

· 研究论文 ·

## SIRT1 去乙酰化酶抑制剂引起人乳腺癌 MCF-7 耐药细胞凋亡的机制

李咏, 徐榕, 张秀敏, 李电东, 何琪杨\*

(中国医学科学院、北京协和医学院 医药生物技术研究所, 北京 100050)

**摘要:** 研究 SIRT1 去乙酰化酶抑制剂引起人乳腺癌 MCF-7 耐多柔比星(doxorubicin, DOX) 细胞及其敏感细胞凋亡的机制。MTT 法检测细胞生长抑制作用; Western blotting 方法检测蛋白表达; DNA 特异染料 Hoechst 33342 染色检测染色质凝集; Annexin V 检测细胞凋亡; 流式细胞仪测定细胞周期分布。结果表明, SIRT1 去乙酰化酶抑制剂烟酰胺(nicotinamide, NAM) 和 Sirtinol 对人乳腺癌细胞 MCF-7 敏感和耐药细胞表现出相同的生长抑制作用, 但没有增强 DOX 活性的作用。NAM 使 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期。50 mmol · L<sup>-1</sup> NAM 作用 MCF-7 细胞后, 激活 caspase 凋亡通路, 出现 PARP、caspase-6、-7、-9 切割片段, 并且染色质发生凝集和 Annexin V 阳性细胞。而在 MCF-7/DOX 耐药细胞中, NAM 作用 24 h 后, 才开始出现 PARP、caspase-6、-7 切割片段, 48 h 后明显增加, 可以检测到较多的细胞出现染色质凝集和 Annexin V 阳性细胞。SIRT1 去乙酰化酶抑制剂对人乳腺癌 MCF-7 耐药细胞和敏感细胞均有相似的抑制作用, 无交叉耐药性, 其作用通过激活 caspase 凋亡通路实现。

**关键词:** SIRT1 去乙酰化酶抑制剂; 多药耐药性; 细胞凋亡; 人乳腺癌 MCF-7 细胞

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)10-1003-08

## Mechanism of apoptosis induced by SIRT1 deacetylase inhibitors in human breast cancer MCF-7 drug-resistant cells

LI Yong, XU Rong, ZHANG Xiu-min, LI Dian-dong, HE Qi-yang\*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** The mechanism of apoptosis induced by SIRT1 deacetylase inhibitors in both human breast cancer MCF-7 and MCF-7 doxorubicin-resistant cells was studied. MTT assay was used to detect growth-inhibitory effect on the cells. Protein expression was detected by Western blotting. Chromatin condensation was detected by a fluorescent microscope after Hoechst 33342 staining. Cell cycle distribution was analyzed with flow cytometry. Apoptotic cells were detected with Annexin V staining. Nicotinamide (NAM) and Sirtinol, two SIRT1 deacetylase inhibitors, exhibited the similar growth-inhibitory effects on MCF-7/DOX cells and MCF-7 cells, but no potentiation of DOX activities. The arrest at G<sub>2</sub>/M phase was detected by flow cytometry in both MCF-7 and MCF-7/DOX cells after NAM treatment. Activation of caspase pathway in MCF-7 cells, such as the cleavages of PARP, caspase-6, -7, -9, were observed after exposure to NAM 50 mmol · L<sup>-1</sup>, accompanied by the occurrence of chromatin condensation and Annexin V positive cells. However, the cleavages of PARP, caspase-6 and -7 in MCF-7/DOX cells delayed after exposure to NAM for 24 h and obviously increased at 48 h with appearance of chromatin condensation and Annexin V positive cells. SIRT1 deacetylase inhibitors show no cross resistance to MCF-7 drug-resistant cells, and the similar growth-inhibitory actions of them to MCF-7 sensitive and drug-resistant cells by which it is mediated by activation of apoptotic caspase pathway.

收稿日期: 2008-04-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672482).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63131856, Fax: 86-10-63017302, E-mail: qyh2000bj@yahoo.com.cn

**Key words:** SIRT1 deacetylase inhibitor; multidrug resistance; apoptosis; human breast MCF-7 cancer cell

在基因表达调控中,除了基因本身的特异序列外,还受表观遗传(epigenetics)修饰的调节,其中以组蛋白的修饰尤为常见<sup>[1]</sup>。表观遗传修饰调节机制的异常,往往导致肿瘤的发生。因此,调节组蛋白修饰,例如:抑制组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的活性,正成为抗肿瘤药物发展的新方向。大量的研究表明:HDAC 抑制剂能诱导肿瘤细胞凋亡,抑制癌基因表达,毒副作用低,明显地增强常规抗肿瘤药物的活性等特点,颇受重视,少数药物已经进入了临床研究<sup>[2,3]</sup>。

肿瘤细胞产生的多药耐药性(multidrug resistance, MDR),是肿瘤化疗失败的主要原因之一<sup>[4,5]</sup>。鉴于其产生机制的复杂性,发展了几种克服 MDR 的策略:一是抑制外排泵蛋白功能的药物,如作用 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp);二是使用无交叉耐药性的抗肿瘤药物,避免被相关蛋白泵出细胞;三是以表观遗传修饰为靶标,抑制 MDR 产生的基因表达。

在组蛋白乙酰化调节过程中,根据活化特点,HDAC 可分为 3 种类型:I、II 型依赖 Zn 离子而活化;III 型需要能量物质 NAD 活化,比较有代表性的是在衰老中起重要作用的长寿基因 SIRT1。研究表明:I、II 型 HDAC 抑制剂对肿瘤多药耐药细胞没有交叉耐药性,通过诱导凋亡而起作用<sup>[6-8]</sup>;至于 III 型 HDAC 抑制剂是否对肿瘤耐药细胞具有相似的作用机制,未见文献报道。鉴于 SIRT1 能直接调节 P-gp 的表达<sup>[9]</sup>,用 SIRT1 去乙酰化酶抑制剂克服肿瘤细胞的多药耐药性,有可能具有应用前景。本研究选用人乳腺癌 MCF-7 耐多柔比星(MCF-7/DOX)细胞和敏感细胞为研究对象,观察 SIRT1 去乙酰化酶抑制剂诱导耐药细胞凋亡的机制。

## 材料与方 法

**试剂与抗体** 烟酰胺(nicotinamide, NAM)、Sirtinol、MTT、碘化丙锭(propidium iodide, PI)及二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)购自 Sigma-Aldrich Chemical Inc。NAM 用 PBS 溶解,配制成浓度为  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  储存液,  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤后备用,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  避光保存。Sirtinol 用 DMSO 溶解,配制成浓度为  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  储存液,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  避光保存。DOX 购自中国医学科学院肿瘤医院。粉防己碱

(tetrandrine, Tet)购于中国药品生物制品检定所。鼠抗 P-gp 抗体(C219)购自 Chemicon 公司。兔抗 SIRT1 抗体(sc-15404)、兔抗 p53 抗体(sc-126)、兔抗 Actin 抗体(sc-1616)购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。兔抗 PARP 抗体(#9542),兔抗切割 caspase-6、-7、-9 抗体(#9929)购自 Cell Signaling Technology 公司。兔抗 FOXO3a 抗体购自 Upstate Biotechnology 公司。

**细胞培养** 人乳腺癌 MCF-7/DOX 及其敏感细胞由美国国立癌症研究院 Kenneth H Crown 博士馈赠,使用前用  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DOX 处理两周,停药 1 周后用于实验。细胞培养在 RPMI-1640 (Invitrogen) 添加 10% 胎牛血清(天津灏海生物制品科技有限责任公司)、青霉素和链霉素各  $100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$  的培养液中,培养条件为 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

**细胞增殖抑制的测定** 采用 MTT 法进行。取对数生长期细胞,消化后计数,按每孔  $4 \times 10^3$  个接种于 96 孔培养板。24 h 后,用不同浓度的药物处理细胞 72 h。然后每孔加入  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MTT  $20 \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 4 h 后,小心吸除培养液,再加入 DMSO  $200 \mu\text{L}$ ,混匀后用酶标仪测定 570 nm 处吸收度(A)值。细胞存活率% = (加药细胞 A 值 - 本底 A 值) / (对照细胞 A 值 - 本底 A 值)  $\times 100\%$ 。每检测点取 3 个平行孔的平均值,绘制抑制曲线,实验重复至少 3 次,计算  $\text{IC}_{50}$  值。

采用药物相互作用指数(coefficient of drug interaction, CDI)评价药物的联合作用,CDI 按下列公式计算:  $\text{CDI} = \text{AB} / (\text{A} \times \text{B})$ 。根据 MTT 结果吸收度值进行计算,AB 为两药联合组与对照组吸收度值的比值;A 或 B 是各药物单独使用组与对照组吸收度值的比值。当  $\text{CDI} < 1$  时两药作用性质为协同;当  $\text{CDI} < 0.7$  时,协同作用非常显著;  $\text{CDI} = 1$ ,则两药作用性质为相加;  $\text{CDI} > 1$ ,则两药作用性质为拮抗。

**流式细胞术检测细胞周期的变化** 细胞以每孔  $4 \times 10^5$  个接种于 6 孔板中,24 h 后加药处理,不同时间消化收集经药物处理过的细胞,用 70% 乙醇固定,保存在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜。染色前加入 RNase A(终质量浓度  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min,然后加入碘化丙啶(PI)染色液至终质量浓度  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,室温避光染色 1 h,细胞经 300 目尼龙网过滤后,流

式细胞仪测定 PI 荧光强度,MODFIT 软件分析细胞周期变化。

**荧光显微镜检测染色质凝集情况** 细胞以每孔  $4 \times 10^5$  个接种于 6 孔板中,24 h 后用药物处理细胞到指定时间,PBS 洗细胞 3 次,加入  $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Hoechst 33342,37 °C 避光染色 20 min,PBS 洗 2 次,荧光显微镜检测。

**Annexin V 检测细胞凋亡** 细胞发生凋亡时,位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸外翻,由于 Annexin V 能特异地与磷脂酰丝氨酸结合,根据结合量的变化可反映凋亡细胞的百分率。检测试剂盒(APT750)购自 chemicon 公司。按试剂盒的说明书操作,经药物处理后的细胞,用带有荧光素 FITC 的 Annexin V 和 PI 同时染色后,用流式细胞仪检测。

**Western blotting 检测蛋白的表达** 收集经药物处理后的细胞,加入细胞裂解液( $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 7.5、 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钠、10% 甘油、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸甘油钠、 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA 和 0.5% Triton X-100,使用前加入  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  蛋白酶抑制剂 PMSF,  $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 aprotinin 和 leupeptin),在冰上裂解 30 min,于 4 °C  $12\ 000 \times g$  离心 15 min,取上清液。蛋白浓度测定采用 Bradford 法。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,将蛋白转移到 PVDF 膜上,常规一抗和二抗孵育后,ECL plus 超敏免疫印迹检测试剂(Amersham 公司)检测蛋白表达,化学发光成像系统 ChemImager 5500 (Alpha Innotech 公司)捕获图像。

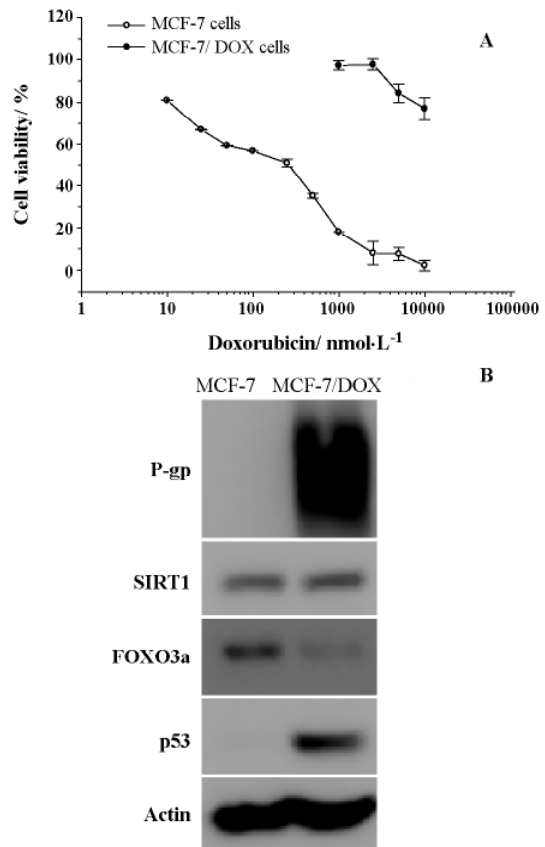
**统计分析** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组  $\text{IC}_{50}$  均数比较采用两样本  $t$  检验, $P < 0.05$  为统计学差异有显著性。

## 结果

### 1 人 MCF-7/DOX 的耐药特征和相关蛋白的表达变化

人乳腺癌 MCF-7/DOX 是长期用 DOX 处理后得到的多药耐药细胞株,首先检测该细胞株对 DOX 的耐药性变化。MTT 法检测表明;DOX 明显抑制敏感 MCF-7 的增殖,其  $\text{IC}_{50}$  值为  $145 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而在耐药细胞中, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理组的抑制率仅为 20%,该值相当于  $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用敏感细胞的抑制率(图 1A),说明耐药株已对 DOX 产生了高度的耐药性。由于 DOX 为红色,较高浓度作用细胞后,细胞着色较重,使 MTT 的检测值不准确,在图中没有显示。

为了充分了解 MCF-7/DOX 耐药细胞分子水平的变化,采用 Western blotting 方法检测相关蛋白的表达情况(图 1B)。MCF-7/DOX 细胞中有高水平的 P-gp 表达。与敏感 MCF-7 相比较,MCF-7/DOX 细胞中 SIRT1 的表达变化不明显。检测其他信号通路相关蛋白的表达,在 MCF-7/DOX 耐药细胞中,FOXO3a 表达显著降低,而 p53 的表达明显升高。

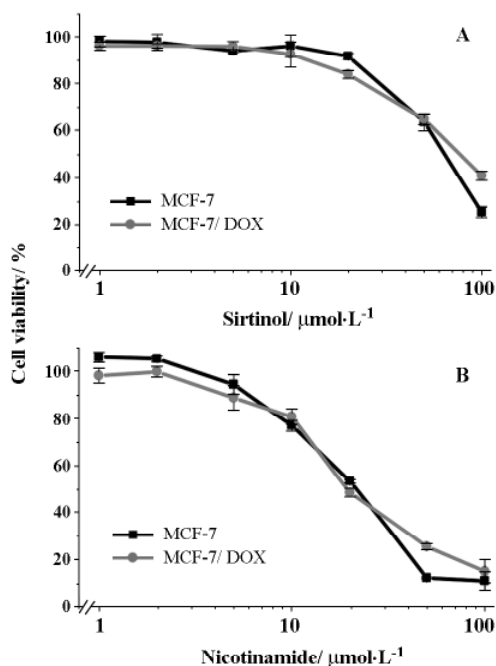


**Figure 1** Characteristics of human breast cancer MCF-7/DOX cells. A: Strong resistance to DOX in the MCF-7/DOX cells. Data are presented as  $\bar{x} \pm s$  from three separate experiments; B: Expression of P-gp and its related proteins in the MCF-7 and MCF-7/DOX cells detected by Western blotting. This is a representative result from two independent experiments

### 2 SIRT1 去乙酰化酶抑制剂克服 MCF-7/DOX 细胞的多药耐药性

选用 SIRT1 去乙酰化酶抑制剂 Sirtinol 和 NAM, 处理 MCF-7、MCF-7/DOX 细胞 72 h 后,用 MTT 法检测细胞增殖的抑制作用。Sirtinol 对 2 种细胞的增殖抑制情况见图 2A,从  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  开始,Sirtinol 对敏感 MCF-7 和 MCF-7/DOX 耐药细胞

表现出相似的生长抑制作用,随着浓度增加,细胞存活率明显降低。由于浓度高于  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的药物溶解度明显降低,导致药物析出,因此无法准确地求得  $\text{IC}_{50}$ 。NAM 抑制 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞生长的特点与 Sirtinol 相似(图 2B),从  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  开始, NAM 以浓度依赖的方式抑制 2 种细胞的增殖,其  $\text{IC}_{50}$  值分别为  $(21.5 \pm 0.7) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $(22.0 \pm 2.8) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上细胞增殖抑制实验的结果表明: MCF-7/DOX 耐药细胞对 SIRT1 去乙酰化酶抑制剂没有交叉耐药性。

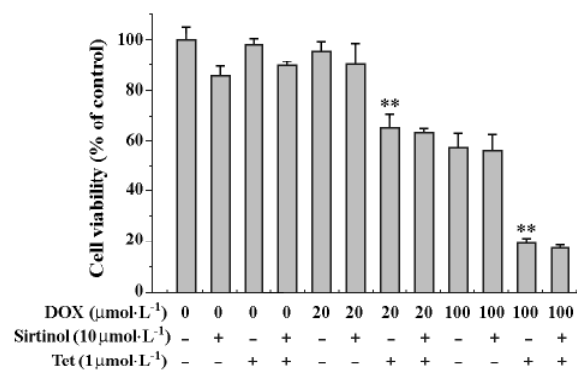


**Figure 2** Growth-inhibitory effects of Sirtinol (A) and nicotinamide (B) on MCF-7 and MCF-7/DOX cells. Data are presented as  $\bar{x} \pm s$  from three separate experiments

### 3 SIRT1 去乙酰化酶抑制剂无逆转耐药性的作用

为了证明 SIRT1 去乙酰化酶抑制剂是否能逆转肿瘤细胞多药耐药性,采用几乎无抑制细胞增殖浓度的抑制剂与 DOX 合用,以明显逆转耐药性的 Tet 作为参照药物,处理 MCF-7/DOX 耐药细胞。MTT 法检测其对细胞增殖的影响,通过药物联合作用 CDI 分析,确定是否具有逆转肿瘤细胞多药耐药性的作用。与 DOX 单独作用组相比,  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tet 与 DOX 合用组使细胞存活率明显下降,当 DOX 浓度为  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,其存活率从 90% 下降到 65%,  $\text{CDI} = 0.69$ ; 当 DOX 浓度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,

其存活率从 56% 下降到 19%,  $\text{CDI} = 0.34$  (图 3)。而与 DOX 单独作用组相比,  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Sirtinol 与 DOX 合用组,细胞存活率没有变化,  $\text{CDI} > 1$ , 另外, Sirtinol 也不能增强 Tet 的作用效果。以上结果表明: Sirtinol 没有逆转肿瘤细胞多药耐药性的作用。用另一种抑制剂 NAM 与 DOX 合用,也没有检测到逆转作用(结果未显示)。



**Figure 3** Effect of DOX in combination with Sirtinol and Tet on the proliferation of MCF-7/DOX cells. The assay was used with MTT method and the data are presented as  $\bar{x} \pm s$  from three separate experiments. \*\*  $\text{CDI} < 0.7$

### 4 NAM 对 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞周期的影响

为了深入研究 SIRT1 抑制剂影响细胞增殖的作用机制,分别用 10、25 和 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAM 处理 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞 24 h, 然后用流式细胞术检测细胞周期的变化。结果表明: NAM 可以阻断 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞于  $G_2/M$  期(图 4)。在 MCF-7 细胞中,随着 NAM 的浓度增加,  $G_2/M$  期比例由对照组的 11.2% 增加逐步升高到 39.9%; 而在 MCF-7/DOX 细胞中,除了未经药物处理的对照组细胞  $G_2/M$  期的比例比敏感细胞稍高外,阻断作用的特征与 MCF-7 细胞相似。

### 5 NAM 诱导 MCF-7/DOX 耐药细胞凋亡

为了研究 SIRT1 去乙酰化酶抑制剂对 MCF-7/DOX 细胞的增殖抑制作用是否通过诱导细胞凋亡来实现,首先观察染色质凝集,从细胞形态上确定凋亡的发生。用  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAM 处理敏感 MCF-7 细胞 24 h 和 48 h 后,多数细胞出现染色质凝集,形成凋亡小体(图 5); 而在耐药细胞 MCF-7/DOX 中,引起细胞凋亡的时间明显滞后,同样浓度的 NAM 作用 24 h 时,仅少数细胞出现凋亡小体,至 48 h 时

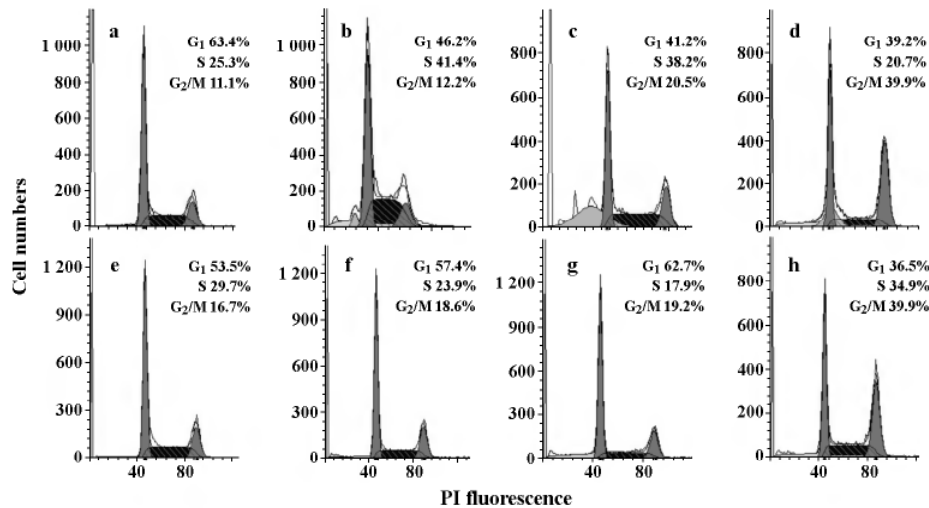
凋亡小体才明显增多(值得注意的是,由于 Hoechst 33342 是 P-gp 的外排底物,部分细胞的荧光强度比 MCF-7 敏感细胞明显变弱)。以上细胞形态学结果表明:NAM 抑制 2 种细胞增殖的机制,是通过引起细胞凋亡而起作用的。

为了更好地定量确定 NAM 引起细胞凋亡的数量变化,采用 Annexin V 染色后,流式细胞仪检测凋亡的细胞(图 6)。当  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAM 处理敏感 MCF-7 细胞 24 h 后,大约 25% 的细胞发生凋亡,而在 MCF-7/DOX 耐药细胞中,仅检测到大约 13% 的凋亡细胞。当 NAM 处理细胞 48 h 后,尽管发生凋亡的细胞总数在 2 种细胞中比较接近,大约为 50%,

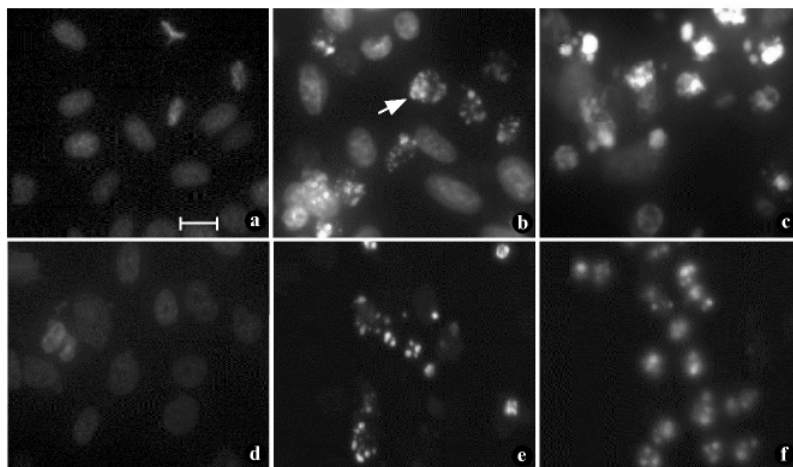
但 MCF-7 细胞中处于晚期凋亡的细胞数明显高于 MCF-7/DOX 耐药细胞。结果表明:MCF-7/DOX 耐药细胞发生凋亡的时间明显延迟。

## 6 NAM 激活 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞的 caspase 凋亡通路

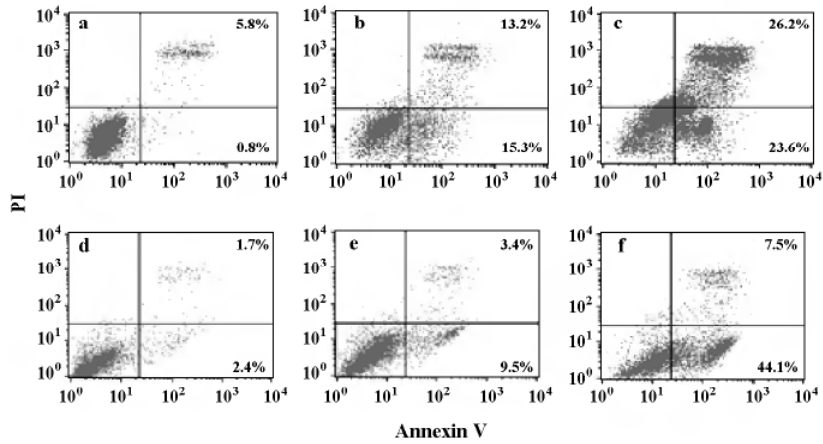
Caspase 凋亡通路的激活是判断细胞凋亡的重要分子标志<sup>[10]</sup>,为了进一步研究 NAM 诱导 MCF-7 和 MCF-7/DOX 细胞凋亡时的 caspase 通路的活化,采用 Western blotting 方法检测了  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAM 作用细胞 12、24 和 48 h 后,caspase-6、-7、-9 及凋亡标志分子 PARP 的表达变化。在敏感 MCF-7 细胞中,NAM 作用 12 h 时,开始出现 caspase-7、-9



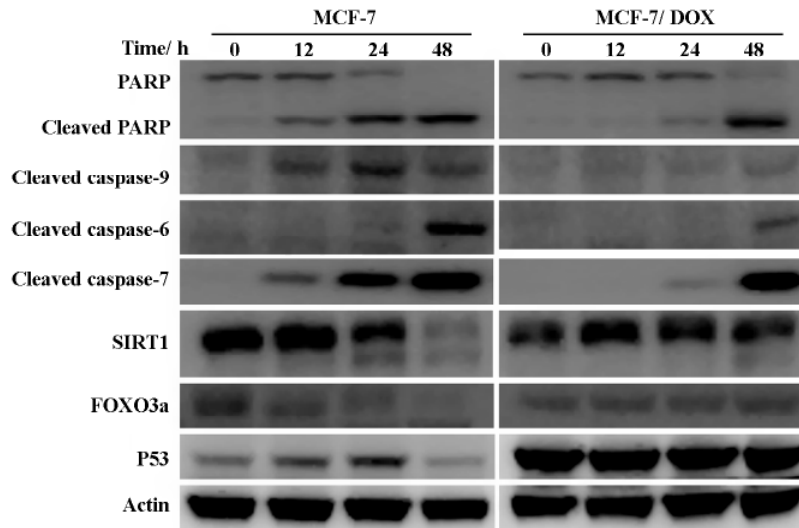
**Figure 4** Effect of NAM on cell cycle distribution in MCF-7 (a-d) and MCF-7/DOX cells (e-h). The cells were treated with 10 (b, f), 25 (c, g), 50 (d, h)  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAM, separately. The cell cycle distribution was detected by flow cytometry and shown one representative of three independent experiments



**Figure 5** Chromatin condensation induced by NAM in both MCF-7 (a-c) and MCF-7/DOX (d-f) cells. The cells were treated with  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAM for 24 h (b, e), 48 h (c, f), separately. The condensed nuclei were observed by a fluorescent microscope after staining with Hoechst 33342. ( $\times 200$ )



**Figure 6** The apoptotic cells stained with Annexin V-FITC. MCF-7 (a-c) and MCF-7/DOX (d-f) cells were treated with 50 mmol · L<sup>-1</sup> NAM for 24 h (b, e) and 48 h (c, f), and then were assayed with flow cytometry. This is a representative result from two separate experiments



**Figure 7** The apoptotic caspase pathway was activated by 50 mmol · L<sup>-1</sup> NAM in both MCF-7 and MCF-7/DOX cells. The cells were treated with NAM for indicated time and the protein contents were detected by Western blotting. This is a representative result from two independent experiments

和 PARP 切割片段,表明此时细胞中的 caspase 凋亡通路已被激活(图 7);在作用 24 h 时,这些切割片段明显增加,至 48 h 达到峰值,并出现 caspase-6 的切割片段。而在耐药细胞 MCF-7/DOX 中,尽管也能激活凋亡信号通路,但激活的时间明显滞后。NAM 作用 24 h 后,才隐约可见 PARP 和 caspase-7 的切割片段;在 48 h 时切割片段增多,并出现 caspase-6 的切割片段,但始终未见 caspase-9 的切割片段。结果表明:NAM 通过激活细胞内的 caspase 凋亡通路而抑制 MCF-7 细胞增殖;与染色质凝集和 Annexin V 检测凋亡的结果相一致,MCF-7/DOX 耐

药细胞中 caspase 凋亡通路激活的时间明显滞后。

为了比较其他耐药相关信号蛋白在细胞凋亡时的变化,检测了 SIRT1、FOXO3a 和 p53 的表达情况。NAM 作用 MCF-7/DOX 细胞后,FOXO3a 和 p53 表达水平没有变化;但在敏感 MCF-7 细胞中,FOXO3a 蛋白明显降低,在 48 h 时 p53 蛋白也明显地降低(图 7)。对于 SIRT1 蛋白而言,NAM 作用 MCF-7 细胞 24 h 后,出现一个小于 120 ku 的片段,出现的时间晚于 caspase 被激活的时间,至 48 h 时含量明显降低;而在耐药细胞中,该切割片段仅在 NAM 作用 48 h 后才出现。

## 讨论

本研究的结果表明: SIRT1 去乙酰化酶抑制剂不仅能抑制肿瘤细胞增殖, 对多药耐药的 MCF-7 细胞也表现出相似的抑制效果, 展示了可以使用该类抑制剂克服肿瘤细胞多药耐药性的可能性。另一种 SIRT1 抑制剂 cambinol 对多种肿瘤细胞具有明显的抑制作用, 对人乳腺癌 MCF-7 耐药细胞也没有交叉耐药性<sup>[11]</sup>, 与本研究的结论一致。虽然 I、II 型的组蛋白去乙酰化酶抑制剂也能克服多药耐药性, 但其作用特征与 III 型抑制剂明显不同, 在抑制耐药细胞的同时, 也能诱导 P-gp 蛋白的表达, 某些抑制剂本身就是 P-gp 的底物<sup>[12]</sup>, 此外, 如 I、II 型的组蛋白去乙酰化酶抑制剂古抑菌素 A (trichostatin A), 与去甲基化酶抑制剂协同作用, 明显活化编码 P-gp 的 *mdr-1* 表达<sup>[13]</sup>。而 SIRT1 在活化的状态下, 引起 *mdr-1* 基因的表达, 使用 RNAi 特异降低 SIRT1 表达后, P-gp 和 *mdr-1* 的表达也明显降低<sup>[9]</sup>。

SIRT1 去乙酰化酶不仅使组蛋白去乙酰化, 还能使 p53、FOXO3a、Ku70 去乙酰化而具有抗细胞凋亡作用<sup>[14,15]</sup>。在正常细胞中 SIRT1 是十分重要的抗衰老、抗代谢性疾病的蛋白<sup>[16]</sup>。而在肿瘤细胞中, 正是 SIRT1 的作用, 使突变细胞逃避凋亡和衰老控制, 而有助于肿瘤的发生。例如: 超甲基化癌蛋白 (hypermethylated in cancer 1, HIC1) 通过与 SIRT1 形成蛋白复合物, 结合在 *SIRT1* 基因的启动子上而抑制 *SIRT1* 基因的表达; 当 HIC1 蛋白缺失或丧失功能后, SIRT1 表达增加, 有助于肿瘤细胞的存活<sup>[17]</sup>。使用 RNAi 特异地降低肿瘤细胞中 SIRT1 蛋白的表达, 明显地引起 FOXO4 相关的细胞凋亡; 同样的方法处理人正常成纤维 ARPE19、HTB126 细胞, 未观察到细胞凋亡, 表明 SIRT1 是选择性药物靶标, 可用于特异地杀死肿瘤细胞<sup>[18]</sup>。

本研究采用的 SIRT1 抑制剂 Sirtinol 的特异性明显地强于 NAM, 由于其溶解度较低, 高于 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  后, 需要更高浓度的 DMSO 助溶, 加上其价格昂贵, 所以选用 NAM 进行凋亡机制的研究。在其他研究<sup>[19]</sup>中已经发现 NAM 抑制 SIRT1 活性的有效浓度为 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本实验所用的浓度为 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。不排除该作用浓度下除了抑制 SIRT1 活性之外, 还抑制其他蛋白而引起细胞凋亡。结果显示: NAM 阻断人 MCF-7 敏感和耐药细胞于 G<sub>2</sub>/M 期, 该结果与文献报道 NAM 作用人 HeLa 细胞和大鼠 RINm5F 的结果一致<sup>[20]</sup>。另外, 已有报道 NAM 的结构修饰化合物 6-氨基 NAM 具有明显的增强辐

射致肿瘤细胞死亡的作用<sup>[21]</sup>, 对 NAM 的作用机制研究有一定的价值。值得指出的是, 虽然本实验所使用的 SIRT1 抑制剂的有效作用浓度较高, 目前已经发展了十分特异的抑制剂, 如吲哚类化合物 (indole)、EX527 对 SIRT1 的抑制活性的 IC<sub>50</sub> 值低于 100  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[22,23]</sup>, 有望向应用方向发展。

当用抗肿瘤药物处理肿瘤细胞后, SIRT1 蛋白表达增加, 在耐药性较低的肿瘤细胞中, SIRT1 蛋白也明显升高<sup>[9]</sup>, 但本实验所用的耐药细胞未见 SIRT1 蛋白的表达明显变化, 其原因可能与该耐药株经过长期的筛选, 具有高度耐药性, SIRT1 表达脱调节有关。至于在图 7 中显示 SIRT1 被切割成较小的片段, 这是因为 SIRT1 是凋亡的关键蛋白酶 caspase-3 和 caspase-9 的底物<sup>[9,24]</sup>。在 *SIRT1* 基因启动子区含有 2 个 p53 结合元件, FOXO3a 通过该结合元件促进 *SIRT1* 基因的表达<sup>[25]</sup>。由于人 MCF-7 耐药细胞中 FOXO3a 的表达明显降低, 导致不能调节 *SIRT1* 基因的表达。而 NAM 处理耐药细胞后, 发生凋亡的时间滞后, 也可能与 FOXO3a 的含量低有关。因为 FOXO3a 活化后明显地促进凋亡蛋白 Bim 的表达, 而启动凋亡通路<sup>[26]</sup>。至于 SIRT1 蛋白调节 P-gp 表达的机制以及与其他重要信号蛋白的关系, 本实验室正在研究中。

## References

- [1] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function [J]. *Cell*, 2007, 128: 693 - 705.
- [2] Marchion D, Munster P. Development of histone deacetylase inhibitors for cancer treatment [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2007, 7: 583 - 598.
- [3] Liu AL, Long J, Wang N, et al. A new target of cancer therapy: advances in the study of histone deacetylase [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 585 - 590.
- [4] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 48 - 58.
- [5] Shi CJ, Fu LW. Advances in the study of expression and regulation of P-glycoprotein [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 911 - 916.
- [6] Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, et al. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of bid and production of reactive oxygen species [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10833 - 10838.
- [7] Tang R, Faussat AM, Majdak P, et al. Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute

- myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1 [J]. *Leukemia*, 2004, 18:1246-1251.
- [8] Batova A, Shao LE, Diccianni MB, et al. The histone deacetylase inhibitor AN-9 has selective toxicity to acute leukemia and drug-resistant primary leukemia and cancer cell lines [J]. *Blood*, 2002, 100:3319-3324.
- [9] Chu F, Chou PM, Zheng X, et al. Control of multidrug resistance gene *mdr1* and cancer resistance to chemotherapy by the longevity gene *sirt1* [J]. *Cancer Res*, 2005, 65:10183-10187.
- [10] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points [J]. *Cell*, 2004, 116:205-219.
- [11] Heltweg B, Gathbonton T, Schuler AD, et al. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes [J]. *Cancer Res*, 2006, 66:4368-4377.
- [12] Tabe Y, Konopleva M, Contractor R, et al. Up-regulation of MDR1 and induction of doxorubicin resistance by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) and ATRA in acute promyelocytic leukemia cells [J]. *Blood*, 2006, 107:1546-1554.
- [13] El-Osta A, Kantharidis P, Zalcberg JR, et al. Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (*MDR1*) on activation [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22:1844-1857.
- [14] Motta MC, Divecha N, Lemieux M, et al. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors [J]. *Cell*, 2004, 116:551-563.
- [15] Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase [J]. *Science*, 2004, 305:390-392.
- [16] Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6:298-305.
- [17] Chen WY, Wang DH, Yen RC, et al. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses [J]. *Cell*, 2005, 123:437-448.
- [18] Ford J, Jiang M, Milner J. Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival [J]. *Cancer Res*, 2005, 65:10457-10463.
- [19] Luo J, Nikolaev AY, Imai S, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress [J]. *Cell*, 2001, 107:137-148.
- [20] Saldeen J, Tillmar L, Karlsson E, et al. Nicotinamide- and caspase-mediated inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase are associated with p53-independent cell cycle (G2) arrest and apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 243:113-122.
- [21] Varshney R, Dwarakanath B, Jain V. Radiosensitization by 6-aminonicotinamide and 2-deoxy-D-glucose in human cancer cells [J]. *Int J Radiat Biol*, 2005, 81:397-408.
- [22] Napper AD, Hixon J, McDonagh T, et al. Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1 [J]. *J Med Chem*, 2005, 48:8045-8054.
- [23] Solomon JM, Pasupuleti R, Xu L, et al. Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26:28-38.
- [24] Ohsawa S, Miura M. Caspase-mediated changes in Sir2alpha during apoptosis [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580:5875-5879.
- [25] Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway [J]. *Science*, 2004, 306:2105-2108.
- [26] Möller C, Alfredsson J, Engström M, et al. Stem cell factor promotes mast cell survival *via* inactivation of FOXO3a-mediated transcriptional induction and MEK-regulated phosphorylation of the proapoptotic protein Bim [J]. *Blood*, 2005, 106:1330-1336.