

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.010

HDAC2 sumo-E3 连接酶活性在 DLD1 细胞迁移和增殖中的作用 *

马琳琳^{1,2} 李 玲¹ 荆 昭¹ 李莹莹¹ 郭 韡² 胡雪婷² 邢 伟^{2Δ} 徐 祥^{1,2Δ}

(1 青岛大学医学部基础医学院 山东 青岛 266071;

2 第三军医大学第三附属医院野战外科研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 重庆 400012)

摘要 目的:探讨 HDAC2 sumo-E3 连接酶对 DLD1 细胞迁移与增殖的影响和可能机制。**方法:**全基因合成 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体 HDAC2 (325-488), 并构建其重组慢病毒表达载体; 感染 DLD1hdac2^{-/-} 细胞 (无内源性 HDAC2 表达), 筛选稳定表达 HDAC2(325-488)的细胞克隆 DLD1h325-488; RTCA 实时细胞分析仪、Trans-well 等检测 DLD1h325-488 稳定细胞的增殖和迁移能力; 免疫印迹、qRT-PCR 检测 DLD1h325-488 稳定细胞增殖和迁移相关基因的表达。**结果:**构建了稳定表达 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体 HDAC2 (325-488) 的细胞株 DLD1h325-488, 并获得稳定表达 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体 HDAC2 (325-488)的 DLD1h325-488 细胞。与对照组细胞相比, DLD1h325-488 细胞增殖活性无显著变化, 但是细胞的迁移能力和迁移相关蛋白 MMP14 的表达显著上升。**结论:**HDAC2 sumo-E3 连接酶可能通过上调 mmp14 的表达而促进 DLD1 细胞的迁移。

关键词:HDAC2; SUMO; 迁移; MMP14

中图分类号:Q55; Q78; R730.231 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)10-1854-06

Effect of HDAC2 Sumo-E3 Ligase Segment on the Proliferation and Migration of DLD1 Cells*

MA Lin-lin^{1,2}, LI Ling¹, JING Zhao¹, LI Ying-ying¹, GUO Wei², HU Xue-ting², XING Wei^{2Δ}, XU Xiang^{1,2Δ}

(1 Qingdao University School of Basic Medical Sciences, Qingdao, Shandong, 266071, China;

2 State Key laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, affiliated to the Third Military Medical University, Chongqing, 400012, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of HDAC2 sumo-E3 ligase segment on proliferation and migration of DLD1 cells and the potential mechanisms. **Methods:** The coding sequence of the sumo-E3 ligase segment of HDAC2 (325-488aa) was chemically synthesized and ligated into a recombinant lentiviral vector. The lentiviral vector was packaged into lentiviral particles and used to infect HDAC2-knockout DLD1 cells (DLD1-HDAC2^{-/-}), and stably transfected cells were selected and named DLD1h325-488. Then, proliferation and migration of the DLD1h325-488 cells were determined by RTCA and transwell assay; and changes in expression of proliferation- and migration-related genes were determined by qRT-PCR and immune-blotting. **Results:** Stable DLD1h325-488 cell line was successfully obtained. Compared to the control cells, and DLD1h325-488 cells stably expressing HDAC2 sumo-E3 ligase mutant. HDAC2 (325-488). DLD1h325-488 cells showed no significant changes in proliferation, but significantly increased migration, which was accompanied by increase expression of the migration-related MMP14. **Conclusion:** HDAC2 sumo-E3 ligase segment may promote the migration of DLD1 cells by upregulating MMP14 expression.

Key words: HDAC2; SUMO; Migration; MMP14

Chinese Library Classification(CLC): Q55; Q78 R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1854-06

前言

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)可引起组蛋白的去乙酰化,是表观遗传调控的主要途径之一^[1],参与发育、多种生理病理过程,包括癌症、炎症、心肌梗大、神经发育等^[2-5]。HDACs 通过与转录辅因子蛋白结合形成复合物,并募集到基因的上游启动子区域,导致组蛋白去乙酰化,进而影响染色质结构由紧密型向松弛型转变,阻碍转录因子、增强子与 DNA 结合,从而抑制基因的转录水平表达。HDAC2 是组蛋白去乙酰化酶(HDACs)家族成员之一,由 488 个氨基酸构成的肽链, N

端为二聚化反应区,第 54-323 个氨基酸是去乙酰化酶活性功能结构域^[6]。越来越多的证据表明 HDAC2 在肿瘤发生和发展中起着至关重要的作用,通常在结肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、淋巴瘤等多种肿瘤中高表达^[7-11]。HDAC2 下调抑癌基因 P53、P16、P21 表达,抑制癌细胞的凋亡,促进细胞存活^[12-15]。在缺氧环境下,HDAC2 抑制 pVHL 的转录表达,从而维持 HIF-1α 稳定性,促进血管生成和肿瘤进程^[16]。相反,HDAC2 的缺失突变可阻止癌细胞的生长,促进细胞的凋亡^[17]。在自发结肠癌小鼠(APCmin)肿瘤形成过程中,HDAC2 的表达也逐渐升高,但在 HDAC2 敲除的 APCmin 小鼠中,肿瘤的数量和大小限制减少^[18,19]。

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81502434);重庆市基础与前沿研究计划一般项目(cstc2015jcyjA10078)

Δ 通讯作者:邢伟, E-mail: wxingchina@sina.com;

徐祥, E-mail: xiangxu@ymail.com

(收稿日期:2017-10-18 接受日期:2017-11-10)

以前的研究通常聚焦在 HDAC2 的去乙酰化酶活性在基因转录调控及生理病理过程中的作用。但是,我们最近的研究发现 HDAC2 能够选择性上调 ODC1、c-Myc、Bcl-2、survivin 等帽结构依赖性 mRNA 的蛋白质翻译表达,且不依赖于其去乙酰化酶活性^[20]。此功能通过 HDAC2 的 SUMO (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 化修饰 E3 连接酶活性介导上调 eIF4E 的 SUMO 化修饰,且 SUMO 化修饰抑制 eIF4E 与 4E-BP1 间的结合,促进 eIF4E 与 eIF4G 间的结合,进而促进蛋白质翻译起始复合物 eIF4F 的形成,选择性上调帽结构依赖性 mRNA 蛋白质翻译^[21,22]。进一步的研究显示 HDAC2 SUMO-E3 连接酶功能结构域位于其 C 末端氨基酸 AA325-AA488 区域,过表达此 SUMO-E3 连接酶功能结构域突变体 (HDAC2325-488) 能够促进荧光素酶报告基因的帽依赖性翻译^[23]。但是,HDAC2 SUMO-E3 连接酶活性的细胞生物学功能还不清楚。因此,在本研究中,我们以 DLD1hdac2^{-/-} 结肠癌细胞系 (无内源性 HDAC2 表达) 为模型^[24],构建了表达 HDAC2 SUMO-E3 连接酶功能结构域突变体 HDAC2325-488 的稳定细胞 DLD1h325-488,探讨 HDAC2 sumo-E3 连接酶对 DLD1 细胞迁移与增殖的影响和可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

细胞模型:HDAC2 基因敲除结肠癌细胞系 DLD1hdac2^{-/-} 由武汉大学杜润蕾教授馈赠^[24],培养条件为 RPMI1640 培养基 (BI),添加 10%FBS (BI),100 U/mL 的青霉素双抗 (thermo)。DLD1hdac2^{-/-} 细胞用来构建表达 HDAC2 SUMO-E3 连接酶功能结构域突变体的稳定细胞 DLD1h325-488。以 293FT 细胞作为病毒包装细胞,培养条件为 DMEM 高糖培养基 (BI),添加 10%FBS (BI),100 U/mL 的青霉素双抗 (thermo)。抗体:本研究使用的一抗包括 Flag 标签抗体 (1:1000 稀释, CST, #14793)、HDAC2 抗体 (1:1000 稀释, CST, #57156)、MMP14 抗体 (1:500 稀释, abcam, ab51074)、ODC1 抗体 (1:1000 稀释, Epitomics, #5495-L)、cyclin D1 抗体 (1:1000 稀释, CST, #2978)、 β -actin 抗体 (1:1000 稀释, CST, #4970) 慢病毒表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 及病毒包装质粒均由本实验保存。

1.2 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体的慢病毒表达载体的构建

通过全基因合成获得 HDAC2 sumo-E3 连接酶功能结构域片段 HDAC2325-488,即从第 325 位氨基酸到第 488 位羧基末端对应的编码基因序列。合成的基因在氨基端添加 FLAG 标签,5' 端和 3' 端含有酶切位点 *Xba*I、*Bam*HI。经酶切连接到慢病毒表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP,获得重组基因质粒,经测序鉴定载体构建是否成功。表达质粒转染 293FT 细胞,48 小时后观察荧光蛋白,再用 FLAG 抗体、HDAC2 抗体检测目的基因的表达。

1.3 慢病毒的包装与收集

将生长状态良好的人胚肾 293FT 细胞以 50%~70% 密度接种于 10 cm 的培养皿中,24 h 待细胞贴壁后即可用于转染。转染前 1 h 将培养基更换为无血清培养基,将重组基因质粒与病毒包装载体以一定比例混合 (1:1:1:1,4 质粒系统),与 Opti-MEM 混匀静置 5 min 后,加入一定体积转染试剂 neofect,轻柔混合,室温静置 20 min 后,将混合液加入待转染的 293T 细

胞中,摇匀,培养箱中培养 48 h 后,收集 293FT 细胞上清液。

配制 5 $\times$ PEG-8000+NaCl (称取 NaCl 8.766g、PEG8000 50 g,溶解在 200 mL Milli-Q 纯水中),121 $^{\circ}$ C 灭菌 30 min,保存在 4 $^{\circ}$ C。使用 0.45 μ m 滤头过滤慢病毒上清液;每 30 mL 过滤后的病毒初始液,加入 5 $\times$ PEG-8000+NaCl 母液 7.5 mL;每 20-30 min 混合一次,共进行 3-5 次;4 $^{\circ}$ C 放置过夜;4 $^{\circ}$ C,4000 $\times$ g,离心 20 min;吸弃上清,静置管子 1-2 min,吸走残余液体;加入适量的慢病毒溶解液溶解慢病毒沉淀;集中后的慢病毒悬液分装成 50 μ L 每份,保存在成品管中。保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.4 筛选表达 HDAC2(325-488)突变体的稳定细胞系

将 DLD1hdac2^{-/-} 细胞以 30%~50% 的密度铺入 6 孔板,慢病毒感染 48 h 后,细胞消化后经 10 倍梯度稀释至约 10 个细胞 /ml,接种 96 孔板,100 μ L / 孔,每个孔 1 个细胞,培养 7 天后可见单细胞克隆,选取表达绿色荧光蛋白的阳性克隆继续扩大培养。同时设置空载对照组,获得 GFP 标记的 DLD1hdac2^{-/-} 细胞。Western blot 进一步鉴定获得的表达外源性 HDAC2 (325-488) 的 DLD1h325-488 细胞系。

1.5 免疫印迹检测蛋白表达

分别收集适量稳定感染的目的细胞与对照组细胞,提取细胞全蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,每组蛋白上样 50 μ g,10% 的 SDS-PAGE 电泳分离后,切取目的条带转印至 0.22 μ m PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h,一定稀释比例的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBST 清洗 5 min $\times$ 3 次,二抗 (山羊抗兔 IgG 抗体,1:10000 稀释) 室温孵育 1 h,PBST 清洗 5 min $\times$ 3 次,滴加 ECL 化学发光底物 (Millipore),多功能发光成像仪 (Bio-Rad/Chemidoc MP) 拍照观察。

1.6 细胞的活性和增殖指数分析

MTT 法检测细胞活性,分别接种 DLD1hdac2^{-/-} 和 DLD1h325-488 细胞至 96 孔板,3000 个细胞 / 孔。于 24 h、48 h、72 h 三个时相点加入 10 μ L MTT (5 mg/mL),继续培养 4 h,去培养基上清,每孔加入 100 μ L DMSO 溶剂,摇床上溶解混匀,490 nm 波长酶标仪检测吸光值。

多功能实时无标记细胞分析仪 (Real-time cell assay, RT-CA, ACEA Bioscience/ xCELLigence RTCA DP) 检测细胞增殖指数,收集对数期 DLD1hdac2^{-/-} 和 DLD1h325-488 细胞并计数,调整细胞浓度至 10 万 /mL,向 E-Plate 检测板中加入 50 μ L 培养基后放入 RTCA 仪上校正基线,向 E-Plate 检测板中每孔接种 1 万个细胞,超净台内放置约 30 min。将加入细胞的 E-Plate 检测板放入 RTCA 仪器,进行实时动态的细胞增殖检测。

1.7 Trans-well 细胞迁移实验

将 DLD1hdac2^{-/-} 和 DLD1h325-488 细胞消化,用无血清 DMEM 培养基配制成 1 $\times$ 10⁶ 个 /mL 的细胞悬液。于 24 孔板中加入 500 μ L 10% FBS 16DMEM 培养基,将 Trans-well 小室 (Millipore, 8 μ m 孔径的膜) 置于孔板上,每个小室加入 100 μ L 细胞悬液,即每孔细胞约 1 $\times$ 10⁵ 个细胞,每组设置 3 个复孔。细胞培养箱中培养 24 h 后取出小室,乙醇固定 15 min,0.1% 结晶紫染色 10 min,用棉签轻轻擦去小室内滞留细胞,显微镜下拍照计数,观察小室下表面的细胞数量以判断细胞迁移情况。

1.8 实时荧光定量 RT-PCR 检测

利用 RNA 提取试剂盒 (bioteck) 从培养细胞中提取总 RNA,然后用逆转录试剂盒 (Takara) 将 1 μ g 总 RNA 逆转录合

成 cDNA。取 2 μ L cDNA 为模板, SYBR Green qPCR master mix 试剂(Takara), 所有具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。应用实时荧光定量 PCR 仪器(Bio-Rad/ CFX96)进行定量 PCR 检测分析。

1.9 统计学分析

用 SPSS10.0 软件处理数据, 计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间均数比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体的慢病毒表达载体

全基因合成 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体 HDAC2 (325-488), 连接到 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 载体, 测序结果符合预期, N 端含有 FLAG 标签 (图 1A)。表达质粒转染 293FT 细胞 48 小时后, 荧光显微镜观察有绿色荧光蛋白表达 (图 1B)。western blot 检测证实, 目的基因转染组有外源性 HDAC2(325-488)突变体蛋白表达, 而空载对照组无表达 (图 1C)。以上结果证明 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体的慢病毒表达载体构建成功。

2.2 获得稳定表达 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体 HDAC2 (325-488)的 DLD1^{h325-488} 细胞

慢病毒感染 DLD1^{h325-488} 细胞 48 h 后, 荧光显微镜下观察细胞生长状态良好, 可见到绿色荧光。细胞消化后经稀释接种 96 孔板, 1 个细胞 / 孔, 培养 7 天后可见单细胞克隆, 选取表达绿色荧光蛋白的阳性克隆继续扩大培养 (图 2A)。FLAG 标签抗体

检测鉴定获得的单细胞克隆可以表达外源性 HDAC2(325-488) (图 2B)。由此, 我们获得了稳定表达 HDAC2 (325-488)的 DLD1^{h325-488} 细胞。

2.3 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体促进 DLD1 细胞迁移

为了研究 HDAC2 sumo-E3 连接酶活性对细胞迁移能力的影响, 利用 trans-well 小室分析发现 DLD1^(h325-488) 细胞与空载对照细胞相比, 迁移速率显著提高 (图 3A、B), 提示 HDAC2 sumo-E3 连接酶能够促进 DLD1 细胞的迁移能力。

2.4 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体对 DLD1 细胞增殖的影响

MTT 实验结果显示: DLD1^{h325-488} 细胞与回补并表达 HDAC2(325-488)的 DLD1^{h325-488} 细胞的活性无显著性差异 (图 3A)。采用 RTCA 实时细胞分析检测仪分析进一步证实 HDAC2(325-488)的表达对细胞的增殖指数有略微的促进, 但无显著影响 (图 3B), 说明 HDAC2 sumo-E3 连接酶活性在 DLD1 细胞的增殖过程中发挥较小的作用。

2.5 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体促进迁移相关蛋白 MMP14 的表达

为了探究 HDAC2 sumo-E3 连接酶促进细胞迁移的机制, 我们检测了迁移相关蛋白的表达。Western blot 结果显示: 与 DLD1^{h325-488} 细胞相比, DLD1^(h325-488) 细胞中基质金属蛋白酶 MMP14 蛋白表达水平显著上调, 尽管 mRNA 水平无显著差异 (图 4A、B), 由此提示 HDAC2 sumo-E3 连接酶对 MMP14 的转录后表达调控。另一方面, 与 DLD1^{h325-488} 细胞相比, DLD1^(h325-488) 细胞中 cyclinD1、ODC1 等蛋白表达水平上调不显著 (图 4C、D), 这与细胞增殖活性无显著变化相一致。

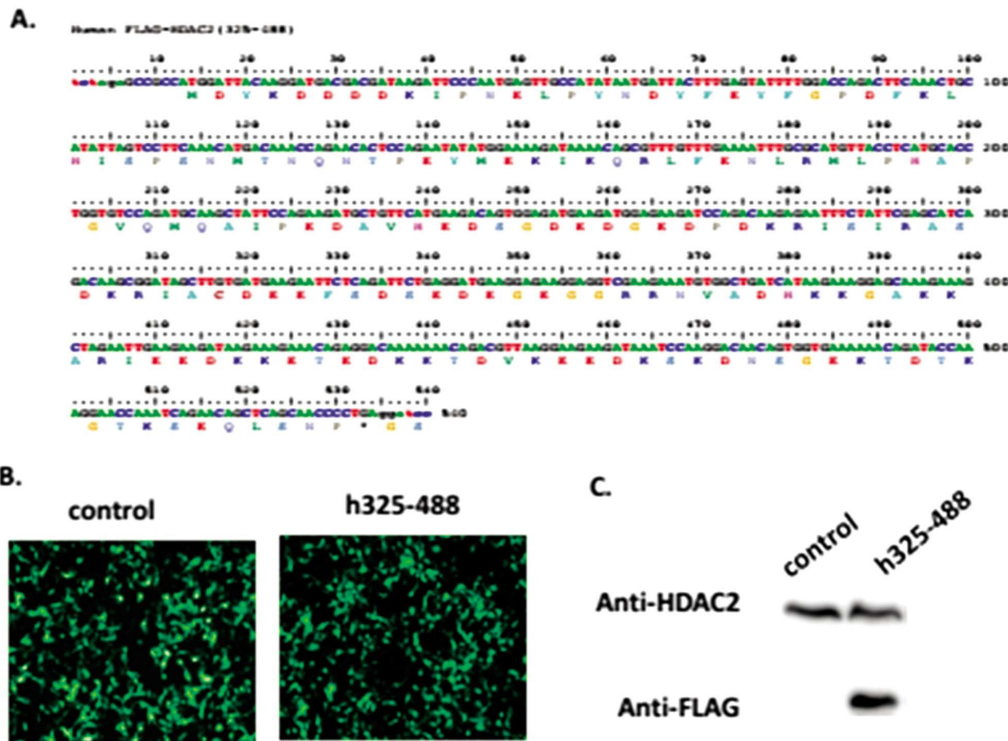


图 1 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体的慢病毒表达载体构建及表达

Fig.1 Construction and expression of lentiviral expression vector of HDAC2 sumo-E3 ligase mutant

A 重组载体测序; B. 转染 293FT 细胞, 荧光显微镜鉴定目的基因和 GFP 标记蛋白表达; C. 免疫印迹检测内源性 (anti-HDAC2 抗体) 及外源性 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体 (anti-flag 抗体) 的表达

A. Recombinant vector sequencing; B. Transfection of 293FT cells, the expression of target gene and GFP marker protein was identified by fluorescence microscopy. C. Immunoblotting Assays Expression of endogenous (anti-HDAC2 antibody) and exogenous HDAC2 sumo-E3 ligase mutant (anti-flag antibody)

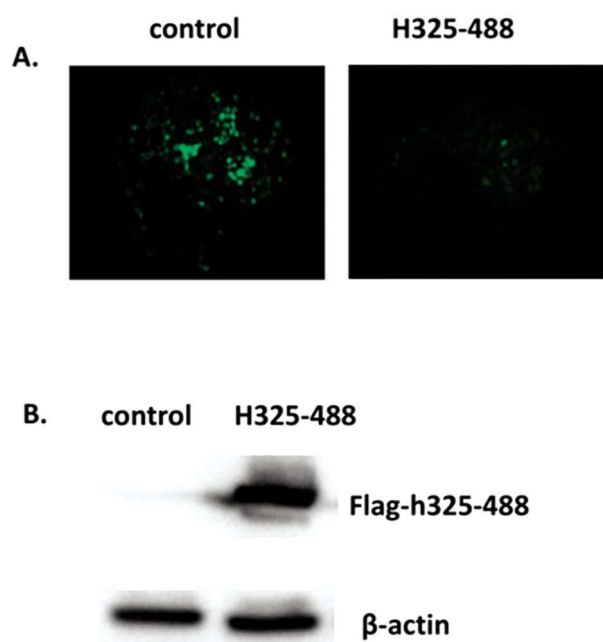


图2 筛选 DLD1h3235-488 稳定细胞系

Fig.2 Screening DLD1h3235-488 Stable cell lines

A.经稀释单个细胞在接种 96 孔板,获得对照细胞和 DLD1h3235-488 单细胞克隆,荧光显微镜观察;B.免疫印迹检测 DLD1h3235-488 细胞系中外源性 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体(anti-flag 抗体)的表达。

A. The cells were stained with 96-well plates to obtain control cells and DLD1h3235-488 single cell clones were observed by fluorescence microscopy. B. Immunoblotting Detection of exogenous HDAC2 sumo-E3 ligase mutants in DLD1h3235-488 cell lines -flag antibody).

3 讨论

HDAC2 不仅通过其内在的去乙酰化酶活性,抑制抑癌基因的转录水平表达,而且还因其 SUMO 化修饰功能结构域选择性促进癌基因的翻译表达。我们前期的研究确定了 HDAC2 的 SUMO 化修饰功能结构域及其翻译调控活性,本研究进一步证实 HDAC2 的 SUMO E3 连接酶活性在促进结肠癌细胞迁移中的重要作用以及对迁移相关蛋白 MMP14 的表达调控作用。

MMP14 在肿瘤侵袭转移、细胞存活以及血管形成中发挥重要作用。在人体胶质瘤细胞系 U251 和 A172 中共培养人星形胶质细胞,通过体外 transwell 系统确定其对胶质瘤迁移和侵袭的影响,发现源自胶质瘤细胞的 MMP14 是该系统中 MMP 家族基因的最高度上调成员,用 siRNA 敲除 MMP14 导致细胞迁移和侵袭能力减弱,表明 MMP14 与肿瘤细胞的侵袭和迁移密切相关^[25]。垂体腺瘤(PAs)是非癌性肿瘤,约 35% 的侵袭性腺瘤已被归类为“侵袭性垂体腺瘤(IPAs)”。侵袭机制是一个复杂的过程,包括金属蛋白酶、抑制剂和肿瘤微环境因素等。在同一样品中,用免疫组织化学法测定 MMP2 和 MMP14 蛋白水平,证实 MMP14 表达的升高与 IPA 的侵入性特征相关。MMP14 在肿瘤浸润和血管生成中起重要作用,可能是治疗的靶标^[26,27]。MMP14 直接降解细胞外基质和基底膜,导致肿瘤细胞浸润和转移。MMP14 还能活化 MMP2,而 MMP2 能够降解基底膜纤维连接蛋白和层粘连蛋白,从而促进肿瘤细胞浸润转移^[28]。MMP14 还能激活缺氧诱导因子 HIF,进而促进血管形成^[29]。因此,上调 MMP14 的表达可能是 HDAC2 sumo-E3 连接酶促进细胞迁移的重要机制。

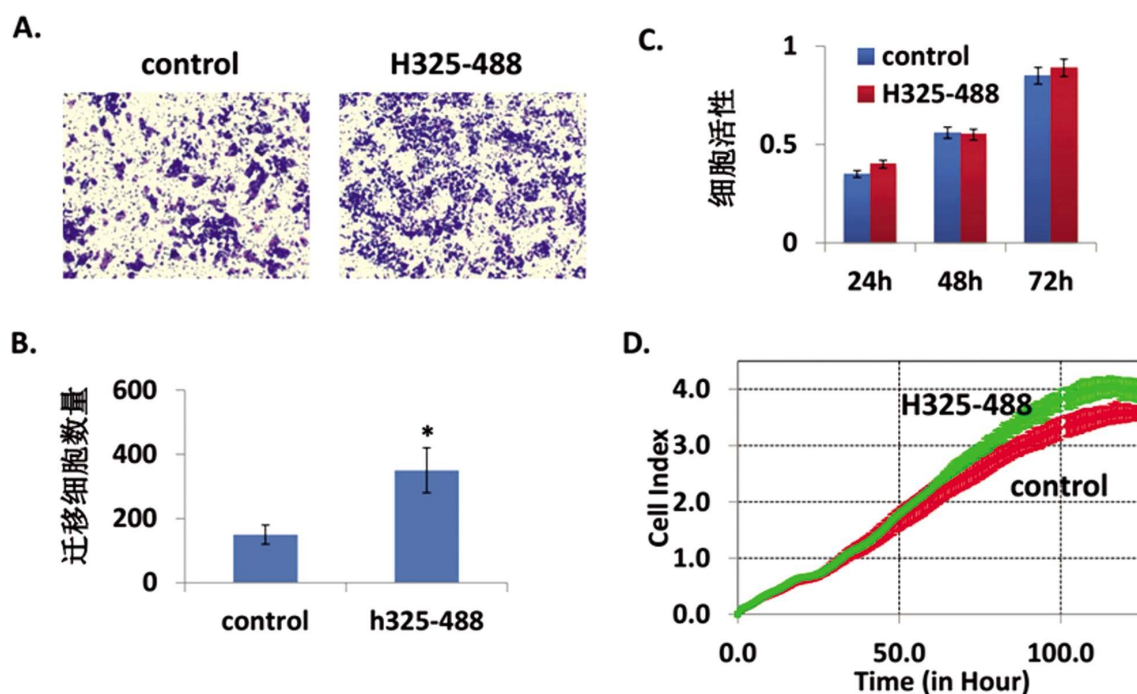


图3 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体对细胞迁移和增殖的影响

Fig.3 Effect of HDAC2 sumo-E3 ligase mutant on cell migration and proliferation

A. Trans-well 检测对照细胞和 DLD1h3235-488 迁移能力;B. 迁移细胞数量统计分析;C. MMT 法检测细胞活性,OD490nm 吸光值代表细胞活力大小;D. RTCA 实时监测细胞增殖情况。

A. Trans-well detection of control cells and DLD1h3235-488 migration ability; B. migration of the number of cells statistical analysis; C. MMT method to detect cell activity, OD490nm absorbance value represents the cell viability; D. RTCA real-time monitoring of cell proliferation.

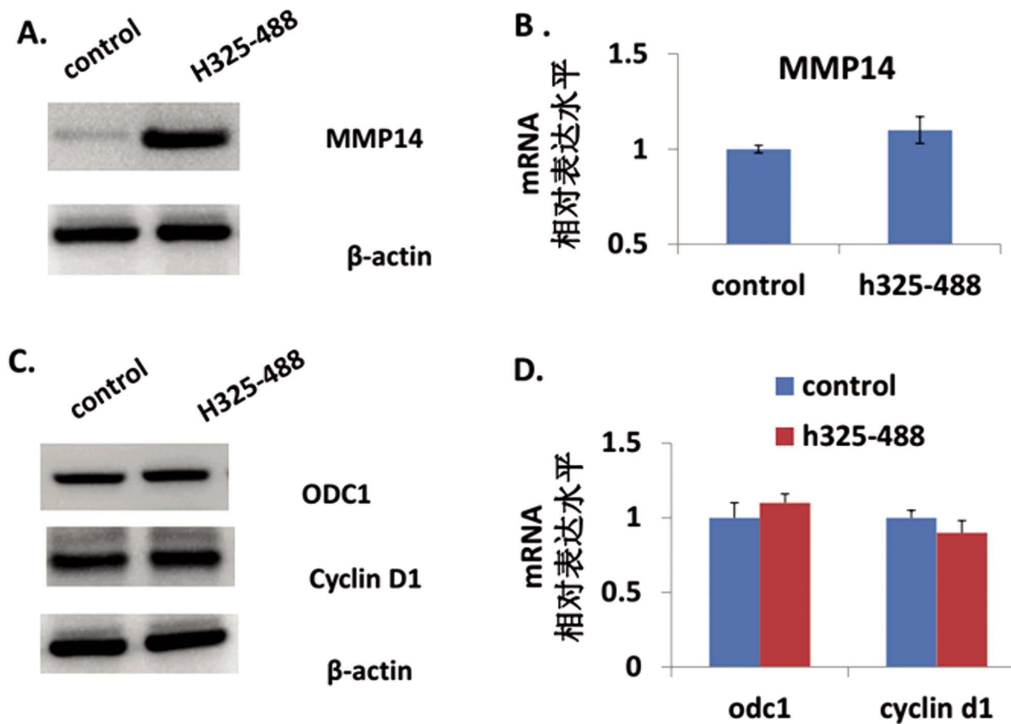


图 4 HDAC2 sumo-E3 连接酶突变体对细胞迁移和增殖相关蛋白的表达调控作用

Fig.4 HDAC2 sumo-E3 ligase mutant on cell migration and proliferation-associated protein expression regulation

A,免疫印迹检测对照组和 DLD1h3235-488 细胞中侵袭转移蛋白 MMP14 的表达水平;B,定量 PCR 检测两组细胞中 MMP14 的 mRNA 表达水平;C,免疫印迹检测对照组和 DLD1h3235-488 细胞中增殖相关蛋白 ODC1、cyclin D1 的表达水平;D,定量 PCR 检测两组细胞中 ODC1、cyclin D1 的 mRNA 表达水平。

A.The expression of MMP-14 in the control group and DLD1h3235-488 cells was detected by immunoblotting assay. B.The expression of MMP-14 in the two groups was detected by quantitative PCR. C.The expression of MMP-14 in the control group and DLD1h3235-488 cells was detected by immunoblotting. D.The expression levels of ODC1 and cyclin D1 in the two groups were detected by quantitative PCR.

转录和翻译是基因表达调控的两个主要形式,我们之前的研究报道 HDAC2 通过其 SUMO 连接酶活性促进 eIF4E 的 SUMO 化,选择性促进细胞增殖和存活相关基因的翻译表达,而本研究结果显示 HDAC2 SUMO 功能结构域的过表达促进 MMP14 蛋白表达,但是 mRNA 水平没有变化,提示 HDAC2 对 MMP14 在蛋白质翻译水平的表达调控作用,但具体的调控机制还需进一步研究验证。

由于 HDAC 在肿瘤形成和发展中起重要作用,因此 HDAC 已经成为重要的抗癌靶点。目前,靶向 HDAC 的去乙酰化酶抑制剂 vorinostat,romidepsin 已经获得 FDA 批准,应用于难治复发性皮肤淋巴瘤的治疗,其他肿瘤治疗及数十种小分子抑制剂处于临床试验阶段^[30]。HDAC 抑制剂通过上调促凋亡蛋白或下调抗凋亡蛋白的表诱导细胞凋亡、破坏细胞周期、抑制 DNA 损伤修复等多种途径抑制肿瘤细胞生长^[31]。但是也有相反的报道,HDAC 抑制剂促进细胞迁移,这可能与癌细胞的异质性和 HDAC 的多样性有关^[32,33]。尽管去乙酰化酶抑制剂已经应用于临床,但是对于实体瘤的效果仍不明显,而且存在毒副作用。HDAC 存在 18 种亚型,具有组织特异性,生物学功能也不相同,因此深入研究每一个 HDAC 亚型的生物学功能及分子机制,对于了解 HDAC 异常引发的疾病进程至关重要。而本研究结果显示 HDAC2 通过其 sumo-E3 连接酶活性促进 MMP14 的表达,这在一定程度上解释了 HDAC2 促进细胞迁移的原因。由于目前的 HDAC2 小分子抑制剂的研究大都是集

中在抑制其去乙酰化酶活性,对其 sumo-E3 连接酶活性的研究甚少,因而同时靶向抑制 HDAC2 去乙酰化酶活性和 SUMO E3 连接酶活性或许为相关癌症的治疗提供一种新的思路和策略。

参考文献(References)

- [1] Delcuve GP, Khan DH, Davie JR. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors [J]. Clin Epigenetics, 2012, 4(1): 5
- [2] Schmitz ML, de la Vega L. New Insights into the Role of Histone Deacetylases as Coactivators of Inflammatory Gene Expression [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 23(1): 85-98
- [3] Morris MJ, Monteggia LM. Unique functional roles for class I and class II histone deacetylases in central nervous system development and function[J]. Dev Neurosci, 2013, 31(6): 70-81
- [4] Kee HJ, Kook H. Roles and targets of class I and IIa histone deacetylases in cardiac hypertrophy [J]. Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 928326
- [5] Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(1): 32-42
- [6] Segre CV, Chiocca S. Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2 [J]. Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 690848
- [7] Shan W, Jiang Y, Yu H, et al. HDAC2 overexpression correlates with aggressive clinicopathological features and DNA-damage response

- pathway of breast cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(5): 1213-1226
- [8] Kobayashi T, Nakazono K, Tokuda M, et al. HDAC2 promotes loss of primary cilia in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(2): 334-343
- [9] Muller BM, Jana L, Kasajima A, et al. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer--overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 215
- [10] Ashktorab H, Belgrave K, Hosseinkhah F, et al. Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(10): 09-17
- [11] Haery L, Thompson RC, Gilmore TD. Histone acetyltransferases and histone deacetylases in B- and T-cell development, physiology and malignancy[J]. *Genes Cancer*, 2015, 6(5-6): 184-213
- [12] Li Z, Hao Q, Luo J, et al. USP4 inhibits p53 and NF-kappaB through deubiquitinating and stabilizing HDAC2[J]. *Oncogene*, 2016, 35(22): 02-12
- [13] Brandl A, Wagner T, Uhlir KM, et al. Dynamically regulated sumoylation of HDAC2 controls p53 deacetylation and restricts apoptosis following genotoxic stress [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 4(5): 84-93
- [14] Kim JK, Noh JH, Eun JW, et al. Targeted inactivation of HDAC2 restores p16INK4a activity and exerts antitumor effects on human gastric cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(1): 62-73
- [15] Bianco S, Jangal M, Garneau D, et al. LRR-1 controls proliferation in breast tumor cells by regulating CDKN1A gene expression [J]. *Oncogene*, 2015, 34(34): 09-18
- [16] Pluemsampant S, Safronova OS, Nakahama K, et al. Protein kinase CK2 is a key activator of histone deacetylase in hypoxia-associated tumors [J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(2): 33-41
- [17] Roperio S, Ballestar E, Alaminos M, et al. Transforming pathways unleashed by a HDAC2 mutation in human cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27(28): 08-12
- [18] Zhu P, Martin E, Mengwasser J, et al. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2004, 5(5): 55-63
- [19] Zimmermann S, Kiefer F, Prudenziati M, et al. Reduced body size and decreased intestinal tumor rates in HDAC2-mutant mice[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19): 47-54
- [20] Xu X, Vatsavan J, Gao C, et al. HDAC2 promotes eIF4E sumoylation and activates mRNA translation gene specifically[J]. *Biol Chem*, 2010, 285(24): 39-43
- [21] Xu X, Vatsavan J, Gao C, et al. Sumoylation of eIF4E activates mRNA translation [J]. *EMBO Rep*, 2010, 11(4): 299-304
- [22] Chen LZ, Li XY, Huang H, et al. SUMO-2 promotes mRNA translation by enhancing interaction between eIF4E and eIF4G [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): 04-57
- [23] 郭韡,熊渊,黄宏,等.组蛋白去乙酰化酶 HDAC2 突变体构建及其 SUMO 修饰 E3 连接酶功能研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(6): 5-8
- Guo Wei, Xiong Yuan, Huang Hong, et al. Construction of histone deacetylase HDAC2 mutant and its function of SUMO-modified E3 ligase[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13 (6): 5-8
- [24] Liu Y, Li S, Zhang H, et al. A one-step cloning method for the construction of somatic cell gene targeting vectors: application to production of human knockout cell lines [J]. *BMC Biotechnol*, 2012, 12: 71
- [25] Chen W, Xia T, Wang D, et al. Human astrocytes secrete IL-6 to promote glioma migration and invasion through upregulation of cytomembrane MMP14[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(38): 62425-62438
- [26] Hui P, Xu X, Xu L, et al. Expression of MMP14 in invasive pituitary adenomas: relationship to invasion and angiogenesis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4): 56-67
- [27] Lu H, Hu L, Yu L, et al. KLF8 and FAK cooperatively enrich the active MMP14 on the cell surface required for the metastatic progression of breast cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(22): 09-17
- [28] Yi SA, Ryu HW, Lee DH, et al. HP1beta suppresses metastasis of human cancer cells by decreasing the expression and activation of MMP2[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(6): 41-48
- [29] Sakamoto T, Weng JS, Hara T, et al. Hypoxia-inducible factor 1 regulation through cross talk between mTOR and MT1-MMP [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(1): 30-42
- [30] West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment[J]. *Clin Invest*, 2014, 124(1): 0-9
- [31] Spiegel S, Milstien S, Grant S. Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy [J]. *Oncogene*, 2012, 31(5): 37-51
- [32] Lin KT, Wang YW, Chen CT, et al. HDAC inhibitors augmented cell migration and metastasis through induction of PKCs leading to identification of low toxicity modalities for combination cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(17): 691-701
- [33] Ji M, Lee EJ, Kim KB, et al. HDAC inhibitors induce epithelial-mesenchymal transition in colon carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(5): 299-308