

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)15-1352-03

组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古菌素 A 联合全反式维甲酸诱导 PLZF-RAR α 阳性 U937 细胞分化

陈思宇^{1,2}, 马立恒², 董颖², 贾培敏², 陈丽娟², 郑磊贞¹, 王振义²(¹ 上海交通大学医学院附属新华医院肿瘤科, 上海 200092; ² 上海交通大学医学院附属瑞金医院上海血液学研究所, 上海 200025)

Differentiation of PLZF-RAR α -positive U937 leukemic cells induced by histone deacetylase inhibitor trichostatin A in combination with all-*trans* retinoic acid

CHEN Si-Yu^{1,2}, MA Li-Heng², DONG Ying², JIA Pei-Min², CHEN Li-Juan², ZHENG Lei-Zhen¹, WANG Zhen-Yi²¹Department of Oncology, Xinhua Hospital, Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China, ²Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai 200025, China

【Abstract】 AIM: To investigate effects of all-*trans* retinoic acid (ATRA) and trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, on PLZF-RAR α -positive cells. METHODS: PLZF-RAR α -positive U937 cells (U937/PLZF) were used as an *in vitro* model. The change of cell morphology was observed by Wright-Giemsa staining, cell growth and proliferation were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, cell cycle distribution and expression of cell membrane surface differentiation-related antigens (such as CD11b, CD64 and CD14) were determined by flow cytometry assay. Expression of PLZF was analyzed by immunofluorescence. Functional differentiation was reflected by nitroblue tetrazolium (NBT) reduction ability and cytochemical staining. RESULTS: While U937/PLZF cells were incubated in tetracycline-withdrawn medium, the expression of PLZF-RAR α protein was increased. After treated with TSA (30 μ g/L) and RA (1 μ mol/L), U937/PLZF cells presented morphologically some features of differentiated cells. The cell growth and proliferation were inhibited in a dose- and time-dependent manner. The number of cells in S phase was decreased and the level of CD11b was increased. The expression of PLZF relocated in treated cells. However, no significant difference in NBT assay and cytochemical staining was documented with the combination therapy. CONCLUSION: The combination of histone deacetylase inhibitor TSA with ATRA can cause partial differentiation of PLZF-RAR α positive U937 cells.

【Keywords】 PLZF-RAR histone deacetylase; differentiation; leukemia, promyelocytic, acute

【摘要】目的: 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古菌素 A (TSA) 和全反式维甲酸 (ATRA) 对 PLZF-RAR α 阳性细胞的作用。方法: 稳定转染 PLZF-RAR α 基因的 U937 细胞 (U937/PLZF) 经 TSA, ATRA 作用一段时间后, Wright-Giemsa 染色观察细胞形态, MTT 法检测细胞生长和增殖状态, 流式细胞仪检测细胞周期和细胞表面分化抗原 CD11b, CD64, CD14 等的表达, 荧光免疫细胞化学染色检测融合蛋白表达, 细胞化学染色和硝基蓝四氮唑 (NBT) 还原试验观察细胞功能分化情况。结果: U937/PLZF 细胞在去除四环素条件培养后, PLZF-RAR α 表达明显增加。TSA (30 μ g/L) 联合 ATRA (1 μ mol/L) 使 U937/PLZF 细胞核质比缩小, 生长增殖受抑, S 期细胞减少, CD11b 表达增高, PLZF-RAR α 蛋白表达减弱, 分布以胞核弥漫细小颗粒为主, 细胞功能上的分化可能尚不成熟。结论: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 联合 ATRA 可使 U937/PLZF 细胞发生部分分化。

【关键词】 PLZF 维甲酸 组蛋白去乙酰化酶 分化 白血病 早幼粒 急性

【中图分类号】 R733.7 **【文献标识码】** A

0 引言

1980 年代中期, 我国学者率先应用全反式维甲酸 (ATRA) 诱导分化治疗急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL), 缓解率高达 85% ~ 90%。但是仍有一部分患者对 ATRA 不敏感, 预后较差。研究发现, 约 1% APL 患者携带 t(11; 17)(q23, q21) 表达 PLZF-RAR α 融合蛋白, 对化疗不敏感, 单用 ATRA 不能诱导缓解, 已知 PLZF-RAR α 的 PLZF 端能与包括组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 在内的转录共抑制复合物紧密结合。我们以 PLZF-RAR α 转染细胞为模型, 研究了 HDAC 抑制剂 (HDACi) 曲古菌素 A (trichostatin A, TSA) 联合 ATRA 对 PLZF-RAR α 阳性白血病细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 U937 细胞和稳定转染 PLZF-RAR α 基因的 U937 细胞 (U937/PLZF) 系保存细胞株^[1], 后者培养液中维持添加 0.5 mg/L 嘌呤霉素 (puromycin, Sig-

收稿日期 2007-06-27; 接受日期 2007-07-09

基金项目 国家自然科学基金面上项目 (30300139); 上海市博士后科研资助计划 (2003-16); 上海市教委重点项目 (07zz43)

作者简介 陈思宇, 博士, 主治医师。Tel (021) 65010796 Email zhen-siyu@126.com

ma), 0.1 mg/L 四环素(tetracycline, Sigma)和 1 g/L G418 (Sigma). 实验前撤去四环素,以诱导 PLZF-RAR α 蛋白表达. 细胞离心涂片, Wright-Giemsa 染色观察细胞形态. TSA (Sigma)溶解于无水乙醇,配成 1 g/L 储存液,用时以培养液稀释成 10 mg/L 工作液. ATRA (Sigma)溶解于无水乙醇,配成 10 mmol/L 储存液,用时以培养液稀释成 100 μ mol/L 工作液.

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测细胞生长 按照文献 [2] 方法操作 570 nm 处测 A 值. 细胞生长抑制率 = (1 - 处理组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) \times 100%. 重复 3 次取平均值.

1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡 取约 1×10^6 细胞,冷乙醇固定, Rnase (终浓度 200 mg/L) 消化 20 mg/L 碘化丙啶 (PI) 染色 30 min, 用流式细胞仪 (Beckmon-Coulter) 检测细胞不同 DNA 含量分布, 经 Multicycle 软件分析细胞周期和凋亡细胞.

1.2.3 检测细胞表面分化抗原 取细胞悬液 100 μ L (约含 5×10^5 细胞) 加入 FITC 或 PE 标记的鼠抗人 CD11b, CD64, CD14 mAb 和相应的同型抗体 (同种荧光标记的非特异性鼠抗人 IgG₁, IgG_{2a}) (均购自 Coulter-Immunotech, France), 室温下避光孵育 30 min, PBS 清洗, 重悬细胞, 立即进行流式细胞仪检测.

1.2.4 检测融合蛋白表达 细胞涂片, -20°C 预冷 甲醇/丙酮 (1:1) 固定液浸泡固定 5~10 min, PBS 浸洗 30 g/L BSA 封闭, 一抗 (goat anti-PLZF, Santa Cruz) 室温孵育 1 h, PBS 洗 5 min \times 5 次, 二抗 (FITC-rabbit anti-goat IgG) 室温孵育 1 h, PBS 洗 5 min \times 5 次, PI 复染, 封片, 激光共聚焦显微镜下观察.

1.2.5 细胞化学染色 氯乙酸 AS-D 萘酚酯酶染色 (CE), 醋酸 AS-D 萘酚酯酶染色 (AE), 过碘酸-席夫试验 (糖原染色, PAS), 过氧化物酶染色 (POX), 按照常用方法进行.

1.2.6 硝基蓝四氮唑还原试验 取约 1×10^6 细胞, PBS 清洗后加入硝基蓝四氮唑 (NBT) 反应液, 37°C 孵育 30 min, 混悬细胞, 离心 (500 r/min \times 5 min) 涂片, 光镜下计数阳性细胞率, 每个视野至少计数 200 个细胞.

2 结果

U937/PLZF 细胞在添加 0.5 mg/L 嘌呤霉素 (puromycin), 0.1 mg/L 四环素 (tetracycline) 和 1 g/L G418 培养液中维持培养, PLZF-RAR α 呈低水平表达. 撤去四环素后, PLZF-RAR α 的表达明显增加.

2.1 细胞形态学变化 单独使用 TSA (30 μ g/L) 或 ATRA (1 μ mol/L) 处理表达 PLZF-RAR α 的 U937/PLZF

细胞 24~72 h 形态变化不甚明显, 当二者合用时, 细胞核质比明显缩小, 核仁减少但未完全消失 (图 1).

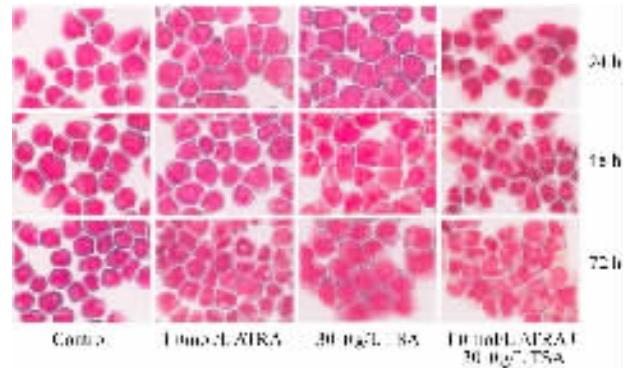


图 1 U937/PLZF 细胞形态学变化 光镜 \times 1000

2.2 TSA 和 ATRA 抑制 U937/PLZF 细胞的生长

10~30 μ g/L TSA 对 U937 细胞的增殖几乎没有抑制作用, 但对 U937/PLZF 细胞的增殖有抑制作用, 此作用呈现时间剂量的依赖性. 1 μ mol/L ATRA 对 U937/PLZF 细胞增殖的抑制作用较弱, 3 μ mol/L ATRA 的抑制作用则明显增强. TSA 和 ATRA 合用可以明显抑制 U937/PLZF 细胞增殖 (表 1). 另外, 我们还发现另一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂 PB 对 U937/PLZF 细胞作用较弱 (低于 20%), 与 ATRA 合用后抑制作用也有增强.

表 1 TSA 或 TSA 合用 1 μ mol/L ATRA 对 U937/PLZF 细胞的生长的抑制率 (%)

药物	t/h	0	10 μ g/L	20 μ g/L	30 μ g/L
TSA	24	-	11.9	12.5	14.5
	48	-	14.3	28.3	45.7
	72	-	20	38.1	59.6
TSA + ATRA	24	16.1	23	26	30.7
	48	34	46.7	55.6	60.6
	72	36.3	63.8	71.1	74.5

2.3 细胞周期和表面抗原的变化 TSA 作用后, U937/PLZF 细胞周期阻滞在 G₁ 期, S 期细胞明显减少. 1 μ mol/L ATRA 也能使 S + G₂ 期细胞明显减少, 并出现亚二倍体 (Sub-G₁) 峰. 1 μ mol/L ATRA 作用后, U937/PLZF 细胞的 CD11b 表达略有增高, 30 μ g/L TSA 使其表达增高的程度明显强于 ATRA, 二者合用有较弱的协同作用. 同时可见, CD64 表达的变化不明显. CD14 在 U937/PLZF 细胞表达量极低, 加药处理后未看到明显变化. 未诱导表达 PLZF-RAR α 的 U937/PLZF 细胞经过 1 μ mol/L ATRA 或者 10~30 μ g/L TSA 处理后, 细胞表面 CD11b 表达增高; 而在

诱导 PLZF-RAR α 高表达后,其对 ATRA 处理的反应性减弱,对 TSA 处理反应性明显增强.结合前面观察到的 10~30 $\mu\text{g/L}$ TSA 对 U937 细胞的增殖几乎没有抑制作用但对 U937/PLZF 细胞有抑制作用,说明 PLZF-RAR α 的表达可以增强细胞对 TSA 的敏感性.

2.4 PLZF 蛋白的变化 培养液中撤除四环素后, U937/PLZF 细胞的 PLZF-RAR α 表达增强,但分布似以胞质为主,胞核内弥漫细小颗粒分布. TSA 合用 ATRA 处理后, PLZF-RAR α 表达减弱,分布以胞核弥漫细小颗粒为主.

2.5 细胞化学染色 药物作用 4 d 后进行细胞的化学染色,粒细胞特异性酯酶(CE)未出现阳性,表明细胞仍以单核系为主,RA 或 TSA + RA 处理组 AE 的氟化钠(NaF)抑制率有所下降(表 2),提示 U937/PLZF 细胞有向粒系分化的趋势,但这种趋势很弱.

2.6 NBT 还原试验 对照组阳性细胞率低于 1%,药物处理后阳性率有所增高,最高可达 10% 左右.提示细胞功能上的分化可能尚不成熟.

表 2 U937/PLZF 细胞经 30 $\mu\text{g/L}$ TSA 和 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 处理 4 d 后细胞化学染色 (%)

组别	POX	PAS	CE	AE	AE + NaF	抑制率
对照	(-)	(+)94	(-)	(+)5	(+)100	66.1
		(+)6		(+)95		
TSA	(-)	(+)98	(-)	(+)2	(+)100	66.4
		(+)2		(+)98		
RA	(-)	(+)4	(-)	(+)3	(+)86	61.6
		(+)32		(+)97	(+)14	
		(+)64				
TSA + RA	(-)	(+)61	(-)	(+)5	(+)90	62.7
		(+)33		(+)95	(+)10	
		(+)6				

3 讨论

组蛋白的乙酰化和去乙酰化与基因调控的研究为人们提供了一个基于染色质靶向治疗肿瘤的新思路,即通过抑制 HDAC 活性抑制肿瘤.目前人们已经研究发现了多种 HDAC^[3],如:正丁酸,丙戊酸, TSA, trapoxin (TPX), SAHA, 已知 TSA 对各种实体瘤和白血病细胞均有明显的抗癌作用^[4],可以加强维甲酸诱导 PLZF-RAR α APL 细胞分化的作用^[5].我们发现, PLZF-RAR α 阳性 U937 细胞对维甲酸不敏感,而联合应用 TSA 和维甲酸后,细胞的生长增殖受到抑制,核浆比例缩小,细胞表面 CD11b 表达增高,表明细胞发生了分化的趋向,这提示 TSA 加强了维甲酸的诱导分化作用.

组蛋白乙酰化是转录的一个重要步骤,可以使组

蛋白-DNA 结合松解,而使得各种因子容易接近 DNA.许多转录的抑制子和共抑制物都可以募集 HDAC 复合物到启动子区. t(11;17)(q23;q21) APL 涉及的 PLZF 及 RAR α 信号通路参与了生物发育,细胞的增生,分化及凋亡等多种生物学功能. PLZF 通过 BTB/POZ 募集 SMAT, N-CoR, HDAC 等核共抑制复合物,构成了一个调节造血细胞正常发育和参与白血病发生的网络.有报道 PLZF 是 RAR α 转录活性的负性调控子^[6]. RAR α 信号通路所调控的基因失调是 APL 发生的共同点. RARs 通过与共抑制子/共激活物相互作用来调控基因的转录,在调节造血细胞成熟尤其是髓系分化中起重要作用. PLZF-RAR α 融合蛋白来源于 PLZF 的 POZ 功能域和前 2 或 3 个锌指,以及 RAR α 基因的大部分功能域(B~F 功能域).与 PML-RAR α 相似, PLZF-RAR α 能以同二聚体的方式结合到 RARE 上,或经 POZ 功能域与 PLZF 或经 RAR α 部分与 RXR 形成异二聚体,改变 DNA 结合和转录活性,干扰正常的 PLZF 蛋白功能以及 RAR α -RXR-RA 途径.药理浓度 ATRA 仅能诱导 RAR α 部分的 E 区与 NCoR 解离,而 PLZF 部分的 POZ 结构域仍与 CoR 紧密结合,转录依然受到抑制.再加用 HDACi 如 TSA 等,可直接消除 POZ 位点上结合的 NCoR 复合物,使核小体组蛋白解除去乙酰化作用,其下游基因的转录作用得以恢复正常.

在本研究中, U937/PLZF 细胞有向粒系分化的趋势,这种趋势很弱.细胞核仁减少但是并未完全消失,提示细胞的分化还不是很完全.这有待于延长加药时间重复实验并借助于其它细胞功能分化标志进行判断.

【参考文献】

- [1] Ward JO, McConnell MJ, Carlile GW, et al. The acute promyelocytic leukemia-associated protein, promyelocytic leukemia zinc finger, regulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced monocytic differentiation of U937 cells through a physical interaction with vitamin D₃ receptor [J]. *Blood*, 2001, 98(12):3290-3300.
- [2] 陈思宇,刘陕西,李信民. 硫化砷诱导 K562 细胞凋亡中 Bcl-2 和 Bax 的表达 [J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(9):790-792.
- [3] Petrie K, Prodromou N, Zelent A. Histone deacetylase inhibitors in APL and beyond [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007, 313:157-203.
- [4] Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(9):769-784.
- [5] Petti MC, Fazi F, Gentile M, et al. Complete remission through blast cell differentiation in PLZF-RAR α -positive acute promyelocytic leukemia: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Blood*, 2002, 100(3):1065-1067.
- [6] Martin PJ, Delmotte MH, Formstecher P, et al. PLZF is a negative regulator of retinoic acid receptor transcriptional activity [J]. *Nucl Recept*, 2003, 1(1):6.