硼替佐米对 K562 细胞株 DNMT1 表达的影响

吴圣豪, 郑翠苹, 刘 珍, 周文锦, 陈月苗
(温州市第二人民医院, 浙江 温州 325000)

摘要: [目的] 探讨蛋白酶体抑制剂硼替佐米(bortezomib)对 K562 细胞株 DNA 甲基转移酶(DNMTs)表达、细胞凋亡的影响。[方法] 以不同浓度的硼替佐米(0、6、20、60nmol/L)处理白血病 K562 细胞株, Western blot 法检测细胞内 DNMT1 的表达, 流式细胞术检测细胞凋亡。[结果] 与对照组相比, 硼替佐米可显著抑制 DNMT1 表达; 硼替佐米作用于细胞 12、24、36h 后细胞凋亡率逐渐增加, 60nmol/L 硼替佐米作用 36h 后细胞凋亡率最高, 为 $61.68\% \pm 3.20\%$ 。[结论] 硼替佐米抑制 K562 细胞株 DNMT1 表达, 并诱导细胞凋亡, 呈浓度依赖性。
关键词: 白血病; 硼替佐米; DNA 甲基转移酶
中图分类号: R733.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)12-0920-03

Effect of Bortezomib on the Expression of DNA Methyltransferase in K562 Cell Line

WU Sheng-hao, ZHENG Cui-ping, LIU Zhen, et al.
(The Second People's Hospital of Wenzhou, Wenzhou 325000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of bortezomib on the expression of DNA methyltransferase (DNMTs) and on cell apoptosis in K562 cell line. [Methods] K562 cells were treated by bortezomib with the concentrations of 0, 6, 20 and 60nmol/L respectively. Western blot was used to analyze the intracellular expression of DNMT1, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis. [Results] Compared with control group, the expression of DNMT1 decreased when treated with Bortezomib. Along with Bortezomib for 12, 24, 36h, the apoptosis increased gradually, and reached the highest after treating with 60nmol/L Bortezomib for 36h. [Conclusion] Bortezomib can suppress the expression of DNMT1 and induce apoptosis of K562 cells with concentration-dependence.

Subject words: leukemia; Bortezomib; DNA methyltransferase

DNA 甲基化异常是人类恶性肿瘤及白血病的一种最常见的可以查明的分子异常^[1], DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMTs)活性增高是其重要原因。硼替佐米(bortezomib)是蛋白酶体抑制剂类抗肿瘤药物, 临床主要用于治疗复发及难治性多发性骨髓瘤, 在白血病治疗方面的应用仍处于理论研究和探索阶段, 国外最新研究证实了硼替佐米可以通过抑制 DNMT1 的表达使部分白血病细胞株抑癌基因的甲基化程度降低^[2]。本研究通过检验硼替佐米对白血病 K562 细胞株的 DNMT1 活性的影响, 观察细胞凋亡变化, 为白血病的基因治疗提供新思路。

基金项目: 温州市科技计划项目(Y20100070)
通讯作者: 郑翠苹, 主任医师, 副教授, 学士; 温州市第二人民医院血液化疗科, 浙江省温州市江滨西路康乐坊口(325000); E-mail: cuipingzheng@163.com。
收稿日期: 2012-04-17; **修回日期:** 2012-10-11

1 材料与方法

1.1 材料

K562 细胞株由浙江大学医学院血液病实验室赠送; RPMI 1640 培养基、蛋白提取试剂盒及实验相关引物合成由南京凯基生物公司提供。Annexin V-FITC 凋亡试剂盒为美国 Bipek 公司产品, 硼替佐米为美国 Millennium 公司产品。兔抗人 DNMT1、 β -actin 多克隆抗体为美国 Cell-signaling 公司产品, 碱性磷酸酶标志山羊抗兔二抗、BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒购自上海优宁维生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞株体外培养及硼替佐米处理 K562 细胞株

K562 细胞置于含 10% 灭活新鲜小牛血清 RPMI 1640 培养液, 在 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培

养,保持细胞活力>97%。取指数生长期的 K562 细胞(1×10^5 /ml)分为对照组与实验组,实验组加入不同终浓度的硼替佐米(6、20、60nmol/L),作用时间分别为 12、24、36h。对照组加入无硼替佐米的细胞培养液,相同条件下培养。实验分组:A 组:不加任何处理的对照组;B 组:6nmol/L 硼替佐米处理组;C 组:20nmol/L 硼替佐米处理组;D 组:60nmol/L 硼替佐米处理组。

1.2.2 Western blot 法检测胞内 DNMT1 表达

收集硼替佐米作用 12、24、36h 后的各处理组细胞,Western blot 及 IP 细胞裂解液提取胞内蛋白,参照试剂盒说明用 BCA 方法测定蛋白浓度,并调节浓度,每泳道取 100 μ g 上样,于 10%SDS-PAGE 凝胶电泳后,电转至硝酸纤维素膜,以 β -actin 为内参蛋白,加入兔抗人 DNMT1 多克隆抗体、 β -actin 一抗、碱性磷酸酶标志山羊抗兔二抗、BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒显色。采用 BandScan 软件分析各组蛋白条带与相应 β -actin 的 A 值之比。实验重复 3 次。

1.2.3 Annexin-V 法流式细胞仪 (FCM) 检测 K562 细胞凋亡率

收集硼替佐米各浓度处理 12、24、36h 的 K562 细胞 1×10^6 个,用 PBS 洗涤 2 次,离心弃上清,加入 100 μ l Binding Buffer 和 FITC 标记的 Annexin-V (20mg/L)10 μ l,室温避光 30min,再加入 PI(50mg/L)5 μ l,避光反应 5min 后,加入 400 μ l Binding Buffer,立即用 FCM 进行定量检测,同时以不加 Annexin-V-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。单纯 FITC 阳性 (FITC+/PI-)细胞群为早期凋亡细胞。

1.3 统计学处理

应用统计分析软件包 SPSS13.0 进行统计学分析。实验数据用 ($\bar{x} \pm s$)表示,组间分析比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 硼替佐米对 K562 细胞株 DNMT1 的活性影响

Western blot 结果显示,与 A 组比较,硼替佐米可诱导 DNMT1 表达下调,B、C、D 3 组 DNMT1 吸光度值均低于对照组,其作用随硼替佐米浓度增加而增强,差异有统计学意义($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 不同浓度硼替佐米作用 DNMT1 表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	DNMT1 表达		
	12h	24h	36h
A 组 (0nmol/L)	0.92 $\pm$ 0.14	0.74 $\pm$ 0.12	0.54 $\pm$ 0.10
B 组 (6nmol/L)	0.88 $\pm$ 0.15*	0.62 $\pm$ 0.11*	0.41 $\pm$ 0.09*
C 组 (20nmol/L)	0.57 $\pm$ 0.09**	0.51 $\pm$ 0.10*	0.30 $\pm$ 0.06*
D 组 (60nmol/L)	0.38 $\pm$ 0.03**	0.32 $\pm$ 0.05*	0.19 $\pm$ 0.03*

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2.2 硼替佐米诱导 K562 细胞株细胞凋亡

结果表明硼替佐米能有效地诱导细胞凋亡,各处理组细胞凋亡率与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。同一药物浓度组作用 12、24、36h 的细胞凋亡率逐渐增加,以 60nmol/L 硼替佐米作用 36h 时的凋亡率最高,为 61.68% $\pm$ 3.20% (表 2)。

表 2 不同浓度硼替佐米作用不同时间细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞凋亡率 (%)		
	12h	24h	36h
A 组 (0nmol/L)	3.50 $\pm$ 0.21	3.84 $\pm$ 0.41	4.16 $\pm$ 0.77
B 组 (6nmol/L)	12.21 $\pm$ 2.64*	21.61 $\pm$ 2.89*	24.22 $\pm$ 2.50*
C 组 (20nmol/L)	20.15 $\pm$ 4.40*	32.50 $\pm$ 2.45*	43.51 $\pm$ 3.02*
D 组 (60nmol/L)	27.52 $\pm$ 3.32*	41.70 $\pm$ 3.05*	61.68 $\pm$ 3.20*

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

许多研究证明, DNMT1 在实体瘤和造血系统肿瘤中表达明显增高。用 RT-PCR 法研究 DNMT1 在正常血细胞和急性髓性白血病中的 mRNA 表达时发现, DNMT1 在急性髓性细胞白血病和慢性髓性细胞白血病急性期的 mRNA 表达比正常骨髓细胞对照分别增高 5.3 和 3.2 倍^[3], 有效地抑制或选择性沉默甲基化转移酶可以达到抗肿瘤效果^[4,5], 提示高表达的 DNMT1 具有持续性或重新甲基化能力, 诱导某些相关基因, 特别是一些抑癌基因异常的、区域性过甲基化, 最终导致白血病恶性克隆形成。

人类 DNMT1 的活性受 Sp1 锌指蛋白的调控^[6,7], NF- κ B 可通过结合于 Sp1 促进 Sp1 的转录调控活性。相反, NF- κ B 抑制剂阻碍 Sp1 转录调控活性^[8]。NF- κ B 的激活在白血病细胞活化及发挥免疫效应过程中起重要作用, 细胞活化过程中 NF- κ B 等核因子的磷酸化将细胞外信号传至细胞核, 促进细胞因子的表达、分泌, 最终导致白血病细胞分化、增殖。

硼替佐米已经证实是 NF- κ B 强有力的抑制剂, Liu 等^[2]证实硼替佐米可以通过阻碍 Sp1 转录调控

活性而抑制甲基化转移酶的表达。本研究检测了硼替佐米干预 K562 细胞株后, DNMT1 酶催化活性和细胞生活状态变化, 用 Western blot 技术分析硼替佐米作用后培养体系细胞 DNMT1 的变化, 发现胞内 DNMT1 的活性均下降, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 DNMT1 转录水平及催化甲基转移能力下降; 同时, 研究还发现该作用在一定的浓度范围内呈现明显的浓度依赖性。

本研究亦证实经硼替佐米处理 K562 细胞后, 肿瘤细胞增殖减缓, 凋亡率增加。硼替佐米能有效地诱导 K562 细胞凋亡, 细胞凋亡率随硼替佐米浓度的升高而增大, 硼替佐米作用 36h 后凋亡细胞比例显著高于其他时间, 细胞凋亡率与作用时间有正相关趋势。Jung 等^[9]在白血病细胞株也观察到了相似的细胞凋亡现象。Jiemjit 等^[10]发现 DNA 低甲基化可以上调 p21 使白血病细胞的细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 在 DNA 复制过程中导致 DNMT1 转移甲基的催化活性下降, 避免基因启动子的甲基化, 维持抑癌基因正常表达, 降低肿瘤细胞的侵袭性, 诱导肿瘤细胞高分化。

总之, 本研究证实了在硼替佐米的干预下, 白血病 K562 细胞株的 DNMT1 的表达水平下降, 肿瘤细胞的生长受到抑制, 凋亡率增加, 本研究可为硼替佐米在白血病治疗中的应用以及其他以 DNMT1 为靶点药物在白血病中的研究提供可靠依据, 显示硼替佐米有望成为治疗血液系统恶性肿瘤的新的低甲基化治疗药物。

参考文献:

[1] Qu Y, Mu G, Wu Y, et al. Overexpression of DNA Methyl-

transferases 1, 3a, and 3b significantly correlates with retinoblastoma tumorigenesis [J]. Am J Clin Pathol, 2010, 134(5):826-834.

- [2] Liu S, Liu Z, Xie Z, et al. Bortezomib induces DNA hypomethylation and silenced gene transcription by interfering with Sp1/NF- κ B-dependent DNA methyltransferase activity in acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2008, 111(4): 2364-2373.
- [3] Subramanyam D, Belair CD, Barry-Holson KQ, et al. PML-RAR α and Dnmt3a1 cooperate in vivo to promote acute promyelocytic leukemia [J]. Cancer Res, 2010, 70(21):8792-8801.
- [4] Ghoshal K, Bai S. DNA methyltransferases as targets for cancer therapy [J]. Drugs Today (Barc), 2007, 43(6):395-422.
- [5] Liu S, Shen T, Huynh L, et al. Interplay of RUNX1/MTG8 and DNA methyltransferase 1 in acute myeloid leukemia [J]. Cancer Res, 2005, 65(4):1277-1284.
- [6] Kishikawa S, Murata T, Kimura H, et al. Regulation of transcription of the DNMT1 gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins [J]. Eur J Biochem, 2002, 269(12):2961-2970.
- [7] Zhu WG, Srinivasan K, Dai Z, et al. Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21 (Cipl) promoter [J]. Mol Cell Bio, 2003, 23(12):4056-4065.
- [8] Al-Sarraj A, Day RM, Thiel G. Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3 and Egr-1 [J]. J Cell Biochem, 2005, 94(1):153-167.
- [9] Jung Y, Park J, Kim TY, et al. Potential advantages of DNA methyltransferases-1 (DNMT1)-targeted inhibition for cancer therapy [J]. J Mol Med (Berl), 2007, 85(10):1137-1148.
- [10] Jiemjit A, Fandy TE, Carraway H, et al. p21 (WAF1/CIP1) induction by 5-azacytosine nucleosides requires DNA damage [J]. Oncogene, 2008, 27(25):3615-3623.