

• 论 著 •

缺锌对经 MNNG 诱导的 HEEC 氧化应激和甲基化的影响*

黄淑翠, 张慧霞, 党兴波, 韩 菲[△]

(桂林医学院公共卫生学院, 广西 桂林 541199)

[摘要] **目的** 探讨缺锌对经 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)诱导的人正常食管上皮细胞(HEEC)氧化应激和甲基化的影响。**方法** 将细胞分为正常对照组、富锌组、阳性对照组和缺锌组,并分别干预 12、24、48 h。比较各组丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平,以及 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)、MLH1 基因甲基化状态及 MGMT 蛋白表达水平。**结果** TPEN 对 HEEC 的半数抑制浓度为 1.0 μmol/L。4 组各时间点 MDA、GSH-Px 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。4 组 12 h 时 SOD 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。4 组 MGMT、MLH1 基因呈现部分甲基化状态。4 组 24 h 时 MGMT 蛋白表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而在 12、48 h 时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 缺锌会致使经 MNNG 诱导的 HEEC 出现氧化应激、MGMT 和 MLH1 基因甲基化和 MGMT 蛋白异常表达。

[关键词] 食管癌; 锌; 甲基化; 氧化应激

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.06.001

中图法分类号:R735.1

文章编号:1009-5519(2023)06-0901-06

文献标识码:A

Effects of zinc deficiency on oxidative stress and methylation of HEEC induced by MNNG*

HUANG Shucui, ZHANG Huixia, DANG Xingbo, HAN Fei[△]

(College of Public Health, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541199, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of zinc deficiency on oxidative stress and methylation of human normal esophageal epithelial cells(HEEC) induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG). **Methods** The cells were divided into the normal control group, the zinc-rich group, the positive control group and the zinc-deficient group, and intervened for 12, 24 and 48 hours respectively. The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px), methylation status of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase(MGMT) and MLH1 genes and expression level of MGMT protein were compared in each group. **Results** The median inhibitory concentration of TPEN on HEEC was 1.0 μmol/L. The levels of MDA and GSH-Px in the four groups at different time points were significantly different($P < 0.05$). The level of SOD in the four groups at 12 hours was significantly different($P < 0.05$). MGMT and MLH1 genes in the four groups showed partial methylation. The expression level of MGMT protein in the four groups was significantly different at 24 hours($P < 0.05$), but there was no significant difference at 12 and 48 hours($P > 0.05$). **Conclusion** Zinc deficiency can lead to oxidative stress, methylation of MGMT and MLH1 genes and abnormal expression of MGMT protein in HEEC induced by MNNG.

[Key words] Esophageal cancer; Zinc; Methylation; Oxidative stress

食管癌作为食管上皮来源的恶性肿瘤,是最为常见的,其发生率和病死率在恶性肿瘤中分别占第 8 位和第 6 位^[1]。我国是世界上食管癌发生率和病死率最高的国家。食管癌具有很明显的地区差异性,且 90% 以上是食管鳞状细胞癌^[2],其在早期不易被发

现,发展到中期后存在治疗难、预后差等问题,严重威胁着人们的生命健康。食管癌的发生、发展涉及多种复杂的机制和因素,且具有明显的家族遗传易感性,这对于食管癌的临床治疗、干预和预后都是一个严峻的挑战。因此,揭示食管癌的诱发、发生、发展规律,

* 基金项目:广西高校中青年教师科研能力提升项目(2019KY0546);桂林医学院中青年教职工科研提升项目(20502018021);桂林医学院大学生创新创业训练计划项目(201910601064)。

作者简介:黄淑翠(1998—),本科,主要从事肿瘤表观遗传学研究。△ 通信作者,E-mail:buxingzhe-1@163.com。

对其进行早期预防、早期诊断与治疗显得尤为重要。

锌是机体必需的微量元素之一,几乎每一个生理生化过程都直接或间接需要锌。锌是机体中绝大多数金属酶的组成部分,这些酶没有锌就不能发挥作用。在细胞水平上,锌起着关键的催化、调节和结构组成等作用,与机体抗氧化自由基、抗衰老、抗癌变等生物过程密切相关^[3]。目前已有大量研究表明,如果机体长期处于缺锌状态,可导致细胞内信号转导发生异常,干扰细胞跨膜转运,影响蛋白质生物合成和机体抗氧化,从而引起机体氧化应激和致使细胞损伤修复功能受损,其可能在肿瘤的发生、发展中起着重要作用^[4]。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)作为一种单功能烷化剂,被认为是环境中广泛存在的化学诱变剂和化学致癌物,可直接靶定 DNA 作用的遗传毒物导致点突变、细胞凋亡等,其中 O⁶-甲基鸟嘌呤是导致其突变的主要 DNA 损伤类型,而 O⁶-甲基鸟嘌呤损伤与肿瘤的发生存在密切关联^[5]。因此,本研究采用体外细胞实验探讨了缺锌对经 MNNG 诱导的人正常食管上皮细胞(HEEC)氧化应激、甲基化和相关基因表达等的影响,为食管癌早期检测及预测营养干预在食管癌发生中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

人正常食管上皮永生化细胞系(广州华拓生物技术有限公司),ZnSO₄·7H₂O(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),MNNG(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),四吡啶甲基乙二胺(TPEN,北京索莱宝公司),四氮唑蓝(MTT,25 mg,北京索莱宝公司),磷酸盐缓冲溶液(北京索莱宝公司),二甲基亚砜细胞培养液(北京索莱宝公司),青链霉素溶液(北京索莱宝公司),RPMI1640 培养液(美国 Gibco 公司),胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%,不含酚红,美国 Gibco 公司),南美进口胎牛血清(美国 Gemini 公司),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成公司),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成公司),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成公司),双辛可宁酸(BCA)蛋白定量试剂盒增强型(上海碧云天公司),一抗、二抗稀释液及 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)抗体(上海碧云天公司)。

倒置荧光显微成像系统(日本 Nikon 公司),分析天平(波兰 RADWAG 公司),紫外分光光度计(美国 Thermo 公司),CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),倒置显微镜(德国 Leica 公司),离心机(德国 Eppendorf 公司),电泳仪(上海天能科技有限公司),一体式化学发光成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司),高压蒸汽灭菌器(日本 SANYO 公司)。

1.2 方法

1.2.1 染毒剂量确定

TPEN 水平的确定采用 MTT 检测法^[6]。测定前收集对数生长期融合大致达到 90% 的对数生长期细胞,细胞悬浮液水平为 4×10⁴~4×10⁵/mL。配置 7 种不同水平 TPEN(分别为 0.2、0.4、0.8、1.0、2.0、4.0、8.0 μmol/L)^[7-9]。绘制细胞抑制曲线,采用改良寇氏法计算 TPEN 对 HEEC 的半数抑制浓度。

1.2.2 分组及染毒处理

将细胞分为 4 组,即正常对照组、富锌组、阳性对照组和缺锌组,各组分别干预 12、24、48 h^[10-12]。观察细胞形态结构变化,染毒干预结束后收集各组细胞进行相关指标检测。见表 1。

表 1 实验分组及染毒处理

组别	干预处理	MNNG 染毒 (mol/L)
正常对照组	正常培养液	—
富锌组	50 μmol/L ZnSO ₄ ·7H ₂ O 培养液	1.5×10 ⁻⁵
阳性对照组	正常培养液	1.5×10 ⁻⁵
缺锌组	1 μmol/L TPEN 培养液	1.5×10 ⁻⁵

注:—表示无此项。

1.2.3 MDA、SOD、GSH-Px 水平检测

各组细胞染毒干预结束后,对实验细胞进行消化、超声波破碎等常规检测前处理后,严格按照 MDA、SOD、GSH-Px 试剂盒的检测说明,定量检测细胞裂解液中 MDA、SOD 和 GSH-Px 水平,每项实验重复 3 次。

1.2.4 MGMT、MLH1 基因甲基化状态检测

将染毒干预后超低温冻存的 HEEC 取出使用试剂盒对基因组 DNA 进行提取。使用甲基化特异性聚合酶链式反应(MSP)试剂盒将重亚硫酸盐转化处理后的基因组 DNA 样本作为模板,扩增片段为 400 bp,反应体系为 20 μL。聚合酶链式反应程序为:95 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 20 s,60 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 20 s,35 个循环,最后 72 °C 再延伸 5 min 后结束。对目片段进行扩增,聚合酶链式反应产物进行电泳。MSP 产物判断:(1)仅扩增出非甲基化条带,判定为未甲基化;(2)同时扩增出甲基化和非甲基化条带,判定为部分甲基化;(3)仅扩增出甲基化条带,判定为完全甲基化。引物序列见表 2。

1.2.5 MGMT 蛋白表达水平检测

蛋白质免疫印迹技术作为细胞分子生物学研究中一项不可或缺的技术,主要用于蛋白表达水平的测定。测定开始前将染毒干预后超低温冻存的 HEEC 取出,速融离心处理后以常规方法提取 HEEC 总蛋白。首先使用 BCA 试剂盒测定各组相对应的蛋白水平,随后配置分离胶、上样,依次电转、电泳、转膜、封闭、化学发光显影,检测 MGMT 蛋白表达水平。使用 Image J 软件分析目

标条带的灰度值,计算 MGMT 蛋白相对表达量,其中蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

表 2 引物序列

基因	扩增	基因序列(5'→3')	长度 (bp)
MGMT	M	F:TAT TTT TGT GAT AGG AAA AGG TAC G R:TAA AAC AAT CTA CGC ATC CTC G	191
	U	F:ATT TTT GTG ATA GGA AAA GGT ATG G R:CTA AAA CAA TCT ACA CAT CCT CAC T	191
MLH1	M	F:GAG TAG GGT TAA CGT TAG AAA GGT C R:ATT AAT TCG TTT TTA AAA ACT CGA A	176
	U	F:GTA GGG TTA ATG TTA GAA AGG TTG T R:ATT AAT TCA TTT TTA AAA ACT CAA A	174

注:M 为甲基化引物扩增;U 为非甲基化引物扩增。

1.3 统计学处理 采用 SPSS28.0 软件对数据进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 *LSD* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 通过倒置显微成像系统观察,HEEC 大小较均匀,细胞核清晰,排列整齐。在 25 cm^2 培养瓶中,2~3 d 可生长融合至 70%~80%。见图 1。

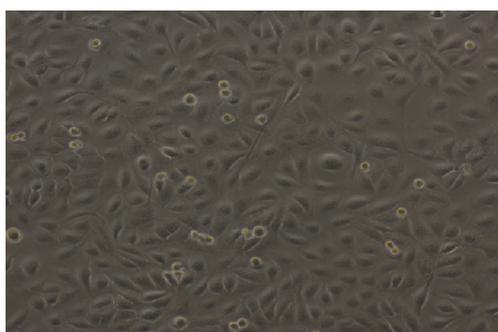


图 1 HEEC 镜下形态图(400×)

2.2 不同水平 TPEN 对 HEEC 抑制率影响 TPEN 水平越高,细胞中所含锌水平越低,其生长受到的抑制越明显。见图 2。改良寇氏法计算得出,TPEN 对 HEEC 作用的半数抑制浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.3 各组 MDA、SOD、GSH-Px 水平比较 (1)2 组间比较:阳性对照组 24、48 h 时 MDA 水平高于正常对照组,差异有统计学意义($t_{24} = -4.879, t_{48} = -9.211, P < 0.05$)。阳性对照组 24、48 h 时 SOD 水平低于正常对照组,差异有统计学意义($t_{24} = 4.792, t_{48} = 4.760, P < 0.05$)。阳性对照组各时间点 GSH-Px 水平低于正常对照组,差异有统计学意义($t_{12} = 3.574, t_{24} = 3.662, t_{48} = 3.827, P < 0.05$)。(2)多组

间比较及两两比较:4 组各时间点 MDA 水平比较,差异有统计学意义($F_{12} = 10.087, F_{24} = 15.113, F_{48} = 145.063, P < 0.05$)。进一步两两比较显示,富锌组与阳性对照组各时间点比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);其余各组间各时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。4 组 12 h 时 SOD 水平比较,差异有统计学意义($F_{12} = 25.261, P < 0.05$);而 24、48 h 时 SOD 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。进一步两两比较显示,富锌组与阳性对照组、缺锌组与阳性对照组 12 h 时比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);其余各组间各时间点差异无统计学意义($P > 0.05$)。4 组各时间点 GSH-Px 水平比较,差异有统计学意义($F_{12} = 77.498, F_{24} = 5.841, F_{48} = 14.604, P < 0.05$)。进一步两两比较显示,缺锌组与阳性对照组 12 h 时、富锌组与阳性对照组 24 h 时、缺锌组与阳性对照组 24 h 时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);其余各组间各时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。(3)组内比较:阳性对照组、缺锌组中不同时间点 MDA 水平比较,差异有统计学意义($F_{\text{阳性对照组}} = 23.895, F_{\text{缺锌组}} = 19.469, P < 0.05$)。进一步两两比较显示,阳性对照组中 24 h 时与 48 h 时比较,缺锌组中 12 h 时与 24 h 时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);其余各组内各时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。阳性对照组中各时间点 SOD、GSH-Px 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。富锌组、缺锌组中各时间点 SOD、GSH-Px 水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较显示,富锌组、缺锌组中 24 h 时 SOD 水平与 48 h 时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);其余各组内各时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。富锌组中 12 h 时 GSH-Px 水平分别与 24、48 h 时比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);缺锌组中 12 h 时 GSH-Px 水平与 48 h 时比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);其余各组内各时间点差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

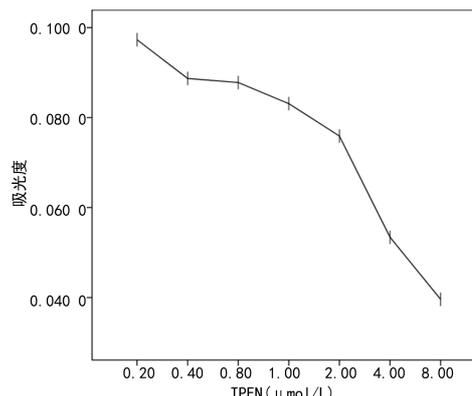


图 2 不同水平 TPEN 对细胞吸光度的影响

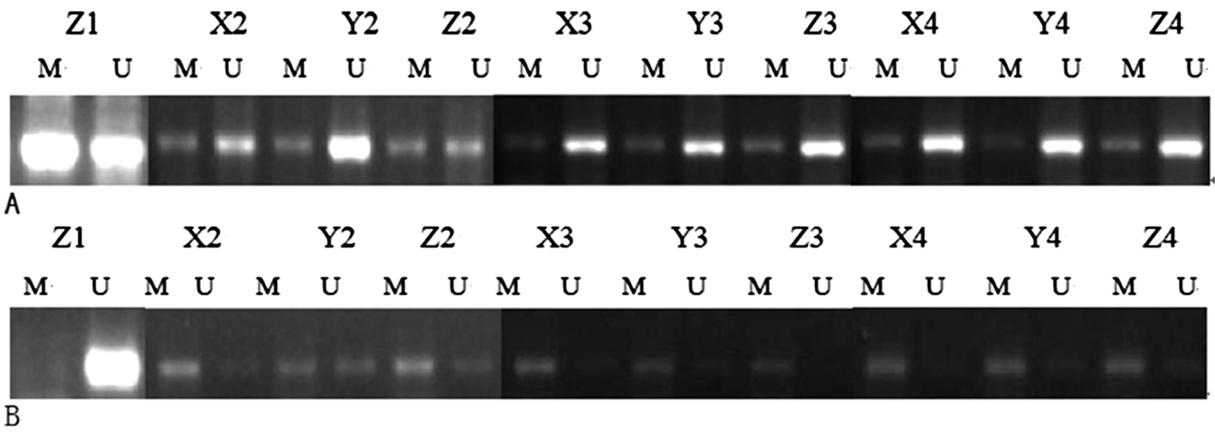
2.4 各组 MGMT、MLH1 基因甲基化情况 各组

MGMT、MLH1 基因扩增产物电泳结果见图 3。48 h 时,正常对照组与其余各组中均可见 MGMT 基因甲基化的特异性基因片段和非甲基化的特异性基因片段。各组 MGMT 基因呈现部分甲基化状态(图 3A)。48 h 时,正常对照组仅出现 MLH1 基因非甲基化的

特异性基因片段,24、48 h 时阳性对照组出现 MLH1 基因非甲基化的特异性基因片段和甲基化的特异性基因片段,其余各组均可见 MLH1 基因甲基化的特异性基因片段。各组 MLH1 基因可呈现部分甲基化和全甲基化状态(图 3B)。

表 3 各组 MDA、SOD、GSH-Px 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA(nmol/mg)			SOD(U/mg)			GSH-Px(nmol/mg)		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
正常对照组	0.40±0.17	0.41±0.10	0.40±0.05	89.36±4.76	90.23±4.77	89.23±4.71	49.72±13.48	49.93±11.39	49.13±9.48
富锌组	0.43±0.16	0.47±0.01	0.63±0.15	102.46±1.86	52.66±16.23	46.79±0.14	98.48±12.41	38.37±13.96	29.49±4.87
阳性对照组	0.36±0.11	0.81±0.07	0.86±0.06	50.35±12.42	66.15±3.71	30.03±11.51	21.13±2.87	17.91±6.67	15.55±6.20
缺锌组	1.21±0.31	1.27±0.24	2.53±0.14	134.88±7.56	29.49±0.99	24.39±0.42	13.64±2.94	7.50±3.71	3.97±2.24



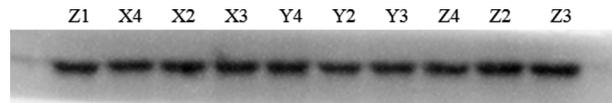
注:A. MGMT 基因扩增产物电泳图,B. MLH1 基因扩增产物电泳图;1 为正常对照组,2 为阳性对照组,3 为缺锌组,4 为富锌组;X、Y、Z 分别为 12、24、48 h。

图 3 各组 MGMT、MLH1 基因扩增产物电泳图

2.5 各组 MGMT 蛋白表达水平比较 (1)2 组间比较:正常对照组与阳性对照组 12、24 h 时 MGMT 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而在 48 h 时比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。(2)多组间比较及两两比较:4 组 24 h 时 MGMT 蛋白表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而在 12、48 h 时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。进一步两两比较显示,富锌组与阳性对照组 12 h 时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);其余各组间各时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。(3)组内比较:富锌组、缺锌组中各时间点 MGMT 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。阳性对照组中各时间点 MGMT 蛋白表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较显示,阳性对照组中 12 h 时与 24 h 时比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);其余各组间各时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4、图 4。

表 4 各组 MGMT 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h
正常对照组	1.02±0.11	1.02±0.11	1.02±0.11
富锌组	0.86±0.10	0.65±0.02	0.68±0.05
阳性对照组	0.87±0.03	0.81±0.05	0.60±0.06
缺锌组	0.68±0.16	0.83±0.06	0.57±0.04



注:1 为正常对照组,2 为阳性对照组,3 为缺锌组,4 为富锌组;X、Y、Z 分别为 12、24、48 h。

图 4 各组 MGMT 蛋白表达电泳图

3 讨论

癌症的发生是一种多基因相互调控、多因素相互影响、多阶段进行的一个复杂过程。多数癌症因发病初期临床症状不明显,不容易确诊,当出现较明显的

临床症状时往往已处于癌症晚期^[13]。癌症的发生涉及多种复杂的机制和因素。大量研究发现,机体长期处于锌缺乏状态时可能引起机体氧化应激和致使细胞损伤修复功能受损,损害 DNA 而导致基因突变等,其可能在大多数肿瘤(如肺癌、肝癌、乳腺癌、膀胱癌和消化道肿瘤等)的发生、发展中起重要作用^[4]。锌在食管癌中起着重要的调控作用,与其发生存在着密切联系。TPEN 作为一种细胞内锌螯合剂,属于非环氨基螯合物家族,在细胞和整个生物水平上有效,能够自由穿越生物膜,高效螯合铜、铁、锌^[14-16]。因此,本研究利用 TPEN 对锌离子的螯合作用使 HEEC 在干预过程中达到一个缺锌状态。虽然 TPEN 常被用作锌的螯合剂,但其对铜和锌也表现出螯合作用。已有研究表明,TPEN 对铜的螯合作用可选择性地杀死结肠癌细胞,并在结肠癌细胞中高度富集^[16]。同时,TPEN 螯合铜所生成的 TPEN-Cu 复合物具有氧化还原活性,可导致癌细胞中活性氧物种(ROS)的增加并具有细胞毒性^[16]。

氧化应激作为判断机体内氧化与抗氧化程度的 1 个指标,是指机体的抗氧化能力下降,ROS 水平增加,机体氧化与抗氧化平衡失调,从而破坏细胞膜脂质,促使氧化应激产物 MDA 形成,导致脂质过氧化。其中,MDA 作为氧化应激的最终产物,可加快生物膜损伤的速度,SOD、GSH-Px 作为抗氧化物质能够避免与减缓脂质过氧化。MDA、SOD、GSH-Px 水平能间接反映生物膜系统受损的程度和细胞受自由基攻击的程度。因此,这 3 个指标被认为是评估氧化应激的良好指标^[17]。本研究结果显示,在一定量 MNNG 诱导下,随着锌水平的降低和染毒时间的延长,HEEC 进入一个强氧化应激的状态。相比于降低锌水平后通过补锌使细胞处于一个富锌状态,可促使 MDA 水平降低,SOD、GSH-Px 水平升高,显著抑制经 MNNG 诱导的 HEEC 的氧化应激水平。其中,富锌组与阳性对照组 MDA(各时间点)、SOD(12 h 时)、GSH-Px(24 h 时)水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其原因可能是富锌组中存在保护因素锌,具有抑制氧化应激的作用,短时间对细胞起到了保护作用,减缓了细胞氧化应激的速度,缩短了肿瘤诱发的时间。由此可预见,通过补锌这一营养干预方式可能会减缓食管癌的发展速度。

DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传调控类型和方式,能在不改变 DNA 序列的情况下,使基因表达发生可遗传的改变,与肿瘤、衰老、老年痴呆等许多疾病密切相关^[18-19]。MGMT 作为 DNA 的直接修复蛋白,通过将受损 DNA 的 O⁶-mG 位的烷化基团转移到自身的半胱氨酸残基上,将受损的 DNA 进行修复,从

而保护细胞免受烷化剂的诱变。与此同时,MGMT 自身也因接受了烷化基团而出现不可逆性失活。因此,MGMT 也被称为“自杀性蛋白”^[20-21]。研究发现,约 30% 的人类癌症存在 MGMT 编码基因启动子甲基化,其可导致该基因失活,促使 MGMT 蛋白表达水平下调,且食管癌中 MGMT 编码基因启动子区的甲基化程度与肿瘤进展呈正相关^[20-23]。这意味着 MGMT 基因甲基化程度越高,癌变的程度与速度愈加难以控制。本研究结果显示,在一定量 MNNG 诱导下和经不同水平锌干预不同时间后,各组 MGMT 基因呈现出部分甲基化状态,与此同时,MGMT 蛋白表达出现下调。由此可预见,MGMT 的低表达可能受启动子区甲基化的调控。以上结果提示,MGMT 基因的正常甲基化与低表达或许可作为食管癌诊断的标志物。

MLH1 作为错配修复基因,是维持基因组完整性的关键。MLH1 基因启动子的甲基化被确定为包括胶质母细胞瘤、结肠直肠癌、胃癌等在内的多种癌症的预后标志物^[20,24]。多种人类癌症都存在 MLH1 基因的失活,其失活的机制与遗传学和表观遗传学异常存在一定关系。在食管癌中,MLH1 编码基因启动子区甲基化的发生率约为 62%,并最终会出现 MLH1 蛋白表达下降^[23]。此外,MGMT 基因 CpG 岛启动子甲基化可能是食管癌发生的常见事件^[25]。以上研究表明,基因的异常甲基化与基因表达很有可能存在着一种相互调控的密切关系。

综上所述,缺锌会致使经 MNNG 诱导的 HEEC 出现氧化应激、MGMT 和 MLH1 基因甲基化和 MGMT 蛋白异常表达,其与食管癌的发生与发展密切相关。本研究为食管癌早期检测及通过营养干预措施干预癌变发展过程提供了一定理论依据。

参考文献

- [1] 谢俞宁,仵红娇,杨振邦,等. 食管癌甲基化驱动基因的筛选、功能及调控通路分析[J]. 山东医药,2019,59(12):18-21.
- [2] 向迪. 家族性食管癌易感基因 SLC22A3 DNA 甲基化异常及其表达失活的研究[D]. 深圳:深圳大学,2018.
- [3] KUMARI D, CHATTERJEE A, PANPATIL V, et al. Alteration of zinc transporter mRNA expression in zinc depleted condition by TPEN {n,n,na2,na2-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine}: A cell-line based study[J]. J Nutr Sci Vitaminol, 2020, 66(Suppl 1): S304-S307.
- [4] 郭永东. 缺锌环境下 miR-193a-5p 调节锌稳态在

- 食管癌进展中的作用及机制研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2020.
- [5] 曾勇,豆倩,张雯雯,等. MNNG 亚慢性暴露致大鼠食管损伤及炎症反应机制研究[J]. 毒理学杂志,2021,35(1):10-14.
- [6] 龚莹,徐菁蔓,习瑾昆,等. 缺锌对心肌细胞的损伤作用及机制[J]. 生理学报,2016,68(5):677-683.
- [7] 蔡志亮. 缺锌对心肌细胞内质网和线粒体的影响及机制[D]. 唐山:华北理工大学,2019.
- [8] 范秋萍,吴睿婷,许茜,等. MTT 法检测松果菊苷对 MPP⁺ 损伤的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响[J]. 福建医药杂志,2020,42(3):116-119.
- [9] KUMAR P, NAGARAJAN A, UCHIL P D. Analysis of cell viability by the MTT assay[J]. Cold Spring Harb Protoc,2018(6):29858338.
- [10] 贾义,宋萍萍,周静,等. 锌对 3-吗啡-斯得酮亚胺(SIN-1)诱导的人晶状体上皮细胞 Cu/Zn-SOD 表达及活性的影响[J]. 眼科新进展,2017,37(1):24-27.
- [11] 贾义,张亮亮,夏欢. 锌对半乳糖诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的影响[J]. 国际眼科杂志,2018,18(10):1774-1777.
- [12] 张慧霞. 叶酸对 MNNG 诱导的哈萨克族食管上皮细胞恶变的干预作用及表观遗传学机制研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2017.
- [13] 张慧霞,韩菲,李旭峰,等. 叶酸和维生素 A 在 MNNG 致哈萨克族食管上皮细胞恶变中肿瘤相关基因表达的干预研究[J]. 现代预防医学,2019,46(14):2612-2616.
- [14] 王立群. 不同锌水平调控转运蛋白 SLC39A5 (ZIP5) 表达在食管癌发生发展中的机制研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2017.
- [15] SHUMAKER D K, VANN L R, GOLDBERG M W, et al. TPEN, a Zn²⁺/Fe²⁺ chelator with low affinity for Ca²⁺, inhibits lamin assembly, destabilizes nuclear architecture and may independently protect nuclei from apoptosis in vitro [J]. Cell Calcium,1998,23(2/3):151-164.
- [16] SCHAEFER-RAMADAN S, BARLOG M, ROA C H J, et al. Synthesis of TPEN variants to improve cancer cells selective killing capacity[J]. Bioorg Chem,2019,87:366-372.
- [17] 汪婷,张晓霞,李一唯,等. 亚麻籽油对多囊卵巢综合征大鼠胰岛素抵抗和氧化应激的保护作用[J]. 现代食品科技,2020,36(7):17-24.
- [18] WU D, CHEN X, XU Y, et al. Prognostic value of MLH1 promoter methylation in male patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncol Lett,2017,13(4):2745-2750.
- [19] DAI X, REN T, ZHANG Y, et al. Methylation multiplicity and its clinical values in cancer[J]. Expert Rev Mol Med,2021,23:e2.
- [20] 薛智文,王晓叶,魏益群. MGMT 基因启动子甲基化与非小细胞肺癌化疗敏感性及预后的关系[J]. 海南医学院学报,2019,25(14):1083-1086.
- [21] SCHÄR P, FRITSCH O. DNA repair and the control of DNA methylation [J]. Prog Drug Res,2011,67:51-68.
- [22] 韩雪涛,周欢娣,薛晓英. MGMT 启动子甲基化对神经胶质瘤患者治疗及预后的临床意义[J]. 中国肿瘤临床,2019,46(12):645-648.
- [23] 齐义军,朱亚飞,李恩民. 食管癌转移的表观遗传学改变研究进展[J]. 食管疾病,2021,3(1):58-63.
- [24] LING Z Q, LI P, GE M H, et al. Aberrant methylation of different DNA repair genes demonstrates distinct prognostic value for esophageal cancer [J]. Dig Dis Sci,2011,56(10):2992-3004.
- [25] WANG S M, JIANG B, DENG Y, et al. Clinical significance of MLH1/MSH2 for stage II/III sporadic colorectal cancer[J]. World J Gastrointest Oncol,2019,11(11):1065-1080.

(收稿日期:2022-06-06 修回日期:2022-12-18)