

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.006

5-氮杂胞苷对 HL60 细胞 P16、DAPK 及 MGMT 基因甲基化状态影响

苏庸春, 徐红珍, 于洁, 蔡倩, 徐酉华

(重庆医科大学附属儿童医院血液肿瘤中心, 重庆 400014)

【摘要】目的:通过检测 5-氮杂胞苷作用于急性早幼粒细胞白血病细胞系(HL60)细胞前后 P16、死亡相关蛋白激酶(Death associated protein kinase, DAPK)及 6-氧-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O-6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)基因甲基化状态的改变及基因表达的变化情况,探讨 5-氮杂胞苷对髓系白血病细胞系作用的相关机制。方法:采用常规细胞培养,加入 5-氮杂胞苷培养 48 h 后,以甲基化特异性 PCR(Methylation specific PCR, MSP)检测基因甲基化状态,以 RT-PCR 检测药物作用前后基因表达水平。结果:MSP 显示用药前 P16 基因、DAPK 基因及 MGMT 基因呈高甲基化状态,应用 5-氮杂胞苷处理后 P16 及 DAPK 基因发生了完全去甲基化, MGMT 基因在用药后发生了部分去甲基化;应用 5-氮杂胞苷处理前后 P16、DAPK 及 MGMT 基因表达强度分别是 (0.22 ± 0.04) 与 (0.64 ± 0.12) 相比、 (0.36 ± 0.08) 与 (1.27 ± 0.09) 相比及 (0.75 ± 0.1) 与 (1.37 ± 0.1) 相比,3 个基因前后表达强度均有统计学差异($P < 0.05$)。结论:5-氮杂胞苷通过对 P16、DAPK 及 MGMT 甲基化基因的去甲基化作用,使这些基因恢复表达,从而抑制髓系白血病细胞系的增殖,发挥肿瘤细胞增殖抑制作用。

【关键词】白血病;5-氮杂胞苷;甲基化;基因

【中国图书分类法分类号】R733.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-02

Effects of 5-azacytidine on methylation state of P16, DAPK and MGMT genes in HL60 cells

SU Yongchun, XU Hongzhen, YU Jie, CAI Qian, XU Youhua

(Center of Hematology and Oncology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of 5-azacytidine on myeloid leukemia cell lines through detecting methylation state and expression changes of P16, death associated protein kinase (DAPK) and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) after 5-azacytidine treatment for acute promyelocytic leukemia cell lines (HL60 cells). **Methods:** HL60 cells were cultured with 5-azacytidine by routine method for 48 h. Then methylation-specific PCR (MSP) and RT-PCR were respectively used to detect gene methylation status and expression changes of P16, DAPK and MGMT before and after being treated with 5-azacytidine. **Results:** MSP showed hypermethylated P16, DAPK and MGMT genes before 5-azacytidine treatment. Complete demethylation was observed in P16 and DAPK genes and partial demethylation was observed in MGMT gene after HL60 cells being co-cultured with 5-azacytidine. Expression intensities of P16, DAPK and MGMT genes in HL60 cells before and after treatment of 5-azacytidine were (0.22 ± 0.04) vs. (0.64 ± 0.12) , (0.36 ± 0.08) vs. (1.27 ± 0.09) and (0.75 ± 0.1) vs. (1.37 ± 0.1) respectively ($P < 0.05$). **Conclusions:** The CpG islands of P16, DAPK and MGMT genes are hypermethylated in HL60 cells. 5-azacytidine inhibits proliferation of leukemic cells by demethylation of some related genes.

【Key words】 leukemia; 5-azacytidine; methylation; gene

基因启动子区高甲基化是多种肿瘤包括白血病普遍存在的现象,研究显示某些基因甲基化与白

血病发生发展及预后密切相关,并认为这可能成为白血病的又一个生物标志物和治疗靶点^[1,2]。5-氮杂胞苷是最早被美国食品药品监督管理局批准用于治疗骨髓异常增生综合征(Myelodysplastic syndromes, MDS)的基因甲基化酶抑制剂^[3]。该药被证实对MDS具有较好的疗效,按最近 WHO 的诊断标准,其中达

作者介绍:苏庸春(1971-),男,副教授,博士,

研究方向:白血病发病机制。

通信作者:徐酉华,女,教授,Email: xuyouhua0504@163.com。

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(编号:渝卫科教 34 号 06-2-193)。

到髓系白血病诊断标准(幼稚细胞比例 20%~30%)的 MDS 病例,经 5-氮杂胞苷治疗后,取得了近 50% 的 2 年总体长期生存率^[4]。但目前尚缺乏 5-氮杂胞苷对髓系白血病细胞作用机制的研究,因此,本研究拟通过检测细胞周期节点生长调节因子、细胞凋亡促进因子及错配修复基因 3 个系列的代表基因 P16、死亡相关蛋白激酶(Death associated protein kinase, DAPK)及 6-氧-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)基因甲基化状态的改变及基因表达的变化情况,探索 5-氮杂胞苷对白血病细胞系作用的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人早幼粒细胞白血病细胞系 HL-60 购自中国科学院上海细胞生物研究所,小牛血清、RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司,5-氮杂胞苷购自 Sigma 公司,RT-PCR 试剂盒、Taq 酶及 dNTP 均购自 TaKaRa 公司,Wizard DNA Clean-up 购自 Promega 公司,CpG 甲基转移酶(M.SssI)为美科美(北京)生物公司产品,PCR 引物由上海生工生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理:人白血病细胞系 HL-60 以 5×10^5 个/ml 的密度接种于含 10% 小牛血清、青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养基中,于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养;取对数生长期细胞,以 5.0 μmol/L 的 5-氮杂胞苷处理 HL60 细胞 48 h,以不加药物作为对照组。

1.2.2 甲基化特异性 PCR(Methylated specific PCR, MSP)检测基因甲基化状态 采用正常人外周血 DNA 经 CpG 甲基转移酶(M.SssI)处理及不处理而行亚硫酸氢盐修饰分别作为甲基化和非甲基化阳性对照,以去离子水作为阴性对照;以高盐沉淀法提取细胞 DNA,对基因组 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰,使用 Promega Wizard Clean-up 纯化回收修饰后的 DNA;以甲基化引物及非甲基化引物扩增修饰后的 DNA,总反应体系 20 μl: 模板 DNA 2 μl, 10×Buffer 2 μl, dNTP 0.5 μl, TapE 0.2 μl, ddH₂O 14.3 μl, 上下游引物各 0.5 μl, 引物序列及退火温度见表 1。取 PCR 产物于 2% 的琼脂糖凝胶上电泳,在 Gel Doc 1000 型凝胶图像分析仪上观察照相。重复独立完成上述实验 3 次。

1.2.3 RT-PCR 检测基因 mRNA 的表达 以 RNA 提取试剂盒提取对照组及 5 μmol/L 5-氮杂胞苷处理 48 h 的 HL60 细胞总 RNA,经完整性鉴定后按反转录试剂盒(PROMEGA)说明书进行 cDNA 第 1 链的合成,以反应所得 cDNA 进行 PCR 扩增。总反应体系 25 μl: cDNA 2 μl, 10×Buffer 2.5 μl, dNTP 1 μl, TapE 0.2 μl, ddH₂O 17.3 μl, 上下游引物各 1 μl, 引物序列及退火温度见表 1。取 PCR 反应产物在 2% 的琼脂

表 1 MSP 及 RT-PCR 引物序列、产物长度及退火温度

Tab.1 Sequences product lengths and annealing temperatures for RT-PCR and MSP primers

引物	基因引物序列（5' - 3'）	产物长度（bp）	退火温度（℃）	循环次数（次）
MSP primer				
P16 M	正义链:TTATTAGAGG GTGGGGCGGATCGC	150	68	40
	反义链:GACCCCGAACC GCGACCGTAA			
P16 U	正义链:TTATTAGAGG GTGGGTGGATTGT	151	60	40
	反义链:CAACCCCAAACCACAACCATAA			
MGMT M	正义链:GGTCGTTTGTACGTTCCG	116	67	7
	反义链:GACCGATACAAACCGAACG			
MGMT U	正义链:GTAGGTTGTTTGTATGTTTGT	122	56	28
	反义链:AACCAATACAAACCAACA			
DAPK M	正义链:GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	98	60	32
	反义链:CCCTCCCAAACGCCGA			
DAPK U	正义链:GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	106	60	32
	反义链:CAAATCCCTCCCAAACACCAA			
RT-PCR primer				
P16	正义链:GAAGAAAAGAGGAGGGGTTGG	280	55	38
	反义链:CTACAAACCCTCTACCCACC			
MGMT	正义链:CGAAATAAAGCTCCTGGGCA	151	55	30
	反义链:GAAGTCTTCGATAGCCTCGGG			
DAPK	正义链:GCCTGGAGACGGAGAAGAT	172	58	35
	反义链:AAGTCCCCTGGCTGGTAGA			
GAPDH	正义链:CACCAGGGCTGCTTTTATC	310	55	25
	反义链:GATGATGACCCTTTTGGCTCC			

糖凝胶上电泳,在 Gel Doc 1000 型凝胶图像分析仪上自动分析成像。用 Quantity one 4.6.5 凝胶成像分析软件测出 P16、MGMT、DAPK 和 GADPH 的灰度值和密度值,按下式计算相对表达强度:相对表达强度=(目的基因灰度值×密度值)/(GADPH 灰度值×密度值)。重复独立完成上述实验 3 次,获得相对表达强度统计值。

1.2.4 统计学处理 计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,基因表达水平比较采用配对 *t* 检验,数据处理均用 SPSS 17.0 软件包完成,以 $P \leq 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 P16、MGMT、DAPK 基因经 5-氮杂胞苷处理前后甲基化状态

在 HL60 细胞中,MSP 显示 P16 基因、DAPK 基因及 MGMT 基因甲基化引物有阳性条带扩增,而非甲基化引物未能扩增出条带,提示 P16、DAPK 基因及 MGMT 基因启动子区 CpG 岛表现为高甲基化。应用 5-氮杂胞苷处理后 P16 及 DAPK 基因甲基化引物均未见扩增产物,而非甲基化引物则扩增出阳性产物,提示 P16 及 DAPK 基因启动子区 CpG 岛在处理前后发生了完全去甲基化,应用 5-氮杂胞苷处理后 MGMT 基因甲基化引物及非甲基化引物均扩增出阳性产物,提示 MGMT 基因启动子区 CpG 岛在用药后发生了部分去甲基化(图 1)。3 次独立重复实验获得了相同的上述结果。

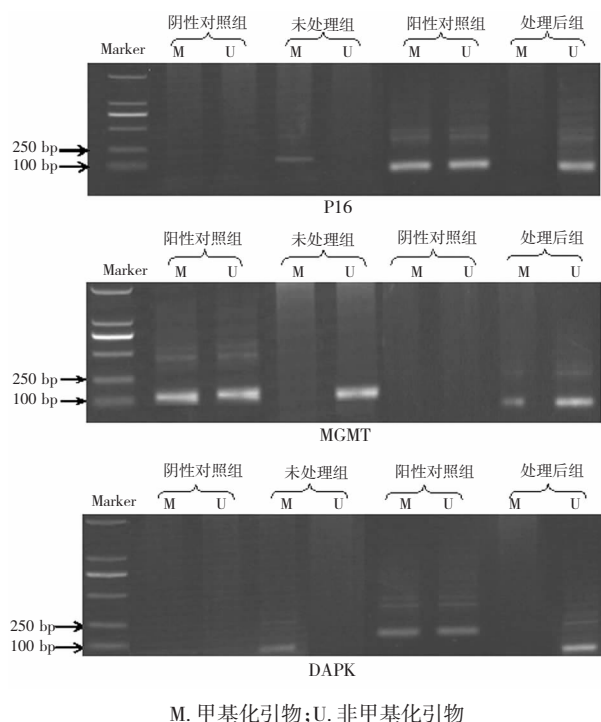


图 1 5-氮杂胞苷处理 HL60 细胞前后 P16、MGMT、DAPK 基因甲基化状态

Fig.1 Methylation state of P16, DAPK and MGMT before and after 5-azacytidine treatment for HL60 cells

2.2 HL60 细胞经 5-氮杂胞苷处理前后 P16、MGMT、DAPK 基因 mRNA 表达情况

HL60 细胞基因启动子区 CpG 岛于用药前呈高甲基化状态,其 mRNA 表达水平较低,经 5-氮杂胞苷处理后,P16、MGMT、DAPK 基因表达水平较用药前均明显上调;经统计分析,经 5-氮杂胞苷处理后 3 个基因的 mRNA 表达水平与用药前均有显著性差异(表 2、图 2)。

表 2 HL60 细胞经 5-氮杂胞苷处理前后 P16、MGMT、DAPK 基因 mRNA 表达强度

Tab.2 mRNA expression intensity of P16, DAPK and MGMT before and after 5-azacytidine treatment for HL60 cells

检测基因	处理前	处理后	统计量及 P 值 (与处理前比较)
P16	0.22 ± 0.04	0.64 ± 0.12	$t=2.132$ $P=4.274 \times 10^{-7}$
MGMT	0.75 ± 0.10	1.37 ± 0.10	$t=2.589$ $P=2.072 \times 10^{-4}$
DAPK	0.36 ± 0.08	1.27 ± 0.09	$t=2.348$ $P=2.610 \times 10^{-5}$

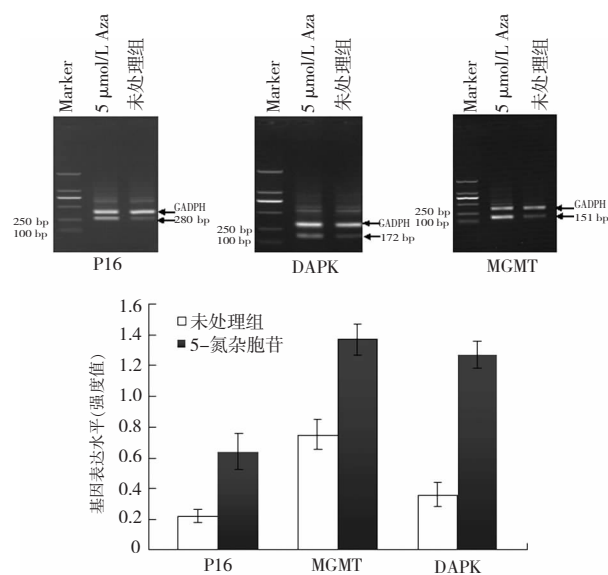


图 2 5-氮杂胞苷处理 HL60 细胞前后 P16、DAPK 及 MGMT 基因 mRNA 表达

Fig.2 mRNA expression levels of P16, DAPK and MGMT before and after 5-azacytidine treatment for HL60 cells

3 讨论

表观遗传学异常在肿瘤发生发展中的作用得到了广泛的证实,基因甲基化是表观遗传修饰的主要和常见形式。本研究发现,在 HL60 细胞中,采用 MSP 法发现 P16 基因、DAPK 基因及 MGMT 基因甲基化引物扩增出阳性条带,而非甲基化引物未能扩增出条带,提示 P16、DAPK 基因及 MGMT 基因启动子区 CpG 岛均表现为高甲基化。P16 基因又称细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 2,P16 蛋白通过对细胞周期蛋白依赖性激酶 4 和 6 介导的 Rb 蛋白磷

酸化过程的抑制而参与细胞周期调控,以起到促进细胞凋亡以及防止癌变^[5]。DAPK 是一种凋亡相关蛋白,与已知的多条凋亡相关途径均有关联,DAPK 激活经典的 p53-胱天蛋白酶凋亡途径而促进细胞凋亡,其表达水平下降与肿瘤发生发展及转移密切相关,研究发现 DAPK 基因启动子区的甲基化程度有助于判断慢性粒细胞白血病的预后及疾病状态^[6,7]。而 MGMT 是一种普遍存在的 DNA 修复酶,可将由于烷化剂作用使 DNA 鸟嘌呤 O⁶ 位发生烷基化而形成的 O⁶-鸟嘌呤加合物从 DNA 上移除,进而使存在 DNA 损伤的细胞不再增生并以此保持基因组的完整性,由此使细胞免受烷化剂的损伤^[8]。上述 3 个基因在人早幼粒细胞白血病细胞系 HL-60 细胞均呈现高甲基化状态提示基因甲基化在白血病细胞系的普遍性特点。

5-氮杂胞苷还作为一种生物反应调节剂,在体内和体外通过抑制 DNA 甲基转移酶 1 的活性而发挥去甲基化效应。研究还显示 5-氮杂胞苷也可作用于细胞信号转导系统,减少炎症介质因子如 γ 干扰素、肿瘤坏死因子的产生,从而提高异常造血干细胞对细胞因子的敏感性,并上调细胞生长停止相关基因表达进而调控细胞周期进展^[9]。5-氮杂胞苷对真核细胞的作用表现出剂量相关的双重性,高浓度时具有细胞毒作用,低浓度时通过非竞争性地结合到真核生物 DNA 上甲基转移酶的结合位点,从而阻断甲基转移酶的活性发挥其脱甲基作用^[10]。1971 年美国国立癌症研究院首先发现 5-氮杂胞苷的抗肿瘤活性;随后的临床研究证实,5-氮杂胞苷对 MDS 的完全缓解率为 10%,部分缓解率为 1%,血液学进步 36%,总有效率达到 47%^[11]。也有个案报道 5-氮杂胞苷对复发和顽固急性白血病和慢性髓系白血病急变时具有一定疗效^[12]。本研究在前期研究中发现不同浓度的 5-氮杂胞苷对髓系白血病细胞系具有增殖抑制作用并探索了其在不同时间的半数抑制浓度^[13]。

本研究中,应用 5-氮杂胞苷处理 HL60 白血病细胞系后 P16 及 DAPK 基因甲基化引物未见扩增产物,而非甲基化引物则扩增出阳性产物,证实 P16 及 DAPK 基因启动子区 CpG 岛在用药后发生了完全去甲基化,应用 5-氮杂胞苷处理后 MGMT 基因甲基化引物及非甲基化引物均扩增出阳性产物,显示 MGMT 基因启动子区 CpG 岛在应用 5-氮杂胞苷处理后发生了部分去甲基化。经 RT-PCR 半定量检

测显示,应用 5-氮杂胞苷处理后 3 个基因的 mRNA 表达上调。因此,5-氮杂胞苷作用于肿瘤细胞的主要机制是通过其去甲基化作用,重新激活了那些由于 DNA 过度甲基化而受到抑制的抑癌基因或多种细胞调控基因,从而使细胞向终末分化、凋亡或衰老,并促进细胞凋亡、抑制细胞增殖。

参 考 文 献

- [1] Issa J P. DNA methylation as a therapeutic target in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(6): 1634-1637.
- [2] Ellis L, Atadja P W, Johnstone R W. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(6): 1409-1420.
- [3] Kaminskas E, Farrell A T, Wang Y C, et al. FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacitidine, vidaza) for injectable suspension[J]. Oncologist, 2005, 10(3): 176-182.
- [4] Fenaux P, Mufti G J, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(3): 223-232.
- [5] Liu Y, Johnson S M, Fedoriw Y, et al. Expression of p16INK4a prevents cancer and promotes aging in lymphocytes[J]. Blood, 2011, 117(12): 3257-3267.
- [6] Lin Y, Hupp T R, Stevens C. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: additional roles beyond cell death[J]. FEBS J, 2010, 277(1): 48-57.
- [7] Qian J, Wang Y L, Lin J, et al. Aberrant methylation of the death-associated protein kinase 1 (DAPK1) CpG island in chronic myeloid leukemia[J]. Eur J Haematol, 2009, 82(2): 119-123.
- [8] Liu L, Gerson S L. Targeted modulation of MGMT: clinical implications [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(2): 328-331.
- [9] Sánchez-Abarca L I, Gutierrez-Cosío S, Santamaría C, et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting[J]. Blood, 2010, 115(1): 107-121.
- [10] Glover A B, Leyland-Jones B. Biochemistry of azacitidine: a review [J]. Cancer Treat Rep, 1987, 71(10): 959-964.
- [11] Kaminskas E, Farrell A, Abraham S, et al. Approval summary: azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(10): 3604-3608.
- [12] Wermke M, Thiede C, Kiani A, et al. Successful treatment of molecular relapse in NPM1-positive AML using 5-azacytidine[J]. Leukemia, 2010, 24(1): 236-237.
- [13] 苏庸春, 徐西华, 蔡 倩, 等. 甲基化抑制剂 5-氮杂胞苷对 HL-60 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(7): 981-984.

Su Y C, Xu Y H, Cai Q, et al. 5-Azacytidine inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2010, 35(7): 981-984.

(责任编辑: 关蕴良)