

· 论 著 ·

曲古抑菌素 A 对人肝癌细胞 HepG2 中 FHIT 基因表达的影响*

王 丽, 刘晓燕, 龚 舒, 何 涛, 段承刚[△]

(泸州医学院医学分子生物学实验室, 四川 646000)

摘要:目的 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂——曲古抑菌素 A(TSA)对人肝癌细胞 HepG2 中脆性组氨酸三联体(FHIT)基因表达的影响。方法 以人肝癌细胞 HepG2(简称 HepG2)和正常肝细胞 LO₂(简称 LO₂)为实验对象,每种细胞设为对照组和不同浓度 TSA(125、250、500、1 000、2 000 nmol/L)处理组,于倒置显微镜下观察细胞形态变化,MTT 比色法测定 TSA 对两种细胞增殖抑制情况,RT-PCR 检测 FHIT 基因表达,Western blot 检测 FHIT 蛋白表达。结果 经 TSA 处理的 HepG2 细胞增殖速度明显减慢;不同浓度 TSA 对 HepG2 细胞的增殖均有抑制作用,并有明显的剂量依赖和时间依赖关系,对 LO₂ 的抑制作用不明显($P>0.05$);HepG2 中 FHIT mRNA 表达和蛋白表达均增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 FHIT 基因的异常改变可能与组蛋白异常去乙酰化有关,TSA 可通过抑制去乙酰化酶活性,上调 FHIT 基因表达而抑制肝癌细胞增殖。

关键词:脆性组氨酸三联体;曲古抑菌素 A;肝癌;人肝癌细胞 HepG2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.007

中图分类号:R735.7;R730.54

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)15-1954-03

Effect of TSA on the expression of FHIT in the human hepatoma cell line HepG2*

WANG Li, LIU Xiao-yan, GONG Shu, et al.

(Laboratory of Medical Molecular Biology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of TSA on the expression of fragile histidine triad(FHIT) in the human hepatoma cell line HepG2. **Methods** After the human hepatocarcinoma cells and the normal liver cells had been treated with various concentrations of TSA in different duration in vitro, cell morphologies were observed by the inverted light microscope, and cell viability were analyzed by MTT assay. The expression of FHIT was analyzed by RT-PCR and Western blot. **Results** TSA inhibited the proliferation of HepG2 cells in dose-dependent and time-dependent manners, but the normal liver cell line LO₂ was not sensitive to the TSA. The expression of FHIT mRNA and FHIT protein were increased after treatment of TSA ($P<0.05$). **Conclusion** The alternation of FHIT gene correlated with abnormal histone deacetylation and TSA could inhibit the proliferation of the hepatocarcinoma cell line HepG2, which were associated with inhibition of enzymatic activity of HDACS, regulation of FHIT gene transcription and FHIT protein expression.

Key words: fragile histidine triad; trichostatin A; hepatoma; hepG2

脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)基因是 1996 年发现的一种新的候选抑癌基因,在人体所有正常组织中均有表达^[1]。近年来研究证实, FHIT 基因在多种肿瘤中存在异常转录、表达缺失或表达下调。而在肝癌患者中 FHIT 基因的异常改变为频发事件,深入研究肝癌患者 FHIT 基因异常改变的原因可进一步丰富和完善肝癌的发病机制,并为寻找新的肝癌治疗途径和药物提供相关理论依据。本实验拟使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂——曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)作用于人肝癌细胞 HepG2(简称 HepG2),通过检测肝癌细胞中 FHIT 基因表达情况,研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂对肝癌细胞中 FHIT 基因表达的影响,从而探讨组蛋白去乙酰化是否在 FHIT 基因的异常表达中发挥一定作用,目前此方面的研究尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料 HepG2 与人正常肝细胞 LO₂(简称 LO₂)为本实验室保存, DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品,新生小牛血清为成都市华星生物化学制品厂生产, RNA PCR Kit(AMV) Ver3.0 试剂盒、500 bp DNA Marke、DL2000 为 TAKARA 公司产品, Trizol 试剂与 DEPC 为 Invitrogen 公司产品, TSA、MTT、DMSO 为 Sigma 公司产品, FHIT 基因兔抗人多克隆抗

体为美国 Bioworld Technology 公司产品, β -actin 兔抗人多克隆抗体为北京博奥森生物技术有限公司产品,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(H+L)为中杉金桥公司生产,彩色预染蛋白质相对分子质量标准为碧云天生物技术研究所以制定, Pro-light HRP 化学发光检测试剂为 TIANGEN 公司产品,其他所用试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 细胞培养 将 HepG2 与 LO₂ 分别接种于含 10% 小牛血清和 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,细胞呈单层贴壁生长后每 2 天换液 1 次,生长密度达 90% 时用 0.25 g/L 胰酶消化传代。

1.3 MTT 法检测细胞增殖变化 TSA 用二甲基亚砜(DMSO)配成 1 mol/L 储存液,使用时用培养液稀释成不同浓度。取培养至对数期的 HepG2 和 LO₂,经胰酶消化后制备成细胞悬液,以 1×10^5 /mL 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μ L。待细胞贴壁后将每种细胞随机分组:不同浓度 TSA 药物组(125、250、500、1000、2000 nmol/L)和对照组(加等量 DMSO),另设空白对照组(只加培养基,无细胞),每组 6 复孔,分别在培养 24、48、72 h 后每孔加入 5 g/L MTT 20 μ L,继续孵育 4 h 终止培养,小心吸弃培养上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 15 min,用酶联免疫检测仪于 490 nm 处测量各孔吸光值(A)。

* 基金项目:四川省卫生厅科研项目(060065)。 [△] 通讯作者, E-mail: dcg-25@163.com。

表 1 不同浓度 TSA 对 HepG2 增殖抑制作用

细胞	作用时间(h)	不同浓度 TSA 作用的 OD 值(nmol/L, $\bar{x} \pm s$)					
		0	125	250	500	1 000	2 000
HepG2	24	0.89±0.03	0.85±0.04	0.82±0.04*	0.76±0.06*	0.76±0.02*	0.74±0.02*
	48	0.88±0.05	0.82±0.04	0.77±0.02*	0.76±0.01*	0.72±0.02*	0.69±0.02*
	72	0.82±0.03	0.76±0.02*	0.72±0.01*	0.70±0.02*	0.67±0.02*	0.64±0.01*
LO ₂	24	0.75±0.03	0.74±0.03	0.72±0.03	0.73±0.03	0.71±0.01	0.68±0.02
	48	0.79±0.03	0.78±0.06	0.75±0.03	0.73±0.02	0.72±0.04	0.69±0.05
	72	0.81±0.02	0.80±0.02	0.79±0.04	0.79±0.02	0.75±0.04	0.73±0.05

* :与同时间对照组比较, $P < 0.05$ 。

1.4 细胞形态观察 挑选培养密度相当的对数期细胞随机分为处理组(加入终浓度为 250、1000 nmol/L TSA)和对照组(正常培养 LO₂ 或 HepG2),作用 24 h 后于倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.5 RT-PCR 法检测 HepG2 和 LO₂ 中 FHIT 基因表达 根据 GeneBank 中 FHIT 基因(NM_002012)和 GAPDH(NM_002046)序列,在 CDS 区内设计各自特异 PCR 引物,送上海生物工程有限公司合成。引物序列如下: FHIT 基因上游,5' CAA CAT CTC ATC AAG CCC TCT 3',下游,5' TCC ACC ACT GTC CCG ACT 3',产物长度为 191 bp; GAPDH 基因上游,5' ATG CTG GCG CTG AGT ACG TC 3',下游,5' GGT CAT GAG TCC TTC CAC GAT A3',产物长度为 263 bp。按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,取 500 ng 总 RNA 构成 10 μL 反应体系,以 Random 9 为引物, MMLV 逆转录合成 cDNA。再以 GAPDH 为内参,通过常规 PCR 进行 FHIT 基因的检测,每个样品 3 个重复,扩增体系为 20 μL。反应条件为:99 °C 预变性 10 min,暂停取出 EP 管于冰上加 Taq 酶 0.1 μL,94 °C、30 s,60.5 °C、30 s,72 °C、30 s,35 个循环后,72 °C 延伸 2 min,最后 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并通过凝胶成像分析系统计算 FHIT 基因和 GAPDH 条带累积光密度比值进行半定量分析。

1.6 Western blot 检测 FHIT 蛋白 按照 PRO-PREPTM 蛋白提取试剂盒说明书操作步骤提取细胞总蛋白,Bradford 法测蛋白浓度。每孔上样总量为 20 μg。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(12%分离胶、5%浓缩胶)进行分离后,转印至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温振荡封闭 1 h,与 FHIT 多克隆抗体(1:1000 稀释)室温振荡孵育 1 h,1×TBST 缓冲液洗涤 3 次(每次 10 min),加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:5000 稀释),室温振荡孵育 1 h,1×TBST 缓冲液洗涤 3 次(每次 10 min),Pro-light HRP 化学发光检测试剂进行显影,在凝胶化学发光仪器内采集发光图像。

1.7 统计学方法 运用 SPSS13.0 统计软件,组间比较采用随机分组设计的方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TSA 对 HepG2 和 LO₂ 形态的影响 HepG2 和 LO₂ 培养 24 h 后在倒置显微镜下观察,发现在加入 TSA 后两种细胞形态均发生明显改变,其中 LO₂ 由原先的不规则圆形变成长梭形,在 1000 nmol/L TSA 组则出现部分细胞伪足增多,形态类似 HepG2 细胞样改变,悬浮细胞随着 TSA 浓度增大,量从较少到逐渐增多并出现细胞碎片;HepG2 由上皮细胞样形态变为三角形或多边形,细胞体积增大,趋于铺展状态,细胞数量

明显减少,悬浮细胞较多,并随 TSA 浓度增大培养液内悬浮细胞和细胞碎片明显增多,见图 1。

2.2 TSA 对 HepG2 增殖的影响 与对照组比较,不同浓度 TSA 均能抑制 HepG2 的增殖,并随作用浓度增加和作用时间延长而抑制性增强,具有剂量、时间依赖性,在同一浓度下,TSA 对 HepG2 的抑制作用远远高于对 LO₂ 的抑制作用;对 HepG2,在培养 24、48 h 时,TSA 浓度均为 250 nmol/L 以上时与同时间对照组 OD 值比较,差异有统计学意义,在培养 72 h、TSA 浓度为 125 nmol/L 以上时与同时间对照组 OD 值比较,差异也有统计学意义;对 LO₂,同一时间不同浓度各组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

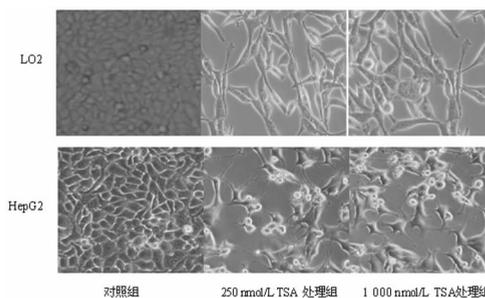
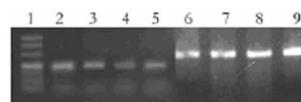
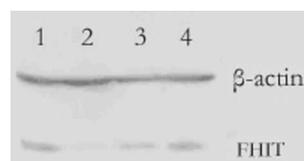


图 1 各组 HepG2、LO₂ 细胞形态比较(×200)



1:500 bp DNA Marker; 2:LO₂ 对照组 FHIT 基因; 3:LO₂ 处理组 FHIT 基因; 4:HepG2 对照组 FHIT 基因; 5:HepG2 处理组 FHIT 基因; 6:LO₂ 对照组 GAPDH 基因; 7:LO₂ 处理组 GAPDH 基因; 8:HepG2 对照组 GAPDH 基因; 9:HepG2 处理组 GAPDH 基因。

图 2 各组 FHIT 基因表达含量比较



1:HepG2 处理组; 2:HepG2 对照组; 3:LO₂ 处理组; 4:LO₂ 对照组。

图 3 Western blot 检测各组 FHIT 蛋白表达结果

2.3 TSA 处理 HepG2 后 FHIT 基因表达变化 用 250 nmol/L TSA 处理 HepG2 和 LO₂ 24 h 后,检测细胞中 FHIT mRNA 的表达,FHIT 基因在未用药物处理的 HepG2 和 LO₂ 中均有表达,其中 LO₂ 表达量明显高于 HepG2,经 TSA 作用后,HepG2 中 FHIT mRNA 表达量增高($P < 0.05$),LO₂ 中则

表现为降低,但差异无统计学意义,见图 2。

2.4 TSA 处理 HepG2 后 FHIT 蛋白表达变化 经 TSA 处理后, HepG2 中 FHIT 蛋白表达上调,经 TSA 处理后 LO₂ 中 FHIT 蛋白表达下调,与 FHIT mRNA 结果类似,见图 3。

3 讨 论

肝癌是我国消化系统肿瘤中常见的一类恶性肿瘤,因确诊时患者多已发展至中晚期而失去有效手术切除机会,采用放、化疗治疗效果差,故寻找有效治疗方法是当前研究工作的重点^[2]。在以往研究肝癌发生分子机制过程中发现,大多数肝癌存在 FHIT 基因的异常改变,包括 FHIT 基因缺失、融合、mRNA 转录下调、FHIT 蛋白表达减少或缺失等^[3-5]。目前对肝癌中 FHIT 基因异常改变的研究主要集中在以下方面,即基因缺失及其缺失所带来的影响、FHIT 蛋白表达下调与癌症预后的关系、外源性 FHIT 基因导入肝癌细胞中产生的影响等。而对肝癌中 FHIT 基因表达下调的机制研究却相对较少,仅在近几年才提出 FHIT 基因的异常甲基化是其转录失活的重要机制^[6]。用去甲基化试剂——5-氮脱氧胞苷可以使甲基化 FHIT 基因逆转,使失活 FHIT 基因 mRNA 及蛋白重新表达^[7-8],此发现为肝癌的治疗提供了一种新的思路。基因异常甲基化和组蛋白异常去乙酰化是导致基因异常失活或表达下调的两个重要因素。有研究表明,组蛋白乙酰化与去乙酰化异常与多种肿瘤的发生有关,运用去乙酰化酶抑制剂可以抑制肝癌、肺癌、宫颈癌、前列腺癌、乳腺癌、头颈部癌等一系列恶性肿瘤细胞的生长^[9-10],但其作用机制尚不明确。由此考虑 FHIT 基因的失活和表达下调是否有组蛋白异常去乙酰化的因素参与? 去乙酰化酶抑制剂对肝癌细胞的生长抑制作用是否与恢复 FHIT 基因的活性使其表达上调有关? 因此作者运用组蛋白去乙酰化酶的强效抑制剂——TSA 对 HepG2 进行了研究,并以 LO₂ 作对照,通过细胞形态学、MTT 法观察 TSA 对 HepG2 的作用,并通过 RT-PCR 和 Western blot 检测 FHIT mRNA 和蛋白表达情况,从而探讨 TSA 作用于 HepG2 过程中可能存在的分子机制。

本研究结果显示,TSA 可以明显抑制 HepG2 生长,呈时间、剂量依赖性,而对 LO₂ 无明显影响,与相关报道一致^[11-12]。TSA 浓度在大于 1 000 nmol/L 以上时,对 HepG2 生长抑制率变化不大,而 LO₂ 却出现诸如形态类似 HepG2 细胞样改变、悬浮细胞和细胞碎片增多等现象,说明较大浓度 TSA 可以对正常肝细胞产生一定细胞毒性,因此,在保证疗效的前提下应尽量降低 TSA 浓度,以避免高浓度 TSA 给机体带来各种毒副作用。作者根据 MTT 检测结果结合细胞形态学观察,最终选择 250 nmol/L 作用 24 h 作为 TSA 作用于 HepG2 和 LO₂ 的最适条件。FHIT mRNA 和蛋白检测结果显示,FHIT 基因在正常肝细胞中有较高水平表达,TSA 作用后可导致其含量降低,但差异不大,而在肝癌细胞中表达较弱,TSA 作用后可明显增强其 mRNA 和蛋白水平的表达,提示 FHIT 基因的异常改变可能与组蛋白异常去乙酰化有关。TSA 对肝癌细胞的促凋亡、抑制增殖作用可能通过抑制乙酰化酶的活性,导致组蛋白乙酰化程度升高,升高的乙酰化组蛋白可以调节 FHIT 基因转录,使 FHIT mRNA 及蛋白表达提高,进而引起肿瘤细胞一系列形态和功能变化,在此过程中是否还有其他关键分子起作用尚有待进一步深入研究。

随着对 FHIT 基因的生理功能及其与肿瘤生物学行为关

系的深入研究,FHIT 基因有望成为基因治疗的新靶点,为恶性肿瘤的治疗提供新途径。本研究结果为揭示 FHIT 基因异常表达的机制、探讨乙酰化酶类抑制剂用于肿瘤治疗的可行性及作用机制提供了一定实验和理论依据,同时在指导临床合理用药方面也具有重要意义。

参考文献:

- [1] Ohta M, Inoue H, Cotticelli WC, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14. 2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers[J]. *Cell*, 1996, 84(4): 587.
- [2] 陈川, 杨志祥. 原发性肝癌分子靶向治疗的进展[J]. *重庆医学*, 2007, 36(19): 1981.
- [3] Tsujiuchi T, Sasaki Y, Oka Y, et al. Alterations of the fragile histidine triad gene in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20(1): 87.
- [4] Yuan Bz, Keck-Waggoner C, Zimonjic DB, et al. Alterations of the FHIT gene in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4): 1049.
- [5] Nan KJ, Ruan ZP, Jing Z, et al. Expression of fragile histidine triad in primary hepatocellular carcinoma and its relation with proliferation and apoptosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(2): 228.
- [6] Yang Q, Nakamura M, Nakamura Y, et al. Two-hit inactivation of FHIT by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(9): 2890.
- [7] Zochbauer M, Fong KM, Maitra A, et al. 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(9): 3581.
- [8] Dhillon VS, Shahid M, Husain SA. CpG methylation of the FHIT, FANCF, cyclin-D2, BRCA2 and RUNX3 genes in Granulosa cell tumors (GCTs) of ovarian origin[J]. *Mol Cancer*, 2004, 3(1): 33.
- [9] Alao JP, Lam EW, Ali S, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation of cyclin D1 in human breast carcinoma cell lines[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(23): 8094.
- [10] Roz L, Gramegna M, Ishii H, et al. Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(6): 3615.
- [11] 谢静, 王锋, 梅浙川, 等. TSA 对不同肝癌细胞株增殖和凋亡的作用及其对 HBV 复制的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(9): 1025.
- [12] 何松, 左国庆, 张燕, 等. 苦参碱对肝癌细胞 HepG2 端粒酶活性调控的体外研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(3): 291.

(收稿日期: 2009-10-26 修回日期: 2009-12-22)