

网络出版时间: 2019-5-30 10:52 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190529.1441.004.html>

EZH2 抑制剂 DZNep 对 NK/T 淋巴瘤细胞增殖、 凋亡及细胞周期的影响

张 梓 夏莎莎 夏瑞祥

摘要 目的 探讨果蝇 Zeste 基因增强子人类同源物 2 (EZH2) 抑制剂 DZNep (3-deazaneplanocin) 对人 NK/T 淋巴瘤细胞株 SNK-6 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响。方法 不同浓度 DZNep 作用 SNK-6 细胞后,用 CCK-8 法测细胞增殖抑制率,用 PI 染色流式细胞术测细胞周期,用 Annexin V/PI 双染流式细胞术测细胞凋亡率;用 Western blot 检测 Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 以及 EZH2 蛋白表达量。结果 DZNep 能下调 EZH2 蛋白水平,抑制 SNK-6 细胞的增殖,诱导 G1/S 期阻滞,诱导细胞凋亡,并促进 Cleaved Caspase-3 及 Cleaved PARP 的表达增加。结论 DZNep 能在体外抑制 SNK-6 细胞的增殖、诱导 G1/S 期阻滞及细胞凋亡。
关键词 鼻腔 NK/T 淋巴瘤; EZH2; DZNep; 细胞增殖; 凋亡; 细胞周期
中图分类号 R 733.4
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)06-0851-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.004

人 NK/T 淋巴瘤是一种特殊类型的非霍奇金淋巴瘤,以鼻和面部中线部位破坏为主要表现,且有明显的地域和种族易感性,多发于亚洲及南美洲,具有侵袭性高、预后差、复发率高等特点^[1]。果蝇 Zeste 基因增强子人类同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 是多梳抑制复合体 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 中的核心亚基,具有组蛋白甲基化酶活性,能催化组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化 (trimethylation of histone H3 lysine27, H3K27me3),在表观遗传学水平调控基因的表达^[2]。而 EZH2 抑制剂 DZNep (3-deazaneplanocin) 作为 EZH2 蛋白的靶向抑制剂,能抑制 EZH2 的组蛋白甲基化酶活性,并能降解 EZH2 蛋白^[3]。最新研究证实, EZH2 在 NK/T 淋巴瘤组织中表达显著增高,且与肿瘤细胞的异常增殖密切相关^[4]。目前,在对 NK/T 淋巴瘤的研究中,针对 EZH2 的靶向治

疗鲜有报道,据此,该研究拟用 EZH2 抑制剂 DZNep 作用人 NK/T 淋巴瘤细胞株 SNK-6,观察其对 EZH2 蛋白水平的影响以及对 SNK-6 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响,进而为该肿瘤的靶向治疗提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人 NK/T 淋巴瘤细胞 SNK-6 细胞株购自上海信裕生物科技有限公司。

1.1.2 药品与主要试剂 DZNep 购自美国 APEX-BIO 公司,以 DMSO 溶解储存备用; RPMI 1640 培养液、胎牛血清购自美国 HyClone 公司; CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒、PI 染色细胞周期检测试剂盒均购自上海贝博公司; 兔抗人 EZH2、Cleaved PARP 单克隆抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 兔抗人 Cleaved Caspase-3 抗体购自英国 Abcam 公司; 兔抗人 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 均购自武汉赛维尔科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 NK/T 淋巴瘤细胞株 SNK-6 置于含 10% 胎牛血清及 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,细胞呈悬浮生长,每 2~3 d 换液并传代,取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖 将 SNK-6 细胞以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中,用不同浓度 (0.2、0.5、1、2、5 μ mol/L) DZNep 处理细胞,同时设对照组 (不加药物,加入等量 DMSO) 及空白组 (只含培养液,无细胞),每组设 3 个复孔,培养 24、48、72 h 后,加入 CCK-8 溶液,在培养箱孵育 2 h 后,用酶标仪测出波长为 450 nm 的吸光度 (A_{450}) 值。实验重复 3 次,取平均值,根据公式计算细胞增殖抑制率 (%) = $[1 - (A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$,以药物浓度为横轴,细胞增殖抑

2019-01-04 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2018ZD020)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

作者简介: 张 梓,女,硕士研究生;

夏瑞祥,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xrx2041@163.com

制率为纵轴, 绘制细胞生长曲线。

1.2.3 PI 染色流式细胞术检测细胞周期 将细胞以 1×10^6 /ml 的浓度接种于 6 孔板中, 用不同浓度 (0.2、1、5 $\mu\text{mol/L}$) DZNep 处理细胞, 并设立对照组 (不加药物, 加入等量 DMSO), 培养 48 h 后, 离心 (1 500 r/min 5 min) 收集细胞, 冷 PBS 洗涤 2 次, 用 500 μl PBS 重悬细胞, 滴加 5 ml 冷乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 离心 (2 000 r/min, 10 min) 收集细胞, 冷 PBS 洗涤 2 次, 用 500 μl 冷 PBS 重悬细胞后加入 Rnase A 溶液 20 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 离心 (2 000 r/min, 10 min) 收集细胞, 加入 400 μl PI 染液重悬细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 立即用流式细胞仪 (BD FACS-Verse) 检测细胞周期, 用 FlowJo 软件分析细胞周期百分比。

1.2.4 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞以 2×10^5 /ml 的浓度接种于 6 孔板中, 用不同浓度 (0.2、1、5 $\mu\text{mol/L}$) DZNep 处理细胞, 并设立对照组 (不加药物, 加入等量 DMSO), 培养 48 h 后, 离心 (1 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min) 收集细胞, 冷 PBS 洗涤 2 次, 用 400 μl $\times$ Annexin V 结合液悬浮细胞, 密度大约为 1×10^6 /ml, 加入 5 μl Annexin V-FITC 染色液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min, 加入 10 μl PI 染色液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min, 立即用流式细胞仪 (BD FACSVerse) 检测细胞凋亡率, 用 FlowJo 软件分析凋亡率。

1.2.5 Western blot 检测 收集不同浓度 DZNep 处理 48 h 后的 SNK-6 细胞, 用全细胞蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒定量, 加入上样缓冲液, 行 SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜上, 使用 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 2 h, TBST 溶液速洗几次, 加入 EZH2、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 及 β -actin 一抗 (1 : 1 000 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日用 TBST 溶液洗 3 次, 加入二抗 (1 : 10 000 稀释) 室温孵育 2 h, TBST 溶液洗 3 次, ECL 化学发光法曝光、显影, 用 ImageJ 分析软件分析各条带灰度值, 目的蛋白的相对表达量以目的蛋白/内参 β -actin 的灰度值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件对实验结果进行统计分析。各实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两两间比较采用 SNK 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DZNep 能抑制 SNK-6 细胞增殖 不同浓度

(0.2、0.5、1、2、5 $\mu\text{mol/L}$) DZNep 分别处理 SNK-6 细胞 24、48、72 h 后, 细胞增殖均受到不同程度抑制, 各加药组与对照组比较差异均有统计学意义 ($F = 192.869$ 、1 469.000、3 210.000, $P < 0.01$), 且 DZNep 对 SNK-6 细胞株的增殖抑制作用存在时间-剂量依赖关系, 见表 1、图 1。

表 1 CCK-8 法检测各组细胞增殖抑制率 (%) $n = 3$

组别	24 h	48 h	72 h
DZNep 处理 ($\mu\text{mol/L}$)			
0.2	$1.93 \pm 0.16^{**}$	$6.69 \pm 0.16^{**}$	$15.25 \pm 0.51^{**}$
0.5	$7.40 \pm 0.99^{**}$	$14.92 \pm 0.62^{**}$	$33.28 \pm 0.60^{**}$
1	$13.38 \pm 0.74^{**}$	$23.27 \pm 0.84^{**}$	$55.65 \pm 0.96^{**}$
2	$26.08 \pm 1.55^{**}$	$33.35 \pm 0.70^{**}$	$73.18 \pm 0.85^{**}$
5	$33.60 \pm 1.41^{**}$	$54.74 \pm 0.89^{**}$	$83.33 \pm 1.13^{**}$
对照	0	0	0

与对照组比较: $^{**} P < 0.01$

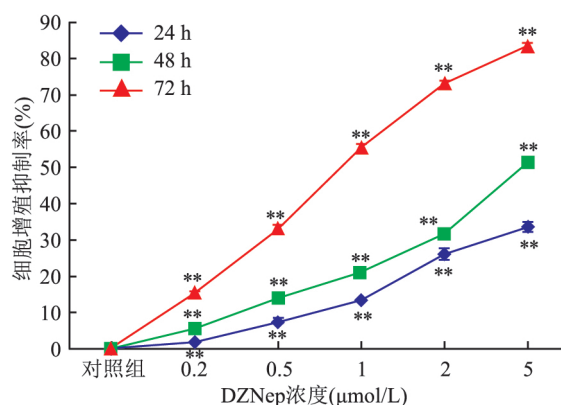


图 1 DZNep 抑制 SNK-6 细胞的增殖

与对照组比较: $^{**} P < 0.01$

2.2 DZNep 能诱导 SNK-6 细胞发生 G1/S 期阻滞

不同浓度 (0.2、1、5 $\mu\text{mol/L}$) DZNep 处理 SNK-6 细胞 48 h 后, 统计得 G1 期细胞百分比分别为 (41.25 $\pm$ 1.76) %、(46.40 $\pm$ 2.03) %、(54.78 $\pm$ 1.18) %, S 期细胞百分比分别为 (52.47 $\pm$ 0.68) %、(41.67 $\pm$ 1.28) %、(36.70 $\pm$ 1.54) %, 对照组 G1 期和 S 期细胞百分比分别为 (33.40 $\pm$ 1.69) %、(60.21 $\pm$ 0.82) %, 各加药组与对照组比较, G1 期细胞百分比升高, 差异有统计学意义 ($F = 56.296$, $P < 0.01$), S 期细胞百分比下降, 差异有统计学意义 ($F = 175.098$, $P < 0.01$), 且均具有剂量依赖性, 见图 2。

2.3 DZNep 能诱导 SNK-6 细胞发生凋亡 不同浓度

(0.2、1、5 $\mu\text{mol/L}$) DZNep 处理 SNK-6 细胞 48 h 后, 统计得细胞凋亡率分别为 (15.09 $\pm$ 0.89) %、

(23.37 ± 1.11) %、(47.54 ± 1.61) % ,对照组细胞凋亡率为(4.42 ± 0.34) % ,各加药组与对照组比较 细胞凋亡率明显升高 ,差异有统计学意义($F = 566.955$, $P < 0.01$) ,且随着药物浓度升高 ,细胞凋亡率逐渐增加 ,呈剂量依赖性 ,见图 3。

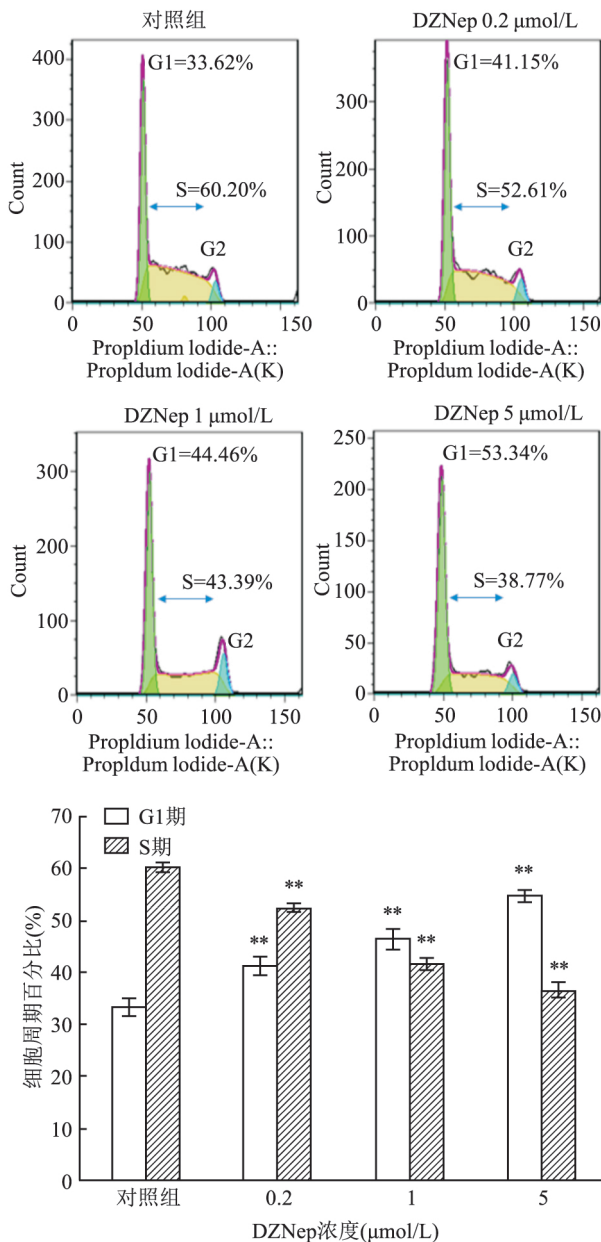


图 2 DZNep 诱导 SNK-6 细胞 G1/S 期阻滞
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.4 DZNep 降解 EZH2 蛋白并诱导 Cleaved Caspase-3 及 Cleaved PARP 的产生 不同浓度 (0.2、1、5 μmol/L) DZNep 处理 SNK-6 细胞 48 h 后 , EZH2 蛋白水平呈下降趋势 ,与对照组相比 ,差异有统计学意义 ($F = 7457.000$, $P < 0.01$) ; Cleaved Caspase-3 蛋白的相对表达量逐渐上升 ,与对照组比

较 ,差异有统计学意义 ($F = 893.251$, $P < 0.01$) ; Cleaved PARP 蛋白的相对表达量逐渐上升 ,与对照组比较 ,差异有统计学意义 ($F = 1118.000$, $P < 0.01$) ,且均具有剂量依赖性 ,见图 4。

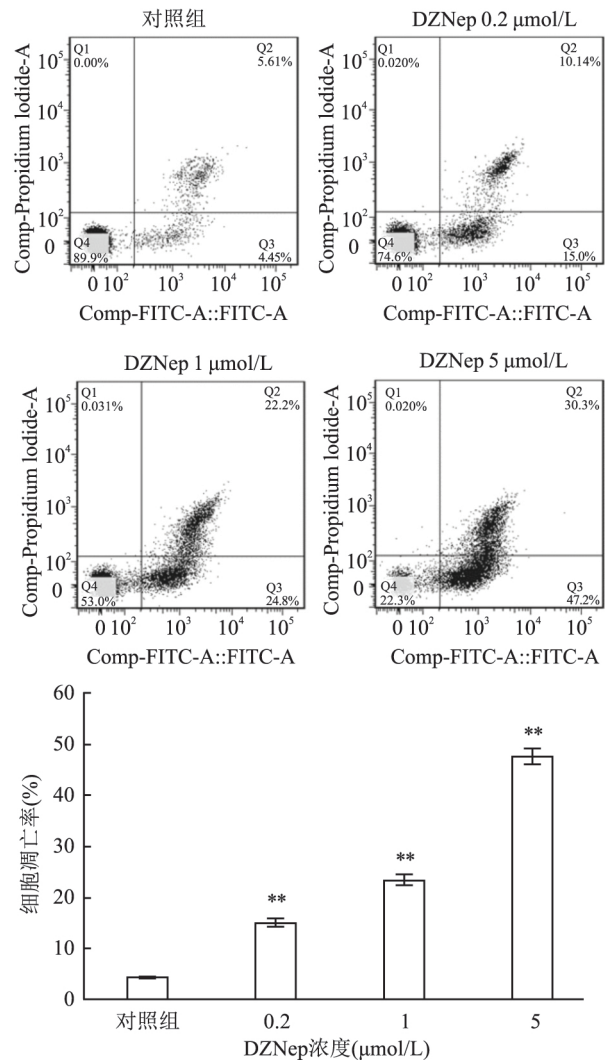


图 3 DZNep 诱导 SNK-6 细胞发生凋亡
与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

NK/T 淋巴瘤具有恶性度高、侵袭性强 ,预后不佳等特点 ,其发病机制尚不完全清楚 ,现已知与 EB 病毒感染密切相关 ,因多原发于鼻腔 ,故又称鼻型 NK/T 淋巴瘤。该病以血管中心性浸润为特点 ,并伴有明显的血管损伤和组织坏死。治疗上 ,早期以局部放疗为主 ,晚期以全身化疗为主 ,化疗方案可选择以左旋门冬酰胺酶为主的联合化疗方案 ,高危和复发难治的患者则可考虑自体或异基因造血干细胞移植治疗 ,但目前国际上仍无明确有效的治疗方案^[5]。故进一步探究其发病机制以及寻求新的治疗思路尤为重要。

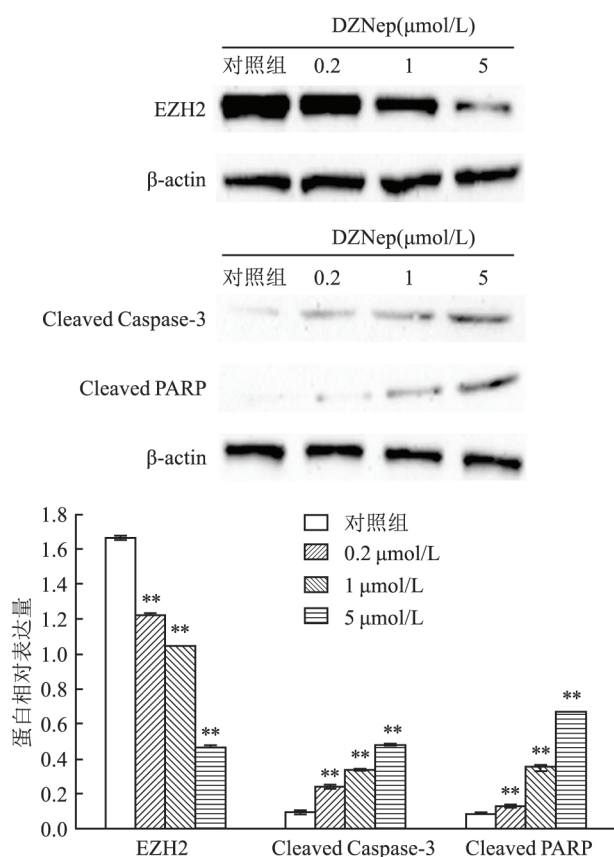


图4 DZNep 降解 EZH2 蛋白并诱导 Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 的产生
与对照组比较: ** $P < 0.01$

EZH2 基因位于染色体 7q35~36 上, 包含 20 个外显子和 19 个内含子, EZH2 蛋白由 746 个氨基酸构成, 具有组蛋白甲基化酶的活性, EZH2 催化的组蛋白甲基化常与其他表观遗传学修饰, 如 DNA 甲基化、组蛋白去乙酰化等相关联, 共同发挥致癌作用^[2]。近年来, 研究^[6-7]显示 EZH2 在前列腺癌、乳腺癌等多种肿瘤中存在表达异常, 且与肿瘤的发生、发展、预后以及耐药性密切相关, 其作用机制复杂多样, 具有特异性。在 NK/T 淋巴瘤中也存在 EZH2 表达上调的现象, 但其并不是通过经典的 H3K27me3 途径发挥致癌作用, 而是作为转录激活因子结合到 Cyclin D1 的启动子上, 直接激活 Cyclin D1 的表达, 进而导致肿瘤细胞的异常增殖^[4]。本课题组前期研究^[8]显示干扰 EZH2 基因可以增强 NK/T 淋巴瘤的化疗敏感性。

DZNep 是一种 3-去氮腺苷的环戊醇类似物, 它是第一个被发现的 EZH2 抑制剂。DZNep 能有效抑制 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶 (S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, SAHH) 水解 S-腺苷同型半胱氨酸 (S-adenosyl-L-homocysteine, SAH), 引起细胞内 SAH

的积聚, 并抑制 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 依赖的组蛋白甲基转移酶活性, 同时, DZNep 能诱导 EZH2 的降解^[3]。目前, 在对前列腺癌、乳腺癌、胃癌等多种肿瘤的体外实验^[9-11]显示, DZNep 能通过干扰组蛋白修饰及 miRNA 等多种途径抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。

本实验选择用 EZH2 抑制剂 DZNep 作用于 SNK-6 细胞株, 观察其对细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响。DZNep 在 0.2~5 μmol/L 的范围内可有效抑制 SNK-6 细胞株的增殖, 并存在时间-剂量依赖性。同时, DZNep 能诱导 G1/S 期阻滞, 细胞周期是指细胞从一次分裂结束到下一次分裂完成的全过程, 包括分裂期和分裂间期两个部分, 分裂间期又包括 DNA 合成前期 (G1 期)、DNA 合成期 (S 期) 和 DNA 合成后期 (G2 期)。G1/S 期转换是指细胞由 DNA 复制前的物质、能量准备阶段进入 DNA 复制阶段, G1/S 期转换失控是癌变的关键步骤^[12]。本实验结果表明 DZNep 能通过阻滞 G1/S 期转换来抑制细胞异常增殖。细胞凋亡是细胞生理性的自发死亡, 受多种基因和信号通路的严密调控, 诱导细胞凋亡是肿瘤治疗中的重要策略。本实验运用 Annexin V/PI 双染流式细胞术证明 DZNep 能有效诱导 SNK-6 细胞发生凋亡。同时, Western blot 结果显示, 随着药物剂量的增加, Cleaved Caspase-3 和 Cleaved PARP 水平呈上升趋势。Cleaved Caspase-3 是 Caspase-3 的激活形式, Caspase-3 作为凋亡执行的关键蛋白, 正常情况下以无活性酶原的形式存在于胞质中, 当凋亡启动时, Caspase-3 被剪辑激活成 Cleaved Caspase-3, 而 PARP 作为 Cleaved Caspase-3 的底物, 又被进一步剪辑成 Cleaved PARP。PARP 具有 DNA 修复酶的功能, 剪辑后的 PARP 丧失了 DNA 修复能力, 促进了凋亡的发生。Cleaved Caspase-3 和 Cleaved PARP 作为凋亡发生的分子标志, 其表达量的增加再次表明 DZNep 能诱导凋亡的发生。除此之外, 随着 DZNep 浓度的增加, EZH2 蛋白水平呈下降趋势, 证明 DZNep 能有效降解 EZH2 蛋白。

以上实验结果初步表明, DZNep 能降解 EZH2 蛋白, 并在体外抑制 SNK-6 细胞的增殖、诱导 G1/S 期阻滞、诱导凋亡发生并促进 Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 的产生。该结果为 NK/T 淋巴瘤的靶向治疗提供了一定的参考, 此后需完善其相关分子机制及上下游信号通路的研究, 同时可进一步探究 DZNep 与常规化疗药物的联合应用效果, 为 NK/T

淋巴瘤的治疗提供更多的思路。

参考文献

- [1] Wu X, Li P, Zhao J, et al. A clinical study of 115 patients with extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type [J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2008, 20(8): 619–25.
- [2] Wen Y, Cai J, Hou Y, et al. Role of EZH2 in cancer stem cells: from biological insight to a therapeutic target [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(23): 37974–90.
- [3] Miranda T B, Cortez C C, Yoo C B, et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(6): 1579–88.
- [4] Yan J, Ng S B, Tay J L, et al. EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity [J]. *Blood*, 2013, 121(22): 4512–20.
- [5] Suzuki R. NK/T-cell lymphomas: pathobiology, prognosis and treatment paradigm [J]. *Curr Oncol Rep*, 2012, 14(5): 395–402.
- [6] Kong D, Heath E, Chen W, et al. Loss of let-7 up-regulates EZH2 in prostate cancer consistent with the acquisition of cancer stem cell signatures that are attenuated by BR-DIM [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33729.
- [7] Wu Q, Chen Z, Zhang G, et al. EZH2 induces the expression of miR-1301 as a negative feedback control mechanism in triple negative breast cancer [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(7): 693–700.
- [8] 蔡露青, 袁小龙, 童铸廷, 等. 多梳基因蛋白 EZH2 对 NK/T 淋巴瘤细胞化疗敏感性的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(8): 1147–53.
- [9] Uchiyama N, Tanaka Y, Kawamoto T. Aristeromycin and DZNep cause growth inhibition of prostate cancer via induction of mir-26a [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 812: 138–46.
- [10] Dagdemir A, Judes G, Lebert A, et al. Epigenetic modifications with DZNep, NaBu and SAHA in luminal and mesenchymal-like breast cancer subtype cells [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2016, 13(4): 291–303.
- [11] 宁向红, 郭蓉, 韩磊, 等. DZNep 通过上调 miR-200c 表达延缓 MGC-803 胃癌细胞侵袭和迁移过程 [J]. *生理学报*, 2015, 67(1): 83–9.
- [12] Hendler A, Medina E M, Buchler N E, et al. The evolution of a G1/S transcriptional network in yeasts [J]. *Curr Genet*, 2018, 64(1): 81–6.

Effects of EZH2 inhibitor DZNep on the proliferation, apoptosis and cell cycle of NK/T cell lymphoma cells

Zhang Zi, Xia Shasha, Xia Ruixiang

(Dept of Hemopathology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the effects of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitor 3-deazaneplanocin (DZNep) on the proliferation, apoptosis and cell cycle of NK/T cell lymphoma cell line SNK-6. **Methods** After treated with DZNep, the proliferation of SNK-6 cells was measured by CCK-8 assay. The cell cycle was evaluated by flow cytometry. The apoptosis was determined by Annexin V/PI double staining. The amounts of EZH2, Cleaved Caspase-3 and Cleaved PARP protein were detected by Western blot. **Results** After treated with DZNep, the level of EZH2 was down-regulated when compared with control cells. The proliferation of SNK-6 cells was inhibited in a dose and time dependent manner and the cells were stagnated in G1/S phase. The apoptosis was induced and the expressions of Cleaved Caspase-3 and Cleaved PARP were up-regulated. **Conclusion** DZNep can effectively suppress the proliferation of NK/T cell lymphoma cells, induce apoptosis and arrest cells in G1/S phase.

Key words NK/T cell lymphoma; EZH2; DZNep; cell proliferation; apoptosis; cell cycle