

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00714

· 论 著 ·

乙酰化酶抑制剂 Garcinol 对雌激素促乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的作用与机制

叶霞, 邓华瑜*, 张力, 赵敬, 袁磊

重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室, 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

[摘要] **目的** 研究乙酰化酶抑制剂 Garcinol 对雌激素促乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、细胞周期转化及凋亡抑制的影响及机制。**方法** 应用 CCK-8 法检测 Garcinol 对 17β -雌二醇(17β -E₂)促 MCF-7 细胞增殖的影响;流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况;细胞免疫荧光检测 NF- κ B/p65 核转运情况;RT-PCR 检测 *cyclin D1*、*Bcl-2*、*Bcl-x_L* mRNA 水平;蛋白质印迹分析检测乙酰化(ac)-H3、ac-H4、NF- κ B/ac-p65、*cyclin D1*、*Bcl-2*、*Bcl-x_L* 蛋白的表达水平。**结果** Garcinol 能抑制 17β -E₂ 促细胞增殖作用,使细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期,细胞凋亡率增加($P < 0.01$); 17β -E₂ 促进 MCF-7 细胞 ac-H3、ac-H4、NF- κ B/ac-p65 表达水平($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),Garcinol 能抑制 17β -E₂ 对 ac-H3、NF- κ B/ac-p65 的表达促进作用($P < 0.01$),对 ac-H4 影响无统计学意义; 17β -E₂ 促进 NF- κ B/p65 核转运相应受到 Garcinol 抑制($P < 0.01$); 17β -E₂ 促进 *cyclin D1*、*Bcl-2*、*Bcl-x_L* 的 mRNA 转录和蛋白表达水平的作用受到 Garcinol 抑制($P < 0.05$)。**结论** 17β -E₂ 促 MCF-7 细胞增殖和凋亡抑制作用与组蛋白和非组蛋白 NF- κ B/p65 乙酰化水平增高有关,乙酰化酶抑制剂 Garcinol 通过降低乙酰化水平对雌激素促乳腺癌细胞增殖具有明显抑制作用,降低 NF- κ B 通路的 ac-p65 蛋白水平,从而下调 *cyclin D1*、*Bcl-2*、*Bcl-x_L* 可能是其重要机制。

[关键词] Garcinol;乙酰化作用;组蛋白类;NF- κ B;乳腺肿瘤**[中图分类号]** R 737.9**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2014)07-0714-08

Effect of acetyltransferase inhibitor Garcinol on estrogen-promoted proliferation of breast cancer cell line MCF-7 and the related mechanism

YE Xia, DENG Hua-yu*, ZHANG Li, ZHAO Jing, YUAN Lei

Department of Pathophysiology, Laboratory for Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of acetyltransferase inhibitor Garcinol on estrogen-induced proliferation, cell cycle promotion and apoptosis inhibition of human breast cancer MCF-7 cells and the related mechanism. **Methods** The effect of Garcinol on 17β -estradiol (17β -E₂)-induced proliferation of MCF-7 cells was investigated using CCK-8 assay, and the optimal concentration of Garcinol was determined according to the inhibition rate. The cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry; the nuclear translocation of NF- κ B/p65 was examined by immune cell fluorescence. RT-PCR was used to determine the expressions of *cyclin D1*, *Bcl-2* and *Bcl-x_L* mRNA in MCF-7 cells; and the expressions of ac-H3, ac-H4, NF- κ B/ac-p65, *cyclin D1*, *Bcl-2*, and *Bcl-x_L* protein were determined by Western blotting analysis. **Results** Acetyltransferase inhibitor Garcinol inhibited 17β -E₂-induced proliferation of MCF-7 cells, arrested MCF-7 cell cycle at G₀/G₁ phase, and increased the cell apoptosis($P < 0.01$). 17β -E₂ increased the expressions of ac-H3, ac-H4 and NF- κ B/ac-p65 protein in MCF-7 cells($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), while Garcinol significantly inhibited the increase of ac-H3 and NF- κ B/ac-p65 ($P < 0.01$) but not ac-H4($P > 0.05$). 17β -E₂-induced nuclear translocation of NF- κ B/p65 in MCF-7 cells was also significantly inhibited by Garcinol ($P < 0.01$). Garcinol also significantly inhibited 17β -E₂-induced transcription and protein expression of *cyclin D1*, *Bcl-2* and *Bcl-x_L* mRNA in MCF-7 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** 17β -E₂-induced proliferation and apoptosis inhibition of MCF-7 cells are associated with elevated acetylation level of histone and nonhistone NF- κ B/p65, and acetyltransferase inhibitor Garcinol may inhibit the effect of 17β -E₂ by decreasing acetylation, probably through decreasing ac-p65 expression of NF- κ B pathway, and

[收稿日期] 2013-12-16 **[接受日期]** 2014-01-24**[基金项目]** 国家自然科学基金(30900651). Supported by National Natural Science Foundation of China(30900651).**[作者简介]** 叶霞, 硕士. E-mail: yexiaoyu666@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-68485478, E-mail: cqdenghy@163.com

subsequently down-regulating cyclin D1, Bcl-2, and Bcl-x_L.

[Key words] Garcinol; acetylation; histones; NF- κ B; breast neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(7): 714-721]

组蛋白乙酰基转移酶 (histone acetyltransferase, HAT) 和组蛋白去乙酰基酶 (histone deacetylase, HDAC) 在调节真核生物基因转录过程中起着重要作用, 高乙酰化标志活跃转录而低乙酰化则与转录抑制相关。包括乳腺癌在内的许多恶性肿瘤的发生发展中, 其癌基因和抑癌基因的表达失调与组蛋白乙酰化修饰失衡密切相关, 一些非组蛋白异常乙酰化修饰在肿瘤发生发展中也具有重要地位^[1-2]。

雌激素是促进雌激素受体 (ER) 阳性乳腺癌增殖的重要因素, 目前研究提示其作用机制与乙酰化异常改变有关^[3]。雌激素可能影响癌基因组蛋白或非组蛋白乙酰化水平, 由此促进癌基因表达及促进肿瘤细胞转化、增殖增强和凋亡抑制。细胞周期素 D1 (cyclin D1) 是雌激素可能影响的重要细胞周期调控蛋白之一, 其表达是促进肿瘤细胞增殖的重要基础。雌激素亦能激活抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-x_L, 下调促凋亡蛋白 Bax、Bad、Bcl-x_S 的表达, 从而抑制细胞凋亡^[4]。除经典的雌激素反应元件 (estrogen response element, ERE) 途径外, 雌激素还可通过与其他转录因子如激活蛋白 1 (activator protein 1, AP-1)、刺激蛋白 1 (stimulating protein 1, SP-1)、核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 等相互作用调节基因转录。有研究表明, NF- κ B 的活化在雌激素促肿瘤细胞增殖中有重要意义^[5]。雌激素可能通过 P300/CBP 对 NF- κ B 的乙酰化发挥重要作用, NF- κ B/p65 不同赖氨酸位点的乙酰化具有不同功能, p65 赖氨酸 310 位点乙酰化可增强其转录活性^[6], 促进有关靶基因表达^[7]。

本研究以 ER 阳性人乳腺癌细胞 MCF-7 为实验对象, 采用乙酰化酶抑制剂 Garcinol, 观察其对雌激素促乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、抑制凋亡的影响, 检测组蛋白 H3、H4 和非组蛋白 NF- κ B/p65 乙酰化水平, 以及 cyclin D1、Bcl-2、Bcl-x_L 表达, 探讨乙酰化酶抑制剂 Garcinol 对雌激素促乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的作用与机制。

1 材料和方法

1.1 材料 乳腺癌细胞 MCF-7 由重庆医科大学基

础医学院病理生理学教研室提供。无酚红 DMEM 干粉培养基 (美国 SAFC Bioscience 公司), 新生牛血清 (美国 Gibco 公司)。乙酰化酶抑制剂 Garcinol (美国 Enzo Life Science 公司), 17 β -雌二醇 (17 β -E₂, 美国 Cayman 公司)。乙酰化 (ac)-H3、ac-H4 兔抗人单克隆抗体, NF- κ B/ac-p65 兔抗人单克隆抗体 (美国 Abcam 公司), H3 兔抗人单克隆抗体 (美国 Bio-Legend 公司), NF- κ B/p65 兔抗人多克隆抗体 (北京信路威科技股份有限公司), cyclin D1 兔抗人单克隆抗体 (美国 Epitomics 公司), Bcl-x_L 兔抗人多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司), Bcl-2 兔抗人多克隆抗体, β -actin 鼠抗人单克隆抗体、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG、HRP 标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司), FITC-羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司)。CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术研究所), RT-PCR 试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司)。自动酶标仪、PAGE 凝胶电泳仪、垂直电泳槽、PCR 仪、电泳凝胶图像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司), FACScan 型流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司), Leica Sp2 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司)。去雌激素新生牛血清按文献^[8]方法制备。

1.2 细胞培养 乳腺癌细胞 MCF-7 常规复苏, 培养于含 10% 去雌激素新生牛血清、1 \times 10⁵ U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的无酚红高糖 DMEM 培养液中。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度的孵箱中培养。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期的 MCF-7 细胞, 调整细胞密度为 2 \times 10⁴ 个/mL, 接种于 3 块 96 孔培养板中, 每孔 200 μ L。本课题组在前期工作中完成 17 β -E₂ 促 MCF-7 细胞增殖的最佳有效浓度测定^[9]。设置试剂对照组、未处理细胞组、17 β -E₂ (100 nmol/L) 处理组、17 β -E₂ (100 nmol/L) 联合 Garcinol 处理组 (10、20、30、40、50 μ mol/L 5 个浓度), 每组设 5 个平行孔。细胞接种 24 h 后加药, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度的孵箱内培养。药物分别作用 24、48、72 h 后, 按照 CCK-8 试剂盒说明书每孔加入 20 μ L CCK-8 试剂, 继续在培养箱中培养 2 h 后用酶标仪在 450 nm 波长处测光密度 (D₄₅₀)

值。实验重复3次。Garcinol对 17β -E₂促细胞增殖的抑制率(%) = $[1 - (17\beta$ -E₂联合Garcinol组 D_{450} - 未处理细胞组 $D_{450}) / (17\beta$ -E₂组 D_{450} - 未处理细胞组 $D_{450})] \times 100\%$ 。根据抑制率求取半效抑制浓度,确定后续实验处理细胞的浓度和时间。

1.4 流式细胞术检测细胞周期 实验分为未处理细胞组、 17β -E₂ (100 nmol/L)处理组、 17β -E₂ (100 nmol/L)联合Garcinol(35 μ mol/L)处理组。细胞接种24 h后加药,培养48 h,收集各组细胞,经预冷的PBS离心洗涤2次,以-20℃预冷的70%乙醇固定,4℃冰箱放置24 h, PBS洗涤1次,然后加20 mg/L核糖核酸酶A(RNaseA),37℃水浴1 h,再加100 mg/L碘化丙啶(PI),4℃避光染色30 min,流式细胞仪测定荧光强度(激发光波长为488 nm)。采用ModFit 2.0分析软件进行细胞周期DNA含量分析。实验重复3次。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞分组及处理同1.4项,用不含EDTA的胰酶消化收集各组细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,取1 mL细胞悬液用预冷PBS离心洗涤2次。加入500 μ L的结合缓冲液悬浮细胞,加入5 μ L Annexin V-FITC混匀后,加入5 μ L PI,混匀,室温、避光反应5~15 min。立即上流式细胞仪检测。实验重复3次。

1.6 细胞免疫荧光术检测NF- κ B/p65核转运情况 细胞分组和处理同1.4项,取对数生长期的细胞,调整细胞密度为 5×10^3 个/mL进行爬片,细胞接种24 h后加药,培养48 h。PBS漂洗3次,每次5 min,用4%多聚甲醛室温固定细胞30 min, PBS同上漂洗后加0.5% Triton打孔30 min, PBS同上漂洗,正常封闭用山羊血清封闭1 h,滴加1:50的兔抗人多克隆NF- κ B/p65抗体,4℃避光孵育过夜, PBS同上漂洗后加1:40的FITC标记的羊抗兔IgG,37℃避光孵育1 h, PBS同上漂洗后加1:1 000的PI室温染色30 s,抗荧光淬灭封片液封片,激光共聚焦显微镜半定量分析荧光强度。实验重复3次。

1.7 RT-PCR检测cyclin D1、Bcl-2、Bcl-x_L mRNA表达 细胞分组和处理同1.4项,按照高纯总RNA快速提取试剂盒(离心柱型)说明书操作步骤提取各组MCF-7细胞总RNA,测定RNA纯度与浓度,按反转录试剂盒说明书先反转录合成第1条cDNA,再以等量的cDNA为模板进行PCR反应。Cyclin

D1引物:上游5'-GCG AGG AAC AGA AGT GCG-3',下游5'-TGG AGT TGT CGG TGT AGA TGC-3',扩增产物长度为192 bp。Bcl-2引物:上游5'-ATG TGT GTG GAG AGC GTC AAC-3',下游5'-AGA CAG CCA GGA GAA ATC AAA C-3',扩增产物长度为221 bp。Bcl-x_L引物:上游5'-CCA CTT ACC TGA ATG ACC ACC TA-3',下游5'-TGT TCC CAT AGA GTT CCA CAA A-3',扩增产物长度为376 bp。 β actin引物:上游5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA-3',下游5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3',扩增产物长度为564 bp。反应条件:94℃预变性3 min后,95℃ 50 s、59.5℃ 45 s、72℃ 40 s共35个循环,最后72℃延伸10 min。取5 μ L PCR产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳,GoodView显色,Quantity One软件分析各扩增产物的表达量。实验重复3次。

1.8 蛋白质印迹分析检测ac-H3、ac-H4、NF- κ B/ac-p65、cyclin D1、Bcl-2、Bcl-x_L蛋白表达 细胞分组和处理同1.4项。收集各组细胞到1.5 mL EP管中,按 1×10^6 个细胞加1 mL RIPA和10 μ L苯甲基磺酰氟(PMSF)。置于冰上裂解30 min,每间隔10 min在涡旋振荡器上充分震荡裂解。2 400 \times g 4℃离心15 min,取上清于-80℃保存。BCA法测定蛋白浓度。行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),转移至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温封闭2 h后加一抗,4℃孵育过夜, TBST洗膜后加二抗,37℃孵育2 h, ECL显色,用Bio-Rad图像分析系统拍照,Quantity One软件分析蛋白相对表达量。实验重复3次。

1.9 统计学处理 采用SPSS 17.0软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 Garcinol对雌激素促MCF-7细胞增殖的影响 100 nmol/L 17β -E₂联合不同浓度Garcinol分别作用MCF-7细胞24、48、72 h,随作用时间延长和剂量增加,细胞增殖抑制率升高($P < 0.01$,图1),说明Garcinol对雌激素促MCF-7细胞增殖有抑制作用。根据抑制率求取半效抑制浓度,以35 μ mol/L Garcinol作用48 h用于后续实验。

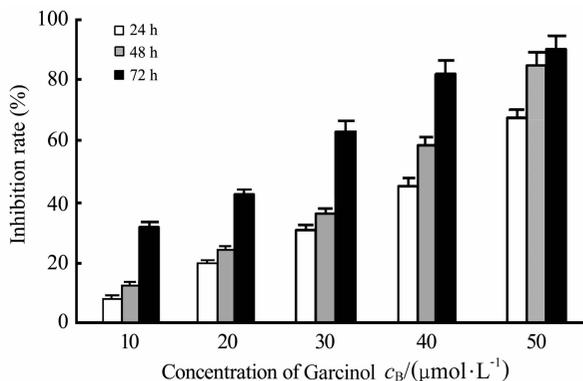


图1 Garcinol对雌激素促MCF-7细胞增殖的抑制作用
Fig 1 Inhibitory effect of Garcinol against proliferation of MCF-7 cells treated with 17 β -estradiol

$P < 0.01$ among different concentrations and time groups; $n = 15, \bar{x} \pm s$

2.2 Garcinol对雌激素所致细胞周期转化的影响 结果(图2)显示,与未处理细胞组比较,100 nmol/L 17 β -E₂作用MCF-7细胞48 h, G₀/G₁期细胞比例降低, G₂/M期比例增加($P < 0.01$); 17 β -E₂联合Garcinol(35 $\mu\text{mol/L}$)处理后 G₀/G₁期细胞比例增加, S期和 G₂/M期比例降低($P < 0.01$)。

2.3 Garcinol对雌激素抑制细胞凋亡的影响 与未处理细胞组[(4.30 \pm 0.11)%]比较, 100 nmol/L 17 β -E₂作用MCF-7细胞48 h, 细胞凋亡率降至[(2.10 \pm 0.20)%], 差异有统计学意义($P < 0.01$); 17 β -E₂联

合Garcinol(35 $\mu\text{mol/L}$)处理后, 细胞凋亡率升至[(16.35 \pm 0.22)%], $P < 0.01$ 。

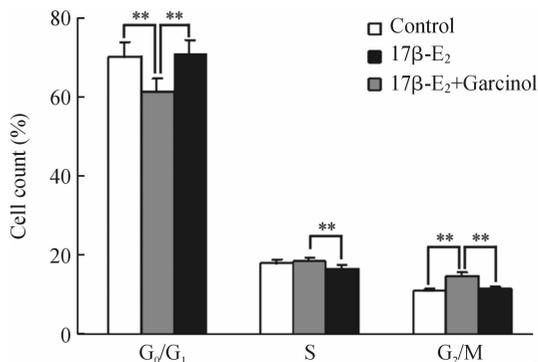


图2 Garcinol对雌激素处理的MCF-7细胞周期的影响
图2 Effect of Garcinol on MCF-7 cell cycle after treated with 17 β -estradiol(17 β -E₂)

** $P < 0.01$; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 Garcinol对雌激素处理后细胞 ac-H3、ac-H4、NF- κ B/ac-p65 蛋白表达的影响 结果(图3)显示, 未处理细胞组中 ac-H4 的基础表达较 ac-H3 偏低, 100 nmol/L 17 β -E₂处理MCF-7细胞48 h, ac-H3 ($P < 0.01$), ac-H4 ($P < 0.05$), ac-p65 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 17 β -E₂联合使用Garcinol(35 $\mu\text{mol/L}$)后, ac-H3、ac-p65 的表达水平降低 ($P < 0.01$), 但 ac-H4 变化无统计学意义 ($P > 0.05$)。

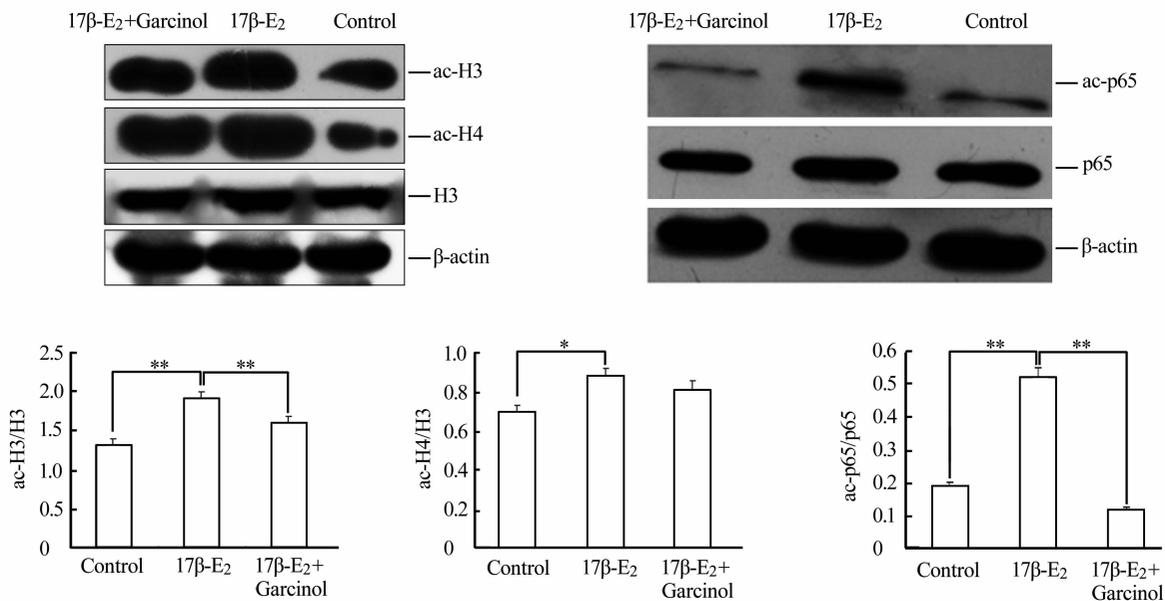


图3 Garcinol对雌激素处理的MCF-7细胞 ac-H3、ac-H4、NF- κ B/ac-p65 蛋白表达的影响
Fig 3 Effect of Garcinol on protein expression of ac-H3, ac-H4 and NF- κ B/ac-p65 in MCF-7 cells treated with 17 β -estradiol(17 β -E₂)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5 Garcinol 对雌激素处理后细胞 NF-κB/p65 核转运的影响 结果见图 4。与未处理细胞(43.46±1.48)比较,100 nmol/L 17β-E₂ 处理 MCF-7 细胞

48 h,p65 从胞质到胞核的核转运增强(72.69±2.35, $P<0.01$);联合使用 Garcinol(35 μmol/L),p65 核转运受到抑制(34.83±1.33, $P<0.01$)。

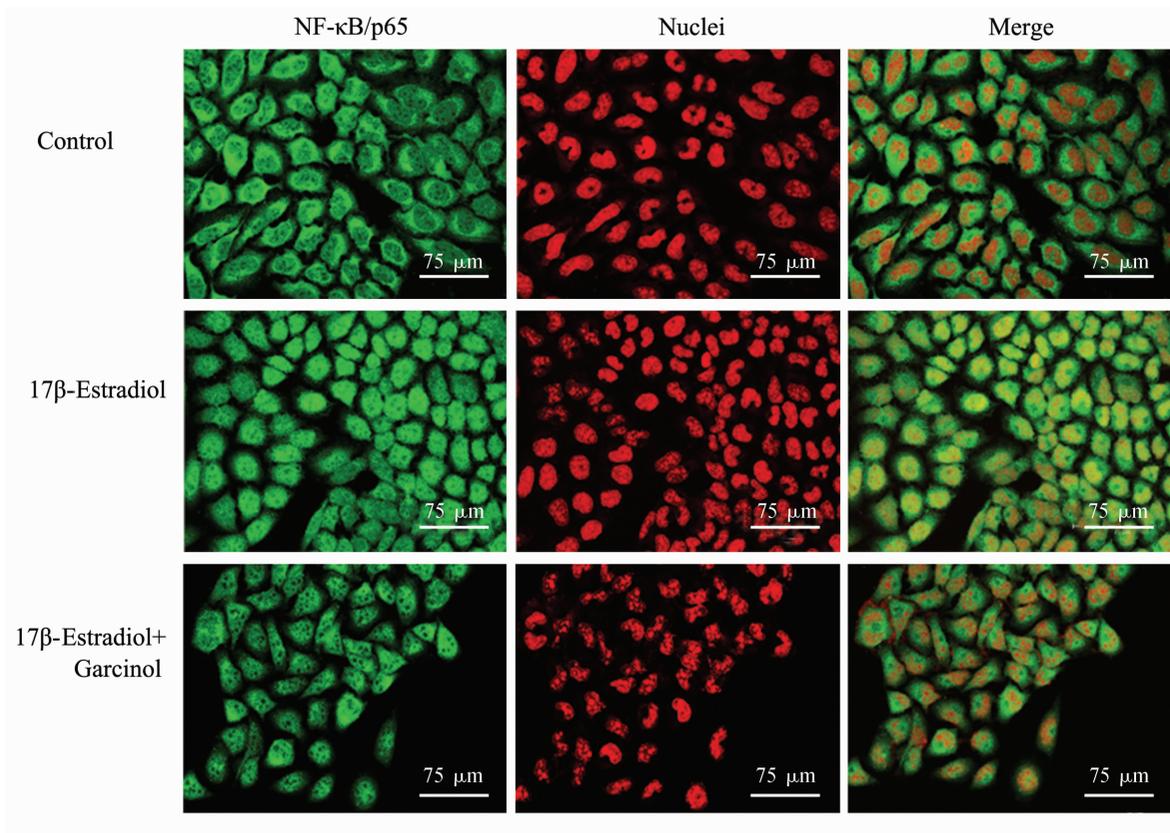


图 4 免疫荧光检测 Garcinol 对雌激素处理的 MCF-7 细胞 NF-κB/p65 核转运的影响

Fig 4 Immunofluorescence analysis of Garcinol affecting nuclear translocation of NF-κB/p65 in MCF-7 cells treated with 17β-estradiol

2.6 Garcinol 对雌激素处理后细胞 cyclin D1、Bcl-2、Bcl-x_L表达的影响 结果(图 5、图 6)显示,与未处理细胞比较,100 nmol/L 17β-E₂ 处理 MCF-7 细胞

48 h,cyclin D1、Bcl-2、Bcl-x_L mRNA 和蛋白表达增强 ($P<0.05$, $P<0.01$);联合使用 Garcinol (35 μmol/L)后,三者表达均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

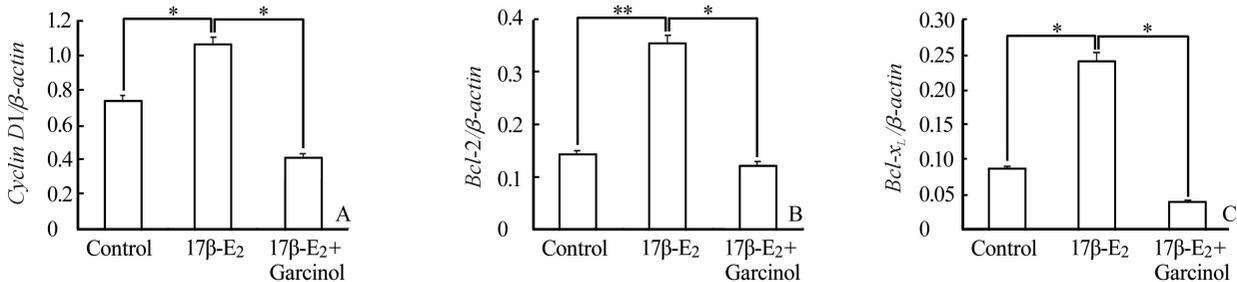


图 5 Garcinol 对雌激素处理的 MCF-7 细胞 cyclin D1(A)、Bcl-2(B)、Bcl-x_L(C) mRNA 表达的影响

Fig 5 Effect of Garcinol on expression of cyclin D1(A), Bcl-2(B) and Bcl-x_L(C) mRNA in MCF-7 cells treated with 17β-estradiol(17β-E₂)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$

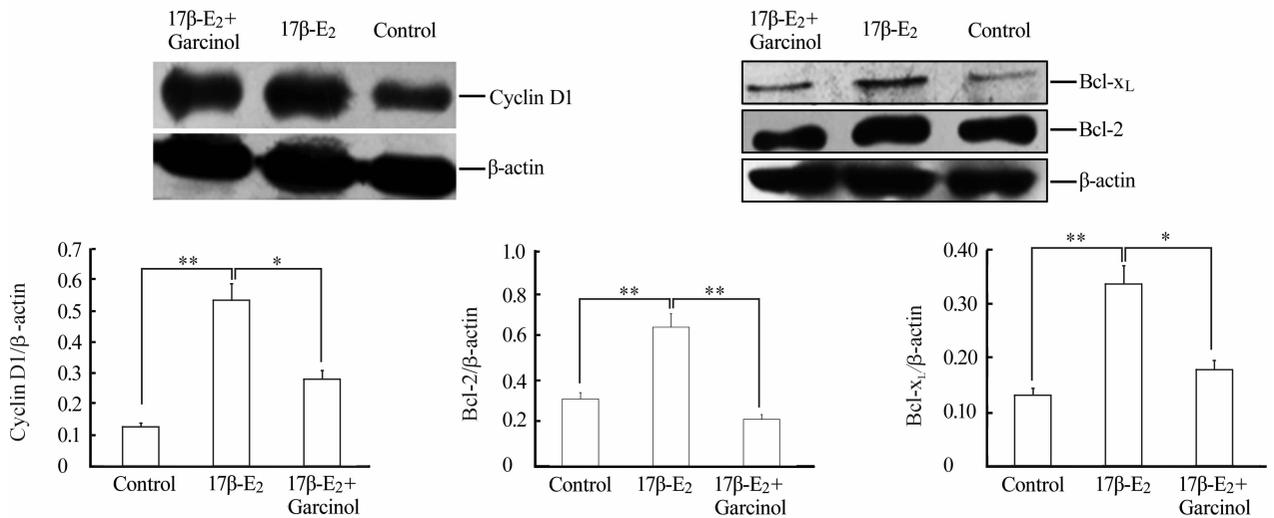


图6 Garcinol对雌激素处理的MCF-7细胞cyclin D1、Bcl-2、Bcl-x_L蛋白表达的影响

Fig 6 Effect of Garcinol on protein expression of cyclin D1, Bcl-2, and Bcl-x_L in MCF-7 cells treated with 17β-estradiol(17β-E₂)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

由乙酰化酶 HAT 导致的高乙酰化是癌基因激活的重要方式^[10]。四类主要的 HAT 包括: Gen5/PCAF、MYST (Hbo1, MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60)、p300/CBP、Rtt109, 每一类显示不同的组蛋白底物特异性^[11]。在雌激素促乳腺癌的发生发展中, 乙酰化修饰异常可能具有重要作用。研究表明, 核受体辅激活因子通常具有 HAT 活性, 随着细胞信号通路活化, 激素可诱导核受体[ER、糖皮质激素受体(GR)、维 A 酸受体(RAR)、维生素 D 受体(VDR)]靶基因组蛋白乙酰化水平升高、基因转录活化^[12]。转录结合因子的基因组分析发现, 雌激素调节基因启动子区聚合酶 II (Pol II) 募集与组蛋白乙酰化水平正相关^[3]。Kutanzi 等^[13]构建雌激素诱导的(ACI)大鼠乳腺癌模型, 鉴定高雌激素水平与乳腺组织的形态学和表观变化的关系, 发现其过增生改变与表观失调相一致, 认为雌激素引起的组蛋白残基高乙酰化表观改变在早期乳腺癌进展中有重要意义。研究发现, p300/CBP 和 PCAF 介导了雌激素诱导的 MCF-7 细胞 H3、H4 高乙酰化及受体靶基因转录激活, PCAF 主要乙酰化 H3^[12, 14-15]。本课题组前期工作亦已证实, 17β-E₂ 可促进 MCF-7 细胞的 PCAF 基因转录和蛋白水平表达^[16-17]。本研究结果显示, 雌激素处理对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖有

较强的促进作用, 细胞周期转化增强, 细胞有丝分裂增强, 细胞凋亡率降低; 同时蛋白质印迹分析显示, 细胞组蛋白 ac-H3、ac-H4、非组蛋白 NF-κB/ac-p65 表达水平明显增高。联合乙酰化酶抑制剂 Garcinol 处理后, 可抑制雌激素促 MCF-7 细胞增殖作用, 使细胞周期转化阻滞于 G₀/G₁ 期, 细胞凋亡率增加; 相应可见, 组蛋白 ac-H3 和非组蛋白 NF-κB/ac-p65 的表达水平降低, 但 ac-H4 未见明显变化。本研究结果表明, 雌激素促 MCF-7 细胞增殖、凋亡抑制效应与组蛋白和非组蛋白 NF-κB/p65 的乙酰化水平增高有关, Garcinol 可通过抑制乙酰化水平对雌激素促乳腺癌增殖产生抑制作用。

Garcinol 是从生长在印度热带地区藤黄属果皮中提取的一种苯甲酮, 分子式为 C₃₈H₅₀O₆, 相对分子质量为 602, 其抗肿瘤活性与化学结构式中双羟基碳酸及 β-二酮基有关^[18]。Garcinol 可通过其结构中邻苯二酚上 C₁₃、C₁₄ 位的-OH 基团与 HAT 上的乙酰-CoA 结合位点结合, 抑制乙酰化作用^[19]。Garcinol 具有较好的细胞渗透性, 体外研究发现能有效抑制 p300/CBP 和 PCAF 的活性和功能^[20], 实验中作为乙酰化酶抑制剂应用。组蛋白 H4 的乙酰化主要通过 HAT (MYST/Hbo1) 完成^[21], 本研究中 Garcinol 对雌激素促 ac-H4 表达无抑制作用可能与此有关。Garcinol 可能通过抑制 HAT、降低乙酰化水平抑制癌基因激活, 发挥抗肿瘤作用, 这对抑制

雌激素促癌发生发展可能具有重要的作用。

NF- κ B 参与细胞增殖调控和凋亡过程,研究显示 NF- κ B 活性失控对乳腺癌发生有重要意义^[22-23]。p300/CBP 是 NF- κ B 的辅激活因子,雌激素可能通过 p300/CBP 对 NF- κ B/p65 的乙酰化表观修饰增强其转录活性^[24]。ER 通过与 NF- κ B 蛋白形成复合物,进而与靶基因 cyclin D1 启动子远端的 κ B 元件结合,控制 cyclin D1 表达,NF- κ B/p65 的活化对雌激素诱导增殖时的 cyclin D₁ 表达是必需的^[5]。Cyclin D1 是调控细胞周期转化的重要周期素蛋白,主要能够促进细胞由 G₀ 期进入 G₁ 期,使处于有丝分裂期的细胞百分数增加。此外,活化的 NF- κ B/p65 亦调节 *Bcl-2*、*Bcl-x_L* 等抗凋亡靶基因的表达^[7],NF- κ B 对于 ER 被募集到抗凋亡基因启动子的 ERE 有必要作用^[24]。增强 NF- κ B 转录活性需要 p300/CBP 和 PCAF 参与,但这些不同的辅激活蛋白怎样被募集到 NF- κ B 靶基因启动子区以及与 NF- κ B 协同的时空作用方式尚不清楚^[25]。NF- κ B/p65 依赖的反式激活在多个水平受乙酰化依赖的调节,主要包括:(1)NF- κ B/p65 依赖的组蛋白乙酰化增加,使 NF- κ B/p65 依赖的基因,如 ERE 容易接近;(2)直接乙酰化 NF- κ B 亚单位 p65、p50,调节 NF- κ B 不同功能,乙酰化 p65 与转录激活、DNA 结合亲和力有关,乙酰化 p50 增强其与 DNA 结合活性^[26]。

本研究结果显示,雌激素促进乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡抑制效应与 NF- κ B/p65 乙酰化水平增高表现一致,可见 p65 核转运相应加强;NF- κ B 的活化与 cyclin D1、*Bcl-2*、*Bcl-x_L* 基因转录和蛋白表达水平升高一致;乙酰化酶抑制剂 Garcinol 对此效应产生抑制作用。我们认为,降低 NF- κ B/p65 乙酰化水平,抑制 NF- κ B 通路活性,从而下调 cyclin D1、*Bcl-2*、*Bcl-x_L* 表达可能是 Garcinol 抑制雌激素促乳腺癌细胞增殖的重要机制;在乳腺癌表观遗传机制中,组蛋白与非组蛋白 NF- κ B 的乙酰化修饰异常,在导致基因转录异常、肿瘤发生发展的作用中可能存在密切关系,二者均值得高度关注。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Singh B N, Zhang G, Hwa Y L, Li J, Dowdy S C, Jiang S

W. Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010, 10: 935-954.

- [2] Mooney S M, Goel A, D'Assoro A B, Salisbury J L, Janknecht R. Pleiotropic effects of p300-mediated acetylation on p68 and p72 RNA helicase [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 30443-30452.
- [3] Kininis M, Chen B S, Diehl A G, Isaacs G D, Zhang T, Siepel A C, et al. Genomic analyses of transcription factor binding, histone acetylation, and gene expression reveal mechanistically distinct classes of estrogen-regulated promoters [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27: 5090-5104.
- [4] Pozzi S, Benedusi V, Maggi A, Vegeto E. Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1089: 302-323.
- [5] Rubio M F, Werbajh S, Cafferata E G, Quagliano A, Col G P, Nojek I M, et al. TNF- α enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor- κ B [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 1367-1377.
- [6] Chen L F, Mu Y, Greene W C. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- κ B [J]. *EMBO J*, 2002, 21: 6539-6548.
- [7] Sung B, Pandey M K, Ahn K S, Yi T, Chaturvedi M M, Liu M, et al. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- κ B alpha kinase, leading to potentiation of apoptosis [J]. *Blood*, 2008, 111: 4880-4891.
- [8] Han D, Denison M S, Tachibana H, Yamada K. Effects of estrogenic compounds on immunoglobulin production by mouse splenocytes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25: 1263-1267.
- [9] Zhang C, Zhao J, Deng H. 17 β -estradiol up-regulates miR-155 expression and reduces TP53INP1 expression in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 379: 201-211.
- [10] Di Cerbo V, Schneider R. Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation [J]. *Brief Funct Genomics*, 2013, 12: 231-243.
- [11] Marmorstein R, Trievel R C. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1789: 58-68.

- [12] Chen H, Lin R J, Xie W, Wilpitz D, Evans R M. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase[J]. *Cell*, 1999, 98:675-686.
- [13] Kutanzi K R, Koturbash I, Kovalchuk O. Reversibility of pre-malignant estrogen-induced epigenetic changes [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9:3078-3084.
- [14] Jin W, Chen L, Chen Y, Xu S G, Di G H, Yin W J, et al. UHRF1 is associated with epigenetic silencing of BRCA1 in sporadic breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 123:359-373.
- [15] Jin W, Liu Y, Chen L, Zhu H, Di G H, Ling H, et al. Involvement of MyoD and c-myc in regulation of basal and estrogen-induced transcription activity of the BRCA1 gene[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 125:699-713.
- [16] 李苏华, 邓华瑜, 陈黎. 细胞外调节蛋白激酶在雌激素促乳腺癌细胞 MCF-7 增殖中的作用[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30:395-399.
Li S H, Deng H Y, Chen L. Role of extracellular signal-regulated protein kinase in estrogen-induced proliferation of breast cancer cell line MCF-7[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30:395-399.
- [17] 李苏华, 邓华瑜, 郑维萍. ERK 抑制对乳腺癌细胞 (MCF-7) PCAF 的影响和意义[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35:1155-1159.
- [18] Saadat N, Gupta S V. Potential role of garcinol as an anticancer agent[J]. *J Oncol*, 2012, 2012:647206.
- [19] Arif M, Pradhan S K, Thanuja G R, Vedamurthy B M, Agrawal S, Dasgupta D, et al. Mechanism of p300 specific histone acetyltransferase inhibition by small molecules[J]. *J Med Chem*, 2009, 52:267-277.
- [20] Balasubramanyam K, Altaf M, Varier R A, Swaminathan V, Ravindran A, Sadhale P P, et al. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:33716-33726.
- [21] Iizuka M, Takahashi Y, Mizzen C A, Cook R G, Fujita M, Allis C D, et al. Histone acetyltransferase Hbo1: catalytic activity, cellular abundance, and links to primary cancers[J]. *Gene*, 2009, 436:108-114.
- [22] Zubair A, Frieri M. Role of nuclear factor- κ B in breast and colorectal cancer [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2013, 13:44-49.
- [23] Baumgarten S C, Frasor J. Minireview: inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers [J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26:360-371.
- [24] Pradhan M, Baumgarten S C, Bembinster L A, Frasor J. CBP mediates NF-kappaB-dependent histone acetylation and estrogen receptor recruitment to an estrogen response element in the BIRC3 promoter[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32:569-575.
- [25] Kim J W, Jang S M, Kim C H, An J H, Kang E J, Choi K H. New molecular bridge between RelA/p65 and NF-kappaB target genes via histone acetyltransferase TIP60 cofactor[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287:7780-7791.
- [26] Quivy V, Van Lint C. Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68:1221-1229.

[本文编辑] 商素芳