

·基础研究·

组蛋白去乙酰化酶抑制剂通过下调MCM2-7表达抑制神经胶质瘤细胞增殖

李慧锋¹, 袁忠民^{1,3}, 吴森斌¹, 马莹¹, 赵凡一¹, 何伟文^{1,2}, 梁建峰^{1,2}, 伍健伟^{1,2}

(1. 广州医科大学附属第二医院神经科学研究所, 广东 广州 510260; 2. 广州医科大学附属第二医院番禺院区神经外科, 广东 广州 511400; 3. 粤港澳大湾区脑科学与类脑研究中心, 广东 广州 510515)

摘要:【目的】探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACIs)抑制神经胶质瘤细胞增殖的机制。【方法】体外培养U251和H4细胞,用组蛋白去乙酰化酶抑制剂:包括帕比司他(LBH589)和M344、伏立诺他(SAHA)处理后,MTT比色法检测细胞存活率,流式细胞术检测细胞周期进程改变,Western blotting和RT-qPCR法分别检测minichromosome maintenance (MCM)蛋白家族成员MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MCM6和MCM7的mRNA和蛋白表达水平。用组蛋白去乙酰化酶抑制剂:包括帕比司他和曲古霉素(TSA)处理U251细胞后,BrdU掺入实验检测细胞增殖和DNA复制能力。用MCM抑制剂环丙沙星(CPX)处理U251和H4细胞,MTT法检测细胞存活率,流式细胞术检测细胞周期进程改变。【结果】与对照组相比,HDACIs降低了U251和H4活细胞数量($P<0.05$);HDACIs组BrdU的掺入率降低($P<0.05$);HDACIs减少细胞周期S期的比率($P<0.05$);Western blotting和qPCR结果显示,HDACIs降低MCM2-7 mRNA和蛋白表达水平($P<0.05$);与对照组相比,CPX降低了U251和H4活细胞数量($P<0.05$),减少细胞周期S期的比率($P<0.05$)。【结论】HDACIs通过下调MCM2-7表达抑制神经胶质瘤细胞增殖。

关键词:神经胶质瘤;组蛋白去乙酰化酶抑制剂;MCM2-7;细胞增殖

中图分类号:R74

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2022)04-0530-09

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0403

Histone Deacetylase Inhibitors Suppress Glioma Cell Proliferation by Downregulating MCM2-7 Expression

LI Hui-feng¹, YUAN Zhong-min^{1,3}, WU Sen-bin¹, MA Ying¹, ZHAO Fan-yi¹,
HE Wei-wen^{1,2}, LIANG Jian-feng^{1,2}, WU Jian-wei^{1,2}

(1. Institute of Neuroscience, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China; 2. Neurosurgery Department, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Panyu District, Guangzhou 511400, China; 3. Guangdong-Hong Kong-Macao Greater Bay Area Center for Brain Science and Brain Inspired Intelligence, Guangzhou 510515, China)

Correspondence to: WU Jian-wei; E-mail: weigegy@163.com

Abstract:【objective】To investigate the mechanism of histone deacetylase inhibitors (HDACIs) in suppressing glioma cell proliferation.【Methods】Glioma cell lines U251 and H4 were cultured in vitro and treated with HDACIs, including LBH589, M344 and SAHA, MTT assay, flow cytometry, RT-qPCR assay and western blotting were performed to determine the cell viability, cell cycle progression, mRNA and protein expression of minichromosome maintenance protein fam-

收稿日期:2022-02-25

基金项目:广州市科学技术局基金(202002020088);广东省重点领域研发计划(2018B030340001);广东省自然科学基金(2019A151010473);国家科技部纵向课题(2016YFC1301703)

作者简介:李慧锋,硕士生,研究方向:神经肿瘤发病机制与防治,E-mail: lhf117402@163.com;伍健伟,通信作者,副主任医师,研究方向:脑血管与神经系统疾病,E-mail: weigegy@163.com

ily (MCM2-7), respectively. BrdU assay was performed to detect the DNA replication in the U251 cells after they were treated with 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589 and 0.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA. MTT assay and flow cytometry were performed to determine the viability and cell cycle progression of U251 and H4 cells respectively after they were treated with ciprofloxacin (CPX).【Results】Compared with those in control group, in HDACIs group, the cell viability was significantly decreased; the viability of cells treated with 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589 for 12, 16, 24 h was significantly lower and the longer the LBH589 treatment, the lower the viability ($P<0.05$). The percentage of U251 and H4 cells in S-phase was significantly lower ($P<0.05$). The mRNA and protein expression of MCM2-7 was significantly decreased ($P<0.05$). BrdU incorporation rate was lower. The cell viability and S-phase cell percentage of U251 and H4 cells treated with 0.5 mmol/L LBH589 in CPX group were significantly decreased (both $P<0.05$).【Conclusion】HDACIs suppress glioma cell proliferation via downregulating MCM2-7 expression.

Key words: glioma; histone deacetylase inhibitors (HDACIs); MCM2-7; cell proliferation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(4): 530-538]

神经胶质瘤 (glioma) 是颅内最常见的原发性肿瘤, 由于其浸润性生长和放疗化疗耐药性, 胶质瘤的复发率高, 预后差, 死亡率高^[1-2]。因此, 研究胶质瘤发生发展的分子机制及寻找新的靶向性药物, 对于治疗胶质瘤和改善预后具有重要意义。组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, HDACIs) 是一类新型的抗癌药物, 它能够抑制肿瘤生长、阻滞细胞周期、诱导细胞分化和凋亡^[3-4]。根据化学结构的不同可分为四类: 短链脂肪酸类, 如 NaBu 和 VPA; 异羟肟酸类, 如 TSA、SAHA 和 LBH589; 苯酰胺类, 如 MS-275 和 M344; 环肽类, 如 FK-228。其中, SAHA 已被 FDA 批准用于治疗皮肤性淋巴瘤, 其它组蛋白去乙酰化酶抑制剂也在进行肿瘤治疗的临床试验^[5]。微小染色体维持蛋白 (minichromosome maintenance proteins, MCMs) 是一类 DNA 复制起始时发挥关键作用的解旋酶, 参与每个细胞周期内的新 DNA 生成^[6]。MCM2、3、4、5、6 和 7 在 G1 期早期形成 MCM2-7 六聚体加载到 DNA 复制起始位点, 在 G1 后期形成 MCM2-7 双六聚体启动 S 期 DNA 复制。在癌细胞中 MCM2-7 高表达, 这使得六聚体向双六聚体转换时间较正常细胞短, 加速细胞周期, 促进细胞恶性增殖^[7-8]。本研究利用多种 HDACIs 处理神经胶质瘤细胞株 U251 和 H4, 观察对细胞增殖、细胞周期及 MCM2-7 表达的影响, 探讨 HDACIs 抑制胶质瘤细胞增殖的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人胶质瘤细胞株 U251 和 H4 细胞由国家实验细胞资源共享平台提供。高糖培养基 DMEM 和 0.25% 胰酶购自 Invitrogen 公司, 胎牛血清购自 Gibco 公司。LBH589、M344、SAHA、TSA 和 CPX 购自 Selleck 公司。RT-qPCR 试剂购自日本 Toyobo 公司。96 孔板和 6 孔板购自 NEST 公司。Anti-BrdU、anti-MCM2、anti-MCM7、anti-Ac-H3K9、anti-Ac-H3K27 和 anti-H3 购自 Cell Signaling Technology。Anti-MCM3 和 anti-MCM6 购自生工生物工程有限公司, Anti-MCM4、anti-MCM5 和 anti-GAPDH 购自 Proteintech 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 胶质瘤细胞培养及药物处理方法 用体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 培养基培养 U251 和 H4 细胞, 设置培养箱温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 浓度为 5%, 每 2~3 d 用胰酶消化传代 1 次。取对数生长期细胞进行实验。HDACIs 储存浓度为 1 000 \times 工作浓度, 溶剂为 DMSO。环丙沙星盐酸盐溶于水, 储存浓度为分别为 0.05 mmol/L \times 200, 0.2 mmol/L \times 200, 0.5 mmol/L \times 200, 1.0 mmol/L \times 200, 使用时用培养基 200 倍稀释。

1.2.2 MTT 法检测组蛋白去乙酰化酶抑制剂对 U251 和 H4 细胞增殖的影响 将对数期生长 U251 和 H4 细胞用胰酶消化后接种于 96 孔板, 每孔 100 μL

细胞悬液,每组设6个平行复孔。当细胞生长至融合度为50%时,分别用0.2、0.5、1.0和2.0 $\mu\text{mol/L}$ LBH589处理U251和H4细胞24 h。用0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589处理U251和H4细胞8、12、16和24 h。多种组蛋白去乙酰化酶抑制剂(0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589、1.0 $\mu\text{mol/L}$ M344和1.0 $\mu\text{mol/L}$ SAHA)处理24 h,对照组加入等量溶剂DMSO,MTT法检测细胞存活率,方法同上。处理结束后每孔加入10 μL MTT溶液(5 g/L)继续培养4 h后终止培养,弃培养液,每孔加入100 μL 二甲基亚砷(DMSO),摇床振荡10 min,用酶标仪检测490 nm波长下各孔的吸光度值^[9]。

1.2.3 BrdU掺入试验检测组蛋白去乙酰化酶抑制剂对U251细胞DNA复制的影响 6孔板U251细胞密度达到60%至70%时,分别用0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589、0.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA处理U251细胞,对照组加入等量溶剂,24 h后向培养基中加入终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo deoxyuridine, BrdU),培养箱孵育4 h,40 g/L多聚甲醛室温固定30 min,用PBS洗3遍后加入2 mol/L的盐酸(溶于0.1% Tween-20的PBS)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,正常山羊血清封闭1 h,加入BrdU一抗(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$

过夜,再用PBS洗3次,加入Cy3标记的二抗室温孵育1 h。洗3遍后,用Hoechst33258室温染核10 min,免疫荧光显微镜观察并拍照^[10-11]。

1.2.4 流式细胞仪检测多种组蛋白去乙酰化酶抑制剂对U251和H4细胞周期的影响 用多种组蛋白去乙酰化酶抑制剂(0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589、1.0 $\mu\text{mol/L}$ M344和1.0 $\mu\text{mol/L}$ SAHA)处理U251和H4细胞12 h后,使用PBS洗一遍,胰酶消化吹散后收集于1.5 mL EP管,离心(4 $^{\circ}\text{C}$,644 \times g,5 min, $r=9.5$ cm)后弃上清,加入1 mL PBS洗两遍,4 $^{\circ}\text{C}$,644 \times g, $r=9.5$ cm,离心5 min。加入75%溶于PBS的乙醇500 μL ,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜后离心弃上清,PBS洗两遍,加入500 μL 溶于PBS终浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 的碘化丙啶(Propidium iodide, PI)于室温避光染色30 min,使用流式细胞仪检测细胞周期^[12]。

1.2.5 RT-qPCR法检测组蛋白去乙酰化酶抑制剂对U251和H4细胞MCM2-7 mRNA表达的影响 用多种组蛋白去乙酰化酶抑制剂(0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589、1.0 $\mu\text{mol/L}$ M344和1.0 $\mu\text{mol/L}$ SAHA)处理U251和H4细胞12 h后,用Trizol法提取总RNA,RT-qPCR分别检测MCM2-7的表达。引物序列见表1。

表1 MCM2-7及GAPDH引物序列
Table 1 Primers of MCM2-7 and GAPDH

Gene		Sequences
MCM2	forward primer	5' CCGTGACCTTCCACCATTTGA 3'
	reverse primer	5' GGTAGTCCCTTTCCATGCCAT 3'
MCM3	forward primer	5' GCGCAGGAAAAACGAGAAGAG 3'
	reverse primer	5' AATGGAGGCCACAAAATCCTTT 3'
MCM4	forward primer	5' CACCACACACAGTTATCCTGTT 3'
	reverse primer	5' CGAATAGGCACAGCTCGATAGAT 3'
MCM5	forward primer	5' ATGTCCGGATTTCGACGATCCT 3'
	reverse primer	5' CCAGGTTGTAATGCCGCTTG 3'
MCM6	forward primer	5' GAGGAACTGATTTCGTCTGAGA 3'
	reverse primer	5' CAAGGCCCGACACAGGTAAG 3'
MCM7	forward primer	5' ACTCTCAGAAACCTACCTGGAAG 3'
	reverse primer	5' CAGCTTTTCGTAGAAATCCTCCT 3'
GAPDH	forward primer	5' GGATTTGGTCTGATTGGG 3'
	reverse primer	5' GGAAGATGGTGATGGGATT 3'

MCM2-7 and GAPDH primers for qPCR.

1.2.6 Western blotting 检测组蛋白去乙酰化酶抑制剂对 U251 和 H4 细胞 MCM2-7 蛋白表达的影响 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589、1.0 $\mu\text{mol/L}$ M344 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SAHA) 处理 U251 和 H4 细胞 12 h 后,每孔加入 2 mL 冰 PBS 洗两遍后,用加入蛋白酶抑制剂的 IP buffer 收集细胞,BCA 法测定蛋白浓度并配平。灌制 4% 集成胶和 10% 分离胶,200 V 电压电泳 45 min,100 V 电压转膜 100 min,50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h。分别加入一抗 (Anti-MCM2-7、anti-AcH3K9、anti-AcH3K27、anti-H3 1:1000 和 anti-GAPDH 1:10000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,回收一抗后再分别加入 HRP 标记抗兔或抗鼠二抗室温孵育 1 h, ECL 发光后曝光。

1.2.7 MTT 法检测 CPX 对 U251 和 H4 细胞增殖的影响 分别用不同浓度 CPX (0.05、0.2、0.5 和 1.0 mmol/L) 处理 U251 和 H4 细胞 24 h, 0.5 mmol/L CPX 处理 U251 和 H4 细胞不同时间 (8、12、16 和 24 h), MTT 法检测相对细胞数,方法同上。

1.2.8 流式细胞术检测 CPX 对细胞株 U251 和 H4 细胞周期的影响 用 0.5 mmol/L 的环丙沙星处理 U251 或 H4 细胞 12 h 后,流式细胞仪检测细胞周期,方法同上。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析,计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。3 组及以上样本的均数比较采用单因素方差分析,随后的组间比较如符合方差齐性采用 LSD 法,否则采用 Dunnett-*t*3 检验。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HDACIs 对 U251 和 H4 细胞增殖的影响

2.1.1 不同浓度 LBH589 对 U251 及 H4 细胞增殖的影响 分别用 0.2、0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{mol/L}$ LBH589 处理 U251 及 H4 细胞 24 h 后,MTT 法测定吸光度值后统计分析每组相对细胞数。差异具有统计学意义 (U251: $F=229.200$, $P=0.000$, H4: $F=32.328$, $P=0.000$, 图 1A)。采用 LSD 法进一步作两两比较,与对照组相比差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), LBH589 浓度 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), LBH589 浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$

达到半数抑制浓度后随浓度增加相对细胞数差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.1.2 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589 作用不同时间对 U251 和 H4 细胞增殖的影响 分别用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589 处理 U251 和 H4 细胞 8、12、16 和 24 h, 相对细胞数差异具有统计学意义 (U251: $F=67.211$, $P=0.000$, H4: $F=53.195$, $P=0.000$; 图 1B)。采用 LSD 法进一步两两比较,除了 U251 细胞 8 h 组与对照组相比无统计学意义 ($P > 0.05$) 外,其他处理与对照组相比,相对细胞数均减少 ($P < 0.05$)。随着处理时间的延长,相对细胞数越少 ($P < 0.05$)。

2.1.3 不同种类组蛋白去乙酰化酶抑制剂对 U251 和 H4 细胞增殖的影响 分别用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589、1.0 $\mu\text{mol/L}$ M344 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SAHA 处理 U251 和 H4 细胞 24 h 后,MTT 法测定吸光度后统计相对细胞数,差异具有统计学意义 (U251: $F=26.600$, $P=0.000$, H4: $F=55.461$, $P=0.001$; 图 1C 和 D)。采用 LSD 法进一步统计分析,与对照组相比,相对细胞数均减少 ($P < 0.05$)。

2.2 HDACIs 抑制 U251 细胞的 DNA 合成

用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589、0.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA 处理 U251 细胞 24 h 后,加入 BrdU 继续孵育 4 h 后检测细胞增殖率。与对照组比较,BrdU 的掺入率降低,差异具有统计学意义 ($F=161.628$, $P=0.000$; 图 2)。采用 LSD 法进一步作两两比较,与对照组相比,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

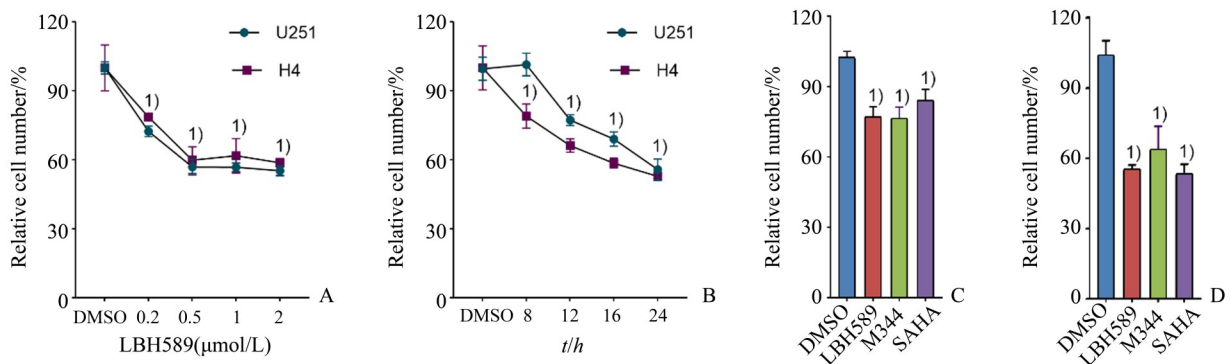
2.3 HDACIs 阻滞 U251 和 H4 细胞周期

分别用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589、1.0 $\mu\text{mol/L}$ M344 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SAHA 处理 U251 和 H4 细胞 12 h 后,流式细胞仪检测细胞周期,细胞周期的 S 期的比例差异具有统计学意义 (U251: $F=4.478$, $P < 0.05$; H4: $F=3.821$, $P < 0.05$; 图 3)。采用 LSD 法进一步两两分析,与对照组相比,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 HDACIs 下调 U251 和 H4 细胞内 MCM2-7 mRNA 水平

分别用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589、1.0 $\mu\text{mol/L}$ M344 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SAHA 处理 U251 和 H4 细胞 12 h 后,RT-qPCR 检测 MCM2-7 mRNA 的表达。与对照组相比,MCM2-7 的表达均减少,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

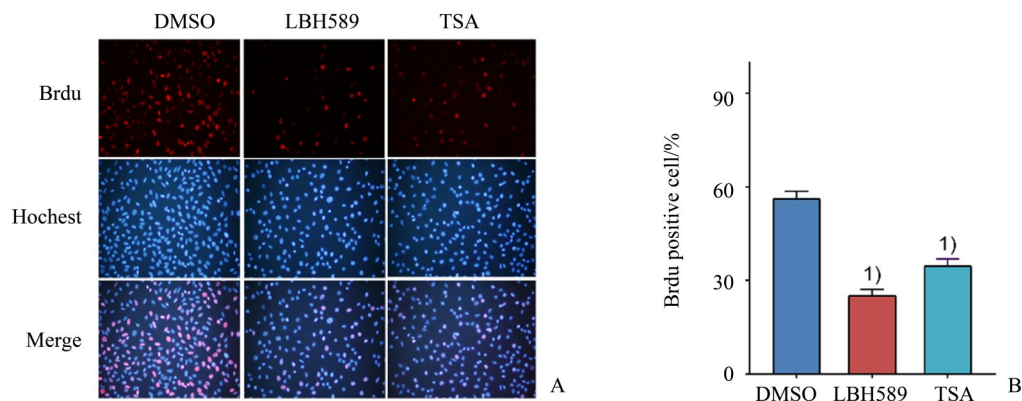
HDACIs 处理 U251 (图 4A) 和 H4 (图 4B) 细胞株 MCM2-7 的统计结果分别为: MCM2 (U251: $F=1036.480$, $P=0.000$, H4: $F=77.715$, $P=0.000$);



A: U251 or H4 cells were treated with different concentrations of LBH589 and cell proliferation was detected by MTT assay after 24 h. 1) $P < 0.05$, compared with control group. B: U251 or H4 cells were treated with LBH589 at 0.5 $\mu\text{mol/L}$ for different durations and cell proliferation was detected by MTT assay. 1) $P < 0.05$, compared with control group. C and D: U251 or H4 cells were treated with different HDACis and cell proliferation was detected by MTT assay after 24 h. 1) $P < 0.05$, compared with control group. $n=3$.

图1 HDACis抑制神经胶质瘤细胞增殖

Fig. 1 HDACis suppresses the proliferation of glioma cells



A: U251 cells were treated with 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589 or 0.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA for 24 h and DNA replication was detected by BrdU, 200 \times . B: 1) $P < 0.05$, compared with control group. TSA: Trichostatin A. $n=3$.

图2 HDACis抑制U251细胞DNA合成

Fig. 2 HDACis suppresses DNA synthesis of U251 cells

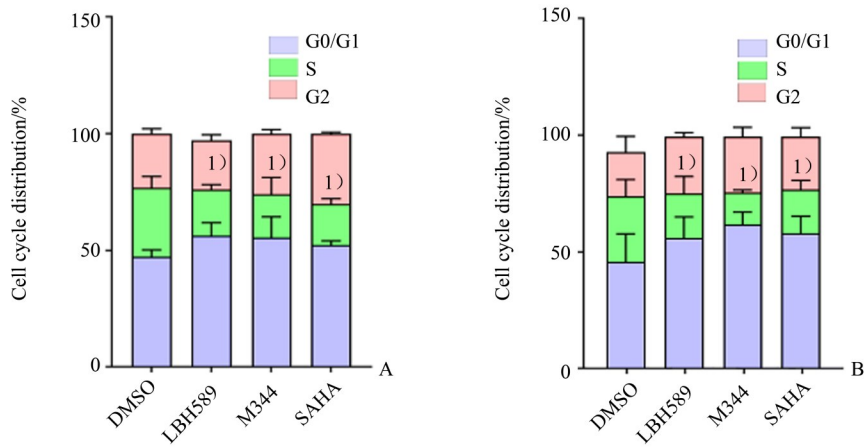
MCM3 (U251: $F = 158.980$, $P = 0.000$, H4: $F = 381.592$, $P = 0.000$); MCM4 (U251: $F = 657.406$, $P = 0.000$, H4: $F = 83.059$, $P = 0.000$); MCM5 (U251: $F = 803.059$, $P = 0.000$, H4: $F = 382.211$, $P = 0.000$); MCM6 (U251: $F = 352.036$, $P = 0.000$, H4: $F = 88.841$, $P = 0.000$); MCM7 (U251: $F = 49.167$, $P = 0.000$, H4: $F = 325.376$, $P = 0.000$).

2.5 HDACis减少U251和H4细胞MCM2-7蛋白表达

为了探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂是否也抑制胶质瘤细胞MCM2-7蛋白的表达,用多种组蛋白去乙酰化酶抑制剂(包括0.5 $\mu\text{mol/L}$ LBH589、1.0 $\mu\text{mol/L}$ M344和1.0 $\mu\text{mol/L}$ SAHA)处理U251和H4

细胞12 h后,Western blotting结果显示,与对照组相比,MCM2-7蛋白表达均减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$;图5)。

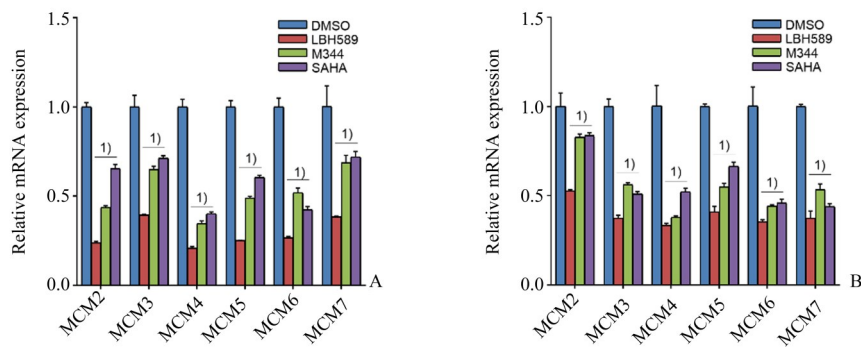
U251和H4细胞株MCM2-7蛋白表达的统计结果分别为:MCM2 (U251: $F = 19.770$, $P = 0.000$, H4: $F = 61.786$, $P = 0.000$); MCM3 (U251: $F = 21.068$, $P = 0.000$, H4: $F = 211.440$, $P = 0.000$); MCM4 (U251: $F = 162.830$, $P = 0.000$, H4: $F = 55.091$, $P = 0.000$); MCM5 (U251: $F = 24.646$, $P = 0.000$, H4: $F = 1132.800$, $P = 0.000$); MCM6 (U251: $F = 41.849$, $P = 0.000$, H4: $F = 103.920$, $P = 0.000$); MCM7 (U251: $F = 52.731$, $P = 0.000$, H4: $F = 113.600$, $P = 0.000$).



U251 (A) or H4 (B) cells were treated with different HDACIs and cell cycle was detected by flow cytometry. 1) $P < 0.05$, compared with control group. $n = 3$.

图3 HDACIs减少U251和H4细胞周期的S期在整个细胞周期比率

Fig.3 HDACIs reduce the S-phase of U251 cell cycle



U251 (A) or H4 (B) cells were treated with different HDACIs and MCM2-7 was detected by RT-qPCR. 1) $P < 0.05$, compared with control group. SAHA: Suberoylanilide hydroxamic acid. $n = 3$.

图4 HDACIs下调MCM2-7 mRNA水平

Fig. 4 HDACIs inhibit MCM2-7 mRNA expression

Ac-H3K9 (U251 : $F = 29.615$, $P = 0.000$, H4 : $F = 358.502$, $P = 0.000$) ; Ac-H3K27 (U251 : $F = 370.974$, $P = 0.000$, H4 : $F = 13.960$, $P = 0.002$) 。

2.6 环丙沙星抑制MCM2-7活性对U251和H4细胞增殖的影响

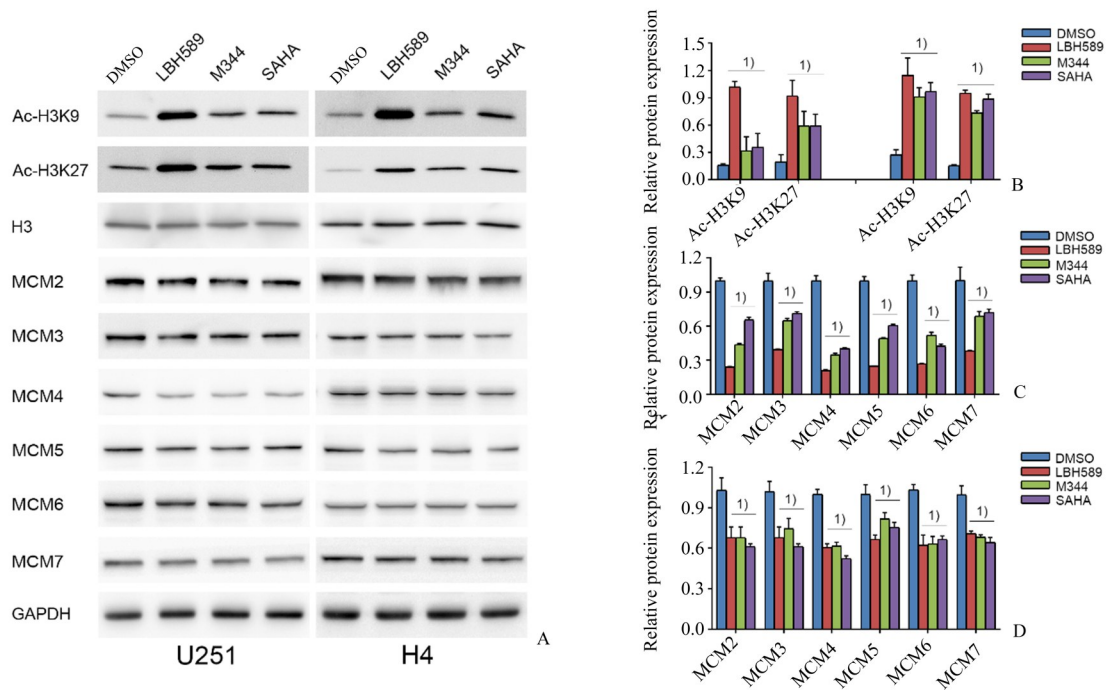
2.6.1 不同浓度环丙沙星对U251和H4细胞增殖的影响 环丙沙星(CPX)是解旋酶MCM2-7活性抑制剂,为了确定抑制MCM2-7后U251细胞的增殖率是否降低,MTT法检测向U251和H4细胞后加入0.05、0.2、0.5和1.0 mmol/L CPX 24 h后,各组相对细胞数差异具有统计学意义(U251: $F = 65.099$, $P = 0.000$, H4: $F = 287.348$, $P = 0.000$;图6A),进一步对U251和H4细胞采用LSD法两两比较,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$),随着浓度的增大,细胞增殖

率逐渐减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6.2 环丙沙星作用不同时间对U251和H4细胞增殖的影响 用0.5 mmol/L的环丙沙星分别作用U251和H4细胞8、12、16和24 h后,MTT法检测细胞相对数,差异具有统计学意义(U251: $F = 152.488$, $P = 0.000$, H4: $F = 187.348$, $P = 0.000$;图6B)。

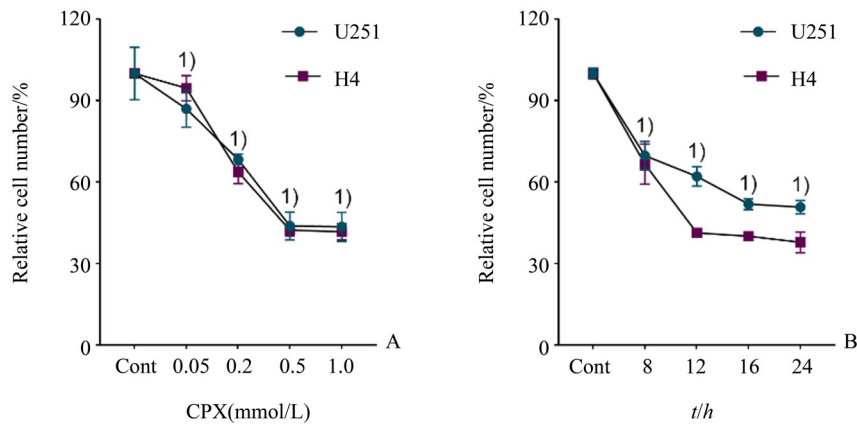
2.7 环丙沙星阻滞U251和H4细胞周期

为了确定抑制MCM2-7后U251和H4细胞周期是否改变,流式细胞术检测发现加入0.5 mmol/L CPX 12 h后,与对照组相比,U251和H4细胞周期S期均显著减少,差异具有统计学意义(U251: $t = 5.306$, $P = 0.000$, H4: $t = 2.306$, $P = 0.000$;图7)。



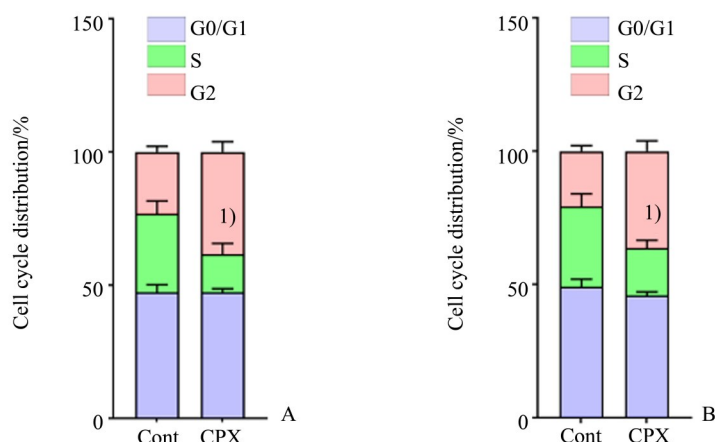
A: U251 or H4 cells were treated with different HDACis, MCM2-7, Ac-H3K9, Ac-H3K27 and H3 were detected by Western blotting. B (U251 and H4), C (U251) and D (H4). The relative density of each was analyzed by ImageJ software. 1) $P < 0.05$, compared with control group. SAHA: Suberoyl-anilide hydroxamic acid. $n = 3$.

图5 HDACis减少U251和H4细胞MCM2-7蛋白表达
Fig. 5 HDACis inhibit MCM2-7 protein expression



A: U251 or H4 cells were treated with different concentrations of CPX and cell proliferation was detected by MTT assay after 24 h. 1) $P < 0.05$, compared with control group. B: U251 or H4 cells were treated with CPX at 0.5 mmol/L for different durations and cell proliferation was detected by MTT assay. 1) $P < 0.05$, compared with control group. CPX: Ciprofloxacin. $n = 4$.

图6 环丙沙星抑制胶质瘤细胞U251和H4增殖
Fig. 6 CPX suppresses the proliferation of glioma cells



U251 (A) or H4 (B) cells were treated with CPX and cell cycle was detected by flow cytometry. 1) $P < 0.05$, compared with control group. CPX: Ciprofloxacin. $n = 3$.

图7 环丙沙星减少U251和H4细胞周期的S期

Fig. 7 CPX reduces the S-phase of U251 and H4 cells cell cycle

3 讨论

由于局部侵袭性强且缺少针对性治愈方法,胶质瘤是目前最具致命性的癌症之一。尽管手术切除和放化疗手段在不断提高,胶质瘤生存率仍未得到改善^[13-14]。分子生物学的发展提高了对胶质瘤发病机制的认识,完善了胶质瘤的诊断、分级和治疗手段。恶性胶质瘤伴随DNA复制能力增强的特点,DNA复制调控蛋白MCM2-7的表达与肿瘤的WHO分级密切相关^[15-16]。

乙酰化和去乙酰化的动态平衡调节着基本的生理功能如细胞存活、死亡、周期等,而乙酰化失衡引起的基因表达异常会导致上述功能紊乱,继而造成多种疾病的发生^[17-18]。特别是,HDACs活性增强介导的去乙酰化事件已被证明是胶质瘤等多种肿瘤发生、发展的重要病理原因^[19]。在这种微环境条件下,一系列抑癌基因如p21、p16、Rb的表达下调,而原癌基因如Raf1、EGFR、c-Jun高表达,促进

癌症发生^[20-21]。我们发现HDACs活性介导了MCM2-7表达,增强了DNA复制能力,这可能是肿瘤细胞适应恶性增殖的一种特征。HDACs的底物包括组蛋白和非组蛋白,它们一方面通过去乙酰化核小体上组蛋白H3、H4、H2A和H2B,使染色体结构重塑以调控基因转录^[22]。另一方面,还通过改变转录因子乙酰化状态,影响其活性,调控基因表达^[23]。但HDACs通过何种机制调控MCM2-7表达,尚需进一步研究。

总之,本研究阐明了HDACs抑制MCM2-7表达和DNA复制起始进程是其重要抗癌机制之一。另一方面,这些研究结果还表明在胶质瘤细胞内MCM2-7的表达依赖HDACs活性,高活性的HDACs促进MCM2-7表达以增强DNA复制能力,适应恶性增殖。我们的研究不仅揭示了HDACs的抗癌新机制,还首次报道了MCM2-7表达依赖HDACs活性,为认知胶质瘤的发生本质和靶向治疗提供了新的理论和实验依据。

参考文献

- [1] Deng Y, Zhu H, Xiao L, et al. Circ_0005198 enhances temozolomide resistance of glioma cells through miR-198/TRIM14 axis. *Aging* 2020, 13 (2) : 2198-2211.
- [2] 牟永告. 脑胶质瘤免疫治疗研究进展[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2020, 41(1): 24-29.
- [3] Mou YG. Research Progress of Glioma Immunotherapy [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2020, 41 (1) : 24-29.
- [3] Psilopatis I, Pergaris A, Giaginis C, et al. Histone

- Deacetylase Inhibitors: A Promising Therapeutic Alternative for Endometrial Carcinoma. *Disease markers* 2021, 2021: 7850688.
- [4] Ruzic D, Djoković N, Srdić-Rajić T, et al. Targeting Histone Deacetylases: Opportunities for Cancer Treatment and Chemoprevention. *Pharmaceutics* 2022, 14 (1): 209.
- [5] Wang Y, Xia Y, Hu K, et al. MKK7 transcription positively or negatively regulated by SP1 and KLF5 depends on HDAC4 activity in gliom. *Int J Cancer* 2019, 145(9): 2496–508.
- [6] Yu S, Wang G, Shi Y, et al. MCMs in Cancer: Prognostic Potential and Mechanisms. *Analytical cellular pathology (Amsterdam)* 2020, 2020: 3750294.
- [7] Hayashi-Takanaka Y, Hayashi Y, Hirano Y, et al. Chromatin loading of MCM hexamers is associated with di-/tri-methylation of histone H4K20 toward S phase entry. *Nucleic Acids Res* 2021, 49 (21): 12152–12166.
- [8] Zhang H. Regulation of DNA Replication Licensing and Re-Replication by Cdt1. *Int J Mol Sci* 2021, 22(10).
- [9] Huang Z, Xia Y, Hu K, et al. Histone deacetylase 6 promotes growth of glioblastoma through the MKK7/JNK/c-Jun signaling pathway. *Journal of neurochemistry* 2020, 152(2): 221–234.
- [10] Chen XD, Su MY, Chen TT, et al. Oxidative stress affects retinal pigment epithelial cell survival through epidermal growth factor receptor/AKT signaling pathway. *International journal of ophthalmology* 2017, 10 (4): 507–514.
- [11] 胡宇辰, 尹恬恬, 李倩, 等. 长链非编码RNA HULC对胶质母细胞瘤原位移植瘤模型肿瘤生长的促进作用[J]. *中山大学学报(医学科学版)* 2020, 41(1): 60–68.
- Hu YC, Yin TT, Li Q, et al. Long Non-Coding RNA HULC Enhances Tumor Growth in Orthotopic Xenograft Model of Glioblastoma [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2020, 41(1): 60–68.
- [12] Hsu EC, Shen M, Aslan M, et al. MCM2–7 complex is a novel druggable target for neuroendocrine prostate cancer. *Sci Rep* 2021, 11(1): 13305.
- [13] Finch A, Solomou G, Wykes V, et al. Advances in Research of Adult Gliomas. *Int J Mol Sci* 2021, 22 (2): 924.
- [14] Zhou L, Deng ZZ, Li HY, et al. TRIM31 promotes glioma proliferation and invasion through activating NF- κ B pathway. *OncoTargets and therapy* 2019, 12: 2289–2297.
- [15] Zhang J, Zhang H, Wang Y, et al. MCM2–7 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: MCM7 Promotes Tumor Cell Proliferation. *Frontiers in oncology* 2021, 11: 782–755.
- [16] Hua C, Zhao G, Li Y, et al. Minichromosome Maintenance (MCM) Family as potential diagnostic and prognostic tumor markers for human gliomas. *BMC cancer* 2014, 14: 526.
- [17] Demyanenko S, Sharifulina S. The Role of Post-Translational Acetylation and Deacetylation of Signaling Proteins and Transcription Factors after Cerebral Ischemia: Facts and Hypotheses. *Int J Mol Sci* 2021, 22 (15): 7947.
- [18] Sharma A, Kumar P, Ambasta RK. Cancer Fighting SiRNA-RRM2 Loaded Nanorobots. *Pharm Nanotechnol* 2020, 8(2): 79–90.
- [19] Wan Y, Long J, Gao H, Tang Z. 2-Aminothiazole: A privileged scaffold for the discovery of anti-cancer agents. *Eur J Med Chem* 2021, 210: 112953.
- [20] Chen R, Zhang M, Zhou Y, Guo W, Yi M, Zhang Z, et al. The application of histone deacetylases inhibitors in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2020, 39 (1): 138.
- [21] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, NY)* 2009, 325(5942): 834–840.
- [22] Xie Y, Tang P, Xing X, Zhao Y, Cao S, Liu S, et al. In situ exploring Chidamide, a histone deacetylase inhibitor, induces molecular changes of leukemic T-lymphocyte apoptosis using Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2020, 241: 118669.
- [23] Bisagno V, Cadet JL. Histone Deacetylases and Immediate Early Genes: Key Players in Psychostimulant-Induced Neuronal Plasticity. *Neurotoxicity research* 2021, 39(6): 2134–2140.