

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS-275 诱导骨髓瘤细胞株 U266 凋亡过程中 Survivin 的表达

马 健¹, 赵 名², 于晓姝², 王志红¹

MS-275, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and alters survivin gene expression in human myeloma cell line U266

Jian Ma,¹ Ming Zhao,² Xiao-Dan Yu² and Zhi-Hong Wang¹

1. 解放军总医院第一附属医院
血液科,
北京 100037
2. 军事医学科学院
基础医学研究所,
北京 100850

1. Department of Hematology,
First Affiliated Hospital of
General Hospital of PLA,
Beijing, 100037
P. R. China
2. Department of Pathobiology,
Institute of Basic Medical
Sciences,
Academy of Military Medical
Sciences, Beijing 100850,
P. R. China

通讯作者: 马 健

Correspondence to: Jian Ma

Tel.: 86.10.68989298

E-mail: mashixuan@163.com

收稿日期: 2008-08-26

修回日期: 2009-01-23

[Abstract] **Background and Objective:** Histone deacetylase inhibitors (HDACi) exert antitumor effects through the induction of apoptosis. This study was to investigate the effects of HDACi on survivin gene expression, cell proliferation and apoptosis in human myeloma cell line U266. **Methods:** U266 cells were exposed to different concentrations of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, at different time courses. Cell viability was measured using the trypan blue exclusion assay. Changes in cell morphology were observed with Wright-Giemsa staining. Cell cycle was analyzed using flow cytometry. Protein expressions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), caspase-3, survivin, P21 and CDK4 were detected by Western blot. **Results:** MS-275 inhibited the growth of U266 cells in a dose- and time-dependent manner. After exposure to 1.39 $\mu\text{mol/L}$ MS-275 for 48 h, the cell cycle was arrested at the G_0/G_1 phase, and the cell viability was decreased by 50%. After the treatment with 2 $\mu\text{mol/L}$ MS-275 for 24 h and 36 h, the ratios of U266 cells at the G_0/G_1 phase were increased to 66.39% and 89.80%, respectively. Obvious changes in morphology of U266 were observed under microscopy. Cleaved PARP appeared, along with an increased protein level of P21 and a decrease of survivin and CDK4 levels in U266 cells treated with MS-275. **Conclusion:** MS-275 could suppress the proliferation, induce apoptosis and reduce the expression of survivin in human myeloma cell line U266, which may be associated with the down-regulation of survivin.

Key words: histone deacetylase inhibitors, human myeloma cell line U266, MS-275, survivin, apoptosis

【摘 要】 背景与目的: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors, HDACi)是一类具有抗肿瘤活性的新型药物,主要通过诱导细胞凋亡发挥作用。本实验研究 HDACi (MS-275) 对人骨髓瘤细胞系 U266 细胞增殖和凋亡的影响及其与 Survivin 表达的关系。方法: 将不同浓度的 MS-275 作用于 U266 细胞不同时间后,用台盼蓝拒染法观察药物对细胞活力的影响;通过瑞氏-姬姆萨染色观察药物作用后细胞形态学的变化;用流式细胞仪分析细胞周期;用 Western blot 检测 Survivin、P21 和 Cdk4 等的蛋白表达,以及凋亡信号通路中 Caspase-3 活化及蛋白聚 ADP 核糖聚合酶[poly (ADP-ribose) polymerase, PARP]的裂解情况。结果: MS-275 呈时间和剂量依赖性抑制 U266 细胞增殖,阻断细胞周期于 G_0/G_1 期。MS-275 作用 U266 细胞 48 h 时的 IC_{50} 为 1.39 $\mu\text{mol/L}$; 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS-275 作用 U266 细胞 24 h 后, G_0/G_1 期细胞占 66.39%, 36 h 后 G_0/G_1 期细胞占 89.80%。瑞氏-姬姆萨染色显示细胞形态发生明显变化。Western blot 检测结果显示, MS-275 作用 U266 细胞后, Survivin 和 Cdk4 表达下降, P21 表达增加, Caspase3 被裂解活

化,其底物蛋白 PARP 发生剪切。结论:MS-275 抑制人多发性骨髓瘤细胞系 U266 增殖并诱导细胞凋亡,可能与下调 Survivin 蛋白的表达有关。

关键词:组蛋白去乙酰化酶抑制剂;MS-275;人骨髓瘤;U266 细胞;Survivin;细胞凋亡

中图分类号:R733.3 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2009)05-0466-06

组蛋白乙酰化/去乙酰化修饰是基因转录调控的关键机制之一,与癌症的发生密切相关^[1]。组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitors,HDACi)是一类具有抗肿瘤活性的新型药物。研究表明,HDACi 可通过细胞周期阻滞、诱导分化和凋亡等机制对血液系统肿瘤和一些实体瘤产生明显抑制作用,其抗肿瘤作用具有广泛性^[2]。MS-275 属苯甲酰胺类强效 HDAC 抑制剂,对多种人类肿瘤细胞系具有强大的抗肿瘤作用,并具有高效、低毒和耐受性好的特点,有很强的特异性和选择性^[3]。本实验将这种新的 HDACi 类药物 MS-275 作用于人骨髓瘤细胞 U266,探讨 MS-275 对 U266 细胞增殖、凋亡的影响以及与 Survivin 表达之间的关系,为进一步阐明骨髓瘤细胞恶性增殖的相关机制提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及其来源

MS-275 由美国科罗拉多大学医学科学中心 Bolin Liu 教授提供,瑞氏染色液和姬姆萨染色液购自北京赛驰生物科技有限公司,RNase A、PI 购自 Sigma 公司,一抗 PARP、Acetyl-Histone H3 以及二抗 Anti-Mouse/Rabbit IgG (HRP-linked)均购于 Cell Signaling 公司,P21 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,BCA™ Protein Assay Kit、Chemiluminescent Substrate 购自 PIERCE 公司,Laemmli Sample Buffer 购自 BIO-RAD 公司,RPMI-1640 干粉培养基购自美国 Gibco 公司。

1.2 细胞来源及培养

人骨髓瘤细胞 U266 细胞系由军事医学科学院放射医学研究所王立生教授馈赠,常规培养于含 10% 灭活胎牛血清及 100 u/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。实验时细胞处于对数生长期,活细胞数达 95%~100%。

1.3 细胞活性测定

取对数生长期的 U266 细胞,1 500×g 离心 5 min 以收集细胞,将细胞密度调整为 2×10⁵ 个/mL,以不同浓度的 MS-275 (0、0.5、1、2、5、10 μmol/L)处理细胞,在药物分别作用 24 h 和 48 h 后,采用台盼蓝拒染法计算各组细胞的活细胞和死细胞数,并计算细胞存活率。细胞存活率=[活细胞数/(活细胞数+死细胞数)]×100%。

1.4 瑞氏-姬姆萨染色

取对数生长期的 U266 细胞,离心后,将细胞密度调整为 2×10⁵ 个/mL,用 2 μmol/L 的 MS-275 分别处理细胞 18 h 和 36 h 后,吸取少量细胞悬液(1×10⁶ 个/mL)进行细胞甩片,甲醇固定 10 min 后,先用姬姆萨染色 15 min,用蒸馏水轻柔冲洗后,再用瑞氏染色液作用 30 min,在显微镜下观察细胞的形态学变化。

1.5 细胞周期分析

取对数生长期 U266 细胞接种于 6 孔板,用 MS-275 (2 μmol/L)处理 12、24、36 h 后,1 500×g 离心 5 min;用 PBS 洗涤,沉淀,离心,收集于 1.5 mL EP 管中,然后以 70% 的冷乙醇(用含 3% 胎牛血清的 PBS 配制)固定过夜,-20℃冰箱保存。次日常温下 2 000 ×g 离心 3 min,以 PBS 洗细胞沉淀两次。以含 RNase A (终浓度 1 mg/mL)的 PBS 0.1 mL 重悬细胞沉淀,37℃水浴 30 min。离心去掉 RNA 酶。向试管内加入 PI 染液(终浓度为 100 μg/mL),室温下避光反应 20 min 后,上流式细胞仪检测。

1.6 Western blot 检测

收集正常培养的 U266 细胞和经 MS-275 (2 μmol/L)处理 12、24、36 h 的 U266 细胞,10 000×g 离心 5 min,用 Laemmli Sample Buffer 裂解,置热混匀仪上 99℃加热 8 min,冰水浴冷却,然后 40℃条件下 10 000×g 离心 10 min。转移上清至另一无菌 EP 管内,取适量样品,应用 BCA 试剂盒测量蛋白浓度(具体步骤见试剂说明书)。配制 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,上样前加入 5% β 巯基乙醇,每个样品上样 50 μg 蛋白。80 V 电压电泳 2 h,至溴酚蓝到达凝胶底部。转移蛋白至 PVDF 膜,80 V 电压电泳 2 h,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h,TBS+Tween 洗膜 3×5 min。加入 5% 脱脂牛奶或 5% BSA 稀释的一抗封闭膜,置 40℃摇床过夜。洗膜后再分别与相应的二抗(5% 脱脂牛奶稀释)室温孵育 1 h,洗膜 3 次。将等体积混合的 ECL 化学发光底

物 A、B 液均匀加在 PVDF 膜上,显色 5 min,X 光片曝光后,将 X 光片依次进行显影和定影。用 β -actin 作为内参对照。

1.7 统计学处理

细胞存活率以均数 $\pm$ 标准差表示。利用 SAS6.0 软件对细胞存活率进行单因素方差分析。比较各药物浓度处理组与对照组的差异, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 MS-275 对 U266 细胞的体外杀伤作用

台盼蓝拒染法测定细胞活力实验结果(图 1)显示,不同浓度 MS-275 均以时间-剂量依赖性方式抑制 U266 细胞增殖,在分别作用细胞 24 h 和 48 h 后,细胞的存活率随药物浓度的增加而逐渐降低,各浓度组之间的差异具有统计学意义($P<0.01$);同时,药物对细胞的杀伤作用也有时间依赖性,各时间点之间的差异也具有统计学意义($P<0.01$),其中药物作用 48 h 的 IC_{50} 为 $1.39 \mu\text{mol/L}$ 。 $2 \mu\text{mol/L}$ 的 MS-275 作用细胞 24 h 后,细胞的存活率为 91.4%;药物作用 48 h 后,细胞的存活率仅为 24.2%,二者之间的差异具有统计学意义($P<0.01$)。在后续的实验

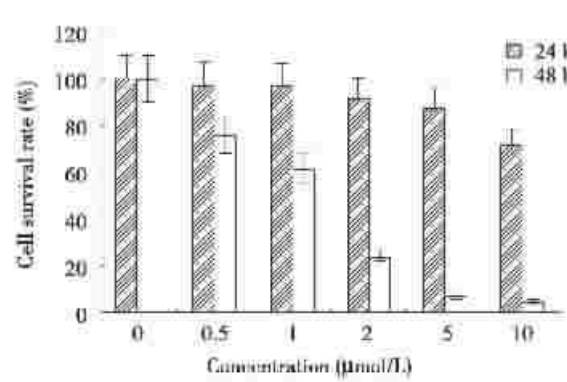


图 1 不同浓度 MS-275 作用 U266 细胞不同时间对细胞活力的影响

Figure 1 Cell viability of U266 treated with different concentrations of MS-275 at different time points

All results are presented as means $\pm$ SD of three independent experiments.

中采用浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$ 的 MS-275。

2.2 MS-275 处理 U266 细胞后细胞的形态变化

$2 \mu\text{mol/L}$ 的 MS-275 作用细胞 36 h 后,瑞氏-姬姆萨染色显示细胞的形态发生明显的改变,细胞核收缩,完整的胞膜不再整齐排列(图 2)。

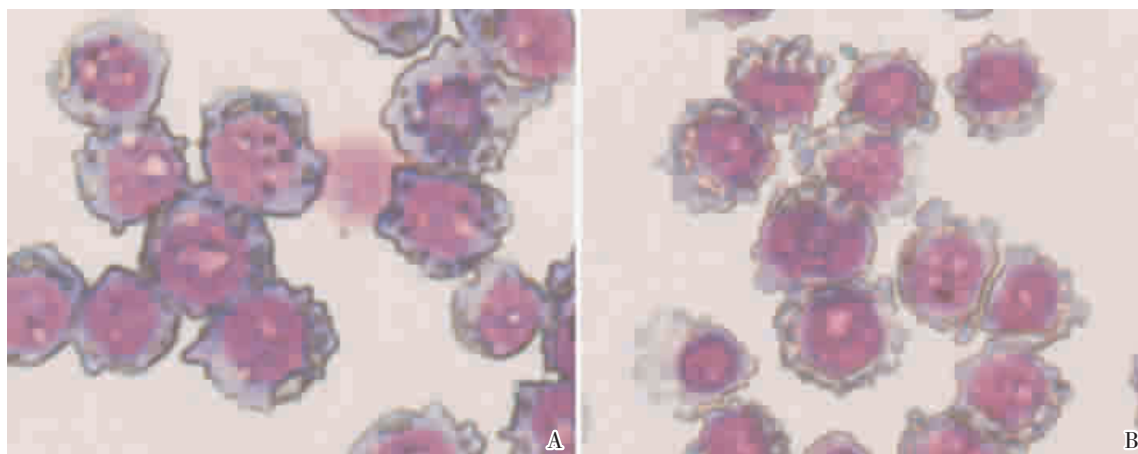


图 2 MS-275 作用细胞 36 h 后 U266 细胞形态的变化 (瑞氏-姬姆萨染色 $\times 400$)

Figure 2 Morphological change in U266 cells after the treatment with MS-275 for 36 h ($\times 400$)

A: U266 cells; B: U266 cells treated with MS-275.

2.3 MS-275 对 U266 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示,MS-275 ($2 \mu\text{mol/L}$) 分别作用 U266 细胞 12 h、24 h、36 h 后,细胞周期被明显地阻滞于 G_0/G_1 期,药物处理时间越长,对细胞周期的阻滞效应越明显。在

药物分别作用 24 h、36 h 后, G_0/G_1 期细胞比例由对照组的 49.07% 分别增加到 66.39%、89.80%;同时,S 期细胞数目显著减少,S 期细胞百分比从 37.73% 分别减少为 16.14%、1.63% (图 3)。

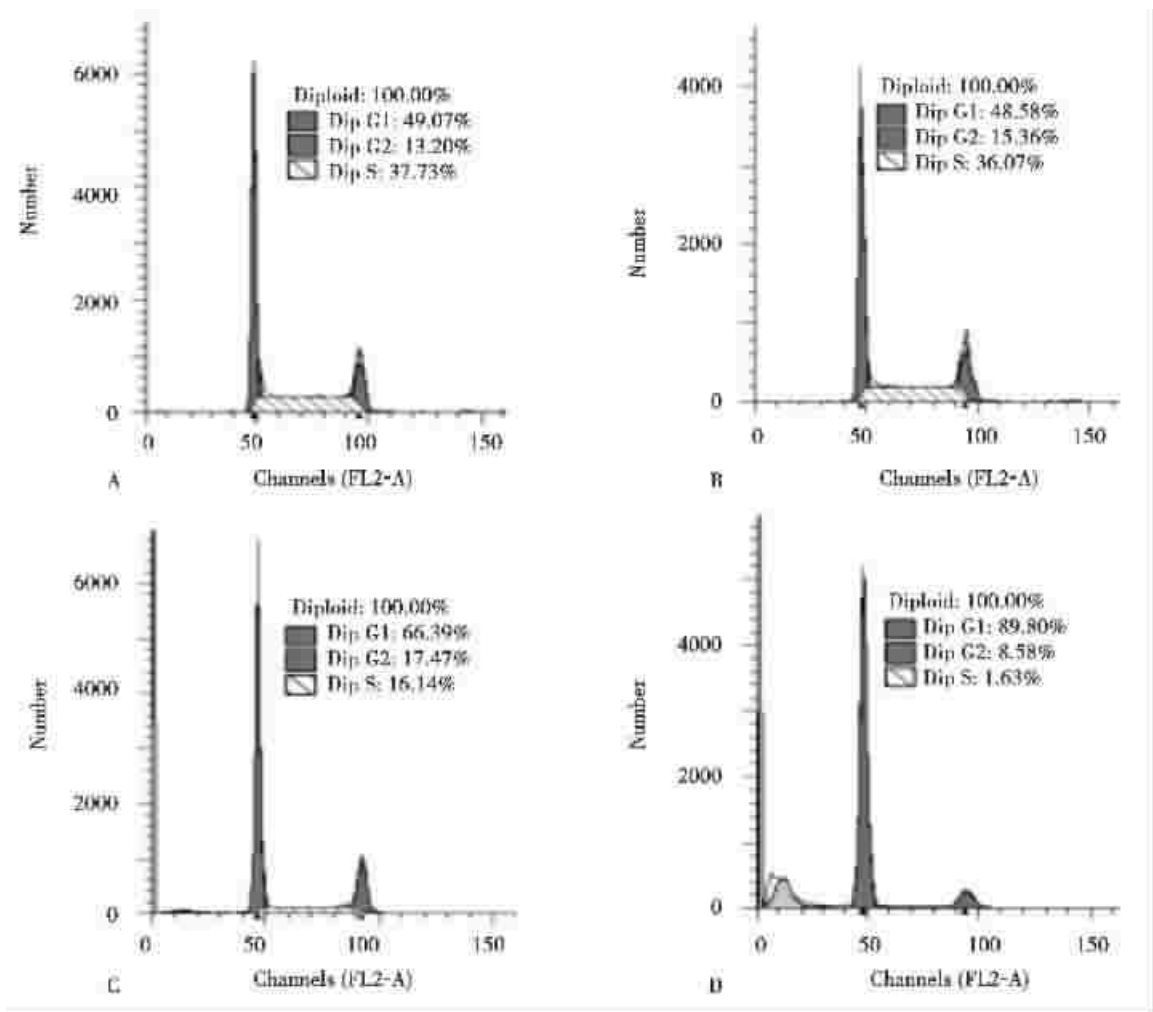


图 3 MS-275 对人骨髓瘤细胞系 U266 细胞周期的影响

Figure 3 Cell cycle of U266 cells after the treatment with MS-275

A: U266 cells; B: U266 cells treated with MS-275 for 12 h; C: U266 cells treated with MS-275 for 24 h; D: U266 cells treated with MS-275 for 36 h.

2.4 MS-275 对 U266 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,MS-275 可明显上调 P21 的表达水平,同时降低 Survivin 和 CDK4 的表达水平(图 4)。MS-275 分别作用 12 h、24 h 和 36 h 后,U266 细胞均出现 Caspase3 的活化和 PARP 剪切后的条带,而且随着时间延长条带越来越明显(图 5)。

2.5 MS-275 对 U266 细胞组蛋白 H3 的乙酰化作用

U266 细胞经 MS-275 处理后,作为 HDAC1 和 HDAC2 底物的组蛋白 H3 的乙酰化明显增强,而且随着时间的延长,MS-275 对 H3 的乙酰化作用更加明显(图 6)。

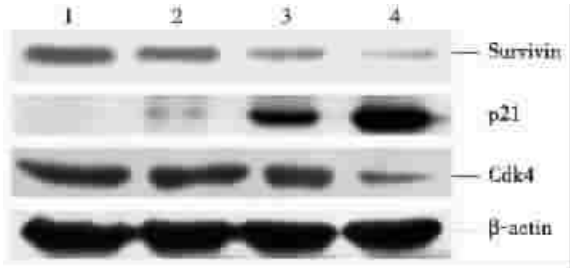


图 4 MS-275 作用后 U266 细胞中 Survivin、P21 和 CDK4 蛋白的表达

Figure 4 Protein expression of survivin, p21 and Cdk4 in U266 cells after the treatment with MS-275

1: U266 cells; 2: U266 cells treated with MS-275 for 12 h; 3: U266 cells treated with MS-275 for 24 h; 4: U266 cells treated with MS-275 for 36 h.

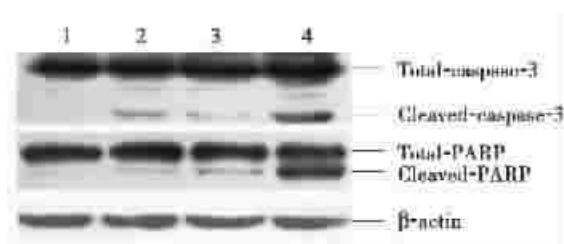


图5 MS-275作用后U266细胞中Caspase-3和cleaved-PARP的表达

Figure 5 Protein expression of caspase-3 and cleaved-PARP in U266 cells after the treatment with MS-275

1: U266 cells; 2: U266 cells treated with MS-275 for 12 h; 3: U266 cells treated with MS-275 for 24 h; 4: U266 cells were treated with MS-275 for 36 h.

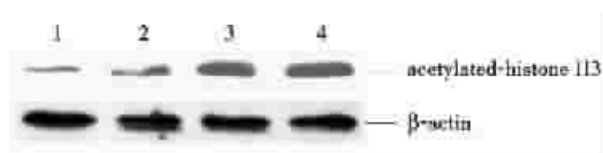


图6 MS-275对U266细胞中组蛋白H3的乙酰化作用

Figure 6 Protein expression of acetylated histone H3 in U266 cells after the treatment with MS-275

1: U266 cells; 2: U266 cells treated with MS-275 for 12 h; 3: U266 cells treated with MS-275 for 24 h; 4: U266 cells treated with MS-275 for 36 h.

3 讨论

组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC)是调节组蛋白乙酰化状态的一组酶^[1]。在正常生理状态下,这两类酶对组蛋白乙酰化作用的调控处于平衡状态。而细胞在发生转化的状态下,HDAC的活性明显增强,使得原有的基因表达平衡状态被打破,导致一些影响细胞增殖和调控细胞周期的分子表达失衡,进而导致细胞恶变。近年来,HDACi被证实具有抑制肿瘤细胞增殖、细胞周期阻滞、诱导细胞分化及促进细胞凋亡的作用。HDACi抗肿瘤作用具有广泛性,体内外实验的结果均提示HDACi具有良好的临床应用前景^[2]。MS-275属苯甲酰胺类强效HDACi,为小分子化合物,分子量为376.4,对多种人类肿瘤细胞系具有强大的抗肿瘤作用,并具有高效、低毒和耐受性好的特点,具有很强的特异性和选择性^[3]。引人注意的是,MS-275可以使正常组织细胞及肿瘤细胞的生长停滞,但是它们仅

诱导肿瘤细胞的快速死亡,而正常细胞不会出现这些改变^[4]。

Survivin基因属于IAP家族,近年研究中发现其在正常组织中不表达,而在多种肿瘤中高表达,对肿瘤细胞的凋亡抑制和异常增殖起着重要作用。已有研究表明Survivin与肿瘤细胞增殖呈正相关,与肿瘤细胞凋亡呈负相关^[5]。肿瘤患者癌组织中Survivin高表达往往提示预后不良。目前的研究表明,Survivin抑制凋亡、促进增殖的机制主要与抑制凋亡蛋白Caspase的活化有关。Caspase被认为是凋亡过程的中心环节,在凋亡的过程中伴随着一系列的Caspase蛋白有序的活化^[6]。Survivin与Caspases特异性结合后,抑制Caspase3、Caspase7的活性,阻断细胞凋亡。Survivin也可以通过p21间接地抑制Caspase的活性。Survivin与细胞周期调控因子CDK4结合形成Survivin-CDK4复合物,使得p21^{wall}从p21^{wall}-CDK4的复合物中释放出来而与Caspase3结合并抑制Caspase3的活性^[5]。本研究表明,MS-275在处理细胞12 h、24 h和36 h后,能明显下调Survivin蛋白水平。同时凋亡效应蛋白Caspase也发生了活化,导致其底物蛋白PARP发生剪切,这个过程可能与Survivin的蛋白下调有关。

有关Survivin在肿瘤细胞中信号转导通路上游的调控机制,尤其是信号转导通路的调控机制目前研究甚少。JAK-STAT信号转导通路最先在干扰素(IFN)信号转导研究中发现。这是一条极其快速的从细胞外到细胞核的信号转导通路。信号转导和转录活化因子(signal transducers and activators of transcription,STATs)家族是一种存在于胞浆并在激活后能够转入核内与DNA结合的蛋白家族,具有转导和转录调控双重作用。在STATs家族中,STAT3与肿瘤的关系最为密切,参与了多种细胞因子的信号转导过程。在多种肿瘤细胞中均发现有持续性过度激活,STAT3被过度激活后,可以通过各种途径促进细胞增殖、恶性转化、阻碍细胞凋亡,表现出致癌作用^[7,8]。有文献报道在某些肿瘤中JAK-STAT3的激活和Survivin高表达关系密切,均提示Survivin基因为STAT3的靶基因^[9,10]。AG490可以选择性阻断JAK,从而阻断JAK-STAT3的信号转导,如多发性骨髓瘤、前列腺癌以及肝癌等肿瘤通过抑制STAT3的激活而抑制肿瘤生长^[11]。AG490还可以抑制STAT3和DNA结合的活性,导致U266细胞的生长抑制^[12]。

余畅等^[13]利用 AG490 来抑制 JAK 酶活性,观察 JAK 酶被抑制前后乳腺癌细胞内 STAT3 活化情况的变化和 Survivin 表达的改变以及乳腺癌细胞凋亡的变化,发现在 AG490 作用后,pSTAT3 的表达明显下降,Survivin mRNA 和蛋白质表达均显著降低,同时出现了肿瘤细胞的增殖被抑制和凋亡增加,提示 JAK-STAT3 的激活和 Survivin 的表达之间有一定的关系。

综上所述,通过干扰 JAK-STAT 信号转导通路的某些环节,从而减少 Survivin 的表达,可能可使肿瘤细胞的恶性增殖得到抑制。但 JAK-STAT 信号转导通路中各环节的分子机制尚有待进一步的探讨。

参 考 文 献

- [1] Kwon SH, Ahn SH, Kim YK, et al. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells [J]. J Biol Chem, 2002,277(3):2073-2080.
- [2] Khochbin S, Verdel A, Lemercier C, et al. Functional significance of histone deacetylase diversity [J]. Curr Opin Genet Dev, 2001,11(2):162-166.
- [3] Suzuki T, Ando T, Tsuchiya K, et al. Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives [J]. J Med Chem, 1999,42(15):3001-3003.
- [4] Hess-Stumpp H, Bracker TU, Henderson D, et al. MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases—the development of an anticancer agent [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007,39(7-8):1388-1405.
- [5] Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and-7 [J]. Biochemistry, 2001,40(4):1117-1123.
- [6] Johnson ME, Howerth EW. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein [J]. Vet Pathol, 2004,41(6):599-607.
- [7] Leeman RJ, Lui VW, Grandis JR. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer [J]. Expert Opin Biol Ther, 2006,6(3):231-241.
- [8] Benekli M, Xia Z, Donohue KA, et al. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival [J]. Blood, 2002,99(1):252-257.
- [9] Pallares J, Martínez-Guitarte JL, Dolcet X, et al. Survivin expression in endometrial carcinoma: a tissue microarray study with correlation with PTEN and STAT-3 [J]. Int J Gynecol Pathol, 2005,24(3):247-253.
- [10] Nam S, Buettner R, Turkson J, et al. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005,102(17):5998-6003.
- [11] Eriksen KW, Kaltoft K, Mikkelsen G, et al. Constitutive STAT3-activation in Sezary syndrome: tyrphostin AG490 inhibits STAT3-activation, interleukin-2 receptor expression and growth of leukemic Sezary cells [J]. Leukemia, 2001,15(5):787-793.
- [12] Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer an activator of transcription [J]. Curr Opin Oncol, 1999,11(6):490-496.
- [13] 余 畅, 邓华瑜. JAK 抑制剂 AG490 诱导乳腺癌细胞凋亡及对 Survivin 表达的影响 [J]. 癌症, 2006,25(10):1227-1231.

[编辑及校对:甘可建]