

## Zebularine 通过 *SFRP2/Dkk3* 去甲基化调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路诱导食管癌细胞凋亡

张凤霞<sup>1</sup>, 张建东<sup>2</sup>, 单保恩<sup>3</sup>, 储金秀<sup>1,4\*</sup>

(1. 华北理工大学基础医学院, 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 河北 唐山 063200; 2. 河北医科大学第三医院检验科, 河北 石家庄 050000; 3. 河北医科大学第四医院科研中心, 河北 石家庄 050000; 4. 华北理工大学, 河北 唐山 063200)

**摘要:** 研究去甲基化药物 zebularine 对食管癌细胞凋亡的影响及其作用机制。采用不同浓度 (25、50、100、200 和 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) zebularine 处理食管癌 ECA109 和 KYSE170 细胞, CCK-8 法检测细胞活力。选用浓度为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  zebularine 处理细胞, 流式细胞术检测凋亡率, Western blot 检测凋亡蛋白 (Bcl-2 蛋白、Bax 蛋白、cleaved-caspase-3 蛋白和 cleaved-PARP 蛋白) 和 Wnt (wingless-related integration site) 信号通路分子 ( $\beta$ -catenin 蛋白、cyclin D1 蛋白和 c-Myc 蛋白) 的表达量, 实时荧光定量 PCR 检测 Wnt 信号通路上游负调控基因表达水平, 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 法检测人分泌型卷曲相关蛋白 2 (secreted frizzled related protein 2, *SFRP2*) 和 *Dkk3* (dickkopf 3) 基因的甲基化状态。敲低 *SFRP2* 和 *Dkk3* 观察对 zebularine 诱导凋亡的影响。结果显示, zebularine 能抑制 ECA109 和 KYSE170 细胞的活力, 呈剂量和时间依赖性; zebularine 可诱导细胞凋亡, 下调 Bcl-2 蛋白, 上调 Bax、cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP 蛋白的表达, 并抑制  $\beta$ -catenin、cyclin D1 和 c-Myc 蛋白表达, 与阴性对照组比较, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); zebularine 作用后, *Dkk3* 和 *SFRP2* 的 mRNA 表达水平明显升高, *SFRP2* 和 *Dkk3* 启动子甲基化水平降低; 敲低 *SFRP2* 和 *Dkk3* 可降低 zebularine 诱导的细胞凋亡。综上所述, zebularine 降低 *SFRP2* 和 *Dkk3* 基因启动子甲基化水平, 促进 *SFRP2* 和 *Dkk3* 基因表达, 进而通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路诱导食管癌细胞凋亡。

**关键词:** 食管癌; zebularine; 细胞凋亡; 人分泌型卷曲相关蛋白 2; dickkopf 3; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)05-1384-07

## Zebularine induces apoptosis of esophageal cancer cells via demethylation *SFRP2/Dkk3* to regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

ZHANG Feng-xia<sup>1</sup>, ZHANG Jian-dong<sup>2</sup>, SHAN Bao-en<sup>3</sup>, CHU Jin-xiu<sup>1,4\*</sup>

(1. Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases of Basic Medical College, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China; 2. Department of Laboratory Medicine, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 3. Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 4. North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China)

**Abstract:** To explore the effect and mechanisms of demethylation drug zebularine on esophageal cancer cells apoptosis, ECA109 cells and KYSE170 cells were treated with zebularine at different concentrations (25, 50, 100, 200, and 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The cell viability was measured by CCK-8. Flow cytometry was used to detect the cell apoptosis rate, Western blot was performed to determine the expression of apoptosis protein (Bcl-2, Bax, cleaved-caspase-3, and cleaved-PARP) and Wnt signal pathway molecules ( $\beta$ -catenin, cyclin D1, and c-Myc), real-time

收稿日期: 2020-11-26; 修回日期: 2021-01-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673642); 河北省医学科学研究重点课题计划项目 (20170640).

\*通讯作者 Tel: 86-311-88603328, E-mail: chujx19@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1828

quantitative PCR was used to detect the expression level of negative regulatory genes of Wnt signaling pathway, methylation specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of secreted frizzled related protein 2 (*SFRP2*) and dickkopf 3 (*Dkk3*) genes. After knockdown of *SFRP2* and *Dkk3*, the effect of zebularine on apoptosis was detected. The studies showed that zebularine could inhibit the activity of ECA109 and KYSE170 cells in a dose-dependent and time-dependent manner; zebularine could induce cell apoptosis, down-regulate the expression of Bcl-2 protein, up-regulate the expression of Bax, cleaved-caspase-3, and cleaved-PARP protein, and inhibit the expression of  $\beta$ -catenin, cyclin D1, and c-Myc protein ( $P < 0.05$ ); the mRNA expression levels of *Dkk3* and *SFRP2* were significantly up-regulated by zebularine, while the methylation levels of *SFRP2* and *Dkk3* promoters were decreased; knockdown of *SFRP2* and *Dkk3* could reduce the apoptosis induced by zebularine. In summary, zebularine could reduce the methylation level of *SFRP2* and *Dkk3* gene promoter, promote the expression of *SFRP2* and *Dkk3* gene, and then induce the apoptosis of esophageal cancer cells by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Key words:** esophageal cancer; zebularine; apoptosis; *SFRP2*; *Dkk3*; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

食管癌是严重危害人类健康的消化道恶性肿瘤之一,其发病率和病死率位居世界癌症发病率和病死率的第8位和第6位<sup>[1]</sup>。全世界每年食管癌新发病例超过60万,其中大多数发生在中国<sup>[2]</sup>。目前,治疗食管癌的主要方法包括手术切除和化疗。然而,对于复发或转移的患者,手术切除有很大的局限性,术后化疗的效果也不能满足所有患者的需要。此外,耐药表型的频繁获得和“继发性恶性肿瘤”的发生往往与化疗有关<sup>[3]</sup>。因此,选择合适、有效的化疗药物是一个难点。近年来,基于表观遗传学方法的去甲基化药物在抗肿瘤方面展现了良好的前景,目前临床常用的去甲基化药物是地西他滨和阿扎胞苷,它们主要用于血液系统肿瘤,但对实体瘤效果不佳。Zebularine [1-( $\beta$ -D-核呋喃糖基)-1,2-二氢嘧啶-2-酮]是第二代去甲基化药物,目前尚处于临床前研究阶段,与传统去甲基化药物相比,具有稳定性和低毒性<sup>[4]</sup>。研究发现,zebularine具有更广谱的抗肿瘤效果,可抑制多种肿瘤细胞生长,在膀胱癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌和胰腺癌细胞系中均发现,其对癌细胞有较高的靶向作用<sup>[5]</sup>。Zebularine还可通过去甲基化上调抑癌基因的表达<sup>[6]</sup>,进而诱导肿瘤凋亡途径的激活,而且是同类药物中第一种能够通过口服给药来激活表观遗传沉默基因的药物。到目前为止,关于zebularine对人食管癌的抗肿瘤作用,尚未见相关报道。本实验通过研究zebularine对食管癌细胞活性和凋亡机制的影响,为食管癌的治疗提供新的思路和依据。

## 材料与方 法

**细胞系** 人食管癌细胞系 ECA109 和 KYSE170 购自 ATCC。细胞复苏后,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,2~3 天更换 1 次培养液。当细胞生长至 70% 以上进行消化传代,以进行后续实验。

**试剂** Zebularine (Selleck 公司); Annexin V/FITC-PI (BD 公司); 反转录试剂盒和实时定量 PCR 试剂盒 (Thermo 公司); 细胞蛋白提取试剂盒 (北京索莱宝公司); CCK-8 试剂盒,抗  $\beta$ -catenin、cyclinD1 和 c-Myc 抗体 (Abcam 公司); siRNA (上海生工公司); DNA 甲基化试剂盒 (美国 ZYMO Research 公司)。

**CCK-8 法检测细胞活力** 收集对数期的 ECA109 和 KYSE170 细胞,胰蛋白酶消化配成单细胞悬液,以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞均匀接种到 96 孔板。细胞贴壁后更换培养基,分别加入 0、25、50、100、200 和 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  zebularine。每组设置 3 个复孔,作用 72 h 后,加入含 CCK-8 质量分数为 10% 的新鲜培养基 100  $\mu\text{L}$ ,孵育 4 h,通过酶标仪检测各孔在波长 450 nm 处的吸光度值 (A),以对照组调零,绘制曲线。然后选用 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  zebularine 作用细胞,在 0、12、24、48 和 72 h 不同时间点分别测吸光度值。细胞存活率 (%) =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

**流式细胞术检测细胞凋亡** 食管癌细胞以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞数接种于 6 孔板中,经 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  zebularine 处理 48 h,收集细胞, PBS 溶液洗涤 2 次, 1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,然后用结合缓冲液 500  $\mu\text{L}$  溶液重悬管中细胞,每管加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 染液,室温避光孵育 10 min,再加入 PI 染液 5  $\mu\text{L}$ ,轻轻混匀后继续孵育 10 min,经流式细胞仪检测分析。

**Western blot 检测蛋白表达** 收集细胞,BCA 法检测蛋白含量。取等量蛋白 (40  $\mu\text{g}$ ),经 10%~12% SDS-PAGE 电泳 1.5 h,电转膜 2 h,3% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗 (抗 Bax、Bcl-2、cleaved-caspase-3、cleaved-PARP、 $\beta$ -catenin、cyclin D1 和 c-Myc) 和 GAPDH (1:1 000 抗体),4 °C 过夜, PBS 漂洗 3 次,加 HRP 标记二抗 (1:200),37 °C 孵育 1 h,显色。凝胶成像分析系统测定光密度,进行蛋白表达定量分析。

实时荧光定量 PCR 检测 Wnt 信号通路上游负调控基因表达水平 收集对照组和 zebularine (100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用 48 h 后的 ECA109 和 KYSE170 细胞, Trizol 试剂一步法提取细胞总 RNA 并鉴定 RNA 的完整性。以 RNA 为模板逆转录合成 cDNA。实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增, 引物序列见表 1。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40 个循环。结果采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行相对定量分析, 以 GAPDH 为内参照。

MSP 检测 SFRP2 和 Dkk3 基因的甲基化状态 Zebularine 作用 48 h 后, 分别收集对照组和处理组细胞, 常规酚-氯仿法提取细胞基因组 DNA, 用亚硫酸盐修饰试剂盒修饰纯化 DNA。取 3  $\mu\text{L}$  修饰后的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min, 92  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 35 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并在凝胶图像分析仪上分析成像。实验重复 3 次。根据 SFRP2 和 Dkk3 启动子设计 MSP 引物, 引物序列见表 1。

SFRP2 和 Dkk3 siRNA 转染对 zebularine 诱导凋亡的影响 根据 GenBank 上 SFRP2 和 Dkk3 基因序列, 参照 siRNA 设计原则设计合成 SFRP2-siRNA、Dkk3-siRNA 和 Ctrl-siRNA, 序列如下: SFRP2-siRNA: 5'-GAGGAUGACAACGACAUAATT-3', anti-sense: 5'-UUAUGUCGUUGUCAUCCUCTT-3'; Dkk3-siRNA: 5'-AAUGGUCUGGUACUUAUCCdGdC-3', anti-sense: 5'-GGAUAAGUACCAGACCAUUGdCd-3'; Ctrl-siRNA: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', anti-sense: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。采用 Lipofectamine 3000 脂质体进行转染, 实验分组为 Ctrl-siRNA 组、SFRP2-siRNA 组、Dkk3-siRNA 组、zebularine + Ctrl-siRNA 组、zebularine + SFRP2-siRNA 组和 zebularine + Dkk3-siRNA 组, 收集各组细胞, 流式细胞仪检测凋亡率, Western blot 检测  $\beta$ -catenin、cyclin D1 和 c-Myc 蛋白表达变化。

统计学分析 实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析。计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-q 检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

**Table 1** Primer sequences. DACT: Dishevelled-binding antagonist of beta-catenin; SFRP: Secreted frizzled related protein; Dkk: Dickkopf; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Name	Sequence of primer
DACT1	Forward: 5'-GGAAGAGGACAGGCTTGAAAC-3' Reverse: 5'-GTCCATTGTTTCAGAGAAGGTATC-3'
DACT2	Forward: 5'-ACGCAGGGACAGTGGTCTCAT-3' Reverse: 5'-GCAGGAAACAGATGAGCCGG-3'
DACT3	Forward: 5'-CTCCCCAGCGTCGTCTGCTTTA-3' Reverse: 5'-ATTCGCTCTCCCCGTAACCC-3'
SFRP1	Forward: 5'-CCGAGCCCTACGGTGCCCT-3' Reverse: 5'-GGAATCGCTGTCGTTGAAA-3'
SFRP2	Forward: 5'-ATCGGTGCTGTCGCTCAA-3' Reverse: 5'-CATCAGGATGCCGGGACT-3'
SFRP4	Forward: 5'-CCAAAGTCAAAGGGAAGGCC-3' Reverse: 5'-GCAAGTGGTATGTGGCCTTC-3'
SFRP5	Forward: 5'-TCTTCCTGCTCGCTCTTC-3' Reverse: 5'-GGGCTCCAATCACTTTTCG-3'
Dkk1	Forward: 5'-TATCACACCAAAGGCAAGAAG-3' Reverse: 5'-TGATGGTGATCTTTCTGTATCC-3'
Dkk2	Forward: 5'-CGACACACCATGCAGGCCGA-3' Reverse: 5'-CCTGGTCAGGCCGCAATCG-3'
Dkk3	Forward: 5'-GCAGGGGACAGCAAT-3' Reverse: 5'-GGAAGCTGTCTATGAGTTTCG-3'
GAPDH	Forward: 5'-CGCTAACATCAAATGGGGTG-3' Reverse: 5'-TGGTGAAGACGAAAGTGGA-3'
Methylated SFRP2	Forward: 5'-GGCTCGGAGTTTTTCGAGTTGTGT-3' Reverse: 5'-CCGCTCTCTTCGCTAAATACGACTCG-3'
Unmethylated SFRP2	Forward: 5'-TTTTGGTTGGAGTTTTTGGAGTTCTCT-3' Reverse: 5'-AACCCACTCTTCACTAAATACAATCA-3'
Methylated Dkk3	Forward: 5'-GTTTCGGTTGGTAAATGGTC-3' Reverse: 5'-GCCGAACCTACGAATCAAATACG-3'
Unmethylated Dkk3	Forward: 5'-TTTGGTTGGTAAATGGTTGG-3' Reverse: 5'-CACCAACTACAAATACATACAA-3'

## 结果

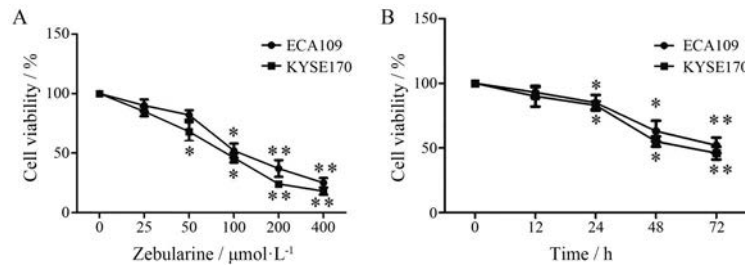
### 1 Zebularine 对食管癌 ECA109 和 KYSE170 细胞活力的影响

为了研究 zebularine 对食管癌细胞活力的影响, 使用 25、50、100、200 和 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  zebularine 作用细胞 72 h, 结果显示 50~400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  zebularine 均能抑制细胞活力 ( $P < 0.05$ ), 其中在 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时细胞活力降低较明显 (图 1A)。选用 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  zebularine, 再以时间为横坐标, 对细胞存活率为纵坐标绘制曲线 (图 1B), 可见在 24~72 h 内, zebularine 作用组的细胞活力低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 其中在 48 h 细胞活力降低较明显。选用抑制率为 50% 左右的 zebularine 作用的浓度

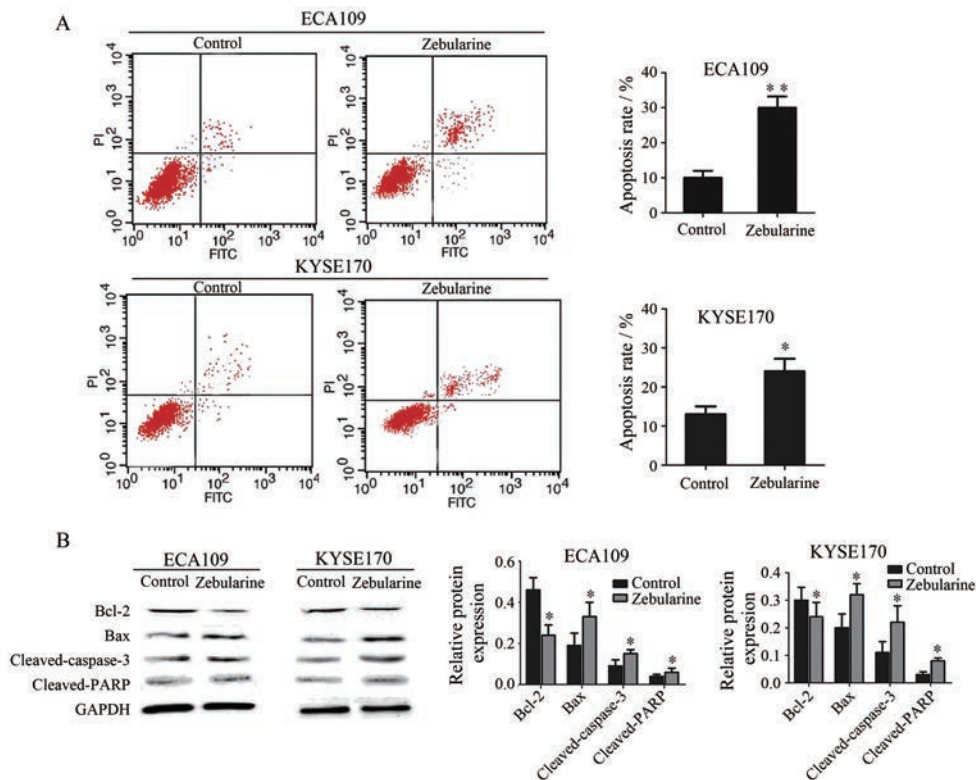
和时间 (分别为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 48 h) 用于后续实验。

### 2 Zebularine 对食管癌 ECA109 和 KYSE170 细胞凋亡的影响

为了确定 zebularine 对食管癌细胞凋亡的影响, 用 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  zebularine 处理 ECA109 和 KYSE170 细胞 48 h, 经流式检测各组细胞凋亡情况。如图 2A 所示, zebularine 组中 ECA109 和 KYSE170 细胞的凋亡率分别为 29.68% 和 23.41%, 与对照组的凋亡率 (10.64% 和 12.13%) 相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。Western blot 结果显示, zebularine 可影响凋亡相关蛋白的表达, 与对照组相比, zebularine 可显著下调 Bcl-2 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 上调 Bax、cleaved-caspase-3 和 cleaved-



**Figure 1** The effect of zebularine on the viability change in esophageal cancer cells. A: ECA109 and KYSE170 cells were treated with zebularine (25, 50, 100, 200, and 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 72 h; B: ECA109 and KYSE170 cells were treated with 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  zebularine for 0, 12, 24, 48, and 72 h. The cell viability was detected by CCK-8. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group

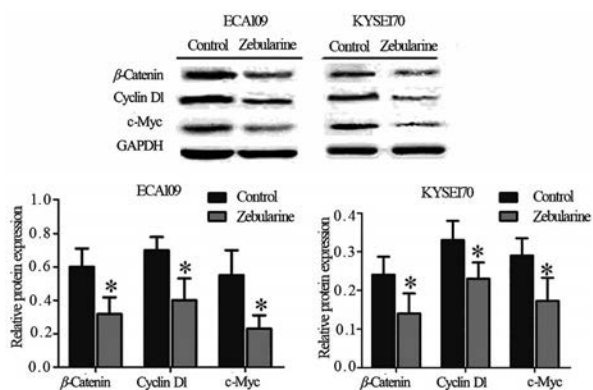


**Figure 2** The effect of zebularine on the apoptosis of ECA109 and KYSE170 cells. A: The apoptosis was analyzed by flow cytometry; B: The protein expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved-caspase-3, and cleaved-PARP were analyzed by Western blot. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group

PARP蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 见图2B。

### 3 Zebularine对Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关蛋白的影响

Western blot结果显示, zebularine作用ECA109和KYSE170细胞后,  $\beta$ -catenin、cyclin D1和c-Myc蛋白表达水平明显降低, 与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图3), 提示zebularine可抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路。



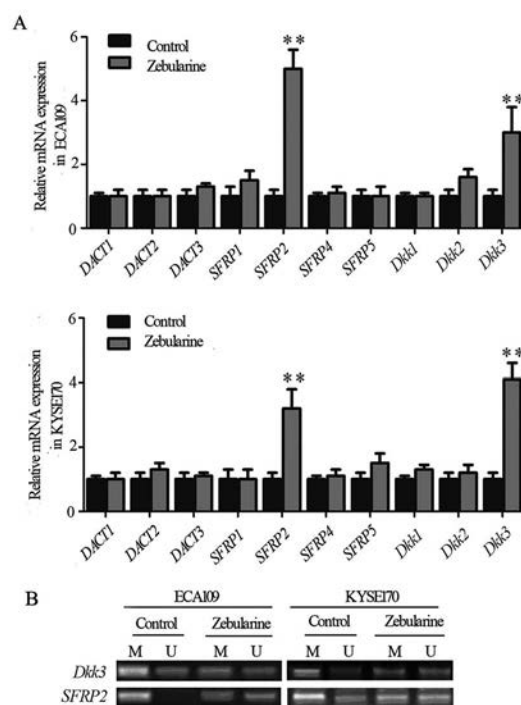
**Figure 3** The effect of zebularine on the expression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway related proteins in ECA109 and KYSE170 cells. After treatment with zebularine ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 48 h,  $\beta$ -catenin, cyclin D1, and c-Myc protein were detected by Western blot. \* $P < 0.05$  vs control group

### 4 Zebularine对SFRP2和Dkk3的mRNA表达和启动子甲基化状态的影响

为了明确zebularine如何影响Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路, 采用实时定量PCR检测Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路上游主要负调控基因: 包括DACT家族基因(DACT1、2和3)、Dkk家族基因(Dkk1、2和3)和SFRP家族基因(SFRP1、2、4和5)的表达情况。结果发现, zebularine作用后, SFRP2和Dkk3基因表达水平明显升高, 与对照组相比差异有统计学意义(图4A)。同时, MSP结果显示, zebularine作用后SFRP2和Dkk3启动子的甲基化水平降低, 非甲基化水平增加(图4B)。以上结果提示, 在食管癌细胞中, zebularine上调SFRP2和Dkk3基因的表达是通过降低启动子甲基化状态实现的。

### 5 沉默SFRP2和Dkk3对zebularine诱导的食管癌细胞凋亡的影响

为了进一步验证zebularine促进细胞凋亡的机制, 用SFRP2-siRNA和Dkk3-siRNA分别转染ECA109和KYSE170细胞, 观察zebularine作用后细胞凋亡变化和Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关蛋白表达的变化。结果显示, 沉默SFRP2和Dkk3后的细胞再经zebularine作用后, 较未沉默SFRP2和Dkk3的细胞凋亡率明显降

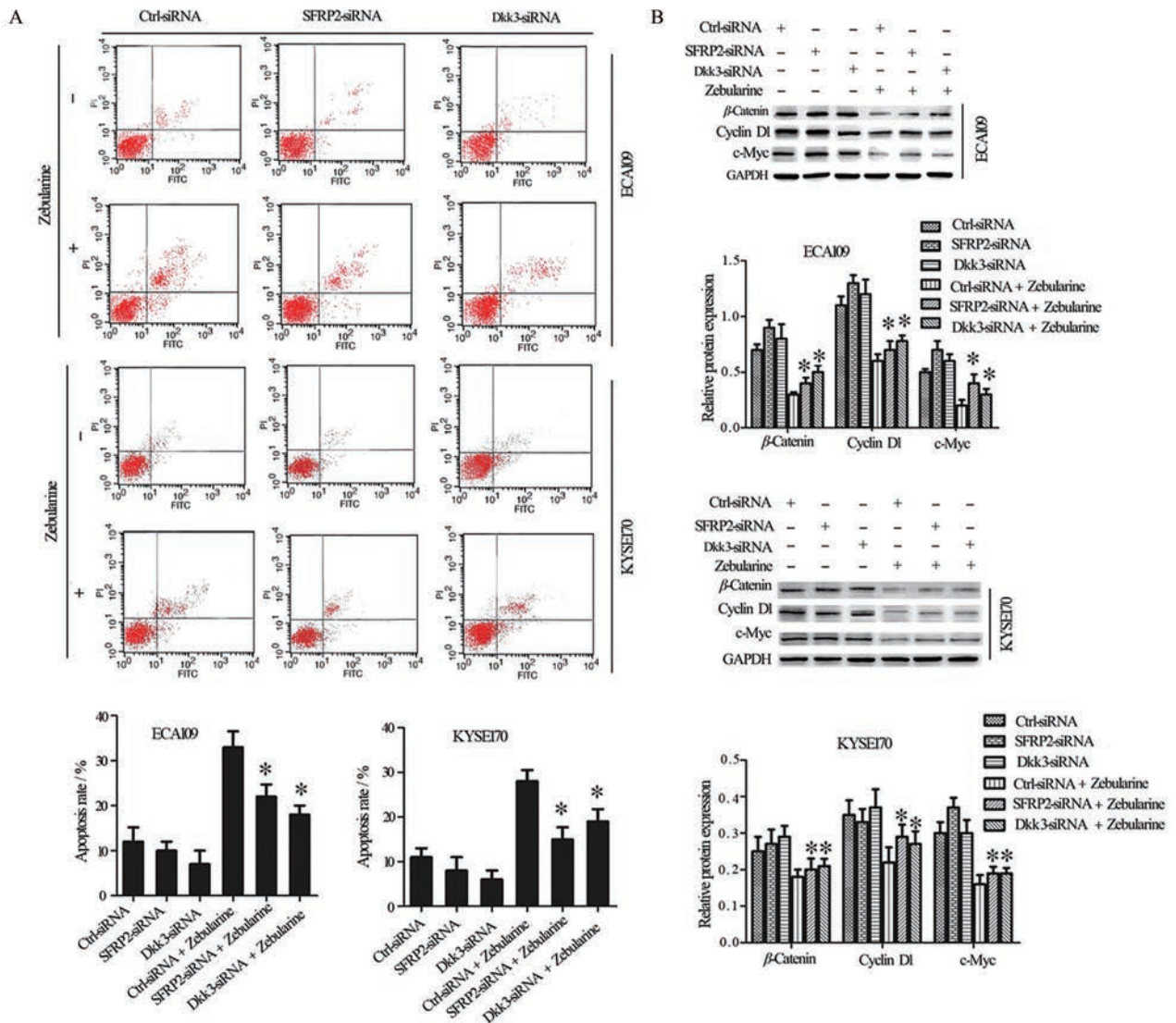


**Figure 4** The effect of zebularine on the mRNA expression of negative regulatory genes of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, and the demethylation of SFRP2 and Dkk3 gene in ECA109 and KYSE170 cells. A: The mRNA expression of negative regulatory genes of Wnt signaling pathway was detected by real-time quantitative PCR; B: The methylation status of SFRP2 and Dkk3 genes was detected by methylation specific PCR (MSP), M represents products amplified by methylated primers, U represents products amplified by unmethylated primers. \*\* $P < 0.01$  vs control group

低 ( $P < 0.05$ ) (图5A),  $\beta$ -catenin、cyclin D1和c-Myc蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ ) (图5B), 表明沉默SFRP2和Dkk3可降低zebularine对Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的抑制作用, 同时降低zebularine诱导的细胞凋亡。

### 讨论

表观遗传变化在致癌过程中起着重要作用, 研究报道表观遗传是治疗癌症的有效途径之一[7,8]。DNA甲基化[9]是最重要的表观遗传修饰之一, 在抗肿瘤中越来越受关注。目前, 一些DNA甲基化抑制药物正在进行临床试验用于治疗多种癌症。Zebularine最初是作为胞苷脱氨酶抑制剂合成的, 然而, 越来越多的研究报道了它作为胞苷类似物的其他作用, 即抑制DNA甲基化和抗肿瘤增殖作用。国内外研究发现, zebularine可通过H2AX磷酸化诱导骨髓瘤细胞凋亡[10], 通过抑制ARHI甲基化增强骨肉瘤细胞的凋亡[11], 通过细胞周期停滞和细胞凋亡抑制肺癌细胞[12]、宫颈癌细胞[13]和恶性间皮瘤细胞[14]的生长。Zebularine还可诱导线粒体



**Figure 5** Effect of knockdown of *SFRP2* and *Dkk3* on zebularine induced apoptosis of esophageal cancer cells. A: The apoptosis was analyzed by flow cytometry; B: The protein expression levels of  $\beta$ -catenin, cyclin D1 and c-Myc were analyzed by Western blot. \* $P < 0.05$  vs Ctrl-siRNA + Zebularine group

诱导的胃癌细胞凋亡<sup>[15]</sup>。这些研究表明, zebularine 可抑制多种肿瘤细胞增殖诱导凋亡, 并且在不同的肿瘤中 zebularine 抑制肿瘤的机制是不同的, 然而 zebularine 对食管癌的作用目前尚不清楚。本研究发现, zebularine 可抑制食管癌细胞 ECA109 和 KYSE170 的活力, 随着浓度增大、作用时间延长, 对细胞抑制效果增强, 同时还发现 zebularine 可诱导 ECA109 和 KYSE170 细胞凋亡。今后, 本课题组还将对 zebularine 诱导食管癌细胞凋亡的机制进行深入探讨。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在肿瘤的发生发展和转移中发挥重要作用。Nakamura 等<sup>[16]</sup>发现 zebularine 可通过 DNMT1-Wnt 轴促进胆管癌细胞死亡, 提示 zebularine 可调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 然而, zebularine 是否

能通过调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进食管癌的凋亡尚不清楚。因此, 本研究进一步探讨 zebularine 和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在食管癌细胞凋亡中的作用机制。结果发现, 食管癌细胞经 zebularine 处理后, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的下游靶分子  $\beta$ -catenin、cyclin D1 和 c-Myc 表达降低, 提示 zebularine 可抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路。

接下来进一步深入研究 zebularine 如何作用于 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 典型的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号从分泌的 Wnt 配体结合到 Frizzled 家族受体开始, 然后触发  $\beta$ -catenin 信号级联反应<sup>[17]</sup>。这一途径受上游主要负调控基因调节, 包括 DACT 家族分子、Dkk 家族分子和 SFRP 家族分子等。据报道, 这些 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通

路上游主要负调控基因的表达水平在各种肿瘤中均不同程度地降低,并且与疾病进展和不良预后相关<sup>[17]</sup>。本研究检测了 zebularine 对 DACT 家族基因 (DACT1、2 和 3), Dkk 家族基因 (DKK1、2 和 3) 和 SFRP 家族基因 (SFRP1、2、4 和 5) 表达的影响,发现 zebularine 能显著上调 *SFRP2* 和 *Dkk3* 基因表达,提示 *SFRP2* 和 *Dkk3* 基因参与了 zebularine 所诱导细胞凋亡。抑癌基因的甲基化是调节基因表达的重要机制<sup>[18,19]</sup>。为了明确 zebularine 对 *SFRP2* 和 *Dkk3* 基因的调节是否与启动子区域甲基化水平有关,本研究检测了启动子区域的甲基化水平,发现 ECA109 和 KYSE170 细胞经过 zebularine 处理后,细胞内 *SFRP2* 和 *Dkk3* 基因启动子甲基化水平降低,非甲基化水平增加。这说明 *SFRP2* 和 *Dkk3* 启动子的甲基化在 zebularine 上调 *SFRP2* 和 *Dkk3* 表达中起重要作用,结合 PCR 结果表明,zebularine 通过影响 *SFRP2* 和 *Dkk3* 基因甲基化水平,调节基因表达。最后为了进一步确定 *SFRP2* 和 *Dkk3* 在 zebularine 诱导的细胞凋亡中的作用,应用 siRNA 敲低 *SFRP2* 和 *Dkk3*,发现沉默 *SFRP2* 和 *Dkk3* 后,zebularine 对细胞凋亡的诱导效应明显降低,对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的抑制作用也降低,表明 *SFRP2* 和 *Dkk3* 在 zebularine 诱导的食管癌细胞凋亡中起到关键的调节作用。

综上所述,zebularine 可以抑制食管癌细胞的生长,其具体机制主要涉及 zebularine 降低 *SFRP2* 和 *Dkk3* 基因启动子甲基化水平,诱导 *SFRP2* 和 *Dkk3* 基因表达,进而通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路诱导食管癌细胞凋亡。本实验可为研究 zebularine 在食管癌中的作用机制提供实验依据。

**作者贡献:** 张凤霞和张建东负责实验和数据分析,完成文章撰写;储金秀和单保恩负责指导实验思路;所有作者均对本文有所贡献。

**利益冲突:** 无利益冲突。

## References

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65: 87-108.
- [2] Lin Y, Totsuka Y, He Y, et al. Epidemiology of esophageal cancer in Japan and China [J]. *J Epidemiol*, 2013, 23: 233-242.
- [3] Huang D, Wang Y, He Y, et al. Paraonase 3 is involved in the multi-drug resistance of esophageal cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 168-172.
- [4] Andersen JB, Factor VM, Marquardt JU, et al. An integrated genomic and epigenomic approach predicts therapeutic response to zebularine in human liver cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2: 54ra77.
- [5] Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, et al. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95: 399-409.
- [6] Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, et al. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 1270-1278.
- [7] Villanueva L, Álvarez-Erriico D, Esteller M. The contribution of epigenetics to cancer immunotherapy [J]. *Trends Immuno*, 2020, 41: 676-691.
- [8] Cao J, Yan Q. Cancer epigenetics, tumor immunity, and immunotherapy [J]. *Trends Cancer*, 2020, 6: 580-592.
- [9] Skvortsova K, Stirzaker C, Taberlay P. The DNA methylation landscape in cancer [J]. *Essays Biochem*, 2019, 63: 797-811.
- [10] Krzeminski P, García-Sanz R, Gutiérrez NC. Zebularine-induced myeloma cell death is accompanied by decreased c-Myc expression [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020, 43: 743-750.
- [11] Ye K, Wang S, Wang J, et al. Zebularine enhances apoptosis of human osteosarcoma cells by suppressing methylation of ARHI [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107: 1851-1857.
- [12] You BR, Park WH. Zebularine inhibits the growth of A549 lung cancer cells via cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Mol Carcinog*, 2014, 53: 847-857.
- [13] You BR, Park WH. Zebularine inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 9723-9731.
- [14] Takemura Y, Satoh M, Hatanaka K, et al. Zebularine exerts its antiproliferative activity through S phase delay and cell death in human malignant mesothelioma cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82: 1159-1164.
- [15] Tan W, Zhou W, Yu HG, et al. The DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces mitochondria-mediated apoptosis in gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430: 250-255.
- [16] Nakamura K, Nakabayashi K, Htet AK, et al. DNA methyltransferase inhibitor zebularine induces human cholangiocarcinoma cell death through alteration of DNA methylation status [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0120545.
- [17] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17: 9-26.
- [18] Zhang J, Xing B, Song J, et al. Associated analysis of DNA methylation for cancer detection using CCP-based FRET technique [J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 346-350.
- [19] Wang B, Yu L, Luo X, et al. Detection of OPCML methylation, a possible epigenetic marker, from free serum circulating DNA to improve the diagnosis of early-stage ovarian epithelial cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14: 217-223.