

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.009

· 基础研究 ·

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS-275 对人宫颈癌 SiHa 细胞增殖及凋亡的影响

闫洪亮¹, 吴维光², 王箬¹, 孙兆翎¹, 唐雅娟¹ (1. 河北联合大学 研究生院, 河北 唐山 063000; 2. 武警后勤学院附属医院 妇产科, 天津 300162)

[摘要] **目的:** 观察组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS-275 对人宫颈癌 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨其可能的机制。**方法:** 以 MS-275 (0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 作用于人宫颈癌 SiHa 细胞, MTT 法检测细胞的增殖, 流式细胞术检测细胞的凋亡, Western blotting 法检测细胞内乙酰化组蛋白 H4 (acetylhistone4, Ac-H4) 水平, RT-PCR 检测 *p21* 和 *p53* mRNA 的表达。**结果:** MS-275 作用后, 人宫颈癌 SiHa 细胞增殖受到抑制, 细胞凋亡增加, 20 $\mu\text{mol/L}$ MS-275 作用下, 细胞增殖率仅为 (13.95 \pm 8.91)%, 凋亡率高达 (38.38 \pm 1.78)%, 显著高于其他各组 ($P < 0.01$)。MS-275 作用后, 细胞内 Ac-H4 水平增加 ($P < 0.01$), *p21* 和 *p53* mRNA 表达增加 (均 $P < 0.01$)。**结论:** MS-275 可抑制人宫颈癌 SiHa 细胞的增殖, 诱导 SiHa 细胞凋亡; 上调 *p21* 和 *p53* 表达、提高组蛋白乙酰化水平可能是其作用机制之一。

[关键词] 宫颈癌; 组蛋白脱乙酰化酶抑制剂; MS-275; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R737.33; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)02-0165-04

Effect of histone deacetylase inhibitor MS-275 on proliferation and apoptosis in human cervical carcinoma SiHa cells

Yan Hongliang¹, Wu Weiguang², Wang Zheng¹, Sun Zhaoling¹, Tang Yajuan¹ (1. Graduate School, Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Affiliated Hospital of Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of histone deacetylase (HDAC) inhibitor MS-275 on proliferation and apoptosis in human cervical carcinoma cells as well as the mechanisms underlying the effect. **Methods:** The human cervical carcinoma cell line, SiHa, was used as a model. SiHa cells were treated with histone deacetylase inhibitor MS-275 at 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$, respectively, for 48 h. The cell viability was assessed by MTT assays and the rate of cell apoptosis was determined by flow cytometry. Levels of acetyl histone H4 and *p21* and *p53* gene transcripts were analyzed by Western blotting and RT-PCR respectively. **Results:** MS-275 treatment resulted in an decrease in cellular growth activity and increases in apoptosis acetyl level of histone H4 and *p21* and *p53* mRNA abundance in SiHa cells in a concentration-dependent manner. **Conclusion:** Histone deacetylase inhibition may effectively inhibit the cellular proliferation and induce apoptosis in cervical carcinoma cells. The mechanisms underlying these effects may involve increased acetylation of histone up-regulated expression of *p21* and *p53*.

[Key words] cervical carcinoma; histone deacetylases inhibitor; MS-275; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(2): 165-168]

恶性肿瘤的发生是多个肿瘤基因表达改变的复杂过程, 涉及抑癌基因的失活及癌基因的激活等基因改变。基因表达的变化中, 有经典遗传学机制, 也有表观遗传学机制。研究^[1]表明, 组蛋白乙酰化水平影响相关基因的表达, 属于肿瘤发生的表观遗传学机制中最常见的调控形式之一。组蛋白乙酰化水平的失衡会影响细胞的增殖和凋亡, 尤其是乙酰化

水平的降低, 会导致肿瘤的发生。组蛋白去乙酰化

[作者简介] 闫洪亮(1989-), 女, 山西省临汾市人, 硕士生, 主要从事妇科肿瘤的基础及临床研究。E-mail: yanhongliang27@163.com

[通信作者] 吴维光(Wu Weiguang, corresponding author), E-mail: weiguangwu02@163.com

[网络出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140331.1727.008.html

酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂可影响相关基因的表达,抑制肿瘤细胞的增殖和诱导凋亡,已成为一类新型的抗肿瘤制剂。MS-275 属于苯甲酰胺类 HDAC 抑制剂,能够选择性杀伤肿瘤细胞,具有高效低毒的特点,对多种肿瘤具有抗肿瘤作用^[2-4]。本研究以此为切入点,选择 MS-275 体外作用于宫颈癌 SiHa 细胞,观察其对宫颈癌 SiHa 细胞增殖与凋亡的作用,及其对抑癌基因 *p21* 和 *p53* 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人宫颈鳞癌来源的 SiHa 细胞株购于武汉典型生物保藏中心,笔者实验室储存。RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,TRIzol 和 FITC-annexin V 凋亡试剂盒购自 Invitrogen 公司,MS-275 购自 Sigma 公司,MTT 试剂盒购自晶美公司,Real-time PCR Master Mix 购自 TaKaRa 公司,乙酰化组蛋白 H4(acetylhistone 4, Ac-H4)单克隆抗体和 β -actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,寡核苷酸引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 细胞培养及处理

SiHa 细胞在含有 100 mg/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。实验时取对数生长期细胞,于细胞培养瓶中加入 MS-275,终浓度分别为 0、5、10、20 μ mol/L,依次分为 A、B、C、D 组,A 组为对照组,各组细胞在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 48 h 后收集细胞。

1.3 MTT 法检测 MS-275 对 SiHa 细胞增殖的影响

取各组细胞,调整细胞密度为 5×10^5 /ml,接种于 96 孔细胞培养板中,每组设 3 个平行孔。细胞贴壁后,加入无血清培养液培养 12 h,使细胞同步化。更换含 100 mg/L 胎牛血清的培养液,37 °C、5% CO₂ 条件下培养 72 h。每孔加入 20 μ l MTT 液(5 mg/ml),继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μ l 的二甲基亚砜,振荡 10 min,酶标仪测定 490 nm 波长处各孔的光密度(*D*)值。细胞增殖率(%)=(实验组平均 *D* 值)/(对照组平均 *D* 值)×100%。实验重复 3 次。

1.4 流式细胞术检测 MS-275 对 SiHa 细胞凋亡的影响

收集各组细胞,预冷 PBS 洗涤 3 次,将细胞重悬于 500 μ l 预冷结合缓冲液中,调整细胞密度至 5×10^6 /ml。取 100 μ l 细胞悬液于流式管中,加入 5 μ l Annexin V 混匀,室温下避光孵育 15 min,上机前 5 min 加入 10 mg/L 碘化丙啶(PI)染液 5 μ l。流

式细胞术检测早期凋亡细胞数,用 CELL Quest 软件对结果进行分析。实验重复 3 次。

1.5 Western blotting 检测 MS-275 对 SiHa 细胞 Ac-H4 表达的影响

收集细胞,加入蛋白裂解液,冰上裂解 10 min,弃沉淀。应用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。取 20 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE,转移蛋白至硝酸纤维素膜上,50 g/L 脱脂奶封闭,加封闭液稀释的一抗(1:500),4 °C 过夜,洗膜后与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)室温下孵育 1 h,洗膜 3 次,ECL 发光压片成像,以 β -actin 为内参照,条带用 Quantity One 软件转化为灰度值,以 Ac-H4/ β -actin 条带灰度值比表示 Ac-H4 蛋白相对含量。实验重复 3 次。

1.6 RT-PCR 检测 MS-275 对 SiHa 细胞中 *p21* 和 *p53* mRNA 表达的影响

TRIzol 一步法抽提细胞总 RNA,紫外分光光度仪测定 RNA₂₆₀/RNA₂₈₀ 光密度值,以检测 RNA 样品的纯度和浓度。以随机引物进行逆转录,cDNA 合成在 42 °C 60 min 进行,70 °C 灭活 5 min,产物 -20 °C 保存。采用 7700 全定量 PCR 仪,以 *GAPDH* 为内参照进行 PCR。*p21* 引物序列,上游:5'-TTAG-CAGCGGAAGGAGT-3';下游:5'-AGAAACGGAAC-CAGGACAC-3';*p53* 引物序列,上游:5'-ACTA-AGCGAGCACTGCCCAAC-3';下游:5'-CCTCAT-TCAGCTCTCGGAACATC-3';*GAPDH* 引物序列,上游:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游:5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'。反应条件:95 °C、1 min,95 °C、15 s,60 °C、15 s,72 °C、45 s,共 40 个循环。扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳,UVP 凝胶成像系统灰度扫描,用 GEL-Pro 4.0 分析软件,以特异扩增条带与内参条带灰度之比表示目的基因相对表达量(RQ 值)。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *LSD-t* 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MS-275 以剂量依赖方式抑制 SiHa 细胞增殖

宫颈癌 SiHa 细胞增殖率检测结果见表 1。四组细胞增殖率比较,随 MS-275 剂量增加,细胞增殖率随之降低($F = 108.831, P = 0.000$)。

2.2 MS-275 以剂量依赖方式促进 SiHa 细胞凋亡

宫颈癌 SiHa 细胞凋亡率流式细胞术检测结果见图 1 和表 1。四组细胞凋亡率比较,随 MS-275 剂

量增加,细胞凋亡率随之增高($F = 177.063, P = 0.000$)。

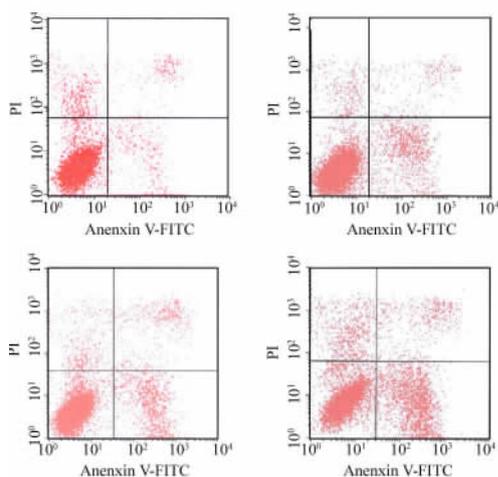


图 1 流式细胞术检测 SiHa 细胞在 MS-275 作用后的凋亡率

Fig. 1 Cell apoptosis rate of SiHa cells treated with MS-275 by flow cytometry

A: 0 μmol/L MS-275; B: 5 μmol/L MS-275; C: 10 μmol/L MS-275; D: 20 μmol/L MS-275

表 1 MS-275 对 SiHa 细胞增殖和凋亡的影响(%)
Tab. 1 The effect of MS-275 on proliferation and apoptosis in SiHa cells (%)

MS-275 [$c_B / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$]	Proliferation rate	Apoptosis rate
0	100.00 ± 0.00	8.19 ± 1.76
5	58.87 ± 4.04	13.08 ± 1.75
10	36.90 ± 7.23	23.21 ± 1.65
20	13.95 ± 8.91	38.38 ± 1.78
<i>F</i>	108.831	177.063
<i>P</i>	0.000	0.000

2.3 MS-275 提高 SiHa 细胞中 Ac-H4 的水平

宫颈癌 SiHa 细胞 Ac-H4 水平的 Western blotting 检测结果见图 2 和表 2。

SiHa 细胞的 Ac-H4 水平随 MS-275 剂量增加而增加($F = 24.142, P = 0.000$),组间两两比较,差异均有统计学意义。

2.4 MS-275 促进 SiHa 细胞中 p21 和 p53 mRNA 的表达

宫颈癌 SiHa 细胞 p21 和 p53 mRNA 表达检测结果见表 2。四组细胞 p21 mRNA 比较,随 MS-275 剂量增加,细胞 p21 mRNA 表达量增加($F = 448.747, P = 0.000$)。四组细胞 p53 mRNA 表达比较,随 MS-275 剂量增加,细胞 p53 mRNA 表达增加($F = 200.028, P = 0.000$)。

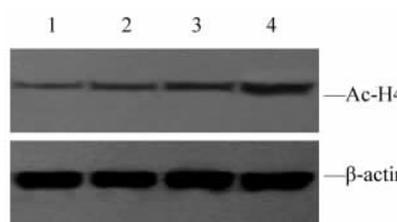


图 2 MS-275 作用后 SiHa 细胞中 Ac-H4 的水平

Fig. 2 Level of Ac-H4 in SiHa cells treated with MS-275

1: 0 μmol/L MS-275; 2: 5 μmol/L MS-275; 3: 10 μmol/L MS-275; 4: 20 μmol/L MS-275

表 2 MS-275 作用后 SiHa 细胞中 Ac-H4 蛋白和 p21 与 p53 mRNA 的表达

Tab. 2 Expressions of Ac-H4 protein and mRNA of p21 and p53 in SiHa cells treated with MS-275)

MS-275 [$c_B / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$]	Ac-H4 protein	p21 mRNA	p53 mRNA
0	0.10 ± 0.09	2.54 ± 0.37	4.15 ± 0.89
5	0.29 ± 0.08	4.88 ± 0.35	7.23 ± 0.88
10	0.50 ± 0.11	7.21 ± 0.38	13.62 ± 0.86
20	0.73 ± 0.10	13.16 ± 0.39	20.25 ± 0.87
<i>F</i>	24.142	448.747	200.028
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

3 讨论

宫颈癌是最常见的女性生殖系统恶性肿瘤,与高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的持续感染相关^[5],但并非感染高危型 HPV 的患者都会发展成宫颈癌。近年来,在宫颈癌发生及发展研究领域,表观遗传学组蛋白乙酰化已成为热点^[6]。组蛋白的乙酰化水平是基因表达的重要调控方式之一,影响其乙酰化水平的主要有组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase, HAT)和 HDAC。HAT 将乙酰辅酶 A 的乙酰基转移到赖氨酸的氨基端,中和组蛋白所带的正电荷,从而减弱 DNA 和组

蛋白之间的相互作用,易于转录因子与 DNA 结合而促进转录。相反,HDAC 可以移去 N 端的乙酰基,减弱 DNA 和组蛋白的相互作用而抑制转录。组蛋白去乙酰化可引起抑癌基因表达被抑制或过度激活,均可导致肿瘤的发生。研究^[7-9]已证实,在宫颈癌组织中 HDAC 1 和 HDAC 2 表达增高,与高危型 HPV 感染关系密切。

干预拮抗表观遗传学改变,诱导失活的抑癌基因表达是表观遗传学治疗恶性肿瘤的理论基础。HDAC 抑制剂可通过增加组蛋白乙酰化水平使染色质结构松散,易于转录因子与 DNA 结合,增加转录,从而影响细胞分化和凋亡^[10]。目前认为,HDAC 抑制剂主要通过以下 3 条途径发挥作用:(1)通过上调 p21 基因表达来阻滞细胞周期,促进分化;(2)通过半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶依赖和非依赖途径促进细胞凋亡;(3)间接抑制血管生成因子,阻断肿瘤供血。苯甲酰胺类 HDAC 抑制剂 MS-275 已经通过体外实验、临床试验^[11-13]证实对多种恶性肿瘤具有较好的对抗作用。本研究通过观察人宫颈癌 SiHa 细胞经 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS-275 作用 48 h 后的相关指标,亦发现,经处理后的宫颈癌 SiHa 细胞增殖明显受到抑制,凋亡率增加,并呈现出剂量依赖性,进一步说明在体外试验中 MS-275 能抑制宫颈癌 SiHa 细胞的增殖、诱导凋亡,有一定的抗肿瘤效应。

P21 是细胞周期负性调节因子,可抑制 Cyclin D1-CDK4 和 Cyclin E-CDK2 的激活,使细胞周期停滞在 G₁ 期;P21 还可以通过细胞周期调控作用间接参与细胞凋亡^[14]。p53 基因是细胞生长周期的核心基因,该基因通过影响细胞的生长和凋亡而发挥作用,野生型 p53 基因是细胞生长的负性调节因子,通过调控细胞生长和诱导细胞凋亡而起到抑癌作用,其表达降低或基因突变均可诱导肿瘤的发生^[15]。本研究中对经 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS-275 作用 48 h 后的宫颈癌 SiHa 细胞的相关指标进行检测,发现 Ac-H4 表达增加,同时细胞 p21 基因和 p53 基因 mRNA 表达也增加,且呈剂量依赖性,说明 MS-275 抑制 HDAC 活性,增加其乙酰化水平,进而上调抑癌基因 p21 和 p53 表达,这可能是 MS-275 抑制 SiHa 细胞增殖和诱导细胞凋亡的机制之一。

综上所述,MS-275 在体外对宫颈癌 SiHa 细胞有较好的对抗作用,其机制可能是抑制 HDAC 活性,导致组蛋白乙酰化水平升高,上调抑癌基因 p21 和 p53 表达,从而达到抑制癌细胞增殖和诱导凋亡的效果。相信随着对 MS-275 的进一步研究,可为

宫颈癌的治疗提供一条新途径。

[参考文献]

- [1] Liu S. Epigenetics advancing personalized nanomedicine in cancer therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(13): 1532-1543.
- [2] Xiao W, Dong W, Zhang C, et al. Effects of the epigenetic drug MS-275 on the release and function of exosome-related immune molecules in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18(1): 61-67.
- [3] Choo QY, Ho PC, Tanaka Y, et al. The Histone deacetylase inhibitors MS-275 and SAHA suppress the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and chemotaxis in rheumatoid arthritic synovial fibroblastic E11 cells [J]. *Molecules*, 2013, 18(11): 14085-14095.
- [4] Chou DHC, Holson EB, Wagner FF, et al. Inhibition of histone deacetylase 3 protects beta cells from cytokine-induced apoptosis [J]. *Chem Biol*, 2012, 19(6): 669-673.
- [5] Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence [J]. *J Clin Virol*, 2000, 19(1/2): 1-5.
- [6] Liu N, Zhao L, Li X, et al. Histone deacetylase inhibitors inducing human cervical cancer cell apoptosis by decreasing DNA-methyltransferase 3B [J]. *Chin Med J*, 2012, 125(18): 3273-3278.
- [7] 邢军, 岳天孚, 李秀伟, 等. 宫颈病变中 HDAC1 的表达以及与 HPV16 感染的关系 [J]. *中国妇幼保健杂志*, 2011, 26(8): 1217-1219.
- [8] 陈琛. 组蛋白去乙酰化酶 2 在宫颈鳞癌组织中的表达及临床意义 [J]. *肿瘤基础与临床杂志*, 2011, 24(6): 468-471.
- [9] 李琪, 李辉, 柯铁, 等. HPV E7 介导 HDAC 抑制宫颈癌细胞 MHC-I 基因转录的研究 [J]. *福建医科大学学报*, 2012, 46(5): 301-304.
- [10] Hagelkruys A, Sawicka A, Rennmayr M, et al. The biology of HDAC in cancer: Thenuclearand epigenetic components [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011, 206: 13-37.
- [11] Qian DZ, Wei YF, Wang X, et al. Antitumor activity of the histone deacetylase inhibitor MS-275 in prostate cancer models [J]. *Prostate*, 2007, 67(11): 1182-1193.
- [12] Qu W, Kang YD, Zhou MS, et al. Experimental study on inhibitory effects of histone deacetylase inhibitor MS-275 and TSA on bladder cancer cells [J]. *Urol Oncol*, 2010, 28(6): 648-654.
- [13] Altmann A, Eisenhut M, Bauder-Wüst U, et al. Therapy of thyroid carcinoma with the histone deacetylase inhibitor MS-275 [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010, 37(12): 2286-2297.
- [14] Monahan P, Himes AD, Parfieniuk A, et al. p21, an important mediator of quiescence during pituitary tumor formation, is dispensable for normal pituitary development during embryogenesis [J]. *Mech Dev*, 2012, 128(11-12): 640-652.
- [15] Chen F, Wang W, El-Deiry WS. Current strategies to target p53 in cancer [J]. *Biochem Pharm*, 2010, 80(5): 724-730.

[收稿日期] 2013-12-11

[修回日期] 2014-02-20

[本文编辑] 阮芳铭, 黄静怡