

组蛋白去乙酰化酶抑制剂诱导人食管鳞癌 KYSE-150 细胞凋亡的实验研究

陈 萍, 陈 龙, 董庆华

(浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016)

摘 要: [目的] 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古菌素 A 和丁酸钠诱导人食管鳞癌细胞 KYSE-150 凋亡的作用及机理。[方法] MTT 法测 IC_{50} 值及细胞毒作用, 流式细胞仪 Annexin V FITC - PI 法检测细胞凋亡发生率, PI 染色法检测细胞周期变化, 蛋白印迹法检测细胞 p21 和 Bmi-1 蛋白表达情况, γ -H2AX 荧光染色检测细胞 DNA 损伤。[结果] 曲古菌素 A 和丁酸钠能抑制人食管鳞癌细胞 KYSE-150 生长且呈浓度依赖关系, 作用 48h KYSE-150 细胞 IC_{50} 值分别为 $0.55\mu\text{mol/L}$ 和 5.6mmol/L ; 曲古菌素 A 和丁酸钠能诱导细胞凋亡, 使细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 同时细胞 p21 蛋白表达增高, Bmi-1 蛋白表达降低, DNA 损伤增强。[结论] 组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古菌素 A 和丁酸钠能抑制 Bmi-1 表达从而激活 p21 蛋白表达, 诱导人食管鳞癌细胞 KYSE-150 细胞周期阻滞、DNA 损伤和凋亡。

关键词: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 曲古菌素 A; 丁酸钠; 食管肿瘤; 鳞状细胞癌; 凋亡

中图分类号: R735 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)09-0699-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2013.09.B008

Histone Deacetylases Inhibitor Inducing Apoptosis in Human KYSE-150 Esophageal Carcinoma Cells

CHEN Ping, CHEN Long, DONG Qing-hua

(Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of histone deacetylases inhibitor trichostatin A (TSA) and sodium butyrate (NaB) on apoptosis of human KYSE-150 esophageal carcinoma cells. [Methods] IC_{50} value and cytotoxicity of KYSE-150 cells were detected by MTT method. Apoptotic cells and cell cycle distribution were analyzed by FCM using Annexin V FITC-PI and PI staining methods respectively. Expressions of p21 and Bmi-1 were evaluated by Western blot method. DNA damage was assayed by γ -H2AX staining. [Results] TSA and NaB significantly inhibited the proliferation of KYSE-150 cells in a dose-dependent manner, with IC_{50} $0.55\mu\text{mol/L}$ and 5.6mmol/L respectively after 48h. Flow cytometric analysis showed that TSA and NaB induced apoptosis and arrested KYSE-150 cells in the G₂/M phase. In addition, p21 protein expression in KYSE-150 cells and DNA damage increased after exposure to TSA and NaB, while Bmi-1 expression was down-regulated. [Conclusion] TSA and NaB could induce apoptosis of human KYSE-150 esophageal carcinoma cells through inhibiting Bmi-1 expression, enhancement of p21 expression and G₂/M arrest, and affect the ability to repair DNA damage.

Subject words: histone deacetylases inhibitor; trichostatin A; sodium butyrate; esophageal neoplasms; squamous cell carcinoma; cell apoptosis

组蛋白是真核生物核染色体的重要构成成分。组蛋白乙酰化在真核生物基因表达调控中发挥着重要的作用。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)是去乙酰化酶超家族成员之一,可移去核心组蛋白的乙酰基,参与调控染色质结构、基因转录活性和表观遗传性状的变化^[1]。曲古菌素 A(trichostatin A, TSA)是羟肟酸类化合物,是最早发现且迄

今研究最广泛的一类组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDAC inhibitors, HDACi),其抑酶作用强,结构简单,底物广泛,为广谱组蛋白去乙酰化酶抑制剂^[2]。丁酸钠(sodium butyrate, NaB)是一种四碳脂肪酸盐,是重要的肠道黏膜营养剂。近年来研究表明组蛋白去乙酰化酶抑制剂对白血病、肺癌、前列腺癌、肠癌、脑瘤等多种肿瘤有抑制作用,部分药物已进入临床研究。

食管癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤,尽管有报道 TSA 和 NaB 能抑制食管癌细胞的增殖,但具体作用机理仍不甚清楚^[3,4]。本实验观察 TSA 和 NaB

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81272493)

通讯作者: 董庆华, 副研究员, 博士; 浙江大学医学院附属邵逸夫医院中心实验室, 浙江省杭州市庆春东路 3 号(310016); E-mail: dongqinghua@zju.edu.cn

收稿日期: 2013-05-15; **修回日期:** 2013-08-01

对人食管鳞癌细胞 KYSE-150 凋亡诱导作用并对其作用机理进行探讨。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

MTT、碘化丙啶(PI)、TSA、NaB 为 Sigma 公司产品, RPMI 1640 培养基为美国 Hyclone 公司产品, Annexin V FITC-PI 试剂为美国 BD Pharmingen 公司产品。

1.2 实验材料和主要仪器

细胞培养瓶及培养板为丹麦 Nunclon 公司产品;超净工作台及 CO₂ 培养箱为德国 Heraeus 产品;Wallac 酶标仪为芬兰产品;FACSCan 流式细胞仪为美国 BD 公司产品;Axioskop 2 荧光显微镜为 Zeiss 公司产品。

1.3 细胞系及培养

KYSE-150 细胞由温州医学院附属第一医院吴士琇教授馈赠, RPMI 1640 培养基加 10%小牛血清, 5%CO₂, 37℃孵箱中常规培养。

1.4 MTT 法检测 KYSE-150 细胞的 IC₅₀ 值及生长抑制曲线

取对数生长期细胞接种于 96 孔培养板内, 6 复孔。每孔 3×10⁴ 个/ml 细胞, 加入不同浓度的 TSA (0~2μmol/L) 或 NaB (0~20mmol/L), 总体积 200μl, 培养 48h 后, 每孔加入 1mg/ml MTT 工作液 50μl, 37℃放置 4h, 离心 2 000r/min, 5min, 弃上清, 每孔加入 150μl DMSO, 震荡溶解结晶, 在波长 570nm 比色, 求出半数抑制浓度 IC₅₀ 及生长抑制曲线。

1.5 细胞凋亡检测

KYSE150 细胞经药物不同处理后, 取 1×10⁵/ml 细胞悬液 1ml 用磷酸盐缓冲液洗 2 次后, 加入缓冲液 490μl、Annexin-V 5μl 和 PI 5μl, 暗处反应 15min, 上机检测, CellQuest 软件分析。另取 2×10⁶ 细胞, 70%冰乙醇固定, 24h 后 PBS 洗 2 次, 加入 1mg/ml RNase A 200μl, 37℃水浴 30min, 再加 PI 染色液避光反应 30min, 上机检测 10 000 个细胞, Modfit 软件分析亚二倍体峰及细胞周期。

1.6 蛋白印迹法检测 p21 和 Bmi-1 表达

按蛋白抽提液(购自碧云天公司)说明提取细胞总蛋白, 定量后取 40μg 蛋白上样, 15%胶电泳后转

PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭, 抗 p21 单抗(购自 Santa Cruz 公司, 工作液浓度为 1:500)或抗 Bmi-1 单抗(购自 Millipore 公司, 工作液浓度为 1:500)4℃过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 5min。二抗(购自 Sigma 公司, 工作浓度为 1:2 000), 室温温浴 60min, TBST 洗膜 3 次, 每次 15min。ECL 显影。

1.7 免疫荧光染色

细胞用 10%福尔马林固定 10min, PBS 清洗后用 0.5% Triton X 100 破膜, 10%羊血清封闭 1h, 分别与一抗 anti-γ H2AX (美国 Millipore 公司)和二抗 Alex Fluor® 488 羊抗鼠 IgG(美国 Invitrogen 公司)反应 1h, DAPI 染细胞核后在荧光显微镜下观察。

1.8 统计学处理

本实验中所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间分析采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 TSA 和 NaB 对 KYSE-150 细胞的细胞毒作用

TSA 和 NaB 能明显抑制 KYSE-150 细胞生长, 且有浓度依赖关系。随着 TSA 作用浓度从 0.0625 μmol/L 增加到 2 μmol/L, 细胞存活率由 85.7%降低为 35.7%; NaB 作用浓度从 0.625mmol/L 增加到 20 mmol/L, 细胞存活率由 82.6%降低为 40.9%(Figure 1)。TSA 和 NaB 作用 48h KYSE-150 细胞 IC₅₀ 值分别为 0.55 μmol/L 和 5.6mmol/L。根据该试验结果, 以后试验 TSA 浓度采用 0.5 μmol/L, NaB 浓度为 5mmol/L。

2.2 TSA 和 NaB 诱导 KYSE-150 细胞凋亡

用 Annexin-V/PI 双染色法定量检测表明, 正常 KYSE-150 细胞自发凋亡率低, 约 2.8%。0.5 μmol/L TSA 作用 24h 后, KYSE-150 细胞质膜磷脂酰丝氨酸外翻增多, 细胞凋亡率增加为 10.6%, 5mmol/L NaB 作用后细胞凋亡率增加为 9.2%(Figure 2)。

2.3 TSA 和 NaB 对 KYSE-150 细胞周期的影响

KYSE-150 细胞经 0.5 μmol/L TSA 或 5mmol/L NaB 处理 24h 后, 细胞周期发生变化, G₀/G₁ 期细胞百分率由未经药物处理时的 36.6%略微增加为 42.7%和 42.8%, G₂/M 期细胞百分率明显由未经药物处理时的 17.1%增加到 25.79 %和 29.06%, S 期细胞百分率则从 46.2%下降为 35.51%和 28.11%(Figure 3)。

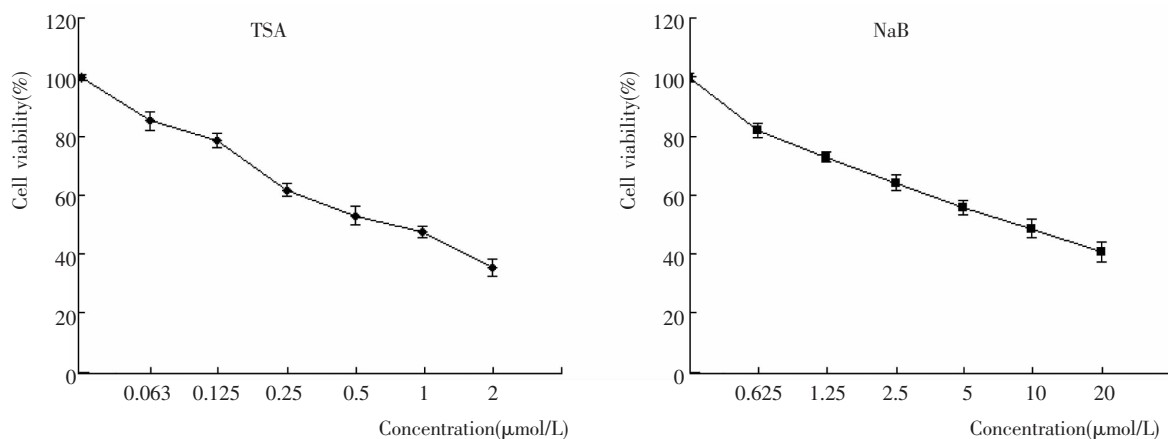


Figure 1 KYSE-150 cell viability changes after treated with different dose of TSA or NaB for 48h

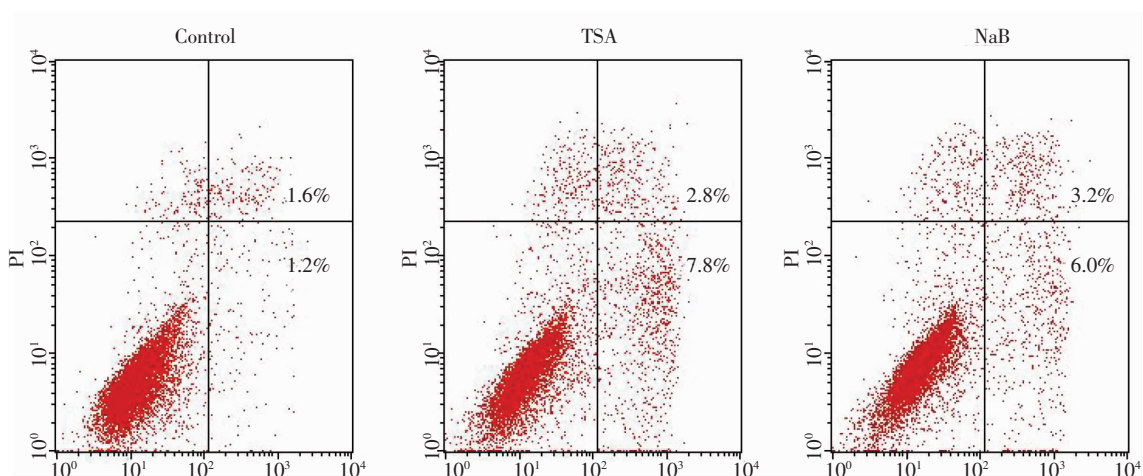


Figure 2 Apoptotic cells induced by 0.5μmol/L TSA or 5mmol/L NaB for 24h in KYSE-150 cells

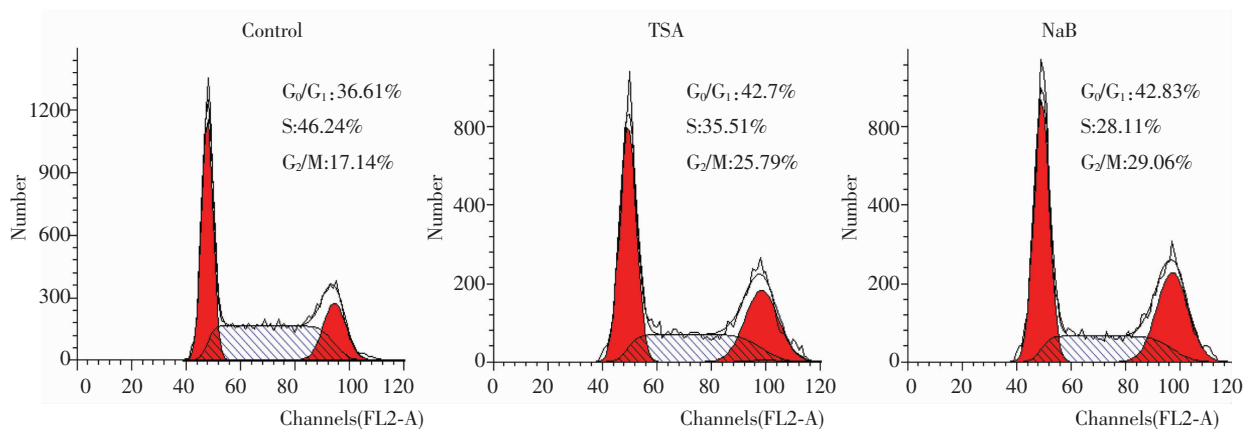
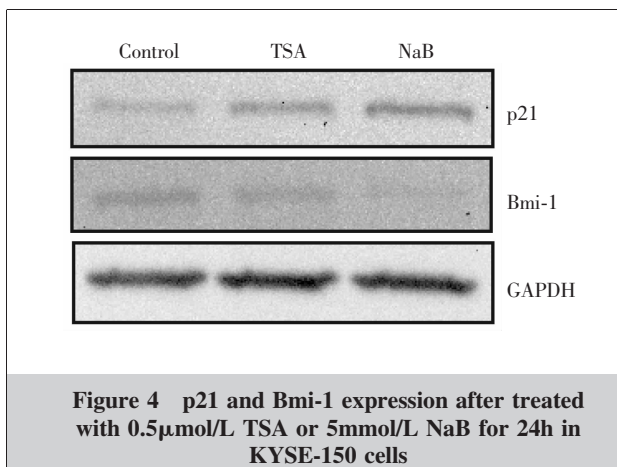


Figure 3 Cell cycle changes after treated with 0.5μmol/L TSA or 5mmol/L NaB for 24h in KYSE-150 cells

2.4 p21 和 Bmi-1 蛋白表达变化

未经药物处理的 KYSE-150 细胞 p21 蛋白表达较少, 经 0.5 μ mol/L TSA 或 5mmol/L NaB 处理 24h 后 p21 蛋白表达明显增加 (Figure 4)。检测 Bmi-1 的表达情况, 发现 0.5 μ mol/L TSA 或 5mmol/L NaB 能抑制细胞 Bmi-1 的表达。

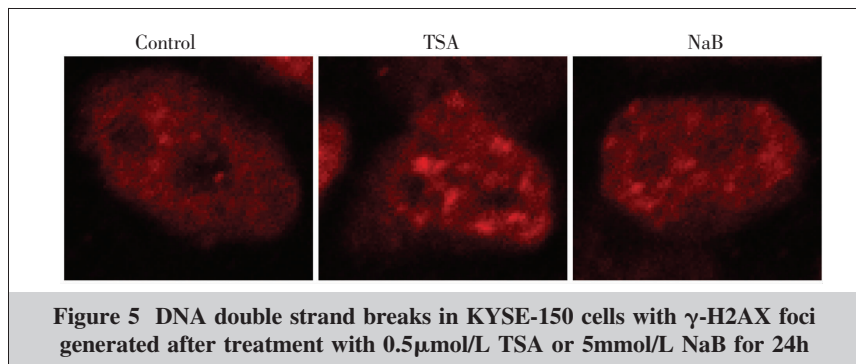


2.5 TSA 和 NaB 对 KYSE-150 细胞 DNA 损伤的影响

γ -H2AX 对 DNA 双链断裂快速敏感的反应使 γ -H2AX 分析用于检测早期 DNA 双链损伤。我们用 γ -H2AX 分析方法检测 KYSE-150 细胞 DNA 双链断裂情况, 对照 KYSE-150 细胞的细胞核染色均一, 没有 DNA 双链损伤; 而在 0.5 μ mol/L TSA 或 5mmol/L NaB 处理 24h 后, 可见所有细胞内 γ -H2AX foci 荧光强度显著增强 (Figure 5)。这些结果表明 TSA 和 NaB 能诱导 KYSE-150 细胞内 DNA 双链断裂大量产生。

3 讨论

作为一类新型的抗肿瘤药物, HDACi 可引起肿



瘤细胞的生长停滞、分化或凋亡, 并且具有一定的肿瘤特异性, 对一些正常细胞没有影响或毒性较低^[5]。HDACi 除对肿瘤细胞有直接的杀伤作用外, 还可抑制肿瘤组织的血管形成过程, 从而抑制肿瘤的转移^[6]。因其高效, 低毒, 广谱的特点, 成为抗肿瘤药物研究的新热点, 并为临床肿瘤化疗提供新途径。

研究表明 HDACi 能够通过上调促凋亡基因表达、下调抗凋亡基因表达来诱导肿瘤细胞凋亡。不同的 HDACi 针对不同类型的肿瘤细胞, 其引起的凋亡途径不同, 可通过线粒体途径或死亡受体途径诱导肿瘤细胞凋亡。其机制包括激活 TRAIL、TNF- α , 转录调节 Bid、Bad、Bim 等的表达、上调活性氧(ROS)的产生、改变线粒体膜电位等^[7,8]。我们研究发现, TSA 能有效抑制人食管鳞癌 KYSE-150 细胞的生长并诱导胞内 p21 蛋白量增加使细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 这与以前的报道相符^[4]。此外, 我们也发现 NaB 同样能诱导胞内 p21 蛋白量增加使细胞周期阻滞于 G₂/M 期。p21 是一种重要的细胞周期调控蛋白, 参与细胞的生长、分化、衰老及死亡过程, 同时又与肿瘤发生密切相关。p21 可抑制细胞周期素依赖激酶 CDK 的活性, 并可直接结合 PCNA 而抑制细胞 DNA 合成, 阻止细胞周期分裂^[9]。

最近的研究表明表观遗传调控因子 Polycomb Group (PcG) 蛋白家族成员 Bmi-1 是 HDACi 的靶位点^[10]。Bmi-1 能维护干细胞的自我更新, 在细胞分化和增殖过程中起重要作用, 而且 Bmi-1 在多种肿瘤组织中高表达, 被认为是癌基因, 与肿瘤发生和预后密切相关。Bmi-1 能转录抑制细胞周期调节蛋白和肿瘤抑制因子 p16Ink4a、p19Arf、p21 等^[11]。因此, TSA 和 NaB 对 KYSE-150 细胞周期的阻滞可能与抑制 Bmi-1 表达从而使 p21 表达增强有关。

最近研究发现 PcG 蛋白家族参与调控 DNA 损伤应答。尽管具体作用机制仍有待更多研究, Bmi-1 在 DNA 损伤修复过程中的关键作用得到一些实验证实。基因敲除老鼠体内实验发现 Bmi-1 能维护线粒体功能和氧化还原平衡, 敲除 Bmi-1 后细胞线粒体功能受损, 胞内 ROS 明显增高, DNA 损伤反应放大^[12]。Bmi-1 具有 E3 泛素连接酶活性,

能与 RING2 和 RNF2 等分子形成复合物调节组胺酸 H2A、H2AX 泛素化,增强细胞 DNA DSB 修复能力^[13]。研究发现 HDACi 能引起白血病细胞 DNA 损伤^[7],我们研究发现 TSA 和 NaB 作用后食管鳞癌 KYSE-150 细胞 γ -H2AX foci 荧光强度显著增强,表明 TSA 和 NaB 能诱导 KYSE-150 细胞内 DNA 双链断裂大量产生,这可能也与 TSA 和 NaB 抑制 Bmi-1 表达有关。

综上所述,TSA 和 NaB 可能通过降低 Bmi-1 表达,从而上调 p21 蛋白表达水平,进而引起细胞周期阻滞和细胞 DNA 损伤,最终诱导细胞发生凋亡。

参考文献:

- [1] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications [J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 41–45.
- [2] Yoshida M, Kijima M, Akita M, et al. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A[J]. *Biol Chem*, 1990, 265(28): 17174–17179.
- [3] Ma JF, Jiang YN, Zhao JM, et al. Trichostatin A inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in human esophageal carcinoma cell line EC1[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2009, 17 (34): 3532–3537. [马俊芬, 江亚南, 赵继敏, 等, 曲古菌素 A 对食管癌 EC1 细胞增殖和细胞周期的影响及其分子机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(34): 3534–3537.]
- [4] Lei PG, Wu JW, Zheng XD, et al. Effects of sodium butyrate on apoptosis in human esophageal carcinoma cell line Eca-109 in vitro[J]. *Tumour Journal of the World*, 2006, 5(4): 250–252. [雷平光, 吴建维, 郑向东, 等, 丁酸钠诱导食管癌细胞凋亡的体外研究[J]. *世界肿瘤杂志*, 2006, 5(4): 250–252.]
- [5] Mateen S, Raina K, Jain AK, et al. Epigenetic modifications and p21-cyclin B1 nexus in anticancer effect of histone deacetylase inhibitors in combination with silibinin on non-small cell lung cancer cells[J]. *Epigenetics*, 2012, 7(10): 1161–1172.
- [6] Mahalingam D, Medina EC, Esquivel JA, et al. Vorinostat enhances the activity of temsirolimus in renal cell carcinoma through suppression of survivin levels[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(1): 141–153.
- [7] Rosato RR, Almenara JA, Maggio SC, et al. Role of histone deacetylase inhibitor-induced reactive oxygen species and DNA damage in LAQ-824/fludarabine antileukemic interactions[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(10): 3285–3297.
- [8] Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway[J]. *Nat Med*, 2005, 11(1): 71–76.
- [9] Harper JW, Adami GR, Wei N, et al. The P21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G₁ cyclin-dependent kinases[J]. *Cell*, 1993, 75(4): 805–816.
- [10] Bommi PV, Dimri M, Sahasrabudhe AA, et al. The polycomb group protein BMI1 is a transcriptional target of HDAC inhibitors[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(13): 2663–2673.
- [11] Subkhankulova T, Zhang X, Leung C, et al. Bmi1 directly represses p21Waf1/Cip1 in Shh-induced proliferation of cerebellar granule cell progenitors[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 45(2): 151–162.
- [12] Liu J, Liu C, Chen J, et al. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway[J]. *Nature*, 2009, 459 (7245): 387–393.
- [13] Ismail IH, Andrin C, McDonald D, et al. BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair[J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(1): 45–60.