

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 对小鼠 T 淋巴瘤细胞 EL4 中 miR-150 表达及增殖的影响

肖刚峰 任富鹏

【摘要】 目的 探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACi)SAHA 对 EL4 细胞中 miR-150 表达及增殖的影响。方法 使用 HDACi SAHA 处理 EL4 细胞,定量 RT-PCR 法测定各组细胞中 miR-150 的表达水平,MTT 法测定各组细胞增殖能力。结果 经 HDACi SAHA 处理后,EL4 细胞中 miR-150 的表达随着 SAHA 剂量的增加而增加。经 HDACi SAHA 处理后,EL4 细胞增殖能力下降。结论 HDACi SAHA 能够恢复或提高小鼠 T 淋巴瘤细胞 EL4 中 miR-150 表达并抑制 EL4 细胞增殖。miR-150 在 EL4 细胞中表达可能受乙酰化修饰的调控,乙酰化修饰调控亦可能通过 miR-150 下调 EL4 细胞的增殖能力。

【关键词】 非特指型外周 T 细胞淋巴瘤 miR-150 EL4 细胞 组蛋白去乙酰化酶抑制剂

Effect of histone deacetylase inhibitor SAHA on expression of miR-150 and proliferation of EL4 cells XIAO Gangfeng, REN Fupeng. Department of Hematology and Oncology, Ningbo No. 2 Hospital, Ningbo 315010, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of histone deacetylase inhibitor (HDACi) SAHA on expression of miR-150 and proliferation of EL4 cells. **Methods** Quantitative RT-PCR was used to detect the expression of microRNA-150 in EL4 cells treated with HDACi SAHA. Cell proliferation was measured by MTT. **Results** The expression of miR-150 increased with the increase of SAHA dose. After treatment with SAHA, the proliferation ability of EL4 cells decreased. **Conclusion** Histone deacetylase inhibitor SAHA can increase the expression of microRNA-150 in EL4 cells and inhibit the cell proliferation, which may be associated with the down-regulation of acetylation modification by miR-150.

【Key words】 Peripheral T-cell lymphoma unspecified miR-150 EL4 cells Histone deacetylase inhibitor

非特指型外周 T 细胞淋巴瘤是一组异质性很强的淋巴系统恶性疾病,是常见的非霍奇金淋巴瘤亚型。其治疗进展缓慢,预后较差。非特指型外周 T 细胞淋巴瘤的发病机制迄今为止尚未得到完全阐明。miR-150 作为肿瘤抑制 miRNA 在多种恶性肿瘤中发生异常表达,介导多种肿瘤的发生、发展及转移^[1]。近年来有研究发现 miR-150 在 T 细胞淋巴瘤低表达^[2],但其低表达的原因尚不清楚。最新研究资料揭示,表观遗传可调控 microRNA 表达,且乙酰化修饰是重要的表观遗传修饰方式之一^[3-4]。我们推测表观遗传机制中的组蛋白去乙酰化酶的激活可能是抑制 microRNA 表达的原因,且研究亦发现组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, HDACi) 作为新型抗肿瘤药物在体内外均有抗肿瘤作用。辛二酰苯胺羟肟酸 (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) 是第二代氧肟酸类 HDACi, 本研究探讨 HDACi SAHA 对小鼠 T 淋巴瘤细胞 EL4 中 miR-150 表达的影响,以及对肿瘤细胞增殖的影响。

lase inhibitors, HDACi) 作为新型抗肿瘤药物在体内外均有抗肿瘤作用。辛二酰苯胺羟肟酸 (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) 是第二代氧肟酸类 HDACi, 本研究探讨 HDACi SAHA 对小鼠 T 淋巴瘤细胞 EL4 中 miR-150 表达的影响,以及对肿瘤细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料 小鼠淋巴瘤细胞(EL4)购于中国科学院上海细胞库。二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于美国 SIGMA 公司;1640 培养液购于 GIBCO 公司。胎牛血清购于中国科学院生物工程研究所。SAHA 购自美国 Sigma-Aldrich 公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit 购自 Applied Biosystems 公司。miR-150 引物、U6 引物由 Primer 5.0 设计并购自上海百力格生物技术有限公司。

1.2 方法

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.21.2018-2459
基金项目:宁波市自然科学基金资助项目(2014A610229)
作者单位:315010 宁波市第二医院血液肿瘤科
通信作者:肖刚峰,E-mail:4516661@qq.com

1.2.1 细胞培养 用含 10%胎牛血清的 1640 培养液培养 EL4 细胞,条件为 5%CO₂,37℃。

1.2.2 SAHA 处理 EL4 细胞 将 5×10⁵/ml EL4 细胞接种于 6 孔板各孔中,细胞进行无血清同步化处理后加入 0.25、0.5、1μmol/L SAHA 孵育 32h。将 SAHA 处理过的 EL4 细胞洗脱、离心,定量 RT-PCR 法测定细胞中 miR-150 的表达水平。

1.2.3 定量 RT-PCR 测定细胞中 miR-150 的表达水平 收集细胞,用 Trizol 提取总 RNA,分光光度计测定浓度。分别通过 miR-150 和 U6 特异性引物,利用 Taq-Man[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit 合成 cDNA,进行 qRT-PCR(ABI PRISM 7000 Sequence Detection System)。反应条件:95℃,10min;95℃,15s;60℃,60s;40 个循环;软件分析其 Ct 值,以 U6 作为内参,由公式 2^{-ΔΔCt} 计算 miR-150 在各组 EL4 细胞中的相对表达量。

1.2.4 MTT 法测定细胞增殖能力 收集各组细胞,制成细胞悬液并计数。再将等量细胞接种到 96 孔培养板,每孔加 MTT(5g·L⁻¹)10μl,培养 4h 后,吸弃上清液,再加入 DMSO(150μl),于微量振荡器充分振荡 10min,置酶标仪上于 490nm 处测吸光度(OD 值)。各组细胞的增殖率(%)=实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值×100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组细胞 miR-150 相对表达量比较 见表 1、图 1。

表 1 4 组细胞 miR-150 相对表达量比较

组别	miR-150 相对表达量
0.25μmol/L SAHA 组	2.236 ± 0.244
0.5μmol/L SAHA 组	3.266 ± 0.243*
1μmol/L SAHA 组	4.768 ± 0.610*
对照组	1.726 ± 0.472

注:与对照组比较,**P*<0.05

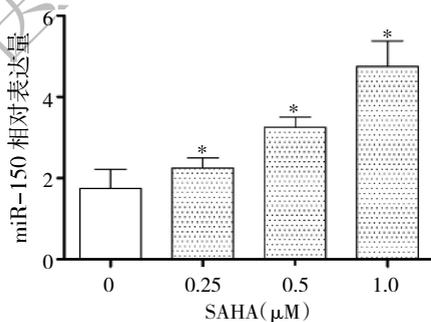


图 1 4 组细胞 miR-150 相对表达量比较(与对照组比较,**P*<0.05)

由表 1、图 1 可见,在使用 HDACi SAHA 来处理 EL4 细胞后,EL4 细胞中 miR-150 的表达增加(均 *P*<0.05),且随着 SAHA 剂量的增加而增加。

2.2 4 组细胞增殖情况比较 见表 2、图 2。

表 2 4 组细胞增殖情况比较

组别	OD 值	增殖率(%)
0.25μmol/L SAHA 组	0.2150 ± 0.0321*	81.66
0.5μmol/L SAHA 组	0.1642 ± 0.0241*	62.36
1μmol/L SAHA 组	0.1353 ± 0.0362*	51.38
对照组	0.2633 ± 0.0261	100

注:与对照组比较,**P*<0.05

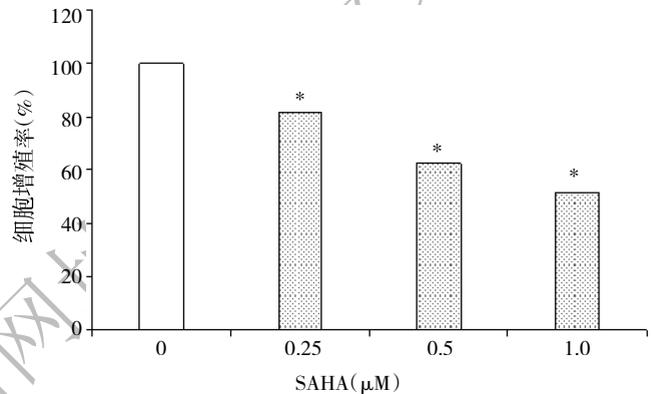


图 2 4 组细胞增殖情况比较(与对照组比较,**P*<0.05)

由表 2、图 2 可见,在使用 HDACi SAHA 来处理 EL4 细胞后,EL4 细胞增殖能力下降(均 *P*<0.05)。

3 讨论

非特指型外周 T 细胞淋巴瘤是一组异质性很强的 T 细胞恶性肿瘤,其确切的发病机制尚未阐明。积极探索本病的发病机制,不仅具有重要的理论意义,而且可能为本病的诊断与治疗提供新的策略。miRNA 是一类非蛋白编码小分子 RNA,根据其在 T 淋巴细胞分化以及 B 细胞淋巴瘤的研究成果^[5-7],可以推测 miRNA 在外周 T 细胞淋巴瘤发病中同样发挥着重要的作用。miR-150 是长度为 22 个核苷酸的单链小分子 RNA,参与免疫系统和造血系统发生、胚胎发育以及干细胞分化的调节^[8-10]。近年来研究发现,miR-150 作为肿瘤抑制性 microRNA 参与包括外周 T 细胞淋巴瘤在内的多种恶性肿瘤的发生、发展^[11-12]。在淋巴及造血系统恶性肿瘤中,其多为低表达。作为肿瘤抑制物,miR-150 的低表达使得细胞分化凋亡异常,参与了恶性淋巴瘤的发生、发展。

HDACi 是一类具有抗肿瘤活性的新型药物,研究

发现其在体内外均有抗肿瘤作用,目前已应用于皮肤 T 细胞淋巴瘤^[13-14]。其抗肿瘤作用的分子机制尚不清楚,存在许多问题尚待进一步阐明。我们推测其可能通过恢复或提高关键肿瘤抑制因子如 miR-150 等表达来起作用。为此,我们使用 HDACi SAHA 来处理小鼠 T 淋巴瘤 EL4 细胞,发现 EL4 细胞 miR-150 的表达随着 SAHA 剂量的增加而增加,表明 miR-150 的表达可能受到乙酰化修饰的调控,但具体机制有待进一步研究。比如可以通过分析组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)与组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferases, HATs)的变化,同时结合阻断策略来检测 miR-150 的表达变化,间接验证对 miR-150 的调控影响。其次,可以用免疫共沉淀技术等方法来直接验证与 miR-150 的关系,以明确 miR-150 乙酰化修饰调控的具体机制。在本研究中,我们同时进一步对经 HDACi SAHA 处理后的 EL4 细胞增殖能力进行了观察,发现经 HDACi SAHA 处理后,EL4 细胞增殖能力下降,SAHA 抗增殖能力呈剂量依赖可能。HDACi 下调 EL4 细胞的增殖能力,我们推测其部分机制可能是通过恢复或提高 miR-150 的表达来实现。

综上所述,本研究提示,SAHA 作为 HDACi 能够恢复或提高 miR-150 的表达并有效抑制小鼠 T 淋巴瘤细胞增殖。本实验结果丰富了对 HDACi 作用机制的认识,为 SAHA 应用于非特指型外周 T 细胞淋巴瘤的临床治疗提供一定的理论依据。

4 参考文献

- [1] Aherne ST, Madden SF, Hughes DJ, et al. Circulating miRNAs miR-34a and miR-150 associated with colorectal cancer progression[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15:329. DOI: 10.1186/s12885-015-1327-5.
- [2] Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, et al. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma [J]. *Leukemia*, 2011, 25(8):1324-1334. DOI: 10.1038/leu.2011.81.
- [3] Kunej T, Godnic I, Ferdin J, et al. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature[J]. *Mutat Res*, 2011, 717(1-2):77-84. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008.
- [4] Morales S, Monzo M, Navarro A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression[J]. *Biomol Concepts*, 2017, 8(5-6): 203-212. DOI: 10.1515/bmc-2017-0024.
- [5] Li QJ, Chau J, Ebert PJ, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection[J]. *Cell*, 2007, 129:147-161. DOI: 10.1016/j.cell.2007.03.008.
- [6] Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, et al. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system [J]. *Genome Biol*, 2005, 6:R71. DOI: 10.1186/gb-2005-6-8-r71.
- [7] Lawrie CH. MicroRNA expression in lymphoid malignancies: new hope for diagnosis and therapy?[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(5A): 1432-1444. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00399.x.
- [8] Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential[J]. *Cell*, 2001, 107(7):823-826. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00616-X.
- [9] Lu J, Guo S, Ebert BL, et al. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors[J]. *Developmental Cell*, 2008, 14 (6): 843-853. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.03.012.
- [10] Edelstein LC, Bray PF. MicroRNAs in platelet production and activation[J]. *Blood*, 2011, 117 (20): 5289-5296. DOI: 10.1111/jth.12214.
- [11] Ito M, Teshima K, Ikeda S, et al. MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6, in advanced cutaneous T-cell lymphoma[J]. *Blood*, 2014, 123:1499-1511. DOI: 10.1182/blood-2013-09-527739.
- [12] Abe F, Kitadate A, Ikeda S, et al. Histone deacetylase inhibitors inhibit metastasis by restoring a tumor suppressive microRNA-150 in advanced cutaneous T-cell lymphoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 31, 8(5):7572-7585. DOI: 10.18632/oncotarget.13810.
- [13] Bubna AK. Vofinostat—An Overview[J]. *Indian J Dermatol*, 2015, 60(4):419. DOI: 10.4103/0019-5154.160511.
- [14] Ceccacci E, Minucci S. Inhibition of histone Deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia[J]. *Br J Cancer*, 2016, 114(6):605-611. DOI: 10.1038/bjc.2016.36.

(收稿日期:2019-11-08)

(本文编辑:沈昱平)

(上接第 2277 页)

cell function, and insulin resistance in relation to vitamin D status after gestational diabetes mellitus[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2017, 96(7):821-827. DOI: 10.1111/aogs.13124.

- [17] Arnold DL, Enquobahrie DA, Qiu C, et al. Early pregnancy maternal Vitamin D concentrations and risk of gestational diabetes mellitus[J]. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2015, 29(3):200-210. DOI: 10.1111/ppe.12182.

- [18] Deleskog A, Hilding A, Brismar K, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D level predicts progression to type 2 diabetes in individuals with prediabetes but not with normal glucose tolerance [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(6):1668-1678. DOI: 10.1007/s00125-012-2529-x.

(收稿日期:2019-03-25)

(本文编辑:沈昱平)