

曲古抑菌素 A 对膀胱癌 T24 细胞增殖及 Apaf-1 和 APC 基因表达的影响

王文卫¹, 陈俊星², 潘俊², 肖峻², 林焕懿², 陈凌武^{2*}

(1. 中山大学附属第一医院黄埔院区泌尿外科, 广东 广州 510700;

2. 中山大学附属第一医院泌尿外科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A(TSA)对人膀胱癌 T24 细胞的增殖抑制作用及对 Apaf-1、APC 基因表达的影响。【方法】采用 3×10^{-4} mmol/L TSA 作用 T24 细胞,MTT 法检测 TSA 对 T24 细胞生长的抑制作用;流式细胞术(FCM)检测 TSA 作用前后 T24 细胞周期和凋亡的变化;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 TSA 作用前后膀胱癌细胞中 Apaf-1、APC mRNA 表达的变化。【结果】TSA 对 T24 细胞的生长具有明显的抑制作用;TSA 作用后 T24 细胞的 G0/G1 期比例增加,S 期比例减少,细胞凋亡率增加($P < 0.05$);RT-PCR 结果显示 TSA 处理能明显诱导 Apaf-1、APC 基因表达增加。【结论】TSA 能抑制 T24 细胞体外生长,诱导细胞周期阻滞和凋亡,其可能通过诱导 Apaf-1、APC 基因表达增加而发挥体外抗膀胱癌作用。

关键词: 膀胱癌; 曲古霉素抑菌素 A; Apaf-1 基因; APC 基因

中图分类号: R737.14 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)04-0552-05

Effects of Trichostatin A on Proliferation and Apoptosis of Human Bladder Cancer T24 Cells and Expression of Apaf-1 and APC Gene

WANG Wen-wei¹, CHEN Jun-xing², PAN Jun², XIAO Jun², LIN Huan-yi², CHEN Ling-wu^{2*}

(1. Department of Urology, Huangpu District, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510700, China;

2. Department of Urology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of Trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor (HDACi), on the growth of T24 human bladder cancer cells and the expression of Apaf-1 and APC in vitro, and to explore the possible mechanism. 【Methods】T24 cells were treated with 3×10^{-4} mmol/L TSA; After treatment, cell growth was measured by MTT assay; Cell apoptosis changes and the cell cycle distribution were examined by flow cytometry (FCM). The expression of Apaf-1 and APC mRNA was detected by RT-PCR. 【Results】TSA significantly inhibited the proliferation of T24 cells; Flow cytometry showed that the cells in G0/G1 phase and the apoptotic rates were significantly increased after treatment with TSA, while the cells in S phase were reduced. RT-PCR results showed that the Apaf-1 and APC mRNA level were promoted after TSA treatment. 【Conclusion】TSA can inhibit T24 cells growth in vitro through inducing cell apoptosis and cell cycle arrest, which might be related to the expression of Apaf-1 and APC.

Key words: bladder cancer; trichostatin A; Apaf-1; adenomatous polyposis coli(APC)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(4):552-556]

组蛋白乙酰化修饰是表观遗传调控最主要的研究内容之一,其通过改变染色质的构型调控基因转录,与恶性肿瘤具有密切的关系。抑制细胞内

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的活性,可增加组蛋白的乙酰化程度,具有抑制肿瘤细胞的生长,诱导分化和(或)凋亡的作用^[1]。曲古

收稿日期: 2010-03-26

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B060700044);广东省医学科研基金(A2009167)

作者简介: 王文卫,主治医师,医学博士,E-mail:wangww2000@yahoo.cn; *通信作者:陈凌武,博士生导师,E-mail:chenlingwu@hotmail.com

抑菌素(trichostatin A, TSA)是一种氧肟酸类 HDAC 抑制剂,本研究应用 TSA 体外作用于人膀胱癌 T24 细胞株,观察其细胞生物学行为改变和人凋亡蛋白酶活化因子-1 基因 (apoptosis protease activating factor-1, Apaf-1)、结肠腺瘤性息肉病基因 (adenomatous polyposis coli, APC) 表达的变化,探讨 TSA 作用于膀胱癌的可能机制并为 HDAC 抑制剂应用于膀胱癌治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养及主要试剂

人膀胱移行细胞癌细胞株 T24 购于中国科学院上海生物细胞研究所,培养于含 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素 100 mg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基。在 37 °C、体积百分比为 5% CO₂ 饱和湿度条件下生长传代,实验时取对数生长期的细胞。TSA 为美国 Sigma 公司产品,按说明配置成储存液,用 RPMI1640 培养基稀释成工作液。MTT、二甲基亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)均购于广州威佳生物公司,凋亡试剂盒(KGA108)购于南京凯基生物科技发展有限公司,Trizol 试剂,Tag 酶,逆转录酶 M-MLV,RT-PCR 试剂盒均购于 Takara 公司,

1.2 细胞增殖抑制实验(MTT)测定 TSA 对 T24 细胞系增殖活性的影响

取对数生长期,以台盼蓝检测活力大于 95% 的 T24 细胞以 10⁴/孔密度接种于 96 孔细胞培养板,每孔体积 200 μL,细胞贴壁后以无血清培养基静置 24 h,实验组加入终浓度为 3 × 10⁻⁴ mmol/L TSA,对照组加入等量的培养液,各组均设 3 复孔。置于 37 °C,体积分数为 5%CO₂ 培养箱内培养,分别于 24 h、48 h、72 h 进行处理,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL/孔,37 °C,体积分数为 5% CO₂ 继续孵育 4 h,小心吸弃上清,加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μL/孔,充分混匀,于 Bio-Tek 酶标仪分析 490 nm 处吸光度值。用下面的公式计算抑制率:抑制率(%) = (1 - 实验组吸光度值/对照组吸光度值) × 100%。

1.3 流式细胞术(FCM)检测 T24 细胞周期变化

取对数生长期的 T24 细胞按 10⁶/孔接种于 6 孔细胞培养板中。培养 24 h 后,给予 3 × 10⁻⁴ mmol/L 的 TSA 分别处理 24、48、72 h,对照组加

入等量的培养液,各组每个时间点均设 3 个复孔。同期培养并同期用不含 EDTA 的胰蛋白酶收集处理后的细胞,800 r/min(*r* = 12 cm)离心 10 min,沉淀采用 300 μL PBS 重悬,逐滴加入 700 μL 预冷的无水乙醇中,乙醇终浓度为 70%,4 °C 避光固定过夜。800 × *g* 离心 10 min,去上清。PBS 洗两次。重悬细胞于 500 μL 含 100 unit/mL 的 RNase A 的 PBS 缓冲液中,避光,37 °C 孵育 30 min。加 2 mg/mL PI 至终浓度 50 μg/mL,避光孵育 30 min。流式细胞仪检测细胞周期。

1.4 流式细胞术(FCM)检测 T24 细胞凋亡率变化

取对数生长期的 T24 细胞按 10⁶/孔接种于 6 孔细胞培养板中。培养 24 h 后,给予 3 × 10⁻⁴ mmol/L 的 TSA 处理 72 h,对照组加入等量的培养液,各组均设 3 个复孔。同期培养并同期分别以无 EDTA 的 2.5 g/L 胰蛋白酶收集上清漂浮细胞和底壁细胞。加 200 μL binding buffer 重悬,加入 2 μL AnnexinV-FITC,5 μL PI,孵育后行流式细胞仪分析。

1.5 RT-PCR 分析 Apaf-1、APC 基因的表达

用终浓度为 3 × 10⁻⁴ mmol/L 的 TSA 处理 T24 细胞,非药物处理组作为对照,分别于 24、48、72 h 后收集细胞。Trizol 法抽提总 RNA。紫外分光光度仪检测所抽提 RNA 的浓度和纯度。用 MMLV-RT 逆转录酶按照说明合成 cDNA,逆转录产物作为下步 PCR 模板。取逆转录 cDNA 产物 2 μL 进行 PCR 扩增,PCR 反应总体系为 25 μL,反应条件为:95 °C 预变性 5 min,循环内 95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 25 s,扩增 35 个循环后 72 °C 延伸 5 min。Apaf-1 上游引物为 5'-TACAATCAGGCTCTGGGAGAC-3',下游引物为 5'-GTGAAGTGGAT GTGCCATAC-3',RT-PCR 产物为 323 bp。APC 上游引物为 5'-TCCTCCAGGTGAAA GGAAAG-3',下游引物为 5'-GGGTCACAGTGTTC ACATAC-3',RT-PCR 产物为 297 bp。同时扩增 β-actin 作为内参照,上游引物为 5'-TGGCACCCAGC ACAATGAA-3',下游引物为 5'-CTAAGTCATAGT CCGCCTAGAAGCA-3',RT-PCR 产物为 186 bp,反应条件如上述。PCR 产物经过 2% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统进行半定量分析。

1.6 统计学处理

实验数据用 SPSS 13.0 统计软件分析,采用单因素方差分析进行统计学分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TSA 对 T24 细胞增殖的影响

MTT 实验可见, TSA 药物对 T24 细胞生长增殖活性具有明显抑制的抑制作用, 3×10^{-4} mmol/L TSA 作用 24、48、72 h 抑制率分别为 $(16.1 \pm 1.2)\%$ 、 $(31.8 \pm 2.5)\%$ 和 $(36.9 \pm 1.3)\%$ (图 1)。

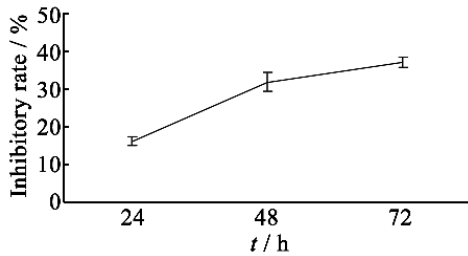


图 1 TSA 处理后时间-细胞生长抑制率曲线

Fig.1 Inhibitory effect of TSA on proliferation of T24 cells

2.2 TSA 诱导 T24 细胞周期阻滞和细胞凋亡

与同时期对照组相比, 流式细胞仪分析可见 TSA 作用 24 h 及 48 h 后, T24 细胞 G_0/G_1 期细胞百分率升高, S 期细胞百分率下降 ($P < 0.01$); TSA 作用 72 h 后 S 期细胞百分率下降, G_2/M 期细胞百分率较对照组升高 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 TSA 对膀胱癌 T24 细胞周期的影响

Table 1 Effects of 3×10^{-4} mmol/L TSA on cell cycle distribution in T24 bladder cancer cells

Group	Cell cycle (%)		
	G_0/G_1	S	G_2/M
Control 24 h	72.30 ± 0.40	24.73 ± 0.80	2.97 ± 0.40
TSA 24 h	75.53 ± 1.58 ²⁾	19.67 ± 1.16 ²⁾	4.83 ± 0.49 ²⁾
Control 48 h	69.60 ± 0.30	24.43 ± 0.21	5.97 ± 0.32
TSA 48 h	73.63 ± 1.86 ²⁾	20.30 ± 1.40 ²⁾	6.03 ± 0.45
Control 72 h	71.30 ± 1.15	25.53 ± 0.25	3.13 ± 1.36
TSA 72 h	71.27 ± 0.61	18.13 ± 0.68 ²⁾	10.60 ± 0.10 ²⁾

1) Compared with control at the period, $P < 0.05$; 2) Compared with control at the same period, $P < 0.01$.

Annexin V/PI 双染法检测凋亡结果显示 TSA 处理 72 h 后 T24 细胞凋亡率为 $(9.97 \pm 1.83)\%$, 同时期对照组细胞凋亡率为 $(5.60 \pm 0.70)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 可见 TSA 能诱导 T24 细胞凋亡增加。

2.3 TSA 对 T24 细胞中 Apaf-1、APC 基因 mRNA 表达的影响

半定量 RT-PCR 分析显示 3×10^{-4} mmol/L TSA 处理 T24 细胞 24 h 后 Apaf-1 mRNA 表达较同时期对照组无明显区别, 但 TSA 处理 48、72 h 后, Apaf-1 mRNA 表达水平较同时期对照组明显升高 ($P < 0.05$, 图 2)。TSA 处理 T24 细胞 24、48、72 h, APC 基因 mRNA 表达水平较同时期对照组均明显升高 ($P < 0.05$, 图 3)。

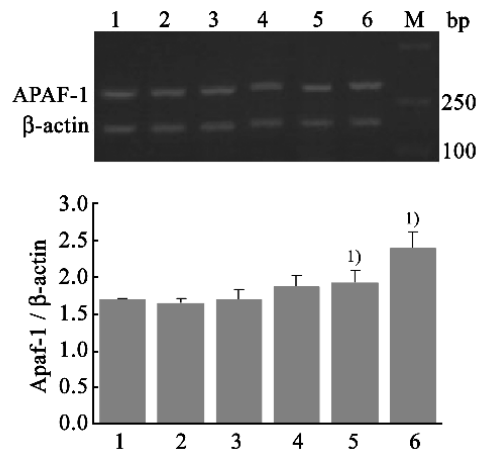


图 2 TSA 对 T24 细胞 Apaf-1 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of TSA on Apaf-1 mRNA expression in T24 cells

1) Compared with control at the same period, $P < 0.05$; 1-3: control group 24, 48, 72 h; 4-6: TSA 3×10^{-4} mmol/L group 24, 48, 72 h; M: Marker

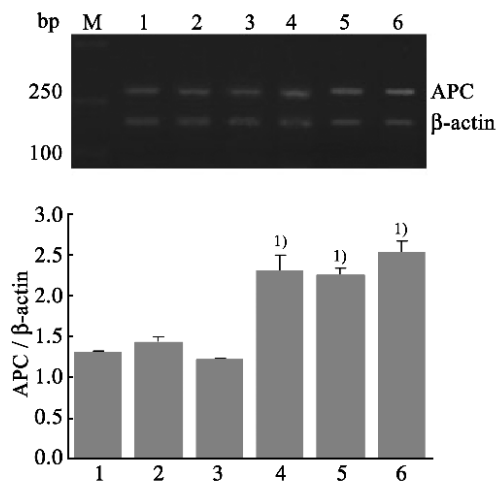


图 3 TSA 对 T24 细胞 APC mRNA 表达的影响

Fig.3 Effect of TSA on APC mRNA expression in T24 cells

1) Compared with control at the same period, $P < 0.05$; 1-3: control group 24, 48, 72 h; 4-6: TSA 3×10^{-4} mmol/L group 24, 48, 72 h; M: Marker

3 讨 论

组蛋白乙酰化修饰是表观遗传学的重要研究内容,是基因转录调控的重要机制之一,在肿瘤发生中具有重要作用。组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和去乙酰化酶的活性平衡是调控组蛋白乙酰化的水平的重要机制,其通过改变染色体构象而影响基因转录^[1]。组蛋白的异常去乙酰化将使基因表达失调,从而导致肿瘤发生,在白血病等肿瘤中已得到证实^[2-3]。去乙酰化酶抑制剂 TSA 能增加组蛋白乙酰化水平,影响基因转录,具有抗肿瘤作用^[4];还有研究发现 TSA 在膀胱癌细胞系、乳腺癌细胞系中能诱导全基因组和特定基因启动子的去甲基化^[5],但其具体机制仍不清楚。

TSA 体外作用于肿瘤细胞能抑制肿瘤细胞增殖、促进分化、诱导细胞凋亡,对小细胞肺癌等肿瘤具有明显的抑制作用^[6-7]。本研究中采用 MTT 法发现 3×10^{-4} mmol/L TSA 对膀胱癌 T24 细胞生长具有明显的抑制作用,FCM 检测结果显示 TSA 作用 T24 细胞 72 h 后 T24 细胞凋亡率为 $(9.97 \pm 1.83)\%$,同时期对照组细胞凋亡率为 $(5.60 \pm 0.70)\%$,凋亡率明显升高($P < 0.01$),并且 TSA 作用 24 h 及 48 h 后,T24 细胞 G_0/G_1 期细胞百分率升高,S 期细胞百分率下降($P < 0.01$),说明 TSA 可能通过诱导 T24 细胞凋亡和细胞周期阻滞而抑制 T24 细胞生长,与李功成、曲魏等的研究一致^[8-9]。

已有研究发现 TSA 引起细胞周期阻滞可能与其上调肿瘤细胞中周期蛋白依赖性激酶抑制因子 P21^{WAF1} 或抑制 cyclin A 的表达有关,而 TSA 诱导细胞凋亡的机制可能与其诱导肿瘤细胞中 Bcl-2 的下调和 Bax 的上调有关^[8-9]。肿瘤细胞凋亡受众多凋亡相关基因调控,具有两条独立的途径:死亡受体途径和线粒体介导的凋亡途径。Apaf-1 是线粒体凋亡途径的关键调节因子,其结合自线粒体内释放至胞浆的细胞色素 C,进一步激活 Caspase-9,从而启动 Caspase 级联反应,引起细胞凋亡^[10]。细胞色素 C/Apaf-1/Caspase-9 途径的激活依赖于 Apaf-1 基因的正常表达。本研究中经 RT-PCR 检测发现 TSA 作用 72 h 后 T24 细胞中 Apaf-1 mRNA 表达明显上调($P < 0.01$),同时伴随有细胞

凋亡的明显增加,可见 Apaf-1 表达可能受组蛋白乙酰化调节,而 TSA 引起细胞凋亡的机制可能与其诱导 Apaf-1 的表达上调有关。

APC 是 Wnt 信号的下游抑制因子,间接调节一系列参与调控细胞周期和凋亡的基因的表达,如 cyclinD1、c-myc、c-jun 等。在 Wnt 信号通路中,Apc 直接参与调节 β -catenin 在胞浆中的水平,当 APC 表达缺失可引起 β -catenin 在胞浆内聚集并转运至核内,与转录因子 TEF/LEF 结合调节 c-myc 等癌基因的转录,引发肿瘤^[11]。在膀胱癌中,APC 表达异常常与其启动子异常甲基化有关,且与肿瘤的复发和进展相关^[12-13];而因突变或杂合性缺失(LOH)所导致的 APC 表达异常则较为少见^[14-15]。本研究发现 TSA 处理 T24 细胞 24、48、72 h,APC 基因 mRNA 表达水平较同时期对照组均明显升高($P < 0.05$),说明 APC 的表达同时受组蛋白乙酰化水平调节,TSA 导致的 APC 表达上调可能是 TSA 诱导膀胱癌周期阻滞和凋亡的重要机制之一。

本研究表明,组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 能显著抑制膀胱癌 T24 细胞体外生长,诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞,其机制可能与其诱导 Apaf-1、APC mRNA 的表达上调有关。

参考文献:

- [1] Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation [J]. Opin Gene Dev, 1999, 9(1): 40-48.
- [2] Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases [J]. Annu Rev Biochem, 2001, 70: 81-120.
- [3] Fenrick R, Hiebert SW. Role of histone deacetylases in acute leukemia [J]. J Cell Biochem Suppl, 1998, 30-31: 194-202.
- [4] Monneret C. Histone deacetylase inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2005, 40(1): 1-13.
- [5] Ou J, Torrisani J, Unterberger A, et al. 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.
- [6] Marks PA, Richon VM, Breslow R, et al. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs [J]. Curr Opin Oncol, 2001, 13(6): 477-483.
- [7] Platta CS, Greenblatt DY, Kunnimalaiyaan M, et al. The HDAC inhibitor trichostatin A inhibits growth of

- small cell lung cancer cells [J]. *J Surg Res*, 2007, 142(2): 219-226.
- [8] Qu W, Kang Y, Zhou M, et al. Experimental study on inhibitory effects of histone deacetylase inhibitor MS-275 and TSA on bladder cancer cells [J]. *Urol Oncol*, 2009, Jan 30. [Epub ahead of print]
- [9] Li G, Zhang X, Pan T, Chen Z, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A inhibits the growth of bladder cancer cells through induction of p21WAF1 and G1 cell cycle arrest [J]. *Int J Urol*, 2006, 13(5): 581-586.
- [10] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade [J]. *Cell*, 1997, 91(4): 479-489.
- [11] Roose J, Huls G, Van Beest M, et al. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin Tcf-4 target Tcf-1 [J]. *Science*, 1999, 285(5435): 1923-1926.
- [12] Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(24): 8659-8663.
- [13] Yates DR, Rehman I, Abbod MF, et al. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(7): 2046-2053.
- [14] Kastiris E, Murray S, Kyriakou F, et al. Somatic mutations of adenomatous polyposis coli gene and nuclear b-catenin accumulation have prognostic significance in invasive urothelial carcinomas: evidence for Wnt pathway implication [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(1): 103-108.
- [15] Miyamoto H, Shuin T, Ikeda I, et al. Loss of heterozygosity at the p53, RB, DCC and APC tumor suppressor gene loci in human bladder cancer [J]. *J Urol*, 1996, 155(4): 1444-1447.

(编辑 徐杰)

(上接第 551 页 from page 551)

究这些炎症细胞及其活化过程中的细胞因子的相互关系有助于探索新的哮喘治疗手段,以更好地控制儿童支气管哮喘的发生发展。

参考文献:

- [1] 廖竞,农光民,蒋敏,等. 儿童重症哮喘气道中性粒细胞凋亡的研究 [J]. *中华儿科杂志*, 2009, 47(8): 628-631.
- [2] Traves SL, Donnelly LE. Th17 cells in airway diseases [J]. *Curr Mol Med*, 2008, 8(5): 416-426.
- [3] Hung LY, Velichko S, Huang F, et al. Regulation of airway innate and adaptive immune responses: the IL-17 paradigm [J]. *Crit Rev Immunol*, 2008, 28(4): 269-279.
- [4] Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, et al. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(8): 720-730.
- [5] McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice [J]. *J Immunol*, 2008, 181(6): 4089-4097.
- [6] Lindén A. Interleukin-17 and airway remodelling [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2006, 19(1): 47-50.
- [7] Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123(5): 1185-1187.
- [8] 中华医学会儿科分会呼吸学组. 2008年修订儿童支气管哮喘防治常规 [J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(10): 745-753.
- [9] Baines KJ, Simpson JL, Bowden NA, et al. Differential gene expression and cytokine production from neutrophils in asthma phenotypes [J]. *Eur Respir J*, 2010, 35(3): 522-531.
- [10] Maneechotesuwan K, Essilfie-Quaye S, Kharitonov SA, et al. Loss of control of asthma following inhaled corticosteroid withdrawal is associated with increased sputum interleukin-8 and neutrophils [J]. *Chest*, 2007, 132(1): 98-105.
- [11] Liang SC, Long AJ, Bennett F, et al. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment [J]. *J Immunol*, 2007, 179(11): 7791-7799.
- [12] Bullens DM, Truyen E, Coteur L, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? [J]. *Respir Res*, 2006, 7: 135.

(编辑 张恩健)