

· 实验研究 ·

TSA 对食管癌细胞系 EC9706 细胞周期作用及分子机制的探讨

刘霞,冯婷,马俊芬,赵继敏,杨洪艳,黄幼田,董子明[△]

(郑州大学基础医学院病理生理学教研室 450052)

摘要:目的 研究去乙酰化酶抑制剂曲古菌素 A(TSA)对食管癌细胞 EC9706 细胞周期的作用及机制。方法 将浓度为 0.5、1.0、1.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA 作用 EC9706 细胞 24 h,用 MTT 观察不同浓度 TSA 对 EC9706 细胞的生长抑制作用;流式细胞仪检测细胞生长及周期;Western Blot 检测 TSA 对食管癌细胞周期相关基因的表达。结果 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 TSA 对 EC9706 细胞有明显的生长抑制作用,并呈现一定的量效关系,在 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度之上可明显诱导食管癌细胞 EC9706 细胞周期阻滞,明显增强 p21、p27 基因的表达,明显降低 CCND1、CDK4D 基因的表达。结论 一定剂量的 TSA 可抑制食管癌 EC9706 细胞的生长,通过调控多个细胞周期相关基因诱导食管癌细胞细胞周期阻滞,细胞阻滞的发生与 p21、p27 基因表达的增加及 CCND1、CDK4D 基因表达的减少相关。

关键词:曲古菌素 A;细胞周期;P21;P27;CCND1;CDK4D;食管癌细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.015

中图分类号:R735.1;R73-3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)20-2734-03

The molecular mechanism of TSA to esophagus cancer cell line EC9706 mitotic cycle function

LIU Xia, FENG Ting, MA Jun-fen, et al.

(Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To study the deacetylase inhibitor TSA on the esophageal cancer cell EC9706 cell cycle effect and its mechanism. **Methods** 0.5, 1.0, 1.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA actin EC9706 cells 24 hours, the effects of different concentrations of TSA on EC9706 cell growth inhibition were observed by MTT, flow cytometry measured cell growth and cycle; TSA on esophageal cancer cell cycle-related genes expression by Western Blot test. **Results** 1.0 $\mu\text{mol/L}$ concentration of TSA on the EC9706 inhibited the growth of cells and showed a definite dose-effect relationship, above 1.0 $\mu\text{mol/L}$ concentration could significantly induce cell cycle arrest of esophageal cancer cell EC9706 could significantly enhance the p21, p27 gene expression, decreased CCND1, CDK4D gene expression. **Conclusion** The dose of TSA inhibit the growth of esophageal cancer EC9706 cells by regulating multiple cell cycle-related genes induced by esophageal cancer cells in cell cycle arrest, cell block occurrence revelant with p21, p27 gene expression increase and CCND1, CDK4D expression gene reduction.

Key words: trichostatin A; mitotic cycle; P21; P27; CCND1; CDK4D, esophagus cancer cell

组蛋白乙酰化酶(histoneacetylase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histonedacetylase, HDAC)是调节组蛋白乙酰化状态的一对功能相互拮抗的蛋白酶,它们相互的动态平衡控制着染色质的结构和基因的表达。曲古菌素 A(trichostatin A, TSA)是一种组蛋白去乙酰化酶(histonedacetylase, HDACs)抑制剂,能够抑制 HDACs 的活性。由于它能够改变组蛋白的乙酰化状态,从而可以选择性地调控肿瘤相关基因。近年来,研究提示去乙酰化转移酶抑制剂可明显抑制肿瘤的生长,虽然目前对其作用机制仍不十分清楚,但其中一个重要机制是通过阻滞细胞周期来实现其细胞抑制作用的^[1]。具体的机制因去乙酰化转移酶抑制剂药物和肿瘤的各异而不同。调控的相关基因也不相同。TSA 对食管癌细胞周期影响的尚未见报道,因此,本研究主要观察 TSA 对食管癌 EC9706 细胞周期的影响,探讨 TSA 对 EC9706 细胞周期发挥作用的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器 TSA 购自 Sigma(USA)公司,由 DMSO 溶解至 1 mol/L,使用前按照相应浓度稀释加入培养基中。RPMI-1640 购自 Gibco BRL 公司,胎牛血清购自天津 TBD 生物有限公司,P21、P27、CyclinD1 鼠抗人单抗和抗 CDK4 多抗

购自美国 Santa Cruz;ECL 显色试剂盒购自北京中杉生物工程有限公司,蛋白垂直电泳仪和印迹转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司,流式细胞仪购自 FACSort, BD 公司,食管癌细胞株 EC9706 由郑州大学病理生理学教研室提供。

1.2 细胞培养 将 EC9706 细胞放在含 10% 胎牛血清、100 mg/mL 链霉素、100 mg/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养液里,放在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养。取对数生长期的细胞处理后分组,实验组分为 0.5、1.0、1.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA。对照组换为等浓度的 DMSO 同时培养 24 h 后收集。

1.3 TSA 细胞生长抑制试验(MTT 法) 实验分组:实验组,细胞分别给予 0.5、1.0、1.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA 处理,使用不含胎牛血清的培养基;空白对照组 MTT 法检测不同浓度 TSA 对细胞生长的抑制作用,细胞经 0.05% 胰酶消化处理制成 3×10^4 个/mL 细胞悬液,接种在 96 孔板中,每孔加入 100 μL ,每个浓度设 6 个复孔,以未加药细胞作为对照,待细胞贴壁后,分别加入 0.5、1.0、1.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA 作用 24 h 后,加入 20 μL MTT (5 mg/mL)在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱培养 4 h 后弃上清液,每孔再加入 150 μL DMSO,待充分溶解后轻微摇床振荡 10 min,上酶标仪检测,用波长 570 nm 比色测定 OD 值,计算抑制

[△] 通讯作者, E-mail: dongziming@zzu.edu.cn.

率。抑制率(%)=(空白对照组 OD570-实验组 OD570)/对照组 OD570。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期 取对数生长期的 EC9706 细胞,以无血清的 RPMI-1640 培养 24 h 同步后,按照上述分组作用 24 h 后,以 PBS 洗涤,用 70% 的冷乙醇在 4 °C 以下固定 24 h 以上,然后离心弃乙醇(3 000 r/min 离心 10 min),再加入 1 mL PBS 制成细胞悬液后加入 RnaseA 酶(终浓度为 10 μg/mL),室温放置 30 min,再用 50 μg/mL 的碘化丙啶(PI)染色后,用流式细胞仪分析细胞周期。

1.5 Western Blot 检测 p21、p27、CCND1、CDK4D 蛋白的表达 参照《分子克隆实验指南》提取肿瘤细胞总蛋白,测定浓度后,在标准蛋白曲线下算出 50 μg 蛋白上样量,以 B-actin 为内参照,Western Blot 检测肿瘤细胞表面各基因的表达。将蛋白经 SDS-PAGE 后转移至 PVDF 膜,5% BSA 摇床封闭 3 h 后加入相应的一抗,4 °C 冰箱孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,二抗孵育 1 h 后用化学发光法进行 X 线胶片曝光显影。用凝胶成像仪进行图像定量分析。

1.6 统计学方法 所得数据用 SPSS10.0 统计软件处理,多样本均数采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TSA 对 EC9706 细胞增殖影响 见表 1,不同浓度 TSA 处理 EC9706 细胞 24 h 后,与空白对照组比较,0.5 μmol/L TSA 处理组细胞的抑制率差异无统计学意义,而 1.0 μmol/L TSA 处理的细胞抑制率显著增加,并随着 TSA 作用浓度的升高而升高($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度的 TSA 对 EC9706 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	抑制率(%)
空白对照组	7.8 ± 3.74
0.5 μmol/L TSA 处理组	7.96 ± 0.12#
1.0 μmol/L TSA 处理组	20.03 ± 0.21*#
1.5 μmol/L TSA 处理组	26.40 ± 0.58*#

与空白对照组比较,*: $P < 0.05$;不同浓度 TSA 处理组间两两比较,#: $P < 0.05$ 。

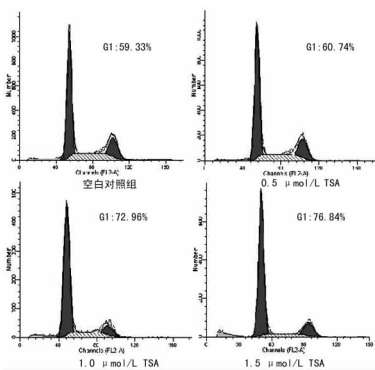


图 1 不同浓度 TSA 对 EC9706 细胞细胞周期的影响

2.2 TSA 对 EC9706 细胞细胞周期的作用 见图 1,0.5、1.0、1.5 μmol/L TSA 作用 EC9706 细胞 24 h 后,与空白对照组比较,0.5 μmol/L TSA 处理组细胞的周期无明显差异,而 1.0 μmol/L TSA 处理后滞留在 G₁ 期的细胞显著增加,S 期细

胞明显减少,并随着 TSA 作用浓度的升高阻滞在 G₁ 期的细胞显著增高($P < 0.05$)。

2.3 EC9706 细胞 p21、p27、CCND1、CDK4D 的表达变化 见图 2,0.5、1.0、1.5 μmol/L TSA 作用 EC9706 细胞 24 h 后,与空白对照组比较,0.5 μmol/L TSA 处理组细胞 p21、p27、CCND1、CDK4D 蛋白的表达差异无统计学意义,而 1.0 μmol/L TSA 处理的细胞 p21、p27 蛋白的表达显著提高,并随着 TSA 作用浓度的升高而增加($P < 0.05$),CCND1、CDK4D 蛋白的表达显著下降,并随着 TSA 作用浓度的升高而降低($P < 0.05$)。

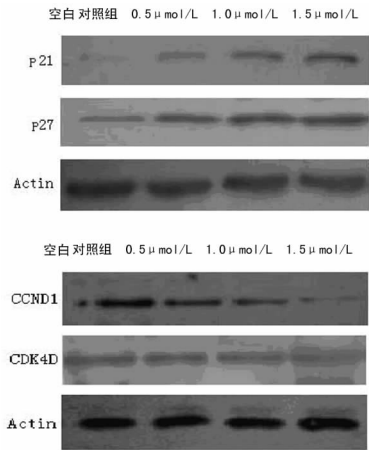


图 2 EC9706 细胞 p21、p27、CCND1、CDK4D 的表达变化

3 讨 论

组蛋白的乙酰化和去乙酰化主要是通过 HAT 和 HDAC 来实现的^[2]。生理状态下,它们相互的动态平衡控制着染色质的结构和基因的表达。一旦平衡在异常状态下被破坏,HDAC 活性增强,原有的基因表达失衡,调控细胞周期和细胞增殖的分子表达紊乱,从而导致细胞恶变。组蛋白去乙酰化抑制剂可以使某些部位的核心组蛋白高度乙酰化,导致某些基因的启动子激活,从而使与周期相关的蛋白得到表达,进而使肿瘤细胞出现增生停止、分化、凋亡转移抑制等变化。TSA 是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HADCI),能特异地抑制组蛋白去乙酰化;使高度乙酰化的组蛋白积累,改变染色体结构,抑制细胞增殖,诱导肿瘤细胞分化和(或)凋亡,是一类具有广泛应用前景的抗肿瘤药物之一^[3]。有研究表明,TSA 可以以时间和剂量依赖性方式显著抑制多种肿瘤细胞增殖,本研究证实了 TSA 可以抑制肿瘤细胞生长,可使食管癌细胞 EC9706 细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期。并且发现 0.5 μmol/L TSA 作用 EC9706 细胞对细胞生长无明显影响,与空白对照组比较抑制率差异无统计学意义,而 1.0 μmol/L TSA 作用 EC9706 细胞显著抑制细胞生长,并且抑制率明显增加,并且表现出一定的剂量效应。进一步研究表明 TSA 对食管癌细胞周期的阻滞作用是通过调控一些细胞周期相关基因的表达来起作用的,TSA 可以明显增加 p21、p27 等许多细胞周期抑制基因的表达,同时降低了 CCND1、CDK4D 等细胞周期促进基因的表达,并且随着 TSA 作用浓度的增加而增强。p21、p27 是细胞周期调控中非常重要的基因,能够与 CCND1 形成复合物使细胞周期停滞在 G₁ 期;它还可以通过 C 端与 PCNA 相互作用,阻断 PCNA 活化 DNA 聚合酶的活性从而抑制 DNA 的合成,使细胞周期停滞^[4-6]。其主要是抑制细胞周期,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,在细胞的生理、病理

过程中发挥重要的作用。而 CCND1 过表达与某些肿瘤的组织类型相关,其功能主要是促进细胞增殖,是 G₁ 期细胞增殖信号的关键蛋白质,被视为癌基因,其过度表达可致细胞增殖失控而恶性化,但是它在不同肿瘤中阳性检出率不同,与组织分化程度相关,在分化差的肿瘤中表达增强。CDK 则是一类重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,包括 CDK1~7 种,主要生物学作用是启动 DNA 的复制和诱发细胞的有丝分裂^[7-8],以复合物形式出现,在 G₁ 早期,CCND 表达并与 CDK2 或 CDK4 结合,成为始动细胞周期的启动子^[9-12],1.0 μmol/L 浓度的 TSA 对 EC9706 细胞有明显的生长抑制作用,并呈现一定的量效关系。本研究发现 TSA 在 1.0 μmol/L 浓度之上可明显诱导食管癌细胞 EC9706 细胞周期阻滞,可明显增强 EC9706 细胞中 p21、p27 等基因的表达,明显降低 CCND1、CDK4D 等基因的表达,但是否 TSA 抑制 EC9706 细胞的生长还与其它基因表达的改变相关,具体的机制有待继续研究探讨。

参考文献:

- [1] Tian FQ, Chen XS, Xie J, et al. Effect of Trichostatin A on expression of HDAC1 in K562 cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2006, 16(11):1642.
- [2] And M, Hansen R, Ding RX, et al. Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the coxsackievirus and adenovirus receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(4):1943.
- [3] Seoj S, Chon Y, Kim R, et al. Cell cycle arrest and lytic induction of EBV-transformed B lymphoblastoid cells by a histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A[J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(1):93.
- [4] 张梅芳. 原发性肝细胞癌组织中 p53 和 p21 WAF/CIP1 及 MDM2 蛋白的表达及其临床意义[J]. *中华肿瘤防治*

杂志, 2007, 14(15):1121.

- [5] Radhakrishnan SK, Feficiano CS, Najmabadi F, et al. Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle[J]. *Oncogene*, 2004, 23(23):4173.
- [6] 王振国, 郭和清. 膀胱癌 Ha-ras 基因突变、p21 蛋白表达及其意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 13(8):59.
- [7] Kalpana S, Joshi. In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(3):918.
- [8] Yu Q, Sicinska E, Geng Y, et al. Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer[J]. *Cancer Cell*, 2006, 9(1):23.
- [9] Henkens T, Papeleu P, Elaut G, et al. Trichostatin A, a critical factor in maintaining the functional differentiation of primary cultured rat hepatocytes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 218(1):64.
- [10] Sachs MD, Rauen KA, Ramamurthy M, et al. Integrin V and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder[J]. *Cancer Urology*, 2002, 60:531.
- [11] Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL, et al. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy[J]. *Cancer Res*, 2002, 2:3812.
- [12] Kitazono M, Goldsmith ME, Aikou T, et al. Enhanced adenovirus transgene in malignant cells treated with the histone deacetylase inhibitor FR901228[J]. *Cancer Res*, 2001, 61:6328.

(收稿日期:2010-02-04 修回日期:2010-03-04)

(上接第 2733 页)

参考文献:

- [1] Vasavada RC, Wang L, Fujinaka Y, et al. Protein kinase C-zeta activation markedly enhances beta-cell proliferation; an essential role in growth factor mediated beta-cell mitogenesis[J]. *Diabetes*, 2007, 56(11):2732.
- [2] Legakis I, Mantouridis T. Positive correlation of PTH-related peptide with glucose in type 2 diabetes[J]. *Exp Diabetes Res*, 2009, 10(11):855.
- [3] Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. Beta-cell failure as a complication of diabetes[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2008, 9(4):329.
- [4] Ishida H, Suzuki K, Someya Y, et al. Possible compensatory role of parathyroid hormone-related peptide on main-

tenance of calcium homeostasis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1993, 129(6):519.

- [5] Lozano D, de Castro LF, Dapia S, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(5):2027.
- [6] Legakis I. The role of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in the pathophysiology of diabetes mellitus[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2009, 9(6):717.
- [7] 黄荣曦, 卢松, 王成剑. 门冬胰岛素 30 联合阿卡波糖对初诊 2 型糖尿病胰岛功能的影响[J]. *重庆医学*, 2009, 38(18):2273.

(收稿日期:2010-02-20 修回日期:2010-03-22)