

H3K27me3 聚集 MEG3 lncRNA 启动子通过 MDM2/p53 途径诱导多发性骨髓瘤 RPMI8226 细胞凋亡逃逸

董娟娟^{1,2}, 彭万仁², 颜兵雪¹, 钱婷婷¹, 蔡谜谜¹, 王 华², 孙国平²

摘要 目的 从组蛋白甲基化与长链非编码 RNA (lncRNA) 相互作用角度探讨多发性骨髓瘤 (MM) 细胞凋亡逃逸的具体机制。方法 MTT 法检测细胞增殖活性; Annexin-V-FITC/PI 双标流式细胞术检测下调组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸上三甲基化 H3K27me3 的表达是否可以诱导多发性骨髓瘤细胞株—RPMI8226 细胞凋亡; RT-PCR 法检测 RPMI8226 细胞中人母系表达基因 (MEG3) lncRNA 及鼠双微体基因 2 (MDM2) 的 mRNA 表达; Western blot 检测 RPMI8226 细胞中 Zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2)、H3K27me3、MDM2 及 p53 蛋白表达; ChIP Real-time PCR 检测 RPMI8226 细胞中 H3K27me3 的结合位点。结果 在 RPMI8226 细胞中, 下调 H3K27me3 可诱导细胞凋亡; H3K27me3 可直接结合于 MEG3 lncRNA 启动子; RPMI8226 细胞中抑制了 H3K27me3 可上调 MEG3 lncRNA 表达; RPMI8226 经 MEG3 lncRNA 小干扰 RNA (MEG3 lncRNA-siRNA) 干预下调 MEG3 lncRNA 时, 细胞内 MDM2 mRNA 水平明显升高, 并诱导 MDM2 蛋白表达。给予 MDM2 拮抗剂后, Ub-p53 表达降低, p53 降解被抑制。结论 MM 中 H3K27me3 结合 MEG3 lncRNA 启动子, MEG3 lncRNA 启动子 H3K27me3 高表达导致 MEG3 lncRNA 表达缺失。MEG3 lncRNA 表达缺失解除 MDM2 的抑制, MDM2 与 p53 直接结合介导 p53 泛素化, 促使 p53 降解, 细胞凋亡逃逸。

关键词 H3K27me3; MEG3 lncRNA; MDM2; 多发性骨髓瘤; 凋亡

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-0994-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.002

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是造血干细胞的恶性克隆性疾病, 具有极强的异质性, 涉及诸多发病环节。MM 发生涉及细胞增殖、凋亡、分化、周期转换等异常过程中, 组蛋白甲基化/去甲基

化修饰平衡功能紊乱发挥举足轻重的作用^[1-5]。组蛋白甲基化修饰状态与细胞凋亡的发生关系密切。研究^[6]显示, 长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 作为新型表观遗传学调控方式, 可与组蛋白甲基化相互调节。通过此方式两者共同参与染色质重构、转录激活、转录干扰等多种重要的调控过程。母系表达基因 3 (materially expressed gene 3, MEG3) lncRNA 是一个被证实具有肿瘤抑制功能的长链非编码 RNA, 在 57% 的 MM 患者中表达缺失^[7], 但其作用机制尚不清楚。现将重点探讨 MM 中 MEG3 lncRNA 基因启动子区域组蛋白 H3 赖氨酸残端 27 位的三甲基化 (H3K27me3) 表达情况, 明确基因启动子区域 H3K27me3 修饰紊乱是否导致 MM 中 MEG3 lncRNA 转录缺失, 从而为 MM 的临床治疗寻找新的方向。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 MTT、碘化丙啶 (PI)、DMSO、RNaseA、Hoechst 33258 荧光染料均购自美国 Sigma 公司产品; RNA 抽提试剂 TRIzol、RPMI 1640 培养基均购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; Annexin-V FITC/PI 试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒购自日本 Toyobo 公司; 抗体 Zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of Zeste homolog 2, EZH2)、H3K27me3、鼠双微体基因 2 (murine double minute 2, MDM2)、p53 和 ubiquitin-p53 购自美国 Cell Signaling 公司; 氯仿、乙醇、异戊醇为国产分析醇, 购自杭州长征化学试剂有限公司。

1.2 仪器 BD 流式细胞仪、Bio-Rad M450 酶联免疫检测仪器购自美国 CA 公司; ChemiDocXRS 蛋白条带密度分析软件购自美国 Bio-Rad 公司; Real-time PCR 仪器购自罗氏公司。

1.3 细胞培养 RPMI8226 细胞购自武汉大学保藏中心, 用含 100 U/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素、10% 灭活 FCS 的 RPMI1640 培养基, 在 5% CO₂、

2018-01-10 接收

基金项目: 教育部 2013 年度新世纪优秀人才支持计划 (编号: NCET-13-0644)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属巢湖医院肿瘤内科, 合肥 238000

² 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科, 合肥 230022

作者简介: 董娟娟, 女, 硕士研究生;

孙国平, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sungp@ahmu.edu.cn

37℃、饱和湿度条件下培养,根据细胞数量,每2~3 d 换液传代1次,倍增时间24~48 h,取细活性>95%的对数生长期细胞用于后续各项实验。

1.4 MTT 比色法检测细胞增殖 收集处于对数生长期的RPMI8226细胞,调整细胞浓度至 2×10^5 /ml,在96孔板中每孔加入体积200 μ l 该细胞悬液,边缘孔用无菌PBS填充。细胞分为MDM2拮抗剂干预组、p53拮抗剂干预组和DMSO干预组,按要求时间在5% CO₂、37℃、饱和湿度条件下孵育,每孔加入5 mg/ml的MTT 20 μ l,继续37℃孵育4~6 h。离心弃上清液,小心用PBS冲2~3次后,每孔加入150 μ l DMSO,置摇床上低速振荡10 min,在蓝色结晶充分溶解后,在Bio-Rad M450酶联免疫检测仪以OD492 nm波长测量各孔的吸光度(A)值,重复实验3次,按公式:抑制率=1-实验组A值/对照组A值,计算细胞增殖抑制率。

1.5 Annexin-V FITC/PI 双标法流式细胞术检测细胞凋亡 按实验设计收集经siRNA-EZH2处理后RPMI8226细胞,同时设计阴性对照组(DMSO处理),经4℃预冷的PBS离心洗2次,按 1×10^6 /ml密度于100 μ l的buffer结合缓冲液中重悬细胞,分别加入Annexin-V FITC 5 μ l和PI 10 μ l,震荡混匀,室温避光条件下反应15 min,再加入buffer结合缓冲液至300 μ l,样品制备完毕后上流式细胞仪检测。

1.6 RT-PCR 法检测 EZH2、MEG3 lncRNA 及 MDM2 和 p53 表达 按试剂盒说明书合成cDNA。按以下条件进行逆转录反应:30℃、10 min,42℃、20 min,99℃、5 min,4℃、5 min,-20℃保存。EZH2引物序列:上游引物5'-GGACCACAGTGT-TACCAAGCAT-3',下游引物5'-GTGGGGTCTTTATC-CGCTCAG-3',扩增产物为79 bp;MDM2引物序列:上游引物5'-CAGTAGCAGTGAATCTACAGGGA-3',下游引物5'-CTGATCCAACCAATCACCTGAAT-3',扩增产物为79 bp;MEG3 lncRNA引物序列:上游引物5'-ATCATCCGTCCACCTCCTTGTCTTC-3',下游引物5'-GTATGAGCATAGCAAAGGTCAGGGC-3',扩增产物为284 bp; β -actin引物序列:上游引物5'-TGAGACCTTCAACACCCAG-3',下游引物5'-GC-CATCTCTTGCTCGAAGTC-3',扩增产物为206 bp;以cDNA为模板,进行MEG3 lncRNA、MDM2的PCR扩增。取扩增产物5 μ l,经琼脂糖凝胶电泳、紫外线照相、Bandscan软件进行扫描分析,得出目的基因的灰度值进行半定量分析。

1.7 Western blot 检测 EZH2、H3K27me3、MDM2 及 p53 蛋白表达 将各处理组细胞收集至50 μ l加入苯甲基磺酰氟和蛋白酶抑制剂的冷细胞裂解液中,以提取细胞总蛋白。按照Bio-Rad试剂盒使用说明书标定Marker蛋白及各泳道,电泳。在300 mA电流15 min的条件下转膜,取出硝酸纤维素膜置于5%脱脂牛奶中4℃过夜封闭。加入稀释的抗靶蛋白抗体与膜共同孵育(37℃)1 h。取出纤维素膜洗涤后,再与辣根过氧化物酶标记的二抗共孵育(37℃)1 h。洗涤后,曝光,X光片扫描定影,输入计算机。

1.8 ChIP-Real time PCR 技术 收集各处理组细胞;细胞固定,直接将甲醛加入细胞培养液,摇晃固定10 min后,迅速加入2.5 mol/L甘氨酸解交联5 min,PBS洗涤,刮下细胞。超声打碎:使用超声水浴锅,EP管在冰水混合物中超声,将长链的DNA打碎成200~1 000 bp的DNA片段。4℃、5 000 r/min离心5 min后去上清液。免疫沉淀:加入ChIP级H3K27me3抗体和对照IgG,和结合抗体的磁珠(或protein A/G)。经稀释后,超声产物分成两份,分别加入ChIP级H3K27me3抗体和对照IgG,轮转过夜,第2天加入磁珠轮转4 h。洗涤:顺序分别用稀释缓冲液、低盐溶液、高盐溶液、氯化锂溶液以及TE缓冲液洗涤,共两个循环。用洗脱缓冲液在65℃洗脱过夜。DNA纯化:将洗脱的产物用DNA纯化试剂盒纯化,得到50 μ l纯化产物DNA。

根据MEG3 lncRNA基因区域上游2 000~3 000 bp范围分段设计引物,每300 bp设计一套,共合成8~10套引物。将ChIP以后的Input、IgG、IP三个样本分别用10个引物进行半定量PCR的筛选,如果IP组的样本某套引物能P出条带,说明H3K27me3和MEG3 lncRNA启动子区域的这段序列存在结合。再运用QPCR定量富集倍数:将半定量电泳PCR筛选出来的有结合的引物,再用Input和IP样本进行QPCR验证,计算得出ChIP富集的倍数。

1.9 siRNA 干扰技术 转染前1 d,常规消化细胞,制成细胞悬液、计数,在6孔板内铺上 1.2×10^5 个细胞,加入1 500 μ l无抗生素培养基培养24 h,到转染时使细胞达到30%~50%的汇合率。三组分别将EZH2-siRNA(EZH2为H3K27me3特异性的组蛋白甲基转移酶)、siRNA阴性对照、NC siRNA各5 μ l溶于250 μ l无血清的Opti-MEM溶液中,轻柔混合均匀。将5 μ l Lipofectamine RNA IMAX溶于

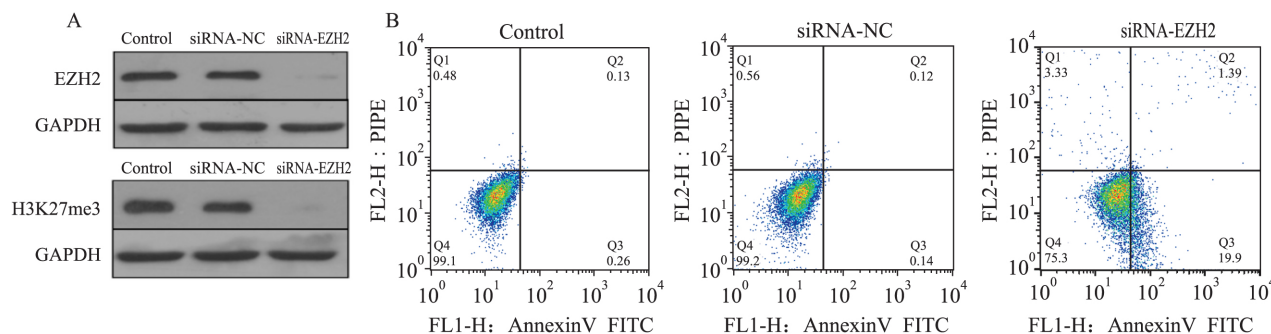


图1 RPMI8226 细胞中下调 H3K27me3 的表达可以诱导 RPMI8226 细胞凋亡

A: 各组 Western blot 中 EZH2、H3K27me3 及 GAPDH 表达; B: 各组细胞凋亡的流式细胞术检测

250 μ l 无血清的 Opti-MEM 中,混合均匀,在室温下孵育 5 min 后,将上述两种混合物轻轻混合均匀,并在室温下孵育 20 min。注意混合试剂时,请勿剧烈吹打或振荡,手指轻弹管壁即可,用力过度可能会破坏 siRNA 的结构。在 6 孔板中弃去旧培养基,每孔加入 1 500 μ l 的无血清培养基,并将上述两种混合物加入 6 孔板,上下左右轻轻晃动板子使得复合物混合均匀。细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养,在加完复合物 4~6 h 后,可更换完全培养基。48 h 后,收集细胞,提取蛋白,测量靶蛋白 EZH2 及 H3K27me3 的表达水平或进行其他实验。

1.10 统计学处理 采用 Graphpad Prism 5.0 软件和 SPSS 17.0 软件进行绘图和数据的统计分析,两组之间比较采用 t 检验,多组间比较采用单样本方差分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H3K27me3 导致 MM 细胞凋亡逃逸 EZH2 是特异性的 H3K27me3 组蛋白甲基化转移酶,合成特异性的 EZH2-siRNA,运用电转染技术使 EZH2-siRNA 进入 RPMI8226 细胞内(同时设有阴性对照)特异性抑制 EZH2 的表达,运用 Western blot 技术检测干扰后 EZH2、H3K27me3 的表达,结果显示,通过干扰 EZH2 的表达可以明显抑制 H3K27me3 的表达,见图 1A。Annexin-V FITC/PI 双标法检测 H3K27me3 对 RPMI8226 细胞凋亡的影响:早期凋亡细胞显示为 Annexin-V FITC 标记为阳性,同时 PI 标记为阴性的细胞;然而,晚期凋亡细胞则为 Annexin-V FITC 与 PI 标记均为阳性的细胞群。与正常 RPMI8226 细胞组对比, EZH2-siRNA 干预组 H3K27me3 蛋白表达明显降低,见图 1A,凋亡的 RP-

MI8226 细胞数目明显增多。正常 RPMI8226 细胞组的早期凋亡率、晚期凋亡率分别为 $(0.13 \pm 0.02)\%$ 和 $(0.26 \pm 0.02)\%$; EZH2-siRNA 干预组的早期凋亡率、晚期凋亡率分别为 $(1.39 \pm 0.27)\%$ 和 $(19.9 \pm 0.71)\%$; 正常组和干预组间细胞凋亡率有明显差异 ($t = 4.870$, $P < 0.05$),见图 1B。

2.2 ChIP Real-time PCR 证实 H3K27me3 直接结合于 MEG3lncRNA 基因启动子区 本研究以 RPMI8226 细胞为样本进行 ChIP 实验。结果显示,在上千个基因启动子区域有高密度聚集的 H3K27me3,其中包含很多癌相关基因。同时发现 MEG3lncRNA 启动子区存在 H3K27me3 聚集。进一步运用 ChIP Real-time PCR 证实 MEG3lncRNA 启动子区存在 H3K27me3 聚集,使用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计分析, H3K27me3 组较 Control IgG 组明显差异,提示 H3K27me3 可直接结合于 MEG3lncRNA 基因启动子区,见图 2。

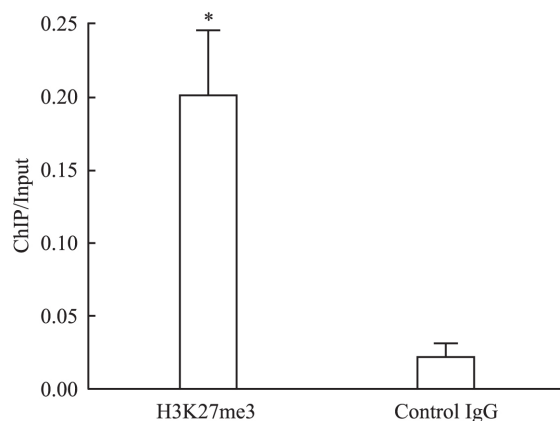


图2 H3K27me3 可直接结合于 MEG3lncRNA 基因启动子区与 Control IgG 组比较: $P < 0.05$

2.3 通过调控 H3K27me3 表达可上调 RPMI8226

细胞 MEG3lncRNA 表达水平 RPMI8226 细胞经 EZH2-siRNA 干预组作用后,细胞内 MEG3lncRNA 表达水平呈明显升高,Control 组与 siRNA-NC 组干预后相比,两组间 MEG3lncRNA 表达水平无明显变化。但 EZH2-siRNA 干预后 MEG3lncRNA 表达水平是前者 2 倍,与 Control 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

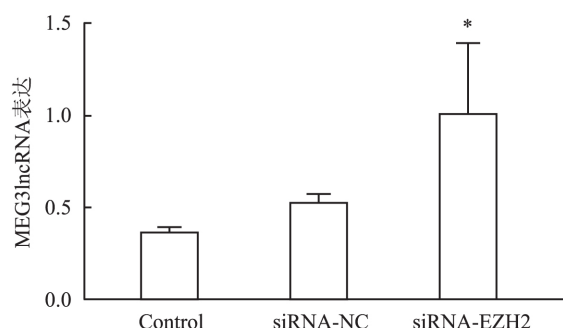


图3 抑制 H3K27me3 可上调 RPMI8226 细胞 MEG3lncRNA 表达水平
与 Control 组比较: * $P < 0.05$

2.4 通过调控 RPMI8226 细胞 MEG3lncRNA 表达可影响 MDM2 蛋白、mRNA 水平 RPMI8226 细胞经 MEG3lncRNA-siRNA 干预组作用后,细胞内 MDM2 mRNA 表达水平呈明显升高,Control 组与 siRNA-NC 组干预后相比,两组间 MDM2 mRNA 表达水平无明显变化。但 MEG3lncRNA-siRNA 干预后 MDM2 mRNA 表达水平是前两者 2 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MEG3lncRNA-siRNA 明显上调 mRNA 表达水平的同时,同时有效诱导了 MDM2 蛋白表达。MEG3lncRNA-siRNA 干预组作用后,细胞内 MDM2 蛋白水平呈明显升高趋势,差异有统计

学意义($t = 3.269, P < 0.05$)。siRNA-NC 组干预后 MDM2 蛋白水平无明显变化,见图 4。

2.5 RPMI8226 细胞中可通过拮抗 MDM2 相关的 p53 泛素化导致 p53 降解 以 MDM2 拮抗剂(Nutlin-3) 干预 RPMI8226 细胞后,应用 Western blot 检测 MDM2 拮抗剂(Nutlin-3) 对 RPMI8226 细胞的 Ub-p53 及 p53 蛋白水平调节变化;结果显示,Nutlin-3 可在蛋白水平上抑制 p53 的泛素化,故 Ub-p53 表达水平降低,使得 p53 降解被抑制,p53 蛋白表达水平明显升高,见图 5。Nutlin-3 处理组与 RPMI8226 细胞未处理组(Control 组) 相比,差异有统计学意义($t = 93.59, P < 0.05$)。

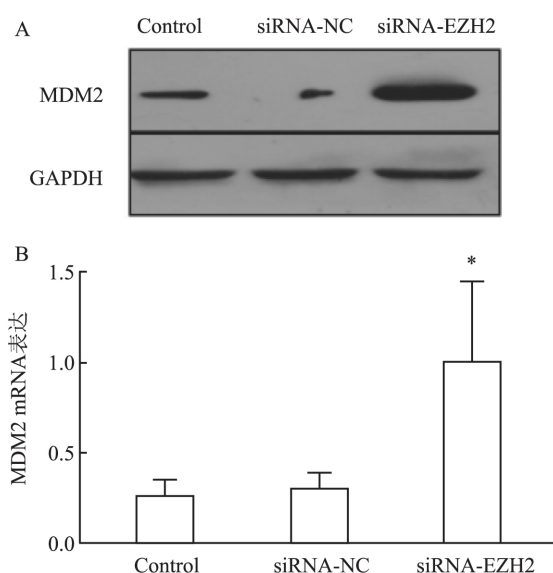


图4 RPMI8226 细胞经 MEG3lncRNA-siRNA 干预后 MDM2 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高

A: 各组 Western blot 中 MDM2 蛋白水平; B: 各组 PCR 中 MDM2 基因水平; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$

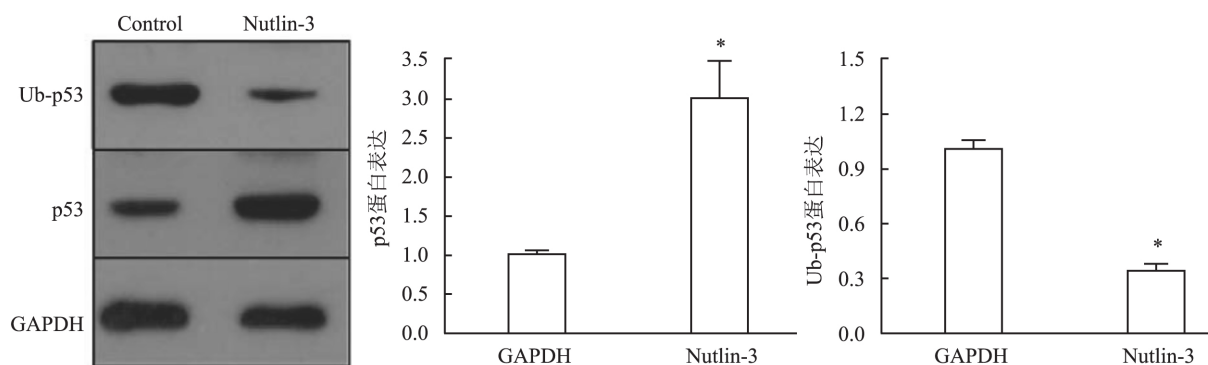


图5 MDM2 拮抗剂(Nutlin-3) 干预后 RPMI8226 细胞的 p53 与 Up-p53 表达
与 Control 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

表观遗传学在肿瘤发生、发展中作用堪比传统遗传学,表观遗传修饰的异常是所有人类肿瘤的共同特点。组蛋白甲基化酶和组蛋白去甲基化酶是表观遗传学的重要内容,机体通过两者共同作用动态调节组蛋白甲基化模式,组蛋白甲基化模式是发挥表观遗传作用的重要方式之一,严格调控细胞的分化、增殖,维持机体细胞生命状态的稳定,在细胞凋亡、周期等生命过程中发挥重要作用^[8],其失平衡则导致肿瘤的发生。H3K27me3 在生物体细胞中广泛富集于基因启动子区域,介导染色质重构,染色质闭锁,基因转录停止。也有报道称除基因启动子区域外,H3K27me3 尚可存在于结构基因多个位点,维持染色质的浓缩状态。

组蛋白甲基化酶复合物 PRC2 的亚基 EZH2 在骨髓瘤中高表达,其调控的 H3K27me3 水平在肿瘤的发生发展中起重要作用,靶向抑制 EZH2 可增加瘤细胞的凋亡率。图 1A 实验证实,通过 siRNA 技术抑制 MM RPMI8226 细胞中 EZH2 表达后,H3K27me3 表达量显著下降,同时 RPMI8226 细胞凋亡率明显增加。徐莉等^[9]也证实 RPMI8226 及 H929 细胞系中的 H3K27me3 高表达会导致本细胞凋亡相关分子 caspase3、PARP 均呈低表达,瘤细胞死亡率降低,且同时对 35 例骨髓瘤患者标本进行 Western blot 分析,证实 EZH2、H3K27ME3 的表达水平和骨髓瘤患者的疾病的恶性程度呈正相关。因此,推论 H3K27me3 的高表达保护了 RPMI8226 细胞的凋亡逃逸。

MEG3 lncRNA 作为第一个被发现有肿瘤抑制功能的 lncRNA,证实了在 57% MM 患者中表达缺失^[7],但其作用机制尚不清楚。lncRNA 是新近发现的具有强大调控功能的基因组“暗物质”,是一类转录长度超过 200 nt 的 RNA 分子,起初因无蛋白质编码功能,被认为是基因组转录的“噪音”^[10]。由于近年研究的不断深入,lncRNA 功能学发现突飞猛进,已证实 lncRNA 参与了染色质修饰、X 染色体沉默、转录干扰、转录激活等多种重要的基因表达调控过程,是重要的表观遗传学调控方式^[11]。研究显示 lncRNA 可与其他表观遗传形式相互作用,组蛋白甲基化可直接作用于 lncRNA 基因启动子区来调控 lncRNA 的表达,反之,上游非编码区转录出的 lncRNA 也可通过影响组蛋白甲基化/乙酰化等修饰状态影响下游基因的表达。其表达缺失已被证实存

在于多种肿瘤细胞系及实体肿瘤中。Benetatos et al^[12]报道,57% 的 MM 病例 MEG3 lncRNA 基因启动子存在异常的甲基化谱,且伴随 MEG3 lncRNA 表达缺失,并且缺失程度与 MM 的亚型和疾病的阶段具有显著相关性。然而,MEG3 lncRNA 表达缺失的原因及其在 MM 的发生、发展中作用机制目前仍未有研究。本实验证实 MM 中 H3K27me3 可结合于 MEG3 lncRNA 基因启动子区域,且通过 siRNA 技术抑制 H3K27me3 甲基化酶 EZH2 降低 H3K27me3 表达的同时,MEG3 lncRNA 表达可明显升高。因此推论,MM RPMI8226 细胞中 MEG3 lncRNA 基因启动子区 H3K27me3 的异常高表达,是 MEG3 lncRNA 表达缺失的重要原因。H3K27me3 如何保护 RPMI8226 细胞的凋亡逃逸,是否与调控 MEG3 lncRNA 表达相关仍有待探索。

在神经胶质瘤中证实,人为使 MEG3 lncRNA 过表达可抑制肿瘤细胞的 DNA 合成及细胞集落的形成,抑制 MDM2 表达,诱导 p53 聚集,刺激 p53 介导的转录活化,选择性的调节 p53 下游靶基因 GDF-15 (growth differentiation factor 15, GDF-15, 此基因具有抗增殖及肿瘤抑制功能)等的表达,从而抑制细胞增殖,诱导凋亡^[13-17]。多发性骨髓瘤中,MEG3 lncRNA 异常低表达是否同样引起 MDM2 的异常活化及 p53 降解导致功能缺失,最终诱导 MM 逃避凋亡。本实验中证实,RPMI8226 细胞中 H3K27me3 表达被抑制时,MEG3 lncRNA 表达升高,同时 MDM2 在 mRNA 及蛋白水平上均明显降低。同样运用 siRNA 技术证实,MEG3 lncRNA 表达被抑制时,MDM2 在 mRNA 及蛋白水平上均有所升高。本实验还证实运用 MDM2 拮抗剂 Nutlin-3 可显著降低蛋白水平泛素化 p53 的表达,非泛素化 p53 的蛋白表达有升高趋势。由此推论,MM 中 MEG3 lncRNA 表达缺失解除了对 MDM2 表达的抑制,MDM2 再通过与 p53 直接结合介导 p53 泛素化,间接促使 p53 的降解,或直接抑制 p53 基因活化,导致 MM 细胞凋亡逃逸。

参考文献

- [1] Liu Y, Zeng L L, Chen Y et al. Triptolide inhibits cell growth and induces G0-G1 arrest by regulating P21wip1/cip1 and P27kip1 in human multiple myeloma RPMI-8226 cells [J]. *Chin J Cancer Res* 2010 22(2): 141-7.
- [2] Zeng R, Zeng L, Chen Y et al. Triptolide-induced apoptosis by inactivating nuclear Factor-kappa B apoptotic pathway in multiple myeloma *in vitro* [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*,

- 2011 31(4):446–51.
- [3] Zhao F, Chen Y, Zeng L L et al. Effects of triptolide on RIZ1 expression, proliferation, and apoptosis in multiple myeloma U266 cells[J]. *Acta Pharmacol Sin* 2010 31(6):733–40.
- [4] Zhao F, Chen Y, Zeng L et al. Role of triptolide in cell proliferation, cell cycle arrest, apoptosis and histone methylation in multiple myeloma U266 cells[J]. *Eur J Pharmacol* 2010 646(1–3):1–11.
- [5] Zhao F, Chen Y, Li R et al. Triptolide alters histone H3K9 and H3K27 methylation state and induces G0/G1 arrest and caspase-dependent apoptosis in multiple myeloma *in vitro* [J]. *Toxicology*, 2010 267(1–3):70–9.
- [6] Peffers M J, Balaskas P, Smagul A. Osteoarthritis year in review 2017: genetics and epigenetics [J]. *Osteoarthritis Cartilage* 2017, 26(3):304–11.
- [7] Benetatos L, Dasoula A, Hatzimichael E et al. Promoter hypermethylation of the MEG3 (DLK1/MEG3) imprinted gene in multiple myeloma [J]. *Clin Lymphoma Myeloma* 2008 8(3):171–5.
- [8] Chen H, Landen C N, Li Y et al. Epigallocatechin gallate and sulforaphane combination treatment induce apoptosis in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells through hTERT and Bcl-2 down-regulation. [J]. *Exp Cell Res* 2013 319(5):697–706.
- [9] 徐莉, 陈协群. 多发性骨髓瘤中组蛋白甲基化的分析研究 [G]. 武汉: 全国淋巴瘤诊治进展研讨会 2014.
- [10] Bedoyareina O C, Ponting C P. Functional RNA classes: a matter of time [J]. *Nat Struct Mol Biol* 2017 24(1):7–8.
- [11] Bassett A R, Azzam G, Wheatley L et al. Understanding functional miRNA – target interactions *in vivo* by site-specific genome engineering [J]. *Nat Commun* 2014 5:4640.
- [12] Benetatos L, Dasoula A, Hatzimichael E et al. Promoter hypermethylation of the MEG3 (DLK1/MEG3) imprinted gene in multiple myeloma [J]. *Clin Lymphoma Myeloma* 2008 8(3):171–5.
- [13] Wang P, Ren Z, Sun P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs *in vitro* glioma cell proliferation [J]. *J Cell Biochem* 2012 113(6):1868–74.
- [14] Zhou Y, Zhong Y, Wang Y et al. Activation of p53 by MEG3 Non-coding RNA [J]. *J Biol Chem* 2007 282(34):24731–42.
- [15] Yan H, Yuan J, Gao L et al. Long noncoding RNA MEG3 activation of p53 mediates ischemic neuronal death in stroke [J]. *Neuroscience* 2016 337:191–9.
- [16] Zhu J, Liu S, Ye F et al. Long Noncoding RNA MEG3 interacts with p53 protein and regulates partial p53 target genes in hepatoma cells [J]. *Plos One* 2015 10(10):e139790.
- [17] Zhan R, Xu K, Pan J et al. Long noncoding RNA MEG3 mediated angiogenesis after cerebral infarction through regulating p53/NOX4 axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2017 490(3):700–6.

H3K27me3 aggregate promoter of MEG3 lncRNA and induce apoptosis escape of RPMI8226 cell through MDM2/p53 pathway

Dong Juanjuan^{1 2}, Peng Wanren², Yan Bingxue¹ et al

(¹Dept of Oncology, Affiliated Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000;

²Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the interaction of lncRNA and aberrant histone modification in multiple myeloma cells escaping from apoptosis. **Methods** Cell proliferation activity was tested by MTT; Annexin V-FITC/PI dual staining was used to test apoptotic cells, RT-PCR was used to test the mRNA expression of enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2), MEG3 lncRNA, murine double minute 2 (MDM2) and p53. The bonding site of promoter of MEG3 by H3K27me3 was confirmed by ChIP-Real-time PCR, shRNA interference was used to downregulate H3K27me3 through inhibiting the expression of EZH2. **Results** The expression of H3K27me3 could be significantly inhibited by interfering EZH2, which indicating downregulation of H3K27me3 could induce apoptosis of RPMI8226 cells. H3K27me3 protein could bind to MEG3 lncRNA promoter directly. H3K27me3 inhibition could increase the expression of MEG3 lncRNA. Furthermore, MEG3 lncRNA could downregulated by MEG3 lncRNA-siRNA in RPMI8226 cells, meanwhile, both protein and mRNA of MDM2 increased in cells. Ubiquitination of p53 was founded upregulation and p53 degradation when RPMI8226 cells incubated with MDM2 inhibitor. **Conclusion** H3K27me3 highly expresses in RPMI8226 multiple myeloma cells, which cause loss of MEG3 lncRNA. The loss expression of MEG3 lncRNA could paralyze the inhibition of MDM2, promote the degradation or inaction of p53 protein. This could be one of the mechanisms of multiple myeloma cells escape from apoptosis.

Key words H3K27me3; MEG3 lncRNA; MDM2; multiple myeloma; apoptosis