

# 雄黄主要成分二硫化二砷对骨髓增生异常综合征 SKM-1细胞的甲基化作用效应

丁小燕<sup>1</sup>, 王洪志<sup>2</sup>, 张颖<sup>1</sup>, 周庆兵<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院西苑医院老年医学研究所, 北京 100091;

2. 中国中医科学院西苑医院血液病研究所, 北京 100091)

**[摘要]** 目的:从DNA甲基化角度探讨雄黄主要成分二硫化二砷( $As_2S_2$ )对骨髓增生异常综合征细胞株SKM-1细胞的效应机制。方法:细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒检测 $As_2S_2$ (0、1、2、4、8、16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对SKM-1细胞的抑制作用;碘化丙啶(PI)染色法检测 $As_2S_2$ (0、1、2、4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对SKM-1细胞周期的影响;运用人甲基化850K芯片在全基因组范围内观察 $As_2S_2$ (0、4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对SKM-1细胞的甲基化效应并进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)与基因本体(GO)分析;根据芯片数据,选取抑癌基因TUSC3,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)与蛋白免疫印迹法(Western blot)技术观察 $As_2S_2$ (0、1、2、4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对TUSC3 mRNA与蛋白的表达作用。结果:与空白组比较, $As_2S_2$ 对SKM-1细胞具有显著的抑制作用;增加 $G_0/G_1$ 期细胞比例,降低S期细胞比例( $P<0.05$ );850K芯片显示,4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $As_2S_2$ 能显著引起SKM-1细胞基因组的甲基化变化,共有12 710个差异甲基化基因(高甲基化与低甲基化基因各占50%),GO与KEGG数据库分析显示,差异甲基化基因涉及嘌呤代谢,自然杀伤细胞介导的增殖抑制作用,内吞作用,趋化因子信号通路,核泛素连接酶复合体等功能与通路;在下游基因表达方面,Real-time PCR与Western blot显示,与空白组比较, $As_2S_2$ 明显升高抑癌基因TUSC3的表达( $P<0.05$ )。结论:雄黄主要成分 $As_2S_2$ 对MDS细胞株SKM-1细胞具有显著的甲基化调控效应,并可能通过增加抑癌基因TUSC3的表达实现治疗效应。

**[关键词]** 骨髓增生异常综合征; 雄黄; DNA甲基化; 抑癌基因

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R284;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0066-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.202201002

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220307.1657.005.html>

**[网络出版日期]** 2022-03-09 10:04

## Effect of Main Component of Realgar Arsenic Disulfide ( $As_2S_2$ ) on DNA Methylation of SKM-1 Cells with Myelodysplastic Syndrome

DING Xiao-yan<sup>1</sup>, WANG Hong-zhi<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, ZHOU Qing-bing<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Geriatric Medicine, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. Institute of Hematology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects of the main component of Realgar arsenic disulfide ( $As_2S_2$ ) on DNA methylation of SKM-1 cells with myelodysplastic syndrome. **Method:** Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the inhibitory effect of  $As_2S_2$  (0, 1, 2, 4, 8, 16  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on SKM-1 cells. Propidium iodide (PI) staining was applied to detect the effect of  $As_2S_2$  (0, 1, 2, 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on the SKM-1 cell cycle. The effect of  $As_2S_2$  (0, 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on the methylation of SKM-1 cells on a genome-wide scale was observed by using Human Methylation 850K BeadChip, followed by Kyoto Encyclopedia of Genes and

**[收稿日期]** 2022-01-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81603490);北京市自然科学基金青年项目(7174344);国家中医药管理局全国中医临床特色技术传承骨干人才培养项目(010070010)

**[第一作者]** 丁小燕,在读硕士,从事老年相关疾病的防治研究,E-mail:1198949357@qq.com

**[通信作者]** \*周庆兵,副主任医师,博士,从事中医药防治老年相关疾病的机制研究,E-mail:zhouqingbing0910@163.com

Genomes (KEGG) and gene ontology (GO) analyses. According to the microarray data, the antioncogene TUSC3 was selected, and real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were adopted to investigate the effect of  $As_2S_2$  (0, 1, 2, 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on the mRNA and protein expression of TUSC3, respectively. **Result:** Compared with the conditions in the blank group,  $As_2S_2$  inhibited SKM-1 cells, increased the proportion of cells in the  $G_0/G_1$  phase, and decreased the proportion of cells in the S phase ( $P < 0.05$ ). The 850K microarray showed that 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $As_2S_2$  could significantly induce DNA methylation in SKM-1 cells, with 12 710 differentially methylated genes involved (50% hypermethylated and 50% hypomethylated genes). KEGG and GO analyses showed that differentially methylated genes were involved in many important biological functions and signaling pathways, including purine metabolism, natural killer cell-mediated cytotoxicity, endocytosis, chemokine signaling pathway, and nuclear ubiquitin ligase complex. In terms of downstream gene expression, Real-time PCR and Western blot showed that  $As_2S_2$  increased the expression of TUSC3, as compared with the conditions in the blank group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:**  $As_2S_2$ , the main component of Realgar, has a significant regulatory effect on the methylation of SKM-1 cells, which is presumedly achieved by increasing the expression of TUSC3.

[**Keywords**] myelodysplastic syndrome; Realgar; DNA methylation; antioncogene

骨髓增生异常综合征(MDS)是一组起源于造血干细胞的恶性克隆性疾病,以无效造血、难治性血细胞减少以及高风险向急性白血病转化为特点,为血液系统常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。流行病学研究显示,MDS的发病以老年人为主,所以MDS又被认为是一种衰老性疾病<sup>[2]</sup>。现有研究表明MDS的病理机制主要包括基因突变、DNA异常甲基化、染色体异常等,其中MDS基因甲基化的研究一直受到众多研究者的密切关注<sup>[3-4]</sup>。DNA甲基化属于表观遗传学范畴,是指在DNA甲基转移酶的作用下,由S-腺苷甲硫氨酸提供甲基供体,CpG序列胞嘧啶选择性添加甲基基团形成5-甲基胞嘧啶的化学修饰过程。DNA甲基化能够影响基因的下游表达,同时由于DNA甲基化是可逆的,因而也是理想的药物作用靶点。现有研究表明,DNA异常甲基化是导致MDS发病及进展的重要分子机制,针对MDS异常甲基化的治疗是当前MDS的重要治疗策略<sup>[5]</sup>。

MDS属于中医“髓毒劳病”<sup>[6]</sup>，“毒、虚、瘀”为其主要病机要素。近年来,创制了以雄黄为君药的青黄散方案治疗MDS,该方案能解毒化瘀,补肾健脾,临床疗效显著,最近统计了130例经雄黄为主方案治疗3年以上的MDS-MLD患者疗效,其中完全缓解(CR)18例(13.84%)、血液学进步(HI)80例(61.54%)、稳定(SD)24例(18.46%)、CR+HI为75.38%<sup>[7]</sup>,但是青黄散治疗MDS的机制一直尚未明确。本次研究从调控DNA甲基化及抑癌基因的表达出发,观察青黄散方案君药雄黄主要成分 $As_2S_2$ 对MDS来源细胞株SKM-1的作用,以进一步阐明

剂治疗MDS的效应机制。

## 1 材料

**1.1 细胞株** SKM-1细胞株由江苏血液研究所陈苏宁教授惠赠,该细胞株来源于1例MDS转白血病的患者<sup>[8]</sup>。

**1.2 药物、试剂**  $As_2S_2$ (美国Sigma公司,货号519111,纯度>95%),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(南京恩晶生物科技有限公司,货号E1CK-000208-10),澳洲胎牛血清(美国Gibco公司,货号10100-147),DNA提取试剂盒(德国Qiagen公司,货号Y5-69506),RNA提取试剂盒、第一链合成试剂盒、PCR反应试剂盒(北京康为世纪生物公司,货号分别为CW0581、CW0744、CW0956),RIPA裂解液及细胞周期与凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术公司,货号分别为p0013B、C1052),一抗和内参 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国Abcam公司,货号均为ab230520),二抗(北京康为世纪生物科技有限公司,货号Sc-2005)。

**1.3 仪器** Line Gene 9600 Plus型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(杭州Bioer公司),PP-1150型电泳仪、MP-3030型转移槽(北京CAVOY公司),SY-101-1001型850K芯片检测系统(北京中康博生物科技有限公司),SW-CJ-2FD型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),Synergy H1型酶联免疫检测仪(美国BioTek公司),INC153型CO<sub>2</sub>培养箱(德国MEM-MERT公司),CKX53型倒置显微镜(日本Olympus公司),Navios型流式细胞仪(美国Beckman-Coulter公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养与传代** 培养液为含10%胎牛血清的RPMI1640,在含37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养,常规2~3d传代。

**2.2 CCK-8试剂检测SKM-1细胞的存活率** 取指数生长期细胞,调整细胞密度至2×10<sup>5</sup>个/mL,种植在96孔板中,加入不同浓度As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>溶液4μL(终浓度分别为1、2、4、8、16μmol·L<sup>-1</sup>),空白组加入PBS4μL,复孔为5个,培养48h,从CO<sub>2</sub>培养箱中取出96孔板,每孔加入CCK-8试剂10μL,放回培养箱并继续培养1h;ELISA检测仪在460nm波长处测定吸光度A;上述实验重复做2次。

**2.3 碘化丙啶(PI)染色法检测SKM-1细胞周期** 调整指数生长期细胞密度至2×10<sup>5</sup>个/mL,将细胞分为空白组、As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>1μmol·L<sup>-1</sup>组、As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>2μmol·L<sup>-1</sup>组、As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>4μmol·L<sup>-1</sup>组,种植在6孔板中,加药培养处理48h后,按照细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书处理细胞。简要步骤如下:将细胞悬液转移至15mL离心管中,PBS清洗离心,加入预冷的75%医用乙醇并重悬细胞,4℃下固定细胞24h后1000r·min<sup>-1</sup>离心5min(离心半径11cm)去掉乙醇。每个样本加入染色缓冲液0.5mL混匀后避光保存30min,流式细胞仪检测,使用Flow Jo V10软件分析数据。实验重复做2次。

**2.4 人甲基化850K检测与分析** 调整细胞密度至2.0×10<sup>5</sup>个/mL,分为空白组、4μmol·L<sup>-1</sup>As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>组,种植在6孔板中,培养箱中培养48h后收集细胞,分别提取DNA后进行人甲基化850K芯片检测,对差异甲基化基因分别进行基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析。

**2.5 Real-time PCR检测As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>对SKM-1细胞中抑癌基因TUSC3的表达作用** 根据甲基化结果,对目标抑癌基因TUSC3进行PCR检测。分别以不同浓度As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(0、1、2、4μmol·L<sup>-1</sup>)处理SKM-1细胞48h,收集细胞提取RNA进行逆转录(RT-)PCR检测。采用Primer primer 5.0设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游引物5'-GGAGTTCCAGACGCTCAATCT-3',下游引物5'-CGCCAGGAGTTCGCCAGTA-3',产物长度175bp;TUSC3上游引物5'-CCTCTGACTTCAACAGCGA CAC-3',下游引物5'-TGGTCCAGGGGTCTTACT CC-3',产物长度174bp。PCR反应条件为95℃预变性10min,95℃变性15s,60℃退火/延伸30s,共45个循环。使用

2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>方法计算基因的相对表达水平。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>对SKM-1细胞抑癌基因TUSC3蛋白表达** 分别以不同浓度As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(0、1、2、4μmol·L<sup>-1</sup>)处理SKM-1细胞48h,收集细胞提取总蛋白。RIPA裂解液冰上裂解30min进行细胞总蛋白提取,100℃煮沸5min变性;上样后丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶恒压80V,约20min后转分离胶,恒压120V,直至溴酚蓝到凝胶底部;以300mA恒流转至PVDF膜上,转膜时间2.5h;封闭后一抗(1:1000)孵育过夜,洗膜后进行相应二抗(1:5000)孵育,再次洗膜后将PVDF膜置于显色液中1min,暗室中曝光、显影并定影,采用Quantity One v.4.6.2软件读取条带灰度值。

**2.7 统计学方法** 剂量-效应曲线由GraphPad Prism 4绘制,组间比较采用单因素方差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>对SKM-1细胞的抑制作用** 以0~16μmol·L<sup>-1</sup>As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>处理SKM-1细胞48h,不同浓度As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>处理下SKM-1细胞A,浓度越大,A越小( $P < 0.05$ ),见表1;As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>对SKM-1细胞的抑制率,浓度越高,抑制效应越明显( $P < 0.05$ )。见表2。

表1 不同浓度As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>处理下对SKM-1细胞A的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of different concentrations of As<sub>2</sub>S<sub>2</sub> on A of SKM-1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	A
空白组		0.84±0.11
As <sub>2</sub> S <sub>2</sub> 组	1	0.69±0.13
	2	0.63±0.15 <sup>1)</sup>
	4	0.48±0.09 <sup>1)</sup>
	8	0.33±0.03 <sup>1)</sup>
	16	0.25±0.02 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ (表2-表4同)

表2 As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>对SKM-1细胞抑制率的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of different concentrations of As<sub>2</sub>S<sub>2</sub> on inhibition rate of SKM-1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	抑制率/%
空白组		0.00±0.00
As <sub>2</sub> S <sub>2</sub> 组	1	23.37±5.27
	2	33.76±10.10 <sup>1)</sup>
	4	47.28±4.54 <sup>1)</sup>
	8	58.39±6.25 <sup>1)</sup>
	16	69.40±3.09 <sup>1)</sup>

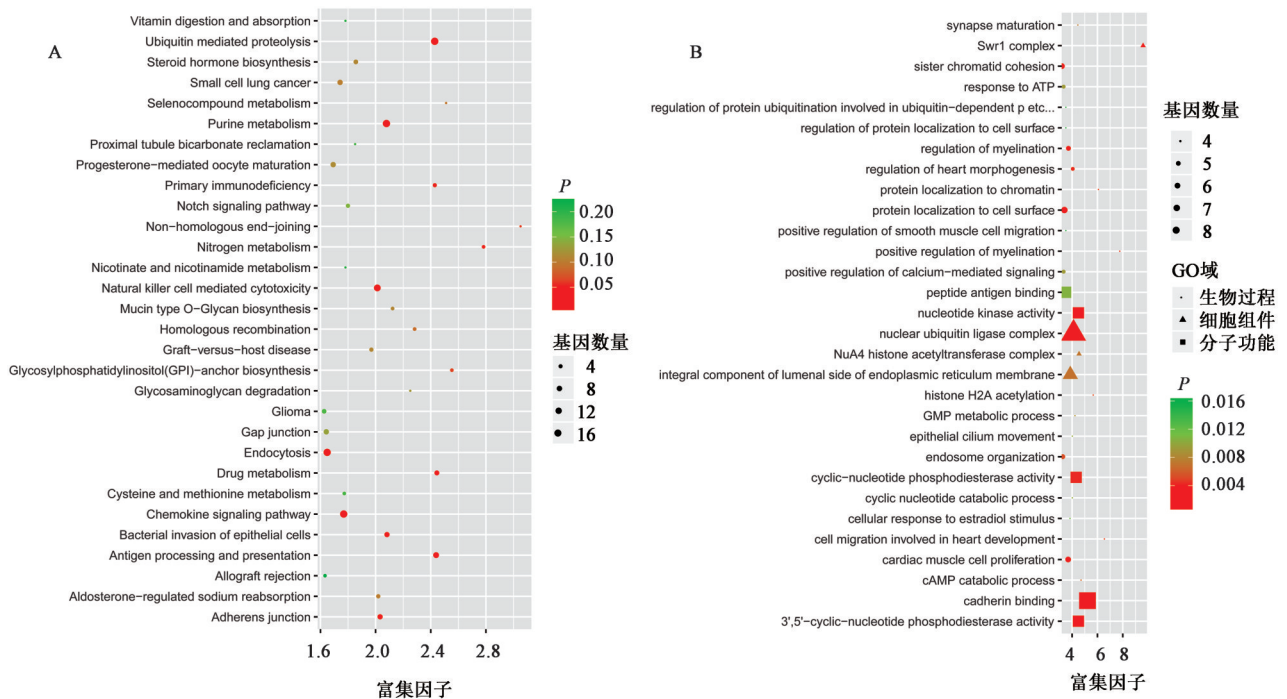
**3.2 对 SKM-1 细胞周期的影响** 与空白组比较, 2、4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{As}_2\text{S}_3$  增加  $G_0/G_1$  期细胞比例, 降低 S 期细胞比例, 浓度越高, 效应越明显 ( $P<0.05$ )。见表 3。

**3.3 对 SKM-1 细胞的甲基化调控效应** 人甲基化 850K 分析显示, 与空白组比较,  $\text{As}_2\text{S}_3$  处理组共有 12 710 个基因的甲基化发生改变, 分别有 6 350 个高甲基化基因与低甲基化基因。GO 与 KEGG 数据库分析显示, 差异甲基化基因涉及嘌呤代谢, 自然杀伤细胞介导的增殖抑制作用, 内吞作用, 趋化因子

表 3  $\text{As}_2\text{S}_3$  对 SKM-1 细胞周期的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$G_0/G_1$	DNA 合成期 (S)	DNA 合成期后期 ( $G_2$ ) %
空白组		19.30 $\pm$ 0.66	75.33 $\pm$ 0.66	3.06 $\pm$ 0.06
$\text{As}_2\text{S}_3$ 组	1	28.33 $\pm$ 2.72	65.00 $\pm$ 2.51	3.50 $\pm$ 0.50
	2	42.66 $\pm$ 1.33 <sup>1)</sup>	48.33 $\pm$ 2.40 <sup>1)</sup>	4.73 $\pm$ 0.26
	4	50.33 $\pm$ 2.60 <sup>1)</sup>	39.33 $\pm$ 5.20 <sup>1)</sup>	6.76 $\pm$ 1.36

信号通路, 核泛素连接酶复合体等功能与通路。见图 1。



注: A. TOP30 通路; B. GO 功能分析

图 1  $\text{As}_2\text{S}_3$  对 SKM-1 细胞甲基化作用及差异甲基化基因的通路及 GO 分析

Fig. 1 Methylation effect of  $\text{As}_2\text{S}_3$  on SKM-1 cells and pathway and GO analysis of differentially methylated genes

**3.4 对抑癌基因 TUSC3 的表达作用** 根据甲基化芯片的结果, 经 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{As}_2\text{S}_3$  处理后 TUSC3 基因的甲基化水平下降。Real-time PCR 显示, 与空白组比较, 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{As}_2\text{S}_3$  能明显升高 TUSC3 mRNA 表达水 ( $P<0.05$ ), 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  与 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{As}_2\text{S}_3$  对 TUSC3 mRNA 表达差异无统计学意义。见表 4。Western blot 显示, 不同浓度  $\text{As}_2\text{S}_3$  处后, 与空白组比较, TUSC3 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ )。见图 2 和表 5。

#### 4 讨论

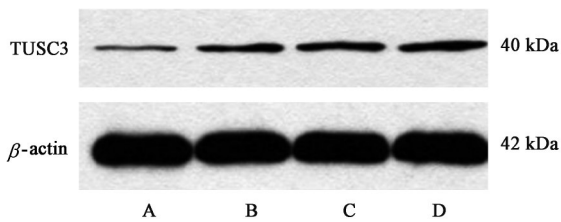
MDS 为血液系统常见的恶性肿瘤, 目前没有药物能治愈本病。纵观 2019 年骨髓增生异常综合征的中国诊断及治疗指南, 当前 MDS 的治疗决策主要

表 4  $\text{As}_2\text{S}_3$  对 SKM-1 细胞抑癌基因 TUSC3 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of  $\text{As}_2\text{S}_3$  on mRNA expression of TUSC3 in SKM-1 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TUSC3
空白组		1.00 $\pm$ 0.00
$\text{As}_2\text{S}_3$ 组	1	1.06 $\pm$ 0.05
	2	0.81 $\pm$ 0.06
	4	1.56 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>

是依据 IPSS 或者 WPSS 的危度分层, 其中去甲基化治疗 (阿扎胞苷与地西他滨) 占有重要地位<sup>[9]</sup>。但是最近关于阿扎胞苷的一项真实世界的临床研究表明, 经阿扎胞苷治疗的高危 MDS 患者其中位生存期



注:A. 空白组;B. As<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 1 μmol·L<sup>-1</sup>组;C. As<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 2 μmol·L<sup>-1</sup>组;D. As<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 4 μmol·L<sup>-1</sup>组

图2 各组SKM-1细胞抑癌基因TUSC3的蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of tumor suppressor gene TUSC3 protein in SKM-1 cells of each groups

表5 As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>对SKM-1细胞抑癌基因TUSC3蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s$ , n=3)

Table 5 Effect of As<sub>2</sub>S<sub>2</sub> on protein expression of TUSC3 in SKM-1 cells ( $\bar{x}\pm s$ , n=3)

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	TUSC3/β-actin
空白组		0.12±0.00
As <sub>2</sub> S <sub>2</sub> 组	1	0.32±0.06 <sup>1)</sup>
	2	0.32±0.04 <sup>1)</sup>
	4	0.37±0.03 <sup>1)</sup>

为18个月左右,去甲基化治疗失败依然十分常见<sup>[10-11]</sup>。近些年来,采用以雄黄(As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>为主)为君药的青黄散方案治疗MDS取得了显著的疗效<sup>[12-16]</sup>,有效地应对了当前MDS的治疗困境,但是砷剂治疗MDS的作用机制依然不够明确。在本次研究中,发现As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>能显著抑制SKM-1细胞的增殖,并能够使细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,初步揭示了As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>治疗MDS的机制。

既往研究表明,MDS存在大量异常的高甲基化基因,如细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂2B(p15)、死亡相关蛋白激酶(DAPK)、DNA结合抑制因子4(ID4)、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、性别决定区Y框蛋白7(SOX7)等<sup>[17-21]</sup>,上述基因大多为抑癌基因,奠定了去甲基化药物治疗MDS的理论基础;与此同时,研究者也发现MDS存在异常的低甲基化基因,原癌基因蛋白(c-Myc)基因具有使细胞无限增殖的能力,是重要的癌基因,1992年TSUKAMOTO等报告了该基因在MDS来源白血病细胞中呈异常低甲基化状态,提示了异常的低甲基化也是MDS的重要病理机制<sup>[18]</sup>,随后研究者陆续发现婆罗双树样基因4(SALL4)、DEAD盒多肽43基因(DDX43)、黑色素瘤优先表达抗原(PRAME)等基因处于低甲基化状态,上述基因大多为癌基因,与造血干细胞的增殖分化密切相关,也是影响MDS发病、进展与预后的重要因素<sup>[22-26]</sup>。在本次研究中,人甲基化850K芯片显示,As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>能引起SKM-1细胞基因组出现大量的

甲基化变化,分别有6355个基因的甲基化出现上调和下调,GO与KEGG数据库分析显示,差异甲基化基因涉及自然杀伤细胞介导的细胞毒作用,内吞作用,趋化因子信号通路,核泛素连接酶复合体等功能与通路,上述功能与通路与肿瘤密切相关。由此可以推断As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>具有双向甲基化调控效应,同时也提示As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>可能是全新的甲基化作用药物,未来需要体内实验以进一步确认As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>的这一双向调控效应。

DNA甲基化对基因的下游表达有调控作用。TUSC3属于抑癌基因<sup>[27-29]</sup>,Blood杂志曾报道该基因在MDS患者中常表现为高甲基化状态<sup>[30]</sup>。本次850K芯片结果提示,As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>对TUSC3基因具有显著的去甲基化效应。与此同时,运用Real-time PCR与Western blot技术发现,As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>能增加TUSC3 mRNA与蛋白表达,这更进一步提示了As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>治疗MDS的可能机制,通过去甲基化增加抑癌基因的表达。

综上所述,研究发现As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>具有显著的甲基化调控效应,能增加抑癌基因TUSC3的下游表达。未来课题组将进一步从动物实验角度出发进行深入研究,进一步阐明雄黄治疗恶性血液病的机制,为中医药防治恶性血液病提供科学依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] CAZZOLA M. Myelodysplastic Syndromes [J]. N Engl J Med, 2020, 383(14): 1358-1374.
- [2] MA X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes [J]. Am J Med, 2012, 125(7 Suppl): S2-S5.
- [3] BLECUA P, MARTINEZ-VERBO L, ESTELLER M. The DNA methylation landscape of hematological malignancies: An update [J]. Mol Oncol, 2020, 14(8): 1616-1639.
- [4] BENETATOS L, VARTHOLOMATOS G. Enhancer DNA methylation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(11): 1999-2009.
- [5] BOND D R, LEE H J, ENJETI A K. Unravelling the epigenome of myelodysplastic syndrome: Diagnosis, prognosis, and response to therapy [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(11): 3128.
- [6] 陈信义,麻柔,李冬云. 规范常见血液病中医病名建议 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(11): 1040-1041.
- [7] 周庆兵,王洪志,王德秀,等. 以雄黄为主方案治疗骨髓增生异常综合征伴多系病态造血患者的远期疗效 [J]. 世界中医药, 2019, 14(10): 2787-2789.

- [ 8 ] NAKAGAWA T, MATOZAKI S. The SKM-1 leukemic cell line established from a patient with progression to myelomonocytic leukemia in myelodysplastic syndrome (MDS) -contribution to better understanding of MDS [J]. *Leuk Lymphoma*, 1995, 17(3/4):335-339.
- [ 9 ] 中华医学会血液学分会. 骨髓增生异常综合征中国诊断与治疗指南(2019年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2019, 40(2):89-97.
- [ 10 ] FENAUX P, HAASE D, SANTINI V, et al. Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(2):142-156.
- [ 11 ] MOZESSOHN L, CHEUNG M C, FALLAHPOUR S, et al. Azacitidine in the 'real-world': An evaluation of 1101 higher-risk myelodysplastic syndrome/low blast count acute myeloid leukaemia patients in Ontario, Canada[J]. *Br J Haematol*, 2018, 181(6):803-815.
- [ 12 ] 麻柔. 骨髓增生异常综合征中西医结合诊疗优势[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(1):21-22.
- [ 13 ] 周庆兵,王洪志,王德秀,等. 以雄黄为主方案治疗骨髓增生异常综合征伴多系病态造血患者的远期疗效[J]. *世界中医药*, 2019, 14(10):2787-2789.
- [ 14 ] ZHOU Q B, YANG X H, WANG H Z, et al. Effect of Qinghuang powder combined with Bupi Yishen decoction in treating patients with refractory cytopenia with multilineage dysplasia through regulating DNA methylation [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25 ( 5 ) : 354-359.
- [ 15 ] ZHOU Q B, ZHU Q Z, WANG H Z, et al. Traditional Chinese medicine containing arsenic treated MDS patients effectively through regulating aberrant hypomethylation[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020:7469809.
- [ 16 ] WANG D X, XU Y G, DU Y, et al. Arsenic concentration in peripheral blood is correlated with efficacy of a traditional Chinese medicine regimen containing realgar for the treatment of myelodysplastic syndrome [J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 41 ( 4 ) : 630-635.
- [ 17 ] QUESNEL B, GUILLERM G, VEREECQUE R, et al. Methylation of the p15 (INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression [J]. *Blood*, 1998, 91 ( 8 ) : 2985-2990.
- [ 18 ] VOSO M T, SCARDOCCIA, GUIDI F, et al. Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes[J]. *Blood*, 2004, 103(2):698-700.
- [ 19 ] WANG H, WANG X Q, XU X P, et al. ID4 methylation predicts high risk of leukemic transformation in patients with myelodysplastic syndrome[J]. *Leuk Res*, 2010, 34(5):598-604.
- [ 20 ] 康慧媛,王新荣,高丽,等. ZO-1 基因甲基化在 MDS 进展中的意义[J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23 ( 3 ) : 746-749.
- [ 21 ] XU Z J, TANG C Y, ZHOU J D, et al. SOX7 methylation is an independent prognostic factor in myelodysplastic syndromes [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(2):322-328.
- [ 22 ] PAPAGGELI P C, KORTSARIS A C, MATSOUKA P T. Aberrant methylation of c-myc and c-fos protooncogenes and p53 tumor suppressor gene in myelodysplastic syndromes and acute non-lymphocytic leukemia[J]. *J BUON*, 2003, 8(4):341-350.
- [ 23 ] QIAN J, ZHU Z H, LIN J, et al. Hypomethylation of PRAME promoter is associated with poor prognosis in myelodysplastic syndrome [J]. *Br J Haematol*, 2011, 154(1):153-155.
- [ 24 ] ZHANG Y Y, ZHOU J D, YANG D Q, et al. Intragenic hypomethylation of DNMT3A in patients with myelodysplastic syndrome [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(3):485-491.
- [ 25 ] LIN J, QIAN J, YAO D M, et al. Aberrant hypomethylation of SALL4 gene in patients with myelodysplastic syndrome[J]. *Leuk Res*, 2013, 37(1):71-75.
- [ 26 ] WU D H, YAO D M, YANG L, et al. Hypomethylation of let-7a-3 is associated with poor prognosis in myelodysplastic syndrome[J]. *Leuk Lymphoma*, 2017, 58(1):96-103.
- [ 27 ] 周晓晗,顾页,林洁. TUSC3 基因与人类癌症相关的研究进展[J]. *转化医学电子杂志*, 2017, 4(6):60-63.
- [ 28 ] 盛须仁,邢松歌,葛勇胜,等. TUSC3 基因在肝细胞癌中的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(1):75-80.
- [ 29 ] WANG S, ZHU W. Tumour suppressor candidate 3 inhibits biological function and increases endoplasmic reticulum stress of melanoma cells WM451 by regulating AKT/GSK3- $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(5):604-612.
- [ 30 ] JIANG Y L, OKEEFE C, DUNBAR A, et al. High throughput methylation arrays allow for identification of complex methylation patterns in MDS [J]. *Blood*, 2007, 110(11):2437.

[责任编辑 周冰冰]