

# 表没食子儿茶素没食子酸酯促进急性髓系白血病细胞凋亡的机制

吴明彩<sup>1,2</sup>, 蒋明<sup>3</sup>, 薛梦雅<sup>1</sup>, 李青<sup>1</sup>, 程彬<sup>1</sup>, 黄梦珠<sup>1</sup>, 徐蕾<sup>1,2</sup>, 章尧<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>皖南医学院生物化学与分子生物学教研室, 安徽 芜湖 241002; <sup>2</sup>安徽省活性大分子重点实验室, 安徽 芜湖 241002; <sup>3</sup>安徽省军区芜湖市第二离职干部休养所, 安徽 芜湖 241002

**摘要:**目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)诱导 *CHD5* 基因去甲基化促进 KG-1、THP-1 细胞凋亡的相关机制。方法 设实验组及正常对照组, 实验组: 不同浓度 (25、50、75、100、150 μg/mL) EGCG 处理作用于 KG-1、THP-1 细胞, 正常对照组: 不加 EGCG 处理。MSP 法检测 KG-1、THP-1 细胞 *CHD5* 基因甲基化; MTT 法检测作用 48 h 后细胞增殖; 流式细胞术检测作用 48 h 后细胞周期和细胞凋亡状况; RT-qPCR、Western blot 检测 DNMT1、*CHD5*、p19<sup>Arf</sup>、p53、p21<sup>Cip1</sup> 基因和蛋白表达。结果 EGCG 呈现剂量依赖性逆转了 KG-1、THP-1 细胞 *CHD5* 基因高甲基化; EGCG 以剂量依赖性的方式抑制 KG-1、THP-1 细胞增殖 ( $P < 0.05$ ); EGCG 诱导细胞周期停滞于 G1 期, 促进细胞凋亡; EGCG 以剂量依赖性的方式下调 DNMT1 的 mRNA 和蛋白表达, 上调 *CHD5*、p19<sup>Arf</sup>、p53、p21<sup>Cip1</sup> 的 mRNA 和蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。结论 EGCG 可通过下调 DNMT1 降低 KG-1、THP-1 细胞 *CHD5* 基因高甲基化, 恢复 *CHD5* 基因表达, 从而上调 p19<sup>Arf</sup>、p53、p21<sup>Cip1</sup> 表达诱发细胞凋亡。

**关键词:** 表没食子儿茶素没食子酸; *CHD5* 基因; 甲基化; p19<sup>Arf</sup>-p53-p21<sup>Cip1</sup> 信号通路; 急性髓系白血病

## Epigallocatechin gallate induces *CHD5* gene demethylation to promote acute myeloid leukemia cell apoptosis *in vitro* by regulating p19<sup>Arf</sup>-p53-p21<sup>Cip1</sup> signaling pathway

WU Mingcai<sup>1,2</sup>, JIANG Ming<sup>3</sup>, XUE Mengya<sup>1</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, CHENG Bing<sup>1</sup>, HUANG Mengzhu<sup>1</sup>, XU Lei<sup>1,2</sup>, ZHANG Yao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; <sup>2</sup>Anhui Provincial Key Laboratory of Active Biological Macromolecules, Wuhu 241002, China; <sup>3</sup>Wuhu Second Sanatorium for Retired Cadres, Anhui Provincial Military Command, Wuhu 241002, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism by which epigallocatechin gallate (EGCG) induces *CHD5* gene demethylation and promotes the apoptosis of acute myeloid leukemia KG-1 and THP-1 cell lines. **Methods** KG-1 and THP-1 cells treated with 25, 50, 75, 100 or 150 μg/mL EGCG for 48 h were examined for *CHD5* gene methylation using MSP and for cell proliferation using MTT assay. The changes in cell cycle and apoptosis of the two cell lines after treatment with EGCG for 48 h were detected using flow cytometry. The mRNA and protein expressions of DNMT1, *CHD5*, p19<sup>Arf</sup>, p53 and p21<sup>Cip1</sup> in the cells were detected using RT-quantitative PCR and Western blot. **Results** EGCG dose-dependently reversed hypermethylation of *CHD5* gene and reduced the cell viability in both KG-1 and THP-1 cells ( $P < 0.05$ ). EGCG treatment caused obvious cell cycle arrest in G1 phase, significantly increased cell apoptosis, downregulated the expression of DNMT1 and upregulated the expressions of *CHD5*, p19<sup>Arf</sup>, p53 and p21<sup>Cip1</sup> in KG-1 and THP-1 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** EGCG reduces hypermethylation of *CHD5* gene in KG-1 and THP-1 cells by downregulating DNMT1 to restore its expression, which results in upregulated expressions of p19<sup>Arf</sup>, p53 and p21<sup>Cip1</sup> and induces cell apoptosis.

**Keywords:** epigallocatechin gallate; *CHD5* gene; methylation; p19<sup>Arf</sup>-p53-p21<sup>Cip1</sup> signaling pathway; acute myeloid leukemia

急性髓系白血病(AML)是一种异质性克隆血液恶性肿瘤,以髓样祖细胞不受控制的增殖为特征,以及分

化成熟血细胞的能力受到抑制导致造血功能不全<sup>[1-2]</sup>。AML 发生机制与表观遗传学改变有关,研究表明抑癌基因高甲基化与白血病的发生密切相关<sup>[3-4]</sup>。因此,降低抑癌基因高甲基化状态是白血病的一种新的治疗策略。

DNA 甲基转移酶(DNMT)在 DNA 甲基化中起重要作用, DNMT 抑制剂降低 DNA 链的高甲基化,恢复沉默的抑癌基因表达<sup>[5]</sup>。目前常用的抑制剂如 5-aza-2'-脱氧胞苷等缺乏靶点特异性,机体稳定性差且对健康细胞具有高毒性<sup>[6]</sup>。与这些合成抑制剂相比,小分子天然产物具有毒性低,副作用小且经济等特性成为新兴的靶向表观遗传调节剂。

绿茶是一种风靡全球的天然饮品,研究显示绿茶主

收稿日期:2020-03-04

基金项目:国家自然科学基金(31971199);安徽高校自然科学基金项目重点项目(KJ2018A0262);安徽省高等学校省级质量工程教学研究重点项目(2019jyxm025);皖南医学院博士科研启动基金项目(WYRCQD2018001);皖南医学院青年骨干人才项目(wyqnyx201906);安徽省大学生创新训练项目(S201910368088, 201810368063, 201810368064)

Supported by National Natural Science Foundation of China (31971199).

作者简介:吴明彩,博士,副教授,E-mail: williyia@wnmc.edu.cn;蒋明,主治医师,E-mail: 954967767@qq.com。吴明彩、蒋明共同为第一作者

通信作者:章尧,博士,教授,硕士生导师,E-mail: zhangyao@ahedu.gov

要的化学物质成分:表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG),可通过诱导肿瘤细胞凋亡或阻断肿瘤细胞周期,抑制肿瘤细胞增殖<sup>[7-8]</sup>。EGCG与DNMT的催化部位中Glu1265、Arg1310、Arg1311和LYS1482四个氨基酸残基形成氢键,直接抑制DNMT功能,降低抑癌基因的甲基化状态,从而抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[9-10]</sup>。Sheng等<sup>[11]</sup>发现EGCG通过降低DNMT逆转SCUBE2的甲基化,恢复SCUBE2的表达,抑制乳腺癌细胞增殖。因此,EGCG可能对抑癌基因甲基化起靶向调控作用。然而目前EGCG调控AML抑癌基因甲基化恢复其表达研究较少<sup>[12]</sup>,抑癌基因甲基化影响细胞增殖的具体分子机制尚不清楚,EGCG是否可通过调节抑癌基因甲基化影响AML细胞增殖和凋亡也值得进一步探讨。

我们前期研究发现AML患者CHD5基因甲基化率高于正常对照组,且存在CHD5基因甲基化的病例CHD5 mRNA表达水平相应降低<sup>[13]</sup>。CHD5位于染色体1p36位点,被认为是一种潜在的肿瘤抑制基因,可调节p19<sup>Arf</sup>-p53-p21<sup>Cip1</sup>等抑制肿瘤增殖相关信号通路,诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。研究表明在多种人类癌症中存在CHD5启动子高甲基化,导致表观遗传沉默<sup>[15-16]</sup>。本课题组前期证实CHD5基因甲基化的AML患者外周血p19<sup>Arf</sup>,p53,p21<sup>Cip1</sup> mRNA和蛋白均呈现低表达。在本研究的初步实验中,发现KG-1、THP-1细胞的CHD5基因存在高甲基化,但EGCG是否可调节CHD5基因甲基化恢复CHD5表达未见报道,p19<sup>Arf</sup>-p53-p21<sup>Cip1</sup>信号通路介导CHD5基因甲基化影响AML细胞增殖凋亡的作用尚不明确。因此我们拟在前期研究基础上,以KG-1、THP-1细胞为研究对象,明确EGCG是否诱导CHD5基因启动子去甲基化进而影响CHD5表达,通过调控p19<sup>Arf</sup>-p53-p21<sup>Cip1</sup>信号通路从而促进细胞凋亡。本研究旨在分析EGCG是否可通过调节CHD5甲基化影响细胞增殖和凋亡,探讨EGCG在AML中的相关表观遗传机制,为EGCG应用于AML治疗提供进一步的科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

KG-1、THP-1细胞购自中科院典型培养物保藏委员会上海细胞库,培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基中,培养温度为37℃,CO<sub>2</sub>浓度为5%,传代间隔时间为36~48 h,细胞中常规培养,取对数生长期细胞进行实验。

### 1.2 MSP法检测CHD5基因甲基化

1×10<sup>5</sup> KG-1、THP-1细胞接种到12孔板,用25、50、75、100、150 μg/mL EGCG处理48 h,设空白对照组。细胞基因组DNA由TIANamp Genomic DNA kit(TIANGEN)提取,使用NanoDrop微量分光光度计(Thermo)检测

基因组DNA纯度。亚硫酸盐修饰按照EZ DNA Methylation-Gold Kit(ZYMO)操作说明进行,修饰并纯化后的基因组DNA为模板上PCR仪扩增。CHD5甲基化上游引物为5'-CGGGGAGTAGGTTAAGGC-3',下游引物为5'-TACCAACCTTAACCCGTACG-3';CHD5未甲基化上游引物为5'-TGTGGGGAGTAGGTTAAGGT-3',下游引物为5'-ATACCAACCTTAACC CATAAC-3'。PCR体系设置为50 μL;反应条件为:95℃预变性3 min,94℃30 s,54℃30 s,72℃1 min,40个循环,然后72℃7 min。配制1.5%琼脂糖凝胶,上样后放置电泳槽检测。

### 1.3 MTT法检测细胞增殖

制备1×10<sup>5</sup>/mL的KG-1、THP-1细胞悬液,取100 μL/孔接种到96孔板,分别加入25、50、75、100、150 μg/mL EGCG(TCI),并设空白对照组及调零组,每组设5个复孔。于37℃培养箱孵育细胞48 h后,取5 mg/mL的MTT溶液20 μL加入每孔,继续37℃培养4 h。1000 r/min离心10 min,吸弃上清,PBS清洗1次,加入150 μL DMSO,放置摇床上温和震荡10 min,待甲瓚结晶溶解后,上酶标仪(Thermo)于570 nm波长处测定光密度值(A<sub>570 nm</sub>),根据下列公式计算细胞增殖率:细胞增殖率=(实验组A<sub>570 nm</sub>-调零组A<sub>570 nm</sub>)/(空白对照组A<sub>570 nm</sub>-调零组A<sub>570 nm</sub>)×100%。实验重复2次。

### 1.4 流式细胞术检测EGCG处理后KG-1、THP-1细胞周期和细胞凋亡

1×10<sup>5</sup> KG-1、THP-1细胞接种到6孔板,用25、50、75、100、150 μg/mL EGCG处理48 h,1200 r/min离心5 min收集细胞,冰冷PBS洗涤并重悬2次,加入70%乙醇在4℃下冷却过夜,1500 r/min离心5 min,小心吸弃乙醇,预冷PBS清洗2次。细胞重悬在PI染色液(KeyGEN)离心5 min(20 mg/mL PI,0.2 mg/mL RNase),37℃孵育30 min,过筛网后采用流式细胞仪分析细胞周期分布(BD)。按异硫氰酸荧光素(FITC)细胞凋亡检测试剂盒(KeyGEN)操作说明检测各孔凋亡情况,FITC标记的Annexin V和PI室温下固定细胞15 min,上机检测细胞早期和晚期凋亡率。

### 1.5 RT-qPCR检测DNMT1、CHD5、p19<sup>Arf</sup>、p53、p21<sup>Cip1</sup> mRNA表达水平

1×10<sup>5</sup> KG-1、THP-1细胞接种到12孔板,用25、50、75、100、150 μg/mL EGCG处理48 h,设空白对照组。1200 r/min离心5 min收集细胞,冰冷PBS洗涤,应用TRIzol试剂(Takara)提取总RNA,离心样品加入氯仿,转移上清并加入预冷异丙醇。16 000 r/min离心10 min,弃上清加入冰冷乙醇清洗2次,离心后小心吸弃上清,产物以焦碳酸二乙酯水溶解。RNA定量采用NanoDrop微量分光光度计。取1 μg RNA用于合成cDNA,按

PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Takara) 操作说明进行。qPCR 按照 SYBR Green qPCR Master Mix(Thermo)操作说明进行,所用引物见表 1。扩增循环数设为 40 个,变性温度设为 95 °C,时间 30 s,各基因

退火温度见表 2,时间为 30 s,延伸温度和时间分别为 72 °C,30 s。相对 mRNA 表达水平采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算, $\beta$ -actin 作为参照基因。所有实验均重复至少 3 次。

表 1 RT-qPCR 使用的引物  
Tab.1 Primers used for gene expression analysis (RT-qPCR)

Primer	Sequence	Annealing temp (°C)
<i>DNMT1</i> -F	5'-AAGAATGGTGTGTCTACCGAC-3'	55
<i>DNMT1</i> -R	5'-CATCCAGGTTGCTCCCCTGGATGG-3'	55
<i>CHD5</i> -F	5'-TCCGCAAGCAGGTCAACTACA-3'	56
<i>CHD5</i> -R	5'-CTCATCTCAGAGCCAATGGAA-3'	56
<i>p19<sup>Arf</sup></i> -F	5'-CCATGTGGACCTGTCCTACTGT-3'	60
<i>p19<sup>Arf</sup></i> -R	5'-AAGATGTAGAGCGGGCCTTT-3'	60
<i>p53</i> -F	5'-CTGGGGAGTCTTGAGGGACC-3'	59
<i>p53</i> -R	5'-CAGGTTGTCTAAATTCCTAG-3'	59
<i>p21<sup>Cip1</sup></i> -F	5'-CTGTGGAGCCGGAGCT-3'	58
<i>p21<sup>Cip1</sup></i> -R	5'-TGGTGTCTCGGTGACAAAGT-3'	58
$\beta$ -actin-F	5'-TGGCACCCAGCACAAATGAA-3'	60
$\beta$ -actin-R	5'-CTAAGTCATAGCCGCTAGAAGCA-3'	60

1.6 Western blot 检测 DNMT1、CHD5、p19<sup>Arf</sup>、p53、p21<sup>Cip1</sup> 蛋白表达

2×10<sup>5</sup> KG-1、THP-1 细胞接种到 6 孔板,用 25、50、75、100、150 μg/mL EGCG 处理 24 h,并设空白对照组。收集细胞 PBS 清洗 2 次后采用蛋白提取试剂盒(Sangon)提取蛋白,蛋白浓度采用 BCA 定量试剂盒测定(Sangon)。取 50 μg 蛋白质经 SDS-PAGE 凝胶电泳,随后转移至 PVDF 膜(Santa Cruz),5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入 DNMT1、CHD5、p19<sup>Arf</sup>、p53、p21<sup>Cip1</sup> 一抗(Santa Cruz)于 4 °C 温度条件下振荡孵育过夜,膜经清洗 3 次后加入二抗(Santa Cruz,)室温孵育 2 h,洗膜 3 次采用 ECL 发光试剂盒显色(Sangon),曝光 X 胶片,显影并定影,扫描胶片,光灰度值采用 Image J 软件分析。

1.7 统计分析

数值资料以均数±标准差表示,采用 SPSS 软件进行单因素方差分析,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KG-1、THP-1 细胞 CHD5 启动子甲基化状态

MSP 检测结果发现在 KG-1、THP-1 细胞中,CHD5 基因启动子表现出明显的甲基化(图 1A),以正常人血液 DNA 作为非甲基化阳性对照,通用甲基化 DNA 作为甲基化阳性对照,以 H<sub>2</sub>O 为阴性对照。

2.2 EGCG 逆转了 KG-1、THP-1 细胞 CHD5 基因的高甲基化状态

为明确 EGCG 是否对 KG-1、THP-1 细胞的 CHD5 基因产生去甲基化作用,我们使用 25、50、75、100、150 μg/mL EGCG 处理细胞。结果发现(图 1B、C),与未处理 EGCG 对照组比较,CHD5 基因的甲基化特异性条带逐渐减弱,呈现剂量依赖性;而非甲基化特异性条带则呈现剂量性增强趋势。

2.3 EGCG 对 KG-1、THP-1 细胞的增殖抑制作用

本实验使用 25、50、75、100、150 μg/mL EGCG 处理 KG-1、THP-1 细胞,培育 48 h 后,酶标仪检测 EGCG 对 KG-1、THP-1 细胞是否有增殖抑制作用。结果表明(图 2),25、50、75、100、150 μg/mL EGCG 浓度组与未处理的对照组比较,KG-1、THP-1 细胞增殖率均呈现剂量依赖性显著降低(P<0.05)。

2.4 EGCG 对 KG-1、THP-1 细胞周期和凋亡的影响

不同浓度 EGCG 处理 KG-1、THP-1 细胞 48 h 后,加入 PI 单染或 Annexin V 和 PI 双染检测细胞周期分布的变化及对细胞凋亡率的改变。如图 3 所示,EGCG 处理导致细胞阻滞在 G1 期,S 期或 G2 期细胞比率则呈现下降趋势。Annexin V 和 PI 双染结果显示(图 4):与对照组比较,EGCG 诱导 KG-1、THP-1 细胞凋亡增加(P<0.05),且表现出剂量依赖性。

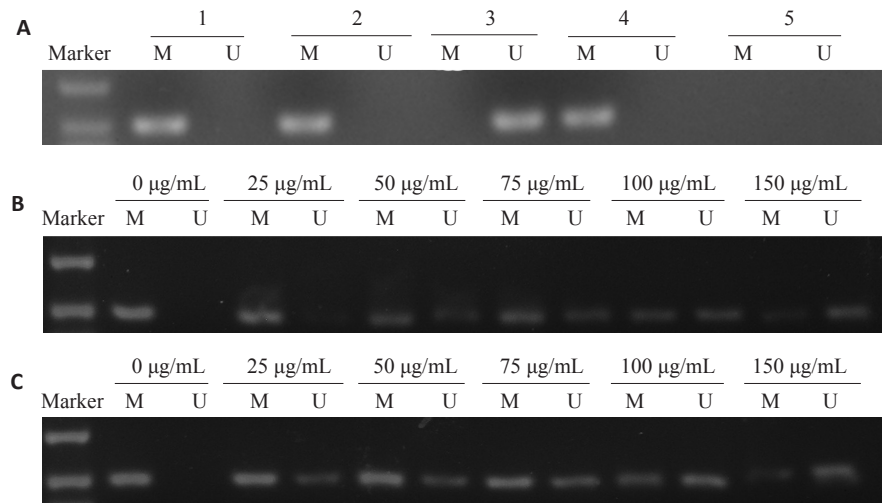


图1 KG-1、THP-1细胞CHD5基因的甲基化状态及EGCG的去甲基化作用

Fig.1 Methylation status of *CHD5* gene in KG-1 and THP-1 cells and *CHD5* gene demethylation induced by EGCG. M: Methylation-specific PCR. U: Unmethylation-specific PCR. A: Methylation status of *CHD5* gene in KG-1 and THP-1 cells. Line 1: Methylation status of *CHD5* gene in KG-1 cells. Line 2: Methylation status of *CHD5* gene in THP-1 cells. Line 3: Unmethylation positive control. Line 4: Methylation positive control. Line 5: Negative control; B: Demethylation in KG-1 cells; C: Demethylation in THP-1 cells.

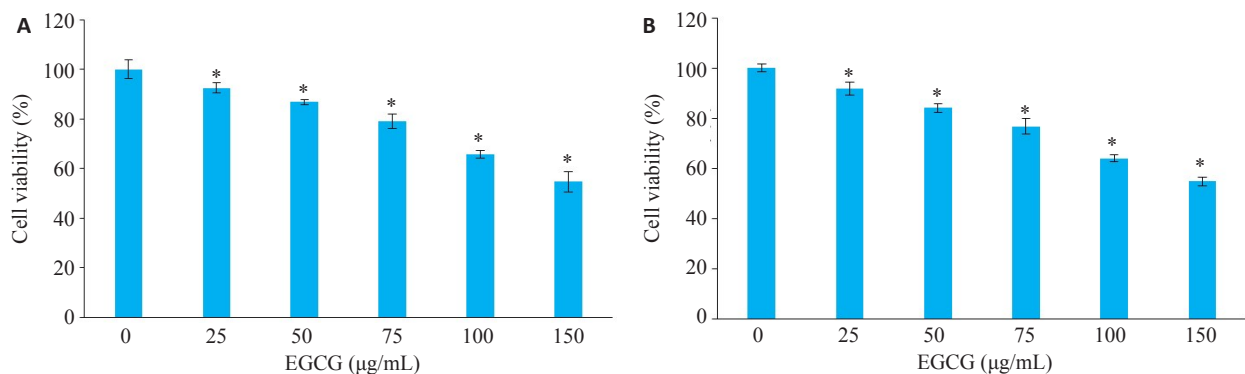


图2 EGCG对KG-1、THP-1细胞的增殖抑制作用

Fig.2 Inhibition of EGCG on proliferation of KG-1 (A) and THP-1 (B) cells ( $n=5$ ). \* $P<0.05$  vs control group.

## 2.5 EGCG对KG-1、THP-1细胞CHD5、DNMT、p19<sup>Arf</sup>、p53、p21<sup>Cip1</sup> mRNA的表达影响

如图5所示,EGCG处理KG-1、THP-1细胞后,*DNMT1* mRNA表达程度呈现剂量依赖性下降趋势,25、50、75、100、150 µg/mL EGCG浓度组*DNMT1* mRNA表达量与EGCG未处理的细胞相比有显著差异( $P<0.05$ );*CHD5*、*p19<sup>Arf</sup>*、*p53*、*p21<sup>Cip1</sup>*的mRNA水平的表达水平增加,具有剂量依赖型,与EGCG未处理的细胞相比,*CHD5*、*p19<sup>Arf</sup>*、*p53*、*p21<sup>Cip1</sup>*的mRNA表达量呈现出统计学差异( $P<0.05$ )。

## 2.6 EGCG对KG-1、THP-1细胞CHD5、DNMT、p19<sup>Arf</sup>、p53、p21<sup>Cip1</sup>蛋白表达的影响

不同浓度EGCG(25、50、75、100、150 µg/mL)处理KG-1、THP-1细胞24 h后,检测蛋白表达水平,结果显示(图6)随着EGCG浓度升高,*DNMT1*蛋白表达水平

呈现降低趋势;*CHD5*、*p19<sup>Arf</sup>*、*p53*、*p21<sup>Cip1</sup>*蛋白表达水平则呈现剂量依赖性增加,与未处理对照组比较,EGCG浓度组出现显著差异( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

近年来,大量研究表明表观遗传修饰在癌症生理学和病因学中起着至关重要的作用<sup>[17-18]</sup>。表观遗传修饰指独立于基因序列改变调节功能基因的表达,包括DNA甲基化、RNA和组蛋白的修饰。其中,DNA甲基化最为常见,现已发现多种抑癌基因的异常DNA甲基导致基因沉默是癌症的形成和进展的重要因素之一。如何等<sup>[19]</sup>在肝癌中发现*SOCS3*启动子区异常甲基化修饰导致*SOCS3*转录抑制而造成表达水平下降,进一步影响细胞凋亡。DNA甲基化改变是可逆的,可通过去甲基化恢复沉默的抑癌基因表达,一些合成表观遗传修饰剂

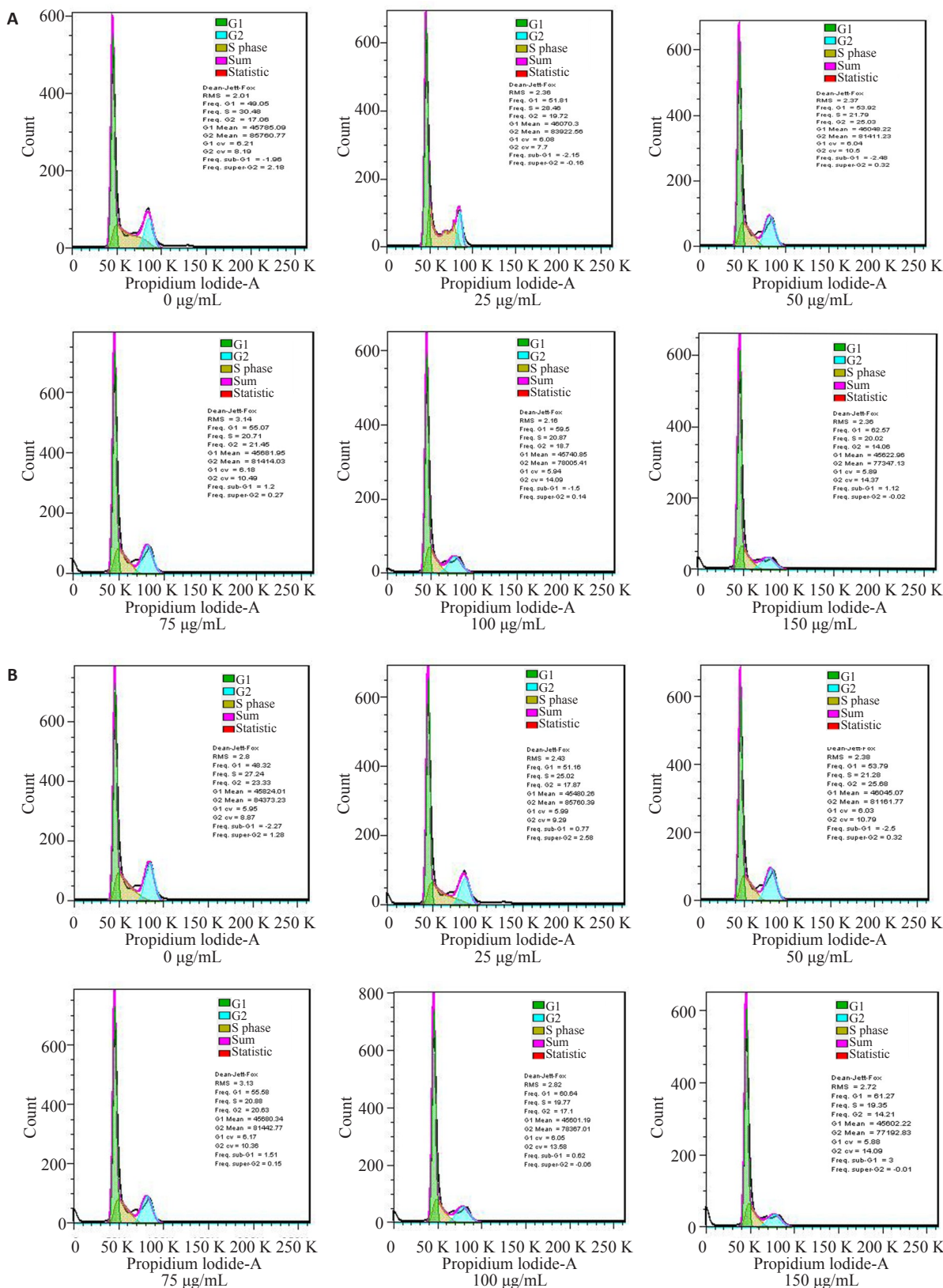


图3 EGCG对KG-1、THP-1细胞周期的作用  
Fig.3 Effect of EGCG on cell cycle of KG-1 (A) and THP-1 (B) cells.

已经通过癌症治疗的临床试验。如DNMT抑制剂氮杂替丁和癸二胺(胞苷类似物)已被美国食品药品监督管理局批准用于慢性粒细胞白血病和骨髓增生异常综合征治疗<sup>[20]</sup>。然而,合成DNMT抑制剂缺乏靶点特异性,机

体稳定性差以及对健康细胞具有较高的毒性。因此,具有抗肿瘤作用的天然小分子产物引起广泛的研究兴趣。

目前已有多种天然小分子产物被证实具有表观遗传调节因子作用,可用于癌症的预防和治疗,如芹菜素、

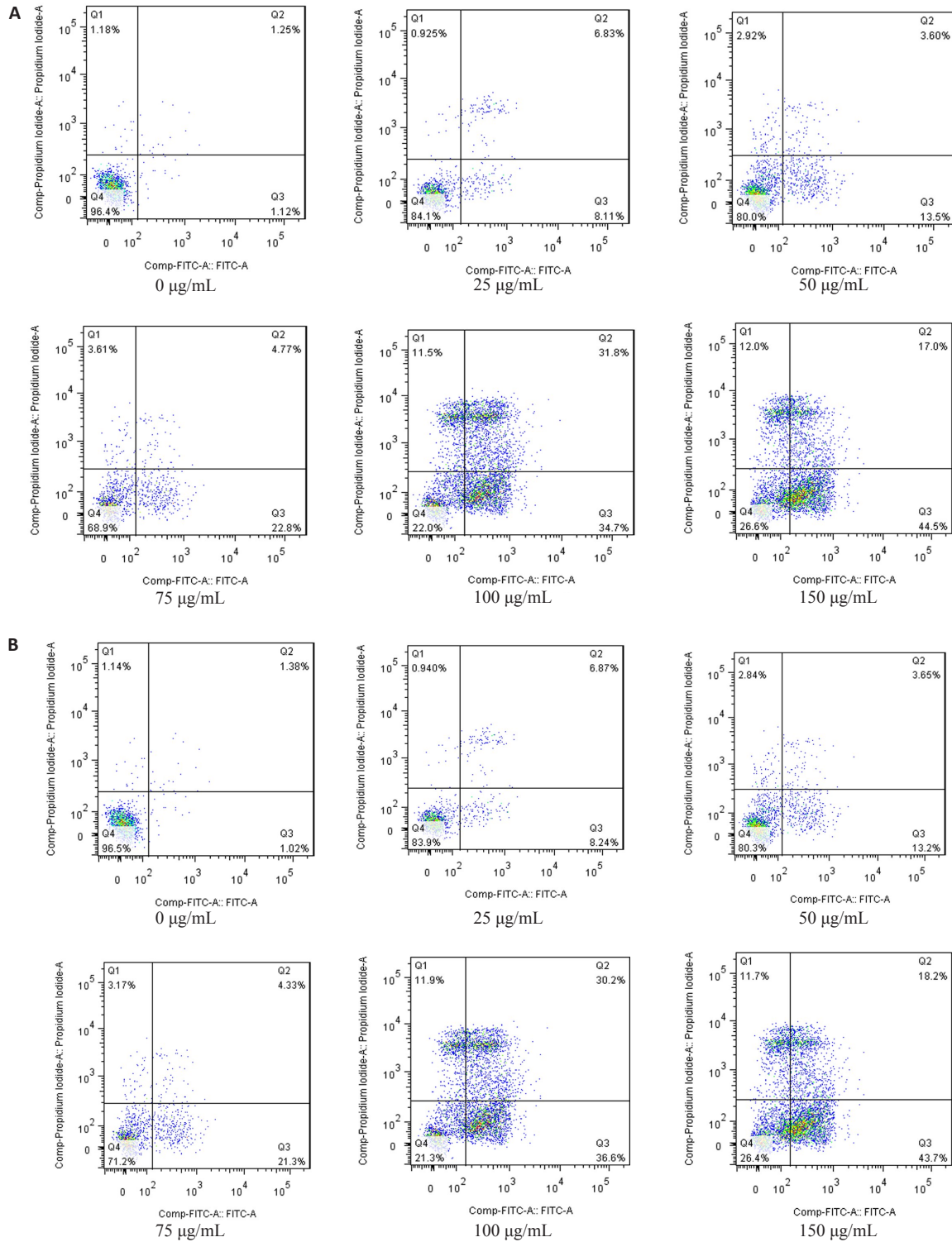


图4 EGCG对KG-1、THP-1细胞凋亡的作用  
Fig.4 Effect of EGCG on apoptosis of KG-1 (A) and THP-1 (B) cells.

叶酸、染料木素、番茄红素、杨梅素、柚皮素、鞣皮素、原儿茶酸、槲皮素、迷迭香酸、芥子酸和萝卜硫素等,具备口服给药,副作用少,且药效维持时间长等特点<sup>[21]</sup>。其中绿茶的主要成分EGCG被证实通过抑制DNMT功能,减少多种抑癌基因甲基化。如Morris等<sup>[22]</sup>用EGCG处理结肠癌细胞后降低DNMT表达活性,降低了*RXRα*

启动子甲基化并恢复*RXRα*基因的表达;Sheng等<sup>[11]</sup>将EGCG加入MCF-7和MDA-MB-231细胞孵育后检测DNMT活性,与EGCG未处理组活性比较显著降低;Assumpção等<sup>[23]</sup>发现EGCG与DNMT1的MTase结构域相互作用,使BT-549细胞中*RASSF1A*的启动子区脱甲基化。前期研究结果表明AML患者外周血*CHD5*甲

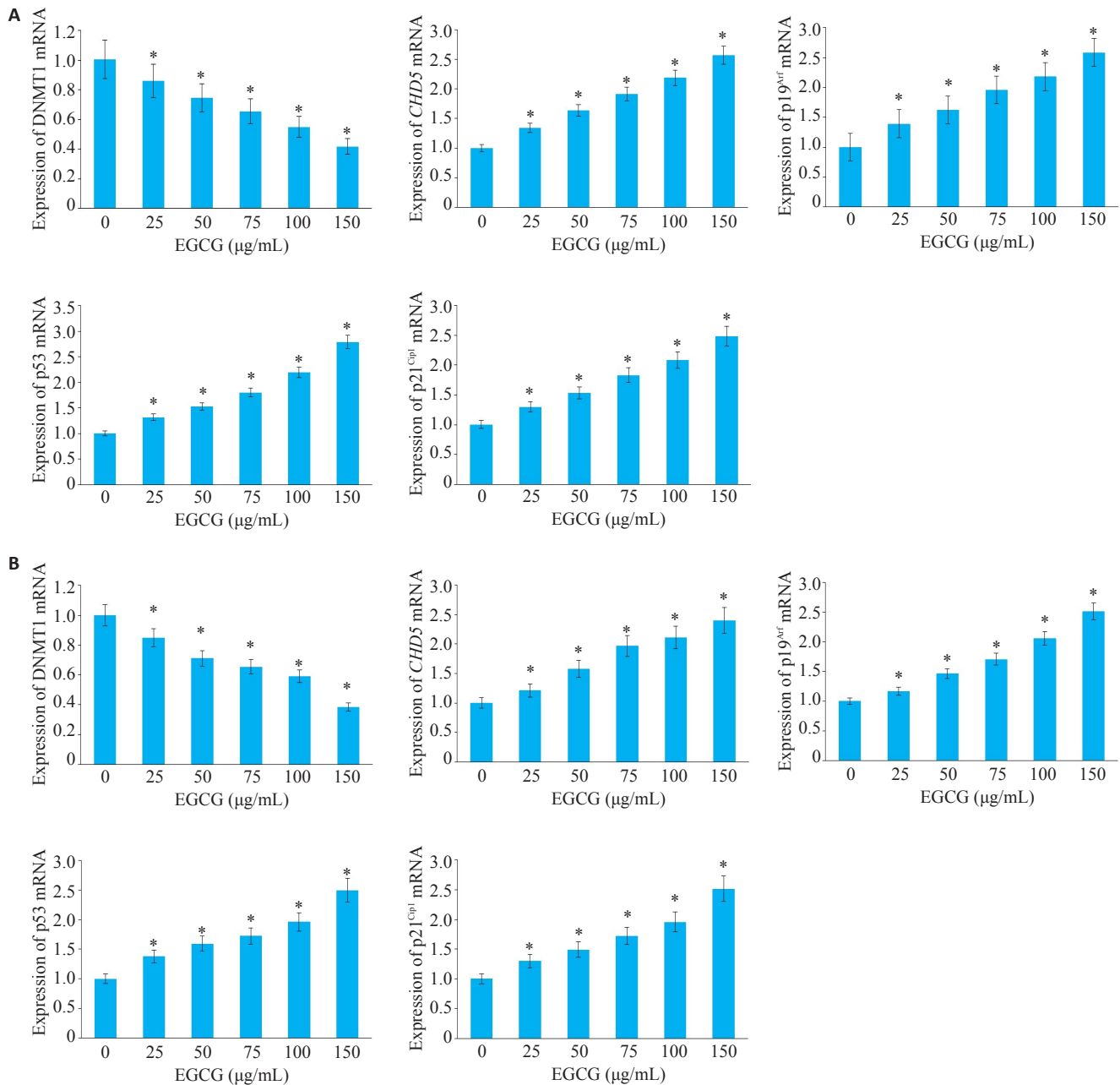


图5 EGCG对KG-1、THP-1细胞*DNMT1*、*CHD5*、*p19<sup>Arf</sup>*、*p53*、*p21<sup>Cip1</sup>* mRNA表达的作用

Fig.5 mRNA expressions of *DNMT1*, *CHD5*, *p19<sup>Arf</sup>*, *p53* and *p21<sup>Cip1</sup>* in KG-1 (A) and THP-1 (B) cells treated with EGCG. \**P*<0.05 vs control group (*n*=3).

基化率较高, *CHD5* mRNA 表达水平下调<sup>[12]</sup>, 因此推测 *CHD5* 甲基化可能导致了 *CHD5* 表达的沉默。本研究采用 EGCG 处理人急性髓系白血病细胞系, 探讨 EGCG 调节 *CHD5* 基因甲基化的表观遗传作用。MSP 实验结果表明 EGCG 可降低 KG-1、THP-1 细胞 *CHD5* 基因启动子甲基化, 并呈现出剂量依赖性, 实时定量 RT-PCR 结果也显示 KG-1、THP-1 细胞 *CHD5* mRNA 呈现低表达, EGCG 处理后可恢复 *CHD5* mRNA 表达, 降低 DNMT1 mRNA 的表达, 提示 EGCG 可降低 DNMT 逆转 *CHD5* 基因高甲基化, 恢复沉默 *CHD5* 基因的表达。

除了抑制 DNMT 活性外, EGCG 还被证实具有诱

导凋亡、抑制表皮生长因子受体介导的信号通路、破坏血管生成、抑制端粒酶和 DNMT 以及减少氧化应激水平等作用<sup>[24-26]</sup>。本研究采用 MTT 法证实 EGCG 对 KG-1、THP-1 细胞有明显的增殖抑制作用, 尤其在 75、100、150 μg/mL 浓度时, 细胞活力受到明显抑制。Zhang 等<sup>[27]</sup>发现 EGCG 可诱导肺癌 A549 细胞周期停滞于 G1 期, G2 和 S 期细胞比率明显低于对照组; Zan 等<sup>[28]</sup>也证实 EGCG 对乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖活力抑制作用有明显的时间依赖性和剂量依赖性, 流式细胞术分析表明 EGCG 在 G2/M 期诱导细胞凋亡, 破坏细胞周期进程。本研究也发现, EGCG 可阻滞 KG-1、THP-1 细胞生长周

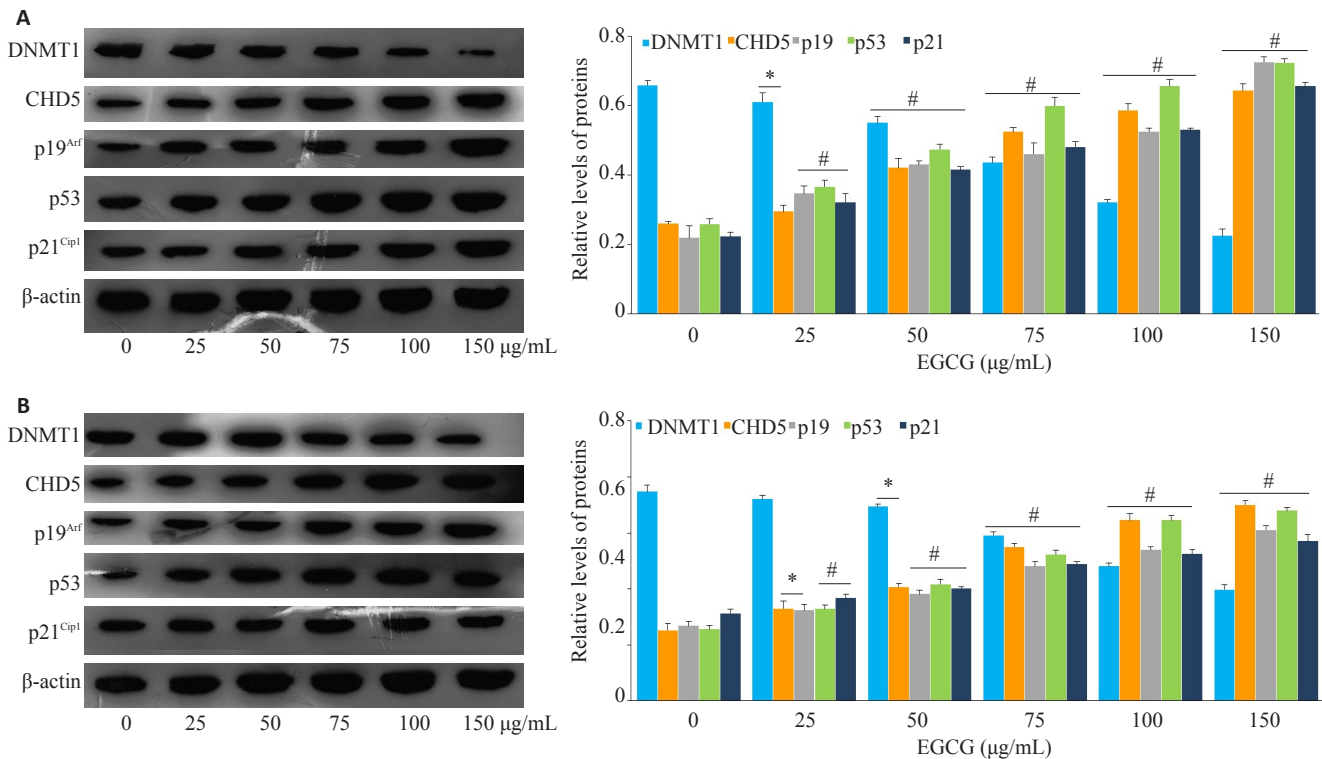


图6 EGCG对KG-1、THP-1细胞DNMT1,CHD5,p19<sup>Arf</sup>,p53,p21<sup>Cip1</sup>蛋白表达的作用

Fig.6 Protein expressions of DNMT1, CHD5, p19<sup>Arf</sup>, p53 and p21<sup>Cip1</sup> were detected in KG-1 (A) and THP-1 (B) cells treated with EGCG. \* $P < 0.05$  vs control group ( $n=3$ ), # $P < 0.01$  vs control group ( $n=3$ ).

期于G1期,剂量依赖性地促进细胞早期凋亡。CHD5,编码一个染色质重塑蛋白,已被报道为多种人类癌症中一个新的肿瘤抑制基因,如肾细胞癌、胃癌和乳腺癌等<sup>[29-32]</sup>。研究表明,CHD5促进细胞凋亡可通过调控p19<sup>Arf</sup>-p53-p21<sup>Cip1</sup>信号通路对细胞增殖起抑制作用。前期研究结果也表明AML患者体内p19<sup>Arf</sup>,p53,p21<sup>Cip1</sup>mRNA和蛋白水平较对照组降低,进一步检测发现,CHD5基因启动子在AML患者与未甲基化AML患者和对照组比较甲基化率较高,存在CHD5基因甲基化的AML患者p19<sup>Arf</sup>,p53,p21<sup>Cip1</sup>mRNA和蛋白均低表达。本研究在前期基础上探寻EGCG调控CHD5甲基化及促进细胞凋亡的分子机制,将不同浓度EGCG作用于KG-1、THP-1细胞,发现EGCG可对CHD5基因产生去甲基化作用,恢复CHD5 mRNA和蛋白表达,同时也增加p19<sup>Arf</sup>,p53,p21<sup>Cip1</sup>mRNA和蛋白表达,促进细胞凋亡,进一步证实EGCG可作为治疗AML的靶向表观遗传药物。

本研究首次报道EGCG可以通过降低DNMT的表达逆转KG-1、THP-1细胞DNA甲基化,重新恢复CHD5基因的表达,进而激活p19<sup>Arf</sup>-p53-p21<sup>Cip1</sup>信号通路,促进白血病细胞凋亡。我们的研究表明对EGCG可作为靶向功能基因的表观遗传修饰治疗药物,为EGCG治疗急性髓系白血病的临床应用提供参考。然而,EGCG作为表观遗传修饰药物的具体调节分子机制以及相应的体

外和临床试验需进一步探讨。综上所述,本研究揭示了EGCG对CHD5基因产生去甲基化作用,通过调控p19<sup>Arf</sup>-p53-p21<sup>Cip1</sup>信号通路促进细胞凋亡,为EGCG作为新型表观遗传药物提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2016, 374(23): 2209-21.
- [2] Chen HL, Liu T, Liu J, et al. Circ-ANAPC7 is upregulated in acute myeloid leukemia and appears to target the MiR-181 family[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(5): 1998-2007.
- [3] Younesian S, Shahkarami S, Ghaffari P, et al. DNA hypermethylation of tumor suppressor genes RASSF6 and RASSF10 as independent prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukemia[J]. Leuk Res, 2017, 61: 33-8.
- [4] Zhou JD, Zhang TJ, Li XX, et al. Methylation-independent CHFR expression is a potential biomarker affecting prognosis in acute myeloid leukemia[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(6): 4707-14.
- [5] Pathania R, Ramachandran S, Mariappan G, et al. Combined inhibition of DNMT and HDAC blocks the tumorigenicity of cancer stem-like cells and attenuates mammary tumor growth[J]. Cancer Res, 2016, 76(11): 3224-35.
- [6] Tyagi T, Treas JN, Mahalingaiah PK, et al. Potentiation of growth inhibition and epigenetic modulation by combination of green tea polyphenol and 5-aza-2'deoxyctidine in human breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2015, 149(3): 655-68.



- [7] Braicu C, Gherman CD, Irimie A, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits cell proliferation and migratory behaviour of triple negative breast cancer cells[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, 13(1): 632-7.
- [8] 李彬彬, 万郑, 孔霞, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯通过调控P53/miR-34a抑制鼻咽癌细胞的增殖[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(9): 1557-62.
- [9] Gan RY, Li HB, Sui ZQ, et al. Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(6): 924-41.
- [10] Mereles D, Hunstein W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for Clinical Trials: More pitfalls than promises[J]? *Int J Mol Sci*, 2011, 12(9): 5592-603.
- [11] Sheng J, Shi WL, Guo H, et al. The inhibitory effect of (-)-Epigallocatechin-3-gallate on breast cancer progression via reducing *SCUBE2* methylation and DNMT activity[J]. *Molecules*, 2019, 24(16): E2899.
- [12] Wu DS, Shen JZ, Yu AF, et al. Epigallocatechin-3-gallate and trichostatin synergistically inhibit human lymphoma cell proliferation through epigenetic modification of p16INK4a [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(6): 2969-75.
- [13] 吴明彩, 蒋明, 董婷, 等. *CHD5*基因启动子甲基化调控p19<sup>ink4a</sup>/p53/p21<sup>cip1</sup>信号通路促进急性髓系白血病发病的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(4): 1001-7.
- [14] Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, et al. *CHD5* is a tumor suppressor at human 1p36[J]. *Cell*, 2007, 128(3): 459-75.
- [15] Mulero-Navarro S, Esteller M. Chromatin remodeling factor *CHD5* is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer[J]. *Epigenetics*, 2008, 3(4): 210-5.
- [16] Ma ZL, Song JL, Liu SM, et al. Decreased expression of the *CHD5* gene and its clinicopathological significance in breast cancer: Correlation with aberrant DNA methylation[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 4021-6.
- [17] Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, et al. Cancer epigenetics: Moving forward[J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(6): e1007362.
- [18] Fukuoka K, Mamatjan Y, Tatevossian R, et al. Clinical impact of combined epigenetic and molecular analysis of pediatric low grade gliomas[J]. *Neuro Oncol*, 2020: noaa077.
- [19] 何靖场, 刘秋英, 魏玲, 等. BORIS通过表观修饰对人肝癌细胞SOCS3表达的调控[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2018, 49(1): 1-7.
- [20] Navada SC, Steinmann J, Lubbert M, et al. Clinical development of demethylating agents in hematology[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(1): 40-6.
- [21] Schnekenburger M, Diederich M. Epigenetics offer new horizons for colorectal cancer prevention[J]. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 2012, 8(1): 66-81.
- [22] Morris J, Moseley VR, Cabang AB, et al. Reduction in promotor methylation utilizing EGCG (epigallocatechin-3-gallate) restores RXR $\alpha$  expression in human colon cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 35313-26.
- [23] Assumpção JHM, Takeda AAS, Sforcin JM, et al. Effects of propolis and phenolic acids on triple-negative breast cancer cell lines: Potential involvement of epigenetic mechanisms [J]. *Molecules*, 2020, 25(6): 1289.
- [24] Yokoyama M, Noguchi M, Nakao Y, et al. The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(1): 197-204.
- [25] Wang J, Man GCW, Chan TH, et al. A prodrug of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (Pro-EGCG) serves as a novel angiogenesis inhibitor in endometrial cancer[J]. *Cancer Lett*, 2018, 412: 10-20.
- [26] Crous-Masó J, Palomeras S, Relat J, et al. (-)-Epigallocatechin 3-gallate synthetic analogues inhibit fatty acid synthase and show anticancer activity in triple negative breast cancer [J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1160.
- [27] Zhang YW, Wang X, Han L, et al. Green tea polyphenol EGCG reverse cisplatin resistance of A549/DDP cell line through candidate genes demethylation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 69: 285-90.
- [28] Zan L, Chen Q, Zhang L, et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses growth and tumorigenicity in breast cancer cells by downregulation of miR-25[J]. *Bioengineered*, 2019, 10(1): 374-82.
- [29] Du ZF, Li LL, Huang X, et al. The epigenetic modifier *CHD5* functions as a novel tumor suppressor for renal cell carcinoma and is predominantly inactivated by promoter CpG methylation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 21618-30.
- [30] Xu GR, Zhu HX, Zhang MH, et al. Histone deacetylase 3 is associated with gastric cancer cell growth via the miR-454-mediated targeting of *CHD5*[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1): 155-63.
- [31] Luo XR, Xiong X, Shao Q, et al. The tumor suppressor interferon regulatory factor 8 inhibits  $\beta$ -catenin signaling in breast cancers, but is frequently silenced by promoter methylation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 48875-88.
- [32] Hashimoto T, Kurokawa Y, Wada N, et al. Clinical significance of chromatin remodeling factor *CHD5* expression in gastric cancer[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 1066-73.

(编辑:余诗诗)