

· 基础研究 ·

DNA 甲基转移酶基因干扰对 K562 细胞癌 - 睾丸抗原表达的影响 *

梁 伟 徐 兰 杨荣秉 初 明 连 觅 朱蕴兰 余培峰 徐碧荷 王月丹[△]

(北京大学基础医学院免疫学系 北京 100191)

摘要 目的 探讨抑制甲基转移酶(DNMT)对 K562 细胞中癌 - 睾丸抗原表达的影响及其机制。方法 分别采用针对 DNMT 家族不同成员的 siRNA 转染 K562 细胞,采用 RT-PCR 检测细胞中 DNMT 及癌 - 睾丸抗原的水平表达,并采用甲基化特异 PCR(MSP)检测部分癌 - 睾丸抗原基因启动子的甲基化状态。结果 经 siRNA 干扰后,K562 细胞中 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 的表达量均明显降低,癌 - 睾丸抗原 CT10 的启动子区序列发生了去甲基化,但处于非甲基化状态的 MAGE-A1 启动子区没有发生任何改变。干扰 DNMT 组的 K562 细胞,再表达癌 - 睾丸抗原 CT10、PRAME 和 CT9,而 MAGE-A1、SSX-1 的表达上调,但是 NY-ESO-1、HCA587 和 HCA661 的表达状况均没有任何影响。结论 在 K562 细胞中,干扰 DNMT 可使部分癌 - 睾丸抗原基因的启动子区发生去甲基化,从而导致相应的癌 - 睾丸抗原分子的再表达或表达增加。

关键词 甲基转移酶 癌 - 睾丸抗原 肿瘤 K562 细胞

中图分类号 R733.7 R392 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)20-3801-04

Effects of Interference of DNA Methyltransferases in Expression of Cancer/Testis Antigens in K562 Cell*

LIANG Wei, XU Lan, YANG Rong-bing, CHU Ming, LIAN Mi, ZHU Yun-lan, YU Pei-feng, XU Bi-he, WANG Yue-dan[△]

(Department of Immunology, School of Basic Medicine, Peking University, Beijing, 100191, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and the underlying mechanisms of inhibiting three kinds of DNA methyltransferases (DNMT1, DNMT3a and DNMT3b) on the expression of cancer/ testis antigen (CTA) in K562 cell. **Methods:** Transient transfection of K562 cell with siRNA was targeted against different members of DNMT family. RT-PCR was used to detect the expressions of DNMTs and CTAs, and the promoter methylation of partial CTA genes was detected with methylation specific PCR (MSP). **Results:** The expressions of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b declined significantly after siRNA interference in K562 cells. Demethylation occurred in the promoter region of CT10, while the promoter region of MAGE-A1 was in a state of unmethylation. CT10, PRAME and CT9, re-expressed in all transfected cells group; The expressions of MAGE-A1 and ssx-1 were up-regulated in transfected cells group; There was not expression of NY-ESO-1 HCA587 and HCA661 in all cells. **Conclusions:** In K562 cells, DNMT can up-regulate the expression of CTA by demethylated the promoter.

Key words: Methyltransferases; Cancer-testis antigen; Tumor; K562 cell line

Chinese Library Classification(CLC): R733.7 R392 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)20-3801-04

前言

髓性白血病是一种源自髓系造血细胞的恶性血液系统增殖性疾病,预后较差。骨髓造血干细胞移植是治疗该病的有效方法,诱导移植后的移植抗白血病 (GVL) 是预防白血病复发的重要手段之一^[1]。癌 - 睾丸抗原(cancer-testis antigen,CTA)是目前肿瘤免疫应答中,研究的热点问题之一。通常情况下,正常人的外周血细胞和骨髓细胞均不表达 CTA,但是,在髓性白血病细胞中可以有不同程度及不同种类 CTA 的表达。通过提高肿瘤细胞的 CTA 表达,有利于机体免疫细胞对肿瘤的识别,有利于诱导 GVL 等抗白血病现象的发生^[2-3]。本研究通过 RNA 干

扰技术抑制髓性白血病细胞株 K562 细胞内甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)的表达,观察其对髓性白血病细胞中多种 CTA 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

髓性白血病细胞系 K562 购自协和医科大学细胞中心。EZ DNA Methylation KIT (ZYMO RESEARCH CORP), Li-pofectamine 2000TM (博奥生物公司);5- 杂氮脱氧胞嘧啶(5-Aza-dC, 美国 Sigma);Trizol RNA 提取试剂(美国 invitrogen);EZgene DNA kit (Biomiga);cDNA Synthesis Kit(fermentas);2× Taq PCR

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目 (30771995)

作者简介 梁伟 (1982),女,硕士研究生,主要研究方向 肿瘤免疫。电话 82801747, E-mail 1oop19@2008.sina.com

[△]通讯作者 王月丹, E-mail 1wangyuedan@bjmu.edu.cn

(收稿日期 2011-05-09 接受日期 2011-05-31)

Master Mix (美国 Biomiga) DNA marker (博奥生物公司),三种 玛公司合成 (见表 1)。
DNMT (DNMT1、DNMT3a、DNMT3b)的 siRNA 序列由上海吉

表 1 三种 DNMT 的 siRNA 序列
Table 1 Sequence of siRNA targeted against DNMT

GENE	SEQUENCE
DNMT1	FORWARD5' GCACCUCAUUUGCCGAAUATT3
	REVERSE5'UAUUCGGCAAAUGAGGUGCTT3'
DNMT3a	FORWARD5' CGAGGUCAAACUCCAUAATT3'
	REVERSE5' UUUUAUGGAGUUUGACCUCGTT3'
DNMT3b	FORWARD5' GCAACGAUCUCUCAAUGUTT3'
	REVERSE5' ACAUUUGAGAGAUCGUUGCTT3'

1.2 siRNA 转染 K562 细胞

收集对数生长期的 K562 细胞按每孔 2×10^6 个细胞接种至至六孔板中。并分别进行如下处理 :1) 阳性对照组。使用终浓度 5mg/m L 的 5-Aza-dC 培养 6h , 更换无血清培养液培养至 48h 2) DNMT1 + 3a + 3b 组。采用针对 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 的 siRNA 转染细胞,转染后培养 6h ,更换无血清培养基后继续培养至 48h 。 3) DNMT1 + 3a 组采用针对 DNMT1 和 DNMT3a 的 siRNA 转染细胞,转染后培养 6h ,更换无血清培养基后继续培养至 48h。 4) DNMT1+ 3b 组采用针对 DNMT1 和 DNMT3b 的 siRNA 转染细胞,转染后培养 6h ,更换无血清培养基后继续培养至 48h。 5) DNMT3a + 3b 组采用针对 DNMT3a 和 DNMT3b 的 siRNA 转染细胞,转染后培养 6h,更换无血清培养基后继续培养至 48h。 6) 阴性对照组采用阴性对照 siRAN 转染细胞, 转染后培养 6h, 更换无血清培养基后继续培养至 48h 。 以上各组中脂质体浓度均为 2ul/ml。细胞转染步骤按 Li-pofectamine 2000TM 脂质体转染试剂说明书进行。

1.3 RT-PCR 检测 DNMT 和 CTA 相关基因表达

实验分组同转染分组, 转染后 48h 采用 Trizol 提取上述各组细胞总 RNA, 按 fermentas kit 的说明书反转录制备 cDNA。在 GeneBank 中检索 DNMT1 (NM_001130823.1)、DNMT3a (NM_175629.1)、DNMT3b(NM_175848.1)、CT10 (NM_016249)、MAGE-A1 (NM_004988.4)、PRAME (NM_206955.1)、SP17 (NM-001009738.1)、NY-ESO-1(NM-001327.2)、HCA587(AF-151 378.1)、HCA661(NM-016521.2)和 SSX1 (NM_005635.2)等 CTA 的 cDNA 序列,利用 PREMIER6 软件设计对应的扩增引物,并由北京鼎国公司合成 (表 2)。引物工作液浓度为 $10\mu\text{mol/L}$, $20\mu\text{l}$ 反应体系中进行 PCR(反应条件见表 2)。收集 PCR 产物,在 2.0%琼脂糖凝胶中进行分离电泳,GOLDENVIEW (上海雷浩信息科技有限公司) 显色,凝胶成像仪 (北京六一仪器厂 WD-9413B)照相记录结果。

1.4 甲基化特异性 PCR(MSP)检测 CT10 和 MAGE1 启动子区的甲基化状态

分组及处理同以上转染组。用 DNA 提取试剂盒,按说明书的操作提取各组细胞的基因组 DNA,并用 EZ DNA 甲基化试

表 2 PCR 引物序列、条件及产物长度
Table 2 Sequence, condition and size of product of RT-PCR

GENE	SEQUENCE	Tm/CYCLE	SIZE OF PRODUCT
DNMT1	F5'CCGTCACCCCTGTTTCTG3'	54℃/30	254 bp
	R5' GTCTTAATTTCCACTCATACAGTGG3'		
DNMT3a	F 5' CATGTCCCTTACACACAAGCAA3'	56℃/35	216bp
	R5'AGACCAGCATTTCCCTGTCTTC3'		
DNMT3b	F5' TGAAACAAGGCACAGTTTTTT3'	50℃/30	170 bp
	R5' TGGTGTCTATTTTGTAGAATAAGGA3'		
CT10	F5'AAAGAGCAATACATGTGCGAC3'	50℃/32	139bp
	R5' CTTTGCATTTCTGTCCCATATG3'		
HCA587	F5' CACAGATGAGGAAGAGGAGGAA3'	54℃/30	104bp
	R 5' GACCACCAAGAATCAGAGAAGAG3'		
HCA661	F 5' CGGCAGGTTCCAGGTCTAAT3'	55℃/30	167bp
	R5' GAGGTCGTCATCGTTGTTGTC3'		
MAGE-A1	F 5' ATGAGTTGCAGCCAAGGC3'	50℃/30	222bp
	R5' CAACCATCCCTTAAAAAAAACA3'		

CT9	F 5' GCTCGGACACAGGAAC TCA3' R5' GCTTCTGATGACTGCTGATGTT3'	55℃/30	176bp
NY-ESO-1	F 5' CGCCTGCTTGAGTTCTACCT3' R5' GTCAGTCGGATAGTCAGTATGTTG3'	55℃/30	158bp
PRAME	F 5' AAGCAGCCACAGTTTCAG3' R5' G TACTTCCCAAGCCAGAATC3'	50℃/35	218bp
SSX-1	F 5' GTTTCAAAAGTCACCTCTCC 3' R5' TGCTTCTGACACTCCCTTC 3'	53℃/33	203bp

剂盒对基因组 DNA 进行亚硫酸钠修饰和纯化,产物进行 PCR 扩增。CT10 和 MAGE1 的 甲基化及非甲基化引物序列 (见表三) ^[4]。MSP 反应总体系 20μl, 甲基化引物或同基因的非甲基化引物各 1μl ,MASTER MIX 10μl, 模板 1μl 。反应条件为^[5]：

95 ℃30s ,60 ℃45s ,72 ℃30s, 30~35 个循环; 延伸 5min。收集 PCR 产物,2.0 %琼脂糖凝胶电泳,GOLDENVIEW 显色,凝胶成像仪记录结果。

表 3 CT10 及 MAGE1 的甲基化和非甲基化引物

Table 3 Methylated primers and unmethylated primers OF CT10,MAGE-A1

GENE	SEQUENCE
CT10(M,273bp)	F5' GGAAG GACGGTGATTTTTTAATAC3' R5' TAATTATC CAAAATAACGCAACG3'
CT10(U , 272bp)	F5GGAAGGATGGTGATTTTTTAATATG3' R5AATTATCCAAAATAACACAACATC3'
MAGE-A1(M,260bp)	F5' GTTAGGAAATATTCGGGTGTTTC3' R5' CTAAATCAAATTCCTTCGACCG3'
MAGE-A1(U ,261bp)	F5' GTTAGGAAATATTTGGGTGTTTGG3' R5' CCTAAATCAAATTCCTTCAACCA 3'

2 结果

2.1 siRNA 对 DNMT 的干扰效果及鉴定

荧光显微镜观察转染效率，采用 Li-pofectamine 2000TM 脂质体转染 K562 细胞,其转染效率 (转染成功的细胞数 / 转染后总存活的细胞数) 可以达到 80%以上 (见图 1 和图 2) 。

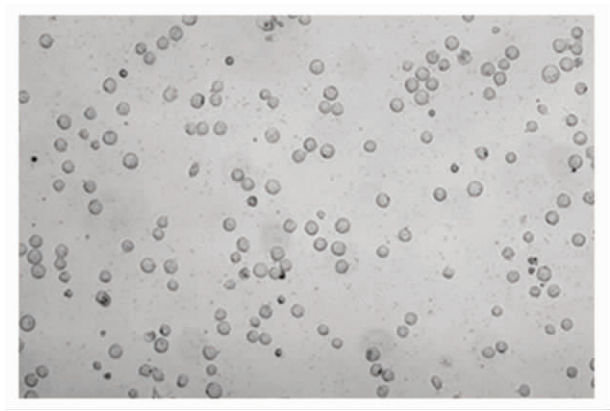


图 1 荧光显微镜观察转染的明场细胞

Fig. 1 Transfected cells in the bright field with fluorescence microscope

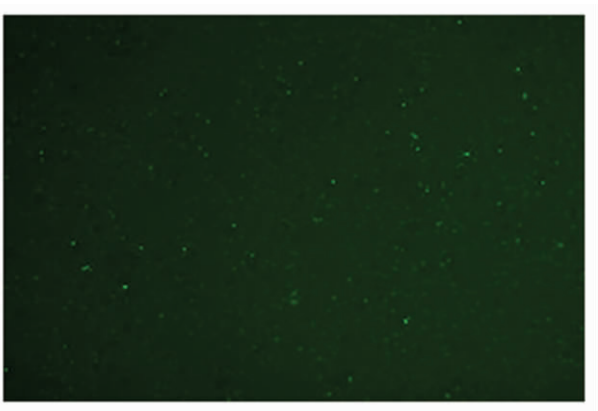


图 2 荧光显微镜观察转染的暗场细胞

Fig. 2 Transfected cells in the dark field with fluorescence microscope

以上二图反应的是明场下和暗场下转染细胞的状况,计数 200 个细胞判断转染效率,效率约为 80%。

2.2 RT-PCR 检测 DNMT mRNA 的表达结果

DNMT1 + 3a + 3b 组、DNMT1 + 3a 组、DNMT1 + 3b 组、DNMT3a + 3b 组中,受相应 siRNA 干扰,DNMT 的表达均降低;

在阳性对照组中 DNMT 的表达明显降低、阴性对照组中 DNMT 的表达较强 (图 3) 。

2.3 siRNA 对 K562 细胞表达的 CTA 水平的调节作用

RT-PCR 检测 CT10、SSX-1、MAGE-A1、CT9、HCA587、HCA661、NY-ESO-1、PRAME mRNA 表达结果 (见图 4 和图

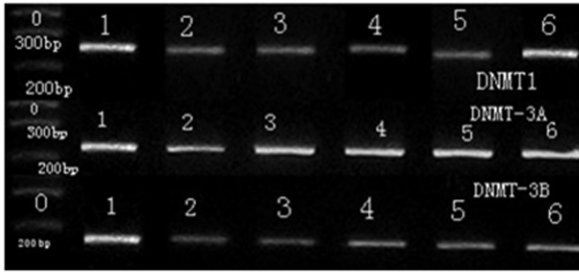


图3 RT-PCR 检测 K562 细胞的 DNMT 基因的表达,0 为 marker ;1 - 6 依次为阴性对照组、阳性对照组、DNMT1 + 3a + 3b 组、DNMT1 + 3a 组、DNMT1 + 3b 组、DNMT3a + 3b 组

Fig.3 Expressions of DNMT genes in K562 detected by PCR,0 is marker,1-6 is respectively negative control, positive control, DNMT1 + 3a + 3b group, DNMT1 + 3a group, DNMT1 + 3b group, DNMT3a + 3b group

5) CT10、CT9 和 PRAME 三个基因在阴性对照组均无表达,而在阳性对照组再表达,干扰组中均呈现再表达,SSX-1 和 MAGE-A1 在各组中均有表达,并且阳性对照中表达上调,干扰组中表达上调,HCA587,HCA661 和 NY-ESO-1 对照组中均无表达,干扰也不能改变其表达。

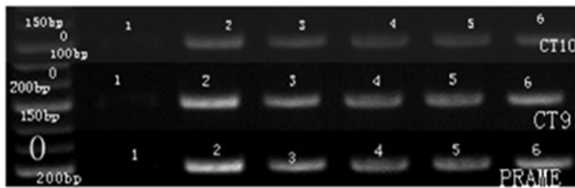


图4 CT10、CT9 和 PRAME 的 mRNA 表达 0 - 6 依次为为MARKER,阴性对照、阳性对照、DNMT1 + 3a + 3b 组、DNMT1 + 3a 组、DNMT1 + 3b 组、DNMT3a + 3b 组

Fig. 4 Expressions of ssx-1 and MAGE-A1 mRNA: 0 is marker,1-6 is respectively negative control, positive control, DNMT1 + 3a + 3b group, DNMT1 + 3a group, DNMT1 + 3b group, DNMT3a + 3b group.

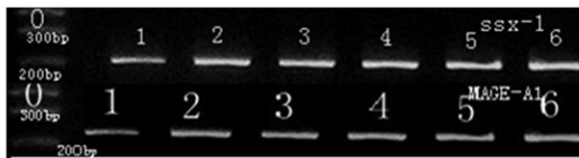


图5 ssx-1 和 MAGE-A1 的 mRNA 表达 0 - 6 依次为为 MARKER,阴性对照、阳性对照、DNMT1 + 3a + 3b 组、DNMT1 + 3a 组、DNMT1 + 3b 组、DNMT3a + 3b 组

Fig. 5 Expressions of ssx-1 and MAGE-A1 mRNA: 0 is marker,1-6 is respectively negative control, positive control, DNMT1 + 3a + 3b group, DNMT1 + 3a group, DNMT1 + 3b group, DNMT3a + 3b group.

2.4 MSP 检测 CT10 及 MAGE1 启动子区甲基化状态

由图 6 可见阴性对照组的 CT10 启动子区处于甲基化状态,其余各组均可检测到不同程度的 CT10 非甲基化条带;另外各组 CT10 的启动子区均可检测到明显的甲基化条带。MAGE-A1 的启动子区只检测到非甲基化条带,无甲基化条带。

3 讨论

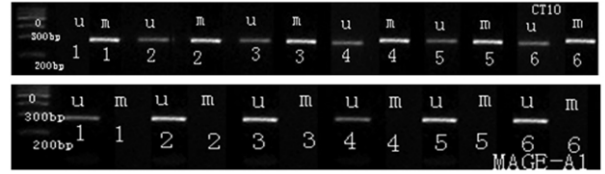


图6 各组启动子区甲基化状态:U- 非甲基化;M- 甲基化;0 -Marker ;1 - 6 依次为阴性对照组、阳性对照组、DNMT1 + 3a + 3b 组、DNMT1 + 3a 组、DNMT1 + 3b 组、DNMT3a + 3b 组

Fig. 6 Methylation status of the promoters ;U- Unmethylated ; M-methylated; 0 is marker,1-6 is respectively negative control, positive control, DNMT1 + 3a + 3b group, DNMT1 + 3a group, DNMT1 + 3b group, DNMT3a + 3b group.

CTA 只特异性表达于人肿瘤细胞和睾丸的精原细胞中,由于精原细胞无人白细胞抗原 (human leukocyte antigen ,HLA) I 类分子的表达,因此,使用以 CTA 表位作为抗肿瘤的 T 细胞特异性疫苗,针对性强且不会导致自身免疫反应。因此,CTA 成为了极具临床应用前景的肿瘤抗原。CTA 包括 MAGE、CT10、NY-ESO-1 和 SSX 等 44 个家族成员。髓性白血病细胞中,MAGE-A1 等 CT 抗原的表达率很高,但在髓性白血病患者中却少见明显的抗白血病免疫应答。目前认为,CTA 的表达率不高及异质性的表达是导致其在白血病免疫应答中效果的主要原因。所以,诱导 CTA 的上调性表达,可能是克服机体对白血病细胞免疫耐受和免疫逃逸的策略之一^[6]。

本研究结果表明, K562 细胞表达 CT 抗原 MAGE-A1 和 SSX-1,但不表达 CT10 和 CT9、PRAME,经过 DNMT siRNA 的干扰后,可以检测到 CT10 和 CT9、PRAME mRNA 的表达。MSP 证实,原来 CT10 的启动子区处于甲基化状态,siRNA 干扰 DNMT 和 5-Aza-dC 处理后,该启动子发生去甲基化,从而导致了 CT10 的表达。DNA 甲基化是一个可逆的过程,由 DNMT,催化甲基化反应,其中 DNMT3a、DNMT3b 主要参与甲基化形成,DNMT1 主要参与甲基化的维持。三种酶在时间或空间方面以特异、有序的方式,相互协调维持 DNA 甲基化谱。Coral 等采用 5-Aza-dC 处理黑色素瘤移植模型小鼠,发现 CTAs 发生再表达,而且与该基因启动子的去甲基化情况同步^[7]。在移植瘤模型小鼠中,P1A(一种小鼠的 CTA) 阴性的癌细胞可发生肺转移,而采用 5-Aza-dC 处理可以使 P1A 发生再表达,从而诱导小鼠体内产生特异性 CTL 细胞,有效地抑制癌细胞的转移。因此,通过抑制 DNMT 诱导去甲基化的发生,促进 CTA 等基因表达,促进机体对白细胞细胞的免疫识别和免疫杀伤。

本研究通过 RNA 干扰的方法,在 mRNA 水平抑制了相应 DNMT 的表达,使得 CT10 等 CTA 基因在 K562 细胞中再表达或表达上调,有助于增强机体抗白血病细胞的免疫应答,对于清楚化疗后残存白血病细胞及诱导骨髓造血干细胞移植后的 GVL 反应均具有潜在的应用前景。

参考文献(References)

- [1] Alois Gratwohl, Helen Baldomero, Mahmoud Aljurf, et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation [J]. JAMA. 2010;303(16): 1617-1624
- [2] Stacey N Akers, Kunle Odunsi ,Adam R Karpf. Regulation of cancer germline antigen gene expression: implications for cancer immunotherapy Future Oncology [J] May 2010, Vol. 6, No. 5, Pages 717-732

(下转第 3808 页)

- communities study[J]. Diabetes, 2004,53(9):2473-2478
- [11] Ceddia RB, Somwar R, Maida A, et al. Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells [J]. Diabetologia, 2005,48(1):132-139
- [12] Combs TP, Berg AH, Obici S, et al. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30 [J]. J Clin Invest, 2001,108(12):1875-1881
- [13] Hung J, McQuillan BM, Thompson PL, et al. Circulating adiponectin levels associate with inflammatory markers, insulin resistance and metabolic syndrome independent of obesity [J]. Int J Obes (Lond), 2008,32(5):772-779
- [14] Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001,86 (5): 1930-1935
- [15] Matsuhisa M, Yamasaki Y, Emoto M, et al. A novel index of insulin resistance determined from the homeostasis model assessment index and adiponectin levels in Japanese subjects [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 77 (1) 151-154
- [16] Nishida M, Moriyama T, Ishii K, et al. Effects of IL-6, adiponectin, CRP and metabolic syndrome on subclinical atherosclerosis [J]. Clin Chim Acta, 2007,384 (1-2): 99-104
- [17] Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism [J]. Trends Endocrinol Metab, 2002,13(2):84-89
- [18] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase[J]. Nat Med, 2002,8 (11): 1288-1295
- [19] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity[J]. Nat Med, 2001,7(8):941-946
- [20] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin[J]. Circulation, 1999,100(25):2473-2476
- [21] Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, et al. Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(7):3236-3240
- [22] Tan KCB, Xu A, Chow WS, et al. Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004,89(2):765-769
- [23] Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor[J]. Clin Chim Acta, 2007,380(1-2):24-30
- [24] Kumada M, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages [J]. Circulation, 2004,109 (17): 2046-2049
- [25] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages [J]. Circulation, 2001,103(8):1057-63
- [26] Zhu W, Cheng KK, Vanhoutte PM, et al. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention[J]. Clin Sci (Lond), 2008,114(5):361-374

(上接第 3804 页)

- [3] Maika Almstedt, Nadja Blagitzko-Dorfs, Jesús Duque-Afonso. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces expression of NY-ESO-1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells[J]. Leukemia Research, Volume 34, Issue 7, July 2010, Pages 899-905
- [4] Honda T, Tamura G, Waki T, et al. Demethylation of MAGE promoters during gastric cancer progression[J]. Br J Cancer, 2004, 90(4): 838-843
- [5] JAMES G. HERMAN, JEREMY R. GRAFF, SANNA MYOHANEN, et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Medical Sciences, September 1996, Vol. 93, pp. 9821-9826
- [6] Leonora Houet, Hendrik Veelken, et al. Active immunotherapy of multiple myeloma [J]. EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 42 (2006) 1653-1660
- [7] Coral S, Sigalotti L, Altomonte M, et al. 5-aza-2-deoxycytidine induced expression of functional cancer/testis antigens in human renal cell carcinoma: immunotherapeutic implications[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(8): 2690-2695
- [8] Kulbhushan T, Idrish YA, Jeena G, et al. 5-Azacytidine prevents cisplatin induced nephrotoxicity and potentiates anticancer activity of cisplatin by involving inhibition of metallothionein, pAKT and DNMT1 expression in chemical induced cancer rats [J]. Toxicology Letters, 2009, 191: 158-166
- [9] Kuendgen A, Lubbert M. Current status of epigenetic treatment in myelodysplastic syndromes[J]. Ann. Hematol, 2003, 87, 601-611
- [10] Lee RH, Song JM, Park MY, et al. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells[J]. Biochem. Pharmacol, 2001, 62: 1013-1023
- [11] Li Y, Hu W, Shen DY, et al. Azacitidine enhances sensitivity of platinum-resistant ovarian cancer cells to carboplatin through induction of apoptosis[J]. Am. J. Obstet. Gynecol, 2009, 200(177):1-9
- [12] Liao Y, Hung MC. Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A-mediated sensitization to apoptosis [J]. Mol. Cell. Biol, 2003, 23, 6836-6848
- [13] Xing Q, Zhang Y, Chen WF. Identification of new cytotoxic T-lymphocyte epitopes from cancer testis antigen HCA587 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 372: 331-335
- [14] Yana Z, Jian Z, Seah HL, et al. Clofarabine induces hypomethylation of DNA and expression of Cancer-Testis antigens [J]. Leukemia Research, 2009, 33:1678-1683
- [15] Rana, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs [J]. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 8, 23-36 (2007)