

◇ 药学研究 ◇

组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素通过上调 Slug 促进结直肠癌细胞上皮-间质转化的研究

费云飞¹, 邱广阔¹, 罗洪波², 王保龙¹

(1. 安徽省立医院检验科, 安徽 合肥 230001; 2. 潜山县中医院检验科, 安徽 潜山 246300)

摘要:目的 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素(TSA)诱导结直肠癌细胞 HCT116 发生上皮-间质转化(EMT)的潜在分子机制。方法 TSA 处理结直肠癌细胞 HCT116, 观察细胞形态变化; 划痕实验观察细胞迁移侵袭能力的变化。实时定量 PCR、Western blot 检测 HCT116 细胞 EMT 标志物以及 Slug 的表达情况。siRNA 敲除 Slug 表达, Western blot 检测 HCT116 细胞 EMT 标志物表达变化, 以及细胞形态变化。结果 TSA 可以促进结直肠癌细胞 HCT116 的迁移能力, 诱导 HCT116 细胞发生 EMT 转化, 包括细胞形态改变, EMT 标志物表达变化。TSA 可以促进 EMT 关键转录因子 Slug 的表达, 包括蛋白和 mRNA 水平; 敲除 Slug 表达可以抑制 TSA 诱导的 EMT 转化过程。结论 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 通过上调 Slug 的表达促进结直肠癌细胞 HCT116 发生 EMT 转化, 从而提高其迁移能力。

关键词:曲古抑菌素; 结直肠癌; 上皮-间质转化; Slug

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2017.10.006

Histone deacetylase inhibitor TSA induced epithelial-mesenchymal transition by up-regulation Slug in colorectal cancer cell

FEI Yunfei¹, QIU Guangkuo¹, LUO Hongbo², WANG Baolong¹

(1. Department of Laboratory, Anhui Provincial Hospital, Hefei, Anhui 230001, China;

2. Department of Laboratory, Qianshan County Hospital, Qianshan, Anhui 246300, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of Histone deacetylase inhibitor TSA-mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cell HCT116. **Methods** The migration capability of HCT116 cells treated by TSA was measured by wound healing test and morphological changes were observed. Western blot and quantitative real-time PCR detected the expressions of E-cadherin, Vimentin and Slug. **Results** TSA induced EMT transition and enhanced migration of HCT116 cells. TSA increased expressions of Slug in mRNA and protein levels. Moreover, knockdown Slug expression by si-RNA suppressed TSA-induced EMT in HCT116 cells. **Conclusions** Histone deacetylase inhibitor TSA induces EMT in HCT116 cells by up-regulation the expression of Slug.

Key words: TSA; Colorectal cancer; Epithelial-mesenchymal transition; Slug

结直肠癌多年来一直是严重威胁世界人民身体健康的恶性肿瘤之一。结直肠癌的转移是临床治疗失败的主要原因。因此, 更好的理解结直肠癌侵袭转移的机制对成功治疗结直肠癌来说具有重大的临床意义。上皮-间质转化(EMT)是指在特定的生理和病理情况下, 上皮细胞失去极性, 失去与基底膜的连接等上皮表型, 向间质细胞转化, 获得了侵袭和迁移等运动能力的生物学过程^[1]。EMT 被认为是肿瘤发生侵袭转移的重要起始步骤。细胞发生 EMT 转化时, 细胞由规则的椭圆形态转变为梭长形态, 同时上皮型标志物 E-cadherin 表达减少, 间质型标志物 Vimentin 表达增多^[2]。EMT 转

化过程受到一些转录因子的调控, 其中转录因子 Slug 被认为是重要的 EMT 调控者, Slug 蛋白可以直接与 E-cadherin 的启动子上 E-box (5'-CAG-GTG-3') 作用元件结合而抑制其表达^[3-4]。Slug 报道参与了许多肿瘤的 EMT 调控过程, 包括结直肠癌^[5]。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACi)是一类新型的抗肿瘤药物, 目前已经发现了多种结构类型的组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 其中小分子氧肟酸类受到了广泛的关注^[6], 其中曲古抑菌素(TSA)是小分子氧肟酸类 HDACi。TSA 可在多种体内癌症模型中发挥抗肿瘤活性^[7]。本研究中发现 TSA 可以促进结直肠癌细胞发生 EMT 转化, 并对其中潜在的分子机制进行了探讨, 以期临床上 HDACi 的合理使用提供一些有益的实验依据和线索。

基金项目: 安徽省自然科学基金(1608085QH217)

通信作者: 王保龙, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤转移与化疗耐药, E-mail: wbl196555@163.com

1 材料与方法

1.1 细胞培养 结直肠癌细胞株 HCT116 购自上海细胞库。培养于含 10% 胎牛血清的 McCoy's 5a 培养基中,置 37 ℃,5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3 d 用 0.25% 的胰酶消化传代。

1.2 主要试剂 TSA 购自 Sigma-Aldrich 公司;单克隆抗体 Slug 购自 Cell Signaling Technology 公司;单克隆抗体 E-cadherin、Vimentin、 α -tubulin 抗体购自 Santa Cruz 公司;HRP 标记的羊抗兔和羊抗小鼠 IgG 购自鼎国生物技术有限公司;荧光定量-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.3 细胞划痕实验 取处于对数生长期的 HCT116 细胞,制备为单细胞悬液,细胞计数,预先在 6 孔细胞培养板后用记号笔画 5 条平行线,细胞以 $7 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 密度接种于培养板,置培养箱中培养,待细胞长成单层后弃去培养液,用灭菌枪头在培养板底部垂直于板底平行线划出划痕,PBS 洗去死细胞,挑选 5 个视野下拍照。细胞在无血清条件下,用 TSA ($200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和同体积的二甲基亚砜 (DMSO) 分别处理 48 h 后,在显微镜下选相同视野拍照,实验重复 3 次。Image-pro Plus 软件分别测量处理前后细胞划痕边界的距离,计算出细胞迁移距离,计算并用统计软件分析。

1.4 蛋白质印迹 Western blot 检测 细胞经预冷 PBS 洗涤后,用蛋白裂解液裂解,离心后收集上清液,测定蛋白浓度;等量蛋白样品经过 SDS-PAGE 电泳分离后,转印至 PVDF 膜上,封闭液室温孵育 2 h,抗体 E-cadherin、Vimentin、Slug 和 α -tubulin 均以 1:1 000 孵育过夜,经 PBST 洗涤后,加入二抗以 1:5 000 室温孵育 1.5 h,PBST 洗涤 3 次,最后用 ECL 化学发光试剂对 X 光片显影。

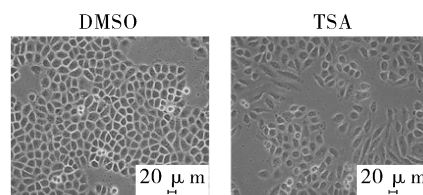
1.5 荧光定量 PCR 实验 按照 TRIzol 说明书方法提取细胞 RNA,逆转录为 cDNA,以 GAPDH 作为内参。引物序列如下: E-cadherin, 正义链 5'-TACACTGCCAGGAGCCAGA-3', 反义链 5'-TG-GCACCAGTGTCCGGATTA-3'; Vimentin, 正义链 5'-TGAGTACCGGAGACAGGTGCAG-3', 反义链 5'-TAGCAGCTTCAACGGCAAAGTTC-3'; Slug, 正义链 5'-TTCGGACCCACACATTACCT-3', 反义链 5'-GCAGTGAGGGCAAGAAAAAG-3'; GAPDH, 正义链 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 反义链 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'。PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 30 s, 94 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s 共 40 个循环。2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 法计算 c-met mRNA 的相对表达量。每个实验组重复 3 次。

1.6 siRNA 干扰实验 将 HCT116 细胞以 $7 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种至 6 孔培养板中,培养过夜。转染以每孔为例:取 5 μL 浓度为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 siRNA 储存液与 250 mL Opti-MEM 培养基混合均匀成 A 液;取 Lip-2000 5 μL 与 250 mL Opti-MEM 培养基混合均匀成 B 液,分别室温放置 5 min 后,将 A 液和 B 液混合,室温放置 20 min,将混合液加入 6 孔板中,每孔补无血清培养基至 2 mL,培养箱中孵育 6 h 后,更换成完全培养基,按照实验要求处理细胞,进行进一步的实验。

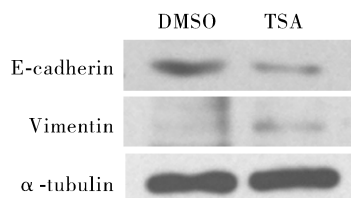
1.7 统计学方法 全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 统计学软件处理。组间比较采用独立样本双侧 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

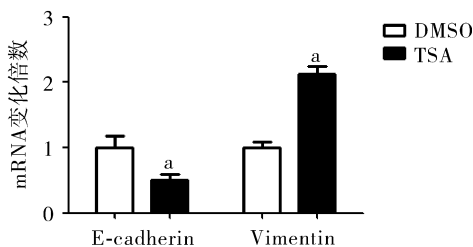
2.1 TSA 诱导 HCT116 细胞发生 EMT 转化 用 TSA ($200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 HCT116 细胞时,我们发现 HCT116 细胞由规则的椭圆形态变为梭长形态 (图 1A),这种形态变化让我们联想到 EMT 过程,为了对这一假设进行验证,我们进行了 Western blot 和荧光定量 PCR 实验。Western blot 结果显示 (图 1B),与对照组 DMSO 处理组对比,TSA 处理 24 h 后,HCT116 细胞中上皮型标志物 E-cadherin 表达明显减少,间质型标志物 Vimentin 表达明显增多。荧光定量 PCR (图 1C) 的结果发现了同样的现象,这些结果证明了 TSA 可以诱导 HCT116 细胞发生 EMT 转化。



A. TSA 对细胞形态的影响



B. Western blot 检测 TSA 对 EMT 标志物表达的影响

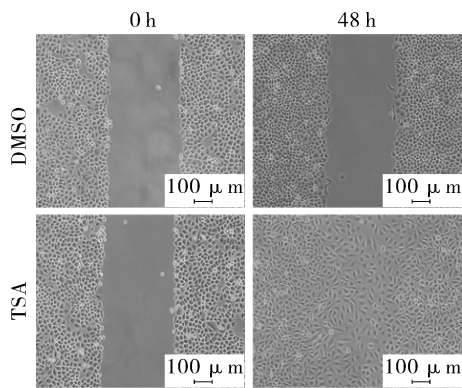


C. 荧光定量 PCR 检测 TSA 对 EMT 转化的影响

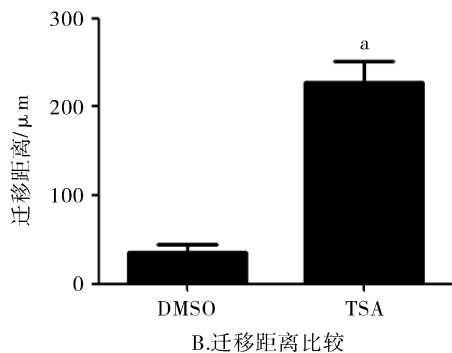
注:与 DMSO 相比,^a $P < 0.05$ 。

图 1 TSA 诱导 HCT116 细胞发生 EMT 转化

2.2 TSA 促进 HCT116 细胞的迁移能力 EMT 转化是肿瘤细胞发生迁移的早期过程, TSA 能够诱导 EMT 转化, 可能会影响 HCT116 细胞的迁移能力, 因此, 我们进行了细胞划痕实验来检测 TSA 对 HCT116 细胞迁移能力的影响, 结果显示, 与 DMSO 处理组相比, TSA 对处理 48 h 后, HCT116 细胞的迁移距离明显增加, 迁移能力明显增强(图 2A)。对迁移距离进行统计分析, 发现 TSA 对可以提高 HCT116 细胞的迁移能力 7 倍之多(图 2B)。



A. 划痕实验检测 TSA 对 HCT116 细胞迁移能力的影响



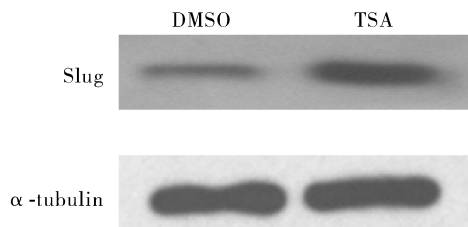
B. 迁移距离比较

注: 与 DMSO 相比, ^a $P < 0.05$ 。

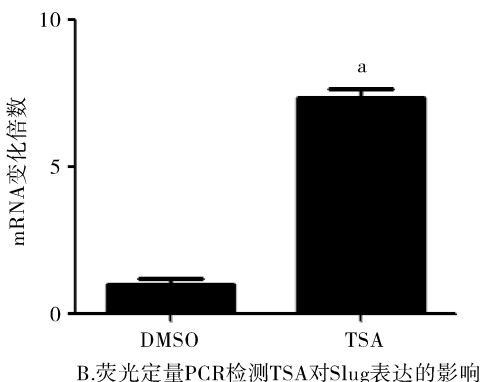
图 2 TSA 对促进 HCT116 细胞的迁移能力

2.3 TSA 促进 Slug 的表达 为了进一步研究 TSA 对诱导 HCT116 细胞发生 EMT 转化的机制, 我们检测了 EMT 重要转录因子 Slug 的表达, Western blot 结果显示(图 3A), TSA 可以明显增加 Slug 的表达; 荧光定量 PCR 的结果进一步证实了 TSA 对促进 Slug 的 mRNA 表达水平(图 3B)。这些结果表明, Slug 蛋白可能在 TSA 对诱导的 EMT 转化过程中发挥重要作用。

2.4 Slug 在 TSA 介导的 EMT 转化中至关重要 为了进一步研究 Slug 在 TSA 介导的结直肠癌细胞 EMT 转化过程中的作用, 我们对 Slug 蛋白进行了 siRNA 干扰。如图 4A 所示, 与阴性对照组相比, 干扰 Slug 后, Slug 的 mRNA 表达下降到 42.3%。干扰



A. Western blot 检测 TSA 对 Slug 表达的影响



B. 荧光定量 PCR 检测 TSA 对 Slug 表达的影响

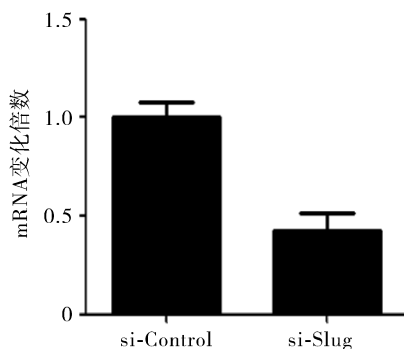
注: 与 DMSO 相比, ^a $P < 0.05$ 。

图 3 TSA 诱导 HCT116 细胞中 Slug 表达

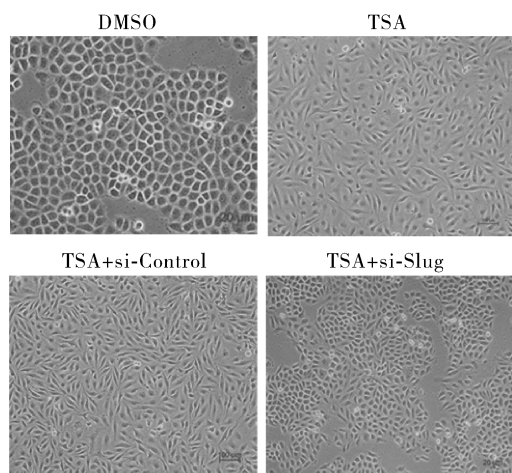
Slug 表达后可以显著抑制 TSA 引起的 EMT 样形态改变, 细胞由梭长的形态变得椭圆(图 4B)。进一步的我们进行了 Western blot 实验来检测 EMT 标志物的表达变化, 结果显示(图 4C), 与阴性对照组相比, siRNA 抑制 Slug 表达后, 上皮细胞标志物 E-cadherin 表达增加, 间质细胞标志物 Vimentin 表达减少。这些结果表明, Slug 在 TSA 介导的结直肠癌细胞 HCT116 的 EMT 转化过程中发挥了至关重要的作用。

3 讨论

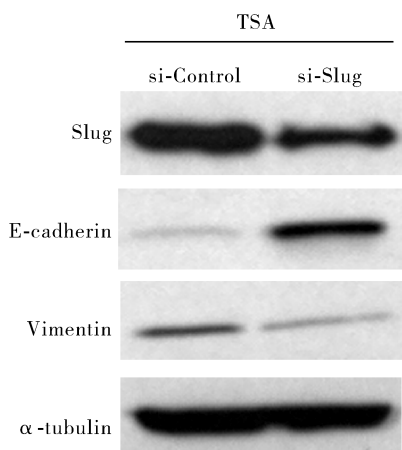
HDACi 是一类新型的抗肿瘤药物, 主要通过抑制机体内组蛋白去乙酰化酶而发挥活性, HDACi 包括脂肪酸类、小分子氧肟酸类、亲电子甲酮类、环肽类、苯酰胺类和其它类化合物, 其中研究的最为广泛的是小分子氧肟酸类组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA, TSA 在多种肿瘤模型中发挥了显著的抗肿瘤活性, 其抗肿瘤机制包括: 诱导肿瘤细胞凋亡、抑制细胞周期、诱导细胞分化、诱导细胞发生自噬性死亡、抗肿瘤免疫以及抑制血管形成等^[8]。然而, 我们的研究发现 TSA 可以促进结直肠癌细胞发生 EMT 转化, 并促进细胞的迁移能力。HCT116 细胞经过 TSA 处理后, 细胞形态发生 EMT 样改变, 由椭圆形态变为梭长状形态, 同时上皮型标志物 E-cadherin 表达减少, 而间质型标志物 Vimentin 表达增多。



A.实时定量PCR检测干扰Slug后Slug mRNA表达情况



B.干扰Slug表达观察细胞形态变化



C.Western blot 检测干扰Slug表达对EMT标志物的影响

图4 干扰 Slug 表达抑制 TSA 诱导的 EMT 转化

EMT 是肿瘤发生侵袭转移的重要起始步骤。EMT 转化过程受到一些转录因子的调控,如 Snail、Slug、Twist、ZEB1 等,这些转录因子通过直接或者间接作用于 EMT 重要分子标志物 E-cadherin,抑制其表达,减少细胞极性,增加细胞运动能力,从而促进肿瘤的侵袭转移^[3]。黄庆等^[9]发现 HDACi 可以通过上调转录因子 Snail 的表达诱导肝卵圆细胞 WB-F344 发生 EMT 转化,提高细胞迁移能力,抑制肝纤维化的发生;相似地,Jiang 等^[10]研究发现 HDACi 可以促进 Snail 的转录活性而提高其蛋白表达,并

促进其发生核转位,从而诱导鼻咽癌细胞发生 EMT 转化提高其侵袭转移能力。此外,有研究报道,HDACi 可以诱导前列腺癌细胞发生 EMT 转化并提高转录因子 ZEB1 的表达^[11]。我们的研究发现,TSA 可以提高 Slug 蛋白的表达,TSA 也可以促进 Slug 的 mRNA 表达水平,促进其转录。Slug 蛋白被认为是 EMT 转化过程的重要调控因子,Slug 入核后通过直接结合 E-cadherin 的启动子序列而抑制其表达,启动 EMT 进程。Slug 被报道在多种肿瘤细胞 EMT 转化过程中发挥着重要的调节作用,包括结直肠癌^[5]。为了验证 Slug 蛋白在 TSA 诱导结直肠癌 EMT 转化中的作用,我们对 Slug 进行了 siRNA 干扰。我们发现,干扰 Slug 表达抑制了 TSA 引起的 EMT 样形态改变,细胞发生了 MET 样形态改变,即由梭长状向圆石状转化,更重要的是,抑制 Slug 表达逆转了 TSA 引起的 EMT 标志物的表达变化,上调了 E-cadherin 的表达,减少了 Vimentin 的表达。表明 Slug 在 TSA 介导的结直肠癌 EMT 转化中至关重要。

总之,我们发现了 HDACi TSA 可以诱导结直肠癌细胞发生 EMT 转化,促进其迁移能力,并对其机制进行了探讨,发现 Slug 蛋白在其中发挥了重要作用,这可能为结直肠癌的临床化学治疗提供有效的指导并为 HDACi 的临床合理用药提供有益的实验依据。

参考文献

- [1] GREENBURY G. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. J Cell Biol,1982,95(1):333-339.
- [2] ZEISBERG M,NEILSON EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions [J]. Journal of Clinical Investigation,2009,119(6):1429-1437.
- [3] PEINADO H,OLMEDA D,CANO A. Snail,ZEB and bHLH factors in tumour progression:an alliance against the epithelial phenotype[J]. Nature Reviews Cancer,2007,7(6):415-428.
- [4] NIETO MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology,2002,3(3):155-166.
- [5] VINCAN E,BARKER N. The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression[J]. Clinical & Experimental Metastasis,2008,25(6):657-663.
- [6] MARKS PA,BRESLOW R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat:development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug [J]. Nat Biotechnol,2007,25(1):84-90.
- [7] YI HU, LUO DF, ZHANG QH,et al. TSA and PS-341 synergistically induce apoptosis in ovarian cancer cells [J]. Cancer Research on Prevention & Treatment,2010,37(8):889-893.