

甲基化抑制剂 5-杂氮胞苷对 T 淋巴细胞株程序性死亡受体-1 基因启动子区域甲基化水平及其表达的影响

张旻¹, 肖新强¹, 梁云生², 彭敏源³, 蒋永芳¹, 许允¹, 龚国忠¹

(中南大学 1. 湘雅二医院感染科, 长沙 410011; 2. 湘雅二医院表观遗传学研究中心, 长沙 410011; 3. 湘雅医院血液科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:以 T 淋巴细胞株 Molt-4 细胞为模型,探讨甲基化抑制剂 5-杂氮胞苷(5-azacytidine, 5-Zac)对淋巴细胞表面程序性死亡受体-1(programmed death receptor 1, *PD-1*)基因启动子的去甲基化作用及其诱导的 *PD-1* 基因表达的改变,并进一步研究去甲基化作用与 *PD-1* 基因表达之间的关系。方法:以不同浓度的 5-Zac 分组(0 $\mu\text{mol/L}$ 组、5 $\mu\text{mol/L}$ 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 组)作用于体外培养的 Molt-4 细胞 72 h,流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞表面表达 PD-1 的 Molt-4 细胞比例和细胞凋亡率;反转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 5-Zac 作用后 *PD-1* 基因 mRNA 的转录水平;亚硫酸氢钠处理各组 Molt-4 细胞 DNA,PCR 扩增 *PD-1* 启动子基因片段,转化感受态大肠杆菌,挑克隆测序,检测扩增的 *PD-1* 启动子片段甲基化状态。结果:0 $\mu\text{mol/L}$ 组、5 $\mu\text{mol/L}$ 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 组的 5-Zac 作用于 Molt-4 细胞 72 h 后,PD-1 在细胞表面的表达率分别为(1.13 \pm 0.01)%, (18.96 \pm 1.87)% 和(63.09 \pm 6.25)%,并呈现浓度依赖性;*PD-1* 基因 mRNA 表达量显著增加;细胞凋亡检测结果显示:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,5 $\mu\text{mol/L}$ 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 组 5-Zac 处理 72 h 后 Molt-4 细胞的凋亡率显著增加,0 $\mu\text{mol/L}$ 组、5 $\mu\text{mol/L}$ 组、10 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡率分别为(1.9 \pm 0.06)%, (8.98 \pm 1.36)% 和(24.5 \pm 3.68)%,差异有统计学意义($P < 0.01$);上述 3 组 DNA 亚硫酸氢钠测序结果表明:加入甲基化抑制剂 5-Zac 处理后,*PD-1* 启动子上 -601 bp 和 -553 bp CpG 点去甲基化程度明显增高。结论:甲基化抑制剂 5-Zac 可导致体外培养的 T 淋巴细胞系 Molt-4 细胞表面 *PD-1* mRNA 表达显著增加,细胞凋亡率增高,这种增高可能与 *PD-1* 基因启动子区域出现的去甲基化有关。

[关键词] 程序性死亡受体-1; 去甲基化; 5-杂氮胞苷; 亚硫酸氢钠测序

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.12.007

Effect of methylation inhibitor on demethylation pattern of the *PD-1* gene in promoter region and PD-1 expression in human T lymphocyte cell line

ZHANG Min¹, XIAO Xinqiang¹, LIANG Yunsheng², PENG Minyuan³,
JIANG Yongfang¹, XU Yun¹, GONG Guozhong¹

(1. Department of Infectious Diseases, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011;
2. Epigenetics Research Center, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011;
3. Department of Hematology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

收稿日期 (Date of reception) 2010-10-22

作者简介 (Biography) 张旻,博士研究生,主要从事慢性 HBV/HCV 感染相关的免疫学发病机制的研究。

通信作者 (Corresponding author) 龚国忠, E-mail: guozhonggong@yahoo.com

基金项目 (Foundation items) 十一五国家科技重大专项(2008ZX10202); 国家自然科学基金(30901269)。 This work was supported by the Major Projects of Eleventh Five-Year National Science and Technology, P. R. China (2008ZX10202) and the National Natural Science Foundation of China (30901269).

Abstract: Objective To observe the demethylation effect of demethylation inhibitor 5-azacytidine (5-Zac) on programmed death receptor 1 (PD-1) in Molt-4 cells (T lymphocyte cell line) and to investigate the relationship between DNA demethylation and expression of PD-1. **Methods** Molt-4 cells were cultured in the medium containing different concentrations of 5-Zac (0, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) for 72 h. According to the concentrations of 5-Zac, the Molt-4 cells were divided into a 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, a 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, and a 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group. The expression of PD-1 in Molt-4 cells was detected by flow cytometry and the apoptosis rate was calculated. The mRNA transcription level of *PD-1* was detected by real-time polymerase chain reaction; Molt-4 cell DNA in all groups were treated by sodium bisulfite. The *PD-1* promoter fragment was amplified by PCR, the amplification fragments were transformed into *E. coli*, the positive clones were selected for sequencing, and the methylation status of the fragments of *PD-1* promoter was examined. **Results** Seventy-two hours after the 5-Zac treatment, the expression rate of *PD-1* in the Molt-4 cells in the 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, the 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, and the 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group was $(1.13 \pm 0.01)\%$, $(18.96 \pm 1.87)\%$, and $(63.09 \pm 6.25)\%$ respectively, in a low concentration-dependent way. The *PD-1* mRNA expression level was increased significantly with the 5-Zac treatment. Cells apoptosis showed that: compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, the apoptosis rate in the 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group and 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group was significantly increased, which was $(1.9 \pm 0.06)\%$, $(8.89 \pm 1.36)\%$, and $(24.50 \pm 3.68)\%$ in the 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, the 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, and the 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac mol/L group respectively. The bisulfite genomic sequencing showed that the demethylation probability of CpG points on -601 bp and -553 bp was significantly increased in the 5-Zac treated cells compared with those untreated. **Conclusion** 5-Zac can result in the increase of *PD-1* expression in the human lymphoid cell series Molt-4 in vitro, and the apoptosis rate increases, which is related to *PD-1* gene promoter demethylation.

Key words: programmed death receptor 1; demethylation; 5-azacytidine; bisulfite genomic sequencing

程序性死亡受体-1 (programmed death receptor 1, PD-1) 也称为 CD279 或 PDCD1, 是在发生程序性死亡的 T 细胞上发现的分子质量为 55 kD 的单体 I 型跨膜蛋白, 属于 CD28/CTLA-4 免疫球蛋白超家族的免疫抑制性受体^[1]。外周血中的 PD-1 主要诱导表达于活化的淋巴细胞表面, 在 T, B 细胞的免疫应答中起负向调控作用^[2]。大量研究证实: PD-1 高表达与 T 淋巴细胞数量耗竭及功能低下关系密切^[3-5]。5-杂氮胞苷(5-azacytidine, 5-Zac) 是一种甲基化抑制剂, 去甲基化处理对 PD-1 表达的影响及其可能机制目前尚未见报道。本研究以体外培养的 T 淋巴瘤系 Molt-4 细胞为研究对象, 观察不同浓度的 5-Zac 对 Molt-4 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用, 检测 Molt-4 细胞表面 PD-1 表达水平的变化, 并进一步用亚硫酸氢钠测序法检测 *PD-1* 基因启动子片段甲基化状态, 旨在探讨去甲基化处理对人 T 淋巴瘤系 Molt-4 细胞表面表达 PD-1 的影响及其对 *PD-1* 基因启动子 CpG 点甲基化状态的影响, 并探讨两者之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

T 淋巴细胞株 Molt-4 细胞由中南大学湘雅医学院细胞培养中心提供。

1.1.2 主要试剂与仪器

5-Zac 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$, 相对分子质量为 244.205, 购自美国 Sigma 公司, 培养液 RPMI 1640 和澳洲胎牛血清购自美国 GIBCO 公司, 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的抗人 PD-1 流式抗体及相应同型对照抗体 FITC Mouse IgG 均购自美国 BD 公司, DNA 提取试剂盒、Taq 酶、dNTP 及反转录试剂盒购自美国 Promega 公司, DNA 标准参照物购自美国 Fermentas 公司, TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, 亚硫酸氢钠处理试剂盒购自美国 Chemicon 公司。流式细胞仪为 FACS Calibur Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

Molt-4 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,置于 37 °C,5% CO₂,饱和湿度条件下培养、传代。每 2~3 d 换液 1 次,收集对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 甲基化抑制剂 5-Zac 处理

实验前 1 d 将 Molt-4 细胞传代,实验当天将细胞接种在 50 mL 细胞培养瓶中,每个培养瓶的细胞数为 5 × 10⁶ 个,并加入 10 mL 完全培养基。实验分为 0 μmol/L 5-Zac 组、5 μmol/L 5-Zac 组和 10 μmol/L 5-Zac 组,依次加入终浓度为 0,5,10 μmol/L 5-Zac,细胞继续置于 37 °C,5% CO₂,饱和湿度孵箱中培养。每隔 24 h 更换新鲜培养液及相同终浓度的药物,于处理 72 h 后收获细胞,进行后续检测。

1.2.3 流式细胞仪检测 Molt-4 细胞表面 PD-1 表达和细胞凋亡率

收集经不同终浓度 5-Zac 去甲基化处理的 Molt-4 细胞 2 × 10⁵ 个,用 PBS 洗涤 2 次后,部分细胞采用直接标记法分别用 FITC 标记的抗人 PD-1 单克隆抗体标记细胞,以相应的同型对照抗体标记细胞作为阴性对照,置于 4 °C,避光条件下孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次以除去过量的未结合的抗体,用流式细胞仪分析阳性细胞数。部分细胞加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 上机检测凋亡细胞,分别计算各组 PD-1 表达率及细胞凋亡率。

1.2.4 PD-1 基因 mRNA 表达的 RT-PCR 检测

按照 TRIzol 说明书操作法提取总 RNA。经紫外分光光度法鉴定和定量后,分别取总 RNA 1 μg,按反转录试剂盒说明书操作,反转录反应合成 cDNA。以反应所得 cDNA 进行 PCR 扩增。内参照 GAPDH

(598 bp): 上游引物 5'-CCACCCATGGCAAATTC-CATG-3',下游引物 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTC-CACC-3'; PD-1 (263 bp): 上游引物 5'-CGTCT-GGGCGGTGCTACAA-3',下游引物 5'-TGACACG-GAAGCGGCAGT-3'。PCR 扩增在 MJ Research 公司 PTC-100™ 扩增仪上进行,反应步骤如下: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环,最后 72 °C 再延伸 7 min。产物与上样缓冲液以 6:1 混合后,于 16 g/L 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶图像分析仪自动分析成像。以目的基因与内参照 GAPDH 的灰度比进行半定量分析。

1.2.5 亚硫酸氢钠基因测序检测 PD-1 基因启动子甲基化状态

亚硫酸氢钠基因测序的主要原理是 DNA 被亚硫酸氢钠处理后,未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基变为尿嘧啶,进一步转化为胸腺嘧啶,甲基化的胞嘧啶保持不变。按照 DNA 提取试剂盒操作说明提取细胞基因组 DNA。经紫外分光光度法鉴定和定量后取 1 μg DNA,用 Chemicon 公司的 CpGenome™ DNA Modification 试剂盒进行亚硫酸氢钠转换处理,操作步骤按试剂盒说明书进行。

将亚硫酸氢钠转换处理后的 DNA 进行 PD-1 启动子 PCR 扩增。PCR 引物序列见表 1。将 PCR 产物于 1% 的低熔点胶电泳,电泳后在紫外灯下切下目标条带,与 T 载体于 16 °C 水浴 16 h 进行胶连。将胶连产物转化入大肠杆菌感受态细胞 (DH5α),将转化的感受态大肠杆菌接种于氨苄青霉素 (+) (100 μg/mL) LB 琼脂平板,37 °C 孵育 12~16 h,取至少 5 个克隆送测序分析,测序步骤由北京华大基因技术有限公司完成。

表 1 亚硫酸氢钠转换处理后 PD-1 启动子 PCR 引物序列、退火温度及扩增片段大小

Tab. 1 Primer sequences, annealing temperature, and amplified fragment size of PD-1 promote treated with the sodium hydrogen sulfite

片段	引物序列	片段大小/bp	退火温度/°C
片段 1 (-632 ~ -428)	F:5'-TATTTATAAGGTGGAAGTTTGTAGG-3'	205	56
	R:5'-ATAAAAAATAAACTCAACCCGACTC-3'		
片段 2 (-451 ~ -237)	F:5'-AGTGGGTTGAGTTTATTTTTATTG-3'	215	56
	R:5'-ACCCCTTCTCTCTATATCTCTACT-3'		
片段 3 (-288 ~ -168)	F:5'-GGATATGGAAGAGGTTATACTACT-3'	121	55
	R:5'-AAAAAAAATAAAAAAAAATAAACG-3'		
片段 4 (-97 ~ +11)	F:5'-TTTTAGTATTGTTTTGTTATTTT-3'	109	55
	R:5'-AAAAAAAACATATCCCAAATCAAAT-3'		

F:上游引物; R:下游引物。

1.3 统计学处理

各实验独立重复3次。采用SPSS 16.0统计软件储存和分析数据。常规进行方差齐性检验和正态性检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组资料之间的比较采用 one way ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 5-Zac 处理对 T 淋巴细胞系 Molt-4 细胞 PD-1 基因 mRNA 表达的影响

计算未加 5-Zac 处理的 PD-1 和加入不同浓度 5-Zac 处理的 T 淋巴细胞株 Molt-4 细胞 PD-1 的表达差异,统计结果显示 5-Zac 处理后的 T 细胞 PD-1 mRNA 水平表达上调,呈浓度依赖性;各组 PD-1 条带灰度值与 GAPDH 条带灰度比值:空白对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组)为 0.35 ± 0.03 ; 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组为 0.41 ± 0.04 , 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组为 $0.49 \pm$

0.06。与空白对照组相比,差异均有统计学意义(5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组 $P < 0.05$, 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组 $P < 0.01$); 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组与 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组比较,差异有统计学意义($P = 0.001$,图1)。

2.2 5-Zac 处理对 Molt-4 细胞表面 PD-1 表达率的影响

流式细胞仪检测 PD-1 在 Molt-4 细胞表面表达率结果显示:未加 5-Zac 培养的 Molt-4 细胞表面表达 PD-1 比例为 $(1.13 \pm 0.01)\%$,这一比例与正常 CD8⁺T 淋巴细胞表面 PD-1 的比例相似。加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 共培养 72 h 后,细胞表面表达 PD-1 比例明显增高(图2); 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组 PD-1 表达率比例升高至 $(18.96 \pm 1.87)\%$ 和 $(63.09 \pm 6.25)\%$,与未加 5-Zac 培养组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组 PD-1 表达率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),且加入 5-Zac 浓度越高,PD-1 表达比例越高。

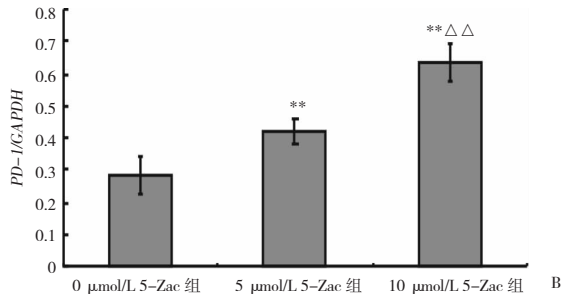
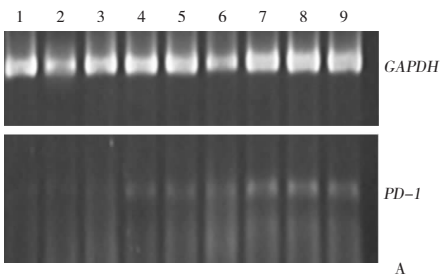


图1 PD-1 基因转录水平随着 5-Zac 的浓度而增加。A; PD-1 基因 mRNA 的 RT-PCR 结果。1 ~ 3: 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组; 4 ~ 6: 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组; 7 ~ 9: 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组。GAPDH 为内参照。B; PD-1 mRNA 表达的统计学结果。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组比较, * * $P < 0.01$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组比较, $\Delta \Delta P < 0.01$ 。

Fig. 1 PD-1 transcription levels increase with the increasing of 5-Zac concentration. A; PD-1 mRNA in Molt-4 cells stimulated with 5-Zac. 1 - 3; 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group; 4 - 6; 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group; 7 - 9; 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group. GAPDH was the internal control; B; Statistical results of PD-1 mRNA expression. Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, * * $P < 0.01$; compared with the 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, $\Delta \Delta P < 0.01$.

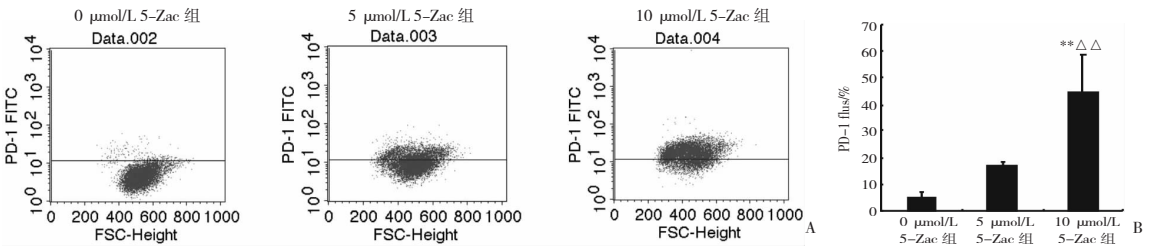


图2 5-Zac 刺激 PD-1 在体外培养的 Molt-4 细胞上表达的流式结果图。A: 不同浓度 5-Zac 处理组的流式结果。基线以上的细胞群为 PD-1 阳性细胞。B: 不同浓度 5-Zac 处理组的 PD-1 阳性细胞率的统计结果图。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组比较, * * $P < 0.01$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组比较, $\Delta \Delta P < 0.01$ 。

Fig. 2 PD-1 expression in Molt-4 cells stimulated by 5-Zac in vitro. A; Flow cytometer results for cells in various 5-Zac concentration groups. The numbers in the upper quadrants represent the absolute numbers of PD-1 positive cells; B; Statistical results of PD-1 positive cells ratios in Molt-4 cell-groups treated with different concentrated 5-Zac. Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, * * $P < 0.01$; compared with the 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, $\Delta \Delta P < 0.01$.

2.3 5-Zac 处理对 Molt-4 细胞凋亡率的影响

对不同浓度 5-Zac 处理后的细胞凋亡情况分析后发现,随着加入 5-Zac 浓度增高,Molt-4 细胞的凋亡率也逐渐增高(图 3),与未加 5-Zac 组比较,5

$\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组的细胞凋亡率比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。且 PD-1 表达与细胞凋亡率呈平行增高。

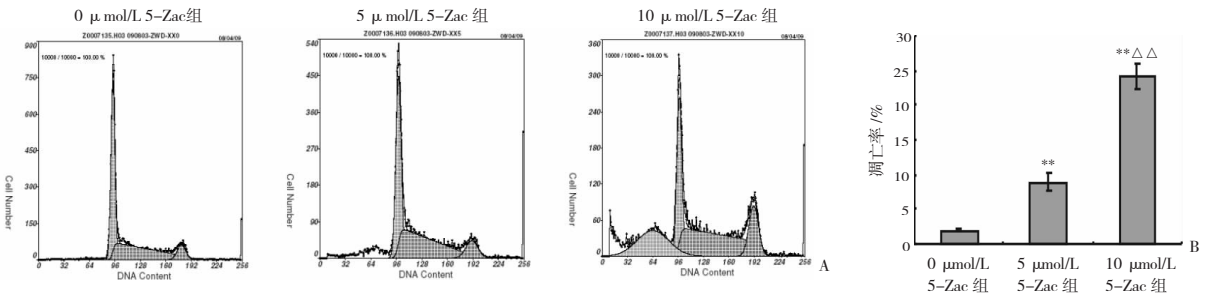


图 3 5-Zac 刺激体外培养的 Molt-4 细胞凋亡。 A:不同浓度 5-Zac 处理后的细胞凋亡情况。图上标记处为凋亡细胞群。 B:不同浓度 5-Zac 处理后细胞凋亡率的统计结果。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组比较, * * $P < 0.01$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Fig. 3 Apoptosis of Molt-4 cells stimulated by 5-Zac in vitro. A: Cell-apoptosis in various 5-Zac concentration groups, the apoptotic cells is shown; B:Statistical results of apoptotic ratios in different 5-Zac concentrated groups. Compared with compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, * * $P < 0.01$; compared with 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, $\Delta\Delta P < 0.01$.

2.4 5-Zac 处理对 PD-1 基因启动子甲基化状态的影响

检测 5-Zac 处理后的各组 Molt-4 细胞 PD-1 基因启动子 16 个 CpG 位点甲基化程度。每组挑 5 个克隆送测序,测序后的每个 CpG 位点的甲基化水平为各组 15 个克隆 5 个 CpG 位点的平均甲基化水平,即每个 CpG 平均甲基化水平由 15 个 CpG 的甲基化水平计算所得,1 代表完全去甲基化,0 代表完全甲基化。结果显示:与该片段其他位置 CpG 点比较,

加入甲基化抑制剂 5-Zac 处理后,PD-1 启动子上 -601 bp 和 -553 bp CpG 点去甲基化程度明显增高,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组比较,5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组去甲基化有明显增高(图 4)。其中,-601 bp 处为预测的转录因子 Brn-2 结合位置。据此推测甲基化抑制剂 5-Zac 对 Molt-4 细胞 PD-1 表达的影响可能与 PD-1 启动子与转录因子 Brn-2 结合位置的 CpG 点去甲基化有关。

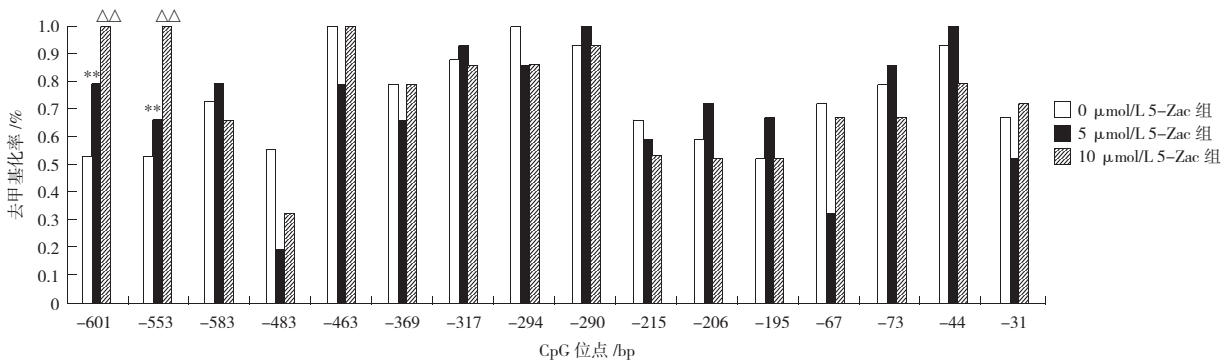


图 4 不同浓度 5-Zac 对 PD-1 启动子 16 个 CpG 位点的去甲基化水平的影响。-601 bp 和 -553 bp 处 CG 点去甲基化水平随着 5-Zac 浓度增加而增加。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组比较, * * $P < 0.01$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Fig. 4 Demethylation at CpG sites in the PD-1 promoter region. The level of CpG demethylation increases in the -601 bp and -553 bp with the increased 5-Zac concentration. Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, * * $P < 0.01$; compared with the 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-Zac group, $\Delta\Delta P < 0.01$.

3 讨 论

DNA 甲基化是最早发现的基因转录前调控途径之一^[6]。在真核生物基因组中约 80% 的 CpG 位点被甲基化,这些甲基化主要发生在基因启动子区域的 CpG 岛^[7-9]。研究表明:DNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变,自身或结合甲基结合蛋白后阻遏转录因子与启动子的结合,从而调控基因表达,是表观遗传学修饰最重要的基因转录前调控方式^[10-13]。基因启动子是一个对于基因转录调控至关重要的区域。各种转录因子在基因启动子上结合并对基因转录进行调控^[14]。

几种转录因子(如 AP-2, Brn-2, C-Myc/Myn, CAREB, EZF 和 NF- κ B)识别 CpG 残基。当 CpG 残基上的 C 被甲基化后,结合作用即被抑制。但有一些转录因子(如 SP1, GF 等)对其结合位置上的甲基化不敏感。基因启动子甲基化修饰已经成为目前研究基因表达与调控的热点之一。PD-1 在外周血中表达于活化的 CD4⁺, CD8⁺ T, B 细胞以及单核细胞表面,与免疫细胞的程序性死亡和功能低下密切相关。PD-1 通过阻断 CD3/CD28 介导的磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)的激活而抑制 Akt 的磷酸化,进一步研究证实 PD-1 对 PI3K/Akt 抑制活性依赖于胞内的 ITSM 基序,ITSM 基序通过招募包含血细胞磷酸酶 1 和血细胞磷酸酶 2 的同源结构 Src2 而抑制 PI3K/Akt 的活性,从而发挥其对 T 细胞活化的抑制^[3]。另外,PD-1 还能抑制 ZAP70 的磷酸化,还能弱化蛋白激酶 C- θ (protein kinase C- θ , PKC θ)激活的磷酸化环路,而 PKC θ 是 IL-2 产生所必需的^[4]。动物实验已经证实:PD-1 与其配体结合可以抑制 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞的激活^[5]。研究表明:在小鼠淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)和人艾滋病病毒、丙型肝炎病毒等病毒持续感染中表位特异性 T 淋巴细胞处于功能耗竭状态,这种功能低下与其表面 PD-1 分子的高表达相关,阻断 PD-1 与其配体 PDL1 的相互作用可使病毒特异性 CTL 功能部分恢复,促进病毒清除^[15-18]。在持续感染淋巴细胞性 LCMV 小鼠的研究中发现:阻断 PD-1/PD-L1 抑制性信号系统,可以部分恢复感染小鼠病毒特异性 T 细胞功能,增强治疗性疫苗的抗病毒作用^[19]。多项动物研究试验结果均提示:PD-1 受体与动物慢性病毒性感染时的病毒特异性 T 淋巴细胞功能低下关系密切。随后有多项针对慢性/急性感染乙肝病毒的人群外周血病毒特异性的 T 淋巴细胞上的 PD-1 表达水平进行的研究发现:在急性

HBV 感染早期,病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞表面 PD-1 分子高水平表达,随着急性感染者的康复,PD-1 表达明显下调。而 HBV 慢性感染者特异性 CTL 细胞 PD-1 分子仍维持高水平表达,并伴随功能低下^[20-21]。并且有研究者观察发现:在慢性乙肝患者抗病毒治疗发生 HBeAg/HBeAb 血清学转换时,HBV 特异 T 细胞的 PD-1 的表达下调^[22]。以上研究提示:PD-1 与慢性 HBV 感染者体内 HBV 特异性 T 细胞细胞功能状态密切相关,PD-1 的水平可以影响 HBV 特异性 T 细胞对乙肝病毒的免疫反应。虽然现在的研究结果已经明确慢性 HBV 感染者外周血病毒特异性 T 细胞功能低下与其表面 PD-1 高表达有关,但是目前仍未从基因调控的水平上阐明 PD-1 表达异常的原因。

5-Zac 是一种胞嘧啶类似物,在 DNA 复制、RNA 合成过程中能够进入核酸分子内部,并以共价结合的方式与 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)相互作用,从而抑制核酸分子的甲基化^[23]。有学者用氮杂胞苷等 DNA 甲基化抑制剂处理鼠或人克隆 T 细胞后,其新合成的 DNA 中未甲基化的胞嘧啶含量明显下降。这种 T 细胞无需抗原刺激,便可与自身人类白细胞抗原分子反应,成为自身反应性细胞。将这种 T 细胞转入同系雌性小鼠体内可诱发狼疮样自身免疫性疾病^[24-25],说明 DNA 甲基化在 T 细胞的基因表达中起着重要的调控作用。DNA 甲基化抑制剂氮杂胞苷确实可以使外周血 T 细胞的 DNA 失去一定程度的甲基化,促进多种分子的表达分泌^[26-28]。

PD-1 基因启动子区域有 16 个 CpG 位点,DNA 去甲基化处理是否对 PD-1 基因表达和启动子甲基化程度有影响,目前国内外尚未见报道。本研究观察了体外培养的 T 淋巴细胞株 Molt-4 细胞在不同浓度的甲基化抑制剂 5-Zac 作用下细胞表面 PD-1 表达、PD-1 基因 mRNA 的转录水平、PD-1 启动子的甲基化状态的影响及其相关性。本研究首次发现:随着 5-Zac 浓度的增加,Molt-4 细胞表面 PD-1 的表达和 mRNA 转录均逐渐增强,且与 Molt-4 细胞的凋亡率呈正相关。在进一步的研究中发现:加 5-Zac 处理后,PD-1 的启动子上 -601 bp 和 -553 bp CpG 点去甲基化程度明显增高。其中,-601 bp 处为预测的转录因子 Brn-2 结合位置。据此推测甲基化抑制剂 5-Zac 对 Molt-4 细胞 PD-1 表达的影响可能与 PD-1 启动子与转录因子 Brn-2 结合位置的 CpG 点去甲基化有关。以上研究提示:PD-1 表达及其基因启动子甲基化状态可以受到甲基化抑制剂 5-Zac 影响,其基因转录水平可能受甲基化调控。为进一步研究与 T 细胞功能低下密切相关的 PD-1 的基因调

控机制提供了新的视角,为研究慢性病毒感染时通过改变 *PD-1* 基因甲基化状态恢复 T 细胞功能提出一个新的方向。

参考文献:

[1] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death[J]. *EMBO J*, 1992, 11:3887-3895.

[2] Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T cell immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(3): 336-347.

[3] Loke P, Allison J P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells[J]. *PNAS*, 2003, 100(9):5336-5341.

[4] Kelly-Ann S, Fitz L J, Lee J M, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ [J]. *FEBS Lett*, 2004, 574(1/3):37-41.

[5] Loke P, Allison J P. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. [J]. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(5):208-214.

[6] 冯伟兴,王科俊,贺波,等. 基因启动子甲基化对转录因子结合的抑制作用分析方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2011, 38(2): 177-184.

FENG Weixing, WANG Kejun, HE Bo, et al. Method to analyze gene promoter methylation inhibition effect on binding of transcription factors[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2011, 38(2): 177-184.

[7] 戴亚丽,张帆,叶静,等. 促甲状腺激素受体基因启动子区甲基化与乳头状甲状腺癌的关系研究[J]. *中国全科医学*, 2009, 12(24): 2194-2196.

DAI Yali, ZHANG Fan, YE Jing, et al. A study on the promoter hypermethylation of TSHR in human papillary thyroid carcinoma[J]. *Chinese General Practice*, 2009, 12(24): 2194-2196.

[8] Mosher R A, Melnyk C W. siRNA s and DNA methylation; seedy epigenetics[J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(4): 204-210.

[9] Gibney E R, Nolan C M. Epigenetics and gene expression[J]. *Heredity*, 2010, 105(1): 4-13.

[10] Crews D. Epigenetics, brain, behavior, and the environment [J]. *Hormones(Athens)*, 2010, 9(1): 41-50.

[11] Bollati V, Baccarelli A. Environmental epigenetics[J]. *Heredity*, 2010, 105(1): 105-112.

[12] Bhargava P. Epigenetics to proteomics; from yeast to brain [J]. *Proteomics*, 2010, 10(4): 749-770.

[13] Asadollahi R, Hyde C A, Zhong X Y. Epigenetics of ovarian cancer; from the lab to the clinic[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 118(1): 81-87.

[14] Aguilera O, Fernandez A F, Munoz A, et al. Epigenetics and environment; a complex relationship [J]. *J Appl Physiol*, 2010, 109(1): 243-251.

[15] Barber D L, Wherry E J, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection [J]. *Nature*, 2006, 439(7077):682-687.

[16] Day C L, Kaufmann D E, Kiepiela P, et al. PD-1 expression

on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression[J]. *Nature*, 2006, 443(7109):350-354.

[17] Petrovas C, Casazzal J P, Brenchley J M, et al. PD-1 is a regulator of virus specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(10):2281-2292.

[18] Urbani S, Amadei B, Tola D, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus(HCV) infection is associated with HCV-specific CD8⁺ exhaustion [J]. *J Virol*, 2006, 80(22): 11398-11403.

[19] Ha S J, Mueller S N, Wherry E J, et al. Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(3): 543-555.

[20] 金波,张纪元,张政,等. PD-1 表达对急性乙型肝炎患者 HBV 特异性 CD8⁺ T 细胞功能的影响[J]. *肝脏*, 2008, 13(4):310-314.

JIN Bo, ZAHNG Jiyuan, ZHANG Zheng, et al. Characterization and clinical significance of PD-1 expression on HBV epitope-specific CD8⁺ T cells in patients with acute self-limited hepatitis B[J]. *Chinese Hepatology*, 2008, 13(4):310-314.

[21] 谢淳怡,陈永文,付晓岚,等. 慢性乙型肝炎患者 HBV 特异性细胞毒性 T 细胞 PD-1 的表达研究[J]. *免疫学杂志*, 2007, 23(6):602-605.

XIE Zhunyi, CHEN Yongwen, FU Xiaolan, et al. Expression of programmed cell death 1 on HBV-specific CTLs in chronic hepatitis B patients[J]. *Immunological Journal*, 2007, 23(6): 602-605.

[22] Evans A, Riva A, Cooksley H, et al Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B; Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion [J] *Hepatology*, 2008, 48(3):759-769.

[23] Gowher H, Jeltsch A. Mechanism of inhibition of DNA methyltransferases by cytidine analogs in cancer therapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(11):1062-1068.

[24] Richardson B, Ray D, Yung R. Murine models of lupus induced by hypomethylated T cells [J]. *Methods Mol Med*, 2004, 102: 285-294.

[25] Qudus J, Johnson K J, Gavalchin J, et al. Treating activated CD4⁺ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors insufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice [J]. *J Clin Invest*, 1993, 92(1):38-53.

[26] Kaplan M J, Lu Q, Wu A, et al. Demethylation of promoter regulatory elements contributes to perforin overexpression in CD4⁺ lupus T Cells [J]. *J Immunol*, 2004, 172(6): 3652-3661.

[27] Lu Q, Kaplan M, Ray D, et al. Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(5):1282-1291.

[28] 米向斌,邱贤文,谭国珍. 氮杂胞苷对 SLE 患者外周血 T 淋巴细胞表达 CD70 的影响 [J]. *中国热带医学*, 2010, 10(4):408-409.

MI Xiangbin, QIU Xianwen, TAN Guozhen. The influence of azacytidine on the expression of CD70 by T lymphocyte from peripheral blood [J]. *China Tropical Medicine*, 2010, 10(4):408-409.