

DNA 甲基化通过锌指蛋白 185 调控慢性粒细胞白血病细胞的增殖*

郑全辉^{1)**} 张爱红²⁾ 郑爱华²⁾ 么文博³⁾ 张庆波¹⁾

陆斌²⁾ 胡雪莲⁴⁾ 王娜⁴⁾ 赵勇⁴⁾

¹⁾ 河北联合大学基础医学院, 唐山 063000; ²⁾ 河北省唐山市工人医院, 唐山 063000;

³⁾ 河北省唐山市人民医院, 唐山 063000; ⁴⁾ 中国科学院动物研究所, 北京 100101

摘要 锌指蛋白 185(ZNF185)属于 LIM 结构域蛋白, 参与细胞的增殖和分化, 在多种肿瘤细胞中具有抑癌基因的功能。ZNF185 在正常人血液系统细胞中高表达, 但目前对白血病细胞的作用未见研究。采用 Western blot 检测人外周血中性粒细胞、急性粒细胞白血病细胞系 HL-60 和慢性粒细胞白血病细胞系 K562 细胞中 ZNF185 的表达, 发现 ZNF185 在 HL-60 和 K562 细胞中的表达水平显著低于外周血中性粒细胞。为了阐明 ZNF185 对慢性粒细胞白血病细胞增殖的影响, 从人外周血中性粒细胞克隆 ZNF185 编码序列, 转染 K562 细胞, MTT 检测细胞增殖, 发现过表达 ZNF185 显著抑制 K562 细胞的增殖。甲基化特异 PCR 分析表明: ZNF185 启动子在 HL-60 和 K562 细胞中高甲基化, 用 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理 K562 细胞, 促进 ZNF185 的表达, 显著抑制细胞增殖。研究结果表明, ZNF185 启动子高甲基化导致其在 K562 细胞中的表达降低和细胞增殖抑制作用减弱。可能是慢性粒细胞白血病发生或发展的原因之一。

关键词 锌指蛋白 185, 慢性粒细胞白血病, 细胞增殖, DNA 甲基化, 5-氮杂-2'-脱氧胞苷

学科分类号 R557.4, R733.7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00369

锌指蛋白(zinc finger protein, ZNF)185 是一种 C 端含有 LIM(Lin-1, Isl.1 和 nec-3)结构域的蛋白质。由于 mRNA 的选择性剪切, ZNF185 编码多个不同的蛋白质剪切体。ZNF185 在人体多种组织表达, 尤以前列腺和骨髓表达最高^[1-2]。近年来研究发现, ZNF185 基因参与了肌动蛋白共定位, 并在肿瘤组织中表达下调^[3-4]。我们发现, 与人外周血正常中性粒细胞相比, ZNF185 在急、慢性粒细胞白血病细胞系 HL-60 和 K562 中的表达显著降低, 然而, 对于 ZNF185 在粒细胞白血病细胞增殖中的作用及其表达调控的分子机制, 至今无人研究。为此, 我们从人外周血正常中性粒细胞中克隆了全长 ZNF185 编码序列, 通过 MTT 检测过表达 ZNF185 对慢性粒细胞白血病细胞增殖的影响。进一步采用甲基化特异 PCR 检测 ZNF185 在正常中性粒细胞与 HL-60 和 K562 细胞中的甲基化差异, 以及采用 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-CdR)处理, 观察去甲基化对 K562 细胞 ZNF185 的表达和细胞增殖的影响。

响, 以期对急、慢性粒细胞白血病的发病机制及治疗探索新的途径和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人外周血取自河北联合大学附属医院检验科, 标本收集获取河北联合大学附属医院伦理委员会批准, 并获得血样提供者知情同意。人外周血中性粒细胞分离液购自北京杰辉生物科技有限公司; 人急、慢性粒细胞白血病细胞系 HL-60 和 K562 由河北联合大学基础医学院冻存; TRIzol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 各种限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶和反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; DNA

* 国家自然科学基金重点资助项目(C30630060)和唐山市科技局指令性科研资助项目(12140209A-44)。

** 通讯联系人。

Tel: 0315-3725918, E-mail: zquanhui@yahoo.com

收稿日期: 2012-07-16, 接受日期: 2012-10-18

提取试剂盒、质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; HRP 标记羊抗兔二抗购自北京博奥森公司; 兔抗人 ZNF185 一抗和 pEGFPC2 绿色荧光蛋白表达质粒由 Dr. Zhang Jin-san (Mayo Clinic/Foundation, Rochester, Minnesota) 惠赠. 蛋白质提取试剂盒和 Bio-Rad 蛋白浓度测定试剂盒购自北京天恩泽公司, 引物由上海生物工程公司合成. 亚硫酸氢钠(sodium bisulfite), 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-CdR)购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 Western blot. 人外周血中性粒细胞分离按说明书操作. 提取外周血中性粒细胞、HL-60、K562 细胞总蛋白, 测定蛋白质浓度. 以上三种细胞蛋白各取 10 μ g 进行 SDS-PAGE. 电泳后将蛋白质电转(4 $^{\circ}$ C, 恒流 300 mA, 2 h)到硝酸纤维素膜(NC)上, 然后将 NC 膜在含 100 g/L 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 2 h, 加兔抗人 ZNF185 一抗(1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗去未结合一抗, 再加 HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)室温作用 1 h, TBST 冲洗后加底物反应 3 min, 暗室曝光.

1.2.2 ZNF185 cDNA 克隆. 提取正常人外周血中性粒细胞总 RNA, 反转录后 PCR 采用 Pfx 高保真 DNA 聚合酶和下列引物: 上游, 5' GGAATTC-ATGAGTATCTCAGCTCTTG 3', 下游, 5' ACG-CGTCGACTAGAAGAGCTTCTCATAGC 3'. 上、下游引物分别加入 *Eco*R I /*Sal* I 酶切位点. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, PCR 产物胶回收并纯化. *Eco*R I /*Sal* I 双酶切 PCR 产物和 pEGFPC2 质粒, 回收纯化酶切产物, 并利用 T4 DNA 连接酶将其连接在一起. 小提质粒测序.

1.2.3 细胞培养和转染. HL-60、K562 细胞采用低糖 DMEM 培养基, 5%胎牛血清常规培养. K562 细胞质粒转染采用电转染(质粒浓度: 20 mg/L, 电转条件: 250V, 10 ms). 为获得稳定转染的细胞, K562 细胞在转染 24 h 后, 1:2 分离培养过夜, 加入 G418(600 g/L)筛选抗性克隆. 选择培养 2 个月后, 采用流式细胞仪分选绿色荧光蛋白阳性细胞, 继续常规培养.

1.2.4 MTT 检测细胞增殖. 将稳定转染空载体以及 ZNF185 编码序列的 K562 细胞接种 96 孔细胞培养板(1 $\times$ 10⁴/孔), 每个样品 3 个复孔. 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养, 随后分别于 24 h、48 h、72 h、

96 h、120 h 加入 25 μ l 四甲基偶氮唑盐(MTT, 10 g/L), 于上述条件下继续培养 4 h, 吸净培养液, 每孔加 200 μ l DMSO, 放置 5~10 min 后, 以 DMSO 作空白对照, 用酶标仪于 570 nm 处测定各孔的光吸收值, 以培养时间为横轴, 平均光吸收值为纵轴, 绘制生长曲线.

1.2.5 基因组 DNA 提取及亚硫酸氢钠处理. 分别将人外周血中性粒细胞、K562、HL-60 细胞用预冷 PBS 洗 1 次, 4 $^{\circ}$ C 1 500 g 离心收集细胞. 基因组 DNA 提取(1 μ g/样本)和亚硫酸氢钠处理同前^[5-6]. 处理后 DNA 样品随后采用 Qiagen 离心柱纯化并溶于 50 μ l 双蒸水中, 加入 0.3 mol/L NaOH 室温 5 min 终止变性, 乙醇沉淀 DNA 作为甲基化特异 PCR 扩增模板.

1.2.6 甲基化特异的 PCR(MSP). 用亚硫酸氢钠处理过的基因组 DNA 作为模板, 选取 ZNF185 基因启动子 CpG 岛序列. 采用下列引物进行 touch-down PCR: ZNF185 甲基化引物, 上游序列为 5' GCGTAGTTTCGGGTGTTTG 3', 下游序列为 5' ACGAAAAACCAACGTAACTA 3'; ZNF185 非甲基化引物, 上游序列为 5' GTGTAGTTTTGGGTGTTTGTAGG 3', 下游序列为 5' CAAAA-AAACCAACATTAATCTATCTC 3'. 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 40 s, 65~55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 10 个循环; 95 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 29 个循环. PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳, EB 染色照相.

1.2.7 DNA 甲基化酶抑制剂 5-aza-CdR 处理. 5-aza-CdR 浓度分别采用 1 μ mol/L 和 5 μ mol/L, 对照组采用 DMSO 处理, 细胞连续培养 5 天(120 h), 每 24 h 更换含有新鲜药物的培养液. 收集细胞, Western blot 检测 ZNF185 表达, MSP 检测 ZNF185 启动子甲基化改变. 将不同处理组 K562 细胞接种 96 孔细胞培养板(1 $\times$ 10⁴/孔), 每个样品 3 个复孔, 细胞连续培养 5 天(120 h), MTT 检测细胞增殖.

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 ZNF185 在人急、慢性粒细胞白血病细胞中表达显著降低

分离正常人外周血中性粒细胞, 流式细胞仪检

测分离纯度在 90%以上(图 1a). 分别提取人外周血中性粒细胞以及人急、慢性粒细胞白血病细胞系 HL-60 和 K562 细胞总蛋白, Western blot 检测 ZNF185 的表达. 结果显示, ZNF185 在人外周血

中性粒细胞中高表达, 而在 K562 和 HL-60 细胞中, ZNF185 的表达显著降低(图 1b, c), 提示 ZNF185 可能在粒细胞白血病细胞的增殖调控中发挥作用.

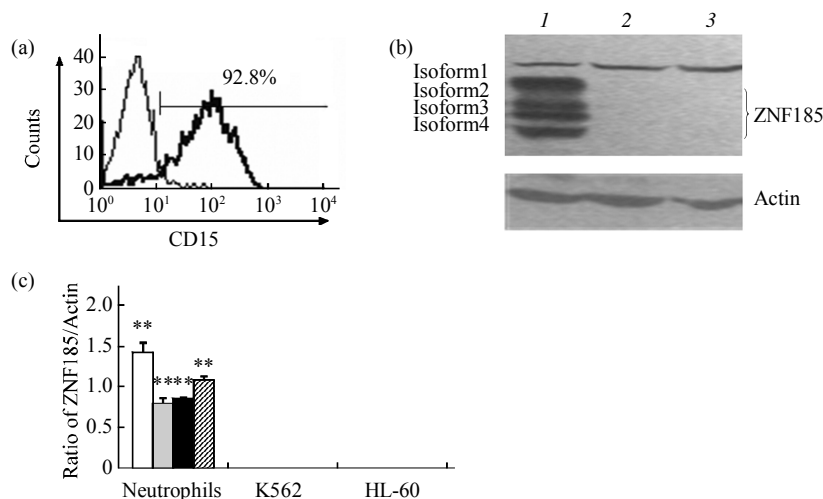


Fig. 1 Decreased ZNF185 protein expression in K562 and HL-60 cells

(a) Neutrophils selected from human peripheral blood were stained by anti-CD15 antibody and the purification of neutrophils was detected by Flow cytometry. Thin line: Negative control; Thick line: Anti-CD15 staining neutrophils. (b) Western blotting analysis of ZNF185 protein expression in neutrophils, K562 and HL-60 cells. Actin was as loading control. ZNF185 protein is expressed as different isoforms because of alternative splicing of *ZNF185* mRNA. 1: Neutrophils; 2: K562; 3: HL-60. (c) Quantitative analysis of the Western blotting was performed with software. □: Isoform1; ▤: Isoform2; ■: Isoform3; ▨: Isoform4. The data was mean of three different experiments. ** ZNF185 protein isoforms in both K562 and HL-60 have significant difference with respect to neutrophils ($P < 0.01$).

2.2 ZNF185 表达质粒的构建

为检测 ZNF185 对粒细胞白血病细胞增殖的影响, 我们从正常人外周血中性粒细胞提取 RNA, 反转录扩增(图 2a). 选取丰度最高的 PCR 扩增片段(2 086 bp)经 *EcoR* I / *Sal* I 双酶切、纯化后克隆至 pEGFPC2 载体. 测序分析表明, 克隆 cDNA 主

要编码 689 个氨基酸的多肽, 此序列羧基端含有 2 个锌指结构组成的 LIM 结构域, 氨基端含有肌动蛋白纤维结合(ATD)结构域. 测序证明此质粒编码 ZNF185 全长序列, 定义为 pEGFPC2(689 氨基酸) (图 2b 及网络版附录, http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20120369&flag=1).

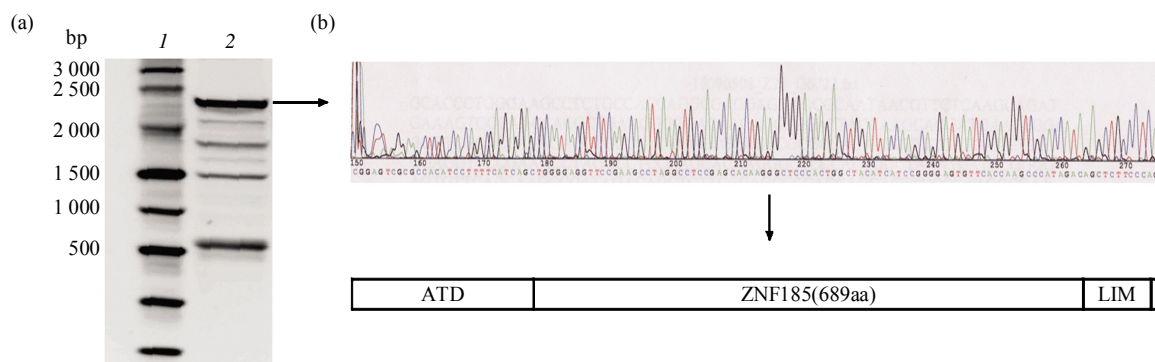


Fig. 2 Cloning of ZNF185 coding sequence

(a) RT-PCR amplification of *ZNF185* coding sequence from mRNA of human neutrophils. Restriction enzyme cutting sites were inserted into the 5' sides of up and down primers as described in the **Materials and methods**. 1: Marker; 2: ZNF185 RT-PCR product. (b) ZNF185 RT-PCR product (as pointed in (a)) was cut from the gel, purified and inserted into pEGFPC2 vector. Plasmid sequencing showed that it translates a 689 amino acids (aa) ZNF185 protein which contains a N-terminal ATD domain and a C-terminal LIM domain.

2.3 过表达 ZNF185 抑制 K562 细胞的增殖

将 pEGFPC2(689 氨基酸) ZNF185 表达质粒转染 K562 细胞, 同时转染 pEGFPC2 空载体作为对照. 转染细胞经 G418 筛选后获得稳定表达细胞株. Western blot 结果显示, 稳定转染 pEGFPC2

(689 氨基酸)的 K562 细胞高表达 ZNF185 蛋白(图 3a). 分别将稳定转染 pEGFPC2 空载体和 pEGFPC2(689 氨基酸)的 K562 细胞接种 96 孔板, MTT 检测细胞增殖, 发现与转染 pEGFPC2 空载体的 K562 细胞相比, 转染 pEGFPC2(689 氨基酸)的 K562 细胞增殖速率显著减低(图 3b).

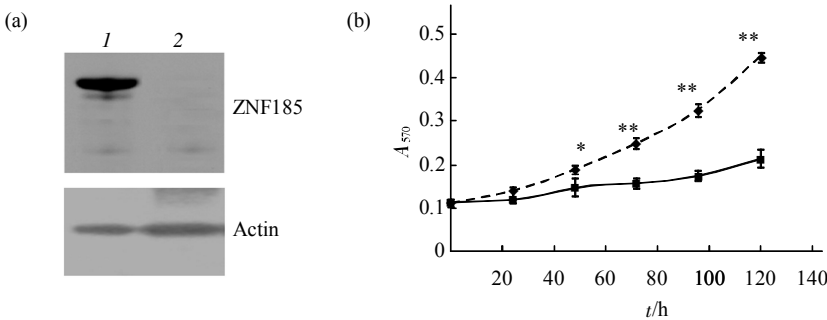


Fig. 3 Overexpression of ZNF185 inhibits K562 cell proliferation

(a)Western blotting analysis of ZNF185 expression in K562 cells stably transfected with pEGFPC2(689aa) and pEGFPC2 blank vector, actin was as loading control. 1: K562 cells transfected with pEGFPC2(689aa); 2: K562 cells transfected with pEGFPC2 vector. (b) K562 cells stably transfected with pEGFPC2(689aa) and pEGFPC2 were cultured in 96 well plate for 120 h and cell proliferation was detected by MTT every 24 h. ◆—◆: pEGFPC2; ■—■: pEGFPC2(689aa). Data are shown as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 ZNF185 启动子在粒细胞白血病细胞中高甲基化

基因启动子部位的 DNA 甲基化修饰是抑制基因表达的主要方式之一. 为研究 DNA 甲基化对 ZNF185 表达的影响, 分别提取人外周血中性粒细胞、K562 和 HL60 细胞基因组 DNA, 选择

ZNF185 启动子部位 CpG 岛进行 MSP 检测(图 4a). 结果发现, ZNF185 启动子在人外周血中性粒细胞中主要表现为非甲基化, 而在粒细胞白血病细胞系 K562 和 HL60 中, ZNF185 启动子几乎全部甲基化(图 4b).

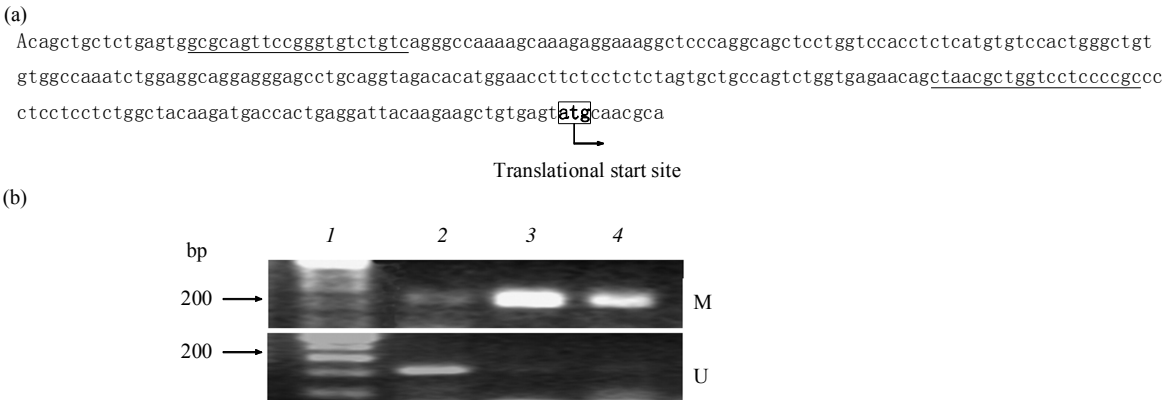


Fig. 4 MSP analysis of methylation of ZNF185 promoter in neutrophils, K562 and HL-60 cells

(a) Genomic position indicates the location of the forward and reverse primer in relation to the translational start site of ZNF185 defined in the GenBank accession No. Y09538. Primers used were either specific for methylated or the modified unmethylated sequences. (b) MSP products from ZNF185 methylation and unmethylation primers. The methylation primers produce a 197bp PCR product and the unmethylation primers produce a 196 bp PCR product. M and U indicates the presence of methylated and unmethylated ZNF185 DNA. 1: DNA marker; 2: DNA of neutrophils; 3: DNA of K562 cells; 4: DNA of HL-60 cells.

2.5 5-aza-CdR 处理 K562 细胞增加 ZNF185 的表达, 抑制细胞增殖

为了进一步明确 *ZNF185* 启动子甲基化是否通过调控 *ZNF185* 的表达进而调节细胞增殖, 选取 K562 细胞作为靶细胞, 分别以 $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 DNA 去甲基化制剂 5-aza-CdR 连续处理细胞 5 天, 每隔 24 h 更换含有药物的新鲜培养液, 观察 DNA 去甲基化处理对 *ZNF185* 表达和 K562 细胞增殖的影响. Western blot 结果显示, 5-aza-CdR 处理致 K562 细胞表达 *ZNF185*, 并随药物浓度的增加 *ZNF185* 表达增加(图 5a, b). MSP 检测 5-aza-CdR

处理 K562 细胞中 *ZNF185* 启动子甲基化的改变, 发现与 DMSO 处理组相比, $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 处理组 *ZNF185* 启动子甲基化程度逐渐降低, 并出现非甲基化扩增条带(图 5c, d). MTT 结果表明, $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 5-aza-CdR 处理 K562 细胞 48 h 后均显示显著地抑制细胞增殖的效果, 且 $5 \mu\text{mol/L}$ 药物处理组的抑制效果高于 $1 \mu\text{mol/L}$ 处理组(图 5e). 此结果证实, *ZNF185* 启动子甲基化抑制其在 K562 细胞中的表达, 降低 *ZNF185* 对 K562 细胞的增殖抑制作用.

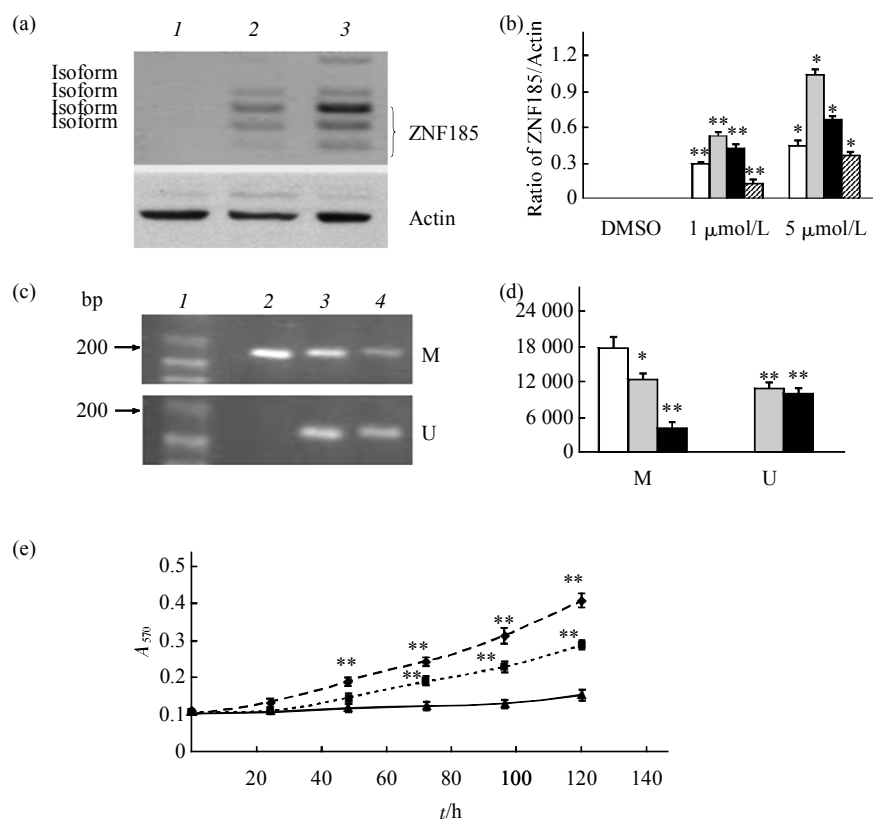


Fig. 5 Inhibition of K562 cell proliferation by 5-aza-CdR

(a) Western blotting analysis of *ZNF185* expression in K562 cells treated with either DMSO or $1 \mu\text{mol/L}$ and $5 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR, actin was as loading control. 1: K562 cells treated with DMSO; 2: $1 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR; 3: $5 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR. (b) Quantitative analysis of the Western blotting was performed with software. The data was mean of three different experiments. □: Isoform1; ▤: Isoform2; ■: Isoform3; ▨: Isoform4. ** $1 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR have significant difference with respect to DMSO ($P < 0.01$); * $5 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR have significant difference with respect to $1 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR ($P < 0.05$). (c) MSP analysis of *ZNF185* methylation in K562 cells treated with either DMSO or $1 \mu\text{mol/L}$ and $5 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR. 1: DNA marker; 2: K562 cells treated with DMSO; 3: $1 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR; 4: $5 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR. (d) Quantitative analysis of the MSP was performed with software. □: DMSO; ▤: $1 \mu\text{mol/L}$; ■: $5 \mu\text{mol/L}$. M*: Methylation of *ZNF185* promoter in K562 cells treated $1 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR have significant difference with respect to K562 cells treated with DMSO ($P < 0.05$); M**: Methylation of *ZNF185* promoter in K562 cells treated with $5 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR, have significant difference with respect to K562 cells treated with DMSO ($P < 0.01$); U**: Unmethylation of *ZNF185* promoter in K562 cells treated with $1 \mu\text{mol/L}$ and $5 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR have significant difference with respect to K562 cells treated with DMSO ($P < 0.01$). (e) K562 cells treated with either DMSO or $1 \mu\text{mol/L}$ and $5 \mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR were cultured in 96 well plate for 120 h and cell proliferation was detected by MTT assay every 24 h. ◆—◆: DMSO; ■—■: $1 \mu\text{mol/L}$; ▲—▲: $5 \mu\text{mol/L}$. Data are shown as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨 论

LIM 结构域是一个富含半胱氨酸并由 2 个锌的蛋白质结构域, LIM 结构域蛋白又称锌指蛋白原子连接(zinc-finger protein, ZNF), 在细胞增殖和分化过程中发挥重要作用^[7-9]. ZNF185 作为 LIM 结构域蛋白之一位于染色体 Xq28, 此区域目前已知与 20 多种遗传性疾病有关. Heiss 等^[1]基于表达序列标签(EST)和基因组序列分析, 推测 *ZNF185* cDNA 编码一个 452 个氨基酸(amino acid)的蛋白质并在其 C 端有一个 LIM 结构域. 2006 年, Zhang 等^[2]从正常人前列腺癌组织中通过克隆测序发现 *ZNF185* 基因至少编码 4 个不同氨基酸序列的蛋白质产物, 分别为 689 个氨基酸, 660 个氨基酸, 630 个氨基酸和 452 个氨基酸, Heiss 等公布的序列只是其中之一. *ZNF185* 在人多种组织表达, 前列腺组织表达最高, 骨髓、外周血、甲状腺、脑、肾等组织也有较高表达. 多项研究表明, *ZNF185* 与癌症的发生存在密切联系并且主要发挥抑癌基因的作用. Gonzalez 等^[10]采用基因芯片分析发现: 与周边正常上皮组织相比, *ZNF185* 在磷状上皮细胞癌的表达下调. Vanaja 等^[11]在筛查前列腺致病相关基因的过程中发现 *ZNF185* 基因的表达在前列腺癌组织中显著降低, 并且与癌症的严重程度和转移程度成正比. Medina 等^[12]发现 *ZNF185* 表达水平的降低是肺癌细胞的一个普遍特征, 并与肺癌的发生呈正相关.

粒细胞白血病是一种起源于多能造血干细胞的恶性增殖性疾病, 在我国其发病率占成人白血病的 20% 以上. 已知 9 号染色体长臂上 *c-abl* 原癌基因易位至 22 号染色体的末端而形成的 *BCR/ABL* 融合基因是其发病原因之一^[13], 而其他与粒细胞白血病发生和发展的分子机制目前所知甚少. 在此研究中, 我们发现, 锌指蛋白 *ZNF185* 在人外周血中性粒细胞中具有较高的表达, 而在急、慢性粒细胞白血病细胞系 HL-60 和 K562 中表达显著降低, 过表达 *ZNF185* 可显著抑制 K562 细胞的增殖, 表明 *ZNF185* 在慢性粒细胞白血病细胞中发挥抑癌基因的作用.

基因启动子部位 DNA 甲基化修饰是真核生物基因表达调控的主要方式之一, 高甲基化抑制基因转录而低甲基化使转录增加^[14]. 通过 MSP 检测, 发现在人正常外周血中性粒细胞中, *ZNF185* 启动

子非甲基化扩增条带明显, 同时也出现微弱的甲基化扩增条带, 而在 HL-60 和 K562 细胞中几乎只有甲基化扩增条带, 说明 DNA 甲基化可能是抑制 *ZNF185* 在急、慢性粒细胞白血病细胞中表达的主要原因, 在人正常中性粒细胞中出现的甲基化扩增条带则可能与分离中性粒细胞时, 掺杂的其他少量不表达 *ZNF185* 的血液细胞有关. 在不同浓度 5-aza-CdR 处理的 K562 细胞中, 与对照组相比, *ZNF185* 启动子均出现明显的非甲基化扩增条带, 而且 *ZNF185* 的表达也随 5-aza-CdR 浓度的增加而增加. 更为重要的是, 5-aza-CdR 处理的 K562 细胞与对照组相比细胞增殖速度显著降低. 此结果证明, DNA 甲基化抑制 *ZNF185* 在慢性粒细胞白血病细胞中的表达并促进细胞增殖.

我们注意到, 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-CdR 处理 K562 细胞的增殖速率甚至低于 *ZNF185* 转染细胞, 这可能与 5-aza-CdR 的非特异去甲基化诱导其他抑制细胞增殖的基因表达有关: 如罗健民等^[15]报道 5-aza-CdR 通过促进 SHP-1 基因表达抑制 K562 细胞增殖, 促进细胞凋亡; 黄云燕等^[16]报道 5-aza-CdR 联合 EGCG(表没食子儿茶素没食子酸酯)可改变 HL-60 和 K562 细胞中 Bcl-2 和 Bax 的表达, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡. 因此, 5-aza-CdR 抑制 K562 细胞的增殖效应可能通过多种途径进行, 而诱导 *ZNF185* 的表达只是其中之一. 由于 mRNA 的选择性剪切, *ZNF185* 表达多个不同分子质量的蛋白异构体, 除 689 个氨基酸外, 其他 *ZNF185* 蛋白异构体对 K562 细胞增殖和分化的影响也尚须进一步探讨. 另外, 由于未知原因, pEGFPC2(689 个氨基酸)*ZNF185* 表达质粒稳定转染 HL-60 细胞未成功, 尚不能确定 *ZNF185* 对急性粒细胞白血病细胞增殖的特异性影响, 也需加以完善.

总之, *ZNF185* 具有抑癌基因的作用, 在急、慢性粒细胞白血病细胞中表达显著降低, 而通过转染或 DNA 去甲基化处理增加 *ZNF185* 在 K562 中的表达具有显著抑制细胞增殖的效果. 本研究为进一步认识粒细胞白血病发生和发展的机制以及临床治疗靶点的选择提供了新的线索.

参 考 文 献

- [1] Heiss N S, Gloeckner G, Bachner D, et al. Genomic structure of a novel LIM domain gene (*ZNF185*) in Xq28 and comparisons with the orthologous murine transcript. *Genomics*, 1997, **43**(3): 329-338
- [2] Zhang J S, Gong A, Young C Y. *ZNF185*, an actin-cytoskeleton-

- associated growth inhibitory LIM protein in prostate cancer. *Oncogene*, 2007, **26**(1): 111–122
- [3] Rabbitts T H, Boehm T. LIM domains. *Nature*, 1990, **346** (6283): 418
- [4] Sanchez—Garcia I, Rabbitts T. The LIM domains: a new structural motif found in zinc- finger-like protein. *Trends Genet*, 1994, **10**(9): 315–320
- [5] Zheng Q H, Ma L W, Zhu W G, *et al.* p21Waf1/Cip1 plays a critical role in modulating senescence through changes of DNA methylation. *J Cell Biochem*, 2006, **98**(5): 1230–1248
- [6] Zheng Q, Xu Y, Liu Y, *et al.* Induction of Foxp3 demethylation increases regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells and prevents the occurrence of diabetes in mice. *J Mol Med (Berl)*, 2009, **87**(12): 1191–1205
- [7] Bach I. The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev*, 2000, **91**(1–2): 5–17
- [8] McLoughlin P, Ehler E, Carlile G, *et al.* The LIM-only protein DRAL/FHL2 interacts with and is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem*, 2002, **277**(40): 37045–37053
- [9] Yamada Y, Pannell R, Forster A, *et al.* The LIM-domain protein Lmo2 is a key regulator of tumor angiogenesis: a new anti-angiogenesis drug target. *Oncogene*, 2002, **21**(9): 1309–1315
- [10] Gonzalez H, Gujrati M, Frederick M, *et al.* Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003, **129**(7): 754–759
- [11] Vanaja D K, Cheville J C, Iturria S J, *et al.* Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression. *Cancer Res*, 2003, **63**(14): 3877–3882
- [12] Medina P P, Carretero J, Ballestar E, *et al.* Sanchez-Cespedes M. Transcriptional targets of the chromatin-remodelling factor SMARCA4/BRG1 in lung cancer cells. *Hum Mol Genet*, 2005, **14**(7): 973–982
- [13] Chomel J C, Sorel N, Guilhot J, *et al.* BCR-ABL expression in leukemic progenitors and primitive stem cells of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2012, **119**(12): 2964–2965
- [14] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003, **33** (Suppl): 245–254
- [15] 罗建民, 李 燕, 杨 琳, 等. 甲基化抑制剂 5-aza-2'-deoxycytidine 对 K562 细胞 SHP-1 基因表达及细胞增殖与凋亡的影响. *中国实验血液学杂志*, 2009, **5**(2): 309–314
Luo J M, Li Y, Yang L, *et al.* *J Experimental Hematology*, 2009, **5**(2): 309–314
- [16] 黄云燕, 夏 焱, 郭海霞, 等. 5-AZA-CdR 联合 EGCG 对 HL-60 和 K562 的影响. *南方医科大学学报*, 2008, **1**(2): 56–60
Huang Y Y, Xia Y, Guo H X, *et al.* *J South Med Uni*, 2008, **1**(2): 56–60

DNA Methylation Regulates Chronic Myeloid Leukemia Cell Proliferation Through ZNF185*

ZHENG Quan-Hui^{1)**}, ZHANG Ai-Hong²⁾, ZHENG Ai-Hua²⁾, YAO Wen-Bo³⁾,
ZHANG Qing-Bo¹⁾, LU Bin¹⁾, HU Xue-Lian⁴⁾, WANG Na⁴⁾, ZHAO Yong⁴⁾

(¹⁾ College of Elementary Medicine, Hebei United University, Tangshan 063000, China; ²⁾ Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China;

³⁾ Tangshan Renmin Hospital, Tangshan 063000, China; ⁴⁾ Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Many studies have demonstrated that ZNF185, a LIM domain protein, acts as a tumor suppressor in several types of tumor cell. However, the role of ZNF185 in leukemia cells remains unclear, though it is highly expressed in the cells of human blood system. In the present study, we found dramatically decreased ZNF185 expression in the acute and chronic myeloid leukemia cell line HL-60 and K562 compared with that in normal neutrophils. To explore the role of ZNF185 in the proliferation of myeloid leukemia cells, complete coding sequence of *ZNF185* was cloned and transfected into K562 cells, MTT assay showed that over expression of ZNF185 in K562 cells significantly inhibited its proliferation. To explore the molecular mechanism that regulates ZNF185 expression in myeloid leukemia cells, methylation specific PCR (MSP) was performed to determine the methylation status of *ZNF185* promoter in the normal PBL neutrophils, HL-60 and K562 cells. Higher methylation of *ZNF185* promoter was detected in HL-60 and K562 cells than that in normal PBL neutrophils. Furthermore, treatment of K562 cells with 5-aza-CdR, a DNA demethylation agent, resulted in demethylation of *ZNF185* promoter, increased ZNF185 expression and inhibited K562 cell proliferation. Our results indicate that *ZNF185* promoter methylation which reduces ZNF185 expression in K562 cells and its ability to inhibit cell proliferation may be one of the molecular mechanisms that are related to the occurrence or development of chronic myeloid leukemia.

Key words ZNF185, chronic myeloid leukemia, cell proliferation, DNA methylation, 5-aza-CdR

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00369

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation for Key Project (C30630060) and The Tangshan Science and Technology Bureau for Basic Medical Research (12140209A-44).

**Corresponding author.

Tel: 86-315-3725918, E-mail: zquanhui@yahoo.com

Received: July 16, 2012 Accepted: October 18, 2012

The underlined sequence in the 5' and 3' end correspond to primers used for RT-PCR cloning of ZNF185 CDNA. *EcoR* I and *Sal* I enzyme cutting sites are boxed and the putative start and stop translated codons are bolded. The putative nucleotide sequences that code the actin binding domain(ATD) and LIM domain of ZNF185 protein are shaded.