

SPAG6 基因沉默和地西他滨对 SKM-1 细胞凋亡和 PTEN 甲基化的影响

罗洁^{1,2} 牟佼^{1,2} 刘林¹

¹重庆医科大学附属第一医院血液科 400016; ²重庆医科大学实验研究中心 400016

通信作者: 刘林, Email: liul7776@aliyun.com

【摘要】 目的 探讨 SPAG6 基因沉默和地西他滨在体内外对 SKM-1 细胞凋亡和 PTEN 启动子甲基化的作用。方法 慢病毒载体转染 SKM-1 细胞沉默 SPAG6 基因的表达, 地西他滨处理细胞后 CCK-8 检测细胞存活率, 流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot 和甲基化特异性 PCR 检测 PTEN 的蛋白表达和甲基化情况, 并构建非肥胖糖尿病/重度联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠异体移植瘤模型, TUNEL 法观察肿瘤组织凋亡, 免疫组化检测 PTEN 在组织中表达情况。结果 慢病毒转染后 SPAG6 干扰组 SPAG6 基因被成功沉默; CCK-8 检测结果提示地西他滨处理能够降低 SKM-1 细胞的存活率, 同时流式细胞术检测显示地西他滨处理组的细胞凋亡率 $[(17.35 \pm 3.37)\%]$ 高于未处理组 $[(5.09 \pm 2.06)\%]$, 且 SPAG6 基因沉默联合地西他滨处理组的凋亡率最高 $[(36.34 \pm 4.00)\%]$; 地西他滨处理后 DNMT1 的表达降低而 PTEN 表达升高, 同时 PTEN 启动子甲基化程度降低, 而经地西他滨处理后的 SPAG6 干扰组的 PTEN 去甲基化引起的蛋白表达升高效果最明显; NOD/SCID 小鼠异体瘤移植模型中地西他滨组的肿瘤体积明显小于生理盐水组, 而地西他滨处理 SPAG6 干扰组的小鼠肿瘤体积最小, 且经 TUNEL 检测发现其凋亡程度最高(阳性比值为 3.57 ± 0.48)。结论 SPAG6 基因沉默在 SKM-1 细胞中能增强地西他滨诱导的凋亡和 PTEN 去甲基化作用, 并且在 NOD/SCID 异体瘤移植模型小鼠中能够增强地西他滨的抗肿瘤特性。

【关键词】 骨髓增生异常综合征; 精子相关抗原 6; PTEN 基因; 地西他滨

基金项目: 国家自然科学基金(82070130、81570109)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.12.007

Effects of SPAG6 silencing and decitabine treatment on apoptosis and phosphatase and tensin homolog methylation in SKM-1 cells

Luo Jie^{1,2}, Mu Jiao^{1,2}, Liu Lin¹

¹Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Experimental Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
Corresponding author: Liu Lin, Email: liul7776@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of SPAG6 silencing and decitabine on apoptosis and phosphatase and tensin homolog (PTEN) methylation in SKM-1 cells in vitro and in vivo. **Methods** SKM-1 cells were transfected with a lentiviral vector to silence the expression of SPAG6. Cell survival rate was detected by CCK8 after treatment with decitabine, and cell apoptosis was detected by flow cytometry. Protein expression and methylation of PTEN were detected using Western blot and merozoite surface protein (MSP). An non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency disease (NOD/SCID) mice xenograft tumor model was established, and the apoptosis and PTEN expression of tumor tissue were observed through terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) and immunohistochemistry (IHC), respectively. **Results** After lentivirus transfection, SPAG6 in the interference group was silenced successfully. CCK8 results indicated that the cell survival rate of SKM-1 cells treated with decitabine decreased. Flow cytometry showed that the apoptosis rate of cells treated with decitabine $[(17.35 \pm 3.37)\%]$ was higher than that of the untreated group $(5.09\% \pm 2.06\%)$ and the apoptosis rate of the SPAG6 silencing combined with the decitabine treatment group was the highest $[(36.34 \pm 4.00)\%]$. After treatment with decitabine, the expression of DNMT1 decreased, while the expression of PTEN increased, and the promoter methylation degree of PTEN also decreased. Moreover, the increased protein level caused by PTEN demethylation was the most obvious in the SPAG6 in the interference shRNA group treated with decitabine. In NOD/SCID mice, the tumor volume of the decitabine

group was significantly smaller than that of the placebo group, and the tumor volume of the SPAG6 silencing combined with the decitabine treatment group was the smallest. Additionally, the apoptosis rate was the highest (the positive ratio was 3.57 ± 0.48). **Conclusion** SPAG6 silencing may enhance the apoptosis level and the effect of PTEN demethylation in SKM-1 cells and enhance the antitumor effect of decitabine in the NOD/SCID xenograft mouse model.

【Key words】 Myelodysplastic syndrome; Sperm associated antigen 6; PTEN gene; Decitabine

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82070130, 81570109)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.12.007

骨髓增生异常综合征(MDS)是一组起源于多能造血干/祖细胞的恶性克隆性血液疾病,老年人群多见,以无效造血、难治性血细胞减少及高风险向急性髓系白血病(AML)转化为特征^[1]。其治疗方案包括支持治疗、免疫治疗、去甲基化治疗以及造血干细胞移植等^[2-3],其中地西他滨常被用于MDS的临床治疗,但治疗仍存在局限性^[4-5]。精子相关抗原6(SPAG6)是一种新型肿瘤睾丸抗原^[6-8],课题组前期的研究中证实SPAG6可能和MDS细胞株SKM-1细胞的增殖、凋亡和自噬等活动相关,并参与PI3K/AKT、mTOR等多个通路的调控^[9-12],沉默SPAG6基因可下调SKM-1细胞中甲基转移酶DNMT1的表达^[13]。本研究中,我们通过构建慢病毒载体沉默SPAG6基因,并使用地西他滨处理细胞,探究SPAG6基因沉默与地西他滨处理对SKM-1细胞的凋亡和对PTEN的去甲基化作用,以期探索分子靶向和去甲基化药物联合作用治疗MDS的可能。

材料与方 法

1. 主要试剂:CCK-8试剂购于日本Dojindo公司,DNA提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司,亚硫酸氢盐处理试剂盒购于美国Zymo research公司,TUNEL试剂盒、GAPDH抗体购于上海碧云天生物技术有限公司,地西他滨购于美国MedChem Express公司,SPAG6抗体购于美国Sigma公司,PTEN抗体购于美国Cell Signaling公司,DNMT1抗体购于美国Abcam公司。

2. 细胞株培养:SKM-1细胞由课题组液氮冻存,使用RPMI培养基(含10%的FBS)培养;人肾上皮细胞株293T细胞使用DMEM培养基(含10% FBS),在37℃、5%CO₂的条件下培养。

3. SKM-1细胞转染:慢病毒载体的序列和构建参考课题组前期研究^[14]。收集呈对数生长的SKM-1细胞,以细胞密度 5×10^4 个/ml种板于24孔板中,每孔500 μl,并加入终浓度5 μg/ml的聚凝胺助染,37℃孵育2 h后,按照转染复数(MOI) = 100进行转

染,转染24 h后更换新鲜培养基终止转染,并于转染后3 d荧光显微镜下观察细胞。

4. 蛋白提取和Western blot检测蛋白表达:收集转染5 d后的细胞,加入RIPA冰上裂解细胞后,4℃、12 000×g离心15 min并收集上清液,通过BCA试剂盒测蛋白浓度。总蛋白40 μg用10%的SDS-PAGE凝胶电泳分离后转移到PVDF膜上,然后5%的脱脂牛奶室温摇床上封闭2 h,4℃一抗孵育过夜,次日用山羊抗体二抗室温孵育1 h,最后ECL化学发光法显色检测蛋白表达信号,实验重复3次。

5. CCK-8检测细胞增殖:收集阴性对照(NC)-shRNA和SPAG6-shRNA组SKM-1细胞接种于96孔板中,每孔 5×10^3 个细胞,并加入100 μl的培养基,分别用0、0.1、0.5、1、2、4、6、8和10 μmol/L终浓度的地西他滨处理细胞,72 h后向每孔中加入10 μl的CCK-8试剂,37℃孵育2 h,酶标仪检测450 nm处的吸光度(A)值,并计算细胞存活率,每次实验设3个复孔,实验重复3次。

6. 细胞DNA提取和甲基化特异性PCR:收集细胞,根据DNA提取试剂盒说明书提取细胞DNA,通过EZ DNA甲基化试剂盒进行亚硫酸氢盐转化。扩增方案:95℃预变性10 min;95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环;72℃延长7 min。引物序列:未甲基化上游引物:5'-TATTAGTTT-GGGGATTTTTTTTTT-3',下游引物:5'-CCCAA-CCCTTCCTACACCACA-3';甲基化上游引物:5'-G-TTTGGGGATTTTTTTTTTTCGC-3',下游引物:5'-AA-CCCTTCCTACGCCGCG-3'。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳成像。

7. Annexin V/PI双染法检测细胞凋亡率:2 μmol/L地西他滨或者生理盐水处理72 h后收集细胞,400 μl的PBS重悬,并分别加入5 μl PI和5 μl Annexin V,充分混匀后室温避光反应10 min后上流式细胞仪检测,实验重复3次。

8. 小鼠异体移植瘤的构建:北京华阜康公司购买4~5周龄的雄性非肥胖糖尿病/重度联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠,每只重18~25 g,饲养于重庆

医科实验动物中心。随机将小鼠分为 4 组, 每组 4 只, 收集 NC-shRNA 和 SPAG6-shRNA 组 SKM-1 细胞, 各组小鼠皮下注射 1×10^7 个 SKM-1 细胞。14 d 后, 治疗组小鼠腹腔注射地西他滨 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 安慰剂组小鼠腹腔注射等体积生理盐水, 连续给药 5 d, 每周 3 次观察小鼠体重及肿瘤生长情况。药物治疗后 14 d 或者小鼠肿瘤直径大于 2 cm 或小鼠一般状况差时处死小鼠, 并分离肿瘤组织。所有动物实验操作均经重庆医科大学动物护理与使用委员会批准。

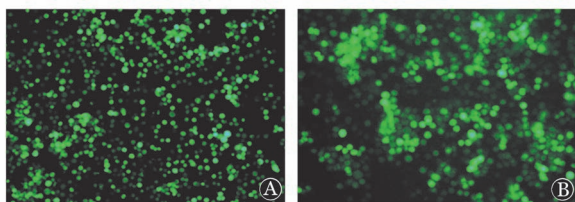
9. TUNEL 检测细胞凋亡: 肿瘤组织切片后二甲苯脱蜡 5 min, 乙醇 100%、90%、80%、70% 浓度梯度水合, 每次 2 min, PBS 冲洗 5 min, 加入蛋白酶 K 工作液, 37°C 作用 20 min 后 PBS 洗涤, 3% H_2O_2 作用 10 min, PBS 洗涤, 向组织样本上滴加 50 μl 生物标记液, 37°C 作用 1 h 后终止, 室温孵育 HRP 工作液后 DAB 显色剂显色。

10. 免疫组化分析: 肿瘤组织切片经脱蜡水化后进行抗原修复, 并向切片上滴加适量的内源性过氧化物酶, 室温孵育 10 min, 再滴加山羊血清封闭 20 min 后滴加一抗稀释液, 4°C 孵育过夜, 之后滴加适量生物素标记山羊抗兔 IgG 聚合物, 室温孵育 15 min, 再滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 室温孵育 15 min 后 DAB 显色液染色, 苏木素复染, 二甲苯透明 2 次, 中性树胶封片。

11. 统计学处理: 使用 SPSS 22.0 和 Graphpad 8.0 进行数据分析, 所有数据以均数 \pm 标准差表示, 两组之间比较采用 *t* 检验, 多组之间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

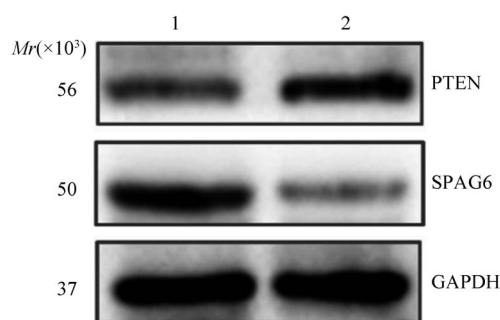
1. 慢病毒载体的转染效率: 慢病毒转染效率如图 1 所示, NC-shRNA 和 SPAG6-shRNA 转染 SKM-1 细胞后荧光显微镜下可见细胞中有大量的绿色荧光信号的表达, 表明 NC-shRNA 和 SPAG6-shRNA 均成功转染 SKM-1 细胞。



A: 阴性对照组; B: SPAG6 干扰组

图 1 慢病毒转染 SKM-1 细胞后荧光显微镜观察荧光信号

2. 慢病毒干扰对 SPAG6 和 PTEN 蛋白表达的影响: Western blot 检测 SPAG6 蛋白表达情况, 较阴性对照组, SPAG6 干扰组 SPAG6 蛋白表达下调、PTEN 蛋白表达上调(图 2)。



1: 阴性对照组; 2: SPAG6 干扰组

图 2 Western blot 检测 SPAG6-shRNA 转染后 SKM-1 细胞 SPAG6 和 PTEN 的表达情况

3. 地西他滨处理 SKM-1 细胞后细胞活力检测: 不同终浓度地西他滨处理阴性对照组和 SPAG6 干扰组 SKM-1 细胞, CCK-8 检测细胞存活率。结果显示, 各浓度地西他滨均可降低细胞存活率, 其中 SPAG6 干扰组的存活率均低于阴性对照组, 且细胞存活率随着药物浓度增加而降低(图 3)。

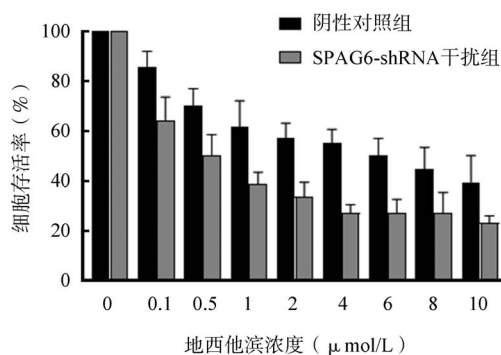
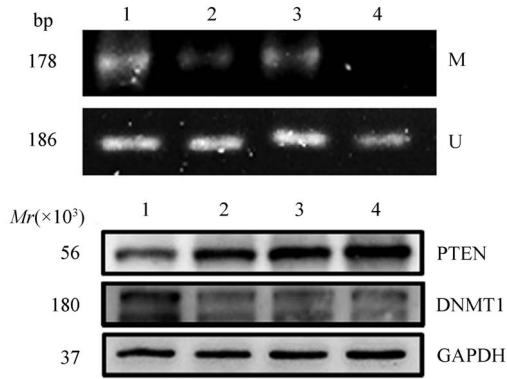


图 3 不同浓度地西他滨处理 SKM-1 细胞 72 h 后 CCK8 检测细胞活力

4. SPAG6 沉默和地西他滨处理后 SKM-1 细胞 PTEN 的表达和甲基化: $2 \mu\text{mol/L}$ 地西他滨处理 SKM-1 细胞 72 h, Western blot 检测示 DNMT1 表达下调, 且 PTEN 的表达升高; 同时甲基化特异性 PCR 结果示, 与地西他滨未处理组相比, 地西他滨处理后 PTEN 的启动子甲基化程度降低, SPAG6 沉默联合地西他滨处理对 PTEN 的去甲基化最强、表达上调最明显(图 4)。

5. SPAG6 沉默和地西他滨处理后细胞凋亡率的变化: $2 \mu\text{mol/L}$ 的地西他滨处理阴性对照组和 SPAG6 干扰组细胞, 72 h 后流式细胞术检测凋亡



1: 阴性对照组; 2: 地西他滨处理阴性对照组; 3: SPAG6 干扰组; 4: 地西他滨处理 SPAG6 干扰组

图 4 地西他滨处理 SKM-1 细胞 72 h 后 PTEN 启动子甲基化(A)以及 PTEN 和 DNMT1 蛋白(B)的表达情况

率。结果显示, 阴性对照组凋亡率为 $(5.09 \pm 2.06)\%$, 阴性对照+地西他滨组凋亡率为 $(17.35 \pm 3.37)\%$, SPAG6 组凋亡率为 $(16.57 \pm 2.85)\%$, SPAG6+地西他滨组凋亡率为 $(36.34 \pm 4.00)\%$, 提示 SPAG6 基因沉默和地西他滨处理均可引起 SKM-1 细胞的凋亡增加, 而 SPAG6 基因沉默和地西他滨处理对凋亡有协同作用(图 5)。

6. SPAG6 基因沉默和地西他滨处理对小鼠异体移植瘤的影响: 构建 NOD/SCID 小鼠的异体移植瘤模型, 结果如图 6 所示, 地西他滨处理组的小鼠肿瘤体积小于生理盐水组, SPAG6 干扰组的小鼠肿瘤

体积较阴性对照组的小鼠体积更小, 其中地西他滨处理后的 SPAG6 干扰组小鼠肿瘤体积缩小最为明显, 提示地西他滨在小鼠体内有抗肿瘤特性。

7. TUNEL 检测小鼠移植瘤的凋亡情况: TUNEL 法检测组织原位细胞的凋亡率, 地西他滨处理组小鼠的肿瘤组织阳性区域面积高于阴性对照组, 同理 SPAG6 干扰组肿瘤组织阳性区域面积也高于阴性对照组(图 7)。同时, 地西他滨处理后的 SPAG6 干扰组凋亡率最高, 与体外研究结果一致, 提示地西他滨可以诱导 SKM-1 细胞体内体外的凋亡, 而 SPAG6 能够增强地西他滨的促凋亡作用。

8. 小鼠移植瘤组织的 PTEN 的表达: Western blot 和免疫组化检测小鼠移植瘤组织中 PTEN 的 DNMT1 的表达情况, 结果提示与阴性对照组相

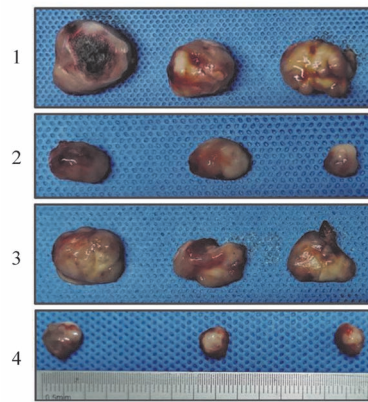
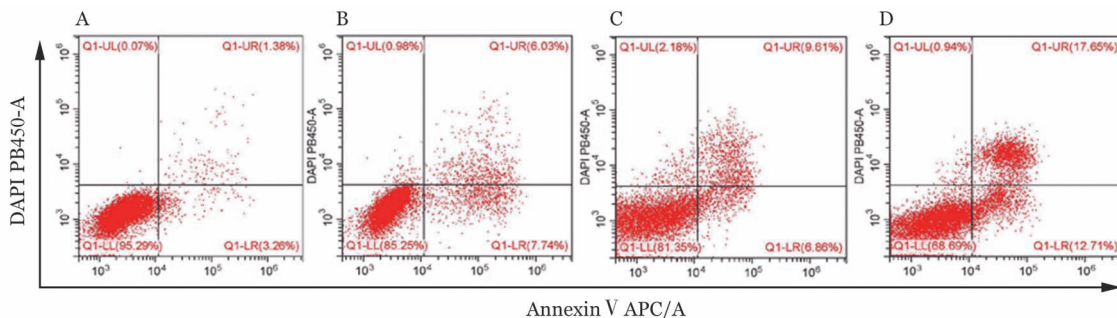
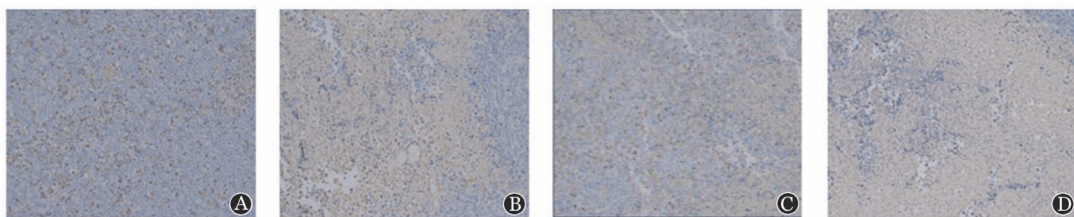


图 6 不同处理组小鼠异体移植瘤组织大小



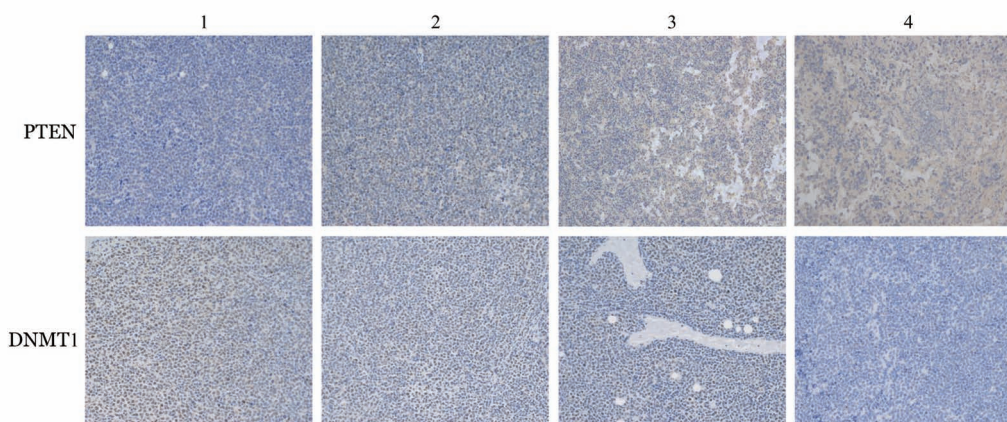
A: 阴性对照组; B: 地西他滨处理阴性对照组; C: SPAG6 干扰组; D: 地西他滨处理 SPAG6 干扰组

图 5 流式细胞学检测地西他滨处理后细胞的凋亡率



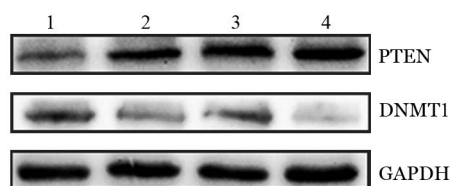
A: 阴性对照组; B: 阴性对照组加地西他滨处理组; C: SPAG6 干扰组加生理盐水组; D: SPAG6 干扰组加地西他滨处理组

图 7 不同处理组 TUNEL 检测肿瘤组织原位细胞凋亡情况($\times 200$)



1: 阴性对照组; 2: 地西他滨处理的阴性对照组; 3: SPAG6 干扰组; 4: 地西他滨处理的 SPAG6 干扰组

图 8 免疫组化检测不同处理组异体移植瘤模型 NOD/SCID 小鼠肿瘤组织中 PTEN 和 DNMT1 蛋白的表达情况



1: 阴性对照组; 2: 地西他滨处理的阴性对照组; 3: SPAG6 干扰组; 4: 地西他滨处理的 SPAG6 干扰组

图 9 Western blot 检测不同处理组异体移植瘤模型 NOD/SCID 小鼠肿瘤组织中 PTEN 和 DNMT1 蛋白的表达情况

比,地西他滨处理组的 DNMT1 表达降低而 PTEN 表达升高,同时 SPAG6 干扰组较阴性对照组 DNMT1 表达水平更低,PTEN 表达水平更高,SPAG6 沉默联合地西他滨处理组的 DNMT1 降低和 PTEN 升高最明显(图 8、图 9)。

讨 论

MDS 是一种起源于多能造血干细胞的恶性克隆性血液疾病,目前的研究认为其发病机制可能和骨髓微环境、体细胞突变、单倍体不足和表观遗传学变化等多种因素有关^[1]。本课题组前期研究发现,SPAG6 基因在 MDS/AML 中高表达^[10],且可能通过影响抑癌基因 PTEN 的表达来调控 PI3K/AKT 通路,但具体 SPAG6 影响 PTEN 表达的机制尚未阐明^[13]。在近来的研究中,前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、肺癌和其他恶性肿瘤中发现了 PTEN 启动子高甲基化水平^[15-19],并被认为其高甲基化水平可能和甲基转移酶的调控有关^[20-21]。

表观遗传包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰等,异常的 DNA 甲基化可作为肿瘤的生物标志物^[21]。地西他滨作为一种 DNA 去甲基化药物,能够竞争性抑制 DNA 甲基转移酶的活性,并通过去甲基化作

用^[22-23]激活肿瘤抑制基因,常用于 MDS 的治疗。除了在血液系统恶性肿瘤中的应用,地西他滨目前也在一些实体肿瘤(包括卵巢癌、前列腺癌和结直肠癌等)中进行临床试验^[24-26]。在本研究中,地西他滨处理细胞后, DNMT1 表达下调, PTEN 表达上调,同时 PTEN 的启动子甲基化程度降低,而 SPAG6 基因沉默能够增加地西他滨对 PTEN 去甲基化的作用。

Wu 等^[27]发现地西他滨可以引起 SKM-1 细胞凋亡率增加,且检测到凋亡抑制因子 Bcl-2 表达下调和促凋亡因子 Bax 表达增高,而韩颖等^[28]的研究表明,地西他滨对细胞的增殖杀伤有着浓度依赖的作用,且影响着 SKM-1 细胞的凋亡和侵袭等生物学功能。在本研究中,流式细胞术检测发现地西他滨处理组的细胞凋亡率均高于未处理组,且 SPAG6 基因沉默可以增加地西他滨的促凋亡作用。

本课题组前期研究通过皮下成瘤构建 SKM-1 细胞小鼠异体移植瘤模型,结果提示 SPAG6 基因沉默能够使小鼠异体移植瘤体积缩小^[13,29]。本研究结果与前期研究一致。此外,本研究我们还发现地西他滨处理组的小鼠肿瘤体积较生理盐水组体积更小,且 TUNEL 检测地西他滨处理组的凋亡程度高于组,提示地西他滨在小鼠体内有抗肿瘤的作用,而地西他滨作用于 SPAG6 干扰组后小鼠的移植瘤体积缩减最多,提示 SPAG6 基因沉默可能增强地西他滨的体内抗肿瘤作用。

综上所述,本研究结果提示地西他滨有诱导 SKM-1 细胞凋亡和 PTEN 去甲基化的作用,且在小鼠移植瘤模型中表现出抗肿瘤生长的作用,而 SPAG6 基因沉默后能够增强地西他滨的体内外作用,因此 SPAG6 靶向沉默联合地西他滨或许能为 MDS 治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 张薇, 付蓉. 骨髓增生异常综合征状态研究进展[J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(7):603-607. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.07.014.
- [2] Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, et al. Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15(1):60-87. DOI: 10.6004/jnccn.2017.0007.
- [3] 赵洪国, 刘锋, 秦铁军, 等. 国产阿扎胞苷治疗较高危骨髓增生异常综合征患者的疗效和安全性分析:多中心、前瞻性、单臂研究[J]. 中华血液学杂志, 2020, 41(10):811-817. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.10.004.
- [4] Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat [J]. Am J Hematol, 2016, 91(1):76-89. DOI: 10.1002/ajh.24253.
- [5] Zeidan AM, Linhares Y, Gore SD. Current therapy of myelodysplastic syndromes [J]. Blood Rev, 2013, 27(5):243-259. DOI: 10.1016/j.blre.2013.07.003.
- [6] Siliņa K, Zayakin P, Kalniņa Z, et al. Sperm-associated antigens as targets for cancer immunotherapy: expression pattern and humoral immune response in cancer patients [J]. J Immunother, 2011, 34(1):28-44. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181fb64fa.
- [7] Neilson LI, Schneider PA, Van Deerlin PG, et al. cDNA cloning and characterization of a human sperm antigen (SPAG6) with homology to the product of the Chlamydomonas PF16 locus [J]. Genomics, 1999, 60(3):272-280. DOI: 10.1006/geno.1999.5914.
- [8] Zhang Z, Sapiro R, Kapfhamer D, et al. A sperm-associated WD repeat protein orthologous to Chlamydomonas PF20 associates with Spag6, the mammalian orthologue of Chlamydomonas PF16 [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(22):7993-8004. DOI: 10.1128/MCB.22.22.7993-8004.2002.
- [9] Zhang M, Luo J, Luo X, et al. SPAG6 silencing induces autophagic cell death in SKM-1 cells via the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2020, 20(1):551-560. DOI: 10.3892/ol.2020.11607.
- [10] Jiang M, Chen Y, Deng L, et al. Upregulation of SPAG6 in Myelodysplastic Syndrome: Knockdown Inhibits Cell Proliferation via AKT/FOXO Signaling Pathway [J]. DNA Cell Biol, 2019, 38(5):476-484. DOI: 10.1089/dna.2018.4521.
- [11] Li X, Yang B, Wang L, et al. SPAG6 regulates cell apoptosis through the TRAIL signal pathway in myelodysplastic syndromes [J]. Oncol Rep, 2017, 37(5):2839-2846. DOI: 10.3892/or.2017.5540.
- [12] 朱春霞, 王利, 罗小华, 等. 精子相关抗原6基因以非P53依赖方式促进TRAIL诱导的骨髓增生异常综合征细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(3):198-204. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201709167.
- [13] Yin J, Li X, Zhang Z, et al. SPAG6 silencing induces apoptosis in the myelodysplastic syndrome cell line SKM1 via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in vitro and in vivo [J]. Int J Oncol, 2018, 53(1): 297-306. DOI: 10.3892/ijo.2018.4390.
- [14] 杨碧慧, 张玉琳, 王利, 等. SPAG6基因RNAi慢病毒载体的构建及其对SKM-1细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(5):474-479. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201408199.
- [15] 殷德涛, 尹峰燕, 郑立运, 等. 甲状腺乳头状癌中PTEN基因启动子甲基化及其蛋白表达的相关性[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 45(4):330-333. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-0860.2010.04.016.
- [16] Chen J, Haanpää MK, Gruber JJ, et al. High-Resolution Bisulfite-Sequencing of Peripheral Blood DNA Methylation in Early-Onset and Familial Risk Breast Cancer Patients [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(17):5301-5314. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2423.
- [17] Roh MR, Gupta S, Park KH, et al. Promoter Methylation of PTEN Is a Significant Prognostic Factor in Melanoma Survival [J]. J Invest Dermatol, 2016, 136(5):1002-1011. DOI: 10.1016/j.jid.2016.01.024.
- [18] Wei F, Wu Y, Wang Z, et al. Diagnostic significance of DNA methylation of PTEN and DAPK in thyroid tumors [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2020, 93(2): 187-195. DOI: 10.1111/cen.14192.
- [19] 延敏博, 孙华宾, 刘燕, 等. PTEN甲基化及其异常表达与膀胱移行细胞癌的关系[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(12): 1249-1251.
- [20] Phuong NT, Kim SK, Lim SC, et al. Role of PTEN promoter methylation in tamoxifen-resistant breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 130(1):73-83. DOI: 10.1007/s10549-010-1304-2.
- [21] Rajendran G, Shanmuganandam K, Bendre A, et al. Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas [J]. J Neurooncol, 2011, 104(2):483-494. DOI: 10.1007/s11060-010-0520-2.
- [22] Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2 [J]. Nat Genet, 1999, 23(2):185-188. DOI: 10.1038/13810.
- [23] Niu C, Li M, Zhu S, et al. Decitabine Inhibits Gamma Delta T Cell Cytotoxicity by Promoting KIR2DL2/3 Expression [J]. Front Immunol, 2018, 9:617. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00617.
- [24] Hanmod SS, Wang G, Edwards H, et al. Targeting histone deacetylases (HDACs) and Wee1 for treating high-risk neuroblastoma [J]. Pediatr Blood Cancer, 2015, 62(1):52-59. DOI: 10.1002/pbc.25232.
- [25] Blagitko-Dorfs N, Schlosser P, Greve G, et al. Combination treatment of acute myeloid leukemia cells with DNMT and HDAC inhibitors: predominant synergistic gene downregulation associated with gene body demethylation [J]. Leukemia, 2019, 33(4): 945-956. DOI: 10.1038/s41375-018-0293-8.
- [26] Luszczek W, Cheryath V, Mekhail TM, et al. Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN- stimulated gene expression [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(8):2309-2321. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0309.
- [27] Wu P, Liu L, Weng J, et al. The Synergistic Effects of Decitabine Combined with Arsenic Trioxide (ATO) in the Human Myelodysplastic Syndrome Cell Line SKM-1 [J]. Indian J Hematol Blood Transfus, 2016, 32(4):412-417. DOI: 10.1007/s12288-015-0632-0.
- [28] 韩颖, 张晋, 季静, 等. 地西他滨抑制 SHP-1 基因甲基化对 MDS 细胞株 Skm-1 增殖及凋亡影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2019, 27(5):1561-1567.
- [29] Yang B, Wang L, Luo X, et al. SPAG6 silencing inhibits the growth of the malignant myeloid cell lines SKM-1 and K562 via activating p53 and caspase activation-dependent apoptosis [J]. Int J Oncol, 2015, 46(2):649-656. DOI: 10.3892/ijo.2014.2768.

(收稿日期:2021-02-03)

(本文编辑:刘爽)