

• 论 著 •

MLL1 和 ER α 结合共同调控 HOXA10 表达的研究*华 川¹, 姚 婕^{2 Δ}

(1. 中国人民解放军第二五二医院检验科, 河北保定 071000; 2. 第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨急性髓性白血病(AML)细胞中研究同源异型基因 10(HOXA10)表达调控途径以及 HOXA10 表达作为 AML 防治新靶点的可能性。方法 以免疫共沉淀(Co-IP)和染色质免疫共沉淀(ChIP)实验检测混合系谱白血病蛋白 1(MLL1)和 ER α 的相互作用,以确定 MLL1 是通过和 ER α 形成蛋白质复合物结合到 HOXA10 的启动子上,甲基化特异 PCR(MSP)检测 HOXA10 启动子 CPG 岛甲基化状态;Western-blot 检测雌二醇(E2)刺激前后和 MLL1 表达沉默前后组蛋白 H3K4 甲基化状态,以明确 MLL1 是否通过表观遗传学途径调控 HOXA10 的表达;流式细胞技术检测组蛋白去甲基化酶(LSD1)处理白血病细胞前后细胞凋亡改变。结果 MLL1 和 ER α 与 HOXA10 启动子上 ERE 区域结合在 E2 刺激后和 MLL1 表达沉默后明显增强,并且 HOXA10 表达明显降低,E2 刺激后组蛋白 H3K4 甲基化状态在明显高于刺激前,且 LSD1 可明显诱导白血病细胞凋亡。结论 MLL1 通过和 ER α 形成蛋白复合体和 HOXA10 启动子序列结合并通过表观遗传学途径调控 AML 细胞的 HOXA10 基因表达,MLL1 介导的 HOXA10 表达的改变有可能为 AML 的治疗提供了一个新的方向。

关键词:同源异型基因 10; 混合系谱白血病蛋白 1; ER α ; 急性髓性白血病

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.15.004 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)15-2175-03

Regulation of mixed lineage leukemia histone methylases 1 collaborated with ER α on expression of HOXA10 in AML*HUA Chuan¹, YAO Jie^{2 Δ}

(1. Department of Clinical Laboratory, the 252 th Hospital of PLA, Baoding, Hebei 071000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression regulation of homeotic genes 10(HOXA10) in pathogenesis of acute myelocytic leukemia(AML) cells, and try to find the regulation mechanism of HOXA10 in acute myelocytic leukemia cell lines. **Methods** With co-immunoprecipitation(Co-IP) and chromatin immunoprecipitation(ChIP), the interreaction between mixed lineage leukemia histone methylases 1(MLL1) and ER α was tested to confirm MLL1 bind promoter of HOXA10 through forming protein complex with ER α . MSP was used to check the methylation status of HOXA10 promoter. Western-blot was used to check the difference of H3K4 methylation status with and without estradiol(E2), with and without MLL1 knockdown. **Results** MLL1 binding to EREs region of HOXA10 promoter sequence increased and HOXA10 expression was down regulated with E2 stimulation and MLL1 knockdown. LSD1 induced apoptosis of AML cells. **Conclusion** It has been clearly demonstrated that HOXA10 is transcriptionally regulated by MLL1, which, in coordination with ER α , plays a critical role in this process with epigenetic way and suggests a potential anti-E2 treatment of AML.

Key words: homeotic genes 10; mixed lineage leukemia histone methylases 1; ER α ; acute myelocytic leukemia

同源盒基因 HOXA10 基因的表达与雌二醇(E2)依赖的雌激素受体的活化相关,主要由于 HOA10 启动子区域包含几个雌激素反应元件(ERE),且靠近 HOA10 转录起始位点^[1]。有研究表明,HOXA10 基因的表达不仅与 E2 依赖性肿瘤发病相关还能在造血发育过程中具有双重调节作用,HOXA10 基因的高表达能诱导髓细胞的增殖而导致急性髓性白血病(AML)。混合系谱白血病蛋白(MLLs)可调控 HOX 基因的表达,通过结合到 HOX 基因启动子区域,并且 MLLs 具有 H3-K4 甲基转移酶的功能^[2-3]。本课题组前期实验证明在白血病细胞中,MLL1 可结合到 HOXA10 的启动子区域 ERE 上并调节 HOXA10 的表达。但 MLL 调控 HOXA10 表达的具体途径尚不清楚。为了探讨 MLL1 在 AML 中如何调控 HOXA10 的表达,本研究以 AML 细胞 HL-60 和 THP-1 为样本,进一步探讨了 HOXA10 在 AML 中的具体表达调控机制。

1 材料与方

1.1 材料来源 HL-60 和 THP-1 细胞均来自 ATCC 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与 E2 处理白血病细胞株 HL-60 和 THP-1 细胞培养方法见卢圣栋主编的《现代分子生物技术》,用 100 nmol/L 的 E2(Sigma 公司)刺激细胞,并在 8 h 的时间点收获细胞。

1.2.2 甲基化特异 PCR(MSP)检测 HOXA10 启动子甲基化引物序列 引物序列见表 1。

1.2.3 反义寡核苷酸转染 严格按照 LipofectamineTM 20009 (Invitrogen)试剂说明书进行转染,于转染前 1 d 用无抗菌药物的含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 调整细胞密度为 1×10^6 /mL,接种于 12 孔板,每孔 1 000 μ L。转染当天换为 500 μ L 无抗菌药物无血清 RPMI 1640。取荧光标记的寡核苷酸链 1.0 μ g 加到 50 μ L 的 RPMI 1640 中混匀,再取 LipofectamineTM 2000 2 μ L,加到 50 μ L 的 RPMI 1640 中混匀。室温放置 5 min 后,将分别混有寡核苷酸链和 LipofectamineTM 2000 的 RPMI 1640 混合,室温放置 20 min(寡核苷酸链与脂质体比值

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2013jcyj0102)。

作者简介:华川,女,主任技师,主要从事检验医学方面的研究。 Δ 通信作者,E-mail:jie.yao413@yahoo.com。

为 1.0 μg/2 mL)。将上述混合物加入 12 孔板中,轻轻混匀,培养 6 h 后,将培养基换为 500 μL 含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640,继续培养 24 h 后收获细胞。

表 1 HOXA10 MSP 引物序列

引物	序列(5'→3')
HOXA10-Mf	ATAAGTTTATTAATCGGCGAAGTTC
HOXA10-Mr	AATAAAAAAAAAACAAAAAAAAACCGAT
HOXA10-Uf	AAGTTTATTAATTGGTGAAGTT
HOXA10-Ur	CCAATAAAAAAAAAACAAAAAAAAACCA

1.2.4 蛋白质印迹试验(Western-blot) 细胞经各因素处理后,收集细胞,加入蛋白裂解液 RIPA 每孔 90 μL,冰上静置 30 min 后,4℃ 12 000 r/min 离心 30 min,取上清液。总蛋白浓度用二喹啉甲酸(BCA)法进行测定。每个样品取 60 μg 蛋白在 12% 的 SDS-PAGE 凝胶中电泳;电泳结束后转聚偏二氟乙烯膜,分别与 HOXA10 抗体(1 B200)、GAPDH 抗体(1 B2000)孵育,然后与相应二抗孵育,最后应用化学发光试剂检测各蛋白水平。

1.2.5 染色质免疫共沉淀 严格按照 Thermo 公司 ChIP 试剂盒说明书进行操作:(1)用甲醛在体内将 DNA 结合蛋白与 DNA 交联;(2)分离染色体(质),剪切后的 DNA 小片段与结合蛋白结合;(3)用特异性抗体与 DNA 结合蛋白结合,用沉淀法分离复合体;反向交联操作释放出 DNA,并消化蛋白质。以得到的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

1.2.6 免疫共沉淀 严格按照 Thermo 公司 CO-IP 试剂盒说明书进行操作:取 10 μL 蛋白质 A 琼脂糖珠,用适量裂解缓冲液洗 3 次,每次 3 000 r/min 离心 3 min。将预处理过的 10 μL 蛋白质 A 琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中,4℃ 缓慢摇晃,孵育 2~4 h,使抗体与蛋白质 A 琼脂糖珠耦联。免疫沉淀反应后,在 4℃ 以 3 000 r/min 速度离心 3 min,将琼脂糖珠离心至管底;将上清液小心吸去,琼脂糖珠用 1 mL 裂解缓冲液洗 3~4 次;最后加入 15 μL 的 2×SDS 上样缓冲液,沸水煮 5 min。

1.2.7 流式细胞技术检测细胞凋亡 收集细胞,约 1×10⁶~5×10⁶/mL,500~1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液。3 mL 磷酸盐(PBS)缓冲液洗涤后离心去 PBS,加入预冷的 70%乙醇固定,4℃,4~8 h。离心弃去固定液,3 mL PBS 重悬 5 min。300 目尼龙网过滤 1 次,500~1 000 r/min 离心 5 min,弃去 PBS。加 1 mL 碘化丙啶染液,4℃ 避光染色 30 min。流式细胞仪检测碘化丙啶,用氩离子激发荧光,激发光波长为 488 nm,发射光波波长大于 630 nm。

2 结 果

2.1 免疫共沉淀技术检测 E2 刺激前后 MLL1 和 ERα 的结合情况 以 Co-IP 检测 HL-60 和 THP-1 在 E2 刺激后 MLL1 和 ERα 的结合情况,结果显示,MLL1 和 ERα 结合在 E2 刺激后明显升高,见图 1。

2.2 HL-60 和 THP-1 细胞株在 E2 刺激 8 h 后的 ERα、MLL1 与 HOXA10 启动子 ERE 结合分析 以 ChIP 检测 HL-60 和 THP-1 以 E2 激活后的 ERα、MLL1 和 HOXA10 启动子 ERE 结合的变化。从图 2 可以看出,E2 刺激后,ERα、MLL1 和 HOXA10 启动子 ERE1 和 ERE2 的结合明显增强。

2.3 E2 刺激和 ERα 表达降低后 H3K4 甲基化水平变化 以 Western blot 检测 HL-60 和 THP-1 在 E2 作用后以及敲除

ERα 后 H3K4 甲基化状态的变化,H3 作为上样质控。从图 3 可以看出,E2 刺激后 H3K4 甲基化增强,而 ERα 敲除后 H3K4 甲基化明显减弱。

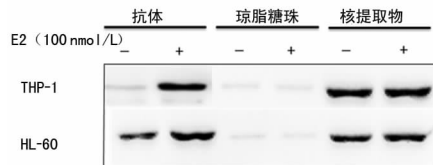


图 1 Co-IP 检测 HL-60 和 THP-1 在 E2 刺激后 MLL1 和 ERα 的结合情况

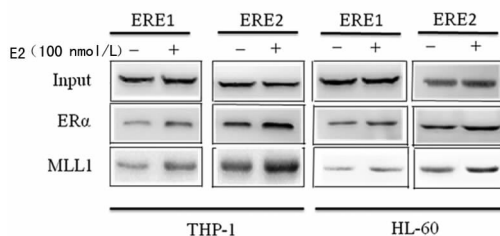
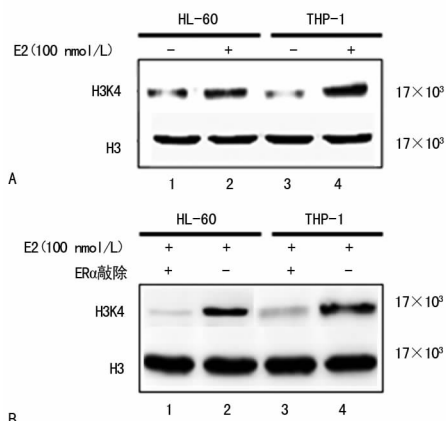


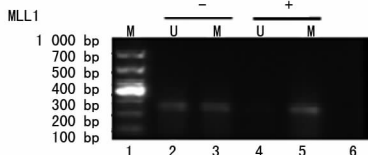
图 2 ChIP 检测 E2 刺激前后 ERα、MLL1 和 HOXA10 启动子 ERE 和 ERE2 结合



注:A 为 HL-60 和 THP-1 在 E2 作用后甲基化状态的变化;B 为 ERα 敲除后 H3K4 甲基化状态的变化

图 3 Western blot 检测 E2 依赖的 ERα 的表达对 H3K4 甲基化状态的影响

2.4 HOXA10 启动子甲基化分析 MSP 检测 MLL1 表达沉默前后 HOXA10 启动子甲基化状态,可以看出 MLL1 表达沉默后 HOXA10 启动子为高甲基化状态,见图 4。



注:M 为 DL 2000 标准;2~3 代表 HOXA10 启动子甲基化状态,4~5 代表 MLL1 表达沉默后 HOXA10 启动子甲基化状态,6 代表空白

图 4 MSP 检测 MLL1 敲除后 HOXA10 启动子甲基化变化

2.5 组蛋白去甲基化对白血病细胞的致凋亡作用 以流式细胞技术检测白血病细胞株组蛋白去甲基化后凋亡作用,HL-60 和 THP-1 组蛋白去甲基化后可导致细胞凋亡,见图 5。

1448-1455.

[4] Amini M, Chautard D, Brassart E, et al. Transcutaneous posterior tibial nerve stimulation; evaluation of a therapeutic option in the management of anticholinergic refractory overactive bladder [J]. *Int Urogynecol J*, 2014, 25(8):1065-1069.

[5] 胡浩, 许克新, 张晓鹏, 等. 伴有膀胱过度活动症状的前列腺增生患者尿液中脑源性神经营养因子的表达 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2014, 46(4):519-523.

[6] Antunes-Lopes T, Pinto R, Battos SC, et al. Urinary neurotrophic factors in healthy individuals and patients with overactive bladder [J]. *J Urol*, 2013, 189(1):359-365.

[7] Kaplan SA, Cardozo L, Herschorn S, et al. Efficacy and safety of fesoterodine 8 mg in subjects with overactive bladder after a suboptimal response to tolterodine ER [J]. *Int J Clin Pract*, 2014, 68(9):1065-1073.

[8] Nonlett K, Siegel S, Mangel J, et al. Results of a prospective, multicenter study evaluating quality of Life, safety, and efficacy of sacral neuromodulation at twelve months in subjects with symptoms of overactive bladder [J]. *Neurourol Urodyn*, 2016, 35(2):246-251.

[9] Ding L, Song T, Yi C, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) improves the diabetic cytopathy (DCP) via up-regulation of CGRP and cAMP [J].

PLoS One, 2013, 8(2):e57477.

[10] Amarenco G, Isamel SS, Even-Schneider A, et al. Urodynamic effect of acute transcutaneous posterior tibial nerve stimulation in overactive bladder [J]. *J Urol*, 2003, 169(6):2210-2215.

[11] De Seze M, Raibaut P, Gallien P A, et al. Transcutaneous posterior tibial nerve stimulation for treatment of the overactive bladder syndrome in multiple sclerosis: results of a multicenter prospective study [J]. *Neurourol Urodyn*, 2011, 30(3):306-311.

[12] Schreiner L, Dos Santos TG, Knorst MR, et al. Randomized trial of transcutaneous tibial nerve stimulation to treat urge urinary incontinence in older women [J]. *Int Urogynecol J*, 2010, 21(9):1065-1070.

[13] Souto SC, Reis LO, Plama T, et al. Prospective and randomized comparison of electrical stimulation of the posterior tibial nerve versus oxybutynin versus their combination for treatment of women with overactive bladder syndrome [J]. *World J Urol*, 2014, 32(1):179-184.

[14] 钟欢, 谢立平, 郑祥毅, 等. 经胫神经电刺激治疗女性膀胱过度活动症的疗效观察 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2014, 35(9):695-699.

(收稿日期:2017-01-11 修回日期:2017-03-19)

(上接第 2176 页)

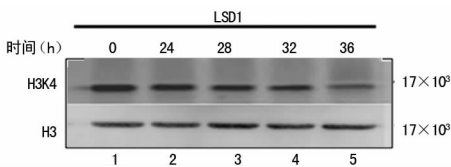


图 5 LSD1 处理后细胞凋亡作用

3 讨论

HOXA10 基因在激素依赖的肿瘤例如卵巢癌中被证明是低表达,说明它可能是一类新的抗癌基因,而在血液系统里 HOXA10 发挥致癌作用。本研究前期实验发现 MLL1 可调控 HOXA10 的表达但是具体途径不清楚,进一步研究发现 MLL1 具有组蛋白 H3K4 特异性甲基化转移酶的功能,能特异性调控组蛋白 H3K4 甲基化,而 H3K4 的甲基化可导致 HOXA10 基因启动子 CpG 岛低甲基化,证明 MLL1 对 HOXA10 的调控是通过表观遗传学途径^[4]。

本研究在前期研究的基础上经进一步证实 MLL1 对 HOXA10 的调控作用是通过表观遗传学途径。AML 细胞以 100 nmol/L 的 E2 处理后以免疫共沉淀技术检测 MLL1 和 ER α 的相互作用,发现在 100 nmol/L E2 刺激下 MLL1 和 ER α 的结合会明显升高。为了进一步研究 MLL1,本研究运用染色质免疫共沉淀技术分别检测 AML 细胞在 E2 刺激前后 MLL1, ER α 分别与 HOXA10 启动子上 ERE1 和 ERE2 的结合改变,发现在 E2 刺激后 ER α 与 HOXA10 启动子上 ERE1 和 ERE2 的结合明显高于无 E2 刺激组,且 MLL1 与 HOXA10 启动子上 ERE1 和 ERE2 的结合也明显高于无 E2 刺激组,表明雌激素依赖的 ER α 活化对 MLL1 蛋白的招募作用,而

MLL1 通过与 ER α 的相互作用结合到 HOXA10 启动子上的 ERE1 和 ERE2 序列并调控 HOXA10 的表达。并且 E2 刺激后 H3K4 的甲基化程度明显高于无 E2 刺激组,而 ER α 敲除后 H3K4 的甲基化程度明显低于无 E2 刺激组,说明 MLL1 对 HOXA10 的表观遗传学调控作用。上述结果表明 ER α 和 MLL1 在 HOXA10 调控的 AML 发病机制中的重要作用。在组蛋白去甲基化酶 LSD1 处理细胞后发现 AML 细胞的凋亡明显增加,为白血病的致病机制分析和治疗提供了一个新的方向。

参考文献

[1] Akbas GE, Song J, Taylor HS. HOXA10 estrogen response element(ERE)is differentially regulated by 17 beta-estradiol and diethylstilbestrol(DES) [J]. *J Mol Biol*, 2004, 340(5):1013-1023.

[2] Cao F, Townsend EC, Karatas H, et al. Targeting MLL1 H3K4 methyltransferase activity in Mixed-Lineage leukemia [J]. *Mol Cell*, 2014, 53(2):247-261.

[3] Chen CW, Armstrong SA. Targeting DOT1L and HOX gene expression in MLL-rearranged leukemia and beyond [J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(8):673-684.

[4] 姚婕, 方立超, 郑峻松. MLL 在 HOXA10 表达调控中作用的实验研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(17):1797-1800.

(收稿日期:2017-01-23 修回日期:2017-04-01)