

PXD101 对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及凋亡影响的机制探讨*

李媛媛 张 斌 赵洪猛 冯炜红 张 月 刘博文 陈祖锦 曹旭晨

摘要 目的:探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂 PXD101 对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、细胞周期及凋亡的影响及分子机制研究。**方法:**应用不同浓度 PXD101 处理培养的乳腺癌细胞株 MCF-7, 通过赛唑蓝比色 (MTT) 法和平板克隆形成实验检测药物对细胞增殖的影响; Hoechst33342 荧光染色法观察细胞形态变化; 流式细胞仪 PI 染色法检测细胞周期变化以及 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡情况; Western blot 检测 p21、CyclinB1、PARP、Bcl-2 以及 Bax 的蛋白表达。**结果:**PXD101 以剂量时间依赖性抑制 MCF-7 细胞的增殖; 荧光显微镜观察发现细胞核碎裂, 出现凋亡小体; 0、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ PXD101 作用 24 h 后, G_2/M 期细胞比例增加, 分别为 (12.66 \pm 1.55)%、(20.63 \pm 1.32)%、(23.20 \pm 1.82)%、(32.19 \pm 2.37)% ($P < 0.05$), 凋亡细胞也增加 ($P < 0.05$); p21 表达增多, CyclinB1 表达减少, PARP 剪切明显增加, Bcl-2 表达减少, Bax 表达增加。**结论:**PXD101 在体外条件下能够明显抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖, 诱导细胞周期阻滞及凋亡, 并呈剂量依赖性。

关键词 乳腺癌 PXD101 细胞周期 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.05.003

The Effects of PXD101 on Proliferation and Apoptosis of Human Breast Cell Line MCF-7 and Its Mechanism

Yuanyuan LI, Bin ZHANG, Hongmeng ZHAO, Weihong FENG, Yue ZHANG, Bowen LIU, Zujin CHEN, Xuchen CAO

Correspondence to: Xu-chen CAO, E-mail: cxc@medmail.com.cn

NO. 1 Department of Breast Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital

Ministry of Education Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy and Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No.81001186) and Natural Science Foundation of Tianjin (No.10JCYBJC14100)

Abstract Objective: This work aims to investigate the effect of PXD101, a novel potent histone deacetylase inhibitor, on the cell proliferation, cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7 and to preliminarily explore its molecular mechanism. **Methods:** MCF-7 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovin serum and were treated with PXD101 at varying concentrations. The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and clonogenic assay were used to measure cell proliferation. Morphological changes of cells were observed by fluorescent microscope after staining by Hoechst33342. Flow cytometer was used to analyze the cell cycle arrest rates (PI staining) and the cell apoptotic rates (AnnexinV-FITC/PI double-staining). The protein expressions of p21, CyclinB1, PARP, Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. **Results:** PXD101 was used to inhibit the proliferation of the MCF-7 cell line in a dose and time-dependent manner. Fluorescence microscope showed there were nuclear fragmentation and apoptosis bodies in the cells. Flow cytometric analysis indicated that PXD101 induced MCF-7 cells in G_2/M phase were significantly increased. After MCF-7 cells exposed to different concentrations of PXD101, i.e., 0, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$, for 24 h, the ratio of G_2/M -phase cells was (12.66 \pm 1.55)%, (20.63 \pm 1.32)%, (23.20 \pm 1.82)% and (32.19 \pm 2.37)% respectively ($P < 0.05$). The rates of apoptotic cells were also significantly increased, compared with the control group ($P < 0.05$). PXD101 could up-regulate the protein expression of p21 and down-regulate the expression of CyclinB1. The cleavage of PARP and the expression of pro-apoptosis protein Bax were increased while the anti-apoptosis protein Bcl-2 was decreased. **Conclusion:** PXD101 *in vitro* can significantly inhibit the proliferation and can induce cell cycle arrest and apoptosis on human breast cancer MCF-7 cell line in a dose-dependent manner. PXD101 may become a new anti-tumor drug for human breast cancer.

Keywords Breast neoplasm; PXD101; Cell cycle; Apoptosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,近年来,其发病率呈明显上升的趋势。组蛋白去乙酰化酶

(Histone Deacetylase, HDAC)抑制剂是一种新型抗肿瘤药物,研究表明,它们可以抑制肿瘤细胞生长、诱

作者单位:天津医科大学附属肿瘤医院乳腺一科,乳腺癌防治教育部重点实验室,天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060)

*本文课题受国家自然科学基金(编号:81001186)和天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(编号:10JCYBJC14100)资助

通信作者:曹旭晨 cxc@medmail.com.cn

导细胞分化和促进凋亡,而对正常细胞几乎没有影响^[1]。PXD101属于新型羟肟酸类HDAC抑制剂,研究发现其对卵巢癌、膀胱癌等有抑制作用^[2],但应用于乳腺癌的研究较少。本实验主要研究PXD101对乳腺癌MCF-7细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响,并对相关机制进行初步探讨,为将来应用于乳腺癌临床试验提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人乳腺癌细胞株MCF-7由天津医科大学附属肿瘤医院中心实验室提供。p21等蛋白一抗购于CST公司,Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒购于BD公司,荧光染料Hoechst33342购于Invitrogen公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7细胞株常规培养于RPMI 1640培养液中,内含10%胎牛血清、1%双抗(青霉素100 U/mL和链霉素100 μg/mL),于37℃、5% CO₂培养箱中培养。待细胞长满瓶底80%~90%时用0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 将细胞按 3×10^4 个/孔浓度接种于96孔板内。24 h后置换为不同浓度的PXD101 200 μL,设计浓度分别为0.01、0.1、1、10、100 μmol/L;对照组加入等量培养液,每组设置3个复孔。加药24 h、48 h后每孔加入20 μL MTT(5 g/L),避光孵育4 h后,1 000 RPM离心5 min弃上清液,加入DMSO 200 μL/孔,震荡10 min,用酶标仪检测各孔570 nm处吸光度(OD值)。细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组OD值/对照孔OD值)×100%。

1.2.3 平板克隆形成实验 制备单细胞悬液,按每孔300个接种于6孔板,每组接种3孔。细胞贴壁后,置换成不同浓度的PXD101(终浓度分别为0、0.1、1、10 μmol/L)2 mL。6 h后,换成普通培养液,2W后,终止培养,预冷PBS漂洗,纯甲醇固定15 min,结晶紫染色15 min, PBS洗去染液,空气干燥。显微镜下记数克隆数(50个细胞以上者记为一个克隆),计算每组平均值。

1.2.4 Western blot 检测 Acetyl-H3、H3、p21、CyclinB1、PARP、Bcl-2、Bax的蛋白表达 以 2×10^5 个/孔密度将细胞接种于6孔板内,每孔2 mL。设计PXD101浓度分别为0、0.1、1、10 μmol/L。加药24 h后,提取蛋白,BCA法测蛋白浓度。按50 μg/孔上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,37 mA恒流1 h将蛋白电转移至醋酸纤维素膜上,5%脱脂牛奶于37℃温箱内封闭膜0.5 h,一抗封闭4℃过夜,第2天与加入HRP标记的二抗室温孵育1 h后,ECL显影,暗室曝光。

1.2.5 Hoechst33342荧光染色法 以适当浓度将细胞接种于6孔板内。细胞贴壁后置换为不同浓度的PXD101(0、0.1、1、10 μmol/L),处理细胞24 h后,加入Hoechst 33342(5 g/L)10 μL,培养箱孵育30 min后,倒置荧光显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.6 PI单标记流式细胞仪检测细胞周期的变化 以 1×10^6 个/孔密度将细胞接种于6孔板中,药物浓度设计与上述相同,作用24 h后收集细胞,1 000 RPM离心5 min,预冷PBS重悬,再次离心,弃上清,500 μL PBS重悬,加入2 mL无水乙醇,4℃固定过夜。转天离心收集沉淀细胞,加入500 μL PI染液(含RNase),避光孵育30 min,上机检测,重复3次。

1.2.7 Annexin-V/PI双标记流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞铺板和药物浓度设计与上述相同,加药24 h后收集细胞,预冷PBS洗涤2次,重悬于结合缓冲液,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。按细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,取100 μL细胞悬液至5 mL流式管中,分别加5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI(5 mg/L),混匀,室温避光孵育15 min后,加400 μL Buffer缓冲液,于1 h内上机检测,重复3次。

1.3 统计学方法

采用SPSS 16.0软件进行单因素方差分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT法检测细胞增殖抑制率

PXD101对MCF-7细胞增殖抑制具有剂量和时间依赖性。MTT结果显示PXD101对MCF-7细胞的抑制率随药物浓度和时间增加而增加(图1),0.1 μmol/L组、1 μmol/L组、10 μmol/L组24 h和48 h抑制率的差异均有统计学意义($P < 0.05$),24 h IC₅₀为(4.221 ± 0.38) μmol/L,48 h IC₅₀为(0.716 ± 0.28) μmol/L。

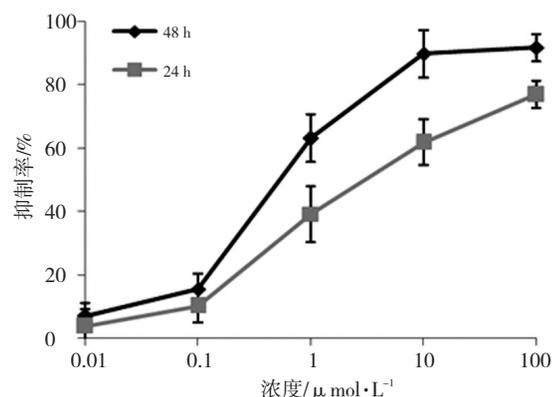


图1 不同浓度PXD101作用于MCF-7细胞24 h和48 h后的抑制率曲线

Figure 1 Inhibition ratio of PXD101 on MCF-7 cells at varying concentrations and in different treatment durations (24h, 48h)

2.2 平板克隆形成实验

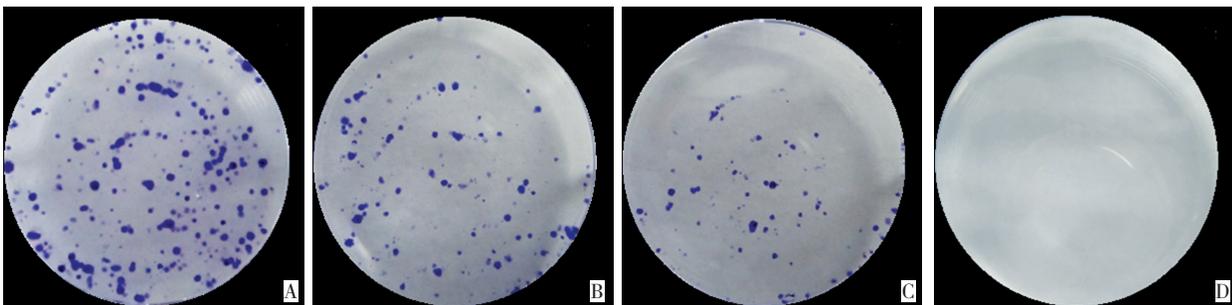
0、0.1、1 和 10 $\mu\text{mol/L}$ PXD101 处理组克隆形成数目分别为(51.3 \pm 8.2)个、(25.7 \pm 3.7)个、(12.6 \pm 2.9)个和(0.8 \pm 0.24)个(图2),差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示PXD101对单个癌细胞的增殖能力有明显的抑制作用。

2.3 细胞周期分析

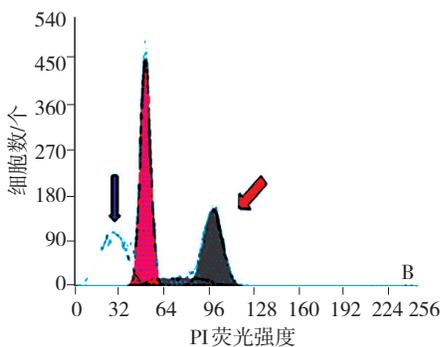
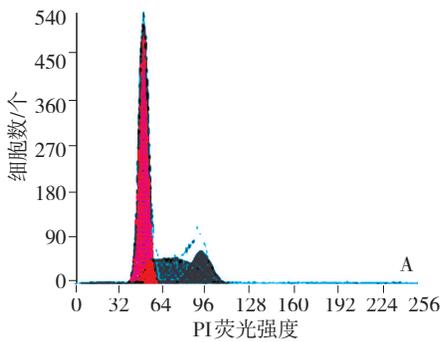
随药物浓度增加,G₂/M期细胞比例明显增加,subG₁峰也显著增多,提示细胞凋亡(图3,表1)。加药组与未加药组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 Western blot 检测 Acetyl-H3 及细胞周期相关蛋白表达水平

结果显示随药物浓度增加,Acetyl-H3 也明显增加,而组蛋白H3变化不大(图4),表明PXD101可以明显增加MCF-7细胞的乙酰化组蛋白表达水平。随药物浓度增加,周期相关蛋白p21表达增多而CyclinB1表达减少(图4),提示PXD101作用后引起细胞G₂/M期阻滞,这可能与诱导p21表达增多且CyclinB1表达减少有关。



A: 0 $\mu\text{mol/L}$; B: 0.1 $\mu\text{mol/L}$; C: 1 $\mu\text{mol/L}$; D: 10 $\mu\text{mol/L}$
图2 PXD101 作用于MCF-7细胞平板克隆的形成
Figure 2 Clonogenic assay of PXD101 on MCF-7 cells



A: 0 $\mu\text{mol/L}$; B: 10 $\mu\text{mol/L}$
红箭头示G₂/M期,绿箭头示subG₁峰

图3 PXD101 作用于MCF-7细胞后的周期变化

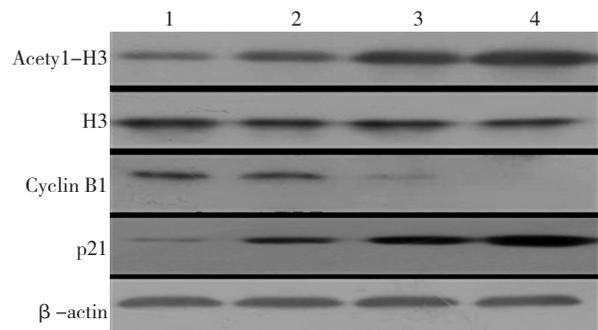
Figure 3 Effect of PXD101 on cell cycle distribution of MCF-7. The green arrow shows the subG₁ peak

表1 PXD101 处理MCF-7细胞24h后细胞周期百分比 (n=3, $\bar{x} \pm s$, %)

Table 1 Cell-cycle distribution of MCF-7 cells at 24h after PXD101 treatment

PXD101 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	subG ₁
0	55.02 \pm 3.19	32.32 \pm 2.65	12.66 \pm 1.55	0.35 \pm 0.14
0.1	59.98 \pm 3.69	19.39 \pm 2.81 ^a	20.63 \pm 1.32 ^a	1.52 \pm 0.33 ^a
1	50.46 \pm 3.72	26.34 \pm 3.16 ^a	23.20 \pm 1.82 ^a	5.48 \pm 0.99 ^a
10	61.2 \pm 4.28 ^a	6.61 \pm 0.73 ^a	32.19 \pm 2.37 ^a	20.72 \pm 1.62 ^a

与对照组0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,^a $P < 0.05$



1: 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 0.1 $\mu\text{mol/L}$; 3: 1 $\mu\text{mol/L}$; 4: 10 $\mu\text{mol/L}$

图4 PXD101 作用于MCF-7细胞后Acetyl-H3、H3、CyclinB1及p21蛋白的表达

Figure 4 Effects of PXD101 on the protein expression of Acetyl-H3, H3, Cyclin B1, and p21 in MCF-7 cells

2.5 细胞形态学改变

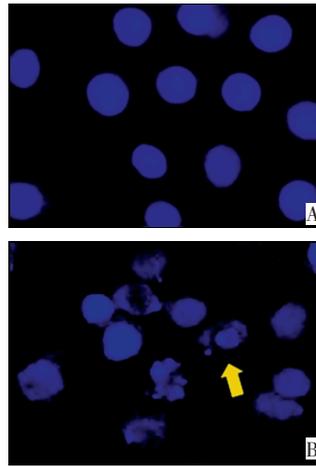
药物处理细胞 24 h 后,可观察到典型的凋亡细胞的形态学变化:细胞核固缩,核碎裂,并且出现大小不等、不规则的碎片,而且随药物浓度增加,这种细胞数量也增多(图5)。

2.6 细胞凋亡率

0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ PXD101 作用 MCF-7 细胞 24h 后,细胞的凋亡率分别为 $(4.5 \pm 0.92)\%$ 、 $(15.1 \pm 0.68)\%$ 、 $(32.4 \pm 0.67)\%$ (图6),与对照组 $(2.04 \pm 0.73)\%$ 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达水平

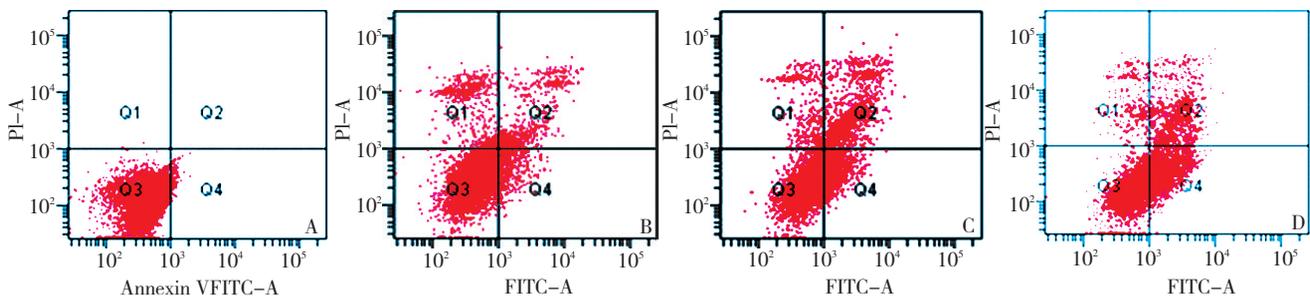
PARP 的剪切是细胞凋亡的标志之一。本实验观察到 PARP 剪切带随药物浓度增加而增加,抗凋亡指标 Bcl-2 表达减少,而促凋亡指标 Bax 表达增多(图7)。



A: 0 $\mu\text{mol/L}$; B: 10 $\mu\text{mol/L}$; 箭头示核碎裂

图5 PXD101 作用于 MCF-7 细胞后细胞形态变化

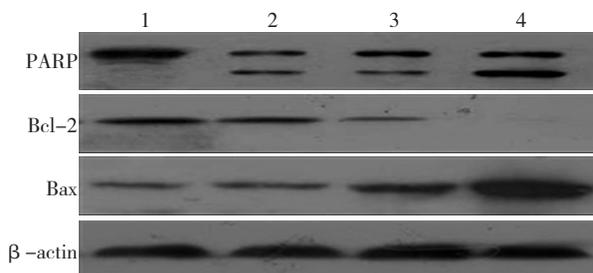
Figure 5 Morphological changes of MCF-7 cells after PXD101 treatment



A: 0 $\mu\text{mol/L}$; B: 0.1 $\mu\text{mol/L}$; C: 1 $\mu\text{mol/L}$; D: 10 $\mu\text{mol/L}$

图6 PXD101 作用于 MCF-7 细胞后的细胞凋亡情况

Figure 6 Apoptosis of MCF-7 cells after PXD101 treatment



1: 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 0.1 $\mu\text{mol/L}$; 3: 1 $\mu\text{mol/L}$; 4: 10 $\mu\text{mol/L}$

图7 PXD101 作用于 MCF-7 细胞后 PARP、Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达

Figure 7 Effects of PXD101 on the protein expression of PARP, Bcl-2 and Bax in MCF-7 cells

3 讨论

近年来,随着对表观遗传学的研究逐步深入,人们发现组蛋白乙酰化和去乙酰化修饰在基因的转录调控中起重要作用,并与肿瘤的发生密切相关。多项研究表明,HDAC 抑制剂对多种实体瘤和血液系统肿瘤具有显著抑制作用,但具体的分子机制尚不十分明确^[3]。尽管 HDAC 抑制剂用于乳腺癌的研究较少,但研究表明,组蛋白去乙酰化/乙酰化水平异常与

乳腺癌密切相关^[4]。Krusehe 等^[5]研究 600 例乳腺癌标本后发现,分别有 39.8% 和 43.9% 的乳腺癌标本高表达 HDAC1 与 HDAC3。因此,本组研究新型 HDAC 抑制剂 PXD101 对乳腺癌 MCF-7 细胞是否有抑制作用。

本研究结果显示,PXD101 可以增加 MCF-7 细胞的组蛋白乙酰化水平,并且在体外可以显著抑制 MCF-7 细胞的增殖,呈现一定的量效关系。为了研究 PXD101 抑制乳腺癌的可能机制,本组用流式细胞仪检测了其对细胞周期的影响。HDAC 抑制剂诱导细胞周期阻滞的作用与药物种类和肿瘤细胞有关。有研究发现,HDAC 抑制剂可以引起肿瘤细胞 G₁ 期阻滞,这可能与 p53 依赖的 p21 途径有关,和(或)HDAC 抑制剂引起 CyclinD、CyclinA 蛋白表达减少阻碍 S 期进程有关^[6]。但是,本研究结果发现 PXD101 诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生 G₂/M 期阻滞。p21 是细胞周期激酶抑制因子,它与细胞周期阻滞和凋亡密切相关,而且与乳腺癌的预后有关^[7]。近期研究表明,PXD101 可以诱导前列腺癌^[8]、肝癌^[9]等肿瘤细胞的

p21蛋白表达增加。另一方面,CyclinB1是细胞G₂期到M期重要的周期蛋白,研究表明,CyclinB1表达降低,可能是HDAC抑制剂诱导肿瘤细胞G₂/M期阻滞的重要机制之一^[10]。本研究发现,PXD101可以引起p21蛋白表达增加,CyclinB1表达降低,并有一定的量效关系。因此,PXD101可能通过诱导p21的蛋白表达,降低CyclinB1的表达,进而引起了细胞周期G₂/M期阻滞,从而抑制肿瘤细胞的增殖。

细胞凋亡程序的异常与恶性肿瘤的发生密切相关^[11],临床上许多抗癌药物均是通过诱导细胞凋亡从而达到抑制肿瘤生长的目的。PXD101作用于MCF-7细胞后,本研究通过Hoechst33342荧光染色观察到典型的凋亡细胞形态学变化;PARP剪切增加;凋亡细胞增多,并呈一定的量效关系,这些均表明PXD101能够诱导MCF-7细胞发生凋亡。Bcl-2家族是调节细胞凋亡最重要的因子,包括抗凋亡因子Bcl-2、Bcl-X_L、和Mcl-1等和促凋亡因子Bax、Bim和Bax等。其中最重要的是Bcl-2和Bax。有研究发现,HDAC抑制剂可以通过调控Bcl-2家族蛋白的表达和亚细胞定位,活化线粒体凋亡信号通路,进而诱导肿瘤细胞凋亡^[12]。本研究发现,随PXD101浓度增高,Bcl-2表达减少,而Bax表达增多。因此,PXD101抑制细胞增殖的另一面是诱导细胞凋亡,这可能与其调控Bcl-2、Bax表达有关。

本研究结果发现HDAC抑制剂PXD101对乳腺癌MCF-7细胞有抑制增殖、诱导周期停滞和促进细胞凋亡的作用,并呈一定的剂量依赖性。但具体的分子生物学机制还有待于进一步研究。

参考文献

- Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(32): 5459-5468.
- Gimsing P. Belinostat: a new broad acting antineoplastic histone deacetylase inhibitor[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2009, 18(4): 501-508.
- Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy[J]. J Cell Biochem, 2009, 107(4): 600-608.
- Singh J, Murata K, Itahana Y, et al. Constitutive expression of the Id-1 promoter in human metastatic breast cancer cells is linked with the loss of NF-1/Rb/HDAC-1 transcription repressor complex[J]. Oncogene, 2002, 21(12): 1812-1822.
- Kruse CA, Wulfing P, Kersting C, et al. Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 90(1): 15-23.
- Zhou Q, Dalgard CL, Wynder C, et al. Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in neurosphere formation by adult subventricular cells[J]. BMC Neurosci, 2011, 12: 50.
- Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 123(3): 725-731.
- Qian X, Ara G, Mills E, et al. Activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat(PXD101) in preclinical models of prostate cancer[J]. Int J Cancer, 2008, 122(6):1400-1410.
- Ma BB, Sung F, Tao Q, et al. The preclinical activity of the histone deacetylase inhibitor PXD101(belinostat) in hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Invest New Drugs, 2010, 28(2): 107-114.
- Bi G, Jiang G. The molecular mechanism of HDAC Inhibitors in anticancer effects[J]. Cell Mol Immunol, 2006, 3(4): 285-290.
- Tait JF. Imaging of apoptosis[J]. J Nucl Med, 2008, 49(10): 1573-1576.
- Hwang JJ, Kim YS, Kim MJ, et al. Histone deacetylase inhibitor potentiates anticancer effect of docetaxel via modulation of Bcl-2 family proteins and tubulin in hormone refractory prostate cancer cells[J]. J Urol, 2010, 184(6): 2557-2564.

(2011-07-13收稿)

(2011-10-18修回)

(王展宏校对)

欢迎使用《中国肿瘤临床》在线稿件管理系统

为满足期刊信息化及网络化发展的迫切需要,方便广大作者投稿与专家审稿,提高编辑部工作效率和管理水平,《中国肿瘤临床》杂志于2011年6月16日采用Magtech JournalX 2.0在线投稿管理系统,实行稿件在线处理,支持作者在线投稿及稿件查询,专家在线审稿等功能。

投稿作者或审稿专家请登录本刊杂志官方网站<http://www.cjco.cn>,点击左侧“作者中心”或“审者中心”开始相应流程操作。作者按照提示注册后进行在线投稿,投稿成功后可以实时登录查询稿件进度及处理审者、编者意见,并能与编辑部进行通讯。审稿系统中将提供自动提醒和催审功能,提醒专家进行电子邮件审稿或者在线审稿,审稿专家也可通过该系统与编辑部进行交流。

欢迎广大作者与审稿专家使用本刊投审稿系统,来电垂询:022-23527053。