

NS-398 调节 HepG2 细胞组蛋白 乙酰化和 p21WAF1/CIP1 表达

Regulation of Histone Acetylation and the Expression of p21WAF1/CIP1 by NS-398 in HepG2 Cells

吴 青/朱长才/郭晓鹏/范丽蓉/宋世震*
(武汉科技大学医学院,湖北 武汉 430000)

WU Qing, ZHU Chang-cai, GUO Xiao-peng,
FAN Li-rong, SONG Shi-zhen*
(School of Medicine, Wuhan University of Science
and Technology Wuhan 430080, Hubei, China)

【摘要】背景与目的：研究非甾体药物 NS-398 对人肝癌细胞株 HepG2 细胞组蛋白 H3 乙酰化水平的调节作用及对细胞周期素依赖性激酶抑制 p21WAF1/CIP1 表达的影响。材料与方法：用不同浓度 (100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$) 的 NS-398 处理 HepG2 细胞,以四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法测定肿瘤细胞增殖抑制率,流式细胞仪 (FCM) 检测细胞周期的改变及凋亡百分率的变化,应用 NS-398 分别作用 HepG2 细胞 4、8、12、24、48 h,非药物作用组作为对照,提取细胞的总 RNA 和总蛋白,采用 RT-PCR 技术检测 p21WAF1/CIP1 mRNA 表达情况,并用免疫印迹技术 (Western blot) 观察组蛋白 H3 的乙酰化水平变化及 p21WAF1/CIP1 蛋白的表达水平。结果：NS-398 抑制 HepG2 细胞增殖,且呈剂量依赖性,并诱导其凋亡。且呈浓度依赖性改变细胞周期的分布,一方面增高 G_0/G_1 期细胞比例,另一方面降低 S 期和 G_2/M 期细胞比例,与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。NS-398 对组蛋白 H3 乙酰化作用随时间改变而变化,可引起组蛋白 H3 的乙酰化。NS-398 对 p21WAF1/CIP1 mRNA 和 p21WAF1/CIP1 蛋白表达的影响呈时间依赖性。结论：NS-398 明显上调 HepG2 细胞组蛋白 H3 的乙酰化水平,促进细胞周期依赖性激酶抑制剂 p21WAF1/CIP1 的表达。

【关键词】 NS-398; 组蛋白乙酰化; p21WAF1/CIP1; HepG2 细胞

中图分类号：Q756

文献标识码：A

文章编号：1004-616X(2007)05-0370-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To investigate the regulation of histone H3 acetylation and the expression of p21WAF1/CIP1 by NS-398 in HepG2 cells. MATERIALS AND METHODS: The effect of NS-398 on the proliferation of HepG2 cells was evaluated by MTT. The apoptotic cells were determined by flow cytometric (FCM) analysis. Total proteins and mRNA were extracted from HepG2 cells treated with or without NS-398 with IC_{50} 200 $\mu\text{mol/L}$ at various time points (4, 8, 12, 24, 48 h). By using Western blot, the levels of acetylated histone H3 and p21WAF1/CIP1 protein expression were assayed. RT-PCR was used to detect the expression level of p21WAF1/CIP1 mRNA. RESULTS: NS-398 inhibited cell proliferation and induced apoptosis in HepG2 in a concentration-dependent manner. DNA ploidy analysis showed that S phase cells were significantly decreased with increasing NS-398 concentration. Histone H3 acetylation was obviously increased by NS-398 in a time-dependent manner. The expression levels of p21WAF1/CIP1 mRNA and protein were up-regulated in a time- and dose-dependent manner. CONCLUSION: The level of acetylated histone H3 was up-regulated by NS-398, and the expression of p21WAF1/CIP1 was increased at the same time.

【KEY WORDS】 NS-398; histone acetylation; p21WAF1/CIP1; HepG2 cell

真核细胞的染色体由 DNA 和组蛋白等包裹而成, DNA 甲基化和组蛋白乙酰化是基因表达调节的两大主要方式,其中组蛋白乙酰化是由乙酰化酶 (histone

acetyltransferase, HATs) 和去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDACs) 作用的可逆过程。组蛋白乙酰化部位的染色体呈开放状态,利于基因转录^[1]。近年研究表

收稿日期：2006-12-11; 修订日期：2007-03-12

基金项目：湖北教育厅基金项目资助 (D200511008)

作者简介：吴青 (1970-), 女, 博士研究生, 主治医师, 研究方向：恶性血液病研究。Tel: 027-61021839, E-mail: wuqing1221@21cn.com

* Correspondence to: SONG Shi-zhen, Tel: 027-68862066; E-mail: songshizhen@wust.edu.cn

明,异常的组蛋白乙酰化可以导致肿瘤发生,乙酰化可能是一个重要的细胞调控过程,有研究表明 HDAC1 在多种肿瘤中表达^[2-4]。但 HDAC1 在肝癌细胞中相关研究则尚未见报道,本研究应用非甾体药物 NS-398 作用于肝癌细胞株 HepG2 细胞,观察 HepG2 细胞组蛋白 H3 的乙酰化变化及细胞周期依赖性激酶 (CDK) 抑制剂 p21WAF1/CIP1 mRNA 和蛋白表达,探讨 NS-398 抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 NS-398 购自晶美公司,乙酰化组蛋白 H3 抗体, p21WAF1/CIP1 抗体均购自 Santa Cruz 公司,前者为兔抗人多抗、后者为鼠抗人单抗,羊抗兔和羊抗鼠二抗和 BCA 蛋白定量试剂盒购自晶美生物制品公司。RPMI 1640 为 Gibco 公司产品, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,胎牛血清购自天津生物技术公司。

1.2 细胞培养 肝癌细胞株购自上海科学院细胞中心。细胞培养采用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基,在 37 °C, 5% 的 CO₂, 饱和湿度下培养,每 48 h 换液传代 1 次。取生长良好,细胞活性大于 98 % 的细胞进行实验。根据 MTT 法测得的 NS-398 对 HepG2 细胞作用的 IC₅₀ (200 μmol/L),并用 200 μmol/L 作用 HepG2 细胞 4、8、12、24、48 h,检测组蛋白 H3 乙酰化水平和 p21WAF1/CIP1 蛋白及 mRNA 的变化,非药物作用组作为对照。

1.3 MTT 法检测 NS-398 对 HepG2 细胞增殖的影响 制备 HepG2 单细胞悬液。以每孔 5 × 10⁵ 个细胞接种于 96 孔培养板,加入不同浓度 NS-398 使其终浓度分别为 (100、200、300、400 μmol/L),作用于不同时间 (0、24、48、72 h) 设不接种细胞的空白对照和只含 1% DMSO 的阴性对照组。每种浓度平行 3 个复孔,继续培养。72 h 后每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μl,继续孵育 4 h,终止培养。吸弃孔中的培养上清,每孔加入 150 μl DMSO,振荡 10 min,在酶联免疫检测分析仪测定各孔吸光度值 (A),按下列公式计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - \text{实验组平均 A 值} / \text{对照组平均 A 值}) \times 100\%$$

1.4 流式细胞术检测细胞周期分析及凋亡百分率测定 HepG2 细胞离心换液后,加入不同浓度 NS-398,使其终浓度分别为 100、200、300、400 μmol/L。设不进行药物干预的细胞为对照组。培养 24 h 后,收集 1 × 10⁶ 细胞,经冷 PBS 洗 2 次,加入 1.5 ml 乙醇 70% 固定,4 °C 放置 24 h,加 RNA 酶 (10 g/L) 100 μl,37 °C 置 15 ~ 20 min。加含 TritonX-100 碘化丙锭 (5 mg/L) 500 μl,

4 °C 置 30 min,上机检测,用 CELLQUEST 3.1f 软件分析获取 DNA 直方图, MULTICYCLE 1.0 DNA 专用分析软件分析获得数据。

1.5 组蛋白 H3 的提取 组蛋白 H3 的提取方法参照文献[5],并进行适当改良。收获各药物处理组细胞 (1 × 10⁶/ml),离心去上清,用冷 PBS 洗 2 次,弃尽 PBS,直接加入 100 μl 煮沸的 Laemmli (含 10 % 的 2-巯基乙醇,不含溴酚蓝) 裂解缓冲液。混匀后,加入 1 mol/L 的盐酸 10 μl,混匀后以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行蛋白质定量。直接进行蛋白质印迹实验。

1.6 p21WAF1/CIP1 蛋白提取 参照文献[6]进行。收获培养 4 ~ 48 h 的细胞,1000 r/min 离心 5 min,吸去上清,用冷的 PBS 洗涤 2 次,去尽洗涤缓冲液,加入裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% NP-40, 1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L PMSF, 5 μg/ml 亮肽霉素, 5 μg/ml 抑肽酶, 5 μg/ml 凝乳蛋白酶素),冰上放置 30 min。然后在低温,12 000 r/min,离心 15 min 取上清液用 BCA 法进行蛋白定量,等量分装后 -80 °C 冻存。

1.7 p21WAF1/CIP1 mRNA 提取和 RT-PCR 扩增 用 Trizol 法提取细胞总 RNA,参照说明书进行。提取的 mRNA 用紫外分光光度计检测纯度,并对 mRNA 进行定量和完整性测定。取 2 μg mRNA 为模板,应用通用引物逆转录合成 cDNA;以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。引物序列为:正义链 5'-ggatgtccgtcagaacca-3',反义链 5'-caggtccacatggtcttcc-3',反应条件为:94 °C 30 s, 58 °C 40 s, 72 °C 50 s,共 35 个循环。扩增产物 399 bp。β-actin 作为内参照:正义链 5'-cgctgcgctggctcgcaca-3',反义链 5'-gtcaccgcacgatttcccgcct-3',扩增产物 619 bp。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳,电泳结果用英国 UVP 公司 GDS 8000 型全自动图像分析系统处理。

1.8 乙酰化组蛋白 H3 和 p21WAF1/CIP1 蛋白表达水平的检测 采用 Western blot 分析。蛋白提取物经定量后,取 20 μg 在 SDS PAGE 凝胶上电泳。然后电转到硝酸纤维素膜上,丽春红染色观察转膜情况。转膜成功后,用 5 % 的脱脂奶粉封闭 2 h。加一抗 (乙酰化 H3 抗体, p21WAF1/CIP1 抗体) 在 4 °C 条件下过夜或在 37 °C 孵育 1 ~ 2 h,充分用 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,再用二抗 (1 : 2 000) (稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔,羊抗鼠 IgG) 振荡孵育 2 h。洗去未结合的二抗,滴加 ECL 化学发光剂, X 光片曝光显影。扫描 X 光片,计算机软件处理,进行密度分析,计算灰度值,以灰度值大小间接反映检测蛋白含量。本实验重复 3 次。

1.9 统计学分析 采用 SPSS11.5 统计软件包处



理数据,采用 *t* 检验进行分析。

2 结果

2.1 NS-398 对 HepG2 细胞增殖的影响

不同浓度的 NS-398 处理 HepG2 细胞 72 h 后, MTT 法测定吸光度值(A), 结果显示 NS-398 对 HepG2 细胞的抑制作用呈剂量-时间依赖性, 随着浓度的增大, 吸光度值明显变小, 分别为: 100 $\mu\text{mol/L}$ 时 0.38 ± 0.09 ; 200 $\mu\text{mol/L}$ 时 0.59 ± 0.06 ; 300 $\mu\text{mol/L}$ 时 0.71 ± 0.04 ; 400 $\mu\text{mol/L}$ 时 0.75 ± 0.03 , 但在 300 $\mu\text{mol/L}$ 与 400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时吸光度值改变无显著不同, 表明 300 $\mu\text{mol/L}$ 时这种抑制效应已达到平台期。

2.2 NS-398 对 HepG2 细胞周期的影响

以 100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$ NS-398 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 在低浓度范围内 G_0/G_1 期及 S 期细胞无明显变化 ($P > 0.05$), 在 200、300、400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时, G_0/G_1 期细胞明显多于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 S 期细胞减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 1。

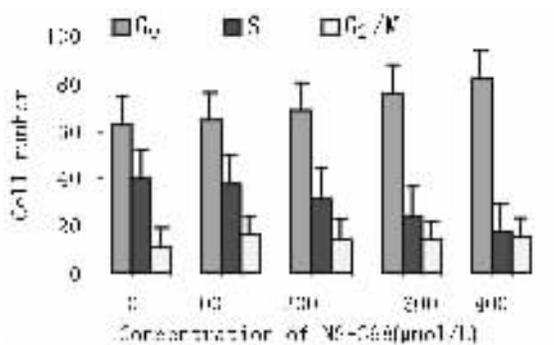


图 1 NS-398 对 HepG2 细胞增殖的影响

Figure 1 Effects of NS-398 on the proliferation of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$), compared with control, * $P < 0.05$

2.3 NS-398 对 HepG2 细胞凋亡的影响

100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$ NS-398 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 凋亡百分率分别为 (16.47 ± 2.15)%、(29.12 ± 3.50)%、(47.58 ± 3.92)%、(64.16 ± 4.12)%, 与对照组 (2.48 ± 0.15)% 比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 且呈浓度依赖性。

2.4 NS-398 对 HepG2 细胞组蛋白 H3 的乙酰化作用

在 200 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下, 随着时间的改变, 组蛋白 H3 的乙酰化水平随之变化。如图 2 所见, 在 4 h 时组蛋白 H3 的乙酰化水平 (104.3 ± 17.2) 和非药物作用组 (19.6 ± 10.3) 相比灰度均值增加了 5.4 倍, 12 h 时 (88.5 ± 10.3) 为对照组的 4.1 倍, 24 h 时 (59.7 ± 11.2) 为对照组的 3.0 倍, 可见乙酰化水平逐渐降低。

2.5 NS-398 对 p21WAF1/ CIP1 蛋白表达的作用

在 200 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下, p21WAF1/ CIP1 蛋白表达

4 h 后升高, 12 h 时 (128.5 ± 41.8) 和对照组 (49.3 ± 30.1) 相比增加了 2.4 倍, 24 h (201.8 ± 50.5) 增加了 5.1 倍, 达高峰, 48 h 有所下降, (见图 3), 在各浓度作用 24 h 时, 呈浓度依赖性。

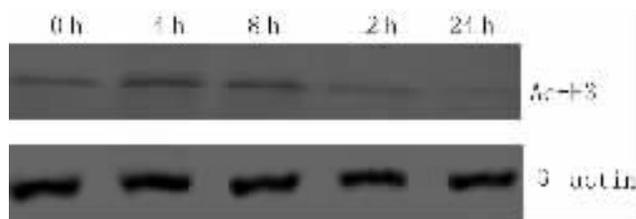


图 2 NS-398 作用 HepG2 细胞后组蛋白 H3 的乙酰化变化

Figure 2 The acetylation levels of histone H3 in HepG2 cells after different treatments detected by Western blot

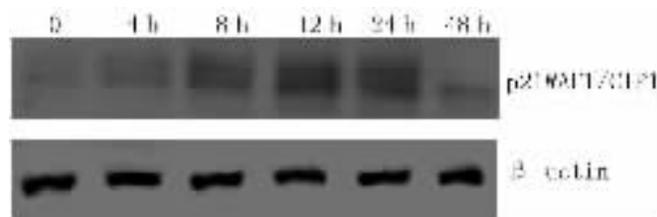


图 3 NS-398 作用 HepG2 细胞后 p21WAF1/CIP1 表达情况

Figure 3 The expression level of P21WAF1/CIP1 in HepG2 cells treated with NS-398 detected by western blot

2.6 NS-398 对 p21WAF1/CIP1 mRNA 转录的影响

RT-PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳后, 凝胶成像系统扫描分析, β -actin 吸光度定为 1。200 $\mu\text{mol/L}$ 的 NS-398 作用 HepG2 细胞, p21WAF1/CIP1 mRNA 表达在 4 h 时已见到升高, 持续 24 h 后有所降低, 12 h 稳定表达, 24 h 时与内参照的比值比 4 h 升高 3.6 倍, 与对照组相比增加 5.2 倍。结果类似于 p21WAF1/CIP1 蛋白的表达。

图 4 结果显示, NS-398 作用 4 h 可见 p21WAF1/ CIP1 mRNA 的表达产物升高。

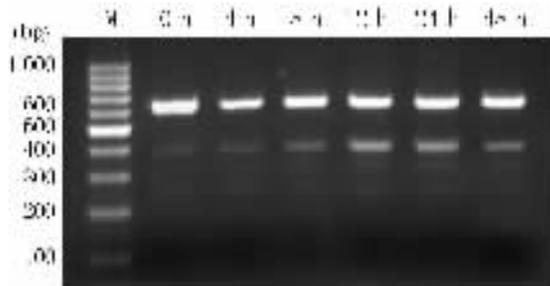


图 4 NS-398 作用后 p21WAF1/CIP1 mRNA 表达情况

Figure 4 The expression of P21WAF1/ CIP1 mRNA in HepG2 cells treated with NS-398 detected by RT-PCR

3 讨论

组蛋白乙酰化/去乙酰化修饰是基因转录调控的关键机制之一, 而这种修饰作用由组蛋白 HATs 和

HDACs 所调控, 所以 HATs/ HDACs 间接调节基因的转录和沉寂。HATs/ HDACs 这对酶的平衡紊乱则会使基因表达失控, 导致肿瘤发生。抑制 HDACs 活性, 阻止组蛋白的去乙酰化, 就可以诱导组蛋白的高乙酰化状态, 将高度有序的染色体打开呈松弛状态, 促进转录因子与 DNA 结合, 受抑基因得到表达, 从而发挥治疗肿瘤的作用。NS-398 是一种酸性磺酰胺类二环化合物, 是选择性的环氧合酶 2 抑制剂, 具有抗人肿瘤细胞的增殖活性, 诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[7], 近来研究发现, 在长期服用非甾体类药物 (NSAID) 的患者中恶性肿瘤的发病率明显下降。体外实验还发现该类药物可诱导多种肿瘤细胞凋亡^[8]。在本实验中, 我们研究了 NS-398 对 HepG2 细胞组蛋白 H3 乙酰化水平的影响及组蛋白乙酰化改变后 *p21WAF1/ CIP1* 基因表达的情况, 结果发现, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 NS-398 对组蛋白 H3 就有明显作用; 在 300 $\mu\text{mol/L}$ 的情况下, 组蛋白 H3 的水平在 4 h 时已升高 5.4 倍, 12 h 以后逐渐下降, 说明 NS-398 的作用是可逆的。用 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 NS-398 处理 HepG2 细胞, 随着时间增加 *p21WAF1/ CIP1* 水平逐渐升高, 4 h 见上升, 24 h 达高峰, 和对照组相比 12 h 和 24 h 增加了 2.4 和 5.1 倍, 同时检测 *p21WAF1/ CIP1* mRNA 的转录情况, 发现 *p21WAF1/ CIP1* mRNA 的合成也呈时间依赖性, 类似于 *p21WAF1/ CIP1* 蛋白的表达, 说明 NS-398 不仅抑制 HDACs 活性, 促进 H3 的高度乙酰化, 也同时促进 *p21WAF1/ CIP1* 基因转录的启动。证明 NS-398 是一种新的具有抗肿瘤活性的制剂, 通过抑制 HDACs 活性, 诱导细胞内乙酰化 H3 的大量积聚, 使核小体结构松散, DNA 链上受抑的基因启动位点暴露, 有利于转录因子结合, 启动转录。细胞周期依赖性激酶抑制剂 *p21WAF1/ CIP1* 的水平升高就是一个有力证据。细胞周期是由细胞周期依赖性激酶 (CDK) 序贯性激活和失活所控制, *p21WAF1/ CIP1* 是一种广谱的 CDK 抑制剂, 它的表达分为 P53 依赖和非依赖性两种, 通常在肿瘤细胞是低表达或缺失的, 其主要原因可能是 *p21WAF1/ CIP1* 基因启动子区域 DNA 的高度甲基化或组蛋白的低乙酰化。有研究表明, *p21WAF1/ CIP1* 启动子位点可能也是 HDACs 抑制剂丁酸盐、TSA 等的天然靶基因^[9]。本实验也发现, 在 NS-398 诱导组蛋白 H3 乙酰化水平升高的同时也促进 *p21WAF1/ CIP1* mRNA 合成, 上调 *p21WAF1/ CIP1* 蛋白表达, 说明 *p21WAF1/ CIP1* 基因存在乙酰化/ 去乙酰化作用的调控, NS-398 提高 HepG2 细胞 *p21WAF1/ CIP1* 基因启动子位点的组蛋白 H3 的乙酰化水平, 促进了

p21WAF1/ CIP1 基因转录, 使 *p21WAF1/ CIP1* 的表达水平升高, 影响细胞周期进程, 从而发挥抗肿瘤细胞增殖作用。也间接说明 HepG2 细胞存在组蛋白乙酰化/ 去乙酰化功能紊乱或缺陷。本项研究也提示, *p21WAF1/ CIP1* 可能是 HDACs 抑制剂的重要靶分子之一。

在本研究中, 我们发现 NS-398 在抑制 HDACs 活性诱导 H3 乙酰化升高的同时 *p21WAF1/ CIP1* 的蛋白表达水平也升高, 说明 NS-398 是通过多种途径抑制肿瘤细胞增殖, 诱导分化和凋亡的。结合文献分析表明抑制 HDACs 活性是抗肿瘤治疗的新的分子靶点。

参考文献:

- [1] Strahl BD, Allis D. The language of covalent histone modifications[J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 41 - 45.
- [2] Choi JH, Kwon HJ, Yoon BI, et al. Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92(12): 1300 - 1304.
- [3] Minucci S, Nervi C, Coco FL, et al. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias[J]. *Oncogene*, 2001, 20(24): 3110 - 3115.
- [4] Singh J, Murata K, Itahana Y, et al. Constitutive expression of the Id1 promoter in human metastatic breast cancer cells is linked with the loss of NF21/Rb/HDAC21 transcription repressor complex [J]. *Oncogene*, 2002, 21(12): 1812 - 1822.
- [5] Marini P, Jendrossek V, Durand E, et al. Molecular requirements for the combined effects of TRAIL and ionising radiation[J]. *Radiother Oncol*, 2003, 68(2): 189 - 198.
- [6] Lin T, Zhang L, Davis J, et al. Combination of TRAIL gene therapy and chemotherapeutic enhances antitumor and antimetastasis effects in chemosensitive and chemoresistant breast cancers [J]. *Mol Ther*, 2003, 8(3): 441 - 448.
- [7] Minter HA, Eveson JW, Huntley S, et al. The cyclooxygenase-2 selective inhibitor NS-398 inhibits proliferation of oral carcinoma cell by mechanisms dependent and independent of reduced prostaglandin E2 synthesis[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(5): 1885 - 1897.
- [8] Krysan K, Dalwadi H, Sharma S, et al. Cyclooxygenase-2 dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6359 - 6362.
- [9] Milutinovic S, Knox JD, Szyf M. DNA methyl transferase inhibition induces the transcription of the tumor suppressor p21 (WAF1/ CIP1/ Sdi1) [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(9): 6353 - 6359.

