

曲古霉素 A 体外诱导膀胱癌细胞凋亡及细胞周期阻滞的机制探讨

曲 巍¹, 王立明^{1*}, 朱有华¹, 付莉莉², 华振浩²

(1. 第二军医大学长征医院肾移植科, 上海 200003; 2. 长征医院肾内科, 解放军肾脏病研究所, 上海 200003)

[摘要] **目的:**观察组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂曲古霉素 A(TSA)对体外培养膀胱癌细胞生长情况及相关基因表达的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法:**MTT 法检测不同浓度(0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μmol/L)的 TSA 对人膀胱癌 T24 细胞生长的影响。透射电镜观察 TSA(0.4 μmol/L) 诱导后膀胱癌细胞的形态学变化;流式细胞术检测处理后膀胱癌细胞周期分布及凋亡率的变化;Western 印迹法检测处理后膀胱癌细胞组蛋白乙酰化水平的变化;FQ-PCR 检测处理后膀胱癌细胞 p21^{CIP1/WAF1}、cyclin A 和 cyclin E mRNA 的表达。**结果:**TSA 体外能明显抑制 T24 细胞生长,且抑制作用呈明显的剂量、时间依赖性。TSA(0.4 μmol/L)诱导后,透射电镜下可见大量具有凋亡形态特征的 T24 细胞;流式细胞术检测示细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,并且出现典型的亚二倍体(Sub-G₁)峰;TSA 可明显提高组蛋白乙酰化水平,并诱导 p21^{CIP1/WAF1} 的 mRNA 表达和抑制 cyclin A 的 mRNA 表达,而对 cyclin E 无明显作用。**结论:**TSA 可通过诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞而发挥体外抗膀胱癌作用,其作用机制可能涉及组蛋白乙酰化水平以及相关基因(p21^{CIP1/WAF1}、cyclin A)表达的调控。

[关键词] 膀胱肿瘤;组蛋白脱乙酰基酶类;酶抑制剂;曲古霉素 A;细胞周期;细胞凋亡

[中图分类号] R 737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0272-05

Trichostatin A inducing apoptosis and cell cycle arrest of bladder cancer cells: the *in vitro* mechanism

QU Wei¹, WANG Li-ming^{1*}, ZHU You-hua¹, FU Li-li², HUA Zhen-hao² (1. Department of Kidney Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, PLA Institute of Nephrology, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the influence of trichostatin A (TSA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, on the growth of human bladder cancer cells and on the expression of related genes, and to explore the mechanism involved. **Methods:** MTT assay was employed to evaluate the inhibitory effect of TSA(0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 μmol/L) on growth of human T24 bladder cancer cells. The morphological changes of T24 cells were observed by transmission electron microscope after treated with 0.4 μmol/L TSA; the cell cycle distribution and apoptotic ratio were determined by flow cytometry. The acetyl level of histone after TSA treatment was detected by Western blot; the mRNA expression of p21^{CIP1/WAF1}, cyclin A, and cyclin E was measured by FQ-PCR. **Results:** MTT assay revealed TSA inhibited the growth of T24 cells in a concentration- and time-dependent manner. Typical morphological changes of apoptotic cells were observed by electron microscope after treatment with 0.4 μmol/L TSA. Flow cytometry showed that the cells were blocked at G₀/G₁ phase and typical Sub-G₁ peak appeared. TSA obviously promoted the acetyl level of histone, induced expression of p21^{CIP1/WAF1} mRNA, and inhibited expression of cyclin A, but had no obvious influence on expression of cyclin E. **Conclusion:** TSA can inhibit bladder cancer cells through inducing cell apoptosis and cell cycle arrest *in vitro*, which might be related to the acetyl level of histone and the expression of p21^{CIP1/WAF1} and cyclin A.

[KEY WORDS] bladder neoplasms; histone deacetylases; enzyme inhibitors; trichostatin A; cell cycle; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 272-276]

染色质的结构改变是真核细胞基因表达调控的一个重要机制,核小体 DNA 序列的完整组装以及染色质序列的高度有序确保了基因转录的正常进行,当核小体组蛋白乙酰化水平发生变化时可影响特定转录因子的活性,从而调节相关基因的转录与表达^[1]。正常细胞中组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyl transferase, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)的活性处于平衡状态,调节组蛋白的乙酰化水平,保证相应基因正常表达。已有研究^[2]证实 HDACs 的活性改变与肿瘤形

成相关。HDAC 抑制剂是一类通过抑制 HDACs 活性而改变染色质结构在转录水平对基因表达进行调控的化合物。曲古霉素 A (trichostatin A, TSA) 是由抗真菌药物衍生而来的一种 HDACs 活性的强效

[基金项目] 上海市科技发展基金(03ZR14118)。Supported by the Fund for Science and Technology Development of Shanghai (03ZR14118).

[作者简介] 曲 巍, 博士生, 主治医师。

E-mail: quvei@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: wt2530@yahoo.com.cn

非竞争性抑制剂,对血液系统肿瘤和实质性肿瘤均有较强的抑制作用^[3],但具体机制还不很清楚。本研究观察 TSA 对体外培养的膀胱癌细胞生长情况及其相关基因表达的影响,探讨其作用于肿瘤细胞的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和药物 TSA 为德国 Merck 公司产品,用二甲亚砜(DMSO)溶解后贮存浓度为 1 mg/ml,实验时 DMSO 在培养液中的浓度控制在 0.1% 以内。乙酰化组蛋白 H3(Ac-H3)小鼠抗人单克隆抗体为 Cell signaling 公司产品,GAPDH 单克隆抗体为上海康成生物公司产品。PCR 引物由上海复旦悦达生物公司合成。

1.2 细胞株及培养条件 T24 人膀胱癌细胞系由中国科学院上海生物细胞研究所提供,在含 10% 小牛血清、双抗(青霉素、链霉素各 100 IU/100 ml)的 DMEM 培养液中培养,在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下生长传代,实验时取对数生长期的细胞。

1.3 MTT 法计算 TSA 作用后 T24 细胞的生长抑制率 将 T24 细胞密度调至 4×10⁴/ml,每孔 100 μl 接种于 96 孔培养板内,继续培养 24 h,观察细胞贴壁且生长良好后,加入浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μmol/L 的 TSA 作为实验组,另以非药物处理组作为阴性对照,DMEM 培养液不加细胞作为空白对照,各设 5 个复孔。分别继续培养 12、24、48、72 h,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 10 μl,再培养 4 h,吸弃孔内培养液,每孔加 100 μl DMSO,酶标仪测定 492 nm 波长处光密度值(D₄₉₂),以空白对照调零。肿瘤细胞生长抑制率(%)=(1-实验组光密度值/对照组光密度值)×100%。以作用时间为横坐标,以抑制率为纵坐标绘制肿瘤生长抑制曲线。

1.4 透射电镜观察 TSA 作用后细胞的形态学变化 根据 MTT 实验结果,取接近于 IC₅₀ 值的 0.4

μmol/L 的 TSA 作用于细胞。将 T24 细胞以 1×10⁶/孔接种于 10 cm 培养皿,观察细胞贴壁且生长良好后,以加入 TSA 者作为实验组,以非药物处理组作为对照,继续培养 48 h 后收获细胞,PBS 洗涤后用 2.5% 戊二醛前固定,2% 的锇酸后固定,然后经包埋、超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后,送 H-800 透射电镜观察并拍照。

1.5 流式细胞仪(FCM)检测 TSA 作用后 T24 细胞周期的变化 取对数生长期细胞按 2×10⁵/孔的密度接种于 6 孔板,给予 0.4 μmol/L 的 TSA 分别处理 6、12、24、36、48 h,每个时间点设 3 个复孔,非药物处理组作为对照,同期培养并同期收集细胞,PBS 洗涤 2 次,70% 的预冷乙醇固定,4℃ 过夜后,再用 PBS 洗 2 次,RNA 酶消化,碘化丙啶(PI)染色后,用 FACSCalibur 流式细胞仪检测,分析细胞周期的变化。

1.6 Western 印迹法检测 TSA 作用后细胞核蛋白乙酰化水平 细胞培养和处理同前,细胞核蛋白的提取方法参考文献^[4],并采用 BCA 法进行蛋白定量,分装后-20℃ 冻存。取 20 μg 细胞核蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,积层胶的浓度 5%,分离胶的浓度 12%),电转 2 h 至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入小鼠抗人 Ac-H3 单抗(1:500),4℃ 孵育过夜,洗膜,加入 HRP 羊抗小鼠二抗(1:2 000),室温轻摇 2 h,洗膜,加入 ECL 反应液,暗室显影、定影后,将胶片扫描。在同一张膜上测定 GAPDH 蛋白表达作为参照。

1.7 FQ-PCR 检测 TSA 作用后细胞 p21^{CIP1/WAF1}、cyclin A 和 cyclin E 的 mRNA 表达 细胞培养和处理同前,TRIzol 法抽提细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,在 7700 型实时荧光定量 PCR 仪上进行 DNA 扩增和分析,反应中的引物序列见表 1。每份标本均以 GAPDH 为内参照,实时检测荧光强度的变化,定量扩增完毕后得到各样本的拷贝值。

表 1 FQ-PCR 引物序列

Tab 1 FQ-PCR primer set

Primer	Primer set	Segment length(bp)
p21 ^{CIP1/WAF1}	F: 5'-TGG GGA TGT CCG TCA GAA C-3' R: 5'-CTC CAG TGG TGT CTC GGT GA-3'	166
Cyclin A	F: 5'-GAT GAG CAT GTC ACC GTT CC-3' R: 5'-CCA TTG GAT AAT CAA GAG GGA C-3'	202
Cyclin E	F: 5'-CTG GAT GTT GAC TGC CTT GA-3' R: 5'-GTG GGT CTG TAT GTT GTG TGC-3'	231
GAPDH	F: 5'-AAG GTC GGA GTC AAC GGA TT-3' R: 5'-CTG GAA GAT GGT GAT GGG ATT-3'	222

1.8 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 TSA 显著抑制 T24 细胞的生长 MTT 检测结果显示,TSA 对 T24 细胞的生长抑制率随作用浓度和时间的增加而明显上升(图 1)。

2.2 TSA 作用后细胞超微结构的变化 透射电镜观察到,对照组 T24 细胞多具有典型的生长良好的肿瘤细胞特征,外形不规则,核大,圆形或椭圆形,核质比例高,核仁大,染色质均匀;实验组细胞出现典型的细胞凋亡的形态学特征,微绒毛消失,胞质凝缩,内质网变疏松形成一个个空泡,线粒体嵴消失,细胞核内的染色质逐渐凝聚成块状附在核膜周边,部分断裂成碎块,细胞膜多保持完整,胞质丢失过多者可形成裸核,并有膜包裹细胞器的凋亡小体(图 2)。

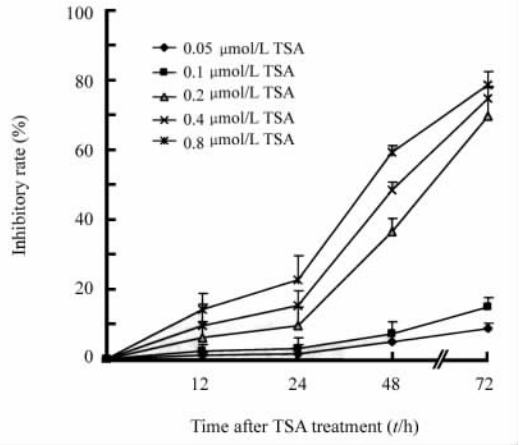


图 1 不同浓度 TSA 对 T24 细胞的生长抑制作用

Fig 1 Growth inhibition of T24 cells by different concentrations of TSA
 $n=5, \bar{x} \pm s$

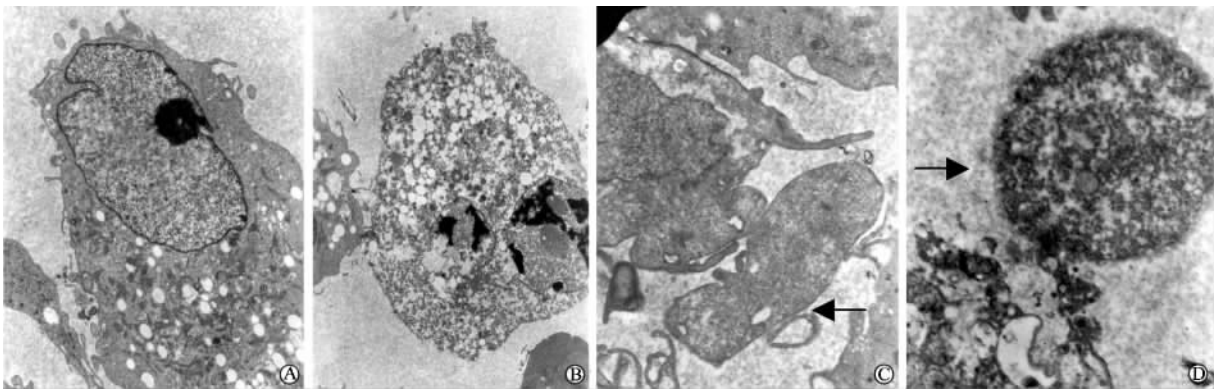


图 2 TSA 作用后 T24 细胞透射电镜观察结果

Fig 2 Apoptosis of T24 cells induced by TSA under transmission electron microscope(A, B: $\times 5000$; C, D: $\times 10000$)

A: Control group; normal cells; B: TSA-treated group; chromatin assembled to margin; endoplasm net swollen and vacuolated; C: TSA-treated group; apoptotic body(packing organelles) shedded from the nucleus(indicated by arrow); D: TSA-treated group; cytoplasm shedded and nucleolus became naked (indicated by arrow)

2.3 TSA 诱导细胞周期阻滞 FCM 检测结果显示,0.4 μmol/L 的 TSA 作用于细胞后,细胞周期和细胞凋亡率的变化如图 3 所示,具体表现为,随作用时间的延长 G_0/G_1 期细胞的比例逐渐增加,S 期细胞的比例逐渐减少,作用 24 h 后出现典型的亚二倍体(Sub- G_1)峰。

2.4 TSA 引起 T24 细胞组蛋白 H3 的乙酰化改变 在 0.4 μmol/L 的 TSA 作用下,组蛋白 H3 的乙酰化水平随之增加;作用 6 h 时组蛋白 H3 的乙酰化水平即比非药物处理组明显增加,作用 24 h 时的乙酰化水平达最高,以后乙酰化水平逐渐降低,但仍明显高于对照组(图 4)。

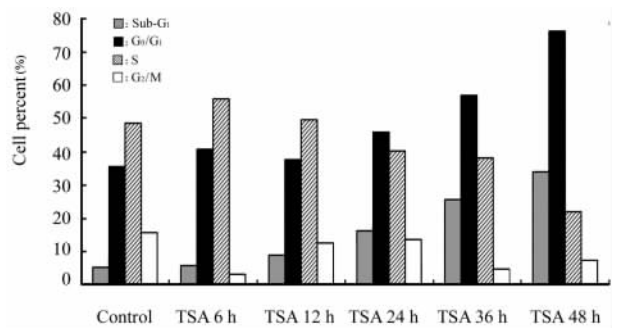


图 3 TSA 对肿瘤细胞细胞周期的影响

Fig 3 Influence of TSA on cell cycle

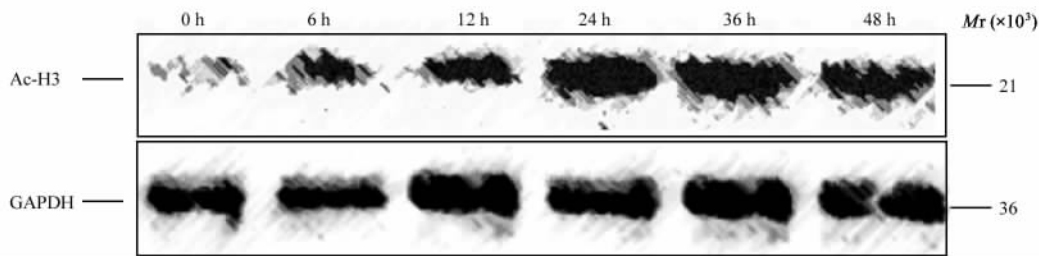


图4 Western印迹法检测TSA对组蛋白H3乙酰化水平的影响

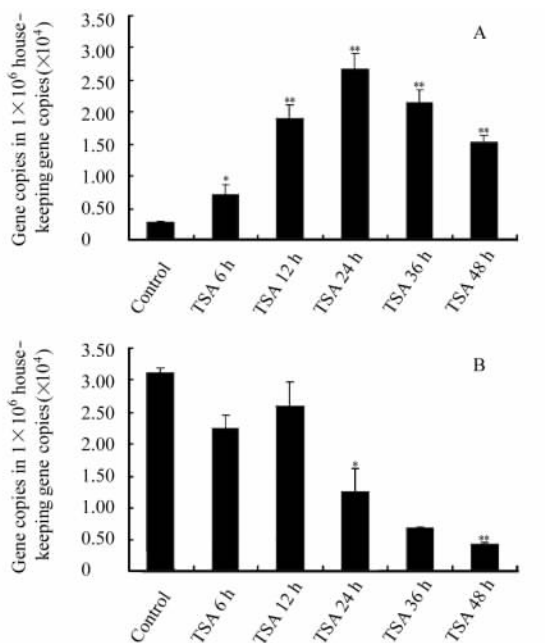
Fig 4 Influence of TSA on acetyl level of histone H3 detected by Western blot

2.5 TSA对细胞 p21^{CIP1/WAF1}、cyclin A及 cyclin E mRNA 表达的影响 与对照组相比,0.4 μmol/L的TSA处理组T24细胞 p21^{CIP1/WAF1}的mRNA水平在6 h时即明显增加($P < 0.05$);12 h明显升高,24 h时达最高,其mRNA水平是对照组的近10倍,36 h后略有降低,但仍明显高于对照组(P 均 < 0.01)。与对照组相比,cyclin A的mRNA水平在TSA作用24 h后开始出现明显减弱($P < 0.05$),至48 h时出现更显著的减弱,与对照组相比降低了超过6倍($P < 0.01$)。而cyclin E的mRNA水平在各时间段均无显著性变化(图5)。

3 讨论

HDAC抑制剂作为新一代的抗肿瘤药物,其对膀胱癌细胞的生长抑制作用已有报道^[5-6],而其作用机制有待深入研究。本研究也证实了HDAC抑制剂TSA在较低浓度下即对T24膀胱癌细胞有明显的生长抑制作用,并对其作用机制从细胞凋亡和细胞周期角度进行分析。FCM检测显示TSA可阻断T24细胞的细胞周期进程,使细胞停滞于G₀/G₁期。为阐明TSA诱导G₁期细胞周期阻滞的机制,本研究中检测了其涉及细胞周期调控的几个关键基因的影响。p21^{CIP1/WAF1}作为细胞增殖的重要调节因子,是细胞周期内通用性抑制物,可通过非磷酸化途径与多种CDK/cyclins复合体结合,调控细胞周期进程。p21^{CIP1/WAF1}的缺失或低表达将导致细胞周期检查点失控,肿瘤细胞无限增殖,而过表达则能够抑制肿瘤生长。现认为p21^{CIP1/WAF1}在肿瘤细胞中的沉默机制可能由其染色质的表观遗传修饰所致,其表达可被组蛋白的乙酰化水平所调节^[7]。本实验研究了HDAC抑制剂TSA对T24细胞组蛋白H3乙酰化水平的影响及组蛋白乙酰化改变后p21^{CIP1/WAF1}基因表达的情况。结果发现,组蛋白H3的乙酰化水平的增加与p21^{CIP1/WAF1}mRNA水平的升高相一致,作用6 h见上升,24 h达高峰。已有研究^[8]证明,HDAC抑制剂诱导的组蛋白乙酰化可位于p21^{CIP1/WAF1}基因启动子区域。这说明TSA诱导的p21^{CIP1/WAF1}表达与细胞内的组蛋白乙酰化水平的提高有关,p21^{CIP1/WAF1}可能是TSA的直接靶点。

虽然p21^{CIP1/WAF1}在G₀/G₁细胞周期阻滞中起重要作用,但相关研究^[9]表明,p21^{CIP1/WAF1}并不是G₀/G₁期阻滞的惟一决定因素。很多研究显示HDACI

图5 FQ-PCR检测TSA作用后T24细胞中p21^{CIP1/WAF1}(A)、cyclin A(B)的mRNA水平的变化Fig 5 mRNA levels of p21^{CIP1/WAF1}(A) and cyclin A(B) in T24 cells as detected by FQ-PCR

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

诱导的细胞周期阻滞还与细胞周期素的表达改变有关,并导致细胞周期依赖性激酶活性的改变。cyclin A 和 cyclin E 是细胞由 G₁ 期进入 S 期的限速因素^[10]。本研究显示 cyclin A 的 mRNA 表达在 TSA 处理后的细胞中明显降低,并与细胞周期阻滞的程度相一致,而 cyclin E 的表达无显著改变。cyclin A 的表达下调有可能是 TSA 调节组蛋白乙酰化水平的直接结果,也可能是 TSA 的间接作用结果,因为 HDAC 抑制剂可活化 RB,RB 活化后可抑制大量的转录因子(包括 E2F),而 E2F 是细胞周期进展基因表达所必需的^[11],从而使 cyclin A 的表达受抑制。所以说,cyclin A 的表达下降和 p21^{CIP1/WAF1} 的表达上调共同导致细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,这一结论同时也验证 HDAC 可影响多个调控基因共同调控细胞周期进程。

实验中还发现 TSA 在引起细胞周期阻滞的同时,引起大量细胞凋亡。细胞凋亡是区别于细胞坏死的一种由内在基因精确调节的程序化死亡形式,诱导肿瘤细胞凋亡已成为公认的有效治疗肿瘤的方法。本实验用透射电子显微镜观察到,0.4 μmol/L 的 TSA 可诱导 T24 细胞出现凋亡的形态学特征性改变,并且随作用时间的延长,细胞凋亡率呈增多趋势。实验中未验证出这一凋亡的周期时相性,因为细胞并不是先经历生长阻滞随后在某一期发生大量凋亡,细胞有可能在经历凋亡前无细胞周期的明显变化。目前对 HDAC 抑制剂所诱导的凋亡是否为周期时相特异性尚无定论,但凋亡与细胞周期进程的改变是直接相关的^[3],并有待进一步探讨。

本研究表明,TSA 在较低剂量下对膀胱癌 T24 细胞即有明显的生长抑制作用,并且可能通过诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞而发挥体外抗膀胱癌作用,其作用机制涉及组蛋白乙酰化水平以及 p21^{CIP1/WAF1} 和 cyclin A 表达的调控。这些均为进一步揭示 HDAC 抑制剂的抗肿瘤机制提供了可靠的实验依据。

[参考文献]

- [1] Monneret C. Histone deacetylase inhibitors[J]. Eur J Med Chem, 2005,40: 1-13.
- [2] Kristeleit R,Stimson L, Workman P, et al. Histone modification enzymes: novel targets for cancer drugs[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2004,9: 135-154.
- [3] Minucci S, Pelicci P G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer[J]. Nat Rev Cancer,2006,6: 38-51.
- [4] Takai N,Ueda T, Nishida M, et al. A novel histone deacetylase inhibitor, Scriptaid, induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer and ovarian cancer cells[J]. Int J Mol Med, 2006, 17: 323-329.
- [5] Canes D,Chiang G J, Billmeyer B R, et al. Histone deacetylase inhibitors upregulate plakoglobin expression in bladder carcinoma cells and display antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*[J]. Int J Cancer,2005,113: 841-848.
- [6] Li G C,Zhang X, Pan T J, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A inhibits the growth of bladder cancer cells through induction of p21^{WAF1} and G₁ cell cycle arrest[J]. Int J Urol, 2006, 13: 581-586.
- [7] Fang J Y,Chen Y X, Lu J, et al. Epigenetic modification regulates both expression of tumor-associated genes and cell cycle progressing in human colon cancer cell lines: Colo-320 and SW1116[J]. Cell Res,2004,14: 217-226.
- [8] Gui C Y,Ngo L, Xu W S, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21^{WAF1} involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004,101: 1241-1246.
- [9] Kim Y B, Ki S W, Yoshida M, et al. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells[J]. J Antibiot (Tokyo),2000,53: 1191-1200.
- [10] Kaldis P, Aleem E. Cell cycle sibling rivalry: Cdc2 *vs.* Cdk2[J]. Cell Cycle,2005,4: 1491 - 1494.
- [11] Abramova M V,Pospelova T V, Nikulenkov F P, et al. G1/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of beta-catenin [J]. J Biol Chem,2006,281: 21040-21051.

[收稿日期] 2006-11-02

[修回日期] 2007-02-05

[本文编辑] 贾泽军