

· 论 著 ·

曲古抑素 A 激活 FAS 途径促使 A549/CDDP 细胞凋亡

伍 俊¹, 易震南¹, 胡成平²

(1. 广东医学院呼吸疾病研究所, 广东湛江 524023; 2. 中南大学湘雅医院呼吸内科, 长沙 410008)

摘要:目的 探讨曲古抑素 A(TSA)是否可以诱导 FAS 的表达,促进人肺腺癌耐顺铂细胞株 A549/CDDP 细胞凋亡,揭示 TSA 诱导 A549/CDDP 细胞凋亡的可能机制。**方法** Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡,流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期变化,间接免疫荧光检测 FAS 表达,蛋白印迹法检测 FAS、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8(caspase-8)表达变化。**结果** TSA 诱导 A549/CDDP 细胞凋亡,流式细胞仪检出凋亡率由 3.9% 递增至 21.7%。procaspase-8 被激活,FAS 表达呈浓度和时间依赖性上调。**结论** TSA 诱导 A549/CDDP 细胞凋亡可能与死亡受体介导的途径相关。

关键词:曲古抑素 A; 细胞凋亡; FAS; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.23.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)23-2294-03

TSA prompts A549/CDDP cell apoptosis by activating FAS-pathway

Wu Jun¹, Yi Zhenan¹, Hu Chengping²

(1. Institute of Respiratory Diseases, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

2. Department of Respiratory Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of trichostatin A(TSA) on FAS-dependent pathway for studying the mechanism of TSA-induced A549/CDDP cell apoptosis. **Methods** Cell apoptosis was analyzed by Hoechst 33258 fluorescence dye and flow cytometry. The changes of Caspases-8 and FAS in A549/CDDP cells were detected with Western blotting and indirect immunofluorescence assay. **Results** After treatment with TSA, A549/CDDP cells showed typical apoptotic morphological character. Using flow cytometry, the apoptotic percentage increased from 3.9% to 21.7%. The level of FAS increased and the hydrolysis of procaspase-8 increased in a time and dose-dependent manner. **Conclusion** TSA-induced apoptosis may be associated with death receptors pathway.

Key words: trichostatin A; apoptosis; FAS; caspase-8

肺癌是世界上发病率最高的恶性肿瘤之一,临床试验证实以顺铂为基础的化疗方案能显著提高肺癌患者的生存率,但是肺癌患者整体 5 年生存率不高,小于 15%,耐药性是化疗失败的主要原因。因而寻求新的有效的化疗药物是目前研究的热点。曲古抑素 A(trichostatin A, TSA)是一种新型的去乙酰化酶的抑制剂,具有较强的抗肿瘤作用,研究表明它在体外可以抑制多种肿瘤细胞增殖^[1-3]。同时,在卵巢癌、胃癌肿瘤株中^[4-5],TSA 被证实还是一种化疗增敏剂,具体机制尚未明确,目前 TSA 在耐药的肺癌细胞株中作用的研究少见。FAS 途径是介导细胞凋亡的重要信号通路。本实验选用人肺腺癌耐顺铂细胞株 A549/CDDP 作为体外模型,观察 TSA 诱导 A549/CDDP 细胞凋亡的生物学机制及对 FAS 表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料 A549/CDDP 细胞株(购自中南大学湘雅医学院细胞中心)以含 10% 小牛血清和 2 mol/L 顺铂的 R/MINI1640 培养液于 37 °C、5% CO₂ 中培养。R/MINI1640(Gibco 公司);小牛血清(杭州四季青公司);蛋白印迹法(Western blotting)试剂;兔抗山羊 IgG-FITC(北京中杉);兔抗山羊 IgG-HRP、山羊抗兔 IgG-HRP、山羊抗人 FAS 抗体、山羊抗人 procaspase-8 抗体、兔抗人 GAPDH 抗体(均为 Santa Cruz 公司产品)。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光染色观察细胞凋亡^[6] A549/CDDP 细胞用 0~500 nmol/L TSA, 37 °C、5% CO₂ 作用 24 h 后,加入 Hoechst

33258(终浓度为 10 μg/mL)和碘化丙啶(propidium iodide, PI)(终浓度为 40 μg/mL)溶液 37 °C 孵育 20 min,荧光显微镜下观察、成像(Eclipse ET2000-E, 日本 Nikon)。

1.2.2 细胞凋亡检测及细胞周期的分析^[7] 收集细胞用 PBS 漂洗细胞 3 次,75% 预冷乙醇固定过夜,离心半径 10 cm,1 000 r/min 离心 5 min,弃乙醇,用含 PI 100 μg/mL、0.5% TritonX-100、RNase 200 μg/mL 孵育 15 min,流式细胞仪(EPICS XL, 美国 COULTER)检测各期细胞比率。

1.2.3 间接免疫荧光检测 FAS 表达、荧光染色观察细胞凋亡 A549/CDDP 细胞用 0~500 nmol/L TSA、37 °C、5% CO₂ 作用 24 h,或 500 nmol/L TSA 分别处理不同时间,4% 的多聚甲醛固定 10 min,用 0.01 mol/L PBST(含 0.1% TritonX-100, pH 7.4)漂洗 5 min×3 次;2% 牛血清封闭 30 min。加未标记的山羊抗人 FAS 抗体(1:100 稀释,用 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 稀释,37 °C 作用 30 min。0.01 mol/L PBST 震荡漂洗 5 min×3 次;加兔抗山羊 IgG-FITC 荧光标记的二抗,37 °C 避光作用 30 min;0.01 mol/L PBST 避光漂洗 5 min×3 次;采用倒置荧光显微镜(Eclipse ET2000-E, 日本 Nikon)观察。

1.3 免疫印迹 免疫印迹方法参照文献[6]。

2 结 果

2.1 荧光染色观察结果 结果见插图 1,细胞经 0~500 nmol/L TSA 处理后,凋亡细胞被 Hoechst 33258 染为点状高亮蓝色,但视野下不见 PI 着色细胞,可见细胞主要发生了凋

亡;随着 TSA 浓度增高,染为高亮蓝色的典型凋亡细胞比率也增多,说明 TSA 诱导细胞凋亡具有浓度依赖性。

2.2 TSA 阻滞细胞周期于 S 期 结果见图 2,随浓度增加,TSA 使 G₁ 期和 G₂ 期细胞减少,S 期细胞增加,最终使细胞阻滞在 S 期,同时可见细胞凋亡峰也随 TSA 浓度增加而增高,细胞凋亡率由 3.9% 递增至 21.7%。

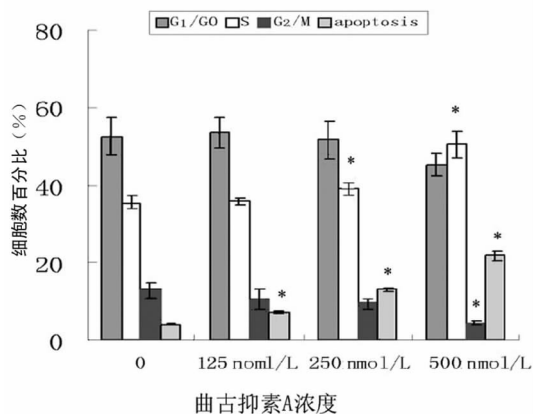


图 2 TSA 对细胞周期的影响

2.3 TSA 诱导 FAS 增加,激活 Caspase-8 结果见插 III 图 3 所示。0~500 nmol/L TSA 处理 A549/CDDP 细胞 24 h 后,FAS 表达水平升高,并具浓度依赖性。同时 Procaspase-8 蛋白水平随 TSA 浓度增加而下降,表明该酶被激活,并随 TSA 浓度升高而增加。随着 TSA 处理时间延长 Procaspase-8 蛋白水平下降,表明该酶被激活,同时胞浆中 FAS 含量增加,表明 TSA 能激活死亡受体介导凋亡途径。

3 讨 论

本研究显示,TSA 能诱导耐顺铂肺癌细胞株 A549/CDDP 凋亡,TSA 处理 A549/CDDP 细胞后,可见典型凋亡细胞。细胞经 Hoechst 33258 荧光染色后,荧光显微镜下观察到正常细胞核形态饱满,表现为弥散均匀的蓝色荧光,凋亡细胞则出现染色质凝集,荧光染色增强,染色质呈致密浓染的块状或颗粒状荧光,可见凋亡小体形成(图 1)。

流式细胞仪图谱分析发现,G₁ 期细胞和 G₂ 期细胞可能对 TSA 较为敏感,其中 G₁ 期细胞比例由 52.6% 下降为 45.2%,特别是 G₂ 期细胞,比例由 12.8% 降至 4.3%,而 S 期细胞比例由 35.4% 升到 50.5%,细胞周期进程被阻滞在 S 期,同时可以检测到明显的代表凋亡细胞的亚二倍体峰(图 2),凋亡峰从 3.9% 升到 21.7%。

许多研究结果表明去乙酰化酶抑制剂对细胞周期具有阻滞作用^[8]。本组研究表明,随着 TSA 浓度的增加,G₁ 期细胞减少,S 期细胞增加,可见 TSA 主要是阻滞细胞于 S 期,这与 Tóth 等^[9]的研究结果类似。研究显示 TSA 诱导细胞凋亡时,活性氧水平增加^[10],活性氧进入细胞核内可引起核酸氧化损伤,使细胞停留在 S 期进行核酸修复。如果 S 期的细胞得不到有效的修复,则会触发细胞凋亡。

去乙酰化酶抑制剂不仅可以诱导细胞周期阻滞,还能引起多种促进细胞凋亡的基因表达增加。有研究显示,TSA 处理细胞能改变 2%~5% 基因表达^[11]。本组研究结果显示,随着 TSA 浓度增加,FAS 表达水平上调。FAS(又称为 Apo-1 或 CD95)是肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor,

TNFR)超家族中含有死亡结构域的成员,是由 325 个氨基酸残基组成、富含半胱氨酸残基的 I 型膜蛋白。死亡受体有一个同源的、被称为死亡结构域的胞内序列,死亡结构域是死亡受体与胞内凋亡机制相连的基本结构。FAS 配基(FAS ligand, FASL)为 II 型膜蛋白。与其他 TNF 家族成员一样,FASL 也是一个同源三聚体分子,每个 FASL 三聚体与 3 个 FAS 分子结合,对有 FAS 表达的细胞有强细胞毒活性。它们在细胞凋亡的调控过程中扮演着极为重要角色。

当细胞凋亡被启动后,FAS 前体复合物与其膜受体 FASL 相互作用并形成了死亡诱导信号复合体(death inducing signaling complex, DISC)。因为死亡结构域有彼此结合的趋势,FAS 的靠近会使受体的死亡结构域聚集。接头蛋白质(FAS-associated death domain, FADD)通过自身死亡结构域与聚集的受体死亡结构域结合。FADD 含有一个死亡效应结构域(death effect domain, DED)可与酶原形式的 procaspase-8 中类似的回文重复的 DED 结构域结合。procaspase-8 的寡聚化导致其通过自身切割使酶活化^[12]。活化的 caspase-8 可激活 caspase-3,后者作用于特异性底物而使细胞进入凋亡的效应阶段,如胞浆和胞核浓缩、胞膜出泡、核片段化以及最终形成凋亡小体^[13]。

本研究结果表明,在 TSA 诱导 A549/CDDP 细胞凋亡的过程中,随着 TSA 处理时间延长 procaspase-8 的水解片段增加,表明这些酶被激活,同时胞浆中 FAS 含量增加。

本组实验证实,TSA 可以诱导人肺腺癌耐顺铂细胞株凋亡,其作用机制可能通过诱导 FAS 的表达,触发 FAS 介导的细胞凋亡信号系统。

既往研究表明,FAS/FASL 凋亡途径在几种肿瘤细胞株中证实是化疗药物诱导凋亡的重要途径,能提高肿瘤细胞对化疗的敏感性^[14-18]。TSA 是否通过死亡受体途径提高人肺腺癌耐顺铂细胞株增加对化疗的敏感性,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Wu P, Tian Y, Chen G, et al. Ubiquitin B: an essential mediator of trichostatin A-induced tumor-selective killing in human cancer cells [J]. Cell Death Differ, 2010, 17(1): 109-118.

[2] Emonds E, Fitzner B, Jaster R. Molecular determinants of the antitumor effects of trichostatin A in pancreatic cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(16): 1970-1978.

[3] Ma XX, Jin YN, Miao Q, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A modulates cell cycles in A2780 human ovarian cancer cell lines [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2009, 30(3): 263-266.

[4] Muscolini M, Cianfrocca R, Sajeva A, et al. Trichostatin A up-regulates p73 and induces Bax-dependent apoptosis in cisplatin-resistant ovarian cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6): 1410-1419.

[5] Zhang X, Yashiro M, Ren J, et al. Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, increases the chemosensitivity of anticancer drugs in gastric cancer cell lines [J]. Oncol Rep, 2006, 16(3): 563-568.

- [6] Zhang HT, Luo H, Wu J, et al. Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(27): 3377-3384.
- [7] Zhang HT, Feng ZL, Wu J, et al. Sodium butyrate-induced death-associated protein kinase expressions promote Raji cell morphological change and apoptosis by reducing FAK protein levels [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(11): 1783-1790.
- [8] Nian H, Delage B, Pinto JT, et al. Allyl mercaptan, a garlic-derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(9): 1816-1824.
- [9] Tóth KF, Knoch TA, Wachsmuth M, et al. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 18): 4277-4287.
- [10] Bruzzese F, Rocco M, Castelli S, et al. Synergistic antitumor effect between vorinostat and topotecan in small cell lung cancer cells is mediated by generation of reactive oxygen species and DNA damage-induced apoptosis [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(11): 3075-3087.
- [11] Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(32): 5459-5468.
- [12] Tungteakkhun SS, Filippova M, Fodor N, et al. The full-length isoform of human papillomavirus 16 E6 and its splice variant E6* bind to different sites on the procaspase 8 death effector domain [J]. *J Virol*, 2010, 84(3): 1453-1463.
- [13] Liu Y, Pop R, Sadegh C, et al. Suppression of FAS-FASL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo [J]. *Blood*, 2006, 108(1): 123-133.
- [14] 李萍, 杨志刚, 文国容, 等. 茶多酚对 ACC-M 细胞株 Fas, FasL 表达的影响 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(3): 268-269.
- [15] 郭芮伶, 吴国明, 钱桂生, 等. 多西紫杉醇诱导人肺腺癌细胞 A549 及其多药耐药细胞 A549/CDDP 凋亡的研究 [J]. *西部医学*, 2008, 20(2): 256-260.
- [16] Taghiyev AF, Guseva NV, Sturm MT, et al. Trichostatin A (TSA) sensitizes the human prostatic cancer cell line DU145 to death receptor ligands treatment [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(4): 382-390.
- [17] 李俊武, 张树梅, 任海全, 等. 白血病 NB4 细胞凋亡过程中 Fas 蛋白和基因的表达及意义 [J]. *山东医药*, 2010, 50(11): 60-61.
- [18] 刘文, 黄文芳, 卢贤瑜. 死亡受体信号传导途径研究进展 [J]. *检验医学与临床*, 2006, 3(9): 445-447.

(收稿日期: 2011-01-09 修回日期: 2011-03-22)

(上接第 2293 页)

- [5] Maxfield FR, McGraw TE. Endocytic recycling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(2): 121-132.
- [6] Lin WJ, Yeh WC. Implication of Toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock [J]. *Shock*, 2005, 24(3): 206-209.
- [7] Husebye H, Halaas O, Stenmark H, et al. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity [J]. *EMBO J*, 2006, 25(4): 683-692.
- [8] 李宇宁, 曹红卫, 郑江, 等. 一种高效 FITC 标记 LPS 方法的建立及应用 [J]. *第三军医大学学报*, 2009, 31(9): 822-824.
- [9] Green BT, Brown DR. Differential effects of clathrin and actin inhibitors on internalization of *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis* in porcine jejunal Peyer's patches [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 113(1/2): 117-122.
- [10] Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002(20): 709-760.
- [11] 伏建峰, 何新建. 脓毒症的发病机制及防治药物研发新思路 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(1): 66-68.
- [12] Krawczyk-Michalak K, Glapiński A, Brzezińska-Błaszczuk E. Toll-like receptors and their role in regulation of the inflammatory response in sepsis [J]. *Anestezjol Intens Ter*, 2008, 40(4): 253-259.
- [13] 聂海, 赖西南, 黄显凯, 等. 舱内腹部闭合性爆炸伤大鼠血浆内毒素的变化及意义 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(2): 146-148, 151.
- [14] Bartor GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization [J]. *Nat Immunol*, 2009, 9(4): 535-542.
- [15] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway [J]. *Cytokine*, 2008, 42(2): 145-151.
- [16] Kagan JC, Su T, Horng T, et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta [J]. *Nat Immunol* 2008, 9(4): 361-368.

(收稿日期: 2011-01-09 修回日期: 2011-03-22)