

·实验研究 Experimental research·

MS-275 对胃腺癌细胞抑制作用及其机制研究

王 栋, 宫卫东, 黄 辞, 李中华, 刘振堂, 吴智群

【摘要】 目的 采用分子靶向药物治疗胃癌是近年研究热点。探讨组蛋白去乙酰化酶抑制因子 MS-275 通过多种途径选择性杀伤人胃低分化腺癌细胞株 SGC-7901 的机制。方法 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度梯度的 MS-275 分别与 SGC-7901、人正常胃黏膜上皮细胞株 GES-1 共培养 24 h 后, 采用 WST-1 法检测 SGC-7901 及 GES-1 细胞存活率, 流式细胞仪检测分析 SGC-7901 细胞线粒体膜电位变化, Western blot、实时荧光定量聚合酶链反应(RTQ-PCR)分别检测处理后胃癌细胞中 p21、p27、p57、cyclin B1、cyclin D1 基因及相应蛋白表达情况。结果 MS-275 可使 SGC-7901 细胞存活率降低($P<0.05$), 其作用随药物浓度增大更明显, 对 GES-1 细胞无显著影响; MS-275 可降低 SGC-7901 细胞线粒体膜电位($P<0.05$); MS-275 显著提升 p21、p27、p57 基因及相应蛋白相对含量, 同时降低 cyclin B1、cyclin D1 基因及其蛋白相对含量($P<0.05$)。结论 MS-275 可选择性杀伤胃腺癌细胞 SGC-7901, 这一作用可能是通过线粒体凋亡途径及调控细胞周期相关基因和蛋白表达实现的。

【关键词】 MS-275; 胃腺癌; SGC-7901; 线粒体凋亡; 细胞周期阻滞

中图分类号: R735.2 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2015)-04-0333-05

Inhibitory effect of MS-275 on gastric glandular cancer cells and its possible mechanism WANG Dong, GONG Wei-dong, HUANG Ci, LI Zhong-hua, LIU Zhen-tang, WU Zhi-qun. Department of Interventional Radiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province 710038, China
Corresponding author: WU Zhi-qun, E-mail: zhiqunwu@aliyun.com

【Abstract】 Objective The use of targeting therapy for the treatment of gastric glandular cancer has been a hot topic in recent years. This study aims to clarify that through what ways the histone deacetylase inhibitor MS-275 completes its selectively killing effect on gastric glandular cancer cell line SGC-7901. **Methods** SGC-7901 cells and GES-1 cells were respectively cultured for 24h, with (10–100) $\mu\text{mol/L}$ concentrations of MS-275. (1) The survival rate of SGC-7901 cells, GES-1 cells and the normal cells were analyzed by WST-1; (2) The change of the mitochondrial membrane potential in SGC-7901 was estimated by flow cytometry; (3) The expression levels of p21, p27, p57, cyclinB1, cyclinD1 were determined by Western blot and PCR methods. **Results** (1) MS-275 could decrease the survival rate of SGC-7901 cells, the effect was significantly enhanced with the increasing of the concentration ($P<0.05$), but MS-275 showed no obvious effect on normal gastric mucosa epithelial cells GES-1; (2) MS-275 treatment could decreased the mitochondrial membrane potential of SGC-7901 cells ($P<0.05$); (3) MS-275 treatment could increase the relative contents of p21, p27, p57 genes and their protein and, at the same time, decrease the relative contents of CyclinB1 and CyclinD1 ($P<0.05$). **Conclusion** MS-275 treatment can selectively kill gastric glandular cancer cells SGC-7901 through several possible ways, such as inducing mitochondrial apoptosis and regulating the expression levels of cell cycle-related genes and proteins. (J Intervent Radiol, 2015, 24: 333-337)

【Key words】 MS-275; gastric glandular cancer; SGC-7901; mitochondrial apoptosis; cell-cycle arrest

胃癌是消化系统常见恶性肿瘤,在全球范围内的发病率很高^[1]。胃癌发病机制复杂,涉及多种因素、多个病理过程。研究表明,胃癌发生与核小体核心组蛋白 N 端赖氨酸残基乙酰化和去乙酰化失衡有着密切关系^[2]。组蛋白去乙酰化酶抑制因子(HDACi)通过调节组蛋白乙酰化和去乙酰化,发挥抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡的作用,并且对正常组织的不良反应较小^[3-5]。MS-275 系人工合成的苯甲酰胺类 HDACi,前期研究表明其对胃腺癌细胞具有选择性杀伤作用,但具体机制尚不十分清楚^[6-7]。本研究旨在前期研究基础上,深入探究 MS-275 对人胃低分化腺癌细胞株 SGC-7901 选择性杀伤的作用机制,为临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人胃低分化腺癌细胞株 SGC-7901 和人正常胃黏膜上皮细胞株 GES-1 由第四军医大学细胞生物中心提供,MS-275 购自德国 Merck 公司,RPMI-1640 培养基、DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶及胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司,WST-1 试剂盒及 ROS 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司,JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒购自北京泛博生物技术公司,所用 PCR 引物购自北京奥科鼎盛生物科技有限公司。

1.2 SGC-7901、GES-1 细胞培养

SGC-7901 细胞在含 10%胎牛血清、100 mg/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素的 RPMI-1640 培养基中培养,GES-1 细胞在含 10%胎牛血清、100 mg/ml 链霉素、100 U/ml 青霉素的 DMEM 高糖培养基中培养;所有细胞均在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。每 2~3 天换液 1 次,铺满培养瓶底面积 85%以上即可传代,传代时 PBS 缓冲液洗涤 3 次,0.25%胰酶消化 1 min,一般按 1:3 传代。

1.3 细胞存活率检测

分别取对数生长期 GES-1 和 SGC-7901 细胞,用胰酶消化后吹打成单细胞悬液,以 1 × 10⁵/ml 细胞浓度接种于 96 孔板(每孔 100 μl,实验组),以不含细胞的培养基为空白对照(对照组),培养过夜。待细胞充分贴壁,加入 MS-275,终浓度分别设置为 10、20、40、60、80 μmol/L,每个浓度 3 个平行孔;对照组不加 MS-275。培养 24 h 后取出,每孔加入 10 μl WST-1 检测液,37℃温箱中温育 4 h 后酶标

仪 450 nm 测定吸光值(D),空白对照孔调零后根据吸光值结果计算肿瘤细胞存活率:肿瘤细胞存活率(%)=D_{实验组}/D_{对照组}×100%。

1.4 线粒体膜电位检测

分别取 SGC-7901 细胞和 GES-1 细胞,用 20~80 μmol/L MS-275 作用 24 h,PBS 缓冲液洗涤 2 次后,按照 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒说明书操作。用流式细胞仪进行分析,JC-1 单体和聚合物荧光信号分别在 FL1 和 FL2 探测器上获得,FL1-H、FL2-H 分别代表绿色荧光强度和红色荧光强度。

1.5 Western blot 检测 p21、p27 等蛋白表达

用三去污剂从 SGC-7901 细胞中提取总蛋白,分别采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对 p21、p27、p57、cyclin B1、cyclin D1 进行分离,然后转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%牛奶室温下摇动封闭后加入一抗,4℃过夜;室温下洗膜后加入二抗,用 ECL Plus 超敏发光液显影。

1.6 实时荧光定量聚合酶链反应检测

采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,反转录获得 cDNA,然后作实时荧光定量聚合酶链反应(RTQ-PCR)检测,并分析检测结果;对待测样品目的基因进行定量,并用管家基因 GAPDH 进行校正。基因扩增引物及条件见表 1。

表 1 基因扩增引物及条件

基因名称	引物序列	碱基扩增产数	退火物长度	退火温度
p27	F 5'-GATCCTCCTCCAAGACAAAC-3'	20	93	60℃
	R 5'-GCATTCAGAGCGGGATTAT-3'	19		
p57	F 5'-CTGCACTATCTCTCCATGTTTC-3'	21	95	60℃
	R 5'-GCGATCTCACACTTGTTC-3'	19		
p21	F 5'-GTCAGTCTTGTACCCCTTG-3'	20	127	60℃
	R 5'-GCGTTTGGAGTGTTAGAAA-3'	19		
cyclin D	F 5'-GCATCTACACCCGACAACTC-3'	20	128	60℃
	R 5'-TTTGGAGAGGAAGTGTTCAT-3'	22		
cyclin B	F 5'-CTTTCGCCTGAGCCTATTT-3'	19	136	60℃
	R 5'-CTTCTGCATCCACATCATTTAC-3'	22		

1.7 统计学分析

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。数据用均数±标准差表示,多组间两两比较用单向方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MS-275 可选择性降低 SGC-7901 细胞存活率

WST-1 检测结果显示,实验组 HDACi MS-275 能够明显降低人胃低分化腺癌细胞株 SGC-7901 存活率,且这种作用具有浓度依赖性,与空白对照组

相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。然而,在相同条件下,人正常胃黏膜上皮细胞株 GES-1 存活率并未随 MS-275 浓度升高出现明显降低($P>0.05$)(图 1)。MS-275 对 SGC-7901 细胞作用 24 h 的 IC50 约为 80 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 MS-275 可降低 SGC-7901 细胞线粒体膜电位
线粒体膜电位变化用流式细胞仪和 JC-1 试剂盒进行检测。JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)的理想荧光探针。线粒体膜电位较高时, JC-1 聚集在线粒体基质中,形成聚合物,可产生红色荧光;线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒

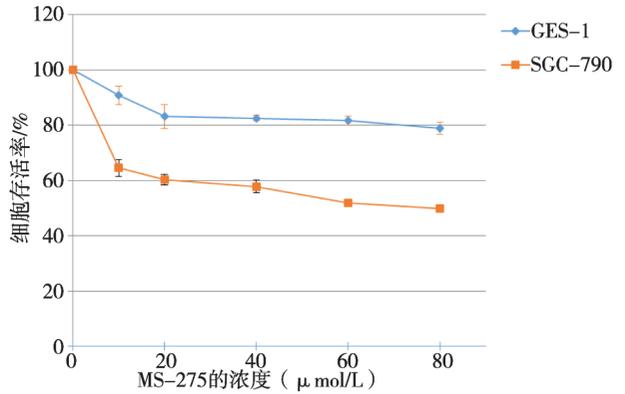
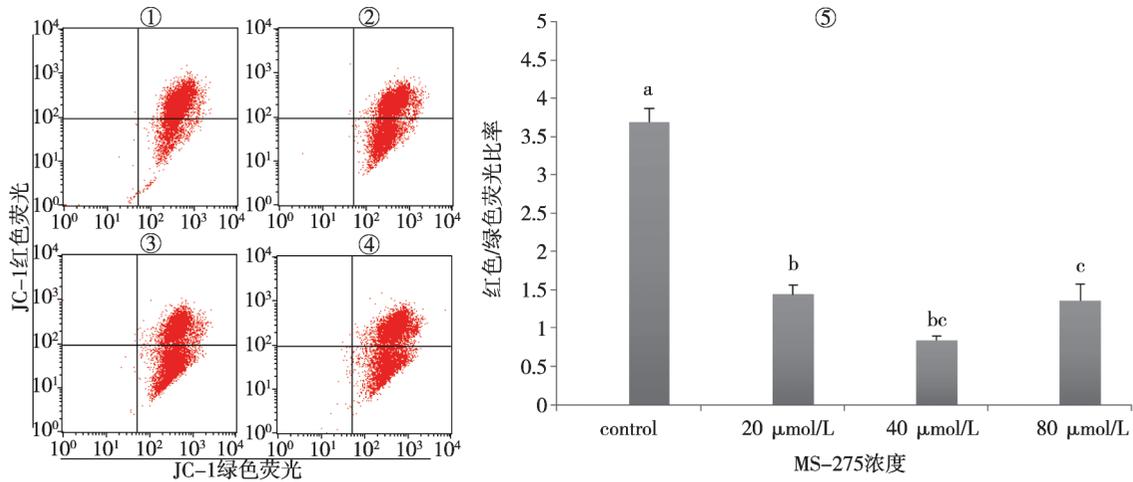


图 1 MS-275 对不同细胞生存率的影响



①对照组;②20 $\mu\text{mol/L}$ 处理组;③40 $\mu\text{mol/L}$ 处理组;④80 $\mu\text{mol/L}$ 处理组;⑤数据用均值 \pm 标准差表示, $P<0.05$

图 2 流式细胞仪分析 MS-275 对 SGC-7901 细胞体膜电位的影响

体基质中,此时 JC-1 为单体,可产生绿色荧光。由图 2 可看出,实验组红色荧光强度与绿色荧光强度比值较对照组降低,且具有浓度依赖性,说明 MS-275 降低了 SGC-7901 细胞的线粒体膜电位;但在 MS-275 浓度为 80 $\mu\text{mol/L}$ 时,线粒体膜电位出现升高。

2.3 MS-275 对 SGC-7901 细胞周期的影响

Western blot 检测显示,MS-275 能不同程度上调 SGC-7901 细胞周期 p21、p27、p57 蛋白表达,同时下调 cyclin B1、cyclin D1 蛋白表达(图 3)。

2.4 MS-275 对肿瘤相关基因 mRNA 水平的影响

随着 MS-275 作用浓度增高,p21、p27 及 p57 相对含量逐渐升高,cyclin B1、cyclin D1 相对含量逐渐降低(图 4),各数据间均有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

MS-275 作为一种人工合成的苯甲酰胺类 HDACi,可通过抑制组蛋白去乙酰化酶活性,使靶细

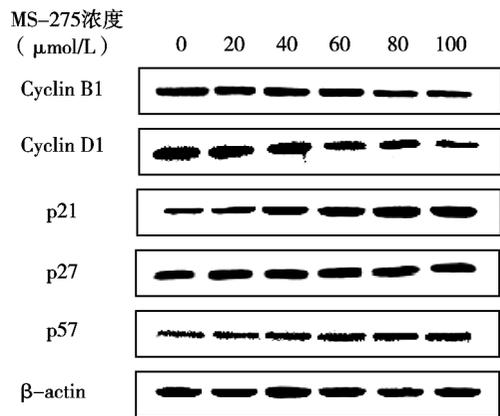


图 3 MS-275 处理 24 h 后 SGC-7901 细胞中肿瘤相关蛋白表达变化

胞内组蛋白高度乙酰化,从而使细胞核内染色质结构疏松,并通过影响多种特异性基因表达调控细胞凋亡途径,发挥肿瘤杀伤作用^[8-9]。前期大量实验证明,MS-275 的肿瘤杀伤作用具有选择性,即它可以显著抑制肿瘤细胞生长,而对正常细胞没有影

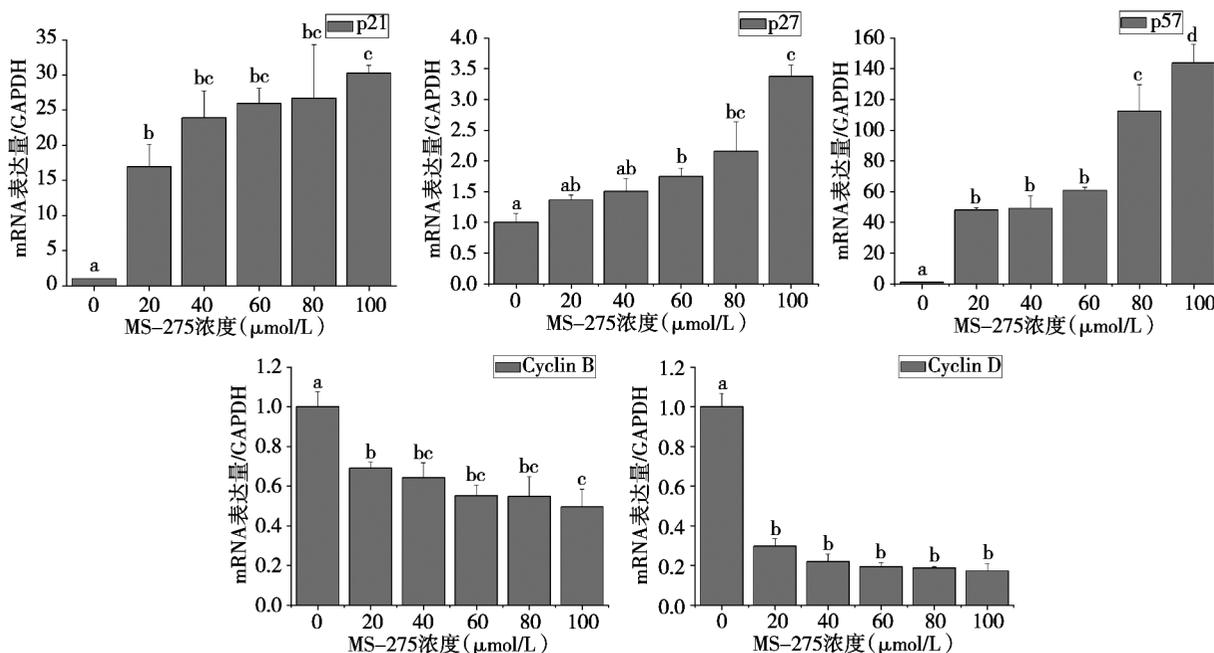


图 4 MS-275 对 SGC-7901 细胞中肿瘤相关基因表达的影响

响^[10-11]。

我们课题组前期研究证实,MS-275 可明显抑制人胃低分化腺癌细胞株 SGC-7901 增殖,并具有时间及剂量依赖性,但对人正常胃黏膜上皮细胞株 GES-1 和张氏肝细胞株却没有致凋亡作用,即 MS-275 对胃癌细胞具有选择性杀伤作用^[6];实验结果显示,MS-275 浓度在 1~8 μmol/L 范围内作用 24 h,胃癌细胞存活率虽有下降,但并不具有显著性差异;细胞存活率实验证明,将 MS-275 浓度调至 10 μmol/L 作用 24 h,胃癌细胞存活率为 64.50%,出现明显的细胞增殖抑制效应,随着药物浓度逐渐增高,细胞存活率不断下降,在 80 μmol/L 时细胞存活率降至 49.79%,说明 MS-275 对 SGC-7901 细胞的增殖抑制效应不断增强。为此,我们在本研究中将 MS-275 浓度范围提升至 10~100 μmol/L。

我们通过检测 MS-275 作用前后线粒体膜电位变化发现,MS-275 可使 SGC-7901 细胞线粒体膜电位下降,且这种作用具有浓度依赖性,提示 MS-275 经由线粒体途径诱导 SGC-7901 细胞凋亡。这与 Meng 等^[12]报道 HDACi 制滴菌素 A (trichostatin A, TSA) 对结肠直肠癌的作用, Rosato 等^[13]报道 MS-275 对白血病细胞的作用相一致。但 MS-275 在作用浓度为 80 μmol/L 时,线粒体膜电位出现了升高,这可能与高浓度 MS-275 对 SGC-7901 的直接毒性作用有关。

我们前期研究表明,MS-275 具有阻滞细胞周期的作用,可诱导 SGC-7901 细胞停滞于 G1/S 期^[6]。

本研究进一步发现,MS-275 能显著增加 SGC-7901 细胞内 p21、p27 及 p57 蛋白量,同时降低 cyclin B1、cyclin D1 蛋白量;RTQ-PCR 检测显示 MS-275 提高了 p21、p27 及 p57 基因的相对含量,同时降低了 cyclin B1、cyclin D1 的相对含量,且作用均具有浓度依赖性。p21、p27、p57、cyclin B1 及 cyclin D1 是重要的细胞周期调控蛋白,参与细胞生长、分化、衰老及死亡过程,同时与肿瘤发生密切相关。p21、p27 及 p57 同属于细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CDKI),可通过抑制 cyclin-细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)活性来调控细胞周期,并可直接结合增殖细胞核抗原(PCNA)抑制细胞 DNA 合成,导致细胞停滞在 G1 期,阻止细胞周期分裂^[14]。cyclin B1、cyclin D1 基因是重要的原癌基因,它们的蛋白产物分别在 G2/M 期和 G1 早期发挥促细胞增殖的正向调控作用^[15]。MS-275 作用后 p21、p27、p57 基因及它们的蛋白表达产物相对含量提高,提示 MS-275 通过上调 CDKI 使 SGC-7901 细胞停滞于 G1/S 期,从而发挥杀伤作用。同时,MS-275 可通过下调 cyclin B1、cyclin D1 抑制 SGC-7901 细胞增殖。这与 Zhou 等^[16]报道 HDACi 辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)及丁酸钠(SB)对成熟神经干细胞的作用,吴伟琪等^[17]报道 HDACi TSA 对胃癌细胞的作用相一致。

综上所述,MS-275 可通过线粒体凋亡途径及调控细胞周期相关基因和蛋白的表达发挥对人胃低分化腺癌细胞株 SGC-7901 的生长抑制作用及选择性杀伤作用。MS-275 对人胃低分化腺癌细胞的

作用机制复杂,尚需进行后续实验深入研究。进一步揭示 MS-275 抗胃癌机制,有利于为胃癌治疗提供新途径。

[参 考 文 献]

- [1] Thrumurthy SG, Chaudry MA, Hochhauser D, et al. The diagnosis and management of gastric cancer[J]. *BMJ*, 2013, 347: f6367.
- [2] Sun WJ, Zhou X, Zheng JH, et al. Histone acetyltransferases and deacetylases: molecular and clinical implications to gastrointestinal carcinogenesis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2012, 44: 80-91.
- [3] Bose P, Dai Y, Grant S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: Emerging insights [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 143: 323-336.
- [4] Ververis K, Hiong A, Karagiannis TC, et al. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents[J]. *Biologics*, 2013, 7: 47-60.
- [5] Batty N, Malouf GG, Issa JP. Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents[J]. *Cancer Lett*, 2009, 280: 192-200.
- [6] 刘 瑾, 任亚蝉, 吴智群. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS-275 在体外抑制胃癌细胞的实验研究[J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21: 585-588.
- [7] Zhang Y, Adachi M, Zhao X, et al. Histone deacetylase inhibitors FK228, N-(2-aminophenyl)-4-[N-(pyridin-3-yl-methoxy-carbonyl) amino-methyl] benzamide and m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide augment radiation-induced cell death in gastrointestinal adenocarcinoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2004, 110: 301-308.
- [8] Bose P, Dai Y, Grant S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 143: 323-336.
- [9] 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: 1388-1405.
- [10] Baradari V, Höpfner M, Huether A, et al. Histone deacetylase inhibitor MS-275 alone or combined with bortezomib or sorafenib exhibits strong antiproliferative action in human cholangio-carcinoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 4458-4466.
- [11] Larsson C. Epigenetic aspects on therapy development for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors [J]. *Neuroendocrinology*, 2013, 97: 19-25.
- [12] Meng J, Zhang HH, Zhou CX, et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells via p53 -dependent and -independent pathways[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28: 384-388.
- [13] Rosato RR, Almenara JA, Grant S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1 [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 3637-3645.
- [14] Bonelli P, Tuccillo FM, Borrelli A, et al. CDK/CCN and CDKI alterations for cancer prognosis and therapeutic predictivity [J]. *Biomed Res Int*, 2014: 361020.
- [15] Mani S, Wang CG, Wu KM, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors: novel anticancer agents[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000, 9: 1849-1870.
- [16] Zhou Q, Dalgard CL, Wynder C, et al. Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in neurosphere formation by adult subventricular cells[J]. *BMC Neurosci*, 2011, 12: 50.
- [17] 吴伟琪, 施 敏, 王玉刚, 等. 曲古霉素 A 对人胃癌细胞的抑制作用及其机制探讨[J]. *胃肠病学*, 2013, 18: 143-148.

(收稿日期:2014-09-04)

(本文编辑:边 倍)