

RNA 干扰沉默 EZH2 基因对 HL-60 细胞增殖、凋亡及组蛋白甲基化、乙酰化的影响

林璐慧 黄轶群 马旭东

Effects of EZH2 siRNA silence on proliferation, apoptosis, and histone methylation, acetylation in HL-60 cells Lin Luhui, Huang Yiqun, Ma Xudong

Corresponding author: Ma Xudong, Department of Hematology, Zhangzhou Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Zhangzhou 363000, China. Email: maxudong005@hotmail.com

EZH2 基因是 Polycomb group 基因家族的重要成员之一。Polycomb 家族是一类调节组蛋白修饰的酶类,共形成 PRC1 和 PRC2 两个复合物,其中 PRC2 主要包括 3 个成员: EZH2、EED 和 SUZ12,特异性完成 H3K27 三甲基化修饰。在肿瘤细胞中, EZH2 作为一个专门高度沉默包括抑癌基因在内的一系列靶基因的转录抑制因子,在多种肿瘤组织中高表达,如前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌、大肠癌、肝细胞癌、淋巴瘤等。EZH2 表达的增加与肿瘤的进展及预后相关^[1]。本研究我们通过干扰 RNA (siRNA) 沉默人急性早幼粒白血病细胞株 HL-60 细胞 EZH2 基因,分析 EZH2 基因对 HL-60 细胞增殖、凋亡及组蛋白甲基化、乙酰化的影响,探讨 EZH2 基因在髓系白血病靶向治疗中的可能性。

材料与方 法

1. 细胞来源及培养:人急性早幼粒白血病细胞株 HL-60 细胞购自中国科学院上海细胞库,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的孵箱中进行培养,细胞自复苏后每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

2. 主要试剂:RPMI 1640 培养基、WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;FBS 购自杭州四季青生物制品公司;DNA Marker 及 RT-PCR 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;PCR 引物、Lipofectamine™ 2000 转染试剂及 RNA 提取试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司;Opti-MEM 试剂购自美国 Gibco 公司;EZH2、β-actin、pro-caspase-3、pro-caspase-9、Bcl-2、Bax、二甲

甲基化 H3K27、三甲基化 H3K27、乙酰化 H3 一抗及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔二抗均购自美国 Upstate 公司。流式细胞术相关试剂盒购自美国 BD 公司。

3. siRNA 转染:针对 EZH2 区域选择作用靶点,根据确定序列的原则设计,委托上海吉玛制药技术有限公司选择合成 3 条靶序列,预实验结果显示 EZH2-homo-2167 siRNA 效率最高,转染率为(82±3)%。其正义链为 5'-GAGGGAAAGU GUAUGAUAATT-3',反义链为 5'-UUAUCAUACACUU UCCCUCTT-3'。确定该序列用于本研究。同时合成随机阴性对照序列和含荧光标志的通用随机阴性序列用于计算转染率。将稀释后的 Lipofectamine™ 2000 室温放置 5 min 后与稀释的 EZH2 siRNA 混合并室温放置 20 min 形成转染复合物。转染前取对数生长期 HL-60 细胞悬浮于无抗生素培养基,转染时细胞密度达到(8~16)×10⁵/ml,接种于 96 孔板,每孔 2×10⁴ 个细胞,终体积为 100 μl。对照组未加转染复合物,实验组分别加入不同浓度转染复合物使 EZH2 siRNA 终浓度分别为 30、60、120 nmol/L。每组设 6 个平行孔,每孔终体积为 2 ml。转染后置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的孵箱中继续培养 24 h。

4. RT-PCR 检测 EZH2 mRNA 的表达:收集转染后 HL-60 细胞,用 TRIzol 法抽提总 RNA。经紫外分光光度法鉴定、定量后,取总 RNA 1 μg 按逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA 并进行 PCR 扩增。引物序列:EZH2 上游引物:5'-ACGGC TTCCAATAACAGTAG-3',下游引物:5'-TCAGATGGTGC CAGCAATAGA-3',产物长度 792 bp;β-actin 上游引物:5'-CTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3',下游引物:5'-CGGGA CCTGACTGACTACCTC-3',产物长度 546 bp。反应条件:94 °C 2 min;94 °C 50 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,共 25 个循环;72 °C 延伸 8 min。PCR 产物与上样缓冲液以 6:1 混匀,在 16 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,于凝胶图像分析仪上自动分析成像。实验重复 3 次。

5. WST-1 法检测 HL-60 细胞增殖:接种 HL-60 细胞至 96 孔板,每孔 2×10⁴ 个细胞,终体积为 100 μl。实验组 EZH2 siRNA 的终浓度分别为 30、60、90、120、150 nmol/L,对照组 EZH2 siRNA 的终浓度为 0 nmol/L,并设空白组(加等体积培养液,不含细胞)。转染培养结束前 4 h 每孔加 10 μl WST-1,继续培养 4 h,充分混匀后在酶标仪上测 450 nm 和 690 nm 波长处吸光度(A)值,记录实验结果,并按以下公式计算细胞增殖率。实验重复 3 次。

$$\text{细胞增殖率}(\%) = \frac{(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}})}{(A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})} \times 100\%$$

6. 流式细胞术检测 HL-60 细胞凋亡:将 HL-60 细胞悬液

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.03.016

基金项目:福建省引进重大项目计划(2012I2004);福建省自然科学基金(2012J01420);福建医科大学科学研究专项(重点类)(2013FZS13004Z);福建省医学创新课题(2012-CX-32)

作者单位:363000 福建漳州,福建医科大学附属漳州市医院血液科

通信作者:马旭东,Email: maxudong005@hotmail.com

接种于6孔板上,使细胞密度在转染时达到(8~16)×10⁵/ml,终体积为2 ml,实验组EZH2 siRNA的终浓度分别为30、60、120 nmol/L,对照组EZH2 siRNA的终浓度为0 nmol/L,分别培养24 h后离心收集细胞。按照试剂盒说明书操作上流式细胞仪进行细胞凋亡检测。每次接种3个6孔板,实验重复3次。

7. Western blot法检测HL-60细胞凋亡相关蛋白及甲基化、乙酰化H3K27蛋白:收集各组HL-60细胞,离心,预冷PBS洗涤2次后,去上清。按1×10⁶细胞加入100 μl裂解液和1 μl酶抑制剂的比例裂解细胞30 min,低温10 000×g离心15 min,吸取中间清亮层。以120 g/L的SDS-PAGE分离,电转移法转膜,室温下摇床封闭1 h,加入TBS,根据一抗的不同稀释浓度,4℃过夜,TBS洗涤液洗膜后分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,室温下摇床作用1 h,TBS洗涤液洗膜后化学发光法显色,X线胶片扫描后,用AlphaDigiDoc图像分析软件进行分析比较。实验重复3次。

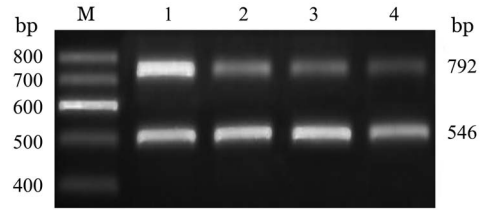
8. 统计学处理:采用GraphPad Prism 5.0处理软件分析。常规进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料实验数据以均数±标准差表示。多组资料组间的比较采用单因素方差分析,采用Dunnett法进行EZH2 siRNA处理组与对照组的两两比较。*P*<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. EZH2 siRNA对HL-60细胞EZH2表达的影响:使用不同浓度EZH2 siRNA(30、60、120 nmol/L)转染细胞24 h后提取EZH2 mRNA及蛋白。RT-PCR结果显示,EZH2 siRNA处理组的mRNA条带亮度弱于对照组,且随着浓度增加呈递减趋势,其中120 nmol/L处理组亮度减弱最明显,提示随浓度增加抑制作用增强(图1)。用UV凝胶成像分析仪分析电泳结果:对照组EZH2 mRNA相对表达水平为1.069±0.647,30、60、120 nmol/L EZH2 siRNA处理组分别为0.713±0.093、0.677±0.568及0.492±0.078,组间差异有统计学意义(*F*=31.48,*P*<0.001),进一步采用Dunnett法进行两两比较,不同浓度EZH2 siRNA处理组EZH2 mRNA均低于对照组(*P*值均<0.01)。Western blot法结果显示,EZH2 siRNA组的EZH2蛋白表达随EZH2 siRNA浓度增加而降低(图2)。相对表达水平:对照组为0.967±0.610,30、60、120 nmol/L EZH2 siRNA处理组分别为0.793±0.080、0.447±0.057及0.144±0.060,组间差异有统计学意义(*F*=95.13,*P*<0.001),进一步采用Dunnett法进行两两比较,不同浓度EZH2 siRNA组EZH2蛋白表达均低于对照组(*P*值均<0.05)。

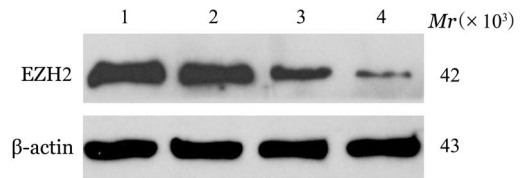
2. EZH2 siRNA对HL-60细胞增殖的抑制作用:经终浓度分别为0、30、60、90、120、150 nmol/L的EZH2 siRNA作用24 h后,HL-60细胞的增殖率分别为(97.44±2.01)%、(87.53±4.13)%、(70.22±4.11)%、(62.54±3.14)%、(28.41±3.78)%、(15.24±4.80)%,随EZH2 siRNA浓度的增加,细胞增殖率逐渐下降,表现出浓度依赖性。组间差异有统计学意义(*F*=223.99,*P*<0.001),进一步采用Dunnett法进行两两比较,不

同浓度EZH2 siRNA对HL-60增殖的抑制作用与对照组比较差异均有统计学意义(*P*值均<0.05)。



M:Marker; 1:对照组; 2~4分别为30、60、120 nmol/L EZH2 siRNA处理组

图1 RT-PCR检测EZH2干扰RNA(siRNA)处理HL-60细胞24 h后EZH2 mRNA的表达

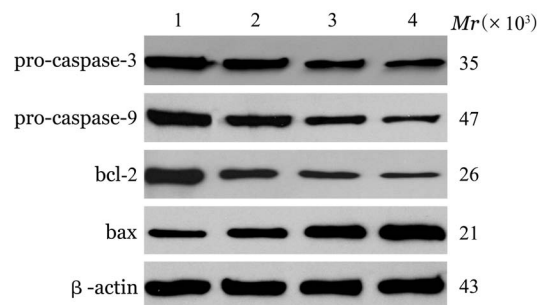


1:对照组; 2~4分别为30、60、120 nmol/L EZH2 siRNA处理组
图2 Western blot法检测EZH2干扰RNA(siRNA)处理HL-60细胞24 h后EZH2蛋白的表达

3. EZH2 siRNA对HL-60细胞凋亡的影响:经终浓度30、60、120 nmol/L EZH2 siRNA作用24 h后,HL-60细胞的凋亡率分别为(27.6±7.1)%、(53.8±8.6)%、(64.4±6.7)%,而对照组HL-60细胞凋亡率为(2.8±1.7)%,随EZH2 siRNA浓度的增加,凋亡率逐渐上升,表现为浓度依赖性。组间差异有统计学意义(*F*=53.38,*P*<0.001),进一步采用Dunnett法进行两两比较,不同浓度EZH2 siRNA对HL-60细胞的增殖抑制作用与对照组比较差异均有统计学意义(*P*值均<0.05)。

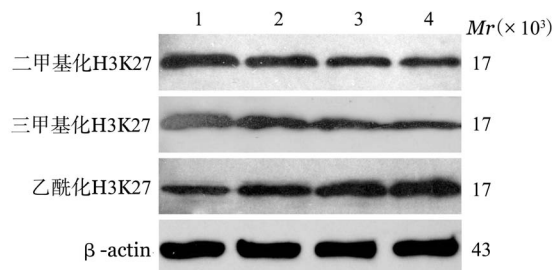
4. EZH2 siRNA对HL-60细胞凋亡相关蛋白的影响:终浓度0、30、60、120 nmol/L EZH2 siRNA处理HL-60细胞24 h后,经Western blot检测,随着EZH2 siRNA终浓度的增加,pro-caspase-3、pro-caspase-9、Bcl-2表达减少,Bax表达增加(图3)。

5. EZH2 siRNA对HL-60细胞H3K27甲基化及乙酰化的影响:与对照组相比,转染EZH2 siRNA后,随着siRNA作



1:对照组; 2~4分别为30、60、120 nmol/L EZH2 siRNA处理组
图3 Western blot法检测EZH2干扰RNA(siRNA)处理HL-60细胞24 h后凋亡相关蛋白的表达

用浓度的增加EZH2蛋白表达递减,并下调H3K27的二甲基化、三甲基化水平,上调H3的乙酰化水平(图4)。



1:对照组;2~4分别为30、60、120 nmol/L EZH2 siRNA处理组

图4 Western blot法检测EZH2干扰RNA(siRNA)处理HL-60细胞24 h后组蛋白的表达

讨 论

白血病系血液系统恶性肿瘤,是一类造血干细胞的恶性克隆性疾病,其发病是多因素、多阶段和多种基因突变协同作用的过程。近来研究发现EZH2在高危骨髓增生异常综合征患者及急性髓系白血病患者中的表达水平显著高于低危骨髓增生异常综合征患者及正常人,提示EZH2在髓系恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[2]。EZH2有对干细胞特异基因的激活以及对很多抑癌基因如p16、p27和BRCA1等进行调控的作用。有研究发现,抑制EZH2的活性能在小鼠模型中抑制甚至完全阻断肿瘤的生长^[3]。Choi等^[4]研究表明EZH2参与p53调控的细胞周期,激活的p53通过抑制EZH2启动子的活性而抑制EZH2基因的表达,使细胞增殖变慢,细胞周期出现G/M期阻滞。Yang等^[5]发现,长链基因间非蛋白质编码RNA高表达于肝癌细胞5'端区域,通过与EZH2相互作用介导PRC2复合物定位于p16、p27等细胞周期相关基因的启动子区域,催化组蛋白过度甲基化从而抑制p16、p27等表达,解除肝癌细胞G₀/G₁期阻滞,参与肝癌细胞的增殖调控。Tonini等^[6]发现在胃癌细胞中,EZH2可减少转录因子与DNA的结合,抑制靶基因表达,作用于pRb2/p130蛋白C-末端与组蛋白去乙酰化酶1(HDAC1)相联的区域,从而恢复pRb2/p130-HDAC1复合物介导的细胞周期素A启动子的活性,最终促进细胞周期演进和恶性转变。本研究结果显示EZH2 siRNA转染髓系HL-60细胞后可阻滞细胞周期,从而抑制细胞增殖。随着EZH2 siRNA浓度的增高,细胞增殖率逐渐下降,呈浓度依赖性。

Moon等^[7]研究表明,白血病患者Bcl-2的表达显著增加,且与不良临床预后呈相关性。文川等^[8]发现急性白血病患者,骨髓单个核细胞CREB和Bcl-2在基因转录和翻译水平的表达均明显高于非恶性血液系统疾病患儿。白血病的体外研究显示,Bcl-2高表达者明显延长白血病细胞生存时间,抑制或阻断多种因素引起的细胞凋亡^[9]。我们的研究表明沉默EZH2基因后,抗凋亡蛋白Bcl-2及胱天蛋白酶pro-caspase-9、pro-caspase-3表达量减少,而促凋亡蛋白Bax表达量增加。说明沉默EZH2可诱导HL-60细胞株的凋亡,

且对HL-60细胞株凋亡的影响可通过内源性-线粒体依赖途径完成的,亦不排除外源性-死亡受体途径参与的凋亡过程,机制有待进一步研究。

Cai等^[10]在肝癌中发现,与正常肝组织相比,三甲基化H3K27在肝癌中高表达,且与肿瘤大小、血管浸润、肿瘤分期等因素相关,并发现三甲基化H3K27蛋白表达与肝癌患者预后有关,三甲基化H3K27表达越高的患者预后越差。Tzao等^[11]研究发现三甲基化H3K27和H3K18ac在食管癌患者中高表达,且表达越高预后越差。急性髓系白血病(AML)是发生于造血干/祖细胞的恶性增殖性疾病。表观遗传学变异在白血病的发生、发展和转移中发挥重要作用。近年来,染色体甲基化异常逐渐成为AML研究的热点,AML中存在一组基因的高度甲基化,导致这些基因表达的沉默或抑制,从而促进正常造血干细胞向白血病细胞的转化。组蛋白甲基转移酶EZH2是特异性H3K27甲基转移酶,通过与DNA甲基转移酶(DNMT1)合作,致使靶基因CpG岛区DNA甲基化导致靶基因的永久性沉默,从而参与异染色质的形成及基因转录调控^[12]。H3K27甲基化是一种抑制效应,与该位点乙酰化具有拮抗效应^[13]。本实验我们通过EZH2 siRNA转染HL-60细胞后,EZH2基因特异性作用于组蛋白H3的第27位赖氨酸残基,下调组蛋白H3K27二甲基化及三甲基化,组蛋白H3乙酰化上调。H3K27甲基化是调控转录的重要的组蛋白修饰之一,高度表达二甲基化及三甲基化的H3K27可以抑制基因转录;反之使二甲基化及三甲基化的H3K27去甲基化可以激活基因转录。H3K27甲基化下调的同时伴有组蛋白H3乙酰化水平升高,我们推测这一组蛋白修饰的改变解除了H3K27甲基化在抑癌基因启动子区域的转录抑制作用,恢复细胞周期调控作用,同时Bcl-2表达下降,Bax表达增加,启动内源性-线粒体凋亡途径,从而达到抑制细胞分裂、促使细胞进入凋亡程序的目的。组蛋白H3K27通过甲基化及去甲基化过程参与基因转录调控,影响细胞增殖、凋亡,参与白血病发生。H3K27甲基化失衡与AML的发生发展相关,通过纠正H3K27的甲基化异常,使高甲基化失活的抑癌基因再度表达,将有望为AML的治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- [1] 唐移忠,田金华,曾定元.组蛋白甲基化转移酶EZH2在卵巢癌组织中的表达及意义[J].现代预防医学,2009,36(10):1980-1982.
- [2] 吴圣豪,郑翠苹,徐杰.EZH2和microRNA-101在急性髓系白血病中的相关性分析及对预后的影响[J].中华血液学杂志,2012,33(3):232-235. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.012.03.021.
- [3] Wilson BG, Wang X, Shen X, et al. Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation [J]. Cancer Cell, 2010, 18(4):316-328. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.09.006.
- [4] Choi JH, Song YS, Yoon JS, et al. Enhancer of zeste homolog 2

expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer[J]. *APMIS*, 2010, 118(3):196-202. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02579.

[5] Yang F, Zhang L, Huo XS, et al. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans [J]. *Hepatology*, 2011, 54(5):1679-1689. DOI: 10.1002/hep.24563.

[6] Tonini T, Bagella L, D'Andrilli G, et al. Ezh2 reduces the ability of HDAC1-dependent pRb2/p130 transcriptional repression of cyclin A [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (28):4930- 4937. DOI: 10.1038/sj.onc.1207608.

[7] Moon JH, Sohn SK, Lee MH, et al. BCL2 gene polymorphism could predict the treatment outcomes in acute myeloid leukemia patients [J]. *Leuk Res*, 2010, 34 (2):166-172. DOI: 10.1016/j.leukres.2009.05.009.

[8] 文川, 马夫天, 万伍卿. cAMP反应元件结合蛋白/Bcl-2在小儿急性白血病骨髓细胞中的表达及意义[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(3):177-180.

[9] Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, et al. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA [J]. *Blood*, 2007, 109 (7):3069-3075. DOI: 10.1182/blood-2006-08-043257.

[10] Cai MY, Hou JH, Rao HL, et al. High expression of H3K27me3 in human hepatocellular carcinomas correlates closely with vascular invasion and predicts worse prognosis in patients [J]. *Mol Med*, 2011, 17 (1-2):12-20. DOI: 10.2119/molmed.010.00103.

[11] Tzao C, Tung HJ, Jin JS, et al. Prognostic significance of global histone modifications in resected squamous cell carcinoma of the esophagus [J]. *Mod Pathol*, 2009, 22 (2):252-260. DOI: 10.1038/modpathol.2008.172.

[12] Gore AV, Weinstein BM. DNA methylation in hematopoietic development and disease [J]. *Exp Hematol*, 2016, 44 (9):783-790. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.04.013.

[13] Wang D, Xia X, Weiss RE, et al. Distinct and histone-specific modifications mediate positive versus negative transcriptional regulation of TSHalpha promoter [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (3): e9853. DOI: 10.1371/journal.pone.0009853.

(收稿日期:2016-07-09)
(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

2017年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

磷酸盐缓冲液	PBS	乳酸脱氢酶	LDH	粒-巨噬细胞集落刺激因子	GM-CSF
胎牛血清	FBS	凝血酶原时间	PT	巨噬细胞集落刺激因子	M-CSF
血红蛋白	HGB	部分激活的凝血活酶时间	APTT	粒-巨噬细胞集落形成单位	CFU-GM
红细胞计数	RBC	EB病毒	EBV	细胞毒性T淋巴细胞	CTL
白细胞计数	WBC	巨细胞病毒	CMV	噻唑蓝实验	MTT实验
血小板计数	PLT	乙型肝炎病毒	HBV	弥漫性血管内凝血	DIC
中性粒细胞绝对计数	ANC	丙型肝炎病毒	HCV	磁共振成像	MRI
核因子-κB	NF-κB	人类免疫缺陷病毒	HIV	正电子发射断层扫描	PET
聚合酶链反应	PCR	自然杀伤细胞	NK细胞	乙二胺四乙酸	EDTA
逆转录-聚合酶链反应	RT-PCR	白细胞介素	IL	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳	SDS-PAGE
酶联免疫吸附实验	ELISA	干扰素	IFN	二甲基亚砷	DMSO
辅助性T淋巴细胞	Th	肿瘤坏死因子	TNF	荧光原位杂交	FISH
丙氨酸转氨酶	ALT	红细胞生成素	EPO	美国国家综合癌症网络	NCCN
天冬氨酸转氨酶	AST	血小板生成素	TPO	国际预后积分系统	IPSS
谷氨酰转氨酶	GGT	干细胞生长因子	SCF	常见不良反应事件评价标准	CTCAE
碱性磷酸酶	ALP	粒细胞集落刺激因子	G-CSF		本刊编辑部