

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.005

## 抑制组蛋白去乙酰酶 1 后对人胃癌干细胞的影响\*

侯曦露<sup>1</sup>,唐 郡<sup>1</sup>,朱 斌<sup>1</sup>,严和中<sup>1</sup>,余森源<sup>1</sup>,贺 艳<sup>2</sup>,历海清<sup>1</sup>,王教学<sup>1</sup>,刘 卫<sup>1△</sup>

(1. 安徽医科大学附属解放军临床学院消化内科/解放军第一〇五医院消化内科,合肥 230601;

2. 蚌埠医学院附属解放军临床学院消化内科,合肥 230031)

**[摘要]** 目的 研究抑制组蛋白去乙酰化酶 1(HDAC1)后对人胃癌干细胞(GCSCs)增殖、干性及侵袭作用的影响。方法 以 CD44 为胃癌干性标志物,流式分选出 GCSCs。实时荧光定量核酸扩增检测(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测 GCSCs 与胃癌非干细胞中 HDAC1 的表达量。组蛋白去乙酰化酶抑制剂处理 GCSCs 后,CCK-8 法、克隆形成和 Transwell 实验观察细胞增殖和侵袭的变化;RT-qPCR 和 Western blot 检测其对凋亡、侵袭相关蛋白及干性标志物表达的影响。结果 HDAC1 在 GCSCs 中的表达比胃癌非干细胞高。实验组细胞的增殖和侵袭能力相较于对照组均减弱,且下调干性标志物及介导上皮间质转化。结论 抑制 HDAC1 的去乙酰化作用后 GCSCs 的增殖、干性及侵袭能力降低。

**[关键词]** 组蛋白去乙酰化酶 1;胃癌干细胞;增殖;干性;侵袭**[中图分类号]** R735.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2319-04

## Effect of HDAC1 deacetylase inhibition on gastric cancer stem cells\*

Hou Xilu<sup>1</sup>, Tang Jun<sup>1</sup>, Zhu Bin<sup>1</sup>, Yan Hezhong<sup>1</sup>, Yu Senyuan<sup>1</sup>, He Yan<sup>2</sup>, Li Haiqing<sup>1</sup>, Wang Jiaoxue<sup>1</sup>, Liu Wei<sup>1△</sup>

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated People's Liberation Army Clinical College of Anhui Medical

University/the 105th Hospital of People's Liberation Army, Hefei, Anhui 230060, China;

2. Department of Gastroenterology, the Affiliated People's Liberation Army Clinical College of

Bengbu Medical College, Hefei, Anhui 230031, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of HDAC1 deacetylase inhibition on the proliferation differentiation and invasion in human gastric cancer stem cells(GCSCs). **Methods** The GCSCs were selected as CD44 marker by using flow cytometry. RT-qPCR and Western Blot were used to detect the expression of HDAC1 in GCSCs and non GCSCs. The effect of proliferation and invasion in GCSCs were observed by CCK-8 assay, colony formation and transwell assay after the cells were treated with TSA. The expression of proteins related apoptosis, differentiation and invasion were detected by using RT-qPCR and Western blot. **Results** The expression of HDAC1 in GCSCs was higher than that in non GCSCs. The capacities of proliferation and invasion in experimental group were attenuated compared to the control group. The proteins related differentiation was down regulated, and epithelial mesenchymal transition was mediated. **Conclusion** After the deacetylation of HDAC1 was inhibited, the proliferation, differentiation and invasion of GCSCs were reduced.

**[Key words]** HDAC1; gastric cancer stem cells; proliferation; differentiation; invasion

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其病死率居恶性肿瘤的首位<sup>[1]</sup>。即使正规治疗后,大多数患者仍死于转移和复发<sup>[2]</sup>。肿瘤干细胞是一种具有自我更新和产生异质性肿瘤细胞系的肿瘤细胞亚群<sup>[3]</sup>。近年研究表明,肿瘤干细胞对多种肿瘤增殖和侵袭作用相关<sup>[3]</sup>。然而肿瘤干细胞增殖与侵袭的相关分子标志物与胃癌的关系尚需确定。表观遗传修饰是分子调控中的重要作用模式之一,在细胞的增殖、分化中起着重要的作用。组蛋白乙酰化/去乙酰化调控是表观遗传学中研究的主要内容,组蛋白去乙酰化酶 1(HDAC1)催化组蛋白去乙酰化作用,可使基因转录活性下降<sup>[1]</sup>。近年来研究表明,异常的组蛋白去乙酰化可能与肿瘤的发生、发展相关,并且 HDAC1 在结肠癌、肝癌、胰腺癌和前列腺癌中均高表达<sup>[4-8]</sup>。笔者前期研究结果提示,HDAC1 在胃癌干细胞(GCSCs)中表达异常,同时也提示 HDAC1 可能在 GCSCs 自我更新及分化过程中起一定的作用。因此,本研究通过 CCK-8 法、克隆形成、Transwell 实验及检测干性(SOX2、BMI1、c-Myc)、侵袭(E-cadherin、Vimentin)标志物的表达,探究去乙酰化酶抑制剂(TSA)抑制 HDAC1 去

乙酰化作用后对 GCSCs 中增殖、干性及侵袭的影响,以进一步明确 HDAC1 在 GCSCs 生长中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人胃癌 MGC803 细胞(购自中国科学院上海细胞库)培养于含 10% 胎牛血清、双抗(青霉素 100 U/mL+链霉素 100 μg/mL)的 RPMI-1640 培养液,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 和 100% 湿度培养箱中培养。将实验分成两组,每组培养 48 h,每 24 小时更换 1 次培养液。实验组:培养液中 TSA 浓度 400 nmol/L;对照组:培养液中与实验组 TSA 等量的 DMSO。

**1.2 主要试剂** RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物制品公司);CCK8(上海碧云天生物制品公司);TSA(美国 Cayman 公司);鼠抗人 HDAC1、SOX2、BMI1、c-Myc、GAPDH 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);鼠抗人 E-cadherin、Vimentin 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);羊抗鼠二抗(上海碧云天生物制品公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 流式分选** 收集 1×10<sup>6</sup> 个贴壁培养的胃癌 MGC803

\* 基金项目:南京军区面上 A 类项目(11MA041)。 作者简介:侯曦露(1989-),住院医师,硕士,主要从事胃癌的分子生物学研究。

△ 通讯作者, Tel:18909696246; E-mail:liuwei196432@sina.com。

细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,重悬在 100  $\mu$ L FACS 缓冲液中。设立实验组和对照组,实验组加入 CD133-PE 和 CD133-FITC 各 10  $\mu$ L,对照组为 CD133-PE 和 CD133-FITC 单阳性对照组,阴性对照加入 10  $\mu$ L 同型对照抗体,于 4  $^{\circ}$ C 避光孵育,每隔 10 min 混悬 1 次细胞,30 min 后流式细胞仪检测。流式分选的目标细胞群体为 CD133<sup>+</sup> 和 CD133<sup>-</sup> 细胞亚群。

**1.3.2 平板克隆形成** 用 0.25% 胰酶彻底分离 MGC803-control 和 MGC803-TSA 细胞,使其成为单细胞悬液,以 200 个/孔的浓度接种到 6 孔板中。用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 2 周,Giemsa 染色后计数菌落个数。

**1.3.3 实时荧光定量核酸扩增检测(RT-qPCR)** 按照 TRIzol(TAKARA,Kyoto,Japan)说明书提取总 RNA,经紫外分光光度计测量其纯度及浓度后,分别取总 RNA 1 000 ng,按照逆转录试剂盒说明书操作,逆转录反应合成 20  $\mu$ L 体系 cDNA。以反应所得 cDNA 及 SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA,Kyoto,Japan)进行定量 PCR 扩增,以 GAPDH 为内参照。所有引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 检测引物序列

目的基因	引物序列(3'-5')
GAPDH	上游:AGCCACATCGCTCAGACA 下游:GCCCAATACGACCAAATCC
HDAC1	上游:CGCATGACTCATAAT 下游:GCTGTGGTACTTGGTCATCT
E-cadherin	上游:TGCCAGAAAATGAAAAAGG 下游:GTGTATGTGGCAATGCGTTC
Vimentin	上游:GGGACCTCTACGAGGAGGAG 下游:CGCATTGTCAACATCCTGTC
SOX2	上游:CATCACCCACAGCAAATGACA 下游:GCTCCTACCGTACCCTAGAACTT
BMI1	上游:TCGTTCTTGTTATTACGCTGTTTT 下游:CGGTAGTACCCGCTTTTAGGC
c-Myc	上游:TCGGACTCTCTGCTCTCCTC 下游:CTTGTCGTTCTCCTCGGTGT

**1.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测** 用含有 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上裂解细胞 30 min。将总细胞裂解物在 4  $^{\circ}$ C 下离心 15 min 后吸取上清液并用 DAB 试剂(Thermo,USA)测量总蛋白水平。以 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,半干电转移法转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,室温下摇床封闭 2 h。4

$^{\circ}$ C 过夜敷一抗,PBST 洗膜后放入羊抗鼠二抗(1:5 000)中,室温孵育 1~2 h,PBST 洗膜后电化学发光法显色,以 GAPDH 为内参照。

**1.3.5 CCK-8 检测** 用 0.25% 胰酶分离 MGC803-control 和 MGC803-TSA 细胞,使其成为单细胞悬液,以 5 000 个/孔的浓度接种到 96 孔板中。每组设 4 个平行孔,并设 3 个不含细胞的空白对照,37  $^{\circ}$ C 环境中用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 24 h 使细胞贴壁后,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,继续培养 2 h 后检测光密度(OD)值(450 nm)。

**1.3.6 体外侵袭实验** 在 Transwells 上室中加入 20  $\mu$ L Matrigel/RPMI-1640 (1:2)混合液后放入 37  $^{\circ}$ C 孵育箱中 30 min 使其凝固。用 0.25% 胰酶分离 MGC803-control 和 MGC803-TSA 细胞,使其成为单细胞悬液,以  $3 \times 10^4$  个/孔的浓度接种到 Transwells 上室中。上室再加入 200  $\mu$ L 无血清 RPMI-1640 培养基,下室加入 500  $\mu$ L 含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。在 37  $^{\circ}$ C 中培养 24 h 后,用 4% 多聚甲醛将上室细胞固定 15 min,结晶紫染色 5 min,最后用棉签小心擦拭染色细胞。随机取 10 个 200 倍下视野拍照并计数细胞个数。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HDAC1 在 GCSCs 与胃癌非干细胞中的表达** 将流式分选的 CD133<sup>+</sup> GCSCs 和 CD133<sup>-</sup> 胃癌非干细胞分别通过 RT-qPCR 和 Western blot 的方法在 mRNA 和蛋白水平上检测 HDAC1 表达水平。结果表明在 mRNA 和蛋白水平上 HDAC1 在 CD133<sup>+</sup> GCSCs 的表达高于 CD133<sup>-</sup> 胃癌非干细胞,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 1、2。

**2.2 GCSCs 增殖能力的变化** 抑制 HDAC1 去乙酰化导致 GCSCs 增殖能力降低。为了检测 HDAC1 去乙酰化对 GCSCs 增殖能力的影响,采用 200 nmol/L TSA 处理 GCSCs 24 h。细胞增殖通过 CCK-8 实验和克隆实验检测。如图 3 所示:前 3 d 实验组与对照组中细胞的增殖能力差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。后 3 d 实验组 GCSCs 的增殖能力较对照组逐渐减弱,而且随着时间的推移,两组差距增大( $P < 0.05$ )。TSA 抑制 GCSCs 的增殖能力且具有时间依赖性。克隆形成实验结果也表明,实验组 GCSCs 的克隆形成能力比对照组明显减弱( $P < 0.01$ ),HDAC1 去乙酰化被抑制后 GCSCs 的增殖能力明显降低,见图 4。

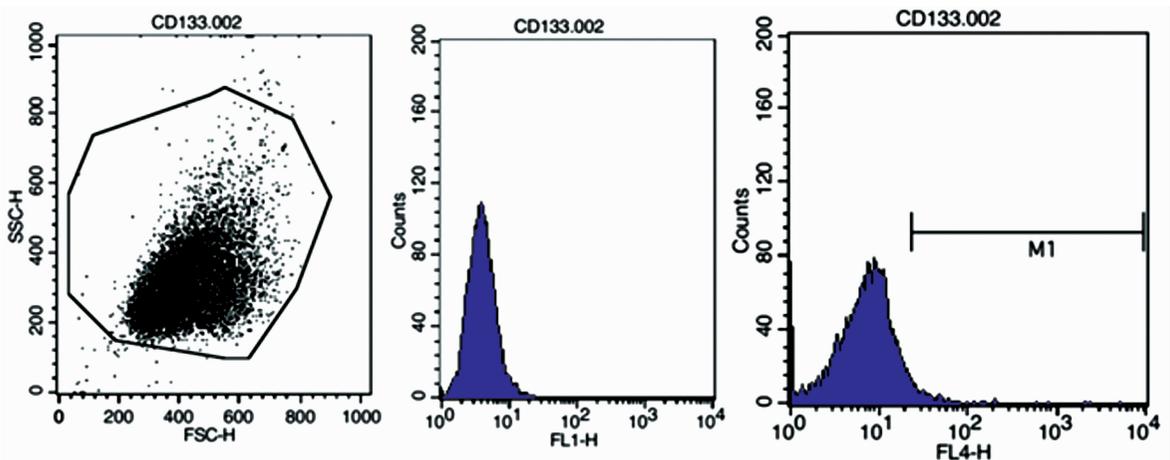


图 1 流式分选出 CD133<sup>+</sup> 和 CD133<sup>-</sup> 的胃癌细胞

**2.3 处理 GCSCs 后侵袭能力的变化** 抑制 HDAC1 去乙酰化导致 GCSCs 侵袭能力降低 基于侵袭是 GCSCs 重要特征之一,通过 Transwell 实验检测 GCSCs 的侵袭能力。为了评估 HDAC1 在 GCSCs 侵袭中的作用,用 TSA 抑制 HDAC1 去乙酰化,从而使 HDAC1 失去功能。实验组 GCSCs 的侵袭能力显著减弱(50%,  $P < 0.01$ ),见图 5。

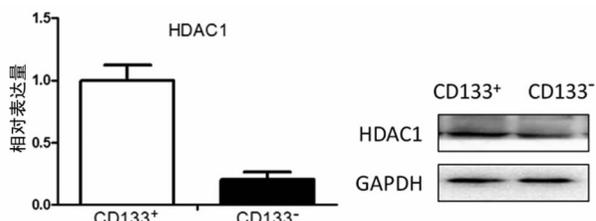


图 2 RT-qPCR 和 Western blot 鉴定 HDAC1 在 CD133<sup>+</sup> 和 CD133<sup>-</sup> 胃癌细胞中的表达量

**2.4 抑制 HDAC1 去乙酰化导致 GCSCs 干性蛋白的下调和介导上皮间质转化(EMT)** 因为胃癌肿瘤干性标志物都不够特异,所以检测了几种可能维持肿瘤干性的转录因子表

达情况。RT-qPCR 和 Western blot 表明实验组细胞的 Sox2、Bmi1 和 c-Myc 的 mRNA 和蛋白表达量均比对照组细胞的表达量低( $P < 0.05$ )。为探究实验组侵袭能力减弱的可能机制,笔者进一步检测了 TSA 抑制 HDAC1 乙酰化作用后细胞中侵袭相关分子的表达,发现抑制 HDAC1 乙酰化后 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达均降低( $P < 0.05$ )。而 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达均增高( $P < 0.05$ ),见图 6。

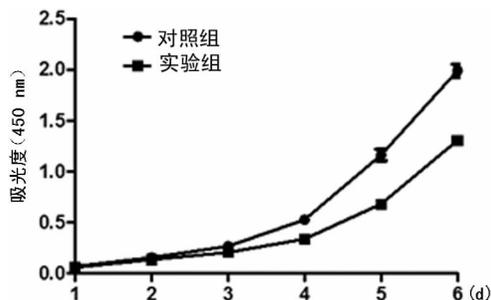
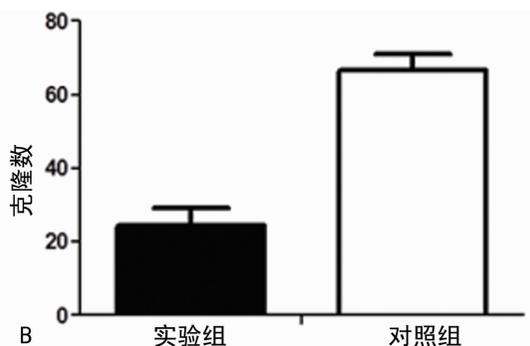
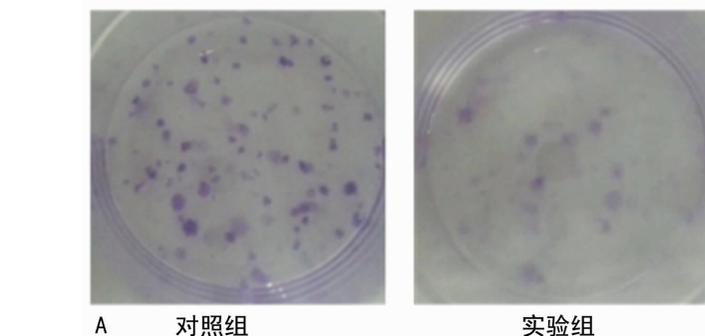
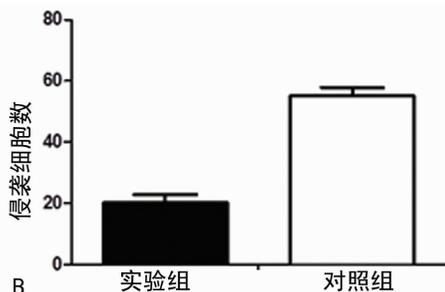
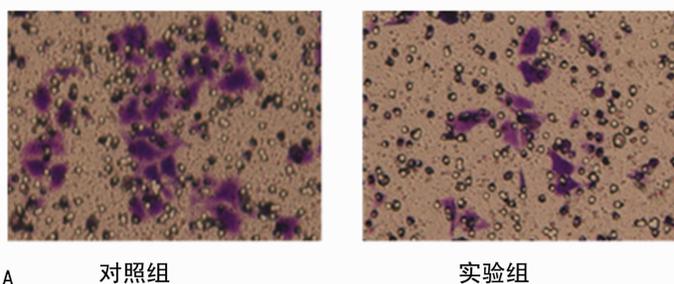


图 3 CCK-8 实验检测 TSA 处理 GCSCs 后增殖能力的变化



A: 两组克隆实验; B: 两组克隆个数定量分析。

图 4 克隆实验检测 TSA 处理 GCSCs 后增殖能力的变化



A: 两组 Transwell 实验( $\times 200$ ); B: 两组侵袭细胞数定量分析。

图 5 处理 GCSCs 后侵袭能力的变化

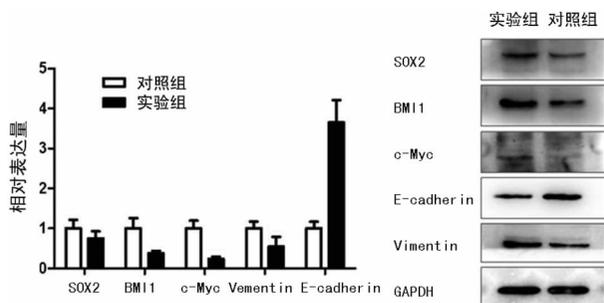


图 6 RT-qPCR 和 Western blot 检测 TSA 处理 GCSCs 后干性及侵袭相关蛋白表达的变化

### 3 讨论

HDACs 属于去乙酰化酶家族,有 I、II、III、IV 4 型。HDACs 可通过调节组蛋白或者转录因子等其他蛋白的转录从而调节基因转录<sup>[9]</sup>。近年发现,HDACs 参与肿瘤的发生、发展,且在人类多种肿瘤细胞中均高表达,如 HDACs 可增加肿瘤细胞的增殖能力,可影响细胞外基质从而增强肿瘤细胞侵袭和转移的能力。同时 HDACs 抑制剂可通过抑制去乙酰化作用从而抑制体外肿瘤细胞的增殖<sup>[10]</sup>。组蛋白的去乙酰化修饰在胚胎干细胞干性的维持和分化过程中起着非常重要的作用。大量研究表明,胚胎干细胞特征性的基因都受去乙酰化水平的调控,例如 BMI1、OCT4 和 SOX2 等,对胚胎干细胞的自

我更新和分化的状态产生重要影响<sup>[11]</sup>。其中,HDAC1 是一种与肿瘤关系最密切的组蛋白去乙酰化酶<sup>[4]</sup>。

HDAC1 是由美国哈佛大学的 Taunton 等发现的第 1 个哺乳动物的组蛋白去乙酰化酶,其蛋白质含有 482 个氨基酸,相对分子质量约  $5.5 \times 10^4$ 。HDAC1 不仅抑制基因的转录,而且可以通过线粒体转位促进癌基因合成,抑制细胞凋亡与分化障碍。因此,深入探讨 HDAC1 的调节机制有助于研发高效安全的靶向药物。前期笔者验证了 HDAC1 在 GCSCs 中高表达。为了探究 HDAC1 去乙酰化作用对 GCSCs 的影响,通过 TSA 抑制 HDAC1 的去乙酰化作用,发现抑制乙酰化后 GCSCs 的增殖、侵袭及其干性能力均减弱。另外,庄涵虚等<sup>[1]</sup>用 HDAC1 siRNA 干扰片段干扰 HDAC1 的表达后发现 HDAC1 siRNA 可使胃癌细胞 MGC-803 癌基因 c-Myc 基因表达降低,下调凋亡相关蛋白 caspase-9、caspase-3 及抗凋亡蛋白 BCL-2。同时 Zhang 等<sup>[12]</sup>发现 HDAC 抑制剂能活化胃癌细胞系中的抑癌基因 p21 VAF1,组蛋白去乙酰化可使胃癌细胞中 p21VAF1 基因失活,而 p21VAF1 基因可影响 c-Myc、Bcl-2 的表达,从而抑制 DNA 的复制,阻断细胞周期。

研究胃癌细胞的干性对于了解胃癌细胞转移的机制至关重要。然而,GCSCs 的分离和培养仍具有挑战性。尽管大多数的胃癌细胞表达 CD133,但其可作为 GCSCs 的一个标志分子。本研究发现抑制 HDAC1 去乙酰化后,干性因子 SOX2、BMI1、c-Myc 的表达也随之降低。张永杰等<sup>[13]</sup>发现在肠型胃癌组织标本中 HDAC1 和 Oct4 两者表达呈正相关,且 HDAC1 可通过调节 Oct4 的表达从而维持干细胞的干性特征和多能性。说明 HDAC1 的去乙酰化作用对维持 GCSCs 的干性有影响,因此 HDAC1 有望成为鉴定和分离 GCSCs 的一个新的标志物。

EMT 是胚胎发育过程中的一个关键步骤,并且是休眠肿瘤细胞获得侵袭能力的一种最常见的现象<sup>[14]</sup>。越来越多的证据表明 EMT 与 GCSCs 侵入邻近胃癌组织相关<sup>[2]</sup>。EMT 的主要分子机制为上调间质标志物和下调上皮标志物<sup>[15]</sup>。研究发现,抑制 HDAC1 去乙酰化水平后,GCSCs 间质标志物 Vimentin 表达降低和上皮标志物细胞黏附分子 E-cadherin 表达升高,该结果代表 EMT 过程的抑制。本研究结果表明 HDAC1 去乙酰化作用通过介导 EMT 促进 GCSCs 的侵袭作用。

综上所述,TSA 抑制 GCSCs HDAC1 去乙酰化作用后,体外 GCSCs 的增殖、干性和侵袭能力显著降低。其机制可能与下调干性标志物、凋亡相关蛋白及 EMT 相关蛋白相关。本研究丰富了 HDAC1 在 GCSCs 中的作用研究,探究其成为胃癌预测指标的可能性。但其在肿瘤致瘤、进展、增殖、侵袭等方面相关具体分子机制复杂,所以 HDAC1 影响 GCSCs 干性、增殖和侵袭的其他机制有待进一步研究。

## 参考文献

[1] 庄涵虚,马旭东,赖亚栋,等. RNA 干扰沉默 HDAC1 基因对胃癌细胞增殖、凋亡、组蛋白乙酰化和甲基化的影响[J]. 南方医科大学学报,2014,34(2):246-250.

[2] Yang L, Ping YF, Yu X, et al. Gastric cancer stem-like

cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype [J]. *Cancer Lett*,2011,310(1):46-52.

- [3] Yang L, Ren Y, Yu X, et al. ALDH1A1 defines invasive cancer stem-like cells and predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mod Pathol*,2014,27(5):775-783.
- [4] 董洁,尹晓燕,崔铮,等. 组蛋白去乙酰化酶 1 对人胃癌发生发展的影响[J]. *中国医药指南*,2011,9(17):60-62.
- [5] 李曾,廖洪,谭政,等. 组蛋白去乙酰化酶 1 在人肾癌、膀胱癌和前列腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *广东医学*,2012,33(1):92-95.
- [6] 吕必华,张玲,朱长才,等. 姜黄素抑制 HepG2 细胞 HDAC1 活性及促进 P21WAF1/CIP1 表达的研究[J]. *中国中药杂志*,2007,32(19):2051-2055.
- [7] Higashijima J, Kurita N, Miyatani T, et al. Expression of histone deacetylase 1 and metastasis-associated protein 1 as prognostic factors in colon cancer[J]. *Oncol Rep*,2011,26(2):343-348.
- [8] 高道键,徐岷,张玉琦,等. RNA 干扰组蛋白去乙酰化酶 1 对人胰腺癌细胞增殖、凋亡的调控机制研究[J]. *解放军医学杂志*,2010,35(4):380-383.
- [9] Pflum MK, Tong JK, Lane WS, et al. Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation[J]. *J Biol Chem*,2001,276(50):47733-47741.
- [10] 谷华伟,刘艳,桑军侠,等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂的研究进展[J]. *中国当代医药*,2015,7(16):15-21.
- [11] Hattori N, Imao Y, Nishino K, et al. Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells[J]. *Genes Cells*,2007,12(3):387-396.
- [12] Zhang Q, Song Y, Chen W, et al. By recruiting HDAC1, MORC2 suppresses p21 Waf1/Cip1 in gastric cancer[J]. *Oncotarget*,2015,6(18):16461-16470.
- [13] 张永杰,秦叔逵,王杰军,等. 肠型胃癌中 HDAC1 与 Oct4 表达的相关性研究[J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*,2013,7(14):6387-6390.
- [14] Lee HJ, Park MK, Lee EJ, et al. Resolvin D1 inhibits TGF- $\beta$ 1-induced epithelial mesenchymal transition of A549 lung cancer cells via lipoxin A4 receptor/formyl peptide receptor 2 and GPR32[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2013,45(12):2801-2807.
- [15] Xu YF, Ge FJ, Han B, et al. High-mobility group box 1 expression and lymph node metastasis in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *World J Gastroenterol*,2015,21(11):3256-3265.

(收稿日期:2015-11-28 修回日期:2016-01-14)