

Thiomyristoyl对几种MLL-r白血病细胞的影响

吴园园 李静*

(上海师范大学生命科学学院, 上海 200234)

摘要 硫化肉豆蔻酰赖氨酸化合物(thiomyristoyl, TM)是一种具有高度特异性的Sirt2抑制剂, 目前已知TM能选择性抑制某些癌细胞的活性, 并显示出明显的抗癌效果。该文使用TM分别处理几种人源MLL-r白血病细胞, 通过Western blot检测细胞内H4K16的乙酰化水平, 并采用细胞功能学实验进行比较, 包括克隆形成能力的检测、MTT法对细胞活率的检测、流式细胞术对细胞周期及凋亡的检测。同时, 通过构建*Sirt2* knockdown细胞株, MTT实验检测了Sirt2表达降低对TM处理的影响。实验结果表明, TM能抑制白血病细胞的生长, 并能降低Sirt2的乙酰化作用底物H4K16蛋白的乙酰化水平; 同时, TM能抑制细胞周期、促进细胞的凋亡。通过MTT实验检测Sirt2表达降低对TM处理的影响结果, 明确了TM对细胞的抑制作用与细胞中Sirt2的表达有关。该研究证明, TM能抑制MLL-r白血病细胞的增殖并初步探索了其抑制机理, 这对利用TM治疗MLL-r白血病有重要的研究意义。

关键词 TM(thiomyristoyl); Sirt2; MLL-r白血病

Effect of Thiomyristoyl on Several MLL-r Leukemia Cells

WU Yuanyuan, LI Jing*

(College of Life Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract TM (thiomyristoyl) is a highly specific Sirt2 inhibitor that is currently known to selectively inhibit the activity of certain cancer cells and exhibit significant anticancer effects. In this study, we used TM to treat several human MLL-r leukemia cells, and the acetylation level of H4K16 in cells was detected by Western blot, and compared the treated cells with cell functional experiments. Including the detection of clone formation ability, the detection of cell viability by MTT method, the detection of cell cycle and apoptosis by flow cytometry. At the same time, the effects of the decrease of Sirt2 expression on TM treatment was detected by constructing *Sirt2* knockdown cell line and MTT assay. The results showed that TM could inhibit the growth of leukemia cells and reduce the acetylation level of H4K16 protein which is the acetylation substrate of Sirt2. At the same time, TM could inhibit cell cycle and promote cell apoptosis. The effect of the decrease in Sirt2 expression on TM treatment by MTT assay confirmed that the inhibition of TM on cells was related to the expression of Sirt2 in cells. This study demonstrates that TM can inhibit the proliferation of MLL-r leukemia cells and explore its inhibitory mechanism, which has important research significance for the treatment of MLL-r leukemia with TM.

Keywords TM (thiomyristoyl); Sirt2; MLL-r leukemia

收稿日期: 2019-04-26 接受日期: 2019-07-25

国家自然科学基金青年科学基金项目(批准号: 81700141)和国家自然科学基金面上项目(批准号: 81670151)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15655283679, E-mail: lij@shnu.edu.cn

Received: April 26, 2019 Accepted: July 25, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81700141, 81670151)

*Corresponding author. Tel: +86-15655283679, E-mail: lij@shnu.edu.cn

网络出版时间: 2019-12-11 11:03:02 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1102.018.html>

混合谱系白血病(mixed-lineage leukemia, MLL)基因,位于11号染色体长臂2区3带(11q23),是造血过程调控的一个关键基因^[1]。在白血病中,常见MLL基因的断裂、重排造成基因融合等异常现象,这与特定的白血病表型相关,常见的MLL融合基因有:MLL-AF9、MLL-ENL、MLL-AF4、MLL-AF10等^[2-4]。目前对MLL融合重排诱导的AML(MLL-rAML)白血病发生发展的机制已有较多的研究,大部分MLL-r白血病均是通过促进MLL的靶基因过度表达而发挥作用,在MLL-r AML细胞中可检测到大多数MLL的靶基因的过度表达^[5-7]。另外,根据我们实验室前期研究发现,Sirt2在MLL-rAML细胞中高表达,但目前对Sirt2在MLL-rAML发生和发展中的作用仍研究较少。

Sirt2是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)依赖性的第三类组蛋白去乙酰化酶沉默信息调节因子2(silence information regulator 2, Sir2)相关蛋白家族的重要成员,Sirt2可通过去乙酰化作用参与细胞分化、细胞内信号传导、细胞增殖、迁移等活动^[8]。Sirt2主要定位在细胞质中,与微管蛋白共定位并脱乙酰化,但在有丝分裂期间,Sirt2可以与染色质共定位于细胞核,作为组蛋白脱乙酰化酶,优先选择组蛋白H4赖氨酸16(H4K16Ac)脱乙酰化,并调节有丝分裂期间的染色体凝聚^[9-10]。当前许多研究表明,Sirt2在炎症、细菌感染、神经退行性疾病和癌症的发生发展中参与重要作用,调节Sirt2活性将可能对这些疾病的治疗有重要影响^[11]。Sirt2亦能参与白血病细胞的异常增殖和存活,并且在AML中,抑制Sirt2会导致细胞周期停滞、凋亡增加、增殖减少和粒细胞分化等现象^[8]。另外,有研究数据显示,AML患者骨髓中的Sirt2 mRNA水平显著高于健康个体,且在复发病细胞中的Sirt2表达水平更高^[12],显示Sirt2水平高表达与AML患者的不良预后有关^[12]。这预示,Sirt2在人MLL-rAML的发生发展中有重要作用,研究Sirt2在MLL-rAML白血病发生发展中的作用具有重要意义。

根据相关研究显示,Sirt2抑制剂具有抗癌作用^[11-17]。而在白血病研究中,Sirt2抑制剂是否能够有效抑制白血病的研究仍较少。硫化肉豆蔻酰赖氨酸化合物(thiomyrystoyl, TM)是一种具有高度选择性的Sirt2抑制剂,研究显示其IC₅₀值为0.028 μmol/L,但抑制Sirt1的IC₅₀值为98 μmol/L,而对于Sirt3~7,即使浓度高于

200 μmol/L也不对其抑制^[13]。体外研究发现,它能显著地抑制癌细胞的活性,尤其多种白血病细胞系对TM都非常敏感^[13]。体内研究也发现,TM具有明显的抗癌效果,通过TM治疗能增加患癌小鼠的存活率^[13]。综上所述,TM在白血病的发生发展及治疗方面具有不可忽视的潜力。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 本文我们选用的细胞系均由Loyola University Chicago医学实验中心提供,细胞系包括:Mono-Mac-6(MM6, MLL-AF9)、U937(MLL-AF10)、THP1(MLL-AF9)、RS4;11(MLL-AF4)、MV4;11(MLL-AF4)、Kopn8(MLL-ENL)。

1.1.2 主要试剂 本文采用的主要试剂Thiomyrystoyl购自MedKoo Biosciences公司;H4抗体购自Abcam公司;H4K16Ac抗体购自EMD Millipore Corp USA公司;β-actin(D6A8)抗体及Sirt2(D4S6J)抗体、Anti-rabbit IgG、Anti-mouse IgG抗体均购自CST公司;BCA蛋白浓度检测试剂盒购自Thermo Scientific公司;流式抗体PI购自Sigma公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自BD公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 以10%胎牛血清+1%双抗(10 mg/mL青霉素+10 KU/mL链霉素)+0.2%庆大霉素(40 mg/mL)+RPMI 1640培养基培养人源AML细胞,37 °C、5% CO₂及饱和湿度条件下培养,每2~3天换液传代。实验所用TM为粉末,DMSO溶解,配制成不同摩尔浓度分装冻存,加药处理时直接与细胞常规培养基混匀使用。

1.2.2 MTT检测 取对数生长期的细胞,台盼蓝计数后,使用平底96孔板,调整细胞浓度为2×10⁵细胞/mL。为减少误差,对照组和实验组每组设8个平行孔,100 μL/孔,37 °C、5% CO₂及饱和湿度培养,44 h后加入MTT(5 mg/mL),再4 h后加入10%的SDS,待甲臞完全溶解后,使用酶标仪检测570 nm波长处吸光度值。

1.2.3 Western blot法检测蛋白表达水平 使用RIPA裂解液+1%蛋白酶抑制剂+1%PMSF(胆碱脂酶抑制剂),提取细胞全蛋白。使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。电泳90 V,待蛋白跑过浓缩胶,调整电压为120 V;以70 V、0 °C冰水浴条件下转膜;5%脱脂奶粉室温封闭30 min,一抗(H4K16Ac或H4、β-Actin、

sirt2) 4 °C 孵育过夜。二抗(Anti-rabbit IgG或Anti-mouse IgG)室温孵育2 h。使用辣根过氧化物酶-ECL试剂, 暗室曝光显影。

1.2.4 克隆形成能力检测 配制甲基纤维素培养基, 加入2%青霉素和链霉素、0.2%庆大霉素、10%胎牛血清。按照1 000细胞/mL的浓度, 流式分选对数生长期细胞至甲基纤维素培养基, 常规培养。培养7天, 显微镜下克隆计数, 统计50个以上细胞集落为一个克隆数, 并在40×显微镜下拍照记录。

1.2.5 细胞周期检测 细胞经PBS洗涤后, 75%预冷无水乙醇固定细胞, 封存于4 °C过夜。第2天, 用含2%胎牛血清的PBS清洗细胞, 现配制染液(1 mg/mL PI染液+1 mg/mL RNA酶+PBS), 染色30 min, 流式细胞分析仪进行检测。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI法检测细胞凋亡 使用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒对细胞进行染色后, 流式细胞分析仪进行检测。

1.2.7 Sirt2 knockdown MM6细胞株的构建 将所购置的质粒[四种Sirt2 Human shRNA: 分别为shSirt2#Ctrl(碱基序列CTC GCC TGC TCA TCA ACA AGG AGA AAG CT)、shSirt2#1(碱基序列AGG AGG CAT GGA CTT TGA CTC CAA GAA GG)、shSirt2#2(碱基序列TGC GCT GCT ACA CGC AGA ACA TAG ATA CC)、shSirt2#3(碱基序列GCA GTT CAA GCC AAC CAT CTG TCA CTA CT)], 转化入大肠杆菌, 挑菌筛选后, LB培养基扩菌培养, 使用QIAGEN HiSpeed Plasmid Maxi Kit试剂盒抽提质粒。使用293T细胞, 慢病毒包装质粒载体, 获得目的病毒后, 以1 mL病毒加入 2×10^5 个MM6细胞及1 μ L助转染

试剂(ploybrene, 8 mg/mL), 32 °C、2 500 r/min离心4 h使细胞感染目的病毒。将获得的细胞, 用嘌呤霉素(2 mg/mL)筛选两周后进行Western blot检测鉴定。

1.2.8 统计学处理 实验数据采用GraphPad Prism 5软件进行分析, 流式图采用Summit 5.2软件分析, 细胞周期用Modifit软件分析, 细胞凋亡用Flowjo 7.6软件分析。分析结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并进行显著性差异分析, 其中* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TM影响白血病细胞的存活率

使用不同浓度(0、1 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L) TM分别处理Kopn8、MM6、U937、RS4;11细胞2天, MTT法检测细胞存活率。结果(图1)显示, 各浓度TM对四种细胞的存活率都有抑制作用, 且随着TM浓度的增加, 抑制作用增强。数据显示, TM浓度在0到10 μ mol/L之间, 细胞存活率变化最明显, 10 μ mol/L与25 μ mol/L之间处理的细胞存活率趋于稳定, 继续增加药物浓度则细胞存活抑制更明显。说明在一定剂量范围内, 细胞存活受TM抑制且10 μ mol/L到25 μ mol/L范围内, 细胞或处于耐受阶段, 浓度过大则导致细胞大量死亡。此外, 四种细胞对TM的敏感性稍有差别, 其中MLL-AF9融合基因阳性的MM6细胞对TM的敏感性最弱, 而MLL-AF10融合基因阳性的U937细胞对其最敏感。也说明TM对不同MLL融合基因的白血病细胞抑制效果也不同。本实验表明, TM可抑制白血病细胞的增殖且这种抑制作用具有剂量依赖性。

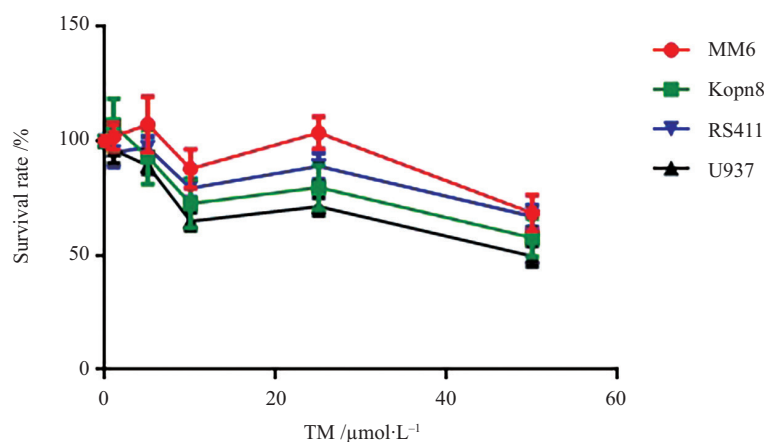


图1 MTT法检测TM处理对细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of TM treatment on cell viability by MTT assay

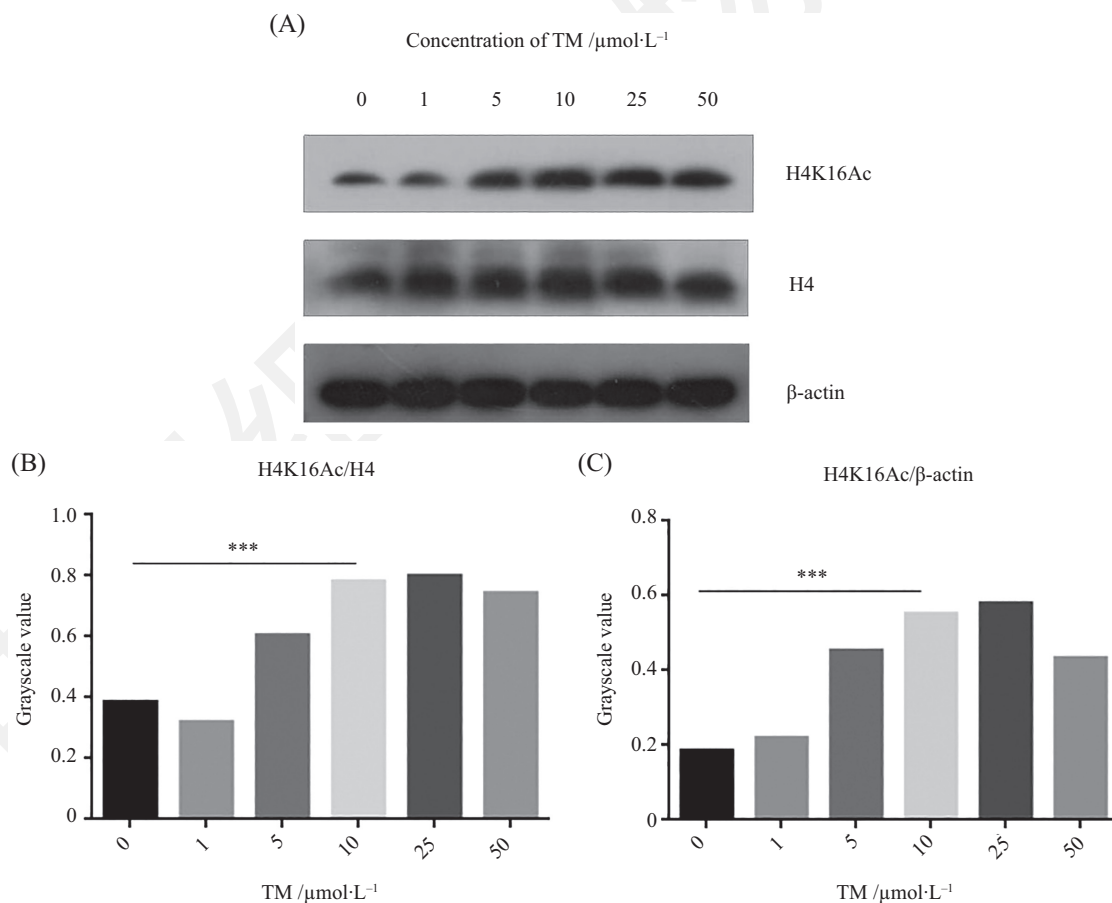
2.2 Western blot法检测MM6细胞中H4K16的乙酰化水平

在有丝分裂期间, H4K16Ac蛋白能被去乙酰化酶Sirt2优先选择脱乙酰化形成H4K16蛋白。为了检测TM对Sirt2底物蛋白H4K16的乙酰化水平的影响, 我们选用对TM敏感性较稳定的MM6细胞进行实验。分别用不同浓度(0、1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$) TM处理MM6细胞后, Western blot检测并进行灰度分析(图2)。结果表明, TM处理浓度在0到10 $\mu\text{mol/L}$ 之间, H4K16的乙酰化水平随TM浓度的增加而增加; 处理浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 与对照组相比, H4K16的乙酰化水平显著增加且表达量趋于稳定, 其中内参蛋白H4或 β -actin在各TM浓度处理下的表达水平相同, 结合灰度分析比较显示, 结果具有统计学差异。H4、 β -actin均为内参蛋白, H4K16Ac蛋白分子量大小为13~14 kDa, H4

蛋白分子量大小为13~14 kDa, β -actin蛋白分子量大小为42~43 kDa。实验表明, TM处理能增加MM6细胞内H4K16的乙酰化水平, 且TM的处理浓度在10 $\mu\text{mol/L}$ 以后, H4K16的乙酰化水平趋于稳定。实验结果说明, TM能通过抑制去乙酰化酶Sirt2的活性, 来抑制H4K16Ac蛋白的脱乙酰化过程, 进而促进H4K16的乙酰化, 且这种变化与TM的处理浓度呈正相关。

2.3 TM影响白血病细胞的克隆形成能力

根据之前的MTT及Western blot实验结果, 我们选用了TM敏感性表现稳定的MM6细胞和敏感性较高的U937细胞进行克隆形成实验(CFU), TM处理浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 。结果显示, 与DMSO处理的对照组相比, TM处理组细胞克隆数减少(图3A), 克隆大小也明显小于对照组(图3B)。于是再选用MM6、U937、THP1、MV4;11、RS4;11细胞进行CFU实验(同

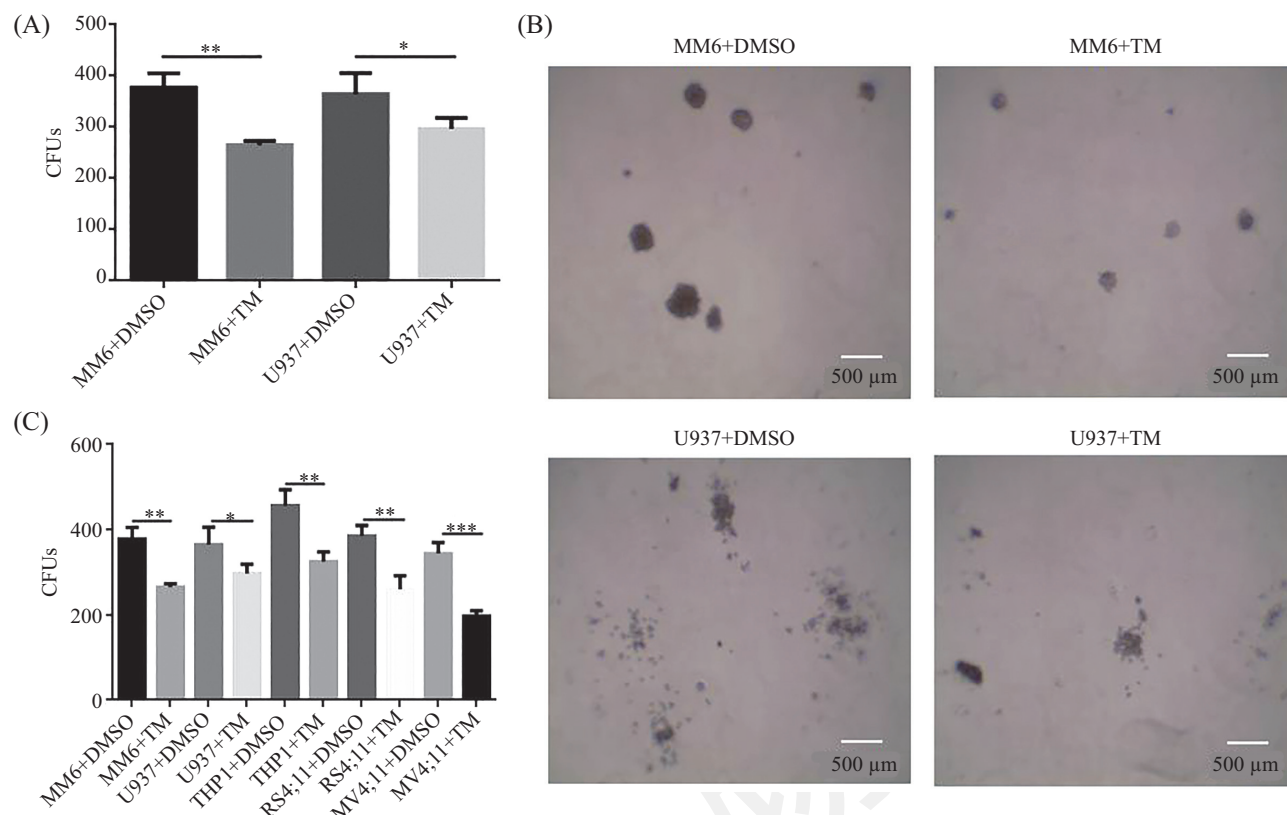


A: Western blot检测结果图; B: H4K16Ac/H4灰度分析比值图; C: H4K16Ac/ β -actin灰度分析比值图。*** $P < 0.001$ 。

A: Western blot test results; B: H4K16Ac/H4 gray scale analysis ratio map; C: H4K16Ac/ β -actin gray scale analysis ratio map. *** $P < 0.001$.

图2 Western blot检测H4K16的乙酰化水平的变化

Fig.2 Western blot analysis of H4K16Ac protein expression levels



A: MM6及U937细胞CFU实验克隆数统计图; B: 显微镜图; C: 几种人AML细胞CFU实验克隆数统计图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: statistic map of CFU experimental clones of MM6 and U937 cells; B: microscope micrograph; C: statistical graph of CFU experimental clones of several human AML cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图3 TM处理克隆形成能力检测实验克隆数目及大小变化的比较

Fig.3 Comparison of the number and size of clones in TM-cloned formation ability assay

时也对Kopn8细胞进行了CFU实验,但Kopn8细胞无法长成可计数的克隆。结果(图3C)显示,虽然不同细胞形成的克隆形态各有不同,但对克隆数统计及形态大小记录的结果显示, TM对这几种细胞的克隆形成能力均有抑制现象,对不同MLL融合基因的细胞差异并不大。实验结果表明, TM可以抑制MLL-r白血病细胞的增殖,降低细胞的克隆形成能力,说明TM在一定程度上可抑制白血病干细胞的“干性”。

2.4 TM对白血病细胞周期的影响

为检测TM处理对细胞周期变化的时效,我们以 $10 \mu\text{mol/L}$ 的TM对MM6细胞进行不同时间(6 h、8 h、10 h、12 h、24 h、48 h)的处理。收细胞后,使用流式细胞仪检测细胞周期。结果显示,与DMSO处理的对照组相比, TM处理时间为6~12 h时,对MM6细胞周期变化影响不大,但当处理时间大于24 h,处 G_1 期细胞数明显上升, S期及 G_2 期明显下降(图4A~图4C)。其他几种细胞U937、RS4;11、Kopn8处理24 h后, G_2 期也呈明显下降趋势(图4D), 其中MLL-AF9

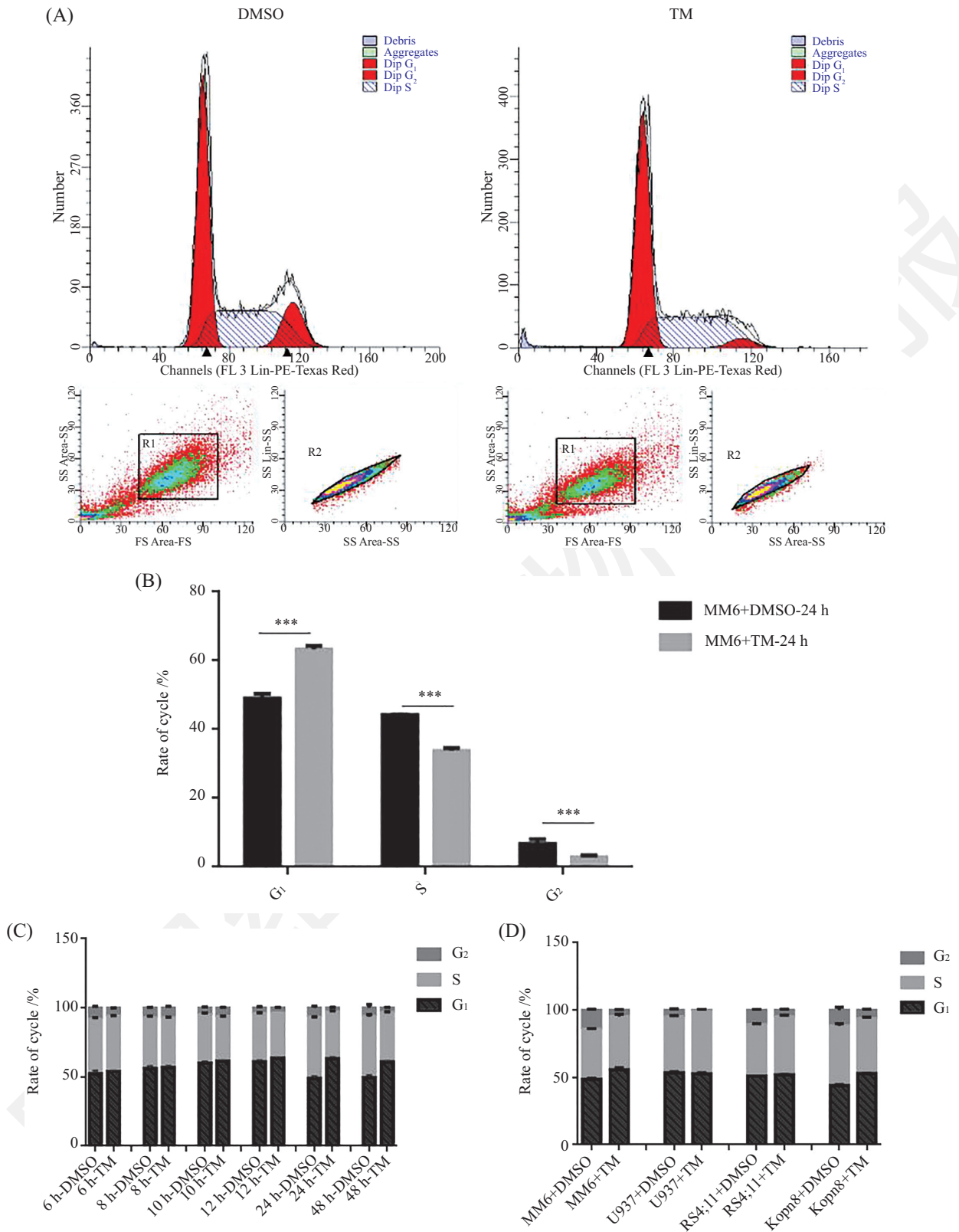
和MLL-ENL融合基因的细胞阻滞在 G_1 期的更明显。表明TM能诱导MLL-r白血病细胞周期阻滞,使细胞被阻滞在 G_1 期,进而抑制细胞增殖。

2.5 TM对白血病细胞凋亡的影响

根据TM处理对细胞周期影响的结果,为检测TM在相同处理时间及浓度条件下对细胞凋亡的影响,我们选用 $10 \mu\text{mol/L}$ 的TM浓度处理MM6、U937、THP1、RS4;11、Kopn8细胞24 h,后用流式细胞仪检测细胞凋亡。分析结果(图5)显示,与对照组相比, TM处理使凋亡细胞数增加,虽然细胞不同,凋亡程度不同,但总体凋亡细胞数明显增加,其中细胞的MLL融合基因类型与凋亡率变化关联并不明显。表明TM能促进白血病细胞的凋亡,导致细胞的存活率降低,与MTT实验结果相吻合。

2.6 TM对Sirt2 knockdown细胞的抑制作用

为检测Sirt2低表达对TM抑制作用的影响,我们构建了Sirt2 knockdown细胞株,以检测相同浓度TM处理,是否能靶向抑制更多Sirt2 knockdown细胞

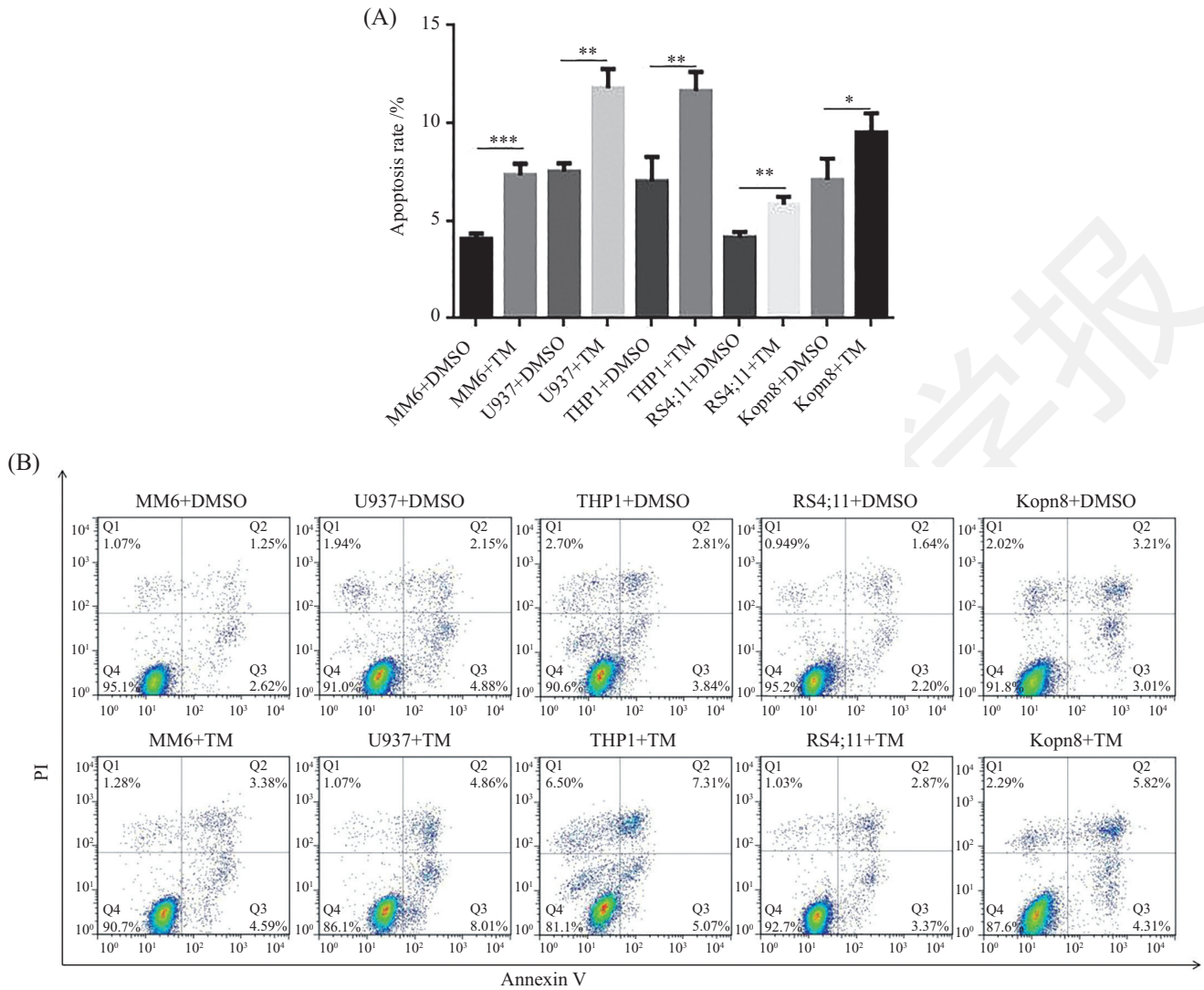


A: TM处理24 h后, 流式细胞术检测细胞周期图; B: TM处理24 h后, 流式细胞术检测细胞G₁、S、G₂期比较图; C: 不同处理时间细胞周期比值图; D: 不同细胞TM处理24 h后的细胞周期比值图。***P<0.001。

A: after 24 hours of TM treatment, cellcycle map was detected by flow cytometry; B: TM treatment for 24 hours, flow cytometry to detect cell G₁, S, G₂ phase comparison map; C: cellcycle ratio map of different treatment time; D: cellcycle ratio map after treatment with different cells for 24 h. ***P<0.001.

图4 流式细胞术检测细胞周期的变化

Fig.4 Flow cytometry to detect changes in cell cycle



A: 流式细胞术检测细胞凋亡率统计图; B: 流式细胞术检测细胞凋亡率。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: flow cytometry to detect apoptosis rate statistics; B: flow cytometry to detect apoptosis rate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 流式细胞术检测细胞凋亡的变化

Fig.5 Flow cytometry to detect changes in apoptosis

的存活。于是, 首先选取MLL-AF9融合基因的MM6细胞, 使用shRNA干扰技术将其感染表达嘌呤霉素抗性, 同时表达shSirt2#Ctrl、shSirt2#1、shSirt2#2、shSirt2#3的慢病毒后, 嘌呤霉素筛选细胞2周, 获取Sirt2 knockdown MM6细胞。随后Western blot实验验证Sirt2蛋白表达水平。结果(图6)显示, 与对照组shSirt2#Ctrl相比, 慢病毒介导的Sirt2靶向shRNA降低了Sirt2蛋白的表达, 且与未感染慢病毒的MM6细胞组比较, shSirt2#Ctrl组Sirt2蛋白表达并无变化。虽然敲低效果不一, 但所得的MM6-shSirt2#1、MM6-shSirt2#2、MM6-shSirt2#3细胞Sirt2蛋白表达均有所下降, 其中MM6-shSirt2#2敲低效果更明显,

因此选取该细胞进行后续实验。

使用不同浓度TM处理MM6、MM6-shSirt2#Ctrl、MM6-shSirt2#1、MM6-shSirt2#2、MM6-shSirt2#3细胞, MTT实验检测结果(图7)发现, 与对照组MM6-shSirt2#Ctrl相比, 三种Sirt2 knockdown MM6细胞的生长同样被TM抑制, 其中MM6-shSirt2#2与对照组MM6及MM6-shSirt2#Ctrl相比, TM处理使得MM6-shSirt2#2细胞存活率下降, 且结果具有显著性差异, 在10 $\mu\text{mol/L}$ 时, $P < 0.001$ 。说明当细胞中Sirt2蛋白水平越低, 相同浓度TM处理将会抑制更多癌细胞, 表明TM对AML细胞的抑制作用与Sirt2表达相关。

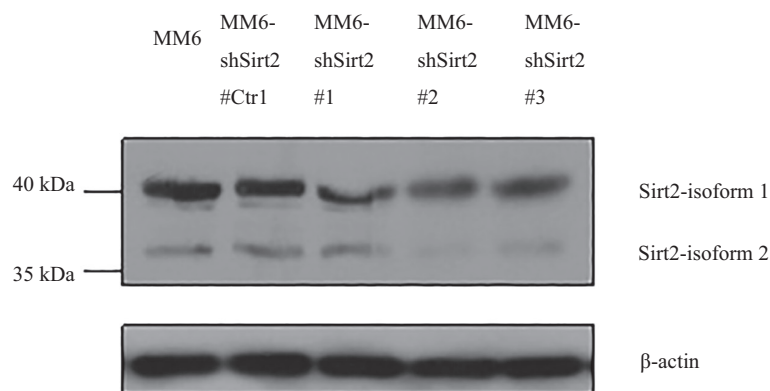


图6 Western blot检测Sirt2蛋白水平

Fig.6 Western blot detection of Sirt2 protein levels

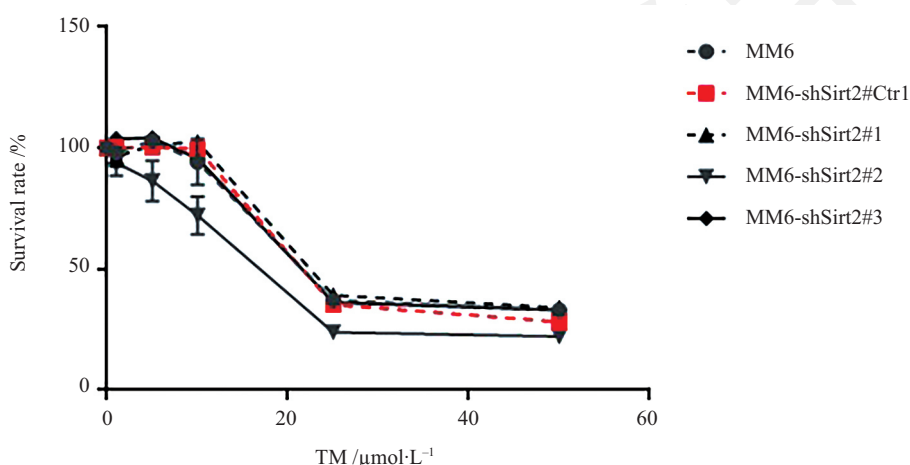


图7 MTT法检测TM处理对不同Sirt2表达水平的细胞存活率的影响

Fig.7 Effects of TM treatment on cell viability of different Sirt2 expression levels by MTT assay

3 讨论

白血病发病率日益增长, 亟待解决。随着医学的进步, 小分子药物靶向治疗白血病, 成为当前血液学疾病研究的热点^[18]。Thiomyristoyl是近期被开发出来的一种有效的Sirt2抑制剂, 研究显示多数的白血病细胞对其十分敏感^[13]。本课题组通过使用TM药物处理几种白血病细胞, 展开相关研究。我们首先采用MTT实验检测得出, TM可以降低MLL-r白血病细胞的存活率, 对不同MLL融合基因的细胞增殖均能抑制且这种抑制作用具有剂量依赖性。这预示利用TM治疗MLL-r白血病的可能性, 于是我们进一步展开相关实验。

根据相关文献报道, 在Sirt2敲除小鼠细胞的有丝分裂中, H4K16Ac蛋白表达明显升高, 且其表达水平在G₂-M期显著下降^[10]。本实验中, 我们使用TM处理白血病细胞, Western blot检测结果显示, TM处

理细胞能增加Sirt2的底物蛋白H4K16的乙酰化水平, 且与TM的处理浓度呈正相关, 表明TM能作为Sirt2的抑制剂发挥抑制去乙酰化酶活性的作用。克隆形成实验结果表明, TM可以在10 μmol/L处理浓度下, 降低白血病细胞的克隆形成能力, 抑制白血病干细胞的“干性”。此外, 检测细胞周期及凋亡实验得出, TM能使细胞周期阻滞在G₁期, 降低G₂-M期比值, 同时TM处理促进细胞的凋亡, 进一步表明导致细胞生长明显受阻的原因。这与文献报道Sirt2参与白血病细胞的异常增殖和存活, 且在AML中, 抑制Sirt2会导致细胞周期停滞、凋亡增加、增殖减少等现象^[8]结果一致。为进一步研究Sirt2表达对TM作用的影响, 我们构建了三种Sirt2 knockdown细胞株, 进行MTT检测实验得出, Sirt2低表达可以导致TM抑制作用的增强, 表明了TM对细胞的抑制作用与细胞中Sirt2表达相关。

关于TM发挥抑制作用的具体机制如何。有报道称, Sirt2可以抑制NEDD4(c-Myc的E3泛素连接酶)的表达, c-Myc是一种在许多癌症中高表达的癌蛋白^[19]。研究发现, TM在乳腺癌细胞中能降低c-Myc蛋白水平, TM可以通过抑制Sirt2, 促进c-Myc降解^[13]。因此我们猜想, 在AML白血病发生发展过程中, 或许可以通过TM抑制Sirt2, 降低c-Myc癌蛋白水平的途径, 从而抑制白血病细胞的生长。具体研究还有待后期进一步实验研究。

由此, 本文表明Sirt2抑制剂TM可以抑制人源MLL-r白血病细胞增殖, 并阻滞细胞周期, 促进细胞凋亡, 这将为研究白血病的治疗提供新的目标。但对TM作用的具体机制及与MLL融合基因的具体关系还有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Ziemin-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R III, Patel Y, Harden A, *et al.* Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(23): 10735-9.
- Chen Y, Anastassiadis K, Kranz A, Stewart AF, Arndt K, Waszkow C, *et al.* MLL2, not MLL1, plays a major role in sustaining MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2017; 31(6): 755-70.
- Jansen MW, van der Velden VH, van Dongen JJ. Efficient and easy detection of MLL-AF4, MLL-AF9 and MLL-ENL fusion gene transcripts by multiplex real-time quantitative RT-PCR in TaqMan and light cycler. *Leukemia* 2005; 19: 2016-8.
- Marschalek R. Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. *Br J Haematol* 2011; 152(2): 141-54.
- Slany RK. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* 2009; 94(7): 984-93.
- Faber J, Krivtsov AV, Stubbs MC, Wright R, Davis TN, van den Heuvel-Eibrink M, *et al.* HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. *Blood* 2009; 113: 2375-85.
- Liu H, Cheng EH, Hsieh JJ. MLL fusions: pathways to leukemia. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1204-11.
- Deng AL, Ning QY, Zhou L, Liang YJ. SIRT2 is an unfavorable prognostic biomarker in patients with acute myeloid leukemia. *Sci Rep* 2016; 6: 27694.
- Kim HS, Vassilopoulos A, Wang RH, Lahusen T, Xiao Z, Xu XL, *et al.* SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 487-99.
- Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng HL, Alt FW, *et al.* SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev* 2006; 20(10): 1256-61.
- Asad Ali Shah, Akihiro Ito, Akiko Nakata, Minoru Yoshida. Identification of a selective SIRT2 inhibitor and its anti-breast cancer activity. *Biol Pharm Bull* 2016; 39(10): 1739-42.
- Xu H, Li Y, Chen L, Wang C, Wang Q, Zhang H, *et al.* SIRT2 mediates multidrug resistance in acute myelogenous leukemia cells via ERK1/2 signaling pathway. *Int J Oncol* 2016; 48: 613-23.
- Jing H, Hu J, BinHe B, Negrón Abri YL, Stupinski J, Weiser K, *et al.* A SIRT2-selective inhibitor promotes c-Myc oncoprotein degradation and exhibits broad anticancer activity. *Cancer Cell* 2016; 29(3): 297-310.
- Cheon MG, Kim W, Choi M, Kim JE. AK-I, a specific SIRT2 inhibitor, induces cell cycle arrest by downregulating Snail in HCT116 human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2015; 356(2): 637-45.
- He B, Hu J, Zhang X, Lin H. Thiomyristoyl peptides as cell-permeable Sirt6 inhibitors. *Org Biomol Chem* 2014; 12(38): 7498-502.
- Hoffmann G, Breitenbücher F, Schuler M, Ehrenhofer-Murray AE. A novel sirtuin 2 (SIRT2) inhibitor with p53-dependent proapoptotic activity in non-small cell lung cancer. *J Biol Chem* 2014; 289(8): 5208-16.
- McCarthy AR, Sachweh MC, Higgins M, Campbell J, Drummond CJ, van Leeuwen I, *et al.* Tenovin-D3, a novel small-molecule inhibitor of sirtuin SirT2, increases p21(CDKN1A) expression in a p53-independent manner. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(4): 352-60.
- 魏旭东, 陈琳. 急性髓系白血病的分子靶向治疗. 白血病·淋巴瘤(Wei Xudong, Chen Lin. Molecular targeted therapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia Lymphoma*) 2019; 28(1): 8-11.
- Liu PY, Xu N, Malyukova A, Scarlett CJ, Sun YT, Zhang XD, *et al.* The histone deacetylase SIRT2 stabilizes Myc oncoproteins. *Cell Death Diff* 2013; 20(3): 503-14.