

地西他滨对同步化的 G0/G1 期 MDS-L 细胞系 线粒体功能的影响

邱宗建,杨娟,宋强

(山东大学齐鲁医院血液科,山东 济南 250012)

摘要:目的 初步探讨地西他滨(DAC)在不整合入基因组 DNA 的情况下对线粒体生物学功能的影响。方法 采用阿非迪霉素(APC)将 MDS-L 细胞同步化在 G0/G1 期。DCFH-DA 检测不同浓度 DAC(0、5、10、15 $\mu\text{mol/L}$) 处理后的同步化 G0/G1 期细胞系活性氧(ROS)的产生水平。采用 qRT-PCR 法检测线粒体 DNA 拷贝数和线粒体编码基因 NADH 脱氢酶 1、6(ND1、ND6)mRNA 改变。结果 与对照组相比,DAC 在低浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 条件下可以通过不依赖 DNA 损伤的途径增加细胞 ROS 的产生($P < 0.05$),同时细胞内线粒体 DNA(MtDNA)的拷贝数较对照组明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。但随着 DAC 浓度增加,DAC 在高浓度(15 $\mu\text{mol/L}$)可降低 ROS 的产生($P < 0.05$)。此外,在高浓度 DAC 作用下,ND1 和 ND6 基因表达较对照组明显升高($P < 0.05$)。结论 DAC 通过影响细胞 ROS 产生,改变线粒体 DNA 的拷贝数以及调控线粒体基因的表达,产生对线粒体功能的影响,并呈浓度依赖性。

关键词:地西他滨;G0/G1 期;线粒体;活性氧离子

中图分类号:R551.3 **文献标志码:**A

Role of decitabine in the mitochondria biogenesis of synchronized G0/G1 phase MDS-L cell line

QIU Zongjian, YANG Juan, SONG Qiang

(Department Of Hematology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of decitabin (DAC) on the mitochondrial biogenesis of synchronized G0/G1 cells. **Methods** MDS-L cells were treated with aphidicolin (APC) to synchronize cell cycle at G0/G1 stage. After treatment of decitabine at different concentrations (0, 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$), reactive oxygen species (ROS) productions were detected by DCFH-DA. Changes of mitochondrial DNA copy number and expressions of coded genes, NADH dehydrogenase 1 (ND1) and NADH dehydrogenase 6 (ND6), were detected with qRT-PCR. **Results** In comparison with the control group, decitabine at low concentration (5 $\mu\text{mol/L}$) could promote the production of ROS ($P < 0.05$) and increase the copy number of mtDNA ($P < 0.05$); however, as the concentration increased to 15 $\mu\text{mol/L}$, ROS production started to decline to even lower than that of the control ($P < 0.05$). Besides, DAC could significantly change the expressions of ND1 and ND6 at high concentration. **Conclusion** Decitabine can affect mitochondrial biogenesis by altering the mtDNA copy number and gene expressions in a concentration-dependent manner.

Key words: Decitabine; G0/G1 stage; Mitochondria; Reactive oxygen species

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)是一种起源于造血干细胞异常克隆的血液系统疾病^[1-2],主要表现为外周血一系或多系

血细胞减少,骨髓活检可见特征性的幼稚前体细胞异常定位病理结构。DNA 甲基化转移酶抑制剂(DNA methyltransferase inhibitor, DNMTI)的出现为

MDS 患者提供了新的治疗策略。

DNA 甲基化转移酶 1a (DNA methyltransferase 1a, DNMT1a) 是一种维持 DNA 甲基化状态的酶, DNA 在复制时 DNMT1a 可以甲基化修饰新合成的子链 DNA, 使 DNA 维持亲本的甲基化状态。地西他滨 (decitabine, DAC) 作为一种 DNMTI 可通过降解 DNMT1a, 降低基因组 DNA 5' mC 水平^[3-4]。Shock 等^[5]报道了 DNMT1a 可以通过 N 端的一段信号肽序列定位于线粒体中, 与线粒体 DNA 结合。线粒体 DNA 编码的蛋白参与线粒体氧化呼吸链的电子传递过程, 线粒体氧化呼吸复合体功能的异常可以导致线粒体功能的改变^[6]。目前国内外有关 DAC 是否可以通过影响线粒体基因组编码蛋白的表达, 从而改变细胞的功能与状态的研究较少。本研究的目的在于探讨 DAC 是否存在除基因组整合以外影响线粒体功能的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人 MDS-L 细胞系受赠于上海交通大学第六人民医院李晓教授。

1.1.2 主要试剂与仪器 细胞培养用 1640 培养基、胎牛血清分别购于美国 Gibco 和 Hyclone 公司。PI、BrdU、鼠源 anti-BrdU 抗体、兔抗鼠二抗-FITC、阿非迪霉素 (aphidicolin, APC) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司。细胞总 RNA 提取用 Trizol 购于美国 Life invitrogen 公司, 反转录试剂盒 gErase cDNA synthesis 为日本 Takara 公司产。qRT-PCR 所用 SYBR Green 购于日本 TOYOBO 公司, 实时定量 PCR 仪 Lightcycle480 为瑞士 Roche 公司产。ROS 检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及细胞周期同步化 MDS-L 细胞系在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养于含有 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、10% 胎牛血清 1640 培养基中, 间隔 2~3 d 添加 1 次白介素-3 (IL-3) (V:V = 1:1 000), 每隔 4~5 d 传代 1 次。APC 以浓度 2 mg/mL 溶解于 DMSO 中并保存于 -80 °C 超低温冰箱。将 MDS-L 细胞以 5 × 10⁵ 个/mL 接种在 24 孔板中, 实验组 MDS-L 细胞添加 APC 至浓度为 20 μg/mL, 对照组 MDS-L 细胞添加 DMSO, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 同步化 MDS-L 细胞。

1.2.2 采用 BrdU 渗入试验检测细胞周期同步化实验组 (APC 同步化) 细胞与阴性对照组 (DMSO)

细胞, 加入终浓度为 15 μg/mL 的 BrdU (溴化脱氧尿嘧啶核苷), 细胞培养箱中孵育 3 h, 4 °C 条件下 70% 乙醇固定 8 h, 将固定后的细胞置于 2 mol/L HCL 处理 30 min。加抗 BrdU 抗体室温孵育 1 h。用 FITC 标记的兔抗鼠二抗室温孵育 30 min, 重悬于含有 PI 的 PBS 中, 流式细胞仪 FL1、FL3 通道检测 BrdU 的渗入量。

1.2.3 DCFH-DA 检测 ROS 的产生 将 APC 同步化后的 MDS-L 细胞分别与不同浓度的 DAC 作用 24 h, 实验组 DAC 浓度为 1.5、5、10、15 μmol/L, 对照组为无 DAC 的 PBS 溶液, RPMI1640 洗涤细胞 2 次, 将细胞重悬于 10 mmol/L DCFH-DA 无胎牛血清 1640 中, 细胞培养箱中孵育 20 min, 用 4 °C 预冷的 Hank's 缓冲液清洗 3 次, 最后用 400 μL Hank's 缓冲液重悬, 采用流式细胞仪 FL1 检测。

1.2.4 qRT-PCR 法检测线粒体 DNA 拷贝数及 ND1、ND6 mRNA 转录变化 将同步化的 MDS-L 细胞与不同浓度 DAC (0、1.5、5、10、15 μmol/L) 作用 24 h, 实验组 DAC 浓度为 1.5、5、10、15 μmol/L, 对照组为无 DAC 的 PBS 溶液。采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 使用 gErase cDNA synthesis (Takara) 试剂盒将总 mRNA 逆转录成 cDNA, 以 β-actin 为内参行相对定量 PCR 方法检测 ND1、ND6 基因表达。采用 Tiangen DNA 提取试剂盒提取 1 × 10⁶ 细胞全基因组 DNA, 检测 mtDNA 的相对拷贝数变化, HGB 为内参基因。以下为 qRT-PCR 所需的引物序列: ND1: 上游: TGCGAGCAGTAGCCCAAACAAT-CT, 下游: TTATGGCCAAGGGTCATGATGGCA; ND6: 上游: TGTGGTCGGGTGTGTTATTATTC, 下游: GACAACCATCATCCCCCTAAAT; β-Actin: 上游: GATGGCCACGGCTGCTT, 下游: AGGACTC-CATGCCCAGGAA; MtDNA: 上游: CACCCAAGA-ACAGGGTTTGT, 下游: TGGCCATGGGTATGTT-GTTA; HGB: 上游: GCTTCTGACACAACACTGTGT-TCACTAGC, 下游: CACCAACTTCATCCACGTT-ACC, 总反应体系为 20 μL, PCR 反应条件为: 95 °C 30 s, 95 °C 30 s, 不同引物退火温度设定如下: ND1、ND6、β-actin: 59 °C, MtDNA、HGB: 60 °C, 72 °C 延伸 30 s, 共 38 个循环。上述引物扩增片段长度为: ND1: 148 bp, ND6: 91 bp, β-actin: 137 bp, MtDNA: 108 bp, HGB: 120 bp。根据各基因检测所得 Ct 值, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对基因表达量。

1.3 统计学处理 所得数据采用 Graphpad Prism 5.0 统计软件分析。多样本均数比较采用单因素方差分析, 实验组与对照组比较采用 Dunnett-t 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 APC 同步化 MDS-L 细胞检测 APC 将细胞同步化在 G0/G1 期,细胞无法进入 S 期。由图 1 可见,实验组经 APC 处理后细胞周期 S 期几乎无细胞存在,而未加 APC 处理的对照组 MDS-L 细胞按照正常的细胞周期进程,S 期可见有大量细胞存在。

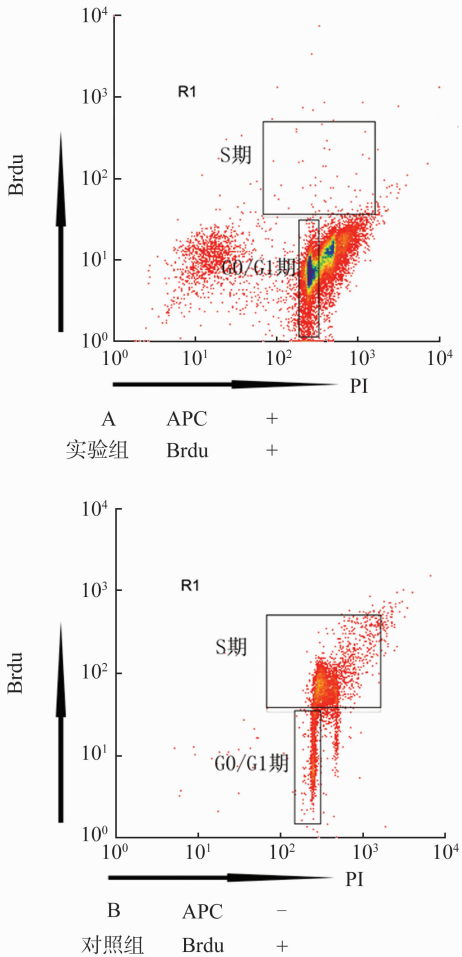


图 1 APC 将 MDS-L 细胞同步化在 G0/G1 期
A: APC 处理实验组; B: 无 APC 处理对照组。

Fig. 1 MDS-L cell line was synchronized at G0/G1 stage by APC

A: Treatment with APC; B: Treatment without APC.

2.2 不同浓度 DAC 对同步化 G0/G1 期细胞 ROS 产生的影响 见图 2。由图 2 可见,实验组 MDS-L 细胞在 5 $\mu\text{mol/L}$ DAC 作用 24 h 后可以促进同步化的 MDS-L 细胞产生 ROS,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。当 DAC 浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞内 ROS 产生较对照组明显较少($P < 0.05$)。

2.3 不同浓度 DAC 对同步化 MDS-L 细胞线粒体 DNA 拷贝数及线粒体编码基因 ND1、ND6 转录的影响 与对照组相比,同步化 MDS-L 在低浓度 DAC(1.5、5 $\mu\text{mol/L}$) 条件下可促进线粒体 DNA

(Mitochondrial DNA, mtDNA) 拷贝数增加($P < 0.05$),但随着 DAC 浓度增加,DAC 对 mtDNA 拷贝数影响不大,见图 3A。在高浓度 DAC(15 $\mu\text{mol/L}$) 作用下,同步化 MDS-L 细胞 ND1、ND6 基因转录明显增加,而低浓度 DAC 对 ND1、ND6 的转录影响不大,见图 3B、C。

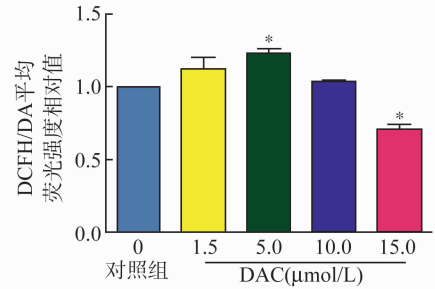


图 2 不同浓度 DAC 作用同步化的 G0/G1 期细胞 24 h 对 ROS 产生的影响

* $P < 0.05$ vs 对照组。

Fig. 2 The generation of ROS after treatment of DAC at different doses for 24 h in synchronized G1/G0 cells
* $P < 0.05$ vs control group.

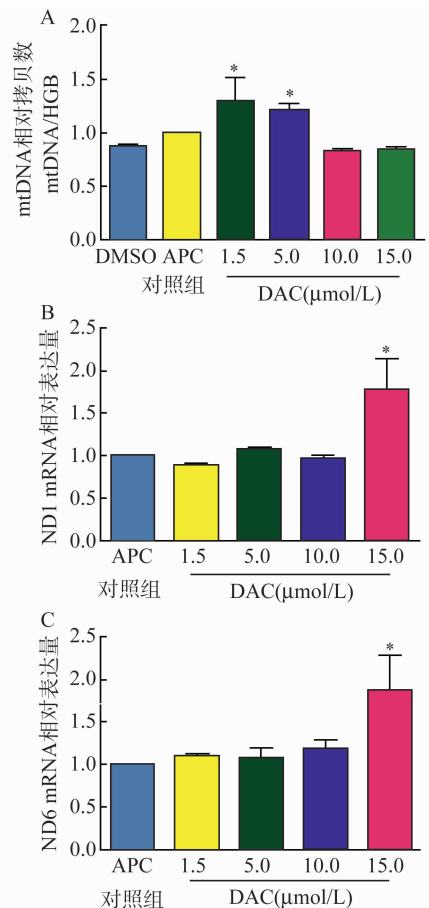


图 3 不同浓度的 DAC 对 G0/G1 期细胞线粒体 DNA 拷贝数(A)以及线粒体基因 ND1、ND6 表达的影响(B、C)
* $P < 0.05$ vs 对照组。

Fig. 3 The effect of DAC on the copy number of mitochondrial DNA (A) and on the mitochondrial transcripts of ND1 and ND6 in G0/G1 cells (B, C)
* $P < 0.05$ vs control group.

3 讨论

有研究表明,遗传异常在肿瘤发生发展中参与重要的作用^[7]。DNA去甲基化药物的出现给MDS治疗提供了新的策略。地西他滨(DAC)作为美国FDA批准的两种用于临床的DNA去甲基化药物之一表现出较好的应用前景,部分MDS患者从中受益^[8]。目前有研究认为,DAC发挥抗肿瘤作用具有浓度依赖性,在低浓度下DAC主要发挥DNA去甲基化作用,使发生甲基化沉默的抑癌基因重新表达,而高浓度DAC则通过基因组DNA整合发挥细胞毒作用^[9]。

线粒体是一种存在于胞浆内的细胞器,参与多种生物学过程如能量代谢、自由基产生、钙离子平衡、蛋白质转录后修饰、细胞凋亡等^[10]。线粒体DNA拷贝数增减或缺失以及线粒体编码基因的突变可见于多种肿瘤组织中,并与肿瘤的发生进展及预后有关^[10-11]。MDS是一种多发于老年患者的血液系统疾病,通过对MDS患者的线粒体DNA测序研究表明,高龄MDS患者线粒体DNA突变频率增加,且突变多发生于非编码区域^[12-13]。此外线粒体DNA编码蛋白的表达量以及线粒体DNA的拷贝数增加异常也可见于MDS患者。

本实验通过体外干预,使MDS-L细胞同步化在G0/G1期,抑制DAC的DNA整合作用,以此探讨DAC是否有对细胞发挥非基因组整合依赖的作用。APC是一种DNA聚合酶抑制剂,可以特异性结合DNA聚合酶,抑制DNA复制合成从而将细胞周期同步化在G0/G1期。本实验结果显示,APC可以很有效地将细胞同步化在G0/G1期。当同步化的MDS-L细胞给予不同浓度DAC作用后发现,在低浓度(1.5、5 $\mu\text{mol/L}$)下DAC可促进同步化细胞ROS产生,但随着浓度的增加,同步化细胞产生的ROS却低于对照组。线粒体内氧化呼吸电子传递是细胞内ROS主要来源^[14]。推测可能与DAC改变线粒体功能有关。通过检测不同浓度DAC对同步化G0/G1细胞线粒体DNA拷贝数以及线粒体基因ND1、ND6(NADH dehydrogenase 1、6)表达的影响。本实验结果显示,低浓度DAC(1.5、5 $\mu\text{mol/L}$)可以促进线粒体DNA拷贝数增加,而高浓度DAC却无此作用。线粒体DNA复制具有半自主性^[15],且受DNA聚合酶 γ 催化亚基(mitochondrial DNA polymerase γ catalytic subunit A, polgA)调控, polgA基因的甲基化程度与线粒体DNA拷贝数呈负相

关^[16]。此外,有研究发现,纤维原细胞在受到内源性或外源性氧化物刺激后,均可刺激线粒体DNA拷贝数增加^[17]。本实验结果显示,当DAC浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 时,能最大程度促进细胞内ROS产生,而此浓度对线粒体DNA拷贝数影响并非最明显。由此可见,低浓度DAC引起的线粒体DNA拷贝数增加可能与DAC去甲基化作用有关。随着浓度增加,DAC引起线粒体DNA损伤,使线粒体DNA拷贝数减少,抵消了DAC去甲基化作用所致的线粒体DNA拷贝数增加的作用。因此,在高浓度DAC作用,同步化MDS-L细胞线粒体DNA拷贝数未见明显改变。虽有研究报道,APC对线粒体功能有影响^[18],但本实验结果显示,APC处理组与DMSO对照组相比,线粒体DNA拷贝数无明显的变化。ND1、ND6是已报道的两个线粒体DNA甲基化转移酶参与调控的线粒体基因。低浓度DAC对线粒体的ND1、ND6表达无明显影响,相比之下,高浓度DAC可以促进两者的表达。因氧化呼吸复合体在线粒体内装配异常可影响氧化呼吸链电子传递^[19],所以高浓度DAC通过改变线粒体基因ND1、ND6蛋白表达、氧化呼吸复合物装配异常,从而影响线粒体氧化呼吸电子传递,与对照相比,降低ROS的产生。

综上所述,本研究初步探讨了DAC存在细胞毒以外的其他作用,不同浓度DAC可以影响线粒体ROS的产生,改变线粒体DNA拷贝数及调节线粒体基因表达等作用,为深入研究DAC的作用机理提供理论依据。

参考文献:

- [1] Nimer S D. MDS: a stem cell disorder but what exactly is wrong with the primitive hematopoietic cells in this disease[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008; 43-51. doi: 10.1182/asheducation-2008.1.43.
- [2] Ogata K, Satoh C, Tachibana M, et al. Identification and hematopoietic potential of CD45-clonal cells with very immature phenotype (CD45-CD34-CD38-Lin-) in patients with myelodysplastic syndromes[J]. Stem cell, 2005, 23(5):619-630.
- [3] Patel K, Dickson J, Din S, et al. Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(13):4313-4324.
- [4] Yamagata Y, Szabó P, Szüts D, et al. Rapid turnover of DNA methylation in human cells[J]. Epigenetics, 2012, 7(2):141-145.
- [5] Shock L S, Thakkar P V, Peterson E J, et al. DNA

- methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria [J]. PNAS, 2011, 108(9):3630-3635.
- [6] Adam-Vizi V, Tretter L. The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress[J]. Neurochem Int, 2013, 62(5):757-763.
- [7] Lichtenstein A V. Cancer: evolutionary, genetic and epigenetic aspects[J]. Clin Epigenetics, 2010, 1(3-4):85-100.
- [8] Fahy J, Jeltsch A, Arimondo P B. DNA methyltransferase inhibitors in cancer: a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies [J]. Expert Opin Ther Pat, 2012, 22(12):1427-1442.
- [9] Stresemann C, Brueckner B, Musch T, et al. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines[J]. Cancer Res, 2006, 66(5):2794-2800.
- [10] Yu M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers[J]. Life Sci, 2011, 89(3-4):65-71.
- [11] Jang M, Kim S S, Lee J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets [J]. Exp Mol Med, 2013, 45:45.
- [12] Wulfert M, Küpper A C, Tapprich C, et al. Analysis of mitochondrial DNA in 104 patients with myelodysplastic syndromes[J]. Exp Hematol, 2008, 36(5):577-586.
- [13] 靳红, 丛雅琴, 胡晓静, 等. 骨髓增生异常综合征患者线粒体 DNAD_loop 区突变研究[J]. 山东大学学报: 医学版, 2008, 46(5):453-461.
- [14] Iuso A, Scacco S, Piccoli C, et al. Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I[J]. J Biol Chem, 2006, 281(15):10374-10380.
- [15] Liu P, Demple B. DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought? [J]. Environ Mol Mutagen, 2010, 51(5):417-426.
- [16] Kelly R D, Mahmud A, McKenzie M, et al. Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(20):10124-10138.
- [17] Lee H C, Yin P H, Lu C Y, et al. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells[J]. Biochem J, 2000, 348(2):425-432.
- [18] Camilleri-Broët S, Vanderwerff H, Caldwell E, et al. Distinct alterations in mitochondrial mass and function characterize different models of apoptosis[J]. Exp Cell Res, 1998, 239(2):277-292.
- [19] Diaz F, Enríquez J A, Moraes C T. Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(2):415-429.

(编辑:徐苗蓁)

(上接第4页)

- [33] Boecker H, Othman A, Mueckter S, et al. Advocating neuroimaging studies of transmitter release in human physical exercise challenges studies[J]. Open Access J Sports Med, 2010, 6(1):167-175.
- [34] Gomes I, Dale C S, Casten K, et al. Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules[J]. AAPS J, 2010, 12(4):658-669.
- [35] Collinder E, Nyberg F, Sanderson-Nydahl K, et al. The Opioid Haemorphin-7 in Horses During Low-speed and High-speed Treadmill Exercise to Fatigue [J]. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 2005, 52(4):162-165.
- [36] Niscola P, Sorrentino F, Scaramucci L, et al. Pain syndromes in sickle cell disease: an update[J]. Pain Med, 2009, 10(3):470-480.
- [37] Song C, Wang Q, Li C C H. Characterization of the aggregation-prevention activity of p97/valosin-containing protein [J]. Biochemistry, 2007, 46(51):14889-14898.
- [38] Andersson V, Hanzén S, Liu B, et al. Enhancing protein disaggregation restores proteasome activity in aged cells[J]. Aging (Albany NY), 2013, 5(11):802.
- [39] McClish D K, Smith W R, Dahman B A, et al. Pain site frequency and location in sickle cell disease: the PiS-CES project[J]. Pain, 2009, 145(1):246-251.

(编辑:刘霞)