

地西他滨对K562细胞增殖和TFPI-2基因表达的影响

王甫珏 李君君 谢海涛 曾亚悦 刘静 张济

Effects of decitabine on proliferation capacity and TFPI-2 expression in leukemia K562 cells Wang Fujue, Li Junjun, Xie Haitao, Zeng Yayue, Liu Jing, Zhang Ji

Corresponding author: Zhang Ji, The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China. Email: zhang_ji001@126.com

近年来研究发现异常的表观遗传学修饰是肿瘤发生的早期事件,基因甲基化修饰改变是血液淋巴系统肿瘤发生的关键步骤之一^[1]。组织因子途径抑制物-2(tissue factor pathway inhibitor-2,TFPI-2)是一种Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制物,具有广谱丝氨酸蛋白酶抑制物作用,是一个非常重要的潜在抑癌基因^[2]。研究报道,在多种肿瘤中存在TFPI-2基因启动子区域异常甲基化,导致TFPI-2基因表达减低,进而参与肿瘤的发生、发展、侵袭和转移^[3]。有研究者在中国儿童急性髓系白血病(AML)患者中发现TFPI-2基因启动子区域存在高频率甲基化,其基因表达水平显著降低^[4-5],但该基因在AML疾病发生、发展及预后中的作用及与抗肿瘤化疗药物的靶向作用机制仍不清楚。本研究我们探讨地西他滨治疗AML的分子机制并寻找其新的调控基因。

材料与方 法

1. 主要试剂与仪器:K562细胞株来自中南大学生命科学学院,购自美国模式培养物保藏所(ATCC);地西他滨购自正大天晴药业集团股份有限公司;CCK-8试剂盒为Vazyme公司产品;基因组DNA提取试剂盒、小分子量DNA Marker购自生工生物工程(上海)股份有限公司;EZ DNA甲基化试剂盒(Lighting试剂盒)及Zymo Taq酶购自北京天漠科技开发有限公司; β -actin及TFPI-2抗体均为博奥森公司产品;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit购自赛默飞公司;2×Power Taq PCR MasterMix为北京百泰克生物技术有限公司产品;PCR扩增仪为美国Bio-Rad DNA Engine Peltier Thermal Cycle;流式细胞仪为美国Beckman公司产品。

2. 骨髓单个核细胞分离及其TFPI-2基因甲基化水平检

测:经患者知情同意后,收集南华大学附属第一医院血液科2014年4月至2015年6月期间33例初诊AML患者骨髓标本,以16例缺铁性贫血(IDA)患者的骨髓标本作为对照组,所有IDA患者均已排除肿瘤因素。取骨髓液2 ml,加入等量PBS混匀,加至淋巴细胞分离液表面,400×g离心20 min后,吸取白色细胞层,PBS洗涤细胞2次,弃上清液,对其进行相应处理后冻存于-80℃冰箱备用。

基因组DNA提取操作参考生工生物工程(上海)股份有限公司小量柱式基因组DNA提取试剂盒说明书。DNA甲基化修饰参照Zymo公司EZ DNA Methylation-Lighting Kit操作步骤,回收DNA溶于10 μ l M-Elution缓冲液中,储存于-20℃。TFPI-2甲基化引物(M)及非甲基化引物(U)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。TFPI-2甲基化引物正义链:5'-TTTCGTATAAAGCGGGTATTC-3',反义链:5'-ACGACCCGCTAAACAAAACG-3'(PCR产物片段95 bp);TFPI-2非甲基化引物正义链:5'-GGATGTTTGTGTTTGTATAAAGTG-3',反义链:5'-AAACAT CCAAAAAACACCTAAC-3'(PCR产物片段89 bp)。甲基化扩增体系总体积为25 μ l,其中Zymo Taq Premix 15 μ l,正、反义引物各2 μ l,模板100 ng,剩余体积用双蒸水补齐;反应条件:95℃预变性10 min,随后94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,共40个循环,最后72℃延伸7 min,4℃维持4 min。用40 g/L琼脂糖凝胶100 V电泳35 min检测扩增产物,紫外灯下观察并摄像。

3. CCK-8法检测细胞存活率:取对数增殖期K562细胞,接种于96孔板中,细胞密度为 8×10^4 /ml,每孔100 μ l。设3个(2、5、10 μ mol/L)地西他滨浓度实验组,并设阴性对照组,每组设4个复孔,共接种4张板,分别培养0、24、48、72 h后在酶标仪上测定450 nm波长下各孔吸光度(A)值,每次检测前2 h分别于每孔加入10 μ l CCK-8反应试剂,继续培养2 h,其中0 h板在种板后即加入CCK-8试剂,并放入培养箱培养2 h后检测A值,结果取各重复孔平均数。每次实验重复3次,结果取各重复孔平均值。按以下公式计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(A_{实验组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})×100%。绘制不同浓度地西他滨和不同处理时间后的存活率点线图。使用锥虫蓝染色计数法分别计数0、24、48、72 h各组活细胞数,取其平均值。

4. TFPI-2蛋白表达的检测:不同浓度地西他滨处理K562细胞48 h后收集细胞,PBS洗涤2次,加入RIPA与PMSF混合液(96:4)200 μ l,冰上裂解细胞30 min,4℃12 000 r/min(离心半径9 cm)离心5 min,取上清液至0.5 ml离心管中,取上清使用BCA蛋白定量试剂盒测定样品蛋白

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.04.016

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81301774);湖南省自然科学基金(2016JJ2108)

作者单位:421001 湖南省衡阳市,南华大学附属第一医院(王甫珏、李君君、谢海涛、张济);中南大学生命科学学院(医学遗传学国家重点实验室)(张济、曾亚悦、刘静)

通信作者:张济,Email:zhang_ji001@126.com

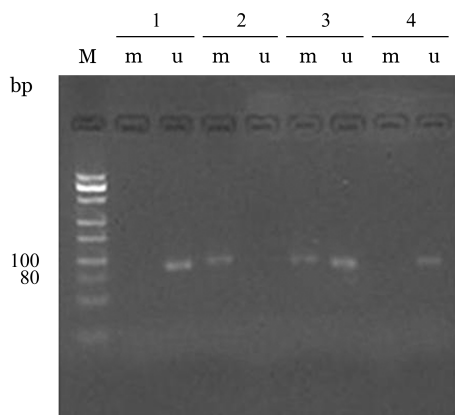
含量。然后,细胞蛋白提取液与5×蛋白上样缓冲液以4:1体积比混匀,PCR仪中99℃加热5 min后离心机短暂离心,然后用提取的蛋白进行SDS-PAGE,100 V恒压电泳2 h,电泳结束后将所需的条带切下,冰上200 mA恒流电转90 min,使分离的条带转移至PVDF膜上,将PVDF膜置于50 g/L脱脂牛奶中室温封闭2 h,加入TFPI-2多克隆抗体后在摇床上室温孵育1 h,然后4℃过夜,次日TBST漂洗膜10 min,共3次,加入二抗后在摇床上室温孵育1 h,TBST漂洗膜10 min,共3次,采用化学发光法显影。

5. 流式细胞术检测细胞周期和凋亡:收集5 μmol/L地西他滨处理48 h的实验组和对照组细胞,用PBS洗涤2次,调整细胞密度,加入5 μl RNAase A,37℃孵育30 min;再加入125 μl PI染液,4℃避光孵育30 min,上机检测K562细胞周期参数。此外,加入100 μl结合缓冲液重悬细胞,加入5 μl Annexin V-FITC和5 μl PI,避光,室温下反应10 min,再加入400 μl结合缓冲液混匀,上机检测K562细胞凋亡情况。

6. 统计学处理:数据分析采用SPSS16.0软件进行。实验重复3次,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。AML与IDA患者骨髓中的甲基化发生率的比较采用卡方检验;CCK-8及细胞计数的均数比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$,方差分析有统计学意义之后的组间两两比较采用LSD法。

结 果

1. TFPI-2基因在初治AML患者骨髓中的甲基化情况:甲基化特异性PCR(MS-PCR)检测了33例初诊的AML患者骨髓单个核细胞TFPI-2基因的甲基化情况,结果显示21例(63.6%)患者该基因启动子区域完全甲基化与不完全甲基化阳性(图1),而在16例IDA患者中未检测到该基因甲基化发生。



m: 甲基化扩增产物; u: 非甲基化扩增产物; M: Marker; 1: 对照组(缺铁性贫血患者); 2-4: 初诊AML患者

图1 甲基化特异性PCR检测TFPI-2基因启动子甲基化状态

2. 地西他滨对K562细胞增殖的影响:K562细胞随着地西他滨药物浓度增高,其细胞存活率呈下降趋势(图2),2、5、10 μmol/L浓度组在24、48、72 h各时间点与对照组相比差

异均有统计学意义(P 值均 <0.001),此外,在24、48、72 h各组间细胞存活率差异有统计学意义(F 值分别为24.056、99.484、104.089, P 值均 <0.001)。

锥虫蓝计数法检测结果显示在相同的时间点,随着地西他滨作用浓度增加,各组活细胞数呈下降趋势,在24、48、72 h时间点,各浓度组活细胞计数差异均有统计学意义(F 值分别为9.222、17.037、42.935, P 值分别为0.006、0.001、 <0.001),各浓度组与对照组相比差异均具有统计学意义(P 值均 <0.05)。在各浓度组中,24 h活细胞计数与对照组相比,差异均无统计学意义(P 值分别为0.067、0.211、0.382),而在48 h、72 h活细胞计数与对照组相比,差异均有统计学意义(P 值均 <0.001)。表明地西他滨对K562细胞的增殖抑制作用在一定范围内呈时间-剂量效应关系。详见图3。

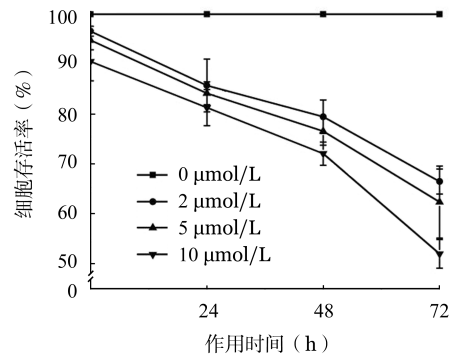


图2 CCK-8检测不同浓度地西他滨处理K562细胞的存活率

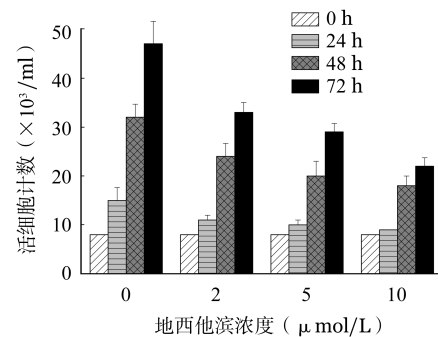
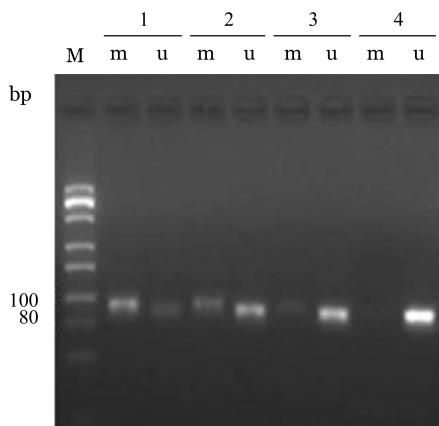


图3 细胞计数法检测地西他滨抑制K562细胞增殖作用

3. 地西他滨处理K562细胞后对TFPI-2基因启动子甲基化的影响:MS-PCR检测发现在K562细胞中TFPI-2基因呈不完全甲基化状态,经2、5、10 μmol/L地西他滨处理48 h后,K562细胞中TFPI-2基因启动子甲基化程度逐渐减低,呈浓度依赖性关系,在较高药物浓度(10 μmol/L)时,MS-PCR未能检测出TFPI-2基因甲基化扩增片段(图4)。

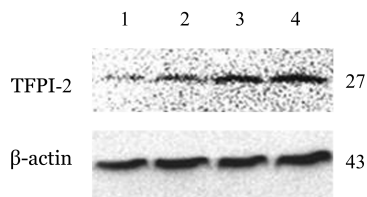
4. 地西他滨对K562细胞TFPI-2蛋白表达的影响:经过2、5、10 μmol/L地西他滨处理K562细胞后,Western blot法检测其细胞内TFPI-2蛋白表达变化,结果显示在空白对照组TFPI-2蛋白呈低表达,经不同浓度地西他滨处理后,TFPI-2蛋白表达增高,且呈浓度依赖性(图5)。

5. 地西他滨对K562细胞周期和凋亡的影响:与空白对



m: 甲基化扩增产物; u: 非甲基化扩增产物; M: Marker; 1~4: 0、2、5、10 μmol/L 地西他滨作用组

图 4 甲基化特异性 PCR 检测不同浓度地西他滨处理 K562 细胞后 TFPI-2 基因甲基化状态



1~4 分别为 0、2、5、10 μmol/L 地西他滨作用组

图 5 Western blot 法检测不同浓度地西他滨处理 48 h 后 K562 细胞 TFPI-2 蛋白表达水平

对照组比较, 5 μmol/L 地西他滨处理 K562 细胞 48 h 后, 处于 G₀/G₁ 期细胞由 32.51% 增至 43.30%, G₂/M 期细胞由 14.02% 增至 28.28%, S 期细胞由 48.85% 减少至 32.49%, 提示地西他滨使 K562 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 和 G₂/M 期, 从而抑制细胞的增殖。此外, 地西他滨处理 48 h 后, K562 细胞的早期凋亡细胞百分比由空白对照组的 1.44% 上升至 2.78%, 提示地西他滨对 K562 细胞凋亡的诱导作用较弱。

讨 论

表观遗传失调是许多肿瘤包括 AML 的发病机制之一, 基因启动子区域 CpG 岛位点甲基化介导的抑癌基因失活在 AML 的发生发展中扮演重要角色^[6-7]。TFPI-2 作为一重要的抑癌基因, 已经被证实在多种恶性肿瘤细胞中由于启动子区域 CpG 岛位点甲基化引起 TFPI-2 蛋白表达显著减低, 导致肿瘤细胞的侵袭转移能力显著增强^[8]。研究发现 TFPI-2 不但能调控肿瘤细胞的侵袭转移, 而且与肿瘤细胞的增殖也密切相关^[9]。本研究结果显示初诊的 AML 患者 TFPI-2 基因启动子甲基化的发生率为 63.6%, 与邵丽丽等^[4]报道的 AML 患者 TFPI-2 基因甲基化发生率 64.63% 基本一致。AML 患者 TFPI-2 表达水平明显减低, 且患者 TFPI-2 基因的表达水平与患者临床分期及疾病预后相关, 即 TFPI-2 表达水平越低,

化疗效果越差。

地西他滨是一种 DNA 甲基化转移酶抑制剂, 能够通过去除异常的甲基化而恢复抑癌基因的表达, 从而实现抗肿瘤的作用, 在临床上已经被应用于骨髓增生异常综合征 (MDS) 的治疗中, 同时在 AML 的前期临床试验研究中, 也表现出显著疗效, 但其调控靶分子及抗白血病的分子机制仍不完全清楚^[10]。本实验结果显示, 10 μmol/L 地西他滨对 K562 细胞中 TFPI-2 基因启动子去甲基化效率最高, 与部分文献报道的 5 μmol/L 浓度有差异, 可能与以下因素有关: 实验使用的地西他滨是小剂量包装的临床药品, 其纯度和药物活性分子可能与专用的科研试剂存在差异; 此外, 不同细胞株对地西他滨的药物反应也可能存在差异。TFPI-2 基因启动子高度甲基化状态被逐渐解除, 去甲基作用随地西他滨浓度增高和处理时间延长而增强, 细胞内 TFPI-2 蛋白表达水平呈时间与浓度依赖性升高。Hamamoto 等^[11]研究发现地西他滨能使非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 内 TFPI-2 基因启动子去甲基化, 使其基因表达水平增高, 然后再通过高表达的 TFPI-2 抑制 TPMS4 基因转录, 导致 NSCLC 细胞增殖显著受抑。地西他滨对 K562 细胞有显著的增殖抑制作用, 且随药物浓度的增加和作用时间的延长, 其细胞增殖抑制作用越来越显著, 与对照组比较 K562 细胞分裂周期受阻、凋亡细胞略有增加, 结果提示地西他滨抑制 K562 细胞增殖可能主要通过调控 K562 细胞周期而实现。Weeks 等^[12]发现在儿童急性 B 淋巴细胞白血病中, 地西他滨通过使 TES 基因启动子去甲基化, 恢复该基因的表达水平后, 白血病细胞通过非 TP53 活性依赖方式诱导细胞凋亡及细胞周期受阻调控 B 淋巴细胞白血病细胞的增殖。刘进等^[13]发现地西他滨解除急性 T 淋巴细胞白血病细胞株 Molt4 细胞中乳铁蛋白 (LTF) 基因启动子 CpG 岛甲基化后, 能有效抑制 Molt4 细胞的增殖, 抑制率呈时间和剂量依赖性增加, 使细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 并能诱导细胞凋亡。

总之, TFPI-2 基因在 AML 疾病发生发展过程中可能发挥重要的负调节作用。地西他滨能有效抑制 K562 细胞增殖, 部分原因可能与其解除 TFPI-2 基因启动子甲基化效应, 恢复 TFPI-2 基因表达相关, 因而, 本研究结果可为深入阐明地西他滨治疗 AML 的分子机制提供新的实验数据。

参 考 文 献

- [1] Oakes CC, Seifert M, Assenov Y, et al. DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia [J]. Nat Genet, 2016, 48(3):253-264. DOI: 10.1038/ng.3488.
- [2] Dong Y, Tan Q, Tao L, et al. Hypermethylation of TFPI2 correlates with cervical cancer incidence in the Uygur and Han populations of Xinjiang, China [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2): 1844-1854.
- [3] Jia Y, Yang Y, Brock MV, et al. Methylation of TFPI-2 is an early event of esophageal carcinogenesis [J]. Epigenomics, 2012, 4(2):135-146. DOI: 10.2217/epi.12.11.

- [4] 邵丽丽, 樊娟, 王蕊, 等. 急性髓系白血病TFPI-2基因表达及启动子甲基化的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(4): 920-926. DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2014.04.008.
- [5] Jian P, Yan WS, Chao SL, et al. Promoter of TFPI- 2 is hypermethylated in Chinese pediatric acute myeloid leukemia [J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2012, 34(1):43-46. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3182277276.
- [6] Kim TK, Gore SD, Zeidan AM. Epigenetic Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current and Future Directions [J]. Semin Hematol, 2015, 52 (3):172- 183. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2015.04.003.
- [7] Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia [J]. N Engl J Med, 2013, 368 (22):2059-2074. DOI: 10.1056/NEJMoa1301689.
- [8] Ma K, Cao B, Guo M. The detective, prognostic, and predictive value of DNA methylation in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Clin Epigenetics, 2016, 8:43. DOI: 10.1186/s13148-016-0210-9.
- [9] Qin Y, Zhang S, Gong W, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits gallbladder carcinoma growth in vitro and in vivo[J]. Cancer Sci, 2012, 103(4): 723-730. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02218.x.
- [10] 雒雪萍, 徐泽锋, 秦铁军, 等. 地西他滨治疗难治性贫血伴有原始细胞过多的疗效和不良反应与治疗疗程数的关系[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(10):870-875. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.10.011.
- [11] Hamamoto J, Soejima K, Naoki K, et al. Methylation-induced downregulation of TFPI-2 causes TMRSS4 overexpression and contributes to oncogenesis in a subset of non- small- cell lung carcinoma [J]. Cancer Sci, 2015, 106(1):34-42. DOI: 10.1111/cas.12569.
- [12] Weeks RJ, Ludgate JL, LeMée G, et al. TESTIN Induces Rapid Death and Suppresses Proliferation in Childhood B Acute Lymphoblastic Leukaemia Cells [J]. PLoS One, 2016, 11 (3): e0151341. DOI: 10.1371/journal.pone.0151341.
- [13] 刘进, 黄崇媚, 程辉, 等. 地西他滨对急性T淋巴细胞白血病细胞株 Molt4 细胞的作用及其机制研究[J]. 中华血液学杂志, 2015, 36 (3):230- 234. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253- 2727.2015.03.012.

(收稿日期:2016-09-05)

(本文编辑:王叶青)

干扰素联合沙利度胺对B细胞淋巴瘤细胞株OCI-LY7细胞的作用及其机制研究

彭大鹏 米瑞华 范瑞华 尹青松 汪小姣 魏旭东

Influence of interferon combined with thalidomide on the proliferation of OCI-LY7 cells and its mechanism Peng Dapeng, Mi Ruihua, Fan Ruihua, Yin Qingsong, Wang Xiaojiao, Wei Xudong

Corresponding author: Wei Xudong, Department of Hematology, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China. Email: weixudong63@126.com

干扰素和沙利度胺广泛应用于临床抗肿瘤治疗。干扰素有调节免疫、增强NK细胞对肿瘤细胞杀伤及诱导肿瘤细

胞凋亡等作用。沙利度胺有调节免疫、破坏肿瘤生长微环境的作用。前期,我们在临床工作中应用干扰素联合沙利度胺治疗复发/难治性非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)取得了良好的效果^[1]。在本实验中我们采用不同浓度的干扰素和沙利度胺体外单独及联合作用于B细胞淋巴瘤细胞株OCI-LY7细胞,观察对OCI-LY7细胞增殖及凋亡的影响并分析其相关机制,为临床治疗方案提供一定的实验依据。

材料与方

1. 细胞培养: OCI-LY7细胞于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的IMDM培养基,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,36~48 h传代1次。取对数生长期细胞进行后续实验。

2. CCK-8法检测细胞增殖抑制率:试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司,按试剂盒说明进行操作。实验分组:①对照组:不加药物细胞组;②干扰素单药组:不同浓度干扰素

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.04.017

基金项目:国家自然科学基金(81170520)

作者单位:450008 郑州大学附属肿瘤医院血液科、河南省肿瘤医院

通信作者:魏旭东,Email:weixudong63@126.com