

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.14.002

网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20190529.1625.021.html (2019-05-31)

## 曲古霉素通过自噬途径对 K7M2 wt 细胞凋亡的影响\*

汪 瑜<sup>1</sup>, 罗梅懿<sup>2</sup>, 黄 歆<sup>1</sup>, 宋永丹<sup>1</sup>, 陈维永<sup>1△</sup>

(1. 四川省成都市第七人民医院/四川省成都市肿瘤医院 610041; 2. 四川省医学科学院·四川省人民医院, 成都 610072)

**[摘要]** 目的 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古霉素(TSA)对小鼠骨肉瘤 K7M2 wt 细胞增殖的抑制作用,并从凋亡和自噬途径探究其作用机制。方法 CCK-8 法检测 TSA 对 K7M2 wt 细胞增殖的影响;流式细胞术(FCM)检测 K7M2 wt 细胞凋亡率;Western blot 检测 TSA 对 K7M2 wt 细胞凋亡和自噬相关蛋白表达的影响;用自噬抑制剂研究自噬对细胞凋亡的影响。结果 CCK-8 结果显示 TSA 对 K7M2 wt 细胞增殖有显著抑制作用,且呈浓度和时间依赖性;FCM 结果显示 TSA 能够诱导 K7M2 wt 细胞凋亡;Western blot 结果显示 TSA 能够上调促凋亡蛋白 caspase-3 和 Bax 表达,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达;同时上调自噬标志蛋白 Beclin-1 和 LC3-II 的表达;自噬抑制剂能够增加 TSA 对 K7M2 wt 细胞的凋亡作用。结论 自噬参与了 TSA 诱导 K7M2 wt 细胞凋亡的过程,且在该过程中对细胞起到保护作用。

**[关键词]** 曲古霉素;细胞凋亡;自噬;骨肉瘤**[中图分类号]** R966**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)14-2345-04

## Effect of TSA on apoptosis of K7M2 wt cells by autophagy pathway\*

WANG Yu<sup>1</sup>, LUO Meiyi<sup>2</sup>, HUANG Xin<sup>1</sup>, SONG Yongdan<sup>1</sup>, CHEN Weiyong<sup>1△</sup>

(1. Chengdu Seventh People's Hospital/Chengdu Cancer Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Sichuan Academy of Medical Sciences &amp; Sichuan People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the inhibitory effect of histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) on the proliferation of mouse osteosarcoma K7M2 wt cells and explore its mechanism. **Methods** CCK-8 assay was used to detect the proliferation of K7M2 wt cells, the flow cytometry (FCM) was used to detect the apoptosis of K7M2 wt cells, Western blot was used to detect the expression levels of the proteins related with apoptosis and autophagy. After joining autophagy inhibitors, the effect of autophagy on apoptosis was studied. **Results** CCK-8 assay showed that TSA could significantly inhibit the proliferation of K7M2 wt cells, which was dose- and time-dependent manners; FCM indicated that TSA induced K7M2 wt cells apoptosis; Western blot results showed that TSA up-regulated the expression of caspase-3 and Bax, down-regulated the expression of Bcl-2. Meanwhile, TSA increased the expression of Beclin-1 and LC3-II; after using autophagy inhibitors, it could induce apoptosis of K7M2 wt cells by TSA. **Conclusion** Autophagy is involved in the process of TSA-induced apoptosis of K7M2 wt cells, and it protects cells during this process.

**[Key words]** trichostatin A; apoptosis; autophagy; osteosarcoma

骨肉瘤是常见的骨原发性恶性肿瘤,主要发生于儿童和青少年的股骨远端和胫骨近端等长骨部位<sup>[1]</sup>。骨肉瘤起源于间叶组织,恶性程度和侵袭性高,易转移,尤其是易转移至肺部。早先对骨肉瘤最主要的治疗方式是外科切除手术,治疗效果较差,患者生存率低于 20%<sup>[2]</sup>。近年来,随着化疗在骨肉瘤中的应用,患者生存率提高至 70%以上,但仍未达到人们的期望水平<sup>[3]</sup>。因此,寻找一种灵敏度高、不良反应小的抗骨肉瘤药物成为临床和基础研究中需迫切解决的问题。曲古霉素(trichostatin A, TSA)是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,对乳腺癌<sup>[4]</sup>、肝癌<sup>[5]</sup>、骨肉瘤<sup>[6]</sup>等多种肿瘤均有抑制作用,但其抗肿瘤机制尚不明确。细

胞凋亡是指受基因控制的主动性程序性死亡。自噬是细胞自我保护的一种手段,通过自噬清除受损蛋白质和细胞器,克服营养缺乏或低氧等环境,从而促进肿瘤细胞的生存和发展。细胞凋亡和自噬与肿瘤的发生、发展有紧密联系,通过凋亡和自噬途径研究肿瘤相关机制已成为肿瘤领域研究热点之一<sup>[7]</sup>。研究发现 TSA 杀伤乳腺癌细胞时,能够促进细胞的凋亡和上调自噬水平<sup>[8]</sup>,而自噬在 TSA 杀伤骨肉瘤中的作用还未见报道。因此,本研究旨在探讨自噬在 TSA 抑制骨肉瘤细胞增殖和诱导骨肉瘤细胞凋亡中的作用,为 TSA 治疗骨肉瘤提供理论依据,也为抗肿瘤药物的研究提供新思路,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞与试剂** 小鼠骨肉瘤 K7M2 wt 细胞和 DMEM 高糖培养基购于武汉普诺赛公司;胎牛血清购于美国 Clark 公司;胰酶、双抗购于美国 Hyclone 公司;CCK-8 及 Western blot 相关试剂购于合肥 Bio-sharp 公司;异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)双染细胞凋亡检测试剂盒购于江苏凯基生物公司;Bax、Bcl-2、Beclin-1、LC3 抗体购于美国 Abcam 公司;氯喹(Chloroquine, CQ)购于美国 Sigma 公司。

**1.1.2 仪器** 台式低速离心机(TDZ4-WS,长沙湘仪离心机仪器有限公司);二氧化碳培养箱(MCO-15AC,上海三洋电机国际贸易有限公司);酶标仪(Multiskan,苏州赛默飞世尔仪器有限公司);流式分析仪(Cytoflex,美国 Beckman 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** K7M2 wt 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,培养条件 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的培养箱。细胞生长至 80% 融合度时,进行传代或进行实验。

**1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖率** 取培养的 K7M2 wt 细胞,调整细胞浓度为  $4 \times 10^4$ /mL,接种于 96 孔板,继续培养,待细胞贴壁后,分别加入终浓度为 50、100、200、400、600 nmol/L 的 TSA,同时设置对照组(TSA 浓度为 0),每组设 6 个复孔。继续培养 12、24、48 h 后,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8,4 h 后终止培养,用酶标仪(450 nm)测定各孔细胞吸光度(OD)值。选出 TSA 实验时基础浓度,并计算各组细胞存活率及半数致死浓度(IC<sub>50</sub>)。细胞存活率=(药物组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%。

**1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率** 取培养的 K7M2 wt 细胞,调整浓度为  $4 \times 10^6$ /mL,接种于 6 孔板,继续培养至贴壁后,用 TSA 的基础浓度及倍数浓度与抑制剂 CQ 单独或联合作用处理 24、48 h,离心收集细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞后,分别加入 5  $\mu$ L Annexin V 和 5  $\mu$ L PI,混匀后,室温(20~25℃)避光孵育 15 min。1 h 内上机检测各组细胞凋亡情况,实验重复 3 次。

**1.2.4 Western blot 检测各蛋白表达情况** 收集经实验预处理的 K7M2 wt 细胞,提取各组细胞总蛋白并用 BCA 法进行定量。各组取等量蛋白质用 10% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳进行分离,分离后的蛋白质转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h 后,结合一抗(Bax、Bcl-2、Beclin-1、LC3 按 1:1 000 稀释, $\beta$ -actin 按 1:400 稀释),4℃ 孵育过夜后 TBST 清洗,然后二抗 IgG(稀释比例均为 1:5 000)室温孵育 1 h, TBST 清洗,ECL 暗室显色。显色后的蛋白使用 Bio-Rad 全功能成像系统采集图像,Image-ProPlus 分析光密度,以  $\beta$ -actin 为内参,计算各组蛋白质的相对表达水平,

实验重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,计数资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较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 抑制 K7M2 wt 细胞增殖** 用不同浓度 TSA 分别作用 K7M2 wt 细胞 12、24、48 h,细胞存活率均受到抑制,且呈明显浓度依赖性和时间依赖性。TSA 对骨肉瘤细胞 12、24 和 48 h 的 IC<sub>50</sub> 分别为 1 061、539 和 338 nmol/L。选用 338 nmol/L TSA 作为后期实验的基础浓度,见图 1。

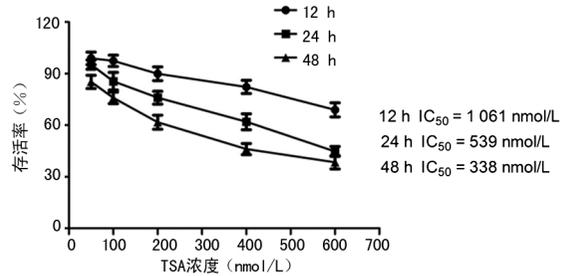
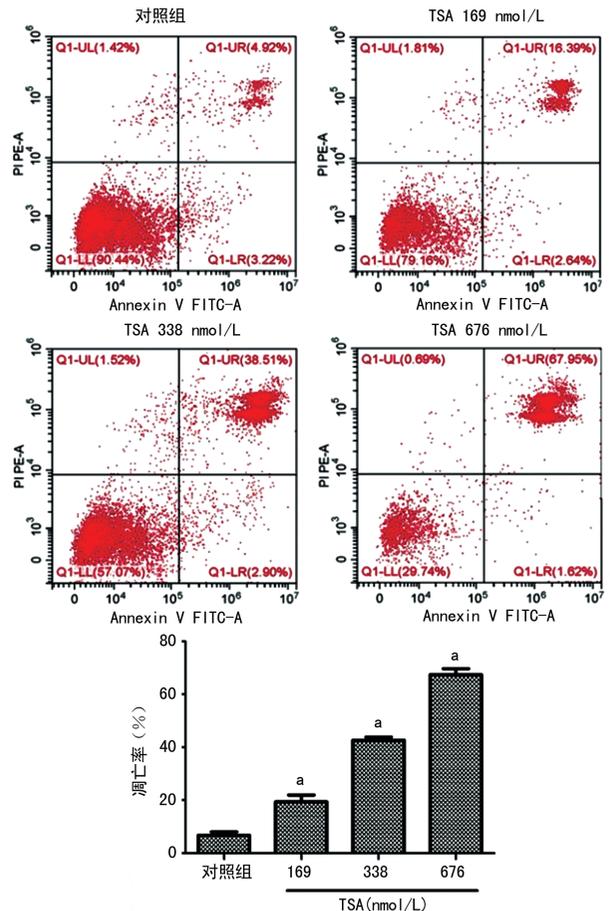


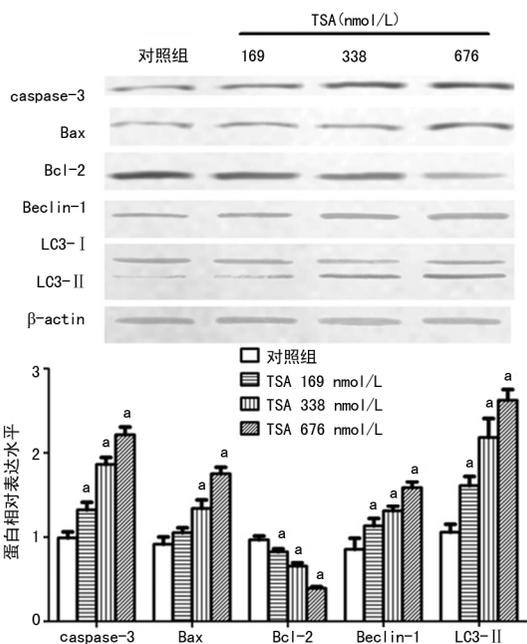
图 1 不同浓度 TSA 对 K7M2 wt 细胞存活率的影响

**2.2 TSA 促进 K7M2 wt 细胞凋亡** 分别用不同浓度 TSA[0(对照组)、169、338 和 676 nmol/L]处理细胞 48 h 后,随着 TSA 浓度升高,细胞凋亡率也升高。与对照组比较,各 TSA 浓度组细胞凋亡率均显著升高( $P < 0.01$ ),见图 2。



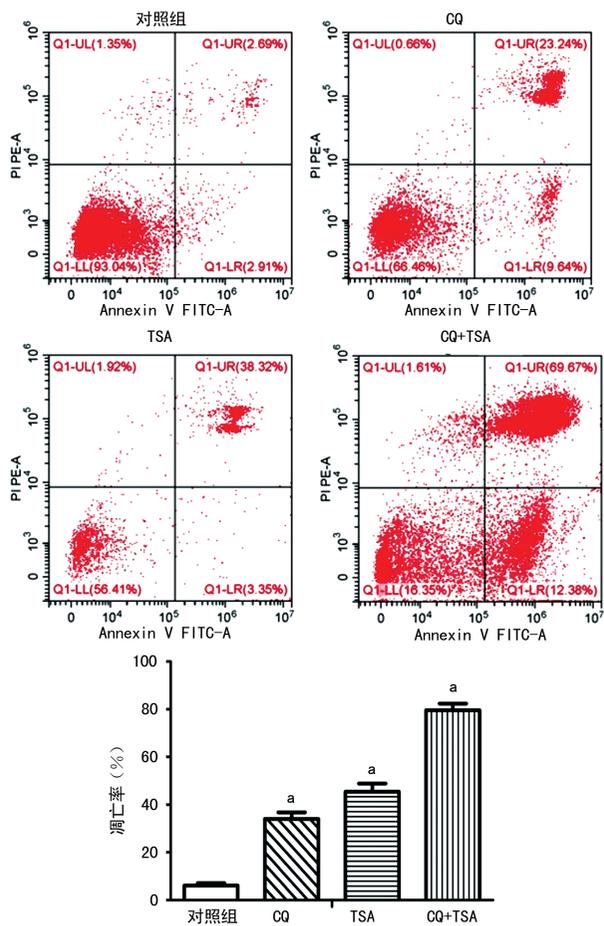
<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

图 2 TSA 诱导骨肉瘤 K7M2 wt 细胞凋亡



a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

图 3 TSA 对 K7M2 wt 细胞凋亡及自噬相关蛋白的影响



a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

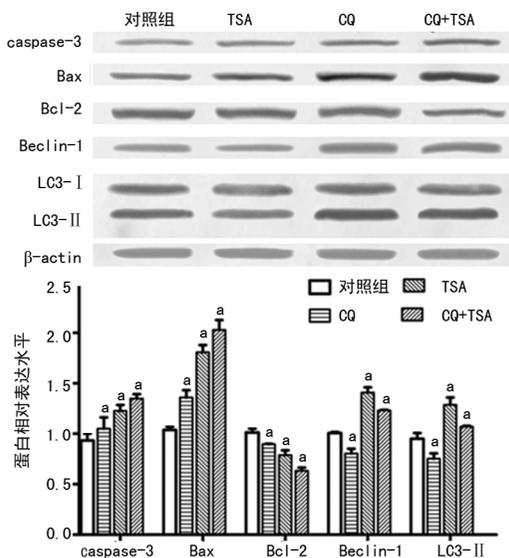
图 4 CQ 和 TSA 联用促进 K7M2 wt 细胞凋亡

**2.3 Western blot 检测凋亡及自噬相关蛋白** 用 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达变化,结果显示用不同浓度 TSA 处理 K7M2 wt 细胞 24 h 后,促凋亡蛋白 caspase-3 和 Bax 表达水平均显著上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著下调;自噬相关蛋白 Beclin-1 和

LC3-II 表达水平同样显著上调 ( $P < 0.05$ )。以 676 nmol/L TSA 变化最显著,见图 3。

**2.4 CQ 和 TSA 联用对细胞凋亡的影响** 用流式细胞术检测自噬抑制剂 CQ 和 TSA 对细胞凋亡的影响,与对照组比较,CQ 和 TSA 单独作用或联用均能显著提高 K7M2 wt 细胞凋亡率,且联用后细胞凋亡率显著高于 CQ 和 TSA 单独作用 ( $P < 0.05$ ),表明 CQ 可以协同增效 TSA 诱导的 K7M2 wt 细胞凋亡,见图 4。

**2.5 CQ 和 TSA 联用对细胞凋亡及自噬相关蛋白的影响** Western blot 检测结果显示,CQ 能够抑制 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白的表达,与对照组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较,CQ 处理后促凋亡蛋白 caspase-3 和 Bax 表达上调,Bcl-2 表达下调,其中 CQ 和 TSA 联合作用的蛋白变化最为显著 ( $P < 0.05$ ),见图 5。



a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

图 5 CQ 和 TSA 联用对 K7M2 wt 细胞凋亡及自噬相关蛋白的影响

### 3 讨论

组蛋白去乙酰化是抑癌基因失活的重要机制之一,如何抑制组蛋白去乙酰化的水平,对于抗肿瘤研究具有重要的意义<sup>[9]</sup>。组蛋白去乙酰化酶抑制剂能够抑制组蛋白去乙酰化,进而抑制肿瘤细胞的增殖和分化,是一类有极大应用价值的抗肿瘤药物。TSA 是第 1 个被发现的具有抑制组蛋白去乙酰化酶作用的天然产物。本研究通过体外培养小鼠骨肉瘤 K7M2 wt 细胞,探讨 TSA 对 K7M2 wt 细胞存活率的影响,结果发现 TSA 可显著抑制 K7M2 wt 细胞的存活,且呈浓度和时间依赖性。这与 HEPP 等<sup>[10]</sup>研究 TSA 对白血病细胞抑制作用相一致。

细胞凋亡是受多基因精确控制的程序性死亡。大多数抗肿瘤药物都能引起肿瘤细胞凋亡,因此,诱导肿瘤细胞凋亡的能力成为评价抗肿瘤药物药效的主要指标之一<sup>[11]</sup>。本研究发现,用 169 nmol/L TSA 处理 K7M2 wt 细胞 48 h 后,细胞凋亡率明显升高,随

着 TSA 浓度的增加, K7M2 wt 细胞凋亡率增加。同时 Western blot 实验结果显示 TSA 处理后, K7M2 wt 细胞中促凋亡蛋白 caspase-3 和 Bax 表达上调, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 明显下调。表明 TSA 能够诱导 K7M2 wt 细胞发生凋亡。

自噬是不依赖 caspase 途径的细胞程序性死亡, 与细胞凋亡关系密切<sup>[12]</sup>。为了进一步完善 TSA 抑制骨肉瘤细胞增殖的作用机制, 笔者进行了探究。Beclin-1 能够正向调控细胞自噬, 是自噬形成的重要参与者<sup>[13]</sup>。LC3 参与自噬体膜的形成, 包括 LC3-I 和 LC3-II 两种形式, 其中 LC3-II 定位于自噬体膜, 是自噬体的分子标志物<sup>[14]</sup>。本实验用不同浓度的 TSA 处理 K7M2 wt 细胞 24 h 后, 发现 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白表达上调, 且呈浓度依赖性, 表明 TSA 能够诱导 K7M2 wt 细胞自噬的发生。

为了探究 TSA 对 K7M2 wt 细胞作用时自噬和凋亡的关系, 本研究用自噬抑制剂 CQ 和 TSA 联合作用细胞, 分析细胞凋亡的变化, 结果发现 CQ 联合 TSA 能够有效降低自噬相关蛋白 Beclin-1 和 LC3-II 的表达, 进一步增加细胞凋亡率和提高凋亡相关蛋白 caspase-3 和 Bax 的表达, 降低 Bcl-2 的表达, 提示 TSA 诱导的自噬被抑制后, 提高了 K7M2 wt 细胞凋亡。这与周宪春等<sup>[8]</sup>报道的自噬抑制剂 3-MA 能够提高 TSA 诱导 T47D 细胞凋亡相同。

综上所述, 本研究发现 TSA 能够抑制 K7M2 wt 细胞的增殖, 作用机制可能与诱导细胞凋亡相关; 自噬在 TSA 诱导 K7M2 wt 细胞凋亡过程中对细胞起保护作用, 当加入自噬抑制剂 CQ 后, 降低了自噬对细胞凋亡的保护作用, 从而导致细胞凋亡率升高。本研究证明 TSA 诱导 K7M2 wt 细胞凋亡可能是通过自噬途径, 但 TSA 通过哪些具体的通路介导 K7M2 wt 细胞发生自噬及自噬途径如何调控 K7M2 wt 细胞凋亡仍不明确, TSA 在体内能否促进骨肉瘤细胞的凋亡也不明确。因此, 在后期研究中需要进一步探究 TSA 介导 K7M2 wt 细胞发生自噬及自噬介导细胞凋亡的具体机制, 并进行裸鼠骨肉瘤体内治疗实验研究, 进一步研究 TSA 的治疗效果。

## 参考文献

[1] 王娜, 王凯, 汪玉良, 等. 骨肉瘤精准治疗研究进展[J]. 癌

(上接第 2344 页)

- [11] BEIRANVAND R, KARIMI A, DELPISHEH A, et al. Correlation assessment of climate and geographic distribution of tuberculosis using geographical information system (GIS)[J]. Iran J Public Health, 2016, 45(1): 86-93.
- [12] 中华人民共和国环境保护部. 中华人民共和国国家标准《环境空气质量标准》: GB 309-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [13] 刘萍. 如何理解空气质量分指数 (IAGD) 计算公式并速算[J]. 黑龙江环境通报, 2014, 38(2): 25-27.
- [14] LIU Q, MA A, WEI L, et al. China's tuberculosis epidem-

ic stems from historical expansion of four strains of Mycobacterium tuberculosis [J]. Nat Ecol Evol, 2018, 2: 1982-1992.

- [2] GELLER D S, MORRIS J, REVSKAYA E, et al. Targeted therapy of osteosarcoma with radiolabeled monoclonal antibody to an insulin-like growth factor-2 receptor (IGF2R)[J]. Nucl Med Biol, 2016, 43(12): 812-817.
- [3] AZIZ M N M, HUSSIN Y, CHE RAHIM N F, et al. Curcumin analog DK1 induces apoptosis in human osteosarcoma cells in vitro through mitochondria-dependent signaling pathway[J]. Molecules, 2018, 23(1): 1-15.
- [4] 朱坤, 徐明, 丁米娜, 等. 3-甲基腺嘌呤联合曲古霉素 A 抑制三阴性乳腺癌细胞生长[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(8): 1524-1527.
- [5] 邓艳春, 侯彭姣, 陈杰民, 等. 曲古霉素 A 抑制肝癌细胞的糖酵解[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(6): 772-776.
- [6] DENG Z T, LIU X Z, JIN J W, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin a promotes the apoptosis of osteosarcoma cells through p53 signaling pathway activation [J]. Int J Biol Sci, 2016, 12(11): 1298-1308.
- [7] 唐瑞龙, 宋鑫. 青蒿素及其衍生物的抗肿瘤机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(5): 461-466.
- [8] 周宪春, 朱坤, 徐明, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 诱导人乳腺癌细胞凋亡及自噬[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(7): 735-738.
- [9] 董照记, 韩诚, 刘晶晶, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(12): 1098-1106.
- [10] HEPP M I, ESCOBAR D, FARKAS C, et al. A trichostatin a (TSA)/spl-mediated mechanism for the regulation of SALL2 tumor suppressor in jurkat T cells[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2018, 1861(7): 623-636.
- [11] 齐伟, 徐扬, 邱实. 细胞凋亡与肿瘤微环境作用的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(22): 4433-4437.
- [12] 李世朋, 王振, 何金丹, 等. 干扰素  $\gamma$  抑制自噬诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(4): 343-346.
- [13] 韩乐, 张国敏, 杨花, 等. 山羊睾丸支持细胞的培养与双荧光自噬报告载体的建立[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(1): 132-139.
- [14] 李艳艳, 于微, 冯里茹, 等. 槲皮素对慢性酒精暴露小鼠肝脏自噬的调控[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(1): 82-86.

(收稿日期: 2019-01-04 修回日期: 2019-03-25)

ic stems from historical expansion of four strains of Mycobacterium tuberculosis [J]. Nat Ecol Evol, 2018, 2: 1982-1992.

- [15] AZAD A K, SADEE W, SCHLESINGER L S. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis[J]. Infect Immun, 2012, 80(10): 3343-3359.
- [16] 杨松, 陈耀凯. 结核分枝杆菌基因多样性及其耐药特点的研究进展[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(3): 152-154.

(收稿日期: 2019-01-06 修回日期: 2019-03-27)