

· 论 著 ·

曲古抑菌素 A 体外对结肠癌细胞凋亡及低氧状态下其缺氧诱导因子-1α 表达的影响

石晓星¹, 王建军², 高 锋^{1*}

(1. 上海交通大学附属第六人民医院中心实验室, 上海 200233; 2. 上海交通大学附属第六人民医院肿瘤科)

[摘要] **目的:**观察曲古抑菌素 A (TSA) 体外对结肠癌 HT-29 细胞凋亡及低氧状态下其缺氧诱导因子(HIF)1α 表达的影响。**方法:**体外培养结肠癌 HT-29 细胞, 给予 TSA 100、200、400、600、800 nmol/L 分别处理 12、24、48、72 h, 对照组加入同等体积的 DMSO。MTT 法检测各组 HT-29 细胞的存活率; Annexin V、TUNEL 法检测 HT-29 细胞凋亡率; RT-PCR、免疫印迹法分别检测低氧状态下(37℃、1% O₂) HT-29 细胞 HIF-1α mRNA 及蛋白的表达。**结果:**MTT 法检测结果发现, 与对照组相比, TSA 处理组 HT-29 细胞活力明显降低($P<0.05$), 随着浓度的增大、时间的延长, 其抑制作用逐渐增强。Annexin V、TUNEL 法检测结果发现, TSA 能诱导 HT-29 细胞的早期凋亡, TSA(200、400、600、800 nmol/L)处理组凋亡率明显高于对照组($P<0.05$)。低氧条件下, TSA 抑制 HT-29 细胞 HIF-1α 蛋白的表达, 随着浓度的增大, 其抑制作用逐渐增强; 而对 HIF-1α mRNA 的表达无影响。**结论:** TSA 体外可能通过抑制低氧条件下 HT-29 细胞 HIF-1α 蛋白的表达, 诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖。

[关键词] 曲古抑菌素 A; 结肠肿瘤; 缺氧诱导因子 1α; 细胞凋亡

[中图分类号] R 735.35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0612-04

Influence of trichostatin A on apoptosis of colon carcinoma cells and expression of HIF-1α under hypoxia *in vitro*

SHI Xiao-xing¹, WANG Jian-jun², GAO Feng^{1*} (1. Central Laboratory, the Sixth People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China; 2. Department of Tumor, the Sixth People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the influence of trichostatin A (TSA) on the apoptosis of colonic cancer cell line HT-29 cells and expression of HIF-1α in HT-29 cells under hypoxia *in vitro*. **Methods:** HT-29 cells were treated with TSA(100, 200, 400, 600, 800 nmol/L for 12, 24, 48, and 72 h. Cells in the control group were treated with the same volume of DMSO. MTT assay was used to investigate the survival of cells in each group. Annexin V and TUNEL were used to determine the apoptosis rate of HT-29 cells. RT-PCR and Western blotting were used to study the expression of HIF-1α mRNA and protein under hypoxia (37℃, 1% O₂). **Results:** MTT assay demonstrated that cell viability decreased significantly in TSA-treated group compared to control group($P<0.05$), and the inhibitory effect of TSA was in a dose- and time-dependent manner. Annexin V and TUNEL showed that TSA induced early apoptosis of HI-29 cells; the apoptosis rates in TSA treatment groups (200, 400, 600, and 800 nmol/L) were significantly higher than that of control group($P<0.05$). TSA suppressed protein expression of HIF-1α under hypoxia in a dose-dependent manner but had no influence on mRNA expression of HIF-1α. **Conclusion:** TSA can induce apoptosis of HI-29 cells and inhibit their proliferation through suppressing expression of HIF-1α at protein level under hypoxia condition.

[KEY WORDS] trichostatin A; colonic neoplasms; hypoxia-inducible factor-1α ; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(6):612-615]

组蛋白被修饰后所引起的染色质结构的改变, 在真核生物基因表达调控中起重要作用。这些修饰包括 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化以及染色质高级结构中其他成分的修饰, 这些修饰可以改变染色质的构型, 导致基因转录调节失衡, 从而导致细胞增殖失常而致癌^[1]。而这些可逆失活基因的重新表达可以抑制肿瘤的生长。目前发现特异性的组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC) 抑制剂, 可以

逆转这些失活的基因。曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)是特异性的 HDAC 抑制剂, 在体内外均具有强烈的抗肿瘤活性作用^[2-3], 已进入临床试验, 但其抗肿瘤活性的具体机制尚未明了。本研究通过观察 TSA 对结肠癌 HT-29 细胞增殖凋亡的影响, 以

[作者简介] 石晓星, 硕士生. E-mail: stonestar99@sina.com
* Corresponding author. E-mail: gaofengc@online.sh.cn

及对低氧状态下 HT-29 细胞缺氧诱导因子(HIF) 1 α 表达的影响,进一步探讨 TSA 的抗肿瘤作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂 TSA 购自 Sigma 公司,溶解于二甲基亚砜溶液(DMSO)中制成 3 mmol/L 浓度 TSA 溶液,保存于-80℃中备用;Annexin V 凋亡试剂盒购自上海博鑫公司;TUNEL 凋亡试剂盒购自罗氏公司;兔抗人 HIF-1 α 67 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;RT-PCR 相关试剂购自 Promega 公司,引物由上海申能博彩公司合成。

1.2 细胞培养 结肠癌 HT-29 细胞来源于中科院上海细胞研究所。将冻存的结肠癌 HT-29 细胞迅速置于 37℃水浴中,使其完全溶解,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤 2 次,用含 10%胎牛血清(加热灭活)的 DMEM 培养液重悬,放置在 37℃、5%CO₂细胞孵化箱中培养。细胞传代,80%贴壁细胞用于实验。低氧细胞培养是将细胞放置在 37℃、1%O₂细胞孵化箱中培养。

1.3 HT-29 细胞的处理 待细胞生长至对数期,弃去原培养液,加入新的培养液,同时加入 TSA,调整至不同的工作浓度,轻晃混匀。对照组加入同等体积的 DMSO 作对照。放入培养箱中继续培养不同时间,取出待测。

1.4 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活力 细胞生长至对数生长期后,96 孔板每孔接种 2×10^4 个细胞,不接种细胞的设为空白对照。培养 24 h 后,每孔加入不同浓度 TSA (0、100、200、400、600、800 nmol/L),对照孔加入等量 DMSO。继续培养 12、24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 20 μ l (5 mg/ml),继续培养 4 h,弃上清,每孔加入纯的 DMSO 液 100 μ l,振荡混匀 5 min。在酶标仪上测各孔 490 nm 波长下的光密度值(D_{490})。实验组按下列公式计算细胞活力,细胞活力=(实验组 D 值-空白对照组 D 值)/(对照组 D 值-空白对照组 D 值) $\times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术检测凋亡率 按 Annexin V 试剂盒说明操作进行。收集 3×10^5 个细胞,离心,去上清,PBS 液洗涤 1 次,加入 1 $\times$ 结合溶液 100 μ l,重悬。置于冰上操作。再加入 5 μ l Annexin V 和 5 μ l 碘化丙啶(PI,250 μ g/ml),避光 15 min,再加入 1 $\times$ 结合溶液 100 μ l,上机检测。

1.6 TUNEL 法检测细胞凋亡 载玻片放入培养板孔中,加入培养液及接种 3×10^4 个细胞,培养 48 h;更换培养液后加入 TSA,继续培养 24 h;去除培

养液,PBS 冲洗载玻片 3 遍,乙醇梯度脱水,4%的多聚甲醛固定,-20℃保存备检。TUNEL 检测按试剂盒说明书操作。

1.7 RT-PCR 检测低氧状态下 HIF-1 α mRNA 表达 2×10^5 个细胞在低氧培育箱培养至对数生长期,加入 TSA 300 nmol/L 继续培养 24 h,收集细胞。细胞总 RNA 提取按 TRIzol(Invitrogen)说明书进行。HIF-1 α 的引物自行设计,由上海申能博彩公司合成。HIF-1 α 引物序列:上游 5'-GAA CCT GAT GCT TTA ACT-3',下游 5'-CAA CTG ATC GAA GGA ACG-3',扩增片段 564 bp。以 GAPDH 为内参,上游 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3',下游 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3',扩增片段 258 bp。PCR 扩增条件:94℃预变性 3 min,变性 94℃ 50 s、退火 57℃ 50 s、延伸 72℃ 1 min 共进行 30 个循环。用 1%的琼脂糖胶,每孔点样 10 μ l,60 V,电泳。用数码凝胶图像分析系统作条带密度扫描,Genesnap SynGene 软件分析。计算目的基因的光密度值(D 值)。

1.8 Western 印迹法检测低氧状态下 HIF-1 α 蛋白表达 2×10^6 个细胞经 TSA 处理后,弃培养液,用温 PBS 冲洗 2~3 遍;加入适量的冰预冷的裂解液后置于冰上 10~20 min;用细胞刮刮下细胞,收集在 EP 管内,12 000 $\times g$ 离心,4℃ 2 min;取上清核蛋白液,移入另一离心管中,调整蛋白质浓度,行 Western 印迹检测,电泳,转膜,加入一抗 HIF-1 α 67(1:500),二抗。以 α -tubulin 为内参。经化学发光法,X 线曝光显影,软件进行扫描定量。

1.9 统计学处理 采用统计软件 SPSS 11.5 进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 TSA 抑制 HT-29 肿瘤细胞的增殖 不同浓度 TSA 处理后的细胞,细胞活力随浓度增加逐渐降低,与对照组相比,差异具有显著意义($P < 0.05$)。TSA 明显抑制 HT-29 细胞的增殖,并呈一定的浓度及时间依赖性(图 1)。

2.2 TSA 诱导 HT-29 细胞的凋亡 流式细胞术结果显示,不同浓度 TSA(0、100、200、400、600、800 nmol/L)作用于 HT-29 细胞 24 h 后,细胞的平均凋亡率分别为(2.65 $\pm$ 1.23)%、(9.60 $\pm$ 1.78)%、(14.40 $\pm$ 2.33)%、(22.05 $\pm$ 1.63)%、(32.40 $\pm$ 2.47)%、(62.15 $\pm$ 2.72)%。200、400、600、800 nmol/L TSA 处理组凋亡率明显高于对照组($P < 0.05$)。

TUNEL 结果显示,不同浓度 TSA(0、100、200、400、600、800 nmol/L)作用于 HT-29 细胞 24 h 后,对照组未见凋亡细胞(图 2A),TSA 处理后见凋亡细胞,呈棕色(图 2B)。凋亡率随浓度的增加而逐渐增加(结果未给出)。

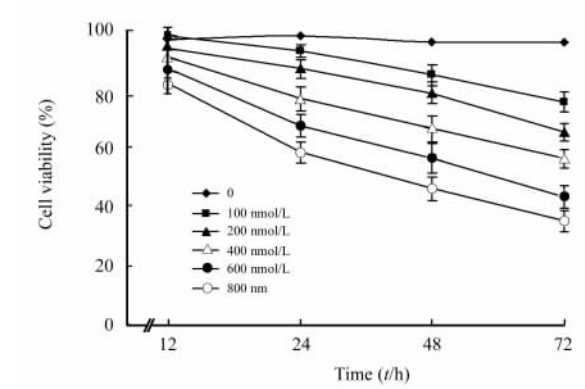


图 1 TSA 对 HT-29 细胞增殖影响的量效和时效关系
Fig 1 Inhibitory effect of TSA on HT-29 cell proliferation in a dose- and time-dependent manner

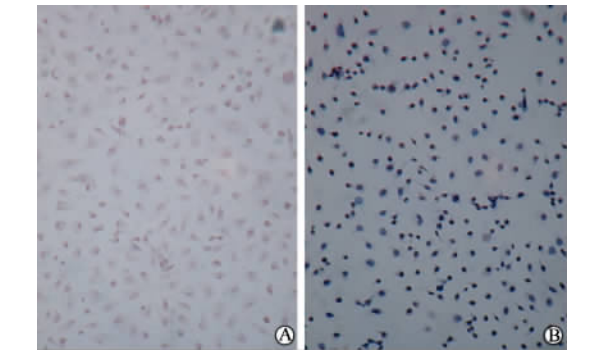


图 2 TSA 对细胞凋亡的影响
Fig 2 Effect of TSA on cell apoptosis (TUNEL method, $\times 40$)
A: Control group (DMSO) had no apoptosis cell; B: TSA (600 nmol/L) treated cells showed apoptotic signals after 24 h(brown signal)

2.3 TSA 对低氧状态下 HT-29 细胞 HIF-1 α mRNA 表达的影响 低氧条件下,与对照组相比,不同浓度 TSA 处理后 HT-29 细胞 HIF-1 α mRNA 的表达无明显变化,各浓度间也无显著差异(图 3)。这提示 TSA 对体外低氧状态下 HT-29 细胞 HIF-1 α mRNA 的表达无明显影响。

2.4 TSA 对低氧状态下 HT-29 细胞 HIF-1 α 蛋白表达的影响 低氧条件下,HT-29 细胞 HIF-1 α 的蛋白表达明显增加(图略);不同浓度的 TSA 处理 24 h 后,HT-29 细胞 HIF-1 α 蛋白的表达随 TSA 浓度的增加而逐渐降低(图 4)。

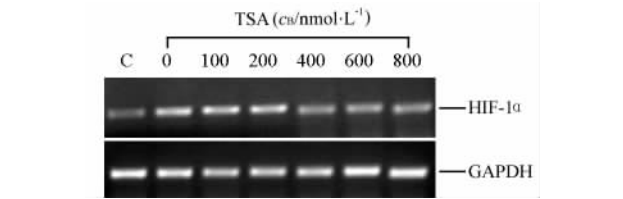


图 3 低氧条件下 HT-29 细胞 HIF-1 α mRNA 的表达
Fig 3 Expression of HIF-1 α mRNA in HT-29 cells under hypoxia

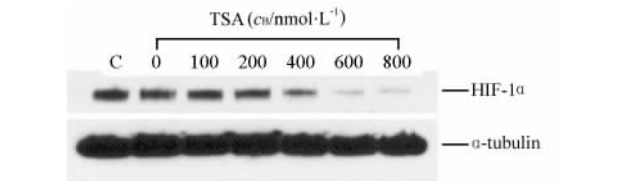


图 4 低氧条件下 HT-29 细胞 HIF-1 α 的蛋白表达
Fig 4 Expression of HIF-1 α protein in HT-29 cells under hypoxia

3 讨 论

肿瘤发生的一个重要原因是细胞增殖和分化失常;HDAC 被认为与染色质紧密及肿瘤发生有关。组蛋白乙酰化修饰可改变染色质的构型,从而影响基因转录。乙酰化状态受组蛋白乙酰化酶(histoneacetylase, HAT) 和 HDAC 动态平衡的调节,一旦失衡会成为一些肿瘤发生的直接诱因。TSA 是氧肟酸类化合物,能在纳摩尔的浓度下特异性抑制组蛋白去乙酰化酶,是目前国际上公认的研究乙酰化对细胞影响的可靠试剂。TSA 能使组蛋白恢复乙酰化状态,染色质变疏松^[4]。

本研究显示,TSA 能显著抑制 HT-29 细胞的增殖,其增殖抑制作用呈时效、量效关系。TUNEL 法凋亡检出率较高,但特异性较差,不能区分凋亡和死亡细胞;而 Annexin V 结合 PI 染色法特异性较高,能区分凋亡和死亡细胞,检测早期凋亡优于 TUNEL 法。二者结合能较好地反映细胞凋亡的变化。本研究结果发现,TSA 能明显抑制 HT-29 细胞的凋亡,细胞生长的抑制部分是通过介导细胞早期凋亡来实现的,其凋亡诱导也呈一定的浓度依赖性。

低氧是许多实体瘤的共同特征。肿瘤缺氧与瘤细胞增殖、恶性侵袭以及对放疗、化疗的抵抗密切相关。肿瘤微环境的低氧(hypoxia)足以激活依赖 HIF-1 α 的靶基因的表达,上调涉及糖代谢、血管生

成、细胞生存和促红素生成等相关因子^[6]。HIF-1 是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物体内的一种氧调节转录因子,由 α 和 β 两个亚单位组成。HIF-1 α 是惟一的 O₂ 调节亚单位,决定 HIF-1 的活性,在正常氧状态下检测不到,低氧条件下其蛋白质稳定而具有活性。HIF-1 α 可调节多种靶基因如血管内皮生长因子(VEGF)、红细胞生成素(EPO)、葡萄糖载体蛋白 1,3(GLUT-1, GLUT-3) 和糖酵解酶等的表达,在维持肿瘤细胞的能量代谢、新生血管形成以及促进肿瘤增殖和转移中起重要作用^[7-8]。本研究发现,低氧对 HIF-1 α 的 mRNA 水平无影响,但使蛋白表达明显增加,提示低氧下 HIF-1 α 的转录调控在蛋白质水平,与多数学者的观点一致。而 TSA 在低氧条件下抑制 HIF-1 α 的表达也在蛋白水平。Kim 等^[9]认为, HIF-1 α 的过表达与 p53、VHL 等肿瘤抑制基因的突变密切相关, TSA 可以上调 p53 和 VHL 的表达,从而下调 HIF-1 α 及其靶基因的表达,在体内外均可抑制肿瘤的生长。因此,可以认为 TSA 的抗肿瘤机制与 HIF-1 α 靶点有关,可能通过抑制 HIF-1 α 的蛋白表达,从而抑制肿瘤血管的生成及糖酵解,发挥其抗肿瘤活性。TSA 可作为一种通过 HIF-1 α 靶点发挥效应的新型抗肿瘤药物。

[参 考 文 献]

[1] Kim M S, Blake M, Baek J H, et al. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting

DNA[J]. Cancer Res,2003,63: 7291-7300.
[2] Donadelli M, Costanzo C, Faggioli L, et al. Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells[J]. Mol Carcinog, 2003,38: 59-69.
[3] Chiba T, Yokosuka O, Fukai K, et al. Cell growth inhibition and gene expression induced by the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, on human hepatoma cells[J]. Oncology, 2004,66: 481-491.
[4] Yoshida M, Furumai R, Nishiyama M, et al. Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy[J]. Cancer Chemother Pharmacol,2001,48 (Suppl 1): S20-S26.
[5] Roh M S, Kim C W, Park B S, et al. Mechanism of histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induced apoptosis in human osteosarcoma cells[J]. Apoptosis,2004,9: 583-589.
[6] Lee J W, Bae S H, Jeong J W, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions[J]. Exp Mol Med,2004,36: 1-12.
[7] Hess-Stumpp H. Histone deacetylase inhibitors and cancer: from cell biology to the clinic[J]. Eur J Cell Biol,2005,84(2-3): 109-121.
[8] Karhausen J, Kong T, Narravula S, et al. Induction of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by late hypoxia limits HIF-1 expression[J]. J Cell Biochem,2005,95: 1264-1275.
[9] Kim M S, Kwon H J, Lee Y M, et al. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes[J]. Nat Med, 2001,7: 437-443.

[收稿日期] 2007-01-09 [修回日期] 2007-04-02

[本文编辑] 贾泽军

中华临床医师杂志(电子版)征稿启事

中华临床医师杂志(电子版)是新闻出版总署“十一五”国家重点出版规划立项的电子出版物之一(新出音[2006]817号),由中华人民共和国卫生部主管,中华医学会主办,中华医学电子音像出版社出版(新出音[2007]74号),面向国内外公开发行。

中华临床医师杂志(电子版)以 CD-ROM 光盘附导读形式出版,具有形式新颖、报道信息容量大的特点。本刊不仅可以传递文字信息和图形信息,还可以传递视频课件,具有很强的互动性。主要栏目有:述评、临床研究、实验研究、短篇论著、综述、专家讲座(视频形式)、临床经验、病例报告、疑难病例分析、会议报道和继续医学教育课堂等。

著名医学专家郭应禄院士、谌贻璞教授担任本刊总编,与全国八十余位各医学学科的知名专家组成了期刊编委会。在编委会的集体领导下,本刊将以科学的流程,给予作者投稿及时处理,分科送审,快速回复,在最短时间内将专家意见反馈给作者,信守科研、编辑道德,以使作者的科研成果、临床经验第一时间得以传播,同时为读者提供最新的医学信息,从中获得科研实践的借鉴。

欢迎医学界同行积极投稿并订阅杂志。

本刊网址:www.clinicmed.net & www.clinicmed.cn

投稿订阅信箱:北京市 100035-50 信箱《中华临床医师杂志(电子版)》编辑部收 邮编:100035

电话:010-62219211 传真:010-62234701 投稿专用电子信箱:Lcdactor@163.com