

HDACi 诱导 B 细胞淋巴瘤表达 CD47 分子机制研究

邓思宇, 彭程, 黄传新

(上海市免疫学研究所 上海交通大学医学院, 上海 200025)

摘要: 研究探讨 B 细胞淋巴瘤中组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)调控 CD47 表达及相关分子机制。课题组对小鼠 B 淋巴瘤细胞系 A20 进行不同剂量和不同时间长度的广谱 HDACi (Vorinostat, SAHA) 处理后, 流式细胞术检测细胞表面 CD47 分子表达水平。随后用 TRIzol 法提取经 SAHA 处理的小鼠和人源 B 淋巴瘤细胞系样本中总 mRNA, 检测 *CD47* 转录水平。为进一步研究 HDACi 调控 CD47 表达的分子机制, 课题组采用染色质免疫共沉淀法检测 H3K4ac、H3K9ac 和 H3K27ac 与 *CD47* DNA 启动子区域的结合情况。最后在 SAHA 和 BRD4 特异性抑制剂 JQ1 的联合处理下, 通过流式细胞术检测淋巴瘤细胞中 CD47 表达水平变化。研究发现 CD47 的蛋白质水平及 mRNA 水平均与 SAHA 处理时间和作用剂量呈正相关性。而在 CD47 启动子区域, H3K4、H3K9 和 H3K27 的乙酰化水平在 SAHA 处理后都有显著提高。此外, SAHA 和 JQ1 的联合使用能够显著抑制 SAHA 单独作用时对 CD47 的上调。以上结果说明 SAHA 通过增强 *CD47* 启动子区域所结合组蛋白的乙酰化水平, 促进基因的转录表达, 上调了 *CD47* 的 mRNA 和蛋白质水平, 而抑制 BRD4 可以逆转 SAHA 对 *CD47* 的上调作用。

关键词: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 转录调控; CD47; BET 抑制剂

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)01-0012-06

组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)作为表观遗传调控类的抗肿瘤药物, 是未来极具发展前景的抗肿瘤药物之一, 尤其在淋巴瘤和实体瘤治疗领域更是被国内外学者广泛关注。HDACi 通过增加染色质特定区域内组蛋白的乙酰化水平, 提高相关抑癌基因的表达水平等途径, 抑制肿瘤细胞增殖, 诱导其分化和(或)凋亡^[1]。HDACi 已成为肿瘤靶向治疗领域的研究热点, 它具有对肿瘤细胞相对较高的选择性和低毒性等优点。目前处于临床研究阶段的 HDACi 超过 10 种, 其对 T 细胞淋巴瘤的临床治疗效果尤其显著^[2-3]。但是, 对 B 细胞淋巴瘤的临床治疗效果具有一定的局限性^[4], 许多患者没有显示出好的疗效并最终复发。此外, HDACi 作为一种新开发的抗肿瘤药物, 多数研究并未深入。由此, 阐明 B 细胞淋巴瘤对 HDACi 的耐受机制将是 B 细胞淋巴瘤临床治疗领域的一个新发现。

在肿瘤的发生发展过程中, 其可以逃避机体免疫系统的监视。CD47 是一种在细胞表面广泛表达

的跨膜糖蛋白, 可与信号调节蛋白 α (signal regulatory protein α , SIRP α)、血小板反应蛋白 1(thrombospondin 1, TSP1)以及整合素相互作用, 介导细胞凋亡、增殖以及免疫应答等一系列反应。其中 SIRP α 作为抑制性受体信号调节蛋白表达在吞噬细胞表面, 当其与 CD47 结合后, 可抑制巨噬细胞的吞噬功能^[5]。机体内年轻红细胞表面表达较高水平的 CD47, 向巨噬细胞释放“自己人, 别吃我”的信号, 而衰老红细胞中 CD47 表达水平逐渐下调, 最终被巨噬细胞清除^[6]。近年来越来越多的研究表明, CD47 在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用。多种肿瘤细胞通过上调 CD47 表达水平, 发出“别吃我”信号, 从而逃避机体免疫细胞的应答反应, 促进肿瘤的发生发展。由此 CD47 作为免疫耐受的关键调节分子, 是研究 B 细胞淋巴瘤对 HDACi 耐受机制的潜在目标蛋白。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞和试剂 小鼠 B 淋巴瘤细胞系 A20、人源 B 淋巴瘤细胞系 OCI-LY1、OCI-LY7、SUDHL4、HBL1、Raji、DOHH2 和 U2392, 获赠于 Ari Melnick 实验室; HDACi SAHA、Trichostatin A(TSA)和 Panobinostat(LBH589)以及 BRD4 抑

收稿日期: 2018-01-04

基金项目: 上海市浦江人才计划基金(5PJ1407400)

作者简介: 邓思宇(1992-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫研究

通信作者: 黄传新(E-mail: Huangcx@shsmu.edu.cn)

制剂 JQ1, 购自美国 Selleck 公司; 抗 CD47-别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 抗体及其流式同型对照抗体, 购自美国 eBioscience 公司; DAPI, 购自美国 Thermo Scientific 公司; H3K4ac、H3K9ac 和 H3K27ac 抗体, 购自美国 Active Motif 公司; RPMI 1640 培养液、IMDM 培养液、FCS、青霉素、链霉素和谷氨酰胺, 均购自美国 Gibco 公司; HEPES 缓冲液, 购自美国 Hyclone 公司; β -巯基乙醇, 购自美国 AMRESCO 公司; TRIzol, 购自美国 Ambion 公司; 反转录和 Real-time PCR 试剂盒, 购自日本 TaKaRa 公司; 多聚甲醛溶液, 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; Protein A/G 磁珠, 购自美国 Santa Cruz 公司。

1.1.2 引物 用于荧光定量 PCR 的引物及序列见表 1, 用于 CD47 CHIP qPCR 检测的引物及序列见表 2。

表 1 荧光定量 PCR 引物

基因	引物序列(5'→3')
<i>mCD47</i>	F: AAATGGATAAGCGCGATGCC R: GGCTGATCCTTGGTCAGTGT
<i>hCD47</i>	F: TCCGGTGGTATGGATGAGAAA R: ACCAAGGCCAGTAGCATTCTT
<i>mActin</i>	F: TCCGGCACTACCGAGTTATC R: GATCCGGTGTAGCAGATCGC
<i>hActin</i>	F: GTTGAGAACCGTGTACCATGT R: TTCCACAATTTGGCAAGAGC
18S	F: GTAACCCGTTGAACCCATT R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG

表 2 CD47 CHIP qPCR 检测引物

引物位置(TSS=0)	引物序列(5'→3')
-1 678~-1 345	F: CGCTCAGAGAATAGCACTCAA R: TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
-1 149~-850	F: TAGCCAGTGTAGCAGCAATC R: GGAGGGAGTGGTTATTTCCCTTAG
-649~-350	F: TCCAGAAGTGGACCTCCTTAT R: CCCTTTCTCTCTCGTGGTTT

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 小鼠 B 淋巴瘤细胞系 A20 培养于 RPMI 1640 完全培养液 (含 10% FCS、100 μ g/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 β -巯基乙醇); 人源 B 淋巴瘤细胞系 OCI-LY1 和 OCI-LY7 培养于

IMDM 完全培养液 (含 10% FCS、100 μ g/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素); SUDHL4、Raji、DOHH2 和 U2392 等细胞系培养于 RPMI 1640 完全培养液 (含 10% FCS、100 μ g/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、2 mmol/L 谷氨酰胺和 10 mmol/L HEPES)。以上细胞都培养于 5% CO₂、37 °C 恒温细胞培养箱中。

1.2.2 流式细胞术 取 (1~2) $\times 10^6$ 个细胞样本用 PBS 洗涤后重悬于 200 μ L FACS 溶液 (配方) 中, 按 1 : 500 加入抗小鼠 CD47 流式抗体及其相应的同型对照抗体 (IgG-APC), 4 °C 避光孵育 45 min。PBS 洗涤 2 次后, 重悬于 200 μ L DAPI 稀释液 (1 : 1 000 稀释于 FACS 溶液中), 利用 Fortessa X-20 检测 CD47 的表达。

1.2.3 RT-PCR 用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。取 500 ng RNA 利用转录试剂盒反转录合成 cDNA。再根据 Real-time PCR 试剂盒说明书提示对 CD47 mRNA 进行荧光定量检测, 其相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

1.2.4 染色质免疫共沉淀与定量 PCR 细胞样本经 1% 多聚甲醛固定后, 用 0.125 mol/L 甘氨酸终止反应。将固定的细胞用超声波破碎至 300~500 bp 大小片段, 用 30 μ L Protein A/G 磁珠与细胞裂解液共孵育 2 h 去除非特异性结合的染色质。加入 2~5 μ g H3K4ac、H3K9ac、H3K27ac 和对照 IgG 过夜反应, 免疫共沉淀目的蛋白-DNA 复合物。再用 30 μ L Protein A/G 磁珠富集蛋白-DNA 复合物, 经充分洗涤后用洗脱液洗脱免疫共沉淀的蛋白-DNA 复合物并于 65 °C 水浴锅中过夜解交联, 解交联的 DNA 经纯化后用 Real-time PCR 定量检测, 根据 Input 计算富集程度。

1.2.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验或者方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HDACi 上调 A20 细胞表面 CD47 蛋白表达水平 SAHA 作为首个获得美国 FDA 批准上市的 HDACi 药物, 于 2006 年被批准用于紧急治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤^[7]。本研究用 SAHA 对 A20 细胞进行不同浓度和不同时间的处理, 发现 CD47 蛋白表达水平的上调与 SAHA 的使用剂量和处理时间有关, 其中 1 μ mol/L SAHA 处理 48 h 时 CD47 的上

调幅度最大(图 1A、1B)。为避免药物的脱靶效应,研究者还选择了其他两种 HDACi 即 TSA 和 LBH589,这两种 HDACi 都能抑制 I 类和 II 类

HDAC,同法处理 A20 细胞后 CD47 的表达水平也有所增加(图 1C)。

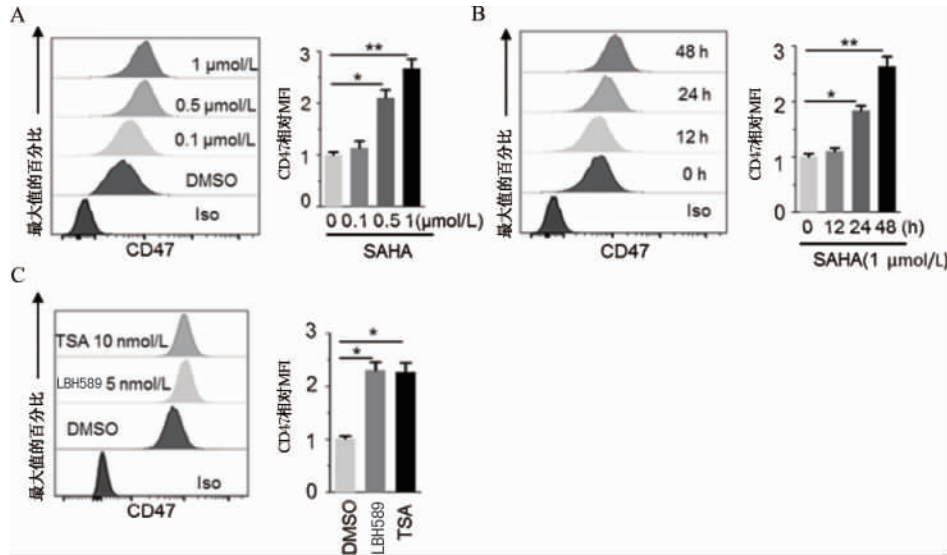


图 1 HDACi 对 B 细胞淋巴瘤中 CD47 蛋白表达水平的影响

注:流式细胞术检测 A20 细胞表面 CD47 蛋白的表达。取 1×10^6 个 A20 细胞铺于 6 孔板中, A. 分别加入 0.1 μmol/L、0.5 μmol/L 和 1 μmol/L SAHA 以及二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)培养细胞 48 h; B. 加入 1 μmol/L SAHA 分别培养细胞 0、12、24 和 48 h; C. 分别加入 10 nmol/L TSA 和 5 nmol/L LBH589 培养 48 h。对 CD47 蛋白的相对 MFI 进行统计, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 SAHA 提高 A20 细胞中 CD47 mRNA 水平 蛋白质水平的变化受到转录、转录后、翻译后等多层面调控机制影响,而 mRNA 水平的检测最为简单直观。研究者用 1 μmol/L SAHA 分别处理 A20 细胞 0、6、12 和 24 h 后,提取总 RNA 进行反转录荧光定量 PCR 检测。当处理时间为 12 h 时,CD47 的 mRNA 水平已经显著上升(图 2A)。除 A20 细胞系外,研究者还对其他 7 种人源 B 淋巴瘤细胞系进行了同样条件的 SAHA 处理。将每种细胞系经 SAHA 和 DMSO 处理(对照组)后 CD47 mRNA 表达的比值进行统计,除 OCI-LY7 细胞系,大部分细胞的 CD47 mRNA 水平都显著升高(图 2B)。这说明 SAHA 对 B 淋巴瘤细胞 CD47 蛋白的上调作用发生在翻译后调控之前。

2.3 SAHA 增强 CD47 启动子区域组蛋白乙酰化水平 HDAC 将组蛋白氨基末端特定的赖氨酸残基上的乙酰基移除后,使组蛋白与带负电荷的 DNA 紧密结合,染色质致密卷曲,基因的转录受到抑制。此外,许多非组蛋白类蛋白质的去乙酰化作用也受到 HDAC 的调节。而 HDACi 能够有效抑制 HDAC 的去乙酰化作用,使得基因表达活性增强。本研究通过染色质免疫共沉淀实验检测 SA-

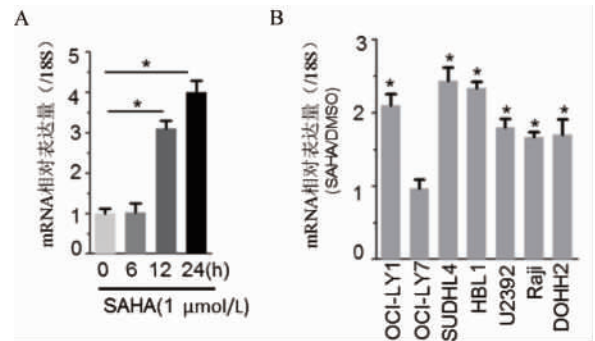


图 2 SAHA 对 B 淋巴瘤细胞系中 CD47 mRNA 水平的影响

注:SYBR 荧光定量 PCR 法检测淋巴瘤细胞系中 CD47 的 mRNA 表达情况。取 1×10^6 个 B 淋巴瘤细胞铺于 6 孔板中, A. 在 A20 细胞中加入 1 μmol/L SAHA 分别培养 0、6、12 和 24 h; B. 分别在 OCI-LY1、OCI-LY7、SUDHL4、HBL1、U2392、Raji 和 DOHH2 细胞中加入 1 μmol/L SAHA 培养 24 h。通过荧光定量 PCR 检测 CD47 mRNA 相对表达量并进行统计分析, * $P < 0.05$

HA 对 CD47 转录水平的影响。据文献报道, H3K4、H3K9 和 H3K27 这 3 个组蛋白赖氨酸位点的乙酰化水平与基因启动子的活动密切相关^[8-10]。本研究用 H3K4ac、H3K9ac、H3K27ac 和同型对照 IgG 沉淀蛋白-DNA 复合物。根据 CD47 基因序列,以转录起始位点 TSS 为原点,向 5'UTR 区延

伸 2 000 bp 序列设计 3 段引物, 对纯化的 DNA 模板进行荧光定量 PCR 分析。H3K4、H3K9 和 H3K27 在 *CD47* TSS 上游 -1 678~-850 bp 的乙酰化水平较高, 在 SAHA 作用下, 乙酰化水平均有不同程度上调(图 3A~3C)。这说明 SAHA 通过直接增强 H3K4、H3K9 和 H3K27 在 *CD47* 启动子区域的乙酰化水平, 增强了 *CD47* 的表达。

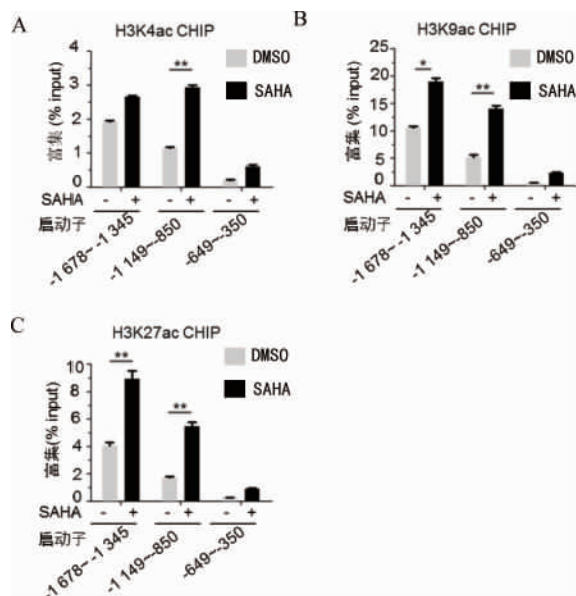


图 3 *CD47* 在 SAHA 作用下的转录情况

注:染色质免疫共沉淀实验和荧光定量 PCR 检测 *CD47* 启动子区域组蛋白乙酰化水平。5×10⁶ 个 A20 细胞铺于 25 mL 培养瓶中。分别加入 DMSO 和 1 μmol/L SAHA 培养 9 h, 固定终止后加入 A. H3K4ac, B. H3K9ac 和 C. H3K27ac 抗体检测与其作用的 DNA 即 *CD47* 表达情况。* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2.4 BRD4 介导 SAHA 对 *CD47* 的上调作用 组蛋白的乙酰化和去乙酰化是个动态过程, 主要涉及 3 个重要成员: Writer、Reader 和 Eraser。其中 Reader 是识别乙酰化位点启动下游反应的关键执行者, 主要由 BET 家族构成。BRD4 作为 BET 家族中的重要成员, 通常结合在高度乙酰化的染色质区域, 通过招募转录延长因子复合物(transcription elongation factor, TEFb)至增强子或者启动子区域以促进基因的快速转录^[11-13]。已有文献报道, BRD4 在乳腺癌细胞系中参与了 *CD47* 的表达调控, 加入 BRD4 抑制剂 JQ1 后, 肿瘤细胞中 *CD47* 的转录减少了, *CD47* 蛋白的表达水平也降低^[14]。而 BRD4 抑制剂也是当前进入临床试验阶段的最有前景的肿瘤治疗新药之一。本研究使用 JQ1 和 SAHA 共同处理 A20 细胞, 以验证 SAHA 对 *CD47* 的转录调控作用是否同时受到 BRD4 的影

响。JQ1 单独处理 A20 细胞时, 对细胞中 *CD47* 的表达影响不大。但 JQ1 和 SAHA 联合使用时, 由 SAHA 上调的 *CD47* 的表达被 JQ1 显著抑制(图 4)。

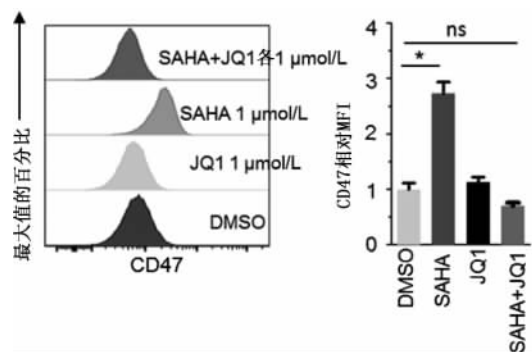


图 4 BRD4 与 SAHA 共同作用对 A20 细胞中 *CD47* 蛋白表达水平的影响

注:流式细胞术检测 A20 细胞 *CD47* 表达情况。取 1×10⁶ 个 A20 细胞铺于 6 孔板中, 分别加入 DMSO、SAHA、JQ1 以及 SAHA+JQ1 培养 24 h, 其中共处理组中 JQ1 较 SAHA 提前 2 h 加入。对 *CD47* 蛋白的相对 MFI 进行统计,* *P* < 0.01, ns: 差异无统计学意义

3 讨论

与其他基于表观遗传的治疗策略一样, HDACi 会引起肿瘤细胞基因转录的改变, 因此预测在多数类型肿瘤治疗中都会有一定效果。HDACi 可通过增加细胞内组蛋白乙酰化水平, 抑制肿瘤细胞增殖, 诱导细胞分化和(或)凋亡, 已成为肿瘤靶向治疗的研究新热点。其对肿瘤细胞迁移、侵袭、转移的抑制作用和抗肿瘤血管生成作用也被证实^[15]。目前用于临床使用的 HDACi 有 Romidepsin、PXD101、LBH589 和 SAHA 等, 主要用于治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤、外周 T 细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤等。而对其在非小细胞肺癌、急性髓系白血病和卵巢癌等多种肿瘤治疗中的研究已经在临床 II 期或者 III 期试验阶段^[16]。但是 HDACi 在 B 细胞淋巴瘤的治疗上存在一定的限制, 已有报道显示不同肿瘤对 HDACi 的耐药机制不尽相同。在实体瘤例如乳腺癌中, HDACi 促进了由 BRD4 介导的白血病抑制性因子受体的表达, 激活了 JAK1-STAT3 信号通路, 从而限制了 HDACi 在肿瘤细胞中的作用^[17]。除了对肿瘤本身的影响, HDACi 对肿瘤免疫的调控也是重要的研究方向。

作为一个新兴的免疫检查点蛋白^[18], *CD47* 在免疫系统中发挥的重要作用越来越受到关注。除了为肿瘤细胞提供免疫逃逸的“别吃我”信号以有效躲

避巨噬细胞的吞噬作用, CD47 被阻断后 DC 吞噬肿瘤细胞并提呈相关抗原, 进而使 CD8⁺ T 淋巴细胞发挥肿瘤杀伤作用^[19]。本研究以 B 细胞淋巴瘤为研究对象, 在体外对其进行 HDACi 处理, 发现细胞表面 CD47 蛋白表达水平明显上调, 且 CD47 的 mRNA 无论是在小鼠还是 B 淋巴瘤细胞系中经 SAHA 处理后都提高了。考虑到 HDACi 主要通过抑制组蛋白去乙酰化而发挥作用, 研究者检测了对 A20 细胞进行 SAHA 处理后, H3K4、H3K9 和 H3K27 在 CD47 启动子区域的乙酰化水平, 发现均有所增加。这说明 SAHA 是通过抑制 H3K4、H3K9 和 H3K27 在 CD47 启动子区域的去乙酰化来增强 CD47 启动子区域的乙酰化水平, 从而促进了 CD47 的转录。而 BRD4 作为转录调节的重要参与者, 对组蛋白乙酰化和去乙酰化的动态过程具有重要影响。在一些血液系统肿瘤中, 包括多发性骨髓瘤、急性粒细胞白血病和急性淋巴细胞白血病等, MYC 和许多其他癌基因的异常表达需要 BRD4 的介导^[20]。这里研究者用 1 μmol/L JQ1 处理 A20 细胞时, CD47 的表达并没有受到明显影响, 但是和 SAHA 联合作用时, 由 SAHA 上调的 CD47 表达水平被明显逆转了。

而 HDACi 和 BETi 的联合使用在多种肿瘤的研究中显示了超越单药的治疗效果。例如在非小细胞肺癌中, 选择性地抑制 HDAC 和 BET 蛋白能够调控相关免疫细胞的抗肿瘤功能: 增强 CTL 的功能, 减少抑制性 Treg 活性等^[21]。在 B 细胞淋巴瘤中 SAHA 作用下 CD47 的上调很可能是 SAHA 在 B 细胞淋巴瘤治疗中作用受限的原因之一。针对肿瘤细胞中上调的 CD47 相对直接有效的方法是用 CD47 抗体阻断治疗。但是经抗体治疗后, 高表达 CD47 的红细胞枯竭会造成短暂性的贫血^[22]。虽然该不良反应在临床上较好控制, 但是 CD47 抗体治疗是否真的对正常组织没有伤害, 是目前最为重要的一个问题。SAHA 和 JQ1 的联用可以避免 SAHA 在 B 细胞淋巴瘤治疗中对 CD47 的诱导表达, 为 B 细胞淋巴瘤对 SAHA 治疗的耐药性提供了新的解决办法。而这两种药物都是在临床开发中最具潜力的抗肿瘤药物, 联合 SAHA 和 JQ1 为 B 细胞淋巴瘤的治疗提供了新思路。

参考文献

- [1] Chueh AC, Tse JW, Tögel L, *et al.* Mechanisms of histone deacetylase inhibitor-regulated gene expression in cancer cells [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 23(1): 66-84.
- [2] Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(32): 5459-5468.
- [3] Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors; Potential in cancer therapy[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107: 600-608.
- [4] Joosten M, Ginzel S, Blex C, *et al.* A novel approach to detect resistance mechanisms reveals FGR as a factor mediating HDAC inhibitor SAHA resistance in B-cell lymphoma [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(8): 1232-1244.
- [5] Sick E, Jeanne A, Schneider C, *et al.* CD47 update: A multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 167(7): 1415-1430.
- [6] Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, *et al.* Role of CD47 as a marker of self on red blood cells[J]. *Science*, 2000, 288(5473): 2051-2054.
- [7] Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, *et al.* Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(21): 3109-3115.
- [8] Guillemette B, Drogaris P, Lin HH, *et al.* H3 lysine 4 is acetylated at active gene promoters and is regulated by H3 lysine 4 methylation[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(3): e1001354.
- [9] Nishida H, Suzuki T, Kondo S, *et al.* Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell[J]. *Chromosome Res*, 2006, 14(2): 203-211.
- [10] Tie F, Banerjee R, Stratton CA, *et al.* CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing [J]. *Development*, 2009, 136(18): 3131-3141.
- [11] Itzen F, Greifenberg AK, Bösken CA, *et al.* Brd4 activates P-TEFb for RNA polymerase II CTD phosphorylation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(12): 7577-7590.
- [12] Jonkers I, Lis JT. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(3): 167-177.
- [13] Yang Z, Yik JH, Chen R, *et al.* Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4[J]. *Mol Cell*, 2005, 19(4): 535-545.
- [14] Betancur PA, Abraham BJ, Yu YY, *et al.* A CD47-associated super-enhancer links pro-inflammatory signalling to CD47 upregulation in breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14802.
- [15] Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(9): 673-691.
- [16] Halsall JA, Turner BM. Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy: An evolutionarily ancient resistance response may explain their limited success [J]. *Bioessays*, 2016, 38(11): 1102-1110.
- [17] Zeng H, Qu J, Jin N, *et al.* Feedback activation of leukemia

- inhibitory factor receptor limits response to histone deacetylase inhibitors in breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(3): 459-473.
- [18] 赵磊, 方芳, 陈琪. 免疫检查点抑制剂及联合放疗对肿瘤治疗的进展[J]. *现代免疫学*, 2018, 38(2): 170-174.
- [19] Liu X, Pu Y, Cron K, *et al.* CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors[J]. *Nat Med*, 2015, 21(10): 1209-1215.
- [20] Da Costa D, Agathangelou A, Perry T, *et al.* BET inhibition as a single or combined therapeutic approach in primary paediatric B-precursor acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Blood Cancer J*, 2013, 3(7): e126.
- [21] Adeegbe DO, Liu Y, Lizotte PH, *et al.* Synergistic immunostimulatory effects and therapeutic benefit of combined histone deacetylase and bromodomain inhibition in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(8): 852-867.
- [22] McCracken MN, Cha AC, Weissman IL. Molecular pathways: Activating T cells after cancer cell phagocytosis from blockade of CD47 "Don't Eat Me" signals[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(16): 3597-3601.

Studies on the molecular mechanisms of HDACi mediated CD47 upregulation in B cell lymphoma

DENG Si-yu, PENG Cheng, HUANG Chuan-xin (*Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China*)

Abstract: This study focused on the mechanism of CD47 expression mediated by histone deacetylase inhibitor (HDACi) in B-cell lymphoma. After treatment with HDACi (SAHA) of different doses for different time courses, cell surface expression of CD47 in mouse B lymphoma cell line A20 was detected by FACS. Then TRIzol was used to extract RNA from SAHA-treated mouse and human B lymphoma cell lines for determination of CD47 mRNA levels. In order to explore the underlying molecular mechanisms, we used chromatin immunoprecipitation assay to detect the binding of H3K4ac, H3K9ac and H3K27ac at the promoter region of *CD47*. Finally, CD47 levels were measured by FACS after combined treatment with SAHA and BRD4 inhibitor JQ1. The results showed that the levels of CD47 protein and mRNA were positively correlated with the dose of SAHA and time of treatment. Moreover, the acetylation levels of H3K4, H3K9 and H3K27 at the promoter region of *CD47* were significantly increased by SAHA treatment. The combined use of SAHA and JQ1 significantly reversed the up-regulated CD47 by SAHA. Taken together, SAHA up-regulates *CD47* expression through enhancement of its transcription, while inhibition of BRD4 can reverse SAHA-mediated *CD47* up-regulation.

Key words: histone deacetylase inhibitor; transcriptional regulation; CD47; BET inhibitor