

甲基化抑制剂对 CEM 细胞 EphB4 基因表达及细胞增殖与凋亡的影响

李玉华¹ 文飞球² 陈亦欣³ 李长钢² 张朝霞¹ 陈小文² 李博¹

(1. 暨南大学附属第二临床医学院深圳市人民医院儿科, 广东 深圳 518020;
2. 深圳市儿童医院血液肿瘤科, 广东 深圳 518026;
3. 暨南大学附属第二临床医学院深圳市人民医院肿瘤科, 广东 深圳 518026)

[摘要] **目的** 探讨甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-CdR) 对人急性淋巴细胞白血病细胞株 CEM 中抑癌基因 EphB4 的转录调控作用及对 CEM 细胞增殖凋亡的生物学影响, 为寻找肿瘤治疗新靶点提供实验依据。**方法** 采用亚硫酸氢盐修饰后测序法检测 EphB4 基因甲基化水平, 荧光定量 PCR 法(Q-PCR) 和 Western blot 方法检测 5-aza-CdR 处理前后 EphB4 基因 mRNA 及蛋白表达水平; MTS 法检测不同剂量(1.0、2.5、5.0 μmol/L) 的 5-aza-CdR 作用于 CEM 细胞 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 对 CEM 细胞存活率的影响, 流式细胞仪分析 5-aza-CdR 作用 96 h 对 CEM 细胞周期及凋亡的影响。**结果** CEM 细胞中存在 EphB4 基因的甲基化, 甲基化水平为 31.4%; 不同浓度 5-aza-CdR 作用后 CEM 细胞甲基化水平均下降。5-aza-CdR 作用使 CEM 细胞中 EphB4 基因的 mRNA 和蛋白表达上升; 5-aza-CdR 明显抑制 CEM 细胞增殖, 并与药物浓度及作用时间呈正相关。5-aza-CdR 处理 96 h 后, 早期凋亡由 4.1% 上升为 24.8%。用药 96 h 后, CEM 细胞 G1 期由 62.4% 降至 46.8%, G2 期由 2.1% 升至 16.2%, 细胞阻滞于 G2 期。**结论** 特异性甲基化转移酶抑制剂 5-aza-CdR 能使 CEM 细胞中沉默的 EphB4 基因重新表达, 并可抑制白血病细胞增殖和诱导其凋亡。 [中国当代儿科杂志, 2012, 14(3): 205-209]

[关键词] 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; EphB4 基因; 增殖; 凋亡; CEM 细胞
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)03-0205-05

Effect of methylation inhibitor on EphB4 gene expression, proliferation and apoptosis in CEM cells

LI Yu-Hua, WEN Fei-Qiu, CHEN Yi-Xin, LI Chang-Gang, ZHANG Zhao-Xia, CHEN Xiao-Wen, LI Bo. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of Jinan Medical College, Jinan University, Shenzhen, Guangdong 518020, China (Wen F-Q, Email: fwen26@126.com)

Abstract: Objective To study the regulation of methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine on transcription of EphB4 gene and effects on the proliferation and apoptosis of human acute lymphocyte leukemia cell line CEM. **Methods** Bisulfite sequencing PCR was used to detect CpG island methylation density in EphB4 promoter. The expression of EphB4 mRNA and protein was determined by Q-PCR and Western blot. MTS assay and flow cytometry were used to detect the apoptosis of CEM cells after treatment with different concentrations of 5-aza-2'-deoxycytidine (1.0, 2.5 and 5 μmol/L). **Results** Methylation of EphB4 gene promoter was detected in CEM cells (31.4%). The methylation level of EphB4 gene was down-regulated after treatment with various concentrations of 5-aza-2'-deoxycytidine. The EphB4 mRNA and protein expression in CEM cells increased after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. 5-Aza-2'-deoxycytidine significantly inhibited the cell growth in dose and time dependent manners. Early apoptosis rates of CEM cells increased from 4.1% to 24.8% 96 hrs after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. CEM cells in G1 phase decreased from 62.4% to 46.8%, cells in G2 phase increased from 2.1% to 16.2%, and CEM cells were arrested in G2 phase after treatment with 5 μmol/L 5-aza-2'-deoxycytidine for 96 hrs. **Conclusions** 5-Aza-2'-deoxycytidine, an inhibitor of specific methylation transferase, can induce expression of the silent EphB4 gene in CEM cells, inhibit the proliferation of leukemia cells and induce cell apoptosis. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(3): 205-209]

Key words: 5-Aza-2'-deoxycytidine; EphB4 gene; Proliferation; Apoptosis; CEM cell

[收稿日期] 2011-10-17; [修回日期] 2011-11-16
[基金项目] 广东省自然科学基金(No. S2011010004349); 深圳市科技计划项目(No. 201102156)。
[作者简介] 李玉华, 女, 硕士研究生。
[通信作者] 文飞球, 主任医师。

抑癌基因启动子 CpG 岛的异常甲基化与白血病发病关系密切,异常甲基化导致基因沉默,促进了肿瘤的发生^[1]。红细胞生成素生成人肝细胞癌细胞系(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma cell line, Eph)基因家族是酪氨酸蛋白激酶受体家族(receptor tyrosine kinases)中最大的一个亚群,迄今为止,Eph 基因家族已有 16 个成员,EphB4 是其重要成员。有研究显示 Eph 受体是肿瘤抑制因子^[2-3]。人类实体瘤的研究发现,结肠直肠癌和乳腺癌的 EphB2、EphB4 和 EphB6 基因发生了甲基化^[4-5]。然而对于血液系统恶性肿瘤,Eph 受体和配体的高甲基化及表观遗传学调节还没有被详细研究。本研究从分子细胞水平检测人急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL) CEM 细胞中 EphB4 基因 mRNA 和蛋白表达水平;研究 EphB4 基因启动子区甲基化状态及其对 CEM 细胞增殖、凋亡的影响;探讨 EphB4 基因甲基化状态在 ALL 发病的作用及其发生发展过程中的生物学意义,为寻找肿瘤治疗的新靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人 ALL CEM 细胞株购自 ATCC,并为本实验室长期保存。新生胎牛血清、RPMI-1640 培养基和青霉素+链霉素双抗均购自美国 Hyclone 公司。5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-CdR)购自美国 Sigma 公司。EphB4 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。基因组 DNA 抽提试剂盒购自美国 Promega 公司,亚硫酸氢盐修饰试剂盒购自德国 QIAGEN 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自北京东胜创新公司。pMD19-T 载体试剂盒购自日本 TAKARA 公司。Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司。MTS/PMS 检测试剂盒购自美国 Promega 公司。Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒购自日本 TOYOBO 公司。ABI-7500 型 FQ-PCR 扩增仪:美国 Applied Biosystems 公司。Caliber 流式细胞仪:美国 BD 公司。Multiscan MK3 全自动酶标仪:美国 Thermo Fisher Scientific。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理 用 RPMI-1640 培养基加 10% 胎牛血清培养,37℃、饱和湿度、5% CO₂ 正常传代培养人 ALL CEM 细胞株。隔天传代,

保持实验所用细胞处于对数生长期。用 1.0、2.5 及 5.0 μmol/L 的 5-aza-CdR 分别处理细胞并于 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 后检测。

1.2.2 基因组 DNA 抽提、亚硫酸氢盐修饰 样品抽提使用 Promega wizard genomic DNA purification kit。亚硫酸氢盐修饰使用 QIAGEN 公司的 EpiTect Bisulfite Kit。将搜集的修饰后的 DNA 于 -20℃ 保存备用。

1.2.3 BSP 法检测 EphB4 基因甲基化水平 将修饰后的 DNA 进行 PCR 扩增,检测序列片段长度 251 bp。设计的引物 Bsp-EPHB4-F1:5'-GAAGTGTTCG-GATTGTAGTGT-3';Bsp-EPHB4-R1:5'-CAAAAAAAT-CAAACCTAAAAAAC-3'。反应体系:DNA 1.0 μL,上游引物 0.5 μL,下游引物 0.5 μL,2×PCR Master Mix 10 μL, dH₂O 8.0 μL,总体积 20 μL。反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。使用 DNA 凝胶回收试剂盒进行 PCR 产物回收。将目的片段与载体连接:向 0.2 mL EP 管中加入酶切回收的 PCR 产物 2.2 μL,pMD19-T 载体 0.8 μL,Solution I 3.0 μL,16℃ 连接 2 h。连接产物的转化:冰浴中将 6.0 μL 连接产物分别加入至 30 μL DH5α 感受态细胞中,轻轻旋转混匀,冰浴 30 min;42℃ 水浴热休克 90 s;快速将管转移至冰浴中,冰浴 2 min;分别加入 200 μL LB 培养基,混匀,37℃、200 rpm 振荡培养 1 h;将菌液涂布于含氨苄青霉素(100 μg/mL)、X-Gal、IPTG 的 LB 平板表面,室温下放置,至液体吸收;倒置平板,转移入 37℃ 生化培养箱过夜培养。质粒酶切鉴定及阳性克隆:从平板上面各接 5 个菌落于 3.0 mL LB 管中摇床过夜培养,提取其质粒;酶切鉴定所提取质粒;经克隆后送到华大公司测序。设对照组(未用 5-aza-CdR 处理的 CEM 细胞)及处理组(用 1.0 μmol/L、2.5 μmol/L、5.0 μmol/L 的 5-aza-CdR 分别处理 CEM 细胞 96 h),进行 BSP 测序。

1.2.4 Q-PCR 验证基因表达情况 收集 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 用 5.0 μmol/L 的 5-aza-CdR 处理的细胞。每个时间点均设 3 个复孔。Trizol 一步法分别抽提细胞总 RNA。在光度计上测定 OD 值,检测纯度。取 RNA 样品 1.0 μL,1% 琼脂糖凝胶电泳 80 V×20 min,检测完整性。逆转录体系含 5× 逆转录缓冲液 4.0 μL,随机引物 0.5 μL,10 mmol/L dNTP 2.0 μL,Rnase 抑制剂 0.5 μL,MMLV 0.5 μL,Oligo(dT) 0.5 μL, RNA 1.0 μL。将上述 20 μL 反应溶液 30℃ 保温 10 min;42℃ 保温 50 min;72℃ 保温 10 min。Q-PCR:内参片段为 18

SrRNA, 片段长度 112 bp; 目的片段为 EphB4, 片段长度 202 bp。设计的引物 EphB4-F1: 5'-GCCTCAC-TACTCAGCTTTTGG-3'; EphB4-R1: 5'-GGACTTCAT-GTGCTGGACACT-3'。反应体系: cDNA (1:20 稀释) 5.0 μL , 上游引物 0.5 μL , 下游引物 0.5 μL , 2 $\times$ SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , dH_2O 4.0 μL , 总体积 20 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 32 s, 共 40 个循环。融解曲线分析: 温度 60 $^{\circ}\text{C}$ ~ 95 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.5 Western blot 检测 EphB4 蛋白表达水平

设对照组 (未用 5-aza-CdR 处理的 CEM 细胞) 及处理组 (分别用 1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 处理 CEM 细胞 72 h), 每组均设 3 个复孔。分别收集对照组及处理组的细胞约 1×10^7 个。细胞样品经 1000 rpm 离心 10 min, 弃培养液, PBS 清洗 2 次; 加入提取缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻摇 15 min; 收集裂解液到 EP 管中, 14000 rpm 离心 15 min; 取上清到新的 EP 管中, BCA 法测量蛋白浓度。将提取好的蛋白溶液和上样缓冲液按 2:1 混合, 煮沸 5 min; 混合液行 SDS-PAGE 电泳: 80 V 恒压 50 min, 120 V 恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止; 将分离的条带电转移至 PVDF 膜上。取出杂交膜, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 将稀释浓度适宜的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, Factor IX 和 Factor VIII 稀释比例为 1:1000。相应二抗稀释液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。蒸馏水漂洗膜 2 min, 弃去液体, 共洗 3 次。将化学荧光发光底物加到膜的表面 5 min, 放至暗盒, 显影。扫描仪扫描蛋白质条带, Imagequant 5.1 软件定量分析蛋白质条带灰度值, 以 GAPDH 条带作为参照。取目的蛋白条带与 GAPDH 相对灰度比值进行动态比较。

1.2.6 MTS 法测定 5-aza-CdR 对细胞增殖的影响

将 5-aza-CdR 溶于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 浓度分别为 1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 。实验设 5 组, 分别为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组、对照组 (仅有培养液、细胞, 无药物) 和空白组 (仅有培养液, 无细胞和药物), 每组设 3 个复孔。细胞传代培养后, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 即每孔细胞为 1×10^4 个, 处理组每孔加入 100 μL 含不同浓度 5-aza-CdR 的 RPMI-1640 培养基, 对照组和空白组加入 100 μL 培养液, 分别于 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 加入细胞增殖检测试剂 10 μL , 孵育 4 h 后, 用全自动酶标仪于 490 nm 处检测光密度 (A)。实验抑制率 = (对照组平均 OD 值

- 实验组 OD 值) / 对照组平均 OD 值 $\times 100\%$ 。以此 A 值为纵坐标, 时间为横坐标绘制生长曲线。

1.2.7 流式细胞仪检测 5-aza-CdR 对细胞凋亡的影响

分别收集 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 用 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 处理的 CEM 细胞。每个时间点均设 3 个复孔。0 h 设为对照组, 即未用 5-aza-CdR 处理组。用 PBS 洗涤细胞 2 次 (2000 rpm 离心 5 min) 后收集 $5 \sim 10 \times 10^5$ 个细胞; 加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞; 先加入 5.0 μL Annexin V-FITC 混匀后, 再加入 5.0 μL 碘化丙啶 (PI) 染色液, 混匀; 室温、避光、染色 5 ~ 15 min; 用流式细胞仪进行检测。

1.2.8 流式细胞仪检测 5-aza-CdR 对细胞周期的影响

分别收集 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 用 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 处理的 CEM 细胞。每个时间点均设 3 个复孔。0 h 设为对照组, 即未用 5-aza-CdR 处理组。用 PBS 洗涤细胞 2 次 (2000 rpm 离心 5 min) 后收集 $5 \sim 10 \times 10^5$ 个细胞。细胞固定: 离心收集细胞, 弃上清, 用预冷 PBS 洗细胞 2 次, 加入预冷 70% 乙醇, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。细胞染色: 离心收集细胞, 以 1 mL 的 PBS 洗细胞 1 次, 加入 100 $\mu\text{g/mL}$ RNase A 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 然后加入 500 μL PI 染色液 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。流式分析: 以标准程序用流式细胞仪检测, 一般计数 2 ~ 3 万个细胞, 结果用细胞周期拟和软件 ModFit 分析。

1.3 统计学分析

所有数据用 SPSS 16.5 统计学软件进行处理。计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组均数间的比较采用单因素方差分析, 两样本均数间的比较采用 t 检验, 率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-aza-CdR 对 CEM 细胞 EphB4 基因甲基化、mRNA 表达及蛋白表达的影响

对照组 CEM 细胞 EphB4 基因启动子 CpG 岛甲基化水平为 31.4%, 提示 CEM 细胞存在 EphB4 基因的甲基化。1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 处理 CEM 细胞 96 h 后甲基化水平分别为 12.9%、12.9%、11.4%, 处理前后甲基化水平差异均有统计学意义 (分别 $\chi^2 = 7.00$ 、7.00、8.32, 均 $P < 0.01$); 不同浓度 5-aza-CdR 处理后 CEM 细胞甲基化水平之间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.09$, $P = 0.057$)。见

图 1A。

对照组 CEM 细胞中有少量 EphB4 mRNA 表达,5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 作用于 CEM 细胞,随着药物作用时间的延长,EphB4 mRNA 表达水平呈现上升趋势 ($F = 16.95, P = 0.001$),其中 24 h 与 48 h 之间的 EphB4 mRNA 表达差异无统计学意义,72 h 与 24 h、48 h 之间的表达差异有统计学意义。见图 1B。

对照组即未加入 5-aza-CdR 的 CEM 细胞中有少量 EphB4 蛋白表达。对照组、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组 EphB4 蛋白表达水平分别为 0.209 ± 0.041 、 0.354 ± 0.046 、 0.756 ± 0.052 、 0.944 ± 0.091 。EphB4 蛋白表达随着 5-aza-CdR 作用浓度的增加而增加,差异有统计学意义 ($F = 95.48, P < 0.001$),见图 1C。

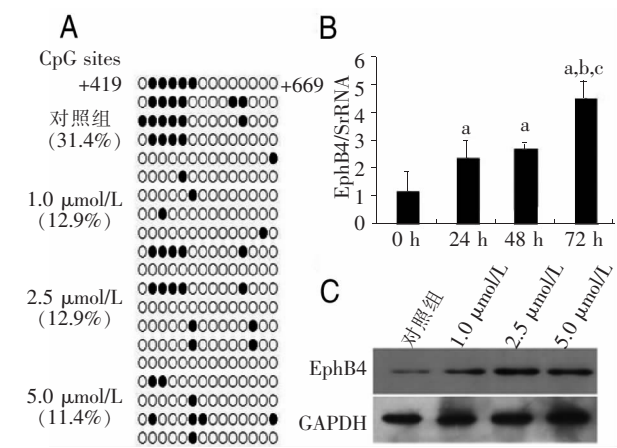


图 1 5-aza-CdR 对 CEM 细胞 EphB4 基因甲基化、mRNA 表达及蛋白表达的影响 A:5-aza-CdR 处理前后 EphB4 基因甲基化的改变。○是非甲基化的 CpG 位点;●是甲基化的 CpG 位点。B:5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 作用于 CEM 细胞后不同时间 EphB4 mRNA 的表达。a:与 0 h 相比, $P < 0.05$;b:与 24 h 相比, $P < 0.05$;c:与 48 h 相比, $P < 0.05$ 。C:不同浓度 5-aza-CdR 作用于 CEM 细胞 72 h 后 EphB4 基因的蛋白表达。

2.2 5-aza-CdR 对 CEM 细胞增殖的影响

用 1.0、2.5 及 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 处理细胞,分别在 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 后检测对 CEM 细胞增殖的影响。结果发现,各浓度的 5-aza-CdR 均可以抑制细胞生长。经 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 作用的 CEM 细胞增殖明显减弱。5-aza-CdR 作用 24 h,对照组和处理组的细胞增殖差异无统计学意义 ($t = 0.000, P = 1.000$);作用 48 h、72 h、96 h,两组的细胞增殖差异有统计学意义(分别 $t = 4.330$ 、 9.649 、 $4.541, P < 0.05$),见图 2。

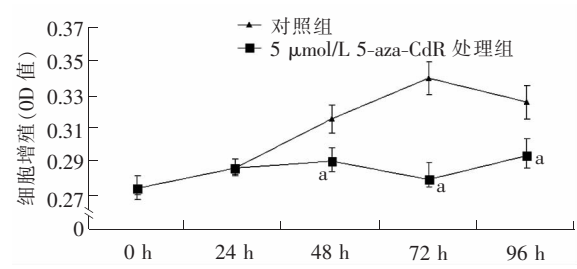


图 2 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR 对 CEM 细胞增殖的影响 a:与对照组同时时间点比较, $P < 0.05$ 。

2.3 5-aza-CdR 对 CEM 细胞凋亡及细胞周期的影响

5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 处理 CEM 细胞 96 h 后,早期凋亡细胞由原来的 4.1% (均数为 0.036 ± 0.005) 上升到 24.8% (均数为 0.203 ± 0.041),差异有统计学意义 ($t = -7.06, P = 0.002$);CEM 细胞 G1 期由 62.4% 降至 46.8%,G2 期由 2.1% 升至 16.2%,细胞阻滞于 G2 期,见图 3~4。

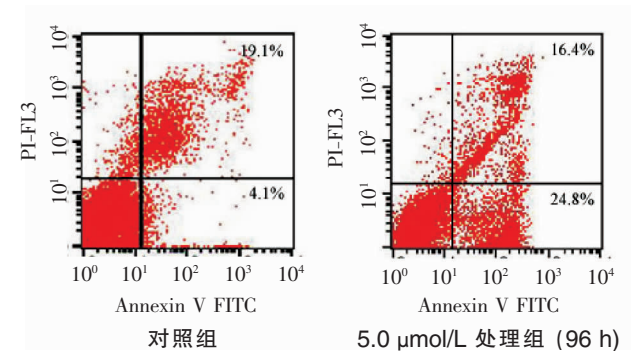


图 3 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 对 CEM 细胞凋亡的影响

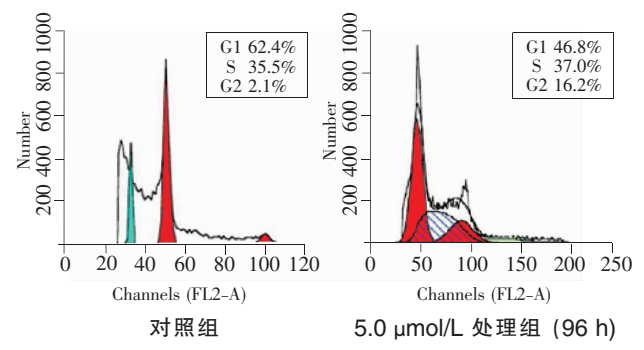


图 4 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 对 CEM 细胞周期的影响

3 讨论

Eph 受体和其配体间的相互作用参与了胚胎发

育模式的许多过程,在神经轴突导向、血管发生、造血细胞的生成和肿瘤形成等方面具有重要作用。有研究发现,某些肿瘤 Eph 受体有明显的表达丢失,如 Alazzouzi 等^[4]报道结肠直肠癌的 EphB2 表达丢失,Davalos 等^[5]报道结肠直肠癌的 EphB4 表达丢失,Fox 等^[6]报道乳腺癌的 EphB6 表达丢失。剔除鼠的 EphB2、EphB3 或 EphA2 基因,会促使鼠患结肠直肠癌和皮肤癌^[2, 7]。另外,在结肠直肠癌及前列腺癌中发现体细胞的 EphB2 基因突变^[8]。

Eph 受体(作为肿瘤抑制因子)表达丢失,可能的机制很多,其中一个原因是 Eph 基因启动子 CpG 岛发生异常的甲基化。异常的 CpG 岛甲基化能导致肿瘤抑癌基因沉默。最近研究人员对 ALL 样本全基因组 CpG 岛的甲基化情况进行筛查,发现几个 Eph/Ephrin 基因 CpG 岛发生了甲基化^[9]。

DNA 甲基化抑制剂是胞嘧啶核苷类似物,能参与快速增长的肿瘤细胞 DNA 合成,通过占有、消耗 DNA 甲基转移酶(DNMTs)特异性地抑制 DNA 甲基化^[10]。5-aza-CdR 已经被 FDA 批准用于治疗骨髓增生异常综合征,并且对于其他血液系统恶性肿瘤也有效,如急性髓性白血病和慢性髓性白血病^[11]。

人 ALL CEM 细胞是研究儿童 ALL 的理想模型。本研究证实 CEM 细胞 EphB4 基因的启动子 CpG 岛存在甲基化,甲基化水平为 31.4%,白血病 CEM 细胞中仅有少量 EphB4 mRNA 和蛋白表达,甲基化抑制了 EphB4 基因的表达,考虑在 ALL 发病过程中 EphB4 基因所起的作用可能是由于 EphB4 基因在白血病细胞中表达水平上的改变引起的,可能导致肿瘤细胞增殖,与国外文献报道相符^[12]。本研究还表明甲基化抑制剂 5-aza-CdR 可以降低 CEM 细胞 EphB4 基因甲基化水平,并且下降程度明显。根据国外文献启动子 CpG 岛甲基化位点 <15% 为非甲基化状态^[12],所以,经过 5-aza-CdR 去甲基化处理后,CEM 细胞 EphB4 基因由甲基化状态恢复到非甲基化状态。同时研究证实,去甲基化的 EphB4 基因恢复了表达;肿瘤细胞增殖受到抑制;诱导了肿瘤细胞凋亡,早期凋亡细胞由原来的 4.1% 上升到 24.8%;肿瘤细胞阻滞于 G2 期,G1 期由 62.4% 降至 46.8%,G2 期由 2.1% 升至 16.2%。因此,本研究提示 EphB4 基因甲基化导致的基因沉默可能促进 ALL 发生,5-aza-CdR 对 CEM 细胞株抑癌基因的

去甲基化作用为去甲基化药物治疗肿瘤提供了一种新思路。白血病的发生同其他恶性肿瘤一样,也是有多因素参与,并经历多阶段演变过程,涉及到多种癌基因(oncogene)的激活和肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene)的失活。本实验仅研究了 EphB4 基因的甲基化情况,对于 Eph 基因家族其他成员的甲基化状态及对 ALL 的发生及预后的影响有待进一步的研究。

[参 考 文 献]

[1] 李玉华,文飞球. DNA 甲基化与儿童白血病的临床研究进展[J]. 中国当代儿科杂志,2011,13(2): 174-176.

[2] Battle E, Bacani J, Begthel H, Jonkeer S, Gregorieff A, van de Born M, et al. EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression[J]. Nature, 2005, 435(7045): 1126-1130.

[3] Noren NK, Foos G, Hauser CA, Pasquale EB. The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(8): 815-825.

[4] Alazzouzi H, Davalos V, Kokko A, Domingo E, Woerner SM, Wilson AJ, et al. Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors[J]. Cancer Res, 2005, 65(22): 10170-10173.

[5] Davalos V, Dopeso H, Castaño J, Wilson AJ, Vilardell F, Romero-Gimenez J, et al. EPHB4 and survival of colorectal cancer patients[J]. Cancer Res, 2006, 66(18): 8943-8948.

[6] Fox BP, Kandpal RP. Transcriptional silencing of EphB6 receptor tyrosine kinase in invasive breast carcinoma cells and detection of methylated promoter by methylation specific PCR[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(1): 268-276.

[7] Guo H, Miao H, Gerber L, Singh J, Denning MF, Gilliam AC, et al. Disruption of EphA2 receptor tyrosine kinase leads to increased susceptibility to carcinogenesis in mouse skin[J]. Cancer Res, 2006, 66(14): 7050-7058.

[8] Huusko P, Ponciano-Jackson D, Wolf M, Kiefer JA, Azorsa DO, Tuzmen S, et al. Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer[J]. Nat Genet, 2004, 36(9): 979-983.

[9] Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, et al. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia[J]. Leukemia, 2008, 22(8): 1529-1538.

[10] Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy[J]. Nature, 2004, 429(6990): 457-463.

[11] Plimack ER, Kantarjian HM, Issa JP. Decitabine and its role in the treatment of hematopoietic malignancies[J]. Leuk Lymphoma, 2007, 48(8): 1472-1481.

[12] Kuang SQ, Bai H, Fang ZH, Lopez G, Yang H, Tong W, et al. Aberrant DNA methylation and epigenetic inactivation of Eph receptor tyrosine kinases and ephrin ligands in acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2010, 115(12): 2412-2419.

(本文编辑:俞燕)