

# 靶向干预 SETDB1 对急性髓系白血病的治疗作用

许爱笑, 张建华, 杜文昕, 何俏军, 应美丹\*, 邵雪晶\* (浙江大学药学院, 浙江省抗肿瘤药物临床前研究重点实验室, 杭州 310058)

**摘要:** 目的 探究组蛋白甲基转移酶 SETDB1 在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)恶性进展中的作用及干扰 SETDB1 对 AML 的治疗效果。方法 基于 TCGA、GTEx、TARGET 数据库, 分析 SETDB1 在不同肿瘤的表达情况, 并对比分析在 AML 骨髓细胞和正常骨髓细胞中的表达情况, 进一步分析 SETDB1 的表达与 AML 患者不同风险分层、不同 FAB(French-American-British)分型及微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)的相关性; 对 SETDB1 高/低表达患者进行基因富集分析。通过 RT-qPCR 考察 shRNA 序列对 SETDB1 的沉默效率; 通过台盼蓝染色法考察沉默 SETDB1 对 AML 细胞的增殖及活力的影响; 通过检测细胞表面抗原 CD11b、CD14 的比例、细胞核形态和氯化硝基四氮唑蓝(NBT)还原能力考察沉默 SETDB1 对 AML 细胞的分化治疗作用。结果 与其他肿瘤相比, SETDB1 在 AML 中显著高表达, 且在 AML 中的表达水平显著高于正常骨髓细胞。SETDB1 在 AML 高风险患者中、MRD 残留患者中也显著高表达。沉默 SETDB1 可显著抑制 AML 细胞的增殖能力, 并对其细胞活力没有显著影响。此外, SETDB1 高表达的 AML 患者存在造血干细胞相关基因和分化阻碍相关基因的显著富集, 以及 SETDB1 在未分化或者部分分化的 M0~M2 亚型中相对高表达。更为重要的是, 沉默 SETDB1 可显著诱导 AML 细胞分化, 表现为增加细胞表面分化标志物 CD11b、CD14 的表达、细胞核形态从圆形或椭圆形向马蹄形的分化状态转变以及细胞 NBT 还原能力显著增加。结论 AML 中特异性高表达的 SETDB1 与 AML 恶性进展密切相关, 靶向 SETDB1 有望成为 AML 分化治疗的潜在策略。

**关键词:** SETDB1; 急性髓系白血病; 恶性进展; 分化治疗

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)12-1662-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230965

引用本文: 许爱笑, 张建华, 杜文昕, 等. 靶向干预 SETDB1 对急性髓系白血病的治疗作用[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(12): 1662-1669.

## Therapeutic Effects of Targeted Intervention of SETDB1 in Acute Myeloid Leukemia

XU Aixiao, ZHANG Jianhua, DU Wenxin, HE Qiaojun, YING Meidan\*, SHAO Xuejing\* (College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Zhejiang Province Key Laboratory of Anti-cancer Drug Research, Hangzhou 310058, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** Acute myeloid leukemia(AML) is an aggressive hematological malignancy. Despite remarkable insights into the molecular pathogenesis and albeit modest advances in treatment, the 5-year survival rate of AML patients is only 25%–30%. A characteristic feature of AML is failure to terminally differentiate into functional mature myeloid cells. A notable exception in AML therapy has been use of all-trans retinoic acid(ATRA) in individuals with acute promyelocytic leukemia (APL). ATRA can induce APL cell differentiation, highlighting that differentiation-based therapy holds great promise for AML treatment. Unfortunately, ATRA only reverses the survival curve of patients with APL, which only accounts for 10% of the total AML. Therefore, there is an unmet need to reveal new druggable targets for broad differentiation-based therapies. SET domain, bifurcated 1(SETDB1) is a histone 3 lysine 9(H3K9)-specific methyltransferase and is essential for the gene expression via regulating histone methylation. Aberrant expression of epigenetic regulators often leads to myeloid malignancies, such as histone demethylase LSD1, METTL3, indicated targeting epigenetic regulators in AML leukemia treatment holds great promise. SETDB1 is involved in regulating cancer development, such as abnormally high expression in hepatocellular carcinoma(HCC) and knocking down SETDB1 expression inhibits the motility and metastatic ability of HCC. However, it is still unclear about the role of SETDB1 in AML leukemogenesis and malignant progression, and whether targeted intervention of SETDB1 can be used for leukemia differentiation therapy. Therefore, this study is aim to explore the role of histone methyltransferase SETDB1 in the malignant progression of AML and the therapeutic effect of SETDB1 suppression in AML. **METHODS** Based on TCGA(The Cancer Genome Atlas) and GTEx(Genotype-Tissue Expression) databases, an analysis of the expression of SETDB1 in different cancer species and a comparison of the expression of SETDB1 in bone marrow cells of AML patients and normal bone marrow cells was conducted. Additionally, the correlation between the expression of SETDB1 and different risk stratification, micro residual disease(MRD) as well as different FAB(French-American-British) subtypes in AML patients were analyzed based on information obtained from the TCGA and TARGET databases. GSEA(Gene set enrichment analysis) for patients with high and

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY22H310005)

作者简介: 许爱笑, 女, 博士生 E-mail: 21819033@zju.edu.cn \*通信作者: 邵雪晶, 女, 博士, 特聘研究员 E-mail: xjshao@zju.edu.cn  
应美丹, 女, 博士, 教授 E-mail: mying@zju.edu.cn

low *SETDB1* expression were performed to analysis the relationship between *SETDB1* expression and differentiation. During the research, the silencing efficiency of *SETDB1* was examined by RT-qPCR in AML cells. Furthermore, the effect of *SETDB1* knockdown on the proliferation and viability of AML cells was evaluated using Trypan blue staining assay. CD11b, CD14 expression level alongside cell nuclear morphologic changes and nitroreductase blue chloride(NBT) reduction ability were used to determine the therapeutic effect of sh*SETDB1* in AML cell differentiation. **RESULTS** *SETDB1* was significantly highly expressed in AML patients compared to other cancer types, and was also significantly higher expressed than that in normal bone marrow cells. *SETDB1* was obviously highly expressed in high-risk AML patients as well as patients with residual MRD. *SETDB1* silencing significantly inhibited AML cell proliferation without any obvious cell death. Besides, genes typically upregulated in hematopoietic stem cells(HSCs) and downregulated in myeloid cell development were highly enriched in patients with high *SETDB1* expression and *SETDB1* was also found to be relatively highly expressed in undifferentiated or partially differentiated M0–M2 FAB subtypes. More importantly, flow cytometry analysis showed that sh*SETDB1* significantly increased the expression of CD11b and CD14 in AML cells and the upregulation ratio of CD11b and CD14 corresponded to the silencing effect of *SETDB1*. Moreover, *SETDB1*-declined cells had a more mature nuclear morphology and enhanced NBT-reducing ability in AML cells, suggesting the depletion of *SETDB1* may drive myeloid differentiation and maturation in AML cells. **CONCLUSION** Histone methyltransferase *SETDB1* is specifically highly expressed in AML and closely associates with the malignant progression of leukemia. Targeting *SETDB1* is expected to be a promising strategy for differentiation therapy in AML, which provides new opportunities for AML treatment.

**KEYWORDS:** *SETDB1*; acute myeloid leukemia; malignant progression; differentiation therapy

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种骨髓与外周血中原始和幼稚髓系细胞异常增生的恶性疾病<sup>[1]</sup>。目前该疾病的标准疗法是以蒽环类抗菌药物联合标准剂量阿糖胞苷方案(3+7)进行诱导治疗<sup>[2]</sup>, 随后配合化疗或干细胞移植进行巩固治疗。虽然白血病细胞在化疗后已从骨髓中暂时清除, 但是很多患者仍存在预后较差的问题, 最终会形成复发或难治性白血病, 成年AML患者的5年生存率仅为30%。分化障碍是AML的一个标志特征, 即造血干/祖细胞阻滞在分化成熟的早期阶段。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)在诱导急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)分化治疗中取得了巨大的成功<sup>[3]</sup>, 但目前分化疗法仍存在临床可用药物少和适用范围窄等缺点。因此寻找AML分化调控的新分子靶点, 有助于推动诱导分化治疗的发展。

*SETDB1*(SET domain bifurcated 1)属于组蛋白3赖氨酸9(histone 3 lysine 9, H3K9)甲基化转移酶家族, 位于1q21染色体上。*SETDB1*可通过调节组蛋白甲基化发挥表观遗传调控功能, 进而影响基因表达, 导致基因沉默和转录抑制。研究显示, 表观遗传调控因子的异常表达会导致骨髓恶性肿瘤的发生<sup>[4-6]</sup>, 如组蛋白去甲基化酶LSD1/KDM1A是促进白血病细胞恶性增殖及分化阻滞的关键蛋白<sup>[7]</sup>; m6A甲基化转移酶METTL3耗竭会诱导AML细胞分化和凋亡<sup>[8]</sup>, 因此靶向表观遗传调控因子在AML的治疗中具有非常大的前景<sup>[5-6,9]</sup>。目前已有多篇研究报告*SETDB1*参与调控肿瘤的发

生发展进程, 如在肝细胞癌、结直肠癌等肿瘤中异常高表达<sup>[10-11]</sup>, 敲低*SETDB1*表达可抑制肝细胞癌的运动和转移能力<sup>[11]</sup>。虽然最新研究利用斑马鱼模型揭示*SETDB1*在正常造血干祖细胞分化过程中扮演着重要角色<sup>[12]</sup>, 但是关于*SETDB1*在AML发生及恶性进展中的作用, 以及靶向干预*SETDB1*是否可用于白血病分化治疗尚不清楚。进一步研究*SETDB1*在AML中的功能, 对于寻找新的AML临床治疗策略具有积极意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

AML细胞株HL60购自中科院上海细胞库; NB4细胞由Lingtao Wu教授馈赠。HL60细胞用含有20%胎牛血清的IMDM培养液进行培养, NB4细胞用含有10%胎牛血清的1640培养液进行培养。2株细胞均于37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。

### 1.2 仪器与试剂

HERACELL 150I 细胞培养箱(Thermo); D-35578 倒置显微镜(Leica); FACSCalibur 流式细胞仪(美国BD公司); QuantStudio 3 实时荧光定量PCR(Applied Biosystems); Centrifuge 5418R 离心机(Eppendorf)。

氯化硝基四氮唑蓝(nitroreductase blue chloride, NBT)粉末(阿拉丁生化科技股份有限公司, 货号: N104910); 佛波酯(TPA, Sigma, 货号: P8139); 瑞氏-吉姆萨染色液(BioChip, 货号: 380055-W2); 台盼蓝粉末(武汉华美生物工程有限公司, 货号: BS1121); PE-human CD11b 流式抗体(Biolegend, 货号: 301306); FITC-human CD14

流式抗体(Biolegend, 货号: 325604)。

### 1.3 生物信息学分析

基于 TCGA 数据库分析 *SETDB1* 在不同肿瘤中的表达情况<sup>[13]</sup>; 基于 TCGA 和 GTEX 数据库分析 *SETDB1* 在 AML 骨髓组织和正常骨髓组织中的表达情况; 基于 TARGET 数据库分析不同风险分层及微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)存在与否的 AML 患者中 *SETDB1* 的表达情况<sup>[14]</sup>; 基于 TCGA 分析 *SETDB1* 在 AML 患者不同 FAB (French-American-British) 中的表达情况; 基于 TARGET 数据库对 *SETDB1* 高/低表达患者进行基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)<sup>[15]</sup>。

### 1.4 细胞分化检测

细胞分化检测指标包括细胞表面抗原 CD11b、CD14, 细胞核形态和 NBT 还原能力检测。

**1.4.1 CD11b、CD14 细胞表面分化标记物比例测定** 收集 shSETDB1 作用后的细胞样本( $1 \times 10^6$  个), 加入 100  $\mu\text{L}$  含有 1% BSA 的 PBS 缓冲液混匀, 再分别加入 2  $\mu\text{L}$  CD11b 或者 2  $\mu\text{L}$  CD14 抗体, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  摇床避光孵育 1 h, 随后加 1 mL PBS 缓冲液终止孵育, 用流式细胞仪检测 CD11b、CD14 阳性细胞的分化比例(每个样本计数 10 000 个细胞)。

**1.4.2 瑞氏-吉姆萨染色试验** 收集 shSETDB1 作用后的细胞样本( $3 \times 10^4$  个), 用 100  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液重悬, 用 Cytospin 细胞涂片机将细胞悬液直接甩至载玻片上, 再用甲醇固定。待晾干后, 采用瑞氏吉姆萨染色液染色, 于显微镜下拍照, 观察细胞的核形态变化以及核质比。

**1.4.3 NBT 还原能力测定** 收集 shSETDB1 作用后的细胞样本( $1 \times 10^6$  个), 采用 PBS 缓冲液漂洗 1 次后用 200  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液重悬, 而后加入 200  $\mu\text{L}$  NBT 反应液(1 mL PBS 中含有 2 mg NBT 与 2  $\mu\text{g}$  TPA), 充分混匀后避光 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 40 min。之后加入 1 mL PBS 缓冲液终止, 离心后吸干上清, 采用 20  $\mu\text{L}$  甲醇固定后均匀涂于 24 孔板中, 晾干后于显微镜下观察拍照, 对每个视野的含有蓝色甲臞的阳性细胞和细胞总数进行计数, 计算 NBT 阳性比例。

### 1.5 台盼蓝染色法检测细胞增殖及活力

细胞在进行病毒感染处理后, 在相应的时间点对细胞进行计数以此考察细胞的增殖及存活情况。具体操作: 收取适量的细胞进行离心, 用 PBS 缓冲液重悬至适量的密度, 随后吸取 10  $\mu\text{L}$  于 96

孔板中, 再加入 10  $\mu\text{L}$  台盼蓝染色液充分混合, 吸取 10  $\mu\text{L}$  混合液体至细胞计数板于显微镜下计数。显微镜下 4 $\times$ 4 小方格中晶莹透亮的细胞视为活细胞, 而被台盼蓝染成蓝色的细胞视为死细胞。随后根据计数结果绘制增殖曲线及细胞活力曲线。

### 1.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

收集 shSETDB1 作用后的细胞( $1 \times 10^6$  个), Trizol 裂解并提取总 RNA, 采用逆转录试剂盒(TransGenBiotech)合成 cDNA。按照试剂盒(QuantiTectTMSYBR Green PCR kits)进行目的片段的扩增。所采用的引物序列为 GAPDH: 正向 5'-GTCATCCATGACAACCTTTGG-3', 反向 5'-GAGCTTGACAAAGTGGTTCGT-3'; SETDB1: 正向 5'-GGTGGAAAGTCCCGAGTTGAG-3', 反向 5'-TTTGGACGTGTCCTGAGCTG-3'。

### 1.7 数据分析

统计数据均表示为  $\bar{x} \pm s$ , 2 组数据间的差异采用 Student *t* 检验(双侧), 多组数据间差异采用单因素 ANOVA 检验。 $P < 0.05$  说明差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *SETDB1* 在 AML 中特异性高表达

TCGA 数据库是由美国国家癌症研究所(NCI)和国家人类基因组研究所(NHGRI)合作建立的癌症研究项目<sup>[13]</sup>, 包括癌症相关的各种组学数据, 是一个大型的癌症研究参考数据库。笔者利用 TCGA 数据库考察 *SETDB1* 在所有癌种中的表达情况, 分别为 AML(急性髓系白血病)、TGCT(睾丸癌)、UCS(子宫癌肉瘤)、CHOL(胆管癌)、BRCA(乳腺浸润癌)、OV(卵巢癌)、UCEC(子宫内膜样癌)、ESCA(食管癌)、THYM(胸腺瘤)、LUAD(肺腺癌)、LGG(脑低级别胶质瘤)、SKCM(皮肤黑色素瘤)、GBM(多形成性胶质细胞瘤)、LUSC(肺鳞状细胞癌)、CESC(宫颈鳞癌和腺癌)、KIRC(肾透明细胞癌)、BLCA(膀胱尿路上皮癌)、DLBC(弥漫性大 B 细胞淋巴瘤)、STAD(胃癌)、SARC(肉瘤)、READ(直肠癌)、THCA(甲状腺癌)、COAD(结肠癌)、PAAD(胰腺癌)、KIRP(肾乳头状细胞癌)、PRAD(前列腺癌)、HNSC(头颈癌)、LIHC(肝癌)、PCPG(嗜铬细胞瘤和副神经节瘤)、ACC(肾上腺皮质癌)和 KICH(肾嫌色细胞癌)。结果显示, 在 31 个癌种中, *SETDB1* 在 AML 中表达最高, 见图 1。随后, 基于 GEPIA2<sup>[16]</sup>在线网站



shSETDB1 #2 均表现出明显的沉默效果( $P<0.001$ ), 并且 shSETDB1 #1 的沉默效果优于 shSETDB1 #2, 见图 4B。因此本研究采用这 2 条 shRNA 进行后续实验。

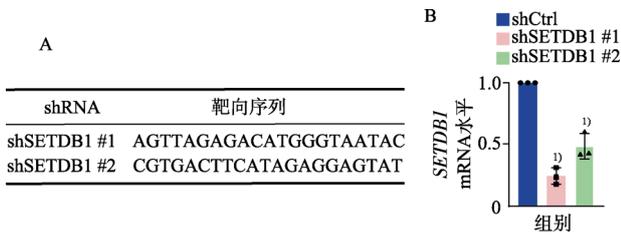


图 4 靶向序列(A)在 AML 细胞中沉默 SETDB1 后 SETDB1 mRNA 水平(B)

与 shCtrl 组相比, <sup>1)</sup> $P<0.001$ 。

Fig. 4 Targeted sequence(A) and SETDB1 mRNA levels after SETDB1 silencing in AML cells(B)

Compared with shCtrl group, <sup>1)</sup> $P<0.001$ .

## 2.4 沉默 SETDB1 显著抑制 AML 细胞增殖

为了评价靶向 SETDB1 的治疗效果, 本研究通过台盼蓝染色法考察了沉默 SETDB1 对 AML 细胞增殖和活力的影响。在病毒感染后的指定时间点(第 3 天、第 5 天和第 7 天)对细胞进行计数。实验结果显示, 在 HL60 细胞中, shSETDB1 #1 或 #2 均可明显地抑制细胞的增殖能力( $P<0.001$  或  $P<0.05$ ), 且增殖抑制能力与 SETDB1 的沉默效果相对应, 见图 5A。同时, 沉默 SETDB1 后对 AML 细胞的活力影响较小, 见图 5B。以上结果表明沉默 SETDB1 可显著抑制 AML 细胞增殖, 提示靶向 SETDB1 可能可作为 AML 临床治疗的新策略。

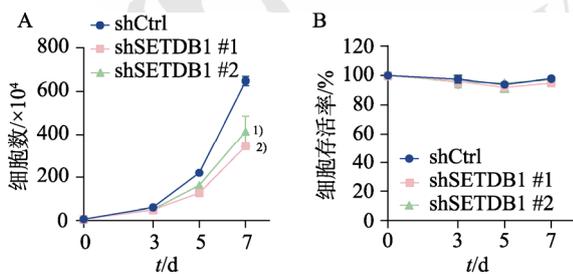


图 5 沉默 SETDB1 对 AML 细胞增殖(A)及活力(B)的影响与 shCtrl 组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.001$ 。

Fig. 5 Effect of silencing SETDB1 on the proliferation(A) and viability(B) of AML cells

Compared with shCtrl group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.001$ .

## 2.5 SETDB1 高表达可能与 AML 分化障碍相关

沉默 SETDB1 可抑制 AML 细胞增殖, 但对细胞活力的影响较小, 因此, 本研究进一步探索沉默 SETDB1 对 AML 细胞其他功能的影响。

造血干细胞位于骨髓中, 可以通过自我更新、

多系分化成有功能的成熟血细胞, 维持个体整个生命周期的血液系统功能。而其分化受阻则会导致功能失调的白血病祖细胞在骨髓或其他造血器官中的异常积累, 与白血病的恶性进展有关。已有文献显示 SETDB1 在正常造血干祖细胞分化过程中扮演着重要角色<sup>[12]</sup>, 因此, 本研究进一步探究在 AML 中过度表达的 SETDB1 与白血病细胞分化障碍的关系。

首先, 本研究基于 TARGET 数据库对 SETDB1 高/低表达的 AML 患者进行 GSEA 分析。结果显示, 高表达 SETDB1 的 AML 患者存在造血干细胞相关基因和分化障碍相关基因的显著富集, 分别表现为造血干细胞中上调的基因(Jaatinen\_Hematopoietic\_Stem\_Cell\_Up, 校正后的富集分数 NES=1.76,  $P=0.012$ ); 以及骨髓细胞发育过程下调的基因(Brown\_Myeloid\_Cell\_Development\_Dn, 校正后的富集分数 NES=1.69,  $P=0.014$ )的显著富集, 见图 6。以上结果表明, SETDB1 的高表达可能与白血病细胞分化障碍密切相关。

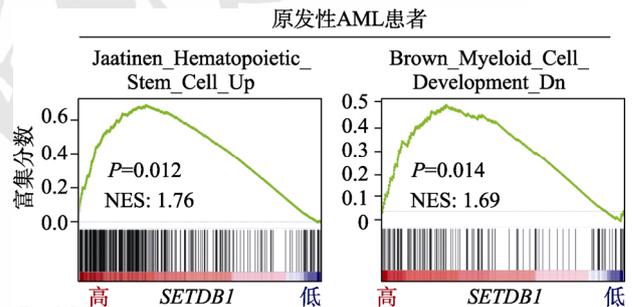


图 6 SETDB1 高/低表达患者 GSEA 分析

Fig. 6 GSEA between AML patients with high and low expression of SETDB1

此外, AML 是由于正常髓系细胞分化发育过程中不同阶段的造血祖细胞恶性转化造成的, 因此 FAB 是其中一种 AML 分型方法。根据其恶性克隆的成熟阶段及其形态学上的不同, 将 AML 分为包括 M0~M7 的 8 个亚型, 分别为 M0(AML 微分化亚型)、M1(急性粒细胞白血病未分化型)、M2(急性粒细胞白血病部分分化亚型)、M3(急性单核细胞白血病)、M4(急性粒细胞-单核细胞白血病)、M5(急性单核细胞白血病)、M6(红白血病)和 M7(急性巨核细胞白血病)。从分类结果可以看出, M0~M2 亚型的细胞属于早期的未分化或者部分分化的细胞, 而 M3~M7 则是偏成熟的细胞。随后, 笔者基于 TCGA 数据库分析 SETDB1 在不同 FAB 亚型 AML 中的表达情况, 其中 M0 亚型有 16 例,

M1 亚型有 42 例, M2 亚型有 39 例, M3 亚型有 16 例, M4 亚型有 35 例, M5 亚型有 18 例, M6 亚型有 2 例, M7 亚型有 3 例。结果显示, 相较于 M3~M7 亚型, *SETDB1* 在 M0~M2 亚型中相对高表达, 见图 7。以上结果进一步提示 *SETDB1* 的高表达可能与 AML 分化阻滞程度有关。

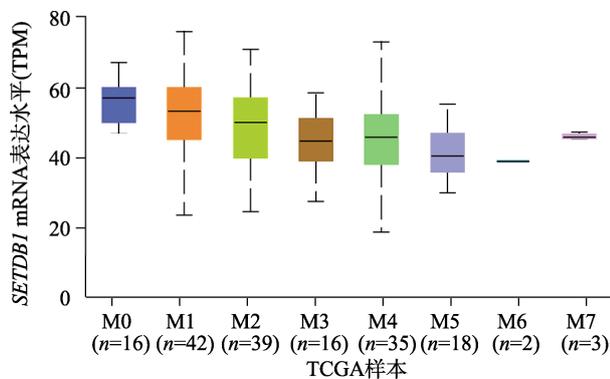


图 7 基于 TCGA 数据库分析 *SETDB1* 在不同 AML FAB 分型中的表达情况

Fig. 7 Analysis of *SETDB1* expression in different AML FAB typing based on TCGA database

## 2.6 沉默 SETDB1 对 AML 细胞分化的诱导作用

AML 具有分化障碍的特征, 而本研究分析结果提示, *SETDB1* 的高表达可能与 AML 细胞的分化障碍有关, 因此进一步考察沉默 SETDB1 对 AML 细胞分化的影响。本研究采用了包括细胞表面 CD11b、CD14 表达, 细胞核形态变化以及对 NBT 的还原能力在内的 3 个经典细胞分化指标来进行后续试验。

细胞表面分化标记物 CD11b、CD14 通常可作为分化检测指标。CD11b 也被称作整合素( $\alpha$ M), 是一种跨膜蛋白, 在骨髓系细胞中表达, 通常是中性粒细胞、单核/巨噬细胞和自然杀伤细胞等分化成熟细胞表面的标记物<sup>[18]</sup>, 参与单核细胞、巨噬细胞和粒细胞的各种黏附相互作用, 调节中性粒细胞迁移、激活与凋亡等。CD14 是一种锚定蛋白, 是存在于单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞等分化成熟细胞表面的标记物, 其配体包括脂多糖、肽多糖等微生物信号<sup>[19]</sup>。

本研究采用流式细胞术检测在沉默 SETDB1 后, HL60 及 NB4 细胞表面 CD11b、CD14 表达比例的变化。CD11b 比例变化结果显示, 与 shCtrl 组相比, 沉默 SETDB1 后, 第 3 天、第 5 天和第 7 天 HL60 细胞表面的 CD11b 表达比例显著增加, 第 7 天沉默 SETDB1 组 CD11b 阳性细胞比例可达

(67.76±6.83)%(shSETDB1 #1,  $P<0.001$ )和(50.18±6.51)%(shSETDB1 #2,  $P<0.001$ )。与 shCtrl 组相比, 在 NB4 细胞中沉默 SETDB1 第 5 天同样可显著诱导 CD11b 表达比例的增加, 分别可达到(43.38±9.84)%(shSETDB1 #1,  $P<0.01$ )和(21.50±3.13)%(shSETDB1 #2,  $P<0.01$ )。结果见图 8A~B。

CD14 比例变化结果显示, 沉默 SETDB1 均可显著诱导 AML 细胞 CD14 表达比例的上调。在 HL60 细胞中 CD14 阳性比例随着病毒感染时间的延长而增加, 到病毒感染第 7 天, 与 shCtrl 组相比, 沉默 SETDB1 后 CD14 阳性细胞比例可达(67.84±4.69)%(shSETDB1 #1,  $P<0.001$ )和(43.28±1.55)%(shSETDB1 #2,  $P<0.001$ )。类似的, 与 shCtrl 组相比, 在 NB4 细胞中沉默 SETDB1 第 5 天 CD14 阳性细胞比例可达(42.49±6.65)%(shSETDB1 #1,  $P<0.01$ )和(26.88±4.88)%(shSETDB1 #2,  $P<0.05$ )。此外, shSETDB1 后的 CD11b 和 CD14 阳性细胞上调比例与 SETDB1 的沉默效率相对应, #1 的上调效果优于#2。以上数据表明, 沉默 SETDB1 可显著诱导 AML 细胞表面的 CD11b、CD14 比例的上调, 促进 AML 细胞分化。结果见图 8C~D。

由于未分化的 AML 细胞核形态通常呈圆形、且核大质少, 而分化后的 AML 细胞核形态会发生变化, 细胞核质比变小, 且细胞核形态呈现马蹄形或分叶型。笔者将 SETDB1 沉默之后的 AML 细胞离心至载玻片上, 再用瑞氏吉姆萨染液对细胞核进行染色。结果显示, 与 shCtrl 组相比, 在 HL60 及 NB4 细胞上沉默 SETDB1 后, 细胞核形态从圆形或椭圆形向马蹄形分化状态转变, 并且细胞核质比例变小, 进一步提示沉默 SETDB1 后 AML 细胞具有明显的分化现象。结果见图 9。

最后, 由于分化的白血病细胞可发生氧化还原反应将淡黄色的 NBT 还原成蓝色的甲臞, 以折光性强的点状或斑状颗粒沉积于细胞内, 因此本研究考察了 AML 细胞在沉默 SETDB1 后对 NBT 还原能力的变化来指征细胞分化情况。将 SETDB1 沉默的细胞样本用 NBT 反应液染色, 于显微镜下拍照。结果显示, 与 shCtrl 组相比, 在 HL60 和 NB4 细胞上沉默 SETDB1 后, NBT 阳性细胞的比例均呈显著性增加, 并且 NBT 阳性上调比例与 SETDB1 的沉默效率相对应, 见图 10A。NBT 具体统计结果显示, 与 shCtrl 组相比, 在 HL60 细胞中沉默 SETDB1 后 NBT 阳性细胞比例可达(56.95±5.10)%

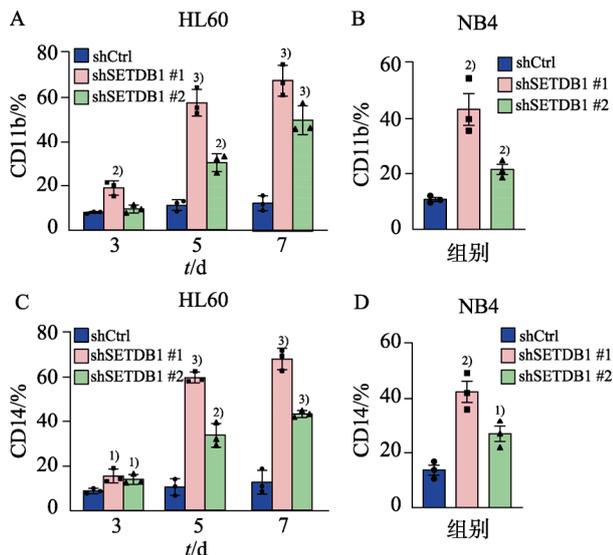


图8 AML细胞在沉默SETDB1后表面抗原CD11b、CD14表达变化

A-沉默SETDB1后HL60细胞中CD11b比例变化；B-沉默SETDB1后NB4细胞中CD11b比例变化；C-沉默SETDB1后HL60细胞中CD14比例变化；D-沉默SETDB1后NB4细胞中CD14比例变化。与shCtrl组相比，<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ，<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ，<sup>3)</sup> $P < 0.001$ 。

Fig. 8 Changes of CD11b and CD14 expression in AML cells after silencing SETDB1

A-Changes in the proportion of CD11b in HL60 cells after silencing SETDB1; B-changes in the proportion of CD11b in NB4 cells after silencing SETDB1; C-changes in the proportion of CD14 in HL60 cells after silencing SETDB1; D-changes in the proportion of CD14 in NB4 cells after silencing SETDB1. Compared with shCtrl group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , <sup>3)</sup> $P < 0.001$ .

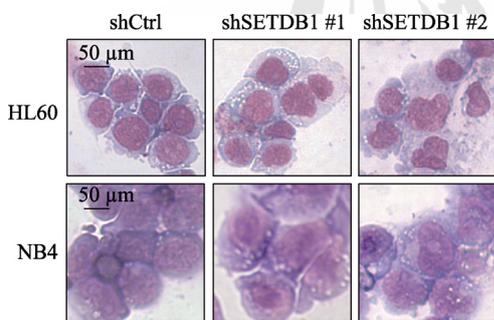


图9 AML细胞中沉默SETDB1后的核形态变化(200×)  
Fig. 9 Morphologic changes of AML cells after silencing SETDB1(200×)

(shSETDB1 #1,  $P < 0.001$ ) 和  $(33.70 \pm 1.84)\%$  (shSETDB1 #2,  $P < 0.001$ ), 在NB4细胞中沉默SETDB1后NBT阳性细胞比例可达 $(43.21 \pm 1.76)\%$  (shSETDB1 #1,  $P < 0.001$ ) 和  $(29.62 \pm 2.10)\%$  (shSETDB1 #2,  $P < 0.001$ ), 见图10B。这些结果进一步提示沉默SETDB1具有显著的诱导AML细胞分化作用。

以上结果从细胞表面CD11b、CD14表达比例, 细胞核形态以及NBT还原能力3个方面证实,

沉默SETDB1具有诱导AML细胞分化的作用。不仅揭示了SETDB1在AML细胞分化障碍中的重要作用, 而且提示靶向SETDB1有望成为AML分化治疗的潜在策略。

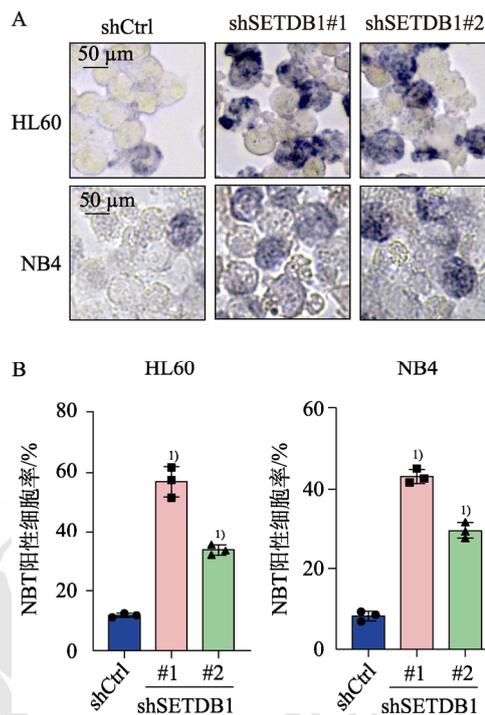


图10 AML细胞在沉默SETDB1后NBT的还原能力变化  
A-AML细胞中沉默SETDB1后NBT还原能力变化；B-NBT阳性细胞统计结果。与shCtrl组相比，<sup>1)</sup> $P < 0.001$ 。

Fig. 10 Changes in NBT reduction ability of AML cells after silencing SETDB1

A-Changes in NBT reduction ability of AML cells after silencing SETDB1; B-statistical results of NBT positive cells. Compared with shCtrl group, <sup>1)</sup> $P < 0.001$ .

### 3 讨论

分化障碍是AML的一个标志性特征, 自ATRA首次应用于临床诱导分化治疗APL, 并取得巨大成功后, 分化疗法被认为是一项治疗AML非常有前景和突破性的策略。但目前分化疗法仍存在临床可用药物少和适用范围窄等缺点。因此, 寻找AML分化治疗的新型潜在靶标和干预手段具有重要的临床需求。

表观遗传修饰包括DNA甲基化、组蛋白修饰、RNA修饰和染色质重塑等, 是一种动态可逆的生物学过程<sup>[20]</sup>。研究表明表观遗传修饰异常可能与恶性肿瘤的发生发展关系密切<sup>[21]</sup>。近年来随着测序技术的发展, 越来越多的研究发现表观遗传修饰相关的基因在AML中发生突变<sup>[22]</sup>, 可能在AML的发病机制上发挥作用。有研究表明高甲基化与白血病的发生密切相关<sup>[23]</sup>, SETDB1是H3K9组

蛋白甲基转移酶, 本研究发现 *SETDB1* 在 AML 癌种中特异性高表达, 提示 *SETDB1* 的高表达可能通过促进蛋白质甲基化进而介导白血病的发生发展。本研究利用 TARGET 数据库分析得出 *SETDB1* 在高风险人群和存在 MRD 的人群中显著高表达, 提示 *SETDB1* 可能是指征 AML 患者对化疗敏感性的新的预后标志物。并进一步通过实验发现沉默 *SETDB1* 后可显著抑制 AML 细胞的增殖, 提示其可作为 AML 治疗的新靶点。

另一方面, 本研究通过 GSEA 分析发现高表达 *SETDB1* 的 AML 患者存在造血干细胞相关基因和分化阻碍相关基因的显著富集, 且 *SETDB1* 在未分化或者部分分化的 M0~M2 亚型中相对高表达, 提示 *SETDB1* 高表达与 AML 分化阻滞有关。本研究发现沉默 *SETDB1* 可明显诱导 AML 细胞发生分化, 分别表现为增加细胞表面分化标志物 CD11b、CD14 的表达、细胞核形态从圆形或椭圆形向马蹄形的分化状态转变和细胞 NBT 还原能力显著增加。因此, *SETDB1* 不仅在正常造血细胞分化过程中有重要作用<sup>[12]</sup>, 而且过度表达的 *SETDB1* 会导致血细胞分化障碍进而促进白血病发生发展, 因此靶向 *SETDB1* 可能为 AML 分化治疗提供新的治疗方案。此外, 与正常骨髓细胞相比, *SETDB1* 在 AML 骨髓细胞中表达显著增加, 提示靶向该分子可能可有效降低对正常骨髓细胞的毒性。

综上所述, 本研究发现 *SETDB1* 在 AML 的恶性进展中扮演着重要角色, 沉默 *SETDB1* 可诱导 AML 细胞退出分化阻滞, 提示 *SETDB1* 可能可作为 AML 临床治疗的潜在新靶点, 具有重要的理论意义和临床价值。

## REFERENCES

- [1] DÖHNER H, ESTEY E H, AMADORI S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet[J]. Blood, 2010, 115(3): 453-474.
- [2] ZEIDAN A M, PODOLTSEV N A, WANG X Y, et al. Patterns of care and clinical outcomes with cytarabine-anthracycline induction chemotherapy for AML patients in the United States[J]. Blood Adv, 2020, 4(8): 1615-1623.
- [3] SANZ M A, LO-COCO F. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(5): 495-503.
- [4] LI S, GARRETT-BAKELMAN F E, CHUNG S S, et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia[J]. Nat Med, 2016, 22(7): 792-799.

- [5] WOUTERS B J, DELWEL R. Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2016, 127(1): 42-52.
- [6] PASTORE F, LEVINE R L. Epigenetic regulators and their impact on therapy in acute myeloid leukemia[J]. Haematologica, 2016, 101(3): 269-278.
- [7] HARRIS W J, HUANG X, LYNCH J T, et al. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells[J]. Cancer Cell, 2012, 21(4): 473-487.
- [8] VU L P, PICKERING B F, CHENG Y M, et al. The N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells[J]. Nat Med, 2017, 23(11): 1369-1376.
- [9] DAIGLE S R, OLHAVA E J, THERKELSEN C A, et al. Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor[J]. Cancer Cell, 2011, 20(1): 53-65.
- [10] CAO N, YU Y L, ZHU H, et al. *SETDB1* promotes the progression of colorectal cancer via epigenetically silencing p21 expression[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5): 351.
- [11] WONG C M, WEI L, LAW C T, et al. Up-regulation of histone methyltransferase *SETDB1* by multiple mechanisms in hepatocellular carcinoma promotes cancer metastasis[J]. Hepatology, 2016, 63(2): 474-487.
- [12] WU J X, LI J, CHEN K, et al. Atf7ip and Setdb1 interaction orchestrates the hematopoietic stem and progenitor cell state with diverse lineage differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(1): e2209062120.
- [13] WANG Z, JENSEN M A, ZENKLUSEN J C. A practical guide to the cancer genome atlas (TCGA)[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1418: 111-141.
- [14] BOLOURI H, FARRAR J E, TRICHE T Jr, et al. Erratum: The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions[J]. Nat Med, 2018, 24(4): 526.
- [15] SUBRAMANIAN A, TAMAYO P, MOOTHA V K, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [16] LI C W, TANG Z F, ZHANG W J, et al. GEPIA2021: Integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(W1): W242-W246.
- [17] VOSO M T, OTTONE T, LAVORGNA S, et al. MRD in AML: The role of new techniques[J]. Front Oncol, 2019, 9: 655.
- [18] MURRAY P J, WYNN T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(11): 723-737.
- [19] COLLIN M, BIGLEY V. Monocyte, macrophage, and dendritic cell development: The human perspective[J]. Microbiol Spectr, 2016, 4(5).
- [20] ESTEVE-PUIG R, BUENO-COSTA A, ESTELLER M. Writers, readers and erasers of RNA modifications in cancer[J]. Cancer Lett, 2020, 474: 127-137.
- [21] HOGG S J, BEAVIS P A, DAWSON M A, et al. Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity[J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(11): 776-800.
- [22] SHEN Y, ZHU Y M, FAN X, et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2011, 118(20): 5593-5603.
- [23] CROCE L D, RAKER V A, CORSARO M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor[J]. Science, 2002, 295(5557): 1079-1082.

收稿日期: 2023-04-11  
(本文责编: 李艳芳)