

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170267

HDAC 抑制剂 SAHA 抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 的迁移和增殖

姚海淋, 霍丽红, 郝云鹏, 来永巍, 段慧鑫, 欧国芳, 何红鹏
(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 用组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase complex, HDAC)抑制剂 SAHA 对人乳腺癌细胞 MCF-7 进行处理, 抑制组蛋白的去乙酰化, 进而检测 SAHA 对 MCF-7 的影响. 体外划痕实验与 Transwell 实验表明 SAHA 可以抑制 MCF-7 细胞的迁移; 免疫印迹(Western blot)实验表明 SAHA 可以抑制迁移相关基因 MYL9 蛋白水平的表达. MTT 实验和克隆形成实验表明 SAHA 可以抑制 MCF-7 细胞的增殖; Western blot 实验与逆转录实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)实验表明 SAHA 能够抑制细胞周期蛋白标志基因 CyclinD1、CDK4 的表达, 促进周期蛋白激酶抑制剂 p21 的表达.

关键词: 乳腺癌; MCF-7 细胞; SAHA; 细胞增殖; 细胞迁移

中图分类号: R737.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2019)02-0025-05

Inhibiting the Proliferation and Migration of Human Breast Cancer Cell MCF-7 with HDAC Inhibitor SAHA

YAO Hailin, HUO Lihong, HAO Yunpeng, LAI Yongwei,
DUAN Huixin, OU Guofang, HE Hongpeng

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Histone deacetylase complex (HDAC) inhibitor SAHA was used to deal with human breast cancer cell MCF-7 and inhibit the deacetylation of histone proteins in order to detect the effects of SAHA on MCF-7 cells. Wound healing assays and transwell assays showed that SAHA inhibited the migration of MCF-7 cells. Western blot assays proved that SAHA inhibited the expression of migration-related gene MYL9. MTT assays and colony forming assays demonstrated that SAHA inhibited the proliferation of MCF-7 cells. Western blot assays and RT-qPCR assays proved SAHA inhibited the expression of cell cycle marker genes CyclinD1 and CDK4 and promoted the expression of CDK inhibitor p21.

Key words: breast cancer; MCF-7 cells; SAHA; cell proliferation; cell migration

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤之一^[1], 从美国癌症协会(ACS)统计的数据分析, 乳腺癌患者人数预计占有新诊断癌症患者的 1/2, 乳腺癌已成为全球范围内危害女性身体健康的头号杀手^[2-3]. 乳腺癌主要是由于乳腺上皮细胞在致癌因子的作用下发生基因突变, 成为不受调控、可以无限增殖的癌细胞而导致的^[4].

以组蛋白为代表的蛋白质乙酰化修饰是表观遗传

学研究的重要内容, 通过乙酰化修饰改变蛋白质空间构象和所带电荷, 从而增强或削弱蛋白质的生物学功能^[5]. 乙酰化修饰是可逆的生物学反应, 行使去乙酰化功能的组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase complex, HDAC)更是临床肿瘤抑制剂研发的热点^[6]. 通过抑制 HDAC 活性, 诱导组蛋白的适度乙酰化状态, 将高度有序的染色体打开, 促进转录因子与 DNA 结合, 从而使受抑的肿瘤抑制基因得到表达, 起

收稿日期: 2017-10-07; 修回日期: 2018-01-04

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(31301073)

作者简介: 姚海淋(1989—), 男, 河北保定人, 硕士研究生; 通信作者: 何红鹏, 副教授, hehongpeng@tust.edu.cn

到治疗肿瘤的作用^[7].

组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)通过抑制 HDAC 的活性而使组蛋白过乙酰化,进而通过抑制血管新生、细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡、调节转录因子活性等作用而产生较强的抗肿瘤效应,因此在抗肿瘤方面有良好的应用前景. SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid)是继 HMBA(hexamethylene bisacetamide)之后的第二代氧肟酸类组蛋白去乙酰化酶抑制剂,它比 HMBA 具有更高的活性,在微摩尔($\mu\text{mol/L}$)水平即对肿瘤细胞有很大的杀伤效果^[8]. SAHA 是小相对分子质量(<300)线性肟酸,是广谱组蛋白去乙酰化酶抑制剂,可以抑制 I 类和 II 类 HDAC 的活性,其作用机制为通过结合到酶的活性位点而抑制 HDAC 的活性^[9-10].

SAHA 是目前研究最多、最深入的组蛋白去乙酰化酶抑制剂,在一些疾病的研究与治疗中已有重要应用. 多数研究认为 SAHA 的抗肿瘤机制与上调 *p21* 基因表达有关:王箬等^[8]研究表明 SAHA 可以通过促进 *p21* 基因和 *Bax* 基因的表达,能够在体外抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞的生长并促进其凋亡;于涛等^[11]研究表明 SAHA 可以诱导骨髓瘤细胞的凋亡,选择性诱导细胞周期负调控子 *p21* 的表达,从而阻滞细胞周期,诱导多种肿瘤细胞的分化和凋亡. 以往对 SAHA 抗肿瘤作用研究主要集中于其对细胞增殖和凋亡的影响. 本研究用 SAHA 处理乳腺癌细胞,分别从细胞水平、蛋白水平以及 RNA 分子水平上观察 SAHA 对乳腺癌细胞迁移和增殖的影响.

1 材料与方法

1.1 细胞株和细胞培养

人乳腺癌细胞 MCF-7、人脐静脉内皮细胞 HUVEC 细胞为本实验室保藏. 细胞用 DMEM/F12 培养基(Gibco 公司),添加 10% 灭活胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,用 0.25% 的胰酶消化传代.

1.2 主要试剂

青链霉素, Gibco 公司; 胎牛血清, 天津康源生物技术有限公司; GAPDH 单克隆抗体、CyclinD1 抗体、CDK4 抗体、p21 抗体, Santa 公司; MYL9 抗体, Abcam 公司; M-MLV 逆转录酶、Trizol 裂解液、RNA 酶抑制剂, Invitrogen 公司; Fast SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems 公司; SAHA、DMSO, 上海赛金生物科技有限公司.

1.3 细胞划痕实验

将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板, 培养 18 ~ 24 h. 在每孔中央用 10 μL 吸头垂直划两条宽度为 300 ~ 500 μm 的无细胞交叉划痕区. 用 PBS 清洗, 加入含 1% FBS 的 DMEM/F12 培养基继续培养. 将 DMSO 溶液加入对照组中, 将 SAHA 按照 2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度加入实验组中. 每隔 12 h 在荧光倒置显微镜下观察每孔中划痕宽度变化情况, 拍照并记录划痕宽度(愈合快慢), 愈合快慢代表 MCF-7 细胞在培养板上迁移率大小.

$$\text{迁移率} = \frac{0 \text{ h 划痕宽度} - 48 \text{ h 划痕宽度}}{0 \text{ h 划痕宽度}} \quad (1)$$

1.4 Transwell 实验

按每孔约 5×10^5 个细胞铺在 24 孔 Transwell 上层小室中, 下室加含药培养基(含 10% FBS) 500 ~ 600 μL ; 培养 16 h 后, 将孔板取出, PBS 洗 3 次; 用 500 ~ 600 μL 含 4% 多聚甲醛溶液固定小室下层细胞 20 min; PBS 洗 3 次; 500 ~ 600 μL 100% 甲醇放在 24 孔板中, 小室浸在其中, 室温放置 20 min; PBS 洗 3 次; 吉姆萨染色, 通过激光扫描共聚焦显微镜计数上、下、左、右、中这 5 个视野下的细胞数并拍照.

1.5 免疫印迹(Western blot)检测

收集处理组及阴性对照组 MCF-7 细胞, 加入 200 μL SDS 细胞裂解液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 20 min, 用细胞刮刀收集蛋白于 1.5 mL EP 管中, 煮沸 5 min, 取蛋白进行 SDS-PAGE 电泳. 电泳完毕, 利用半干转膜仪将蛋白转移至 NC 膜上, 用质量分数为 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜. 然后用 PBS 缓冲液(PBST)漂洗 NC 膜 3 次, 每次 5 min. 洗完后于室温下二抗避光孵育 1 h, PBST 漂洗 3 次, 每次 5 min. 洗完后, 用 Odyssey 红外激光成像系统成像, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作对照.

1.6 细胞 RNA 的提取及逆转录实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

收集细胞, Trizol 法提取总 RNA 后逆转录成 cDNA, 以此为模板进行实时荧光定量 PCR. 在 Invitrogen 公司合成以下引物: GAPDH 上、下游引物 5'-ATTCAACGGCACAGTCAAGG-3'和 5'-GCAGAA GGGGCGGAGATGA-3', 产物大小 213 bp; p21 上、下游引物 5'-GACACCACTGGAGGG TGACT-3'和 5'-CAGGTCCACATGGTCTTCCT-3', 产物大小 172 bp; CyclinD1 上、下游引物 5'-GCTGCGAAGTG GAAACCATC-3'和 5'-CCTCCTTCTGCACACATT TGAA-3', 产物大小 135 bp.

1.7 MTT 实验

收集对数期细胞, 调整细胞悬液浓度, 将其加入 96 孔板中, 每孔加入 100 μL , 使待测细胞密度为 1 000 ~ 10 000 个/孔. 过夜培养, 加入浓度梯度的药物, 设置 3 ~ 5 个复孔. 孵育 24 h, 倒置显微镜下观察. 每孔加入 10 μL MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 避光条件下进行, 继续培养 4 h. 终止培养, 吸去孔内培养液, 每孔加入 100 μL 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解. 在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度 (A), 按照式 (2) 计算存活率.

$$\text{存活率} = \frac{A_{\text{实验}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (2)$$

1.8 克隆形成实验

将胰酶消化后的单个细胞以适当密度接种于 6 孔板中, 每孔接种 100 ~ 200 个细胞进行培养. 细胞贴壁后, 将浓度梯度的药物加入到 6 孔板中. 待培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养. 用 PBS 清洗 3 次. 向每孔中加 4% 的多聚甲醛, 固定细胞 15 min. 去除固定液, 加适量吉姆萨染色液染色 10 ~ 30 min, 然后用去离子水缓慢洗下染色液, 将 6 孔板倒扣在滤纸上, 干燥. 再将 6 孔板倒扣在一张白色的纸上, 拍照并比较克隆数.

1.9 数据分析

采用 Graphpad Prism 6 软件进行数据处理, 与对照组相比进行显著性分析: *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$.

2 结果与分析

2.1 SAHA 作为 HDAC 抑制剂的有效剂量范围

为了确定 SAHA 发挥 HDAC 抑制剂作用的有效浓度, 用 SAHA 处理 MCF-7 细胞, 进行了免疫印迹实验, 检测组蛋白的乙酰化, 结果如图 1 所示.

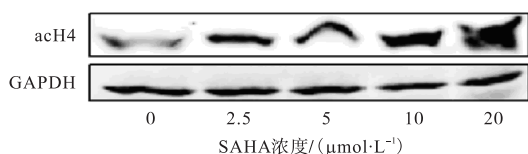


图 1 SAHA 阻断组蛋白的去乙酰化

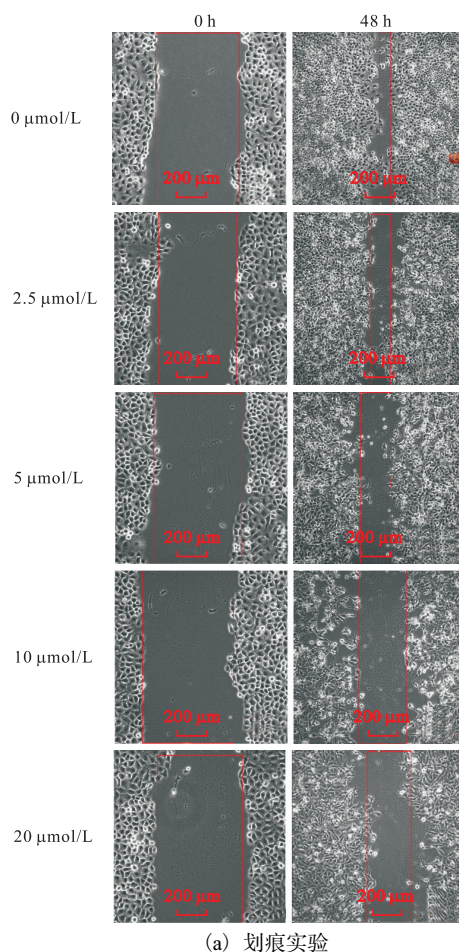
Fig. 1 Histone deacetylation blocked by SAHA

由图 1 可知: 相对于对照组, 当 SAHA 的浓度由 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 组蛋白 H4 的乙酰化水平 (acH4) 是逐渐上调的. 这表明组蛋白去乙酰化反应被阻断, SAHA 在此浓度范围可以抑制

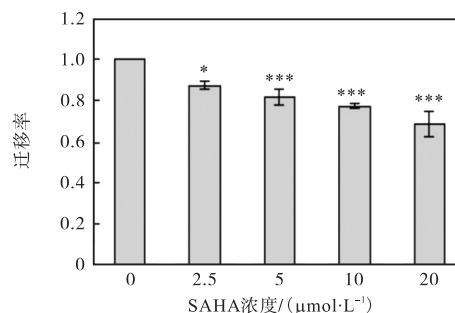
HDAC 活性, 且具有浓度依赖性.

2.2 SAHA 对乳腺癌细胞 MCF-7 迁移的影响

为了检测 SAHA 对 MCF-7 细胞迁移的影响, 进行了体外划痕实验与 Transwell 实验. 以不加 SAHA 的 MCF-7 细胞作为对照组, 与对照组相比, 加药 48 h 后, 随着 SAHA 浓度的升高, MCF-7 细胞划痕愈合明显减慢 (图 2); Transwell 实验中, 相对于加 DMSO 的对照组, 加 SAHA 的实验组 MCF-7 细胞的跨膜迁移的个数比较少 (图 3). 这表明 SAHA 对细胞的迁移具有抑制作用.

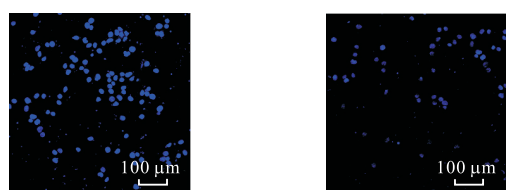


(a) 划痕实验



(b) 48h 时细胞迁移率

图 2 划痕实验检测 SAHA 对 MCF-7 细胞迁移的影响
Fig. 2 Wound healing assay to detect the effects of SAHA on the migration of MCF-7 cells



对照组

SAHA 组 (10 $\mu\text{mol/L}$)

图3 Transwell 实验检测 SAHA 对 MCF-7 细胞迁移的影响

Fig. 3 Transwell assay to detect the effects of SAHA on the migration of MCF-7 cells

2.3 SAHA 对 MCF-7 细胞迁移相关基因表达的影响

为了探索 SAHA 抑制 MCF-7 细胞迁移的分子机制,检测了 SAHA 对 MCF-7 细胞中与迁移关系密切的 MYL9 基因表达的影响,如图 4 所示. 相对于对照组,加 SAHA 的实验组的迁移相关基因 MYL9 蛋白的表达量是逐渐下调的,这说明 SAHA 可以抑制迁移相关基因蛋白的表达.

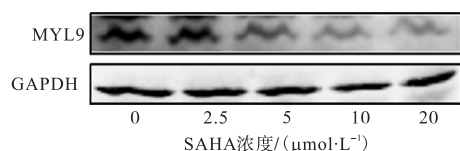


图4 SAHA 抑制迁移相关基因 MYL9 的表达

Fig. 4 SAHA inhibiting the expression of MYL9

2.4 SAHA 对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响

为了检测 SAHA 对 MCF-7 细胞增殖的影响,分别进行了 MTT 实验与克隆形成实验(吉母萨染色,记录克隆数). 图 5 是验证 SAHA 对肿瘤 MCF-7 细胞与非肿瘤 HUVEC 细胞存活影响的实验.

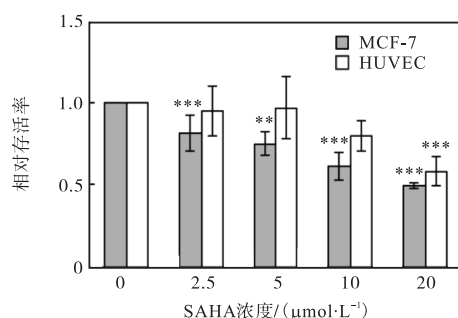


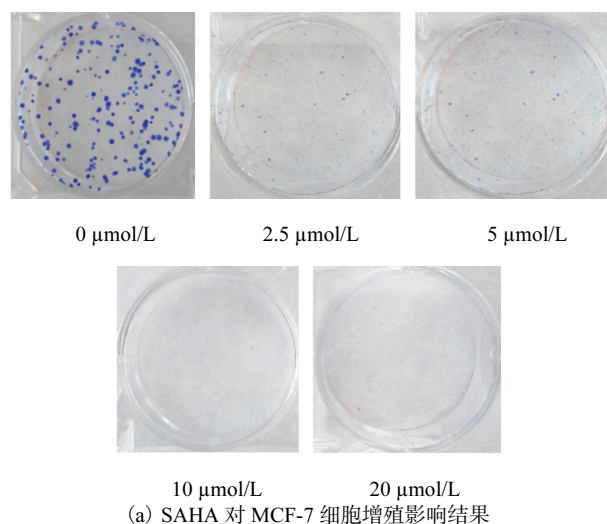
图5 MTT 实验检测 SAHA 对 MCF-7 和 HUVEC 细胞增殖的影响

Fig. 5 MTT assay to detect the effects of SAHA on proliferation of MCF-7 and HUVEC cells

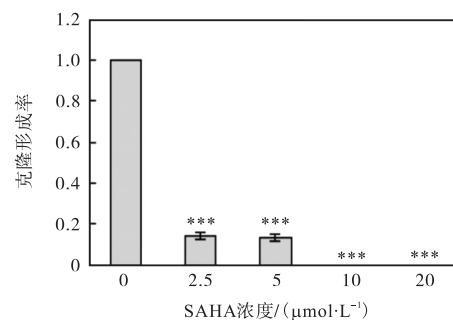
由图 5 可见: SAHA 对 MCF-7 细胞的存活具有抑制作用,随着药物浓度的增加, MCF-7 细胞的存活率逐渐降低. 而对于 HUVEC 细胞,只有在高浓度时,其存活率下调明显. 因此,这表明 SAHA 可以抑

制肿瘤 MCF-7 细胞的存活,对非肿瘤细胞 HUVEC 存活抑制不明显.

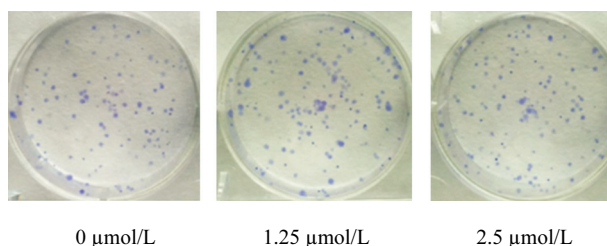
图 6 和图 7 是 SAHA 对 MCF-7 与 HUVEC 细胞增殖影响的实验. 用 SAHA 处理 MCF-7 细胞时,当药物浓度在 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 两个较低的浓度时,形成的克隆数目就已经很少,当浓度较高时,便已不能形成克隆,这说明 SAHA 可以抑制 MCF-7 细胞的增殖(图 6). 而对于 HUVEC 细胞,只有在高浓度时(20 $\mu\text{mol/L}$),其克隆形成数目下降明显;在低浓度时,SAHA 对 HUVEC 细胞的克隆形成数目影响不大(图 7). 因此,这表明 SAHA 可以抑制 MCF-7 细胞的增殖,且肿瘤细胞 MCF-7 比非肿瘤细胞 HUVEC 对 SAHA 更加敏感.



(a) SAHA 对 MCF-7 细胞增殖影响结果



(b) 克隆形成率

图6 克隆形成实验检测 SAHA 对 MCF-7 细胞增殖的影响
Fig. 6 Colony forming assay to detect the effects of SAHA on proliferation of MCF-7 cells

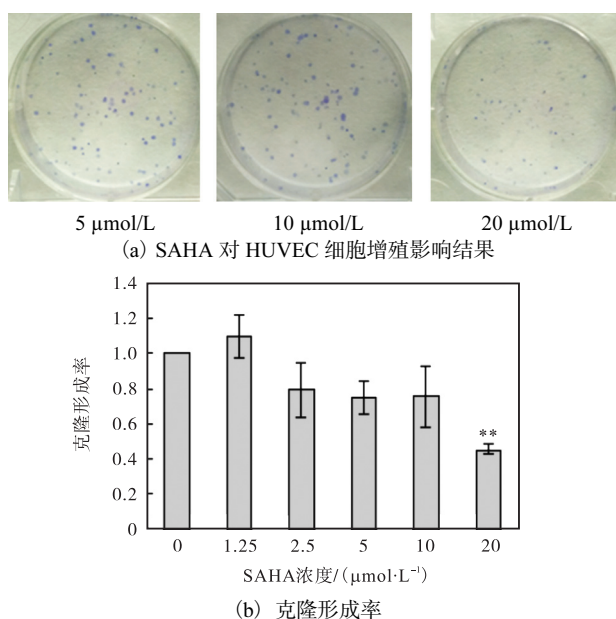


图 7 克隆形成实验检测 SAHA 对 HUVEC 细胞增殖的影响

Fig. 7 Colony forming assay to detect the effects of SAHA on proliferation of HUVEC cells

2.5 SAHA 对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖相关基因表达的影响

为了检测 SAHA 对增殖相关基因 CyclinD1、CDK4 与 p21 的影响,运用实时荧光定量 PCR 和免疫印迹方法从 mRNA 和蛋白表达水平上进行了检测,以加 DMSO 的为对照组,结果如图 8 和图 9 所示。

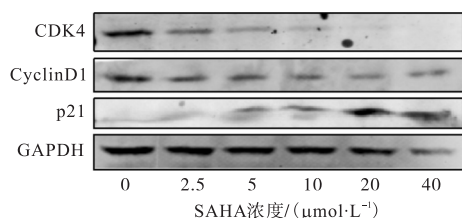


图 8 SAHA 对增殖相关基因蛋白的影响

Fig. 8 Effects of SAHA on the protein expression of cell proliferation related genes

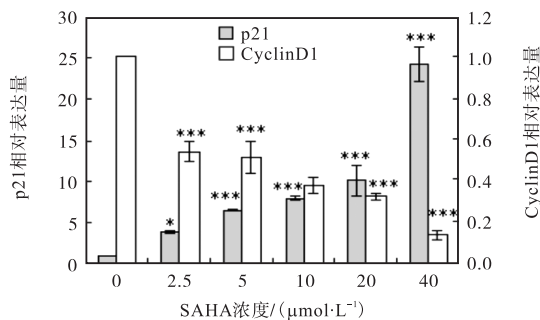


图 9 SAHA 对 MCF-7 细胞增殖相关基因 RNA 的影响

Fig. 9 Effects of SAHA on the RNA expression of cell proliferation related genes

CyclinD1 是细胞周期蛋白,CDK4 是细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶,而 p21 蛋白可以抑制 CDK 复合物活性。图 8 和图 9 结果表明:与对照组相比,加药组的 CyclinD1、CDK4 在蛋白以及 RNA 的水平上表达量均下调,但 p21 的表达量上调,并且蛋白的表达量变化随药物浓度的降低具有浓度梯度依赖性。由以上的结果说明:SAHA 抑制了肿瘤 MCF-7 细胞过度增殖相关基因的表达,促进了抑癌基因表达。

3 讨论

一般情况下,细胞中组蛋白的乙酰化与去乙酰化可维持动态平衡并受到严格调控,但当这种平衡被外界因素打破时,就常常会导致基因表达紊乱,进而引起疾病的发生,特别是容易引起肿瘤的发生^[12]。在多种肿瘤发现 HDAC 过量表达,SAHA 能够通过抑制 HDAC 的活性而使组蛋白过乙酰化,进而通过细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡等作用机制而产生较强的抗肿瘤效应,因此在某些肿瘤治疗方面展现了良好的应用前景^[13],但 SAHA 对乳腺癌细胞迁移和增殖的影响及机制未见报道。

蛋白质乙酰化修饰相关的表观遗传学改变是造成肿瘤发生的一个很重要的因素,而高迁移,异常增殖是肿瘤细胞的标志,本研究使用小分子化合物 SAHA 处理细胞,分别从乳腺癌细胞 MCF-7 的迁移和增殖角度,阐述其抗乳腺癌作用机制,最终发现 SAHA 在分子水平上抑制促增殖和迁移相关基因、增强抑增殖基因表达;在细胞水平上,可以抑制 MCF-7 的迁移与增殖,具有显著的抗乳腺癌作用。本研究对乳腺癌新药研发具有一定的意义。

参考文献:

- [1] Ziegler R G, Anderson W F, Gail M H. Increasing breast cancer incidence in China: The numbers add up[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2008, 100(19): 1339-1341.
- [2] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2014, 64(1): 9-29.
- [3] Forouzanfar M H, Foreman K J, Delossantos A M, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis[J]. Lancet, 2011, 378(9801): 1461-1484.

- [4] Sariego J. Breast cancer in the young patient[J]. The

(下转第 44 页)

本不变,说明所使用的纯化方法没有破坏木素结构。

(4)木素纯化前后的热重分析表明,木素的降解温度主要在 160~460℃。粗木素的最高失重峰出现在 368℃。甲酚硫酸法纯化后,木素的最高降解速率对应温度比粗木素提高 19℃,热稳定性得到提高。相比液-液抽提法和弱酸法,甲酚硫酸法纯化木素热稳定性最好。

参考文献:

- [1] 王华,陈明强,张晔,等. 木质素分离研究进展[J]. 广州化工,2012,40(6):7-9.
- [2] 任苗苗,吕惠生,张敏华,等. 木质素资源利用的研究进展[J]. 高分子通报,2012(8):44-49.
- [3] 文志军,张安龙,杜煜. 碱法制浆黑液中木素的提取及综合应用综述[J]. 西北轻工业学院学报,2002,20(3):92-96.
- [4] 何伟,沙萍,郇颢生. 工业碱木素的纯化方法:甲酚-硫

酸法[J]. 中国造纸,1991,10(3):8-12.

- [5] Lundquist K, Ohlsson B, Simonson R. Isolation of lignin by means of liquid-liquid extraction[J]. Svensk Papperstidning, 1977, 80(5):143-144.
- [6] 崔金龙,李海明,毕佳捷. 离子色谱在造纸原料碳水化合物分析中的应用[J]. 大连工业大学学报,2013(6):432-436.
- [7] 邢玉柱. 二氧六环木素的制备[J]. 天津造纸,1983(3):121-122.
- [8] 刘玉. 三倍体毛白杨 EMCC 蒸煮和 TCF 漂白及其木素结构变化的研究[D]. 广州:华南理工大学,2005.
- [9] 张春敬,刘玉. 黑液中提取碱木素(溶出木素)的研究进展[J]. 华东纸业,2011,42(6):70-75.
- [10] 赵吉,丁子栋,王兴,等. 乙醇木素纯化及其结构表征[J]. 中国造纸,2016,35(3):29-33.
- [11] 陈琳,范峰,凌凤香,等. 造纸黑液纯化木素的结构及热性质表征[J]. 当代化工,2008,37(4):382-385.

责任编辑:周建军

(上接第 29 页)

American Surgeon, 2010, 76(12):1397-1400.

- [5] Brownell J E, Allis C D. Special HATs for special occasions: Linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 1996, 6(2):176-184.
- [6] Khochbin S, Verdel A, Lemerrier C, et al. Functional significance of histone deacetylase diversity[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2001, 11(2):162-166.
- [7] 于亚平,王学文. 组蛋白乙酰化酶和去乙酰化酶在细胞增生分化和肿瘤发生中的作用[J]. 医学研究生学报,2001,14(3):249-252.
- [8] 王箐,吴维光,闫洪亮,等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 体外抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞的实验研究[J]. 中国肿瘤临床,2013,40(12):698-701.
- [9] Richon V M, Emiliani S, Verdin E, et al. A class of hy-

brid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases[J]. Cell Biology, 1998, 95(6):3003-3007.

- [10] Munster PN, Troso-Sandoval T, Rosen N, et al. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells[J]. Cancer Research, 2001, 61(23):8492-8497.
- [11] 于涛,张鹏,鹿全意,等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 诱导骨髓瘤细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究,2012,16(6):1062-1066.
- [12] Sterner D E, Berger S L. Acetylation of histones and transcription-related factors[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(2):435-459.
- [13] Tan J, Cang S, Ma Y, et al. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2010, 3:5.

责任编辑:郎婧