

# 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

刘进 黄崇媚 程辉 唐古生 胡晓霞 周虹 王健民 杨建民

**【摘要】** 目的 探讨去甲基化药物地西他滨对急性T淋巴细胞白血病细胞株 Molt4 细胞的影响及其可能的作用机制。方法 CCK-8法检测地西他滨对细胞增殖的影响;Annexin V/PI 双重染色法检测地西他滨对细胞凋亡的影响;PI染色法检测细胞周期变化;转录组高通量测序筛选组间差异基因;亚硫酸氢盐测序法检测地西他滨作用 Molt4 细胞前后乳铁蛋白(LTF)基因启动子 CpG 岛的甲基化水平变化;实时定量 RT-PCR 及 Western blot 法分别检测 LTF mRNA 及蛋白的表达变化。结果 地西他滨能有效抑制 Molt4 细胞的增殖,抑制率呈时间和剂量依赖性增加,并能诱导细胞凋亡,使细胞阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。0.50 μmol/L 地西他滨处理 72 h 后, Molt4 细胞 LTF 基因启动子甲基化率较对照组降低(45.0% 对 72.3%), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), mRNA 和蛋白表达增加( $P$  值均  $< 0.05$ ), 同时还检测到 caspase 3、caspase 9 凋亡蛋白表达增加( $P$  值均  $< 0.05$ )。结论 地西他滨诱导 Molt4 细胞凋亡, 阻滞细胞周期在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 抑制细胞增殖。LTF 基因是地西他滨作用的重要靶点。

**【关键词】** 地西他滨; 白血病, T 细胞; Molt4 细胞; 基因, LTF

**Effects of decitabine against acute T lymphoblastic leukemia cell line Molt4** Liu Jin, Huang Chongmei, Cheng Hui, Tang Gusheng, Hu Xiaoxia, Zhou Hong, Wang Jianmin, Yang Jianmin. Department of Hematology, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China  
Corresponding author: Yang Jianmin, Email: yang3401@yahoo.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effects and possible mechanisms of decitabine on Molt4 in vitro. **Methods** Effects of decitabine on cells proliferation were detected by using CCK-8, the apoptosis by Annexin V-FITC, cell cycles by propidium iodide-FACS. Discrepancy genes were screened by RNA-seq technique. The CpG methylation of lactoferrin (LTF) gene in Molt4 cells were identified by Bisulfite sequencing PCR (BSP). The expression of LTF mRNA in Molt4 by RT-PCR and LTF protein expression were analyzed by Western blot. **Results** Decitabine effectively inhibited proliferation and induced apoptosis for Molt4 cells by an time- and dose-dependent manners. Cell cycles were arrested at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. The promoter methylation degree of LTF gene in Molt4 cells was 72.3% before decitabine treatment and decreased to 45.0% after treatment with 0.50 μmol/L decitabine for 72 h. After the reduction of methylation, expression of its mRNA and protein increased, meanwhile caspase 3 and caspase 9 protein expression levels increased. **Conclusion** The demethylating drug decitabine can induce apoptosis, detain cell cycle at phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, inhibit proliferation and up-regulate LTF gene expression in Molt4 cells. LTF may become a new target for acute T lymphoblastic leukemia.

**【Key words】** Decitabine; Leukemia, T-cells; Molt4 cells; Gene, LTF

DNA 甲基化改变是人类肿瘤中最常见的表观遗传学改变<sup>[1]</sup>, 抑癌基因启动子区的甲基化能促进肿瘤形成。已证实许多抑癌基因如 p15、p16、p53、

ER、E-cadherins 等的过甲基化与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[2-3]</sup>。地西他滨是一种去甲基化制剂, 可使沉默基因重新表达, 发挥抗肿瘤作用。目前地西他滨在骨髓增生异常综合征(MDS)及急、慢性髓系白血病的治疗中均取得了很好的疗效<sup>[4]</sup>, 但尚未用于急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL)的治疗。本研究中我们探讨了地西他滨对 T-ALL 细胞株 Molt4 细胞的影响及其可能的作用机制。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.03.012

基金项目: 国家自然科学基金(81172249、81470322)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学附属长海医院血液科

通信作者: 杨建民, Email: yang3401@yahoo.com

## 材料和方法

1. 主要试剂:地西他滨(西安杨森制药有限公司产品)溶于生理盐水, -20℃保存。使用时用生理盐水稀释至工作浓度;RPMI 1640培养基和无支原体胎牛血清购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒购自日本同仁化学研究所;碘化丙锭(PI)、RNase A购自美国Sigma公司;Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自美国eBioscience公司;TRIzol购自美国Promega公司;RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;引物由上海英骏生物技术有限公司合成;亚硫酸氢钠修饰试剂盒购自德国凯杰公司;RIPA裂解液购自上海基尔顿生物科技有限公司;抗GAPDH、caspase 3抗体购自美国CST公司,抗caspase 9、LIF抗体购自美国Abcam公司,羊抗兔HRP标记二抗购自中国碧云天生物技术研究所以。

2. 细胞株来源和细胞培养:Molt4细胞株购自美国典型培养物保藏中心,来源于T-ALL患者的外周血。采用含有10%热灭活胎牛血清的RPMI 1640培养基,放置于37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养,每2~3 d更换1次细胞培养基。实验所用细胞均处于对数生长期。所有实验均重复3次。

3. CCK-8法检测地西他滨对细胞增殖的影响:取对数生长期的Molt4细胞接种于96孔板,每孔200 μl,每孔细胞数调整为2×10<sup>4</sup>个,加入地西他滨,使其终浓度分别为0.05、0.10、0.50、1.00和5.00 μmol/L,并设未加药的对照组,每种浓度设5个复孔。置于培养箱中培养24、48、72和96 h后,加入10 μl CCK-8溶液,在培养箱内继续孵育4 h,用酶标仪检测450 nm处各孔的吸光度(A)值。按下式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率(\%)} = \frac{A_{\text{对照组}} - A_{\text{药物组}}}{A_{\text{对照组}}} \times 100\%$$

4. 流式细胞术检测细胞凋亡:用RPMI 1640培养液调整细胞密度为1×10<sup>5</sup>/ml,接种于24孔板,每孔1 ml,设置0.50 μmol/L地西他滨处理组及未加药的对照组,每组设3个复孔。置培养箱中培养72 h,收集待检测细胞,PBS洗1次,结合缓冲液洗1次,用50 μl结合缓冲液重悬。每管加入5 μl Annexin V-FITC和5 μl PI,轻轻混匀,于室温避光温育15 min,加入结合缓冲液后,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

5. 流式细胞术检测细胞周期:用RPMI 1640培养液调整细胞密度为1×10<sup>6</sup>/ml,接种于24孔板,每孔1 ml,实验分组同上,每组设3个复孔。置培养箱

中培养72 h,收集待检测细胞,PBS洗2次,用冰冷的70%乙醇固定,-20℃过夜。PBS洗2次,细胞重悬于PI染液(含0.2 mg/ml RNase A, 50 μg/ml PI, 0.1% Triton X-100的PBS溶液)染色。室温避光染色30 min,上机检测。

6. 转录组高通量测序筛选组间差异基因:实验分组同上,收集各组细胞,用TRIzol提取总RNA,并用TruSeq RNA样品制备试剂盒构建测序文库,总RNA用量为1 μg。RNA文库的测序步骤参照Illumina公司提供的标准手册。在数据处理阶段,利用CASAVA 1.8软件进行碱基序列读取分析和测序数据清洗,剔除简单的、低质量的数据。再通过Chepelev等<sup>[5]</sup>描述的方法计算每个读段的丰度,即将一个基因的所有外显子合并形成一个meta转录本,计算比对到meta转录本外显子的读段数量,并且通过meta转录本和文库的大小对数据进行标准化。比较两组测序数据利用倍数法,计算基因间的差异倍数,从而得到差异的基因。

7. 亚硫酸氢盐测序法检测乳铁蛋白(LTF)基因启动子CpG岛的甲基化:实验分组同上,提取各组细胞基因组DNA。取基因组DNA 1 μg进行亚硫酸盐修饰,使未甲基化的胞嘧啶(C)转化成胸腺嘧啶(T),而甲基化的胞嘧啶不变。以修饰后基因组DNA为模板进行LTF基因启动子扩增。LTF特异性引物:上游引物5'-GGGGTAAAGTTTTGAATAAAGGG-3',下游引物5'-CAACTCCTATTCCTC-CCCATATAA-3',其反应体系为50 μl,包括2×PCR Mix 25 μl, 10 μmol/L上、下游引物各1 μl,模板DNA 2.5 μl,双蒸水20.5 μl。反应条件:95℃变性4 min,94℃30 s,55℃30 s,70℃40 s,进行40次循环,然后72℃延伸5 min。将获得的PCR产物行15 g/L琼脂糖凝胶电泳,割胶回收目标片段,采用pTG19-T作为载体连接,转化感受态细胞XL10-Gold,进行筛选、扩菌、提取质粒DNA,用3730测序仪进行测序,由上海捷瑞生物工程有限公司完成。

8. 实时定量RT-PCR法检测LTF mRNA表达:实验分组同上,采用TRIzol法提取各组细胞总RNA,测定其浓度和纯度。RT反应体系10 μl,包括缓冲液2 μl, Oligo(dT) primer 0.5 μl,反转录酶0.5 μl,随机引物0.5 μl,模板500 ng。RT-PCR引物:β-actin mRNA上游引物5'-TGACGGGGTCCACCACACTGTGCCCATCTA-3',下游引物5'-CTAGAAGCATTGCGGACGATGGAGGG-3';LTF mRNA上游引物5'-GCGACGAGCAGGGTGAGA-3',下游

引物 5'- GCCCCAGTGTAGCCGTAAGTATC-3'。反应条件为 95 °C 预变性 15 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 进行 40 次循环, 最终 72 °C 延伸 10 min。反应结束后根据熔解曲线判断扩增产物的特异性, 记录不同基因的 Ct 值。目的基因相对表达量应用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式来计算,  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{药物组目的基因}} - Ct_{\text{药物组内参基因}}) - (Ct_{\text{对照组目的基因}} - Ct_{\text{对照组内参基因}})$

9. Western blot 法检测 LTF 蛋白及凋亡途径的相关蛋白表达水平: 实验分组同上, 收集各组细胞, 用含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞, 抽提细胞总蛋白, 测定蛋白浓度, 上等量的蛋白通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h, 湿转印至膜, 50 g/L 脱脂奶粉溶液封闭 1 h 后, 加入相应的一抗温育, 4 °C 过夜, 用 HRP 标记的二抗室温温育 1 h, 显色、图像采集及分析处理。

10. 统计学处理: 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 数据以均数 ± 标准差表示, 用析因方差分析进行统计学处理(两组均数比较先进行方差齐性检验, 方差齐者用 *t* 检验, 方差不齐者用 *t'* 检验)。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 地西他滨对 Molt4 细胞增殖的影响: 加入地西他滨后, 在显微镜下观察发现, Molt4 细胞明显皱缩, 细胞密度减小。CCK-8 法检测发现, 地西他滨对 Molt4 细胞增殖的抑制作用呈剂量和时间依赖性(图 1)。地西他滨作用不同时间(24、48、72 和 96 h)后, Molt4 细胞的增殖抑制率差异均有统计学意义(*P* 值均 < 0.05); 不同浓度(0.05、0.10、0.50、1.00 和 5.00 μmol/L)地西他滨作用后, Molt4 细胞增殖抑制率在 24、48 h 除 0.05 与 0.10 μmol/L 浓度组、0.50 与 1.00 μmol/L 浓度组间差异无统计学意义(*P* > 0.05), 其余各浓度组间及作用 72、96 h 各浓度组间差异均

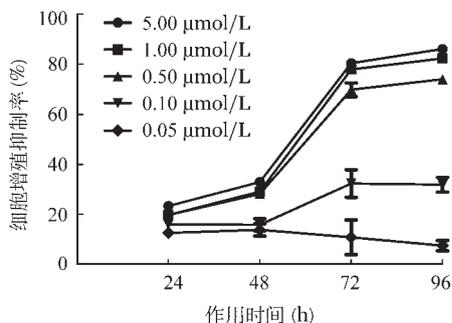


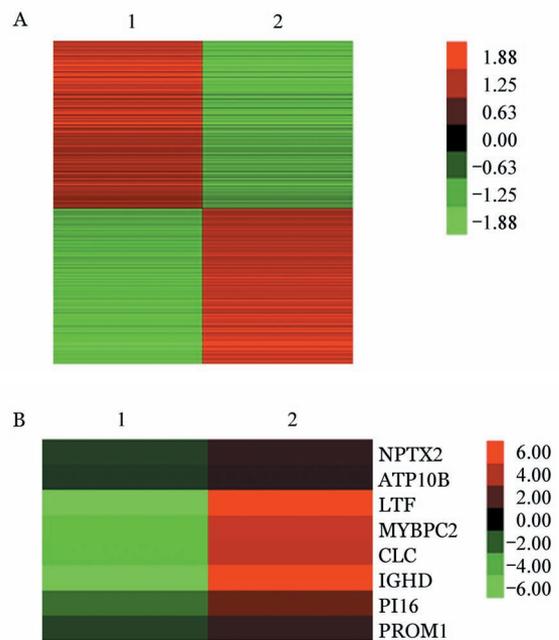
图 1 CCK-8 法检测地西他滨对 Molt4 细胞增殖的影响(实验重复 3 次)

有统计学意义(*P* 值均 < 0.05)。0.50 μmol/L 地西他滨作用 72 h 后细胞增殖抑制率为 (69.76 ± 2.20)%, 以此为实验浓度和作用时间行后续实验。

2. 地西他滨对 Molt4 细胞凋亡的影响: 0.50 μmol/L 地西他滨作用 Molt4 细胞 72 h, 细胞凋亡率为 (37.75 ± 3.87)%, 对照组细胞凋亡率为 (14.54 ± 0.94)%, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

3. 地西他滨对 Molt4 细胞周期的影响: 0.50 μmol/L 地西他滨组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例为 (60.58 ± 0.22)%, 较对照组 [(49.69 ± 1.05)%] 明显升高, S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例分别为 (31.97 ± 0.57)% 和 (7.45 ± 0.42)%, 较对照组 [(44.92 ± 1.37)% 和 (5.39 ± 0.40)%] 明显降低, 差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。

4. 转录组高通量测序筛选组间差异基因: 利用高通量测序及倍数分析法, 共筛选出 1 507 个上调的差异基因(图 2A), 其中 LTF 基因组间差异最明显(图 2B)。



A: 热点图全局图; B: 标注有差异表达基因的局部放大图。1: 未加药对照组; 2: 0.50 μmol/L 地西他滨作用组。热点图旁边的数值代表基因的差异程度, 红色代表上调(或者说表达丰度高), 蓝色代表下调(表达丰度低)

图 2 转录组高通量测序筛选组间差异基因的热点图

5. 地西他滨对 Molt4 细胞 LTF 基因启动子 CpG 岛的甲基化水平的影响: 亚硫酸氢盐测序实验结果显示, Molt4 细胞中 LTF 基因启动子 CpG 岛的甲基化率为 72.3%, 经 0.50 μmol/L 地西他滨处理 72 h 后, Molt4 细胞的 LTF 基因启动子 CpG 岛的甲基化率下

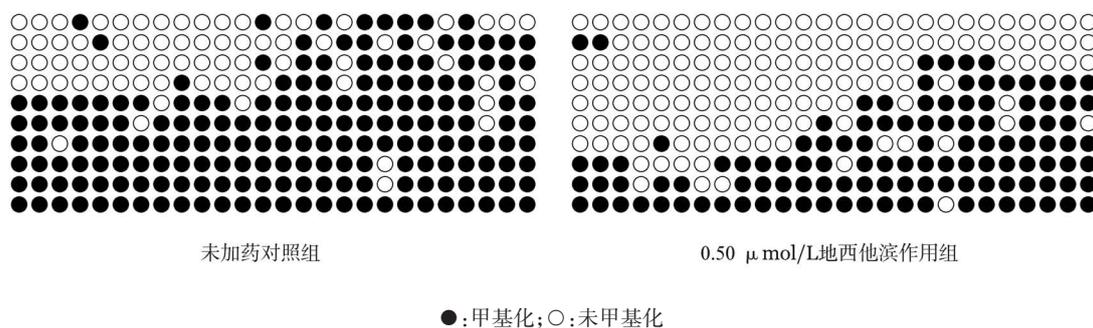
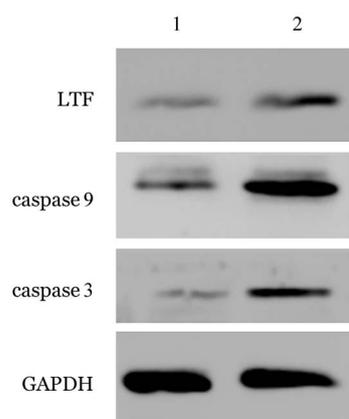


图3 0.50  $\mu\text{mol/L}$  地西他滨作用前后 LTF 基因启动子区 26 个 CpG 位点甲基化情况

降至 45.0%，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。LTF 启动子区 26 个 CpG 位点甲基化如图 3 显示，LTF 基因在 Molt4 细胞内表现为高甲基化状态，地西他滨作用后，其中 4、5、6、7、9、14、16 号 CpG 位点甲基化率较对照组明显降低，下降率为 50% 左右。

6. 地西他滨对 Molt4 细胞 LTF mRNA 表达的影响：Molt4 细胞经 0.50  $\mu\text{mol/L}$  地西他滨作用 72 h 后，LTF mRNA 相对表达量为  $4.05 \pm 0.41$ ，表达水平较对照组明显上调 ( $P < 0.05$ )。

7. 地西他滨对 Molt4 细胞 LTF 蛋白及凋亡相关蛋白表达的影响：0.50  $\mu\text{mol/L}$  地西他滨作用 Molt4 细胞 72 h 后，采用 Western blot 法检测 LTF 蛋白、caspase 家族蛋白的活化情况，发现 LTF 蛋白及凋亡相关 caspase 3、caspase 9 蛋白表达水平较对照组明显增高 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。



1: 未加药对照组; 2: 0.50  $\mu\text{mol/L}$  地西他滨作用组

图 4 Western blot 法检测地西他滨处理 72 h 后 Molt4 细胞 LTF 和 caspase 3、caspase 9 蛋白的表达

## 讨 论

我们以 T-ALL 细胞株 Molt4 细胞为研究对象，探讨地西他滨对 Molt4 细胞的影响及可能的机制。

研究表明，地西他滨对 Molt4 细胞增殖起着明显的抑制作用，抑制率呈时间和剂量依赖性增加。进一步的研究结果提示，地西他滨是通过诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期在  $G_0/G_1$  期，从而使细胞增殖受抑。在探讨地西他滨可能的作用机制中，我们发现 LTF 基因在 Molt4 细胞中呈高甲基化状态，与地西他滨共培养后，LTF 基因启动子甲基化率由 72.3% 下降至 45.0%，LTF mRNA 和蛋白表达明显增加。可见 LTF 基因是地西他滨作用的重要靶点。LTF 基因位于 3p21.3 染色体上，其 mRNA 长约 2.4 kb，含 17 个外显子，编码 LTF。LTF 除了促进铁吸收、抗氧化、广谱抗菌、抗病毒、抗炎和调节免疫的功能外<sup>[6-7]</sup>，还能抑制肿瘤生长和转移<sup>[8-9]</sup>，并在人类多种肿瘤中具有抑癌作用。已证实，LTF 基因在多种肿瘤组织，如鼻咽癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌等中存在表达缺失或下调的现象<sup>[10-13]</sup>。其失活主要与启动子甲基化有关，在去甲基化后，LTF 基因表达能够恢复<sup>[11, 14]</sup>。目前，有关 LTF 基因与 T-ALL 细胞株 Molt4 细胞相关性的研究尚未见报道，其在 T-ALL 中的作用机制有待进一步研究。

近来，不乏一些有关 LTF 分子机制的研究，研究报道 LTF 分子可以通过诱导改变某些重要细胞周期调节蛋白的表达及活性水平，而阻碍肿瘤细胞由  $G_1$  期向 S 期转化，进而抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[15-16]</sup>。LTF 分子促进肿瘤细胞的凋亡则是通过激活 JNK、Fas 信号通路来实现<sup>[17-18]</sup>。在我们的研究中，检测到地西他滨可促进 caspase 3、caspase 9 凋亡蛋白表达水平的增加，其可能机制与 LTF 基因的高表达有关。本研究中我们还发现 LTF 启动子 4、5、6、7、9、14、16 号 CpG 位点甲基化率较对照组明显降低，下降率达 50% 左右。可见这 7 个位点可能是 LTF 基因表达相关的常见甲基化位点，将为去甲基化靶向治疗提供科学依据。

参考文献

[1] Kanai Y, Hirohashi S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(12): 2434-2442.

[2] Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(22): 4632-4642.

[3] 张耀, 宋陆茜, 吴凌云, 等. p15<sup>INK4B</sup>甲基化与骨髓增生异常综合征患者预后及地西他滨疗效的关系[J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(3): 234-241.

[4] Issa JP, Kantarjian HP. Introduction: emerging role of epigenetic therapy: focus on decitabine [J]. *Semin Hematol*, 2005, 42 (3 Suppl 2): S1-2.

[5] Chepelev I, Wei G, Tang Q, et al. Detection of single nucleotide variations in expressed exons of the human genome using RNA-Seq[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(16): e106.

[6] Valenti P, Antonini G. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(22): 2576-2587.

[7] Actor JK, Hwang SA, Kruzel ML. Lactoferrin as a natural immune modulator [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15 (17): 1956-1973.

[8] Bezault J, Bhimani R, Wiprovnick J. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(9): 2310-2312.

[9] Tsuda H, Sekine K, Takasuka N, et al. Prevention of colon carcinogenesis and carcinoma metastasis by orally administered bovine lactoferrin in animals[J]. *Biofactors*, 2000, 12(1-4): 83-88.

[10] Teng C, Gladwell W, Raphiou I, et al. Methylation and expression of the lactoferrin gene in human tissues and cancer cells [J]. *Biometals*, 2004, 17(3): 317-323.

[11] Iijima H, Tomizawa Y, Iwasaki Y, et al. Genetic and epigenetic inactivation of LTF gene at 3p21.3 in lung cancers [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118 (4): 797-801.

[12] Shaheduzzaman S, Vishwanath A, Furusato B, et al. Silencing of Lactotransferrin expression by methylation in prostate cancer progression[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(7): 1088-1095.

[13] Furlong SJ, Mader JS, Hoskin DW. Lactoferrin-induced apoptosis in estrogen- nonresponsive MDA- MB- 435 breast cancer cells is enhanced by C6 ceramide or tamoxifen[J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(5): 1385-1390.

[14] Zhang H, Feng X, Liu W, et al. Underlying mechanisms for LTF inactivation and its functional analysis in nasopharyngeal carcinoma cell lines [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(7): 1832-1843.

[15] Li WY, Li QW, Han ZS, et al. Growth suppression effects of recombinant adenovirus expressing human lactoferrin on cervical cancer in vitro and in vivo [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26(4): 477-483.

[16] Wang JJ, Li QW, Ou YT, et al. Inhibition of tumor growth by recombinant adenovirus containing human lactoferrin through inducing tumor cell apoptosis in mice bearing EMT6 breast cancer[J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(6): 987-995.

[17] Fujita K, Matsuda E, Sekine K. Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25 (10): 1961-1966.

[18] Lee SH, Park SW, Pyo CW, et al. Requirement of the JNK-associated Bcl- 2 pathway for human lactoferrin-induced apoptosis in the Jurkat leukemia T cell line [J]. *Biochimie*, 2009, 91(1): 102-108.

(收稿日期:2014-10-16)

(本文编辑:王叶青)

·读者·作者·编者·

本刊对图表的要求

作者投稿时,原稿中若有图(表),每幅图表应随内容排入相应段落,并另外将图表中附于文后1份,分别按其在正文中出现的先后次序连续编码。每幅图表应冠有图(表)题。说明性的文字应置于图(表)下方注释中,并在注释中标明图表中使用的全部非公知公用的缩写下词汇的全称。线条图高宽比例以5:7为宜。以计算机制图提供激光打印图样。照片图要求有良好的清晰度和对比度;图中需标注的符号(包括箭头)请用另纸标上,不要直接标注在照片上。每幅图的背面应贴上标签,注明图号、方向及作者姓名。若刊用人像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能被辨认出系何人的部分。大体标本照片在图内应有尺度标记。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。图表中如有引自他刊者,应注明出处。电子版投稿中图片建议采用JPG格式。

关于表格,建议采用三横线表(顶线、表头线、底线),如遇有合计和统计学处理内容(如t值、P值等),则在此行上面加一条分界横线;表内数据要求同一指标有效位数一致,一般按标准差的1/3确定有效位数,统计数据要有样本数。

本刊编辑部