

FTO 及其抑制剂对 DLBCL 利妥昔单抗耐药的影响

顾季炜^{1,2}, 施梅², 宋国齐^{1,2}

摘要 目的 探讨脂肪量和肥胖相关蛋白(FTO)及其抑制剂对弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)利妥昔单抗耐药的影响。方法 选取 2 种“双重打击”淋巴瘤衍生的细胞系,活化 B 细胞样(ABC 型)OCI-LY8(LY8)和生发中心 B 细胞样(GCB 型)OCI-LY18(LY18),采用梯度加药法构建利妥昔单抗耐药细胞系(LY8R、LY18R);运用 CCK-8 法检测不同浓度利妥昔单抗分别干扰亲本及耐药细胞后的细胞存活率并计算半数抑制浓度(IC₅₀)值;Annexin V/PI 双染法检测亲本及耐药细胞的凋亡率;RT-qPCR、免疫荧光和 Western blot 检测在耐药细胞株中去甲基化酶 FTO 的表达情况;在耐药细胞株中加入甲氯芬酸钠(MA)抑制 FTO 表达,用 RT-qPCR 和 Western blot 验证抑制情况,并通过 Western blot 分析抑制耐药株中 FTO 后,c-Myc 和 CEBPA 的表达情况。结果 与亲本细胞比较,在利妥昔单抗耐药的细胞株中,去甲基化酶 FTO、c-Myc 表达均增加,CEBPA 表达降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。耐药细胞株经 MA 处理后,FTO、c-Myc 表达降低,CEBPA 表达增高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 FTO 在耐药株中表达明显增高,MA 可抑制 DLBCL 耐药细胞中 FTO 表达,可能对利妥昔单抗耐药的 DLBCL 患者有治疗的潜能。

关键词 弥漫大 B 细胞淋巴瘤;利妥昔单抗;脂肪量和肥胖相关蛋白;c-Myc

中图分类号 R 55

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0760-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.010

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)是起源于生发中心的,是非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin lymphoma, NHL)中最常见的一种类型^[1]。利妥昔单抗联合环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松(rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, R-CHOP)方案大约能治愈 60% 的 DLBCL 患者,其余患者则会出现难治或复发^[2]。因此,研究利妥昔单抗获得性

耐药的机制具有重大意义。m⁶A 是腺苷 N6 位发生甲基化,是一种转录后修饰,在癌症发生、发展及耐药中发挥重要的作用^[3]。研究^[4]表明,MYC 基因易位相关的 DLBCL 与 R-CHOP 治疗的低生存率相关,这表明 MYC 可能与 DLBCL 利妥昔单抗耐药存在相关性。脂肪量和肥胖相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)是一种去甲基化酶^[5],在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)中 R-2-羟基戊二酸(R-2-hydroxyglutarate, R-2HG)通过靶向 FTO/m⁶A/MYC/CEBPA 信号传导,抑制了癌细胞增殖,发挥抗肿瘤作用^[6]。甲氯芬酸钠(meclofenamic acid, MA)可结合 FTO 的活性表面,选择性抑制 FTO 介导的 m⁶A 去甲基化,减少胶质母细胞瘤干细胞的增殖^[7]。该研究旨在探讨 FTO 及其抑制剂 MA 通过 MYC、CEBPA 影响 DLBCL 利妥昔单抗的耐药机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 RPMI-1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);健康人血浆(南通大学附属医院健康体检者);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、CCK-8 试剂盒(日本 DojinDo 公司);AnnexinV-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);利妥昔单抗注射液(上海罗氏制药有限公司);兔抗人 FTO 单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司);兔抗人 c-Myc 单克隆抗体、兔抗人 CEBPA 单克隆抗体、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);引物由广州市锐博生物技术有限公司设计及合成;Trizol 试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);酶联仪(美国 Biotek 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);蛋白免疫印迹电泳设备及化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司);QuantStudio5 荧光定量 PCR 仪(美国 Thermofisher 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞来源与培养 选取 2 种“双重打击”淋巴瘤衍生的细胞系,活化 B 细胞样(ABC 型)OCI-LY8(LY8)和生发中心 B 细胞样(GCB 型)OCI-

2022-12-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81770214)

作者单位:¹南通大学医学院,南通 226001

²南通大学附属医院血液科,南通 226001

作者简介:顾季炜,女,硕士研究生;

宋国齐,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: sdsongqq@163.com

LY18(LY18),均购自中国科学院细胞库上海保藏中心。取生长状态良好的细胞系,培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 RPMI-1640 完全培养基中,置于 37 °C、5% CO₂、100% 饱和湿度的培养箱中培养,观察细胞培养基颜色及显微镜下密度,及时换液和传代。

1.2.2 耐药细胞株模型的建立 采用梯度加药法诱导 DLBCL 细胞系的耐药,分别将处于生长对数期的细胞系 LY8、LY18 以 0.5×10^6 个/ml 的密度接种于含 10% 新鲜人血浆的 RPMI-1640 培养基中,加入 0.5 μg/ml 利妥昔单抗,12 h 后换正常完全培养基培养至细胞状态恢复正常(约 4~5 d),在下个周期将利妥昔单抗浓度提高到前 1 个周期的 2 倍,按此方式重复 9 个周期后,得到对 128 μg/ml 利妥昔单抗耐药的细胞株(LY8R、LY18R)。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞存活率 将亲本及耐药细胞株分别接种于 96 孔细胞培养板中,每孔细胞 5×10^4 个,分别加入浓度为 0、2、10、50、100 μg/ml 利妥昔单抗,每个平行样本 3 个副孔,孵育 48 h 后按所提供的实验步骤在酶联仪上测 450 nm 波长处的吸光度值,计算细胞存活率。将耐药细胞株及经 MA[根据药物说明书 MA 的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为 5.6×10^{-6} mol/L]处理后的耐药细胞株分别接种于 96 孔细胞培养板中,每孔细胞 5×10^4 个,每个平行样本 3 个副孔,孵育 48 h 后,按实验步骤在酶联仪上测 450 nm 波长处的吸光度值,计算细胞存活率。

1.2.4 流式细胞术检测调亡 将亲本及耐药细胞株均分为 2 组: 0 μg/ml 和 50 μg/ml 利妥昔单抗组,每组 3 个复孔,于细胞培养箱内,48 h 后收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗 3 次, Binding Buffer 重悬细胞,分别加入 FITC-Annexin V 和 PI 各 5 μl,避光孵育 20 min。BD 流式细胞仪检测细胞调亡率, FlowJo 软件进行统计分析。

1.2.5 RT-qPCR 测定 FTO 表达 收集 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个细胞,提取总 RNA,参照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,采用 RT-qPCR 检测各组 FTO 的表达情况,引物序列由广州锐博生物技术有限公司设计及合成,引物序列见表 1。

1.2.6 Western blot 检测 收集亲本及耐药细胞,提取总蛋白,并进行 BCA 蛋白定量分析。SDS-PAGE 电泳,随后将蛋白转至 PVDF 膜上,转膜结束后用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。分别加入 FTO 抗体(1:1 000)、c-Myc 抗体(1:1 000)、CEBPA 抗体

表 1 RT-qPCR 引物序列

引物名称	序列(5'-3')
FTO-T	GCC CGA ACA TTA CCT GCT G
FTO-R	TGC TCC TTC TAG GGT TTT GCT
GAPDH-F	GGT CAC CAG GGC TGC TTT TA
GAPDH-R	GGA TCT CGC TCC TGG AAG ATG

(1:1 000)及 GAPDH 抗体(1:1 000) 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,结束后分别加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)室温避光孵育 2 h, TBST 洗膜 5 次, ECL 化学发光法显影, Image J 测量条带灰度值。

1.2.7 免疫荧光检测 将亲本及耐药细胞用 PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次, 0.5% Triton X-100 室温透化 5 min, 封闭 1 h, PBS 洗 3 次,4 °C 过夜孵育荧光一抗 FTO, PBS 洗 3 次、室温避光孵育荧光二抗 2 h, DAPI 染核 5 min、滴加抗淬灭液后拍照。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 利妥昔单抗耐药 DLBCL 细胞株鉴定 将亲本及耐药细胞株分别重悬于 RPMI-1640 完全培养基及含 10% 新鲜人血浆 RPMI-1640 培养基中,观察细胞存活率。结果显示在 0、2、10、50、100 μg/ml 的利妥昔单抗作用下,LY8 及 LY8R 细胞的 IC₅₀ 分别为 0.54、47.15 μg/ml,耐药指数为 87.31; LY18 及 LY18R 细胞的 IC₅₀ 分别为 47.90、227.0 μg/ml,耐药指数为 4.74,差异均有统计学意义($t = 68.12$ 、 7.425 ,均 $P < 0.001$)。见图 1。

2.2 利妥昔单抗处理亲本与耐药细胞株的调亡差异 与对照组(0 μg/ml 利妥昔单抗组)比较,50 μg/ml 利妥昔单抗组和 DLBCL 耐药株(LY8R、LY18R)组细胞调亡差异均无统计学意义,而亲本细胞株组(LY8、LY18),差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 2。

2.3 RT-qPCR 检测 FTO 在亲本与耐药 DLBCL 细胞株中的表达情况 RT-qPCR 检测结果显示,FTO 在耐药细胞株中表达明显升高,表明 FTO 可能与 DLBCL 利妥昔单抗耐药存在相关性。见图 3。

2.4 免疫荧光检测 FTO 蛋白在亲本与耐药 DLBCL 细胞株中的表达情况 免疫荧光结果显示,FTO 在耐药细胞株中表达明显升高,表明 FTO 可能

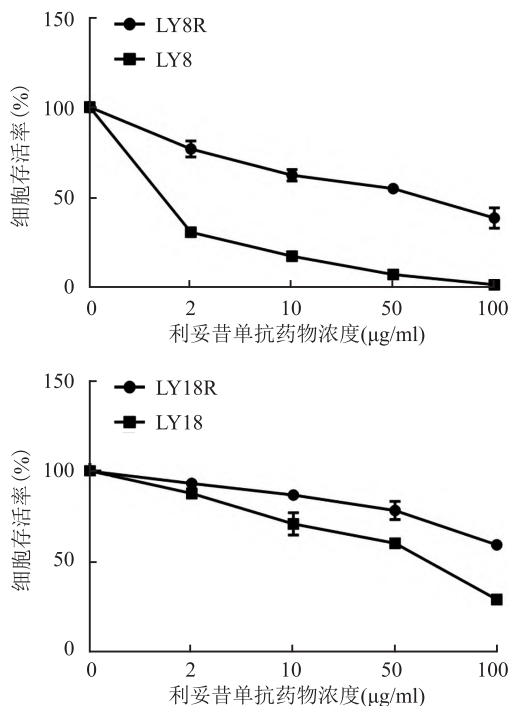


图1 CCK-8 法测定细胞存活率

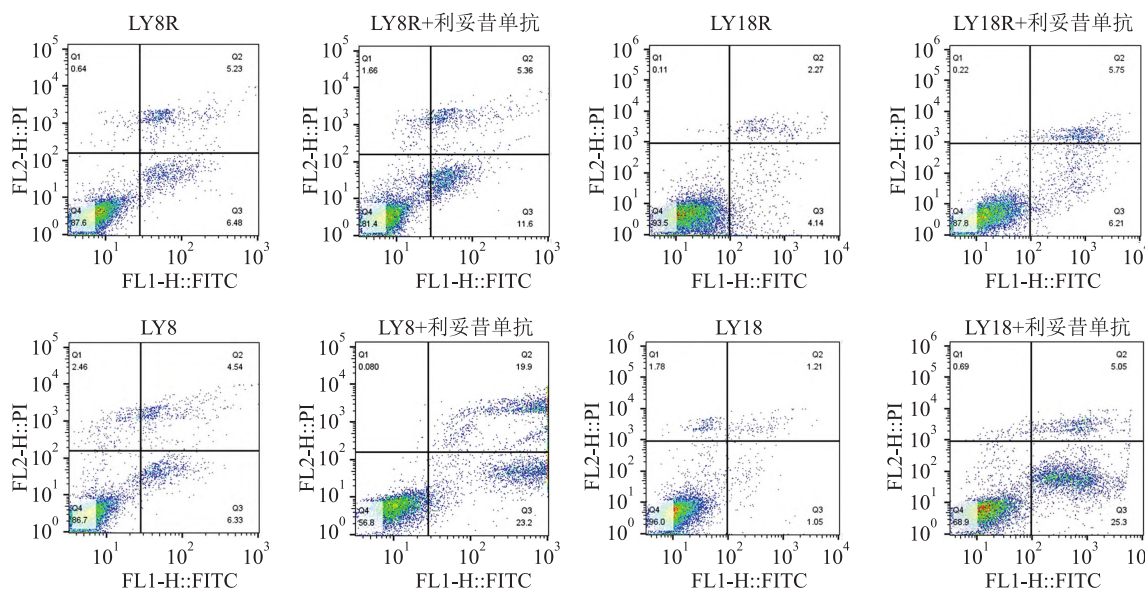


图2 利妥昔单抗处理亲本细胞株与耐药细胞株的凋亡差异

a: LY8; b: LY8 + 利妥昔单抗; c: LY8R; d: LY8R + 利妥昔单抗; e: LY18; f: LY18 + 利妥昔单抗; g: LY18R; h: LY18R + 利妥昔单抗; 与 LY8 组比较: *** $P < 0.001$; 与 LY18 组比较: ### $P < 0.001$

与 DLBCL 利妥昔单抗耐药存在相关性。见图 4。

2.5 Western blot 检测 FTO、c-Myc、CEBPA 蛋白在亲本与耐药 DLBCL 细胞株中的表达情况

Western blot 检测结果显示 FTO、c-Myc 在耐药细胞株 LY8R、LY18R 中表达升高, CEBPA 表达降低, 由此可见, FTO 可能通过 c-Myc、CEBPA 影响 DLBCL 对利妥昔单抗的耐药。见图 5。

2.6 RT-qPCR 检测经抑制剂 MA 处理后 FTO 在耐药细胞株中的表达情况

RT-qPCR 检测结果显示, 经抑制剂 MA 处理后, FTO 在耐药细胞株中的表达明显降低。见图 6。

2.7 Western blot 检测经抑制剂 MA 处理后, FTO、c-Myc、CEBPA 蛋白在耐药细胞株中的表达情况

Western blot 检测结果显示, 经抑制剂 MA 处理后 FTO、c-Myc 在耐药细胞株中表达明显减少, 而 CEBPA 在耐药细胞株中明显增多。见图 7。

2.8 经抑制剂 MA 处理后耐药细胞对利妥昔单抗耐药性的影响

CCK-8 法结果显示, 经 MA 处理后

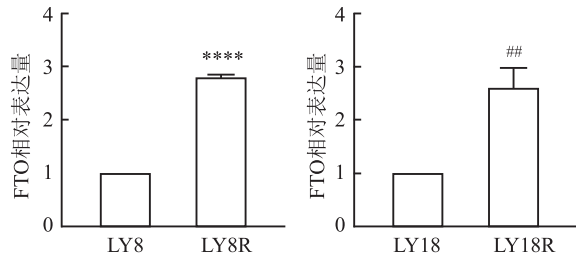


图3 RT-qPCR 检测去甲基化酶 FTO 在亲本与耐药 DLBCL 细胞株中的表达情况

与 LY8 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 LY18 组比较: ## $P < 0.01$

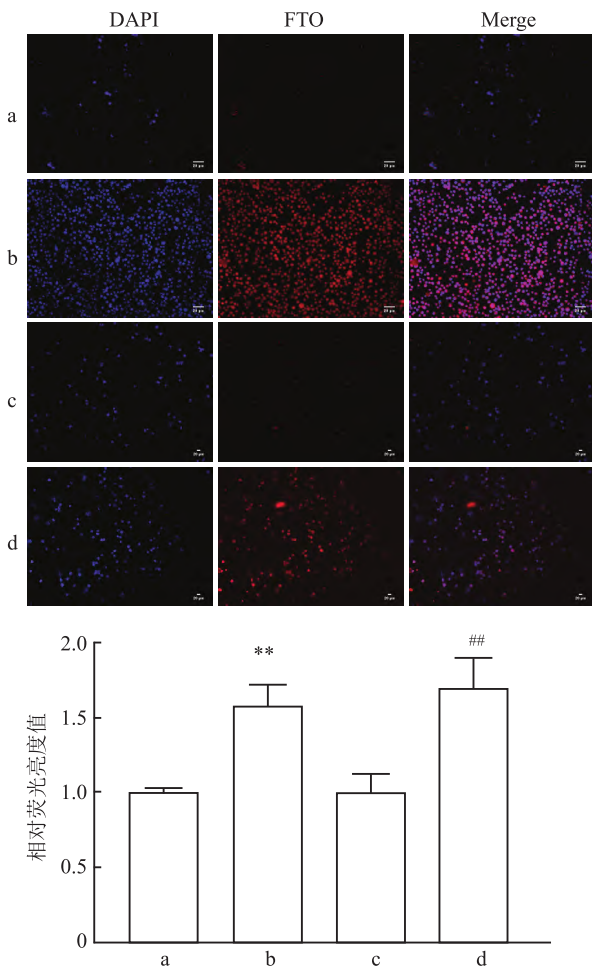


图4 免疫荧光检测 FTO 蛋白在亲本与耐药 DLBCL 细胞株中的表达情况 $\times 400$

a: LY8; b: LY8R; c: LY18; d: LY18R; 与 LY8 组比较: ** $P < 0.01$; 与 LY18 组比较: ## $P < 0.01$

的 LY8R 和 LY18R 在 0、2、10、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 的利妥昔单抗刺激 48 h 后, 细胞活力明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 16.37, 11.96$, 均 $P < 0.001$), 这表明抑制剂 MA 可能影响了 DLBCL 对利妥昔单抗的耐药性。见图 8。

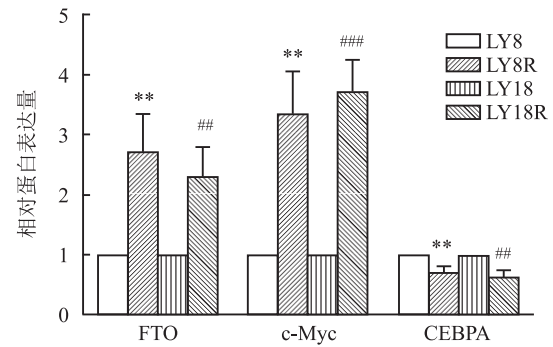
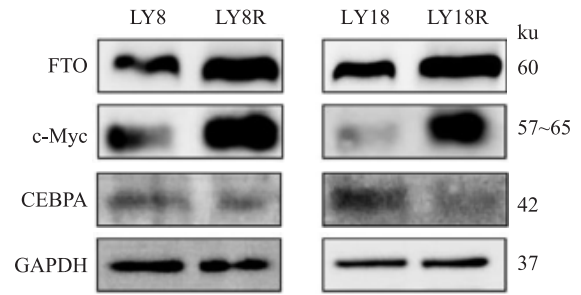


图5 Western blot 检测 FTO、c-Myc 及 CEBPA 在亲本及耐药 DLBCL 细胞株的表达

与 LY8 组比较: ** $P < 0.01$; 与 LY18 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

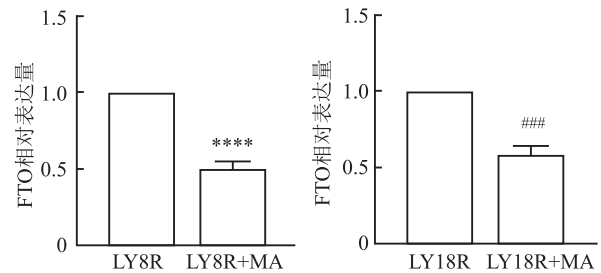


图6 RT-qPCR 检测经抑制 MA 处理后 FTO 在耐药细胞株中的表达情况

与 LY8R 组比较: **** $P < 0.0001$; 与 LY18R 组比较: ### $P < 0.001$

3 讨论

常规化疗和靶向治疗是大部分肿瘤的一线治疗方法, 大多数早期肿瘤患者能取得完全或部分缓解, 而晚期肿瘤患者往往治疗效果不佳, 肿瘤细胞可通过多因素的耐药机制逃避化疗和靶向治疗^[8]。肿瘤耐药的机制包括药物代谢改变、药物转运失调和靶蛋白/受体改变等, 这些都影响药物与其靶标的有效结合, 也是抗癌药物疗效不佳的主要原因^[9]。利妥昔单抗作为治疗 DLBCL 的一线药物, 在临床治疗上发挥重要作用, 但耐药是患者最大的治疗障碍, 尽

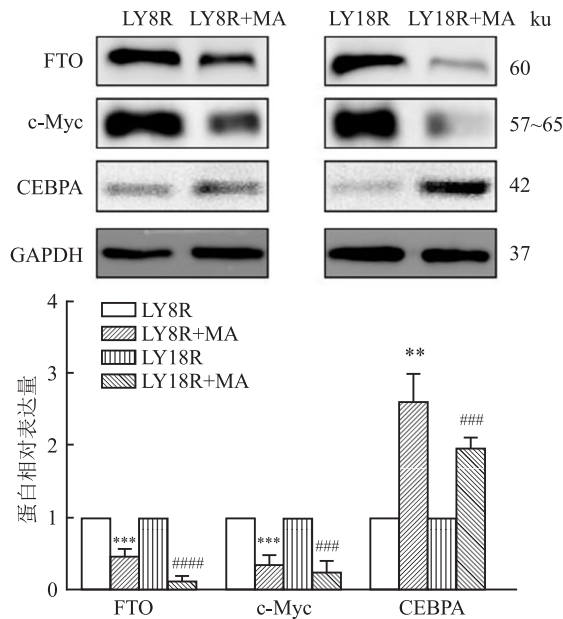


图7 Western blot 检测经 MA 处理后,FTO、c-Myc、CEBPA 蛋白在耐药细胞株中的表达情况

与 LY8R 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 LY18R 组比较: ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$

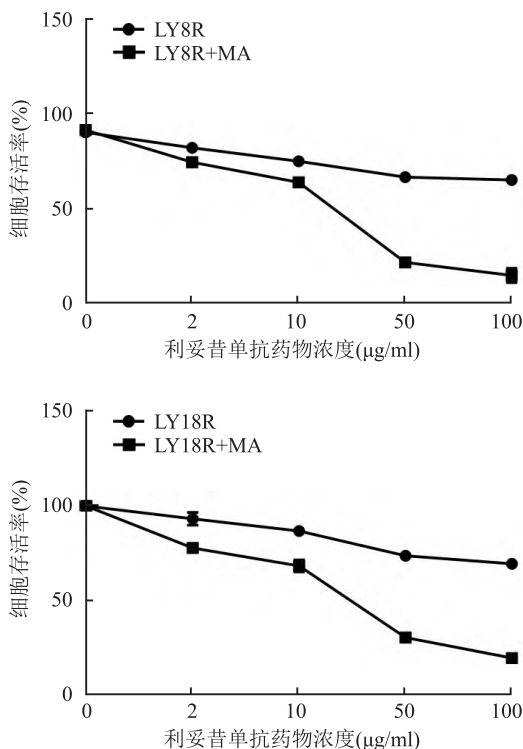


图8 CCK-8 法测定细胞存活率

管现如今对利妥昔单抗耐药机制尚不清楚,但越来越多的研究表明 RNA m⁶A 甲基化修饰促进了肿瘤的发生发展与耐药,如 FTO 通过作用于 G6PD/PARP1,促进结直肠癌进展和化疗耐药,靶向抑制

FTO 能抑制癌细胞生长并提高化疗敏感性^[10]。FTO 通过信号转导因子和转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription3, STAT3) 参与乳腺癌对阿霉素耐药过程,FTO 启动子区域存在 STAT3 结合位点,能激活乳腺癌细胞 STAT3 信号,而 STAT3 的过度激活与乳腺癌耐药相关,因此过表达 FTO 会引起乳腺癌细胞对阿霉素的耐药^[11]。

MYC 是研究最广泛的致癌基因之一,其参与调节细胞生长、细胞周期、分化、凋亡、DNA 修复、蛋白质翻译、免疫反应和干细胞形成等过程^[12-13]。MYC 基因扩增与卵巢癌、食管癌、鳞状肺癌、乳腺癌等预后不良相关^[14]。MYC 染色体重排已被确定为 DLBCL 患者预后不良因素之一^[15],这提示 MYC 的异常参与了 DLBCL 耐药过程。研究^[6]发现, R-2HG 可通过抑制 FTO 来促进 MYC/CEBPA 的甲基化水平并促进 m⁶A 依赖的 mRNA 降解,从而在 AML 中发挥抑癌作用。DLBCL 利妥昔单抗耐药机制中是否与代谢通路相关,尤其是糖酵解通路等,有待进一步研究。

本研究采用梯度加药法构建利妥昔单抗耐药细胞系,并用流式细胞术检测细胞凋亡率,Western blot 证明去甲基化酶 FTO 在耐药株中表达升高,c-Myc 表达也增高,CEBPA 表达降低,此外,耐药株经 MA 处理后,FTO 表达下降且 c-Myc 表达也降低,CEBPA 表达升高,这提示其可能通过 FTO/c-Myc/CEBPA 轴发挥利妥昔单抗抗性作用。CCK-8 法结果显示,耐药株经 MA 处理后,细胞活力降低,表明 MA 可能影响 DLBCL 对利妥昔单抗的敏感性。目前对于利妥昔单抗耐药尚无相关药物进入临床使用,关于利妥昔单抗耐药机制仍需进一步深入研究。

参考文献

[1] Li S, Young K H, Medeiros L J. Diffuse large B-cell lymphoma [J]. Pathology, 2018, 50(1): 74-87.
 [2] Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte [J]. Blood, 2010, 116(12): 2040-5.
 [3] Meyer K D, Patil D P, Zhou J, et al. 5' UTR m(6)A promotes cap-independent translation [J]. Cell, 2015, 163(4): 999-1010.
 [4] Aukema S M, Siebert R, Schuurings E, et al. Double-hit B-cell lymphomas [J]. Blood, 2011, 117(8): 2319-31.
 [5] Zaccara S, Ries R J, Jaffrey S R. Reading, writing and erasing mRNA methylation [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(10): 608-24.

- [6] Su R, Dong L, Li C, et al. R-2HG exhibits anti-tumor activity by targeting FTO/m⁶A/MYC/CEBPA signaling[J]. *Cell*, 2018, 172(1/2):90–105.
- [7] Cui Q, Shi H, Ye P, et al. m⁶A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(11):2622–34.
- [8] Assaraf Y G, Brozovic A, Goncalves A C, et al. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer[J]. *Drug Resist Updat*, 2019, 46:100645.
- [9] Chen Z, Shi T, Zhang L, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade[J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1):153–64.
- [10] Wang J, Qiao Y, Sun M, et al. FTO promotes colorectal cancer progression and chemotherapy resistance *via* demethylating G6PD/ PARP1[J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(3):e772.
- [11] Wang Y, Cheng Z, Xu J, et al. Fat mass and obesity-associated protein (FTO) mediates signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-driven resistance of breast cancer to doxorubicin[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1):1874–89.
- [12] Beaulieu M E, Castillo F, Soucek L. Structural and biophysical insights into the function of the intrinsically disordered myc oncoprotein[J]. *Cells*, 2020, 9(4):E1038.
- [13] Carroll P A, Freie B W, Mathsyaraja H, et al. The MYC transcription factor network; balancing metabolism, proliferation and oncogenesis[J]. *Front Med*, 2018, 12(4):412–25.
- [14] Schaub F X, Dhankani V, Berger A C, et al. Pan-cancer alterations of the MYC oncogene and its proximal network across the cancer genome atlas[J]. *Cell Syst*, 2018, 6(3):282–300.
- [15] Johnson N A, Slack G W, Savage K J, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(28):3452–9.

Effect of FTO and inhibitor on rituximab resistance in DLBCL

Gu Jiwei^{1,2}, Shi Mei², Song Guoqi^{1,2}

(¹Medical School of Nantong University, Nantong 226001;

²Dept of Haematology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001)

Abstract Objective To explore the effect of FTO (fat mass and obesity-associated protein) and inhibitor on rituximab resistance in DLBCL (diffuse large B cell lymphoma). **Methods** Two cell lines derived from “double strike” lymphoma were selected, activated B-cell-like (ABC) OCI-LY8 (LY8) and germinal center B-cell-like (GCB) OCI-LY18 (LY18), and rituximab-resistant DLBCL cell lines (LY8R and LY18R) were constructed by “concentration gradient dosing method”. The CCK-8 method was used to detect the cell survival rate of different concentrations of rituximab after interfering with the parental and drug-resistant cells, and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated; Annexin V/PI double staining method was used to detect the apoptotic rate of parent cells and drug-resistant cells; qRT-PCR, immunofluorescence and Western blot were used to detect the expression of demethylase FTO in rituximab-resistant cells. The expression of FTO was inhibited by adding meclufenamic acid (MA) to drug-resistant cell lines, and the inhibition was verified by RT-qPCR and Western blot. The expression of c-Myc and CEBPA in drug-resistant strains after inhibiting FTO was detected by using Western blot. **Results** Compared with the parent cells, the expression of demethylase FTO and c-Myc increased, and the expression of CEBPA decreased in the rituximab-resistant cell lines, with statistical significance ($P < 0.01$). After the drug-resistant cell lines treated with MA, the expression of FTO and c-Myc decreased and CEBPA increased, all with statistically significant differences ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of FTO in drug-resistant DLBCL significantly increases, and MA inhibits the expression of FTO in drug-resistant cells, which may have therapeutic potential for rituximab-resistant DLBCL.

Key words diffuse large B-cell lymphoma; rituximab; FTO; c-Myc