

莫晶,杨红兰,刘含,等. Tet1 蛋白对 HEK293T 细胞增殖、周期及凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 69–75.
Mo J, Yang HL, Liu H, et al. Effect of Tet1 protein on HEK293T cell proliferation, cell cycle and apoptosis [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 69–75.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.06.010

Tet1 蛋白对 HEK293T 细胞增殖、周期及凋亡的影响

莫晶^{1,2}, 杨红兰^{2,3}, 刘含^{1,2}, 金皎^{2,3}, 范安然^{1,2}, 张鹏^{1,2},
周艳华^{1,2*}, 舒莉萍^{1,2*}

(1. 贵州医科大学细胞工程生物医药技术国家地方联合工程实验室, 贵州省再生医学重点实验室, 贵州医科大学免疫教研室, 贵阳 550004; 2. 中国医学科学院成体干细胞转化研究重点实验室, 组织工程与干细胞实验中心, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学附属医院儿科, 贵阳 550004)

【摘要】目的 构建可诱导 Tet1CD 过表达的稳转细胞系, 探究 Tet1 蛋白对细胞增殖、周期及凋亡的影响。**方法** 构建重组质粒 pTRE-Tight_Tet1CD_IRES_RFP_RPBSA_M2rtTA_Puro, 然后与表达转座酶的“睡美人”质粒通过脂质体法共同转染到 HEK 293T 细胞, 通过嘌呤霉素筛选和多西环素诱导构建诱导表达型的 Tet1CD 稳转细胞系 293T(Tet1CD)。通过 Western blot 检测 Tet1 蛋白的表达; 通过 DNA dot blot 检测细胞基因组中 5hmC 的含量, 通过流式细胞术检测 Tet1CD 蛋白对细胞周期和凋亡的影响; 通过细胞计数检测 Tet1CD 蛋白对细胞增殖的影响。**结果** 成功建立了可诱导 Tet1CD 过表达的 HEK293T 细胞系 293T(Tet1CD); Western blot 结果显示诱导后细胞内 Tet1CD 蛋白表达上升; DNA dot blot 结果显示过表达 Tet1CD 蛋白细胞内 5hmC 含量升高; 流式细胞术结果显示, Tet1CD 过表达促进了细胞凋亡 ($P<0.05$) 及增加 G2 时期细胞比例 ($P<0.05$); 细胞计数结果显示, Tet1CD 过表达抑制细胞增殖 ($P<0.0001$)。**结论** Tet1 蛋白可能通过促进细胞凋亡及阻滞细胞周期最终抑制细胞增殖。**【关键词】** 表观遗传; Tet 蛋白; 细胞周期; 细胞凋亡; 细胞增殖
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 06-0069-06

Effect of Tet1 protein on HEK293T cell proliferation, cell cycle and apoptosis

MO Jing^{1,2}, YANG Honglan^{2,3}, LIU Han^{1,2}, Jin Jiao^{2,3}, FAN Anran^{1,2},
ZHANG Peng^{1,2}, ZHOU Yanhua^{1,2*}, SHU Liping^{1,2*}
(1. National&Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Guizhou Province Key Laboratory of Regenerative Medicine, Department of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China.
2. Key Laboratory of Adult Stem Cell Translational Research, Center for Tissue Engineering and Stem Cell research, Guiyang 550004. 3. Department of pediatrics, the affiliated hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

【Abstract】Objective To explore the effects of Tet1 protein on cell proliferation, the cell cycle and apoptosis, an inducible Tet1CD overexpression cell line was established. **Methods** A recombinant pTRE-Tight_Tet1CD_IRES_RFP_RPBSA_M2rtTA_Puro plasmid was constructed, then the recombinant plasmid and the “Sleeping Beauty” plasmid

[基金项目] 贵州医科大学博士启动基金(院博合 J 字[2018]016 号); 国家自然科学基金(31860325); 贵州省科技厅科技平台及人才团队计划([2017]5611, [2019]5406)。
[作者简介] 莫晶(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 表观遗传学与免疫学。E-mail: jing_bc@163.com
[通信作者] 舒莉萍(1974—), 女, 教授, 研究方向: 造血发育与疾病。E-mail: gyslp456@gmc.edu.cn
周艳华(1982—), 男, 副教授, 研究方向: 表观遗传学与免疫学。E-mail: zhouyanhua@gmc.edu.cn * 共同通信作者

expressing a transposase were cotransfected into HEK293T cells using lipofectamine. The inducible stable 293T (Tet1CD) cell line was selected using puromycin. Tet1 protein expression was detected via western blot, and the 5hmC content in the genome was detected using DNA Dot Blot. The effect of Tet1CD protein on the cell cycle and apoptosis was detected using flow cytometry, and the effect of Tet1CD protein on cell proliferation was detected by cell counting. **Results** The HEK293T (Tet1CD) cell line with inducible Tet1CD expression was successfully established. Western blot and DNA Dot Blot assays showed increased amounts of Tet1CD proteins and increased 5hmC content in inducible cells. Flow cytometry result demonstrated that Tet1CD expression promoted apoptosis ($P<0.05$) and increased the proportion of cells in G2 phase ($P<0.05$). Cell counts showed that Tet1CD overexpression inhibited cell proliferation ($P<0.0001$). **Conclusions** Tet1 protein may inhibit cell proliferation by promoting apoptosis and delaying the cell cycle.

[Keywords] epigenetic; Tet protein; cell cycle; cell apoptosis; cell proliferation

肿瘤发生和发展伴随着基因组甲基化水平的巨大改变^[1],具体表现为肿瘤基因组整体低甲基化,而肿瘤抑制因子往往存在局部高甲基化^[2]。哺乳动物细胞中基因组的甲基化主要由 DNA 甲基转移酶建立并维持的^[3],而基因组中的去甲基化主要认为是由于细胞内 DNA 复制之后甲基转移酶功能失效造成的^[4]。除了 DNA 复制导致的 DNA 去甲基化,据报道,10 - 11 易位蛋白 (ten-eleven translocation, Tet) 也参与 DNA 去甲基化,调节细胞内的 DNA 甲基化^[5]。

哺乳动物的 Tet 蛋白家族包括三个成员: Tet1、Tet2、Tet3。它们都具有羧基末端的催化结构域 (catalytic domain, CD),即富含半胱氨酸区域 (Cys-rich) 和双链 β 螺旋区域 (DSBH),功能上都具有催化 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 转变为 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC) 氧化活性^[6]。有研究报道, Tet 蛋白在肿瘤发生和发展过程中发挥重要作用。Tet 蛋白与血液恶性肿瘤^[7-8] 以及实体瘤 (包括结肠癌^[9]、乳腺癌^[10] 和前列腺癌^[11]) 相关,编码 Tet 蛋白的基因突变失去催化 5mC 转变为 5hmC 的去甲基化能力导致肿瘤发生^[12]。因此,通过调节 Tet 蛋白氧化活性来改变基因甲基化水平,可能是肿瘤的治疗靶点之一。另外, Tet 蛋白在干细胞的多能性获得^[13-14] 和丧失^[15] 过程中发挥重要作用。本实验旨在以 HEK293T 为模型,构建诱导 Tet1CD 过表达的稳转细胞系,初步探索 Tet1 蛋白对细胞增殖、凋亡及周期的影响,为进一步研究 Tet 蛋白功能及相关机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

质粒 pTRE-Tight_IRES_RFP_RPBSA_M2rtTA_Puro 和 pCAG_EGFP_Tet1CD 信息参见文献^[16],

pCMV (CAT) T7-SB100 哺乳转座质粒 (睡美人) (森灵生物)。

1.2 主要试剂与仪器

割胶回收试剂盒、限制性内切酶 Not I、SfaA I、T4 DNA 连接酶 (ThermoFisher); DH5 α 感受态及质粒提取试剂盒 (天根); 转染试剂 LipofectamineTM 3000 (Invitrogen); Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco); 细胞培养基 DMEM、青链霉素混合液、FBS (BI); 多西环素 (Doxycycline, Dox)、嘌呤霉素 (Puromycin, Puro)、亚甲蓝、 β -actin (Sigma); 酚氯仿抽提 DNA 试剂、蛋白裂解液 (索莱宝); TGX Stain-FreeTM FASTCASTTM Acrylamide Kit、Bio-Dot apparatus 微滤装置 (Biorad); 大鼠源 anti-Tet1 (mAb)、兔源 anti-5hmC (pAb) (Activemotif); HRP-羊抗兔二抗、HRP-羊抗大鼠二抗 (ThermoFisher); 凋亡检测试剂盒和周期检测试剂 (美国 BD); 流式细胞仪 (ACEA novocyte); 人胚胎肾细胞系 (HEK293T) (中乔新舟)。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒构建及酶切验证

通过限制性内切酶 Not I 和 SfaA I 37 $^{\circ}$ C 过夜双酶切 pTRE-Tight_IRES_RFP_RPBSA_M2rtTA_Puro 和 pCAG_EGFP_Tet1CD 质粒。经琼脂糖凝胶电泳后割胶回收目的片段。连接后经 DH5 α 感受态转化,在氨苄霉素抗性的琼脂平板上涂板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单克隆菌落,扩大培养后提取重组质粒。

1.3.2 细胞转染与筛选

(1) 细胞的准备

人胚胎肾细胞系 (HEK293T) 按每孔 5×10^5 接种至六孔板内,过夜培养至细胞融合度达 60% ~ 80% 时进行脂质体转染。

(2) 质粒转染:

A, 稀释脂质体: 125 μ L opti-MEM + 5 μ L lipofectation; B, 稀释 DNA: 125 mL opti-MEM + 2.5 μ g DNA (重组质粒和“睡美人”质粒各 1.25 μ g) + 5 μ L P3000; 各自混匀后将稀释后的脂质体加入 DNA 管中, 吹打混匀后室温下放置 15 min。将脂质体-DNA 混合物逐滴滴加至六孔板内。培养于含 10% FBS 和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱中常规培养。

(3) 细胞筛选

双质粒共转染后 24 h, 予细胞换液处理, 持续用含 2 μ g/mL 嘌呤霉素的培养基对转染的细胞进行压迫筛选, 能正常生长的证明是转染成功的细胞。

1.3.3 细胞鉴定

(1) Western blot 检测 Tet1CD 蛋白表达

RIPA 裂解液 (索莱宝) 提取构建好的稳转细胞的细胞总蛋白, 分为 Dox 诱导组和未诱导组 (对照组), 100 $^{\circ}$ C 变性。TGX Stain-Free™ FASTCAST™ Acrylamide Kit 配制 10% 电泳胶对各组蛋白进行电泳, 曝光观察各泳道内总蛋白情况后转膜至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 3% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h, 加入 1:5000 Tet1 一抗室温下孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。1:5000 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗大鼠二抗孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。ECL 化学发光液显影。

(2) DNA blot 检测 5hmC 信号

酚氯仿法提取 293T (Tet1CD) + Dox 组和 293T (Tet1CD) 细胞系的基因组 DNA (gDNA) 后, 将两组 gDNA 倍比稀释, 使得等体积溶液内 DNA 分别为 400 ng、200 ng、100 ng、50 ng, 加入 20 $\times$ SSC 使其终浓度变为 6 $\times$ SSC。将各管中的 gDNA 经 Bio-Dot apparatus 微滤装置转膜至 NC 膜上, 晾干后亚甲蓝染色 5 min 后定量两组 gDNA 的同一性。在两组上样的 gDNA 同一性一致的情况下, 按上述步骤稀释 gDNA 后进行 100 $^{\circ}$ C 10 min 热变性, 变性后立即插入冰中, 在冰上加入 20 $\times$ SSC 使其浓度为 6 $\times$ SSC。转膜后用 3% 脱脂奶粉在 25 $^{\circ}$ C 封闭 1 h。1:10000 的 5hmC 一抗室温孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。1:5000 的 HRP-羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。ECL 化学发光显影。

1.3.4 检测 Tet 蛋白对于细胞周期、凋亡及增殖的影响

(1) 细胞分组

空白对照组 HEK293T: 用单纯完全培养基培养

的 HEK293T; 阴性对照组 HEK293T + Dox: 用含 1 μ g/mL 多西环素的完全培养基培养 HEK293T; 实验组 HEK293T (Tet1CD) + Dox: 用 1 μ g/mL 多西环素的培养基培养稳转细胞 293T (Tet1CD) 以诱导 Tet1CD 过表达。

(2) 细胞增殖

将细胞按上述分组, 各接种 5000 个细胞至 12 孔板内分组培养。在 24 h、48 h、72 h、96 h 分别将各孔细胞消化后取相同体积的细胞悬液用计数板显微镜下计数。

(3) 细胞凋亡和细胞周期

将细胞按上述分组培养, 将培养 96 h 后的细胞分别消化计数, 收集大约 2×10^5 个细胞进行 Annexin V-FITC/7AAD 染色, 15 min 后在流式细胞仪上进行凋亡检测。同时每组收集大约 1×10^5 万个细胞, 加入 75% 预冷乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜, 加入 PI 染色 10 min 后在流式细胞仪上进行周期检测。

1.4 统计学方法

实验重复 3 次。数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 通过 GraphPad Prism 8.0 软件分析。组间差异采用单因素方差分析, 三组比较采用 two-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒构建和酶切验证

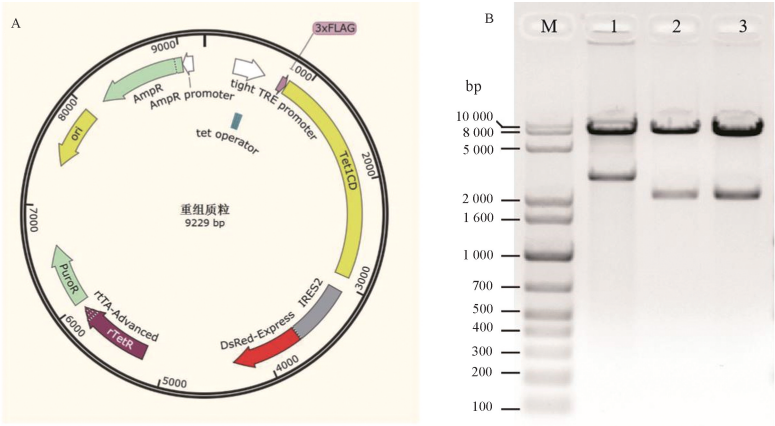
如图 1A 所示, 本实验构建可诱导型 (tet operator)、RFP (dsRed) 标记、表达 Tet1CD 的重组质粒, 该质粒同时具有氨苄的原核抗性和嘌呤霉素的真核抗性。将重组质粒与原质粒经 Not I 和 SfaA I 双酶切后进行电泳验证。结果显示, 重组质粒 (图 1B, 泳道 2) 在大约 2000 bp 位置和 8000 bp 位置附近各有一条带, 与理论上 2084 bp 和 7145 bp 的虚拟酶切相符。说明重组质粒构建正确。

2.2 Western blot 验证 Tet1CD 蛋白的表达

如图 2 结果显示, 当所有样品中细胞总蛋白加载量无显著差异时 ($P = 0.6575$); 与未加 Dox 诱导的对照组相比, 诱导组细胞中 Tet1 蛋白表达量显著增加, $P < 0.001$ 。说明构建的细胞系中 Tet 蛋白可以稳定表达。

2.3 DNA dot blot 检测 Tet1CD 过表达细胞系中 5hmC 的含量

如图 3 所示, 与对照组相比, 诱导组 (+Dox) 基因组中的 5hmC 信号显著增加, $P < 0.001$ 。说明构建的细胞系中 Tet1 蛋白具有催化产生 5hmC 的功能。

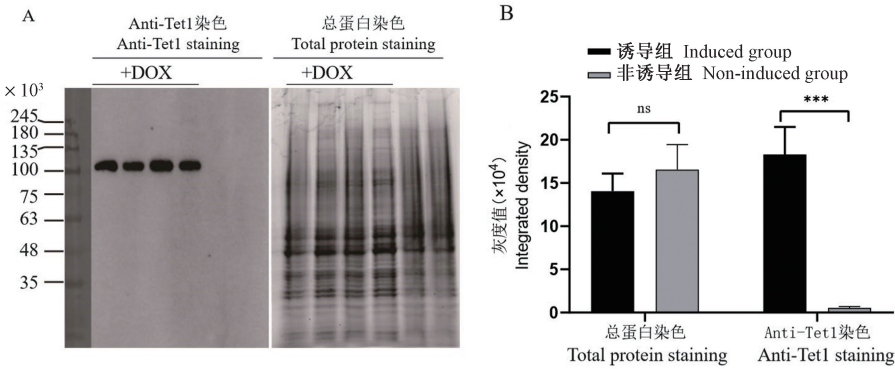


注:A:重组质粒图示;B:质粒经 NotI 和 SfaAI 双酶切后的电泳图(M:DNA marker;泳道 1:骨架质粒双酶切;泳道 2:重组质粒双酶切;泳道 3:目的片段质粒双酶切)。

图 1 重组质粒构建及酶切验证

Note. A, Illustration of recombinant plasmid. B, Electrophoresis result of plasmid after double digestion by NotI and SfaAI (M, DNA marker. lane 1, double digestion of skeleton plasmid. lane 2, double digestion of recombinant plasmid. lane 3, double digestion of target fragment plasmid).

Figure 1 Construction of recombinant plasmid and verification by enzyme digestion

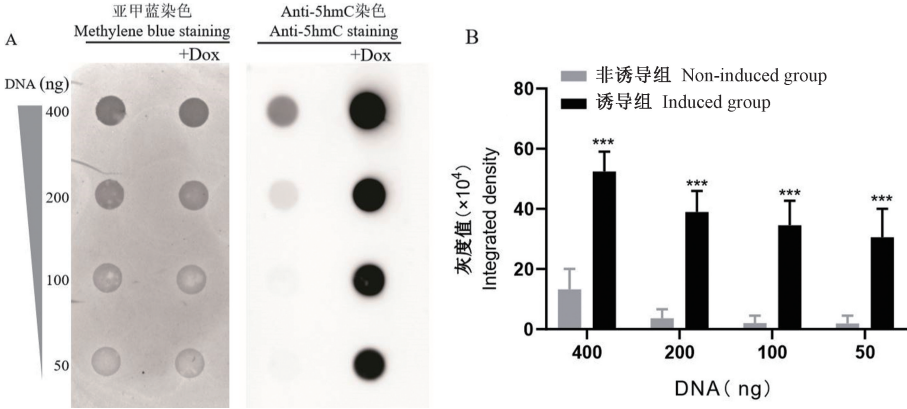


注:A:左侧为 Tet1 抗体染色结果,右侧为以 TGX Stain-Free™ FASTCAST™ Acrylamide Kit 配制的免染胶电泳总蛋白染色图;B:与非诱导组比较,*** $P < 0.001$ 。

图 2 Western blot 检测 Tet1CD 蛋白表达

Note. A, Tet1 antibody staining diagram on the left, and TGX Stain-Free™ FASTCAST™ Acrylamide Kit prepared total protein staining diagram on the right. B, Compared with the non-induced group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Detection of Tet1CD protein expression via Western blot



注:A:左侧为对照组和诱导组倍比稀释 DNA 的亚甲蓝染色;右侧为对照组和诱导组倍比稀释 DNA 的 5hmC 信号;B:与非诱导组比较,*** $P < 0.001$ 。

图 3 DNA Dot blot 检测基因组中的 5hmC 含量

Note. The left, Methylene blue staining of fold-diluted DNA in control and induction groups. The right, 5hmC signal of fold-diluted DNA in control and induction groups. B, Compared with the non-induced group, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Detection of 5hmC content in the genome via DNA Dot blot

2.4 Tet1CD 过表达对细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡及的影响

2.4.1 Tet1 蛋白对细胞增殖的影响

如图 4 所示,阴性对照组 (HEK293T+Dox) 与空白对照组 (HEK293T) 间细胞增殖无显著差异 ($P=0.83$)。但,与阴性对照组 (HEK293T+Dox) 比,Tet1 蛋白过表达对细胞增殖有明显抑制作用 ($P<0.0001$)。说明 Tet1 蛋白对细胞增殖具有抑制作用。

2.4.2 Tet1 蛋白对细胞周期的影响

如图 5A 所示,实验组 HEK(293T)+Dox 周期中 G2 期占比为 25.47%,空白对照组 HEK293T 为 20.43%,阴性对照组 HEK293T+Dox 为 20.69%。与空白对照组和阴性对照组相比,实验组的 G2 期分别增加了 24.67%和 23.11%(图中显示单次实验结果)。如图 5B 所示,为实验重复 3 次后的统计结果,与两对照组相比,实验组的细胞周期阻滞在 G2 期 ($P<0.05$),而 G1/S 期未见显著差异。

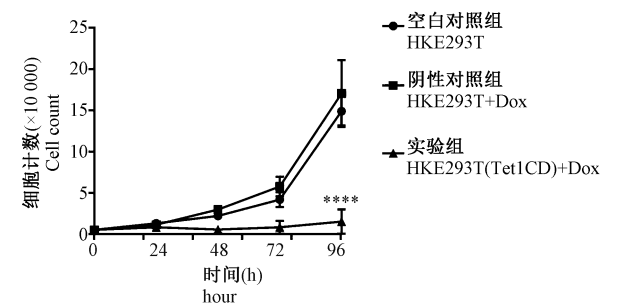
2.4.3 Tet1 蛋白对细胞凋亡的影响

如图 6A 左上所示,实验组细胞不经任何染色在流式细胞术检测凋亡的为 FITC 阴性,7AAD 阴性 (FITC-,7AAD-) 的范围,说明细胞中 RFP 的表达不会影响细胞凋亡的检测。如图 6A 所示,空白对照组 (图 6A 右上)、阴性对照组和实验组的早期凋亡 (FITC+,7AAD-) 有明显差异,比例分别为 1.39%、0.85%和 2.83%,但是晚期凋亡无明显变化。与阴性对照组相比,实验组细胞早期凋亡比例增加 232.94%;而与空白对照组相比,Tet1 蛋白过表达的细胞早期凋亡比例增加 103.60%(图中显示单次实验结果)。如图 6B 所示,实验重复 3 次后,实验组早期凋亡比例较阴性对照组和空白对照组显著升高 ($P<0.05$)。说明 Tet1 蛋白对于细胞早期凋亡具有促进作用。

3 讨论

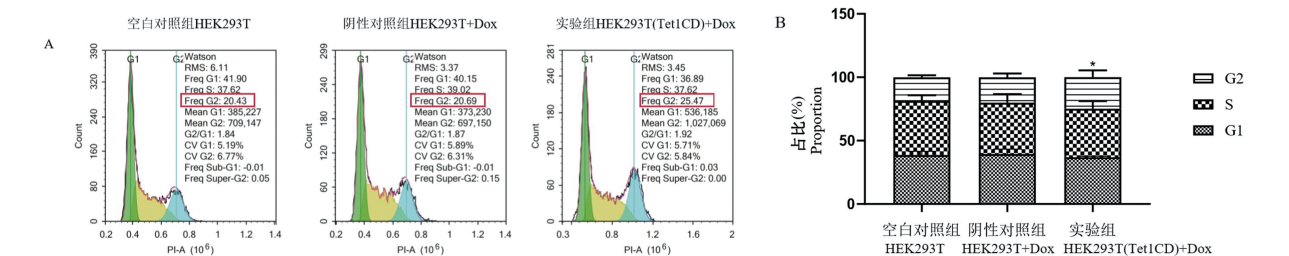
表观遗传学调控肿瘤的发生、发展和预后。表观遗传学包括 DNA 甲基化、基因组印迹、组蛋白修饰等哺乳动物细胞基因组中的胞嘧啶甲基化是在表观遗传学中是代表性修饰,主要发生在 CpG 岛,其甲基化水平往往与基因的转录活性呈负相关^[17]。Tet1 蛋白是 Tet 蛋白家族中的重要成员之一,参与介导 DNA 去甲基化的过程,在胚胎发育、骨髓造血及生殖细胞生成等过程中有着重要作用^[18-19]。

Tet 蛋白的 CD 结构域是靠近羧基端的催化结构域,具有氧化活性,能将 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 转变为 5-羟甲基胞嘧啶 (5hmC),进一步依次氧化成 5-醛基胞嘧啶 (5fC),5-羧基胞嘧啶 (5CaC)^[20]。据多篇文献报道^[8, 11, 21-25],Tet 蛋白氧化 5mC 产生的中间体 5hmC,其水平的高低与多种肿瘤,如血液恶性肿瘤、胃癌、前列腺癌、肝癌及结肠癌等有着密切



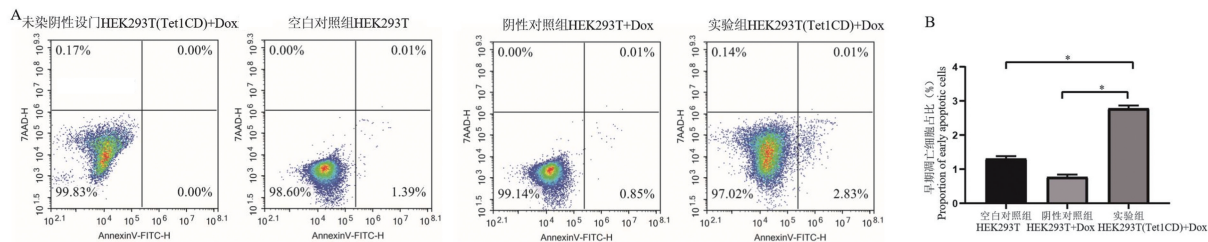
注:与空白对照组及阴性对照组相比,**** $P<0.0001$ 。
图 4 细胞计数法检测 Tet1 蛋白对于细胞增殖的影响
Note. Compared with the blank control group and the negative control group, **** $P<0.0001$.

Figure 4 Detection of the effect of Tet1 protein on cell proliferation by cell counting



注:A;流式细胞术检测 Tet1 蛋白对周期的影响;B;细胞周期中各时期所占比例。与空白对照组及阴性对照组相比,* $P<0.05$ 。
图 5 流式细胞术检测 Tet1 蛋白对细胞周期的影响
Note. A, The effect of Tet1 protein on the cycle was detected by flow cytometry. B, Proportion of each period in cell cycle. Compared with the blank control group and the negative control group, * $P<0.05$.

Figure 5 Effect of Tet1 protein on cell cycle by flow cytometry



注:A;左上:实验组细胞不经凋亡试剂染色直接上机调节荧光补偿进行阴性设门;右上:空白对照组细胞凋亡情况;左下:阴性对照组细胞凋亡情况;右下:实验组细胞凋亡情况。B:不同组间早期凋亡细胞所占比例。与空白对照组及阴性对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 6 流式细胞术检测 Tet 蛋白对细胞凋亡的影响

Note. A, Top left, Cells in the experimental group were directly adjusted without fluorescence staining for apoptosis by staining with apoptotic reagent. Top right, Apoptosis in the blank control group. Bottom left, Apoptosis in the negative control group. Bottom right, Apoptosis in test group. B, Proportion of early apoptotic cells among different groups. Compared with the blank control group and the negative control group, * $P<0.05$.

Figure 6 Effect of Tet protein on apoptosis by flow cytometry

的关系。结合 Tet 蛋白的氧化功能和 5hmC 与肿瘤的关系,提示可通过调节 Tet 氧化活性改变 5hmC 含量,降低 DNA 甲基化水平,从而改变肿瘤的发展进程。

本研究通过在 HEK293T 细胞上构建了诱导型 Tet1CD 过表达的稳转细胞系,用 Western blot 和 DNA dot blot 方法在蛋白水平和生物学功能水平上鉴定稳转系的建立,结果显示稳转系构建成功并且 Tet1 蛋白具有催化产生 5hmC 的功能。通过细胞计数的方法观察到 Tet1 蛋白对于细胞增殖具有抑制作用。之前有研究发现,Tet 蛋白家族中的 Tet2 能够抑制细胞增殖^[26],暗示 Tet 家族蛋白可能在细胞增殖过程中具有保守的作用,但是 Tet 家族蛋白影响细胞增殖是否依赖于其催化 5hmC 的功能还需要进一步的研究。为了探讨 Tet1 蛋白影响细胞增殖的机制,本研究通过流式细胞术方法发现 Tet1 蛋白导致 G2 时期的细胞比例增加,而 G1 和 S 期未见显著差异,说明 Tet1 蛋白可能通过抑制细胞周期使细胞处于 G2 时期最终导致细胞增殖变慢。另外,本研究还发现 Tet1 蛋白促进细胞早期凋亡,凋亡的细胞可能最终发生死亡,从而也会影响到细胞增殖的速度。

由于 HEK293 是胚胎肾永生化的细胞系,具有高度异常的核型,并组成性表达 Ad5 E1A/E1B 蛋白,从而抑制 pRB/p53 通路。高度传代下的 HEK293 细胞可诱导裸鼠肿瘤的形成^[27]。而 HEK293T 细胞系作为 HEK293 细胞衍生物,区别在于其稳定转染了编码 SV40 大 T 抗原温度敏感型突变体质粒,因此更具致癌性^[28]。

综上所述,本文通过在类癌细胞系 HEK293T 中

过表达 Tet1 蛋白的结果可知,Tet1 蛋白促进对 HEK293T 细胞凋亡、促使细胞阻滞在 G2 时期,抑制细胞增殖,提示了通过调节 Tet 蛋白对细胞生长有着重要的意义。一方面,通过调节 Tet 蛋白的表达,改变细胞的增殖速度,可能有利于细胞在体外高效扩增。另一方面,通过调节 Tet 蛋白的表达可能会控制细胞的增殖速度和凋亡状态,从而延缓肿瘤的发展,或为肿瘤治疗的靶点之一。但是,如何在肿瘤细胞中精确的控制 Tet1 蛋白表达以及 Tet1 蛋白如何影响细胞增殖的作用机制还需要进一步的阐明。

参考文献:

[1] Wernig-Zorc S, Yadav MP, Kopparapu PK, et al. Global distribution of DNA hydroxymethylation and DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia [J]. Epigenetics Chromatin, 2019, 12(1): 4.

[2] Yang AS, Estecio MR, Garcia-Manero G, et al. Comment on “Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation” and “Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation” [J]. Science, 2003, 302(5648): 1153.

[3] Khatami F, Teimoori-Toolabi L, Heshmat R, et al. Circulating ctDNA methylation quantification of two DNA methyl transferases in papillary thyroid carcinoma [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10): 17422-17437.

[4] Christmann M, Kaina B. Epigenetic regulation of DNA repair genes and implications for tumor therapy [J]. Mutat Res, 2019, 780: 15-28.

[5] Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer [J]. Genes Dev, 2016, 30(7): 733-750.

[6] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by

- MLL partner TET1 [J]. Science, 2009, 324(5929): 930–935.
- [7] Li W, Xu L. Epigenetic function of TET family, 5-Methylcytosine, and 5-Hydroxymethylcytosine in hematologic malignancies [J]. Oncol Res Treat, 2019, 42(6): 309–318.
- [8] Lio CJ, Yuita H, Rao A. Dysregulation of the TET family of epigenetic regulators in lymphoid and myeloid malignancies [J]. Blood, 2019, 134(18): 1487–1497.
- [9] Gerecke C, Schumacher F, Berndzen A, et al. Vitamin C in combination with inhibition of mutant IDH1 synergistically activates TET enzymes and epigenetically modulates gene silencing in colon cancer cells [J]. Epigenetics, 2020, 15(3): 307–322.
- [10] Chen JY, Luo CW, Lai YS, et al. Lysine demethylase KDM2A inhibits TET2 to promote DNA methylation and silencing of tumor suppressor genes in breast cancer [J]. Oncogenesis, 2017, 6(8): e369.
- [11] Smeets E, Lynch AG, Prekovic S, et al. The role of TET-mediated DNA hydroxymethylation in prostate cancer [J]. Mol Cell Endocrinol, 2018, 462(Pt A): 41–55.
- [12] Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2 [J]. Nature, 2010, 468(7325): 839–843.
- [13] Olariu V, Lövkvist C, Sneppen K. Nanog, Oct4 and Tet1 interplay in establishing pluripotency [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25438.
- [14] Chen J, Gao Y, Huang H, et al. The combination of Tet1 with Oct4 generates high-quality mouse-induced pluripotent stem cells [J]. Stem Cells, 2015, 33(3): 686–698.
- [15] Wu H, D'Alessio AC, Ito S, et al. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells [J]. Nature, 2011, 473(7347): 389–393.
- [16] Zhang P, Rausch C, Hastert FD, et al. Methyl-CpG binding domain protein 1 regulates localization and activity of Tet1 in a CXXC3 domain-dependent manner [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(12): 7118–7136.
- [17] Laporte M, Le Luyer J, Rougeux C, et al. DNA methylation reprogramming, TE derepression, and postzygotic isolation of nascent animal species [J]. Sci Adv, 2019, 5(10): eaaw1644.
- [18] Hore TA. Modulating epigenetic memory through vitamins and TET: implications for regenerative medicine and cancer treatment [J]. Epigenomics, 2017, 9(6): 863–871.
- [19] Melamed P, Yosefzon Y, David C, et al. Tet enzymes, variants, and differential effects on function [J]. Frontiers in cell and developmental biology, 2018, 6: 22.
- [20] Koivunen P, Laukka T. The TET enzymes [J]. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 2018, 75(8): 1339–1348.
- [21] Kroeze LI, van der Reijden BA, Jansen JH. 5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1855(2): 144–154.
- [22] Gao P, Lin S, Cai M, et al. 5-Hydroxymethylcytosine profiling from genomic and cell-free DNA for colorectal cancers patients [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5): 3530–3537.
- [23] Wang KC, Kang CH, Tsai CY, et al. Ten-eleven translocation 1 dysfunction reduces 5-hydroxymethylcytosine expression levels in gastric cancer cells [J]. Oncol Lett, 2018, 15(1): 278–284.
- [24] Ko M, An J, Pastor WA, et al. TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers [J]. Immunol Rev, 2015, 263(1): 6–21.
- [25] Thomson JP, Ottaviano R, Unterberger EB, et al. Loss of Tet1-associated 5-Hydroxymethylcytosine is concomitant with aberrant promoter hypermethylation in liver cancer [J]. Cancer Res, 2016, 76(10): 3097–3108.
- [26] Cimmino L, Dolgalev I, Wang Y, et al. Restoration of TET2 function blocks aberrant self-renewal and leukemia progression [J]. Cell, 2017, 170(6): 1079–1095.
- [27] Shen C, Gu M, Song C, et al. The tumorigenicity diversification in human embryonic kidney 293 cell line cultured *in vitro* [J]. Biologicals, 2008, 36(4): 263–268.
- [28] Stepanenko AA, Dmitrenko VV. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution [J]. Gene, 2015, 569(2): 182–190.

[收稿日期]2019-12-03