

文章编号:1005-6947(2007)06-0574-03

· 基础研究 ·

曲古菌素 A 对结肠癌 Lovo 细胞增殖抑制的研究

张波, 刘科, 陈道达

(华中科技大学附属协和医院 普通外科, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古菌素 A (TSA) 对结肠癌 Lovo 细胞增殖活性的抑制作用。方法 采用不同浓度的 TSA 处理结肠癌 Lovo 细胞。MTT 法检测药物作用前后的细胞增殖情况。流式细胞仪检测 TSA 处理前后细胞周期的变化。结果 TSA 在 500 ng/mL 浓度以上才能明显抑制结肠癌 Lovo 细胞的增殖, 抑制率由第 2 天至第 5 天显著增加 (57.21% 至 82.76%) 细胞周期检测发现 20 ng/mL TSA 即可导致细胞 G₁ 期阻滞, 但没有诱导明显的细胞凋亡; ≥100 ng/mL TSA 可诱导明显的细胞凋亡。结论 TSA 可以抑制体外结肠癌 Lovo 细胞的生长, 可能通过细胞周期 G₁ 期阻滞及诱导细胞凋亡发挥抑癌作用。TSA 可能是结肠癌治疗的潜在靶点。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(6): 574-576]

关键词: 结肠肿瘤; 曲古菌素 A/治疗应用; 细胞周期; 肿瘤细胞, 培养的

中图分类号: R735.35; R73-3

文献标识码: A

Effects of trichostatin A on the growth of colon cancer cells

ZHANG Bo, LIU Ke, CHEN Dao-da

(Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022 China)

Abstract: **Objective** To investigate whether trichostatin A (TSA) possesses antitumor activity against human colon cancer cells. **Methods** Human colon cancer cell line Lovo was treated with different concentrations of TSA. The growth of Lovo cells were observed by MTT assay before and after TSA treatment. The cell cycle of Lovo cells was analyzed by flow cytometry. **Results** Trichostatin A significantly inhibited the proliferation of colon cancer cells at 500 ng/ml. The inhibition rate increased sharply from day 2 to day 5 (57.21% to 82.76%). 20 ng/ml TSA treatment could induce cell cycle arrest at the G₁ phase, but with no apparent increase in apoptotic cells. ≥100 ng/ml TSA could induce significant apoptosis as shown by flow cytometry. **Conclusions** The results indicate that TSA is able to inhibit colon cancer cell growth in vitro, possibly through G₁ cell cycle arrest and induction of apoptosis. This study suggests that TSA may be a potential therapeutic agent for the target treatment of colon cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(6): 574-576]

Key words: Colonic Neoplasms; Trichostatin A/ther use; Cell Cycle; Tumor Cells, Cultured

CLC number: R735.35; R73-3

Document code: A

结肠癌是全球第三大恶性疾病, 其发病率在 35~50/10 万人左右, 在发达国家尤其显著, 发病率平均每年增长 4.2%。常见的高危因素有: 低纤维、高脂肪饮食, 家族史, 肥胖和炎性结直肠疾病等^[1]。曲古菌素 A (Trichostatin A, TSA) 是一种

抗真菌药物, 也是强大的组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 研究显示它可以抑制一些肿瘤细胞的生长^[2-3]。本文探讨 TSA 调节结肠癌 Lovo 细胞增殖的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和药物浓度

Lovo 细胞 (协和医院普外科实验室惠赠) 于含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 mg/mL 链霉

收稿日期: 2006-04-17; 修订日期: 2007-05-31。

作者简介: 张波, 女, 山东荣成人, 华中科技大学附属协和医院主治医师, 主要从事肿瘤标志物和早期诊断方面的研究。

通讯作者: 陈道达 E-mail: chendaoda2006@126.com

素的 DMEM 培养基 (Gibco 公司) 中, 置含 5% CO₂, 37℃ 的培养箱。细胞贴壁后再加药物处理。TSA (Sigma 公司) 溶解于二甲基亚砷 (DMSO), 配制成 1 × 10⁴ ng/mL 的储存液, 在培养基中稀释成终浓度为 5, 20, 100 和 500 ng/mL 的工作液。

1.2 MTT 法检测细胞增殖活性

以每孔 1 × 10³ 个细胞接种于 96 孔板, 各组设 6 个复孔。对照组细胞以常规 DMEM 培养, 药物作用组将细胞分别置入含有 5, 20, 100 和 500 ng/mL TSA 的 DMEM 中培养。待细胞贴壁后, 每 24h 测量 1 次。每孔加入浓度 5 g/L 的 MTT 20 μL, 置培养箱内温育 4h, 小心吸去培养基, 加入 DMSO 150 μL, 37℃ 水平摇床振摇 15 min, 待晶体充分溶解后, 置全自动酶标仪于 490 nm 波长处读取吸光度 (OD)。细胞增殖能力以平均吸光度 (OD) 值分析, 以 OD 值为纵坐标, 时间 (d) 为横坐标, 绘制生长曲线。细胞生长抑制率 % = (1 - 实验组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值) × 100%, 以抑制率 % 为纵坐标, 时间 (d) 为横坐标, 绘制抑制率曲线。

1.3 细胞周期的检测

20 ng/mL 和 100 ng/mL TSA 作用的细胞及对照组细胞均以 1 × 10⁶ 个接种于 60 mm 培养皿中, 各组设平行实验 3 个。36h 后用胰蛋白酶消化分别收集对照组和处理组细胞, PBS 洗涤细胞 2 次,

70% 乙醇固定。检测前离心弃乙醇, PI 溶液 (含 1.5 mg/mL 碘化丙锭, 10 mg/mL RNase A) 于 37℃ 避光染色 3h, 以流式细胞仪 (BD 公司) 进行细胞周期检测。

2 结果

2.1 TSA 对 Lovo 细胞增殖的影响

5 ng/mL 和 20 ng/mL TSA 作用结肠癌 Lovo 细胞 5 d 后, 与对照组比较细胞生长速度差异无显著性 ($P > 0.05$); 100 ng/mL 组的抑制率在第 2 天到第 5 天分别为 16.26%, 32.22%, 28.21%, 37.60% ($P > 0.05$), 而 500 ng/mL TSA 作用 2 d 后即明显抑制了细胞的生长 ($P < 0.05$) (图 1), 抑制率分别为 53.21%, 72.65%, 78.09%, 82.76% (图 2)。表明 500 ng/mL 以上浓度的 TSA 才能有效的抑制 Lovo 细胞的生长。

2.2 TSA 对 Lovo 细胞周期的影响

TSA 作用前结肠癌 Lovo 细胞处于 G₀/G₁, S 和 G₂/M 期的百分比分别为 43.16%, 40.74% 和 16.10%; 20 ng/mL TSA 作用 36h 后, 处于 G₀/G₁, S 和 G₂/M 期的百分比分别为 56.69%, 32.28% 和 11.03%; 100 ng/mL TSA 作用 36h 后, 处于 G₀/G₁, S 和 G₂/M 期的百分比分别为 50.03%, 19.66% 和 30.31%, 表明 20 ng/mL TSA 即可使结肠癌 Lovo 细胞周期出现 G₁ 期的阻滞 (图 3)。

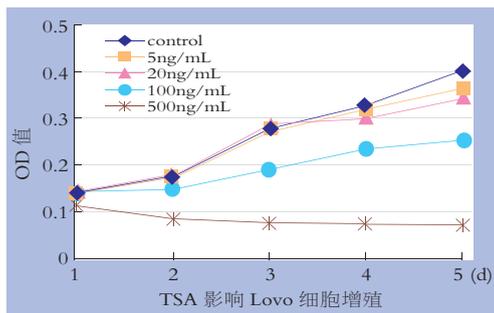


图 1 不同浓度 TSA 对结肠癌 Lovo 细胞增殖的影响

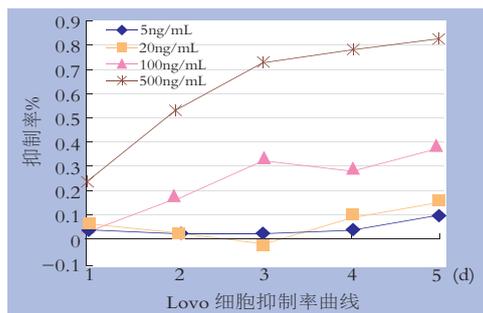


图 2 不同浓度 TSA 抑制结肠癌 Lovo 细胞增殖的抑制率曲线

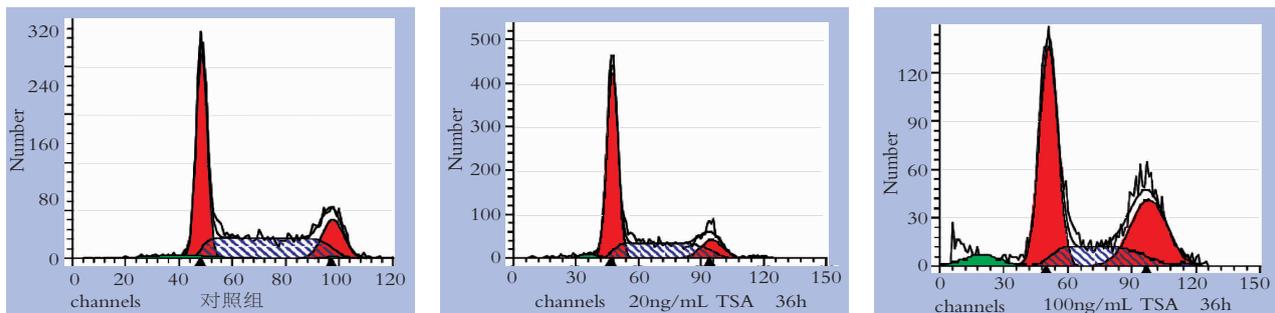


图 3 不同浓度 TSA 对结肠癌 Lovo 细胞周期的影响

2.3 TSA 对 Lovo 细胞凋亡的影响

20 ng/mL TSA 作用 36 h 后, 细胞凋亡比例为 2.12%, 而 100 ng/mL TSA 作用 36 h 后, 细胞凋亡比例为 5.5%。表明 100 ng/mL TSA 可显著的诱导 Lovo 细胞的凋亡(图 3)。

3 讨论

Vogelstein 证实的遗传突变累积学说是公认的结直肠癌发病的主要机制, 即前癌基因的激活和肿瘤抑制基因的失活所累积的遗传缺陷, 使结肠腺瘤向结直肠癌进展的过程^[4]。然而, 这些被证实的遗传缺陷不足以解释绝大多数的散发型结直肠癌的发病机理。

近 20 年的研究发现, 表观遗传机制是调节一些重要基因功能的关键机制。表观遗传通过 DNA 自身化学修饰方式从转录水平影响基因表达, 但不存在 DNA 序列改变的遗传改变。表观遗传修饰包含 3 个方面: 即组蛋白修饰, DNA 甲基化和小 RNA 干扰^[5-6]。也就是说, 细胞可以只有一种遗传密码, 但由于表观遗传修饰的存在使蛋白质表达多种多样, 因而呈现出细胞分化后的不同形态。

核小体是人类染色体的基本组成单位, 由 146 个碱基对环绕组蛋白的十聚体构成。组蛋白的共价修饰可以改变染色体的构象由紧密型变为松弛型, 包括乙酰化、甲基化、磷酸化和泛素化。这些可逆性的共价修饰使得基因的表达受到严格控制。核小体中心组蛋白的乙酰化 (Acetylation) 和去乙酰化 (Deacetylation) 是调节染色体结构和基因转录的重要修饰^[7-8]。具有转录活性的基因其中心组蛋白的乙酰化程度非常高, 相反转录抑制的基因则乙酰化程度很低。组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferase, HAT) 和组蛋白去乙酰酶 (histone deacetylase, HDAC) 是调节染色体结构和基因表达的关键激酶。HAT 通过组蛋白乙酰化提高一些转录因子的活性, 以协助启动子区域进入转录复合体; HDAC 则起着相反的作用。组蛋白去乙酰化酶 (Histone deacetylases, HDACs) 通过调节核小体的构象改变, 在调节基因表达方面起着重要的作用。在多种肿瘤中 HDACs 与细胞周期、细胞分化的调控密切相关^[9-10]。

本研究发现, HDAC 抑制剂 - 曲古菌素 A 在体外可以抑制结直肠癌 Lovo 细胞的增殖, 但在 500 ng/mL 浓度以上才表现出明显的生长抑制作用。笔者既往的研究显示 100 ng/mL 以上浓度的 TSA 就可以抑制多种肿瘤细胞 (如乳腺癌 MDA-

MB-435S 细胞和结肠癌 Caco2 细胞等) 的生长, 在 500 ng/mL 浓度时细胞就出现明显的死亡趋势。这说明 TSA 的抑制作用在结肠癌 Lovo 细胞需要有明显高的剂量。

为了探讨 TSA 抑癌作用的可能机制, 笔者用流式细胞仪检测了不同浓度的 TSA 对细胞周期的影响, 结果发现 20 ng/mL TSA 使 Lovo 细胞出现 G₁ 期阻滞, 而 100 ng/mL 浓度时诱导了细胞凋亡 (5.5%)。这提示低浓度的 TSA 的主要通过调节 G₁/S 期转移的相关蛋白发挥抑癌作用, 而较高浓度的 TSA 主要通过诱导细胞凋亡抑制结肠癌 Lovo 细胞的增殖。

Ou 等^[11] 最新的研究发现, TSA 可以广泛的诱导特定基因去甲基化并重新表达, 并证实组蛋白乙酰化和 DNA 去甲基化之间通过甲基结合蛋白 (methyl-CpG binding proteins, MBDs) 实现相互作用。因此, 寻找和筛选 TSA 的调节靶蛋白是深入研究其抑癌机制的方向, 并可为结肠癌的治疗提供新的靶点。

参考文献:

- [1] Rennett G. Prevention and early detection of colorectal cancer—new horizons [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2007, 174(1):179-187.
- [2] Bouchain G, Delorme D. Novel hydroxamate and anilide derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: synthesis and antiproliferative evaluation [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(22):2359-2372.
- [3] Chiba T, Yokosuka O, Fukai K, *et al.* Cell growth inhibition and gene expression induced by the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, on human hepatoma cells [J]. *Oncology*, 2004, 66(6):481-491.
- [4] Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer [J]. *Trends Genet*, 1993, 9(4):1338-1341.
- [5] D'Alessio AC, Szyf M. Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation [J]. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84(4):463-476.
- [6] Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(19):2220-2222.
- [7] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications [J]. *Nature*, 2000, 403(6765):41-45.
- [8] Villar-Garea A, Imhof A. The analysis of histone modifications [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764(12):1932-1939.
- [9] Garcia-Manero G, Issa JP. Histone deacetylase inhibitors: a review of their clinical status as antineoplastic agents [J]. *Cancer Invest*, 2005, 23(7):635-642.
- [10] Mai A, Massa S, Rotili D, *et al.* Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy [J]. *Med Res Rev*, 2005, 25(3):261-309.
- [11] Ou JN, Torrisani J, Unterberger A. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(9):1297-1307.