

# 曲古菌素 A 诱导髓系白血病细胞株 U937 细胞凋亡的分子途径

宋世震, 田凡清, 徐晓艳

(武汉科技大学医学院, 湖北 武汉 430080)

**摘要:** 目的 研究曲古菌素 A(TSA)诱导髓系白血病细胞株 U937 细胞凋亡的分子途径。方法 不同浓度(50, 100, 200, 300, 400 nmol/L)的 TSA 在不同时间范围(12, 24, 36, 48 和 60 h)作用于 U937 细胞。用流式细胞仪检测细胞的凋亡率和 Fas 抗原(CD95)的表达。用 Western blot 法检测凋亡蛋白 caspase 6, caspase 8 和 caspase 9 的蛋白表达。结果 TSA 诱导髓系白血病细胞株 U937 细胞的凋亡, 并呈时间、剂量依赖性。在 IC<sub>50</sub>浓度(300 nmol/L)作用 24 h 凋亡细胞超过 50%; 100~300 nmol/L TSA 作用 24 h, U937 细胞 Fas 抗原表达也明显升高( $P < 0.01$ )。TSA 作用凋亡蛋白 caspase 6, caspase 8 和 caspase 9 24 h 后, 蛋白表达明显增高( $P < 0.05$ )。结论 TSA 诱导白血病细胞系 U937 凋亡涉及死亡受体参与的外源性途径和线粒体参与的内源性途径。

**关键词:** 曲古菌素 A (TSA); 凋亡; 髓系白血病; 细胞株; U937 细胞

中图分类号: R730.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)01-0008-04

## A study on molecular pathway of apoptosis of U937 cells in myelocytic leukemia cell lines induced by trichostatin A

SONG Shi-zhen, TIAN Fan-qing, XU Xiao-yan

(Medical School of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430080, China)

**Abstract Objective** To investigate the molecular pathway of apoptosis of U937 cells in myelocytic leukemia cell lines induced by trichostatin A (TSA). **Method** Cultured U937 cells were treated with TSA at different concentration of (50, 100, 200, 300 and 400) nmol/L and 300 nmol/L for varied times (12, 24, 36, 48 and 60 h). Flow cytometer was used to determine the rate of apoptosis of cells and the expression of Fas antigen (CD95) and Western blot was performed to determine the expression of caspase 6, caspase 8 and caspase 9. **Result** The apoptosis induced by the effect of TSA on U937 cells showed a time and dose dependent manner, with more than 50% of apoptosis at IC<sub>50</sub> of TSA for 24 h. The expression of Fas elevated significantly with 300 nmol/L TSA for 24 h ( $P < 0.01$ ). The expression of proteins increased significantly treated with 300 nmol/L of TSA for 24 h on apoptosis proteins caspase 6, caspase 8 and caspase 9 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Both TSA and endogenous mitochondria were involved in molecular pathway of apoptosis of U937 cells in myelocytic leukemia cell lines.

**Key words:** Trichostatin A; Apoptosis; Myelocytic leukemia; Cell lines; U937 cell

曲古菌素 A (trichostatin A, TSA) 来源于链霉素的代谢产物, 是组蛋白去乙酰化的抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, DAIS) 药物之一。近年来研究结果表明, TSA 对各种实体瘤和白血病细胞均有明显的抗癌作用, 能抑制癌细胞的增殖, 调控细胞周期进程, 诱导癌细胞凋亡。国外有学者报道, 在胃癌和口腔癌细胞系的研究中发现, TSA 可通过上调 P<sub>21</sub><sup>WAF1/CIP1</sup>, Cyclin E, Cyclin A, 下调 E2F-4 和高磷酸化 RB 蛋白来实现肿瘤细胞增殖抑制<sup>[1]</sup>。在乳腺癌动物模型中, TSA 可明显抑制移植肿瘤细胞的生长, 而对小鼠无明显毒作用<sup>[2]</sup>。Clara Nervi 等发现 TSA 在调节转录的剂量水平对孕鼠无毒性, 也不干扰胎鼠发育, 无致畸作用<sup>[3]</sup>。TSA 能够从

分子水平和蛋白表达水平影响细胞周期进程和诱导细胞凋亡, 但诱导细胞凋亡的启动环节和凋亡途径尚不清楚。本文研究 TSA 诱导细胞凋亡的分子途径, 探讨死亡受体、半胱氨酸蛋白激酶 (caspase) 在 TSA 诱导髓系白血病细胞系 U937 细胞凋亡中的机制, 为 TSA 的临床应用提供理论根据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂与材料

曲古菌素 A (Sigma USA), 纯度 > 99%, 溶解于二甲基亚砜 (DMSO), 分装备用; 溴化二甲噻唑二苯四氮唑 (MIT, Sigma, USA); 培养基 RPMI-1640 (Gibco, USA); 胎牛血清 (北京中山公司), CD95 单克隆抗体和 caspase 6, caspase 8, caspase 9 单克隆抗体购自 SANTA CRUZ 公司, 兔抗鼠二抗及 Annexin-V-FITC 试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒购自晶美生物制品公司。TC3123 型二氧化碳培养箱 (Sheldon, USA); 酶标仪 (NOVAPIH-MIPEADER 型, 荷兰 BIO-RAD)。

#### 1.2 细胞培养

收稿日期: 2004-11-15; 修回日期: 2004-12-30

基金项目: 湖北省卫生厅医药卫生科研计划 (K09002), 武汉科技大学优秀青年教师专项基金项目 (2001-12)

作者简介: 宋世震 (1964-), 男, 医学博士, 硕士生导师, 副教授, 研究方向: 分子毒理学。

白血病细胞系 U937 细胞株购自武汉大学细胞典藏中心。在含有 10% 的胎牛血清、青霉素 100 U/ml 及链霉素 100 mg/ml 的 RPMI-1640 培养基中 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。每 48 h 换液传代一次。取生长良好, 活性大于 98% 的细胞进行实验。根据溴化二甲噻唑二苯四氮唑 (MTT) 法测得的 TSA 对 U937 细胞的 IC<sub>50</sub> (300 nmol/L) 值, 用 IC<sub>50</sub> 浓度的 TSA 作用 24 h, 收集细胞进行实验。

### 1.3 细胞体外生长活性检测

采用 MTT 比色法检测不同浓度 TSA (50~400 nmol/L) 和不同时间 (12、24、36、48 和 60 h) 对 U937 作用后细胞的吸光度 (A) 值。细胞计数并调整细胞密度为 5×10<sup>5</sup> 个/ml, 同时以未加 TSA 的为对照组。置 96 孔板, 每孔 200 μl, 设 3 个平行孔, 每孔加 MTT 20 μl, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中放置 4~6 h, 1 000 r/min 离心 5 min 去上清, 每孔加二甲基亚砷 (DMSO) 50 μl, 充分溶解。选择 490 nm 波长, 酶联免疫检测仪上测定各孔 A 值。肿瘤细胞的生长抑制率 = (1 - 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) × 100%。

### 1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

用 Annexin-V-FITC 及 PI 双标流式细胞仪检测细胞凋亡, 分为实验组和对照组。取指数生长期细胞用含 10% 的小牛血清的 RPMI1640 培养液将细胞配成 5×10<sup>6</sup>/ml, 取 24 孔板, 每孔加入稀释好的细胞悬液 5 μl, 分别加入终浓度为 100 nmol/L、200 nmol/L、300 nmol/L 的 TSA 95 μl, 37 °C 作用 24 h, 用 70% 乙醇 4 °C 固定 24 h, PBS 缓冲液洗去固定液, 离心去上清。用缓冲液 37 °C 孵育 60 min, 195 μl 细胞悬液加 5 μl Annexin-V-FITC, 混匀, 室温温浴 (26 °C) 10 min。用缓冲液洗涤细胞 1 次, 在 190 μl 缓冲液重悬, 然后再加 10 μl 20 μg 碘化丙啶。上流式细胞仪检测。Annexin-V-FITC 和 PI 双阴性为活细胞, Annexin-V-FITC 阳性而 PI 阴性为早期凋亡细胞, Annexin-V-FITC 和 PI 双阳性为晚期凋亡细胞, Annexin-V-FITC 阴性而 PI 阳性为坏死细胞。

### 1.5 TSA 对 U937 细胞 Fas 蛋白表达的作用

细胞收集和调整浓度的方法同上, 取 100 μl 细胞悬液加入 5 μl 荧光标记的 Fas 单抗, 室温孵育 30 min, 直接上流式细胞仪检测细胞表面 Fas 蛋白表达情况。

### 1.6 caspase 6、caspase 8、caspase 9 蛋白提取和 Western blot 分析

1.6.1 caspase 6、caspase 8、caspase 9 细胞核蛋白提取参照文献 [4] 进行。分别取姜黄素作用后的细胞, 1 000 r/min, 离心 5 min; 弃上清加入冷却的 PBS, 悬起

细胞, 1 000 r/min, 离心 5 min; 重复洗涤一次。尽量吸净管内的 PBS, 加入细胞裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP-40, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L PMSF, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml chymostatin), 轻悬细胞, 放置冰上 30 min。然后在低温下, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清用 BCA 法进行蛋白定量, 等量分装后 -80 °C 冻存。

1.6.2 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。按每条泳道加核蛋白 60 μg 进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 经电转印转移到硝酸纤维滤膜上。丽春红染色, 观察蛋白是否转到膜上, 用 5% 的脱脂奶粉 37 °C 摇床震荡 1 h, 加入一抗 caspase 6、caspase 8、caspase 9 单克隆抗体 (美国 Santa cruz 公司) 及 β-actin 抗体。稀释度为 1:2 000, 4 °C 封闭过夜; 用 TBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 再用二抗 (1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG) 封闭震荡 2 h, 洗去未结合的二抗, 然后经化学发光法, X 线曝光显影。用蛋白图像分析仪测定各条带的吸光度 (A) 值作定量分析。

### 1.7 统计学方法

采用方差分析和 *t* 检验, SPSS11.5 统计软件进行。

## 2 结果

### 2.1 TSA 对 U937 细胞的抑制作用

对照组 U937 细胞体外生长活跃, 经 50、100、200、300、400 nmol/L 的 TSA 处理 12~60 h 后, U937 细胞生长均不同程度的减慢, 并呈时间、浓度依赖性。与对照组相比, 各浓度 U937 作用 60 h 后 U937 细胞抑制率为 52.83%~88.46%, 不同浓度 TSA 与不同时间组之间差异均有显著性 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 TSA 诱导 U937 细胞凋亡的动态变化

U937 细胞经 100~300 nmol/L TSA 分别作用 24 h 后, 凋亡率分别是 14.38%、21.60% 和 61.18%, 与对照组相比  $P < 0.05$ 。见图 1。

2.3 TSA 作用 24 h 后, Fas 抗原表达水平明显升高, 作用前后 Fas 抗原表达水平有明显差异 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.4 Western blot 分析结果表明, TSA IC<sub>50</sub> (300 nmol/L) 作用 24 h, caspase 6、caspase 8、caspase 9 蛋白表达, 在药物作用后明显升高, 与对照组相比, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 但在加药组之间差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 2。

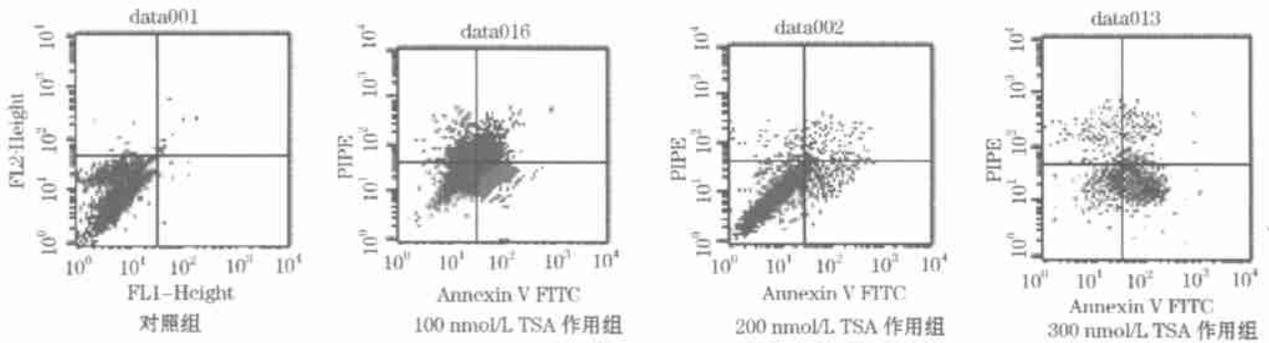


图 1 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况

表 1 不同浓度 TSA 作用 24 h Fas 抗原表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ ) %

组 别	caspase 6	caspase 8	caspase 9
对照组	1.14 ± 0.13	1.32 ± 0.18	1.25 ± 0.20
100 nmol/L (A 组)	11.86 ± 0.10 *	16.12 ± 0.17 *	19.91 ± 0.16 *
200 nmol/L (B 组)	32.77 ± 0.19 *	40.23 ± 0.12 *	37.52 ± 0.22 *
300 nmol/L (C 组)	54.31 ± 0.16 * ◆	60.17 ± 0.11 * ◆	59.98 ± 0.15 * ◆

各组与对照组比较 \*  $P < 0.01$ ; B、C 组与 A 组比较  $P < 0.01$ ; C 组与 B 组比较 ◆  $P < 0.01$



图 2 IC<sub>50</sub>条件下作用 24 h U937 细胞的 3 种蛋白表达

### 3 讨论

曲古菌素 A 具有抗肿瘤作用, 可诱导很多培养的转化细胞的生长停滞、分化或细胞凋亡, 包括神经细胞瘤、黑色素瘤、白血病细胞以及来自乳腺、前列腺、肺、卵巢和结肠的癌细胞<sup>[1]</sup>。TSA 不仅导致组蛋白的乙酰化, 而且可使转录因子 (如 p53、GATA-1) 等乙酰化。体外研究表明, TSA 抑制癌细胞增殖和诱导凋亡的作用靶点可以从 DNA、mRNA 到蛋白质水平<sup>[3]</sup>。有报道, 在人类神经胶质瘤细胞系中, TSA 可通过上调 P21<sup>WAF1/CIP1</sup> 表达抑制 G<sub>1</sub>-S 期转换<sup>[4]</sup>。也可在肾癌细胞 ACHN 系中上调 P27 蛋白水平, 下调 CDK4、CDK6、CyclinD1 和 CyclinA 蛋白水平, 并显著增加 P27 和 CDK2、CDK4 的结合, 使 CDK2、CDK4、CDK6 相关激酶活性下降并上调低磷酸化的 RB 蛋白使细胞停滞于 G<sub>1</sub> 期<sup>[7]</sup>。细胞凋亡的信息通路包括线粒体参加的内源性路径和死亡受体介导的外源性路径, 最终汇集到 caspase 激活的共同路径。参与细胞凋亡的 caspase 分为两大类<sup>[8]</sup>, 一类为启动酶, 可以在死亡受体水平、线粒体水平或内质网水平启动 caspase 的级联反应, 在死亡信号传导的上游发挥作用, 包括

caspase 8、caspase 9、caspase 2、caspase 10 等, 另一类为效应酶, 在死亡信号传导的下游起作用, 包括 caspase 3、caspase 6、caspase 7 等, 是细胞凋亡的执行人。

本研究结果证明, TSA 能抑制 U937 增殖并诱导细胞凋亡, 300 nmol/L TSA 作用 24 h, 凋亡率分别为 14.38%、21.60% 和 61.18%, 与对照组相比差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ), 并呈浓度依赖性。在 TSA 处理后, 死亡受体 Fas 的表达水平明显升高。Western blot 分析结果表明, 300 nmol/L TSA 处理 24 h, caspase 8、caspase 9、caspase 6 的蛋白水平明显升高, 说明 TSA 可能诱导了髓系白血病细胞株 U937 细胞死亡受体 Fas 的表达增强, 引起胞内段 FADD (Fas-associated death domain) 聚集结构的改变, 连接 caspase 8 的 DED 区域。激活 caspase 8 启动 caspase 的级联反应。caspase 8 是死亡受体途径最重要的起始因子之一, 该酶启动后, 既可以直接激活效应 caspase 级联反应, 诱导 caspase 3、caspase 6 活化<sup>[9]</sup>, 也可能作用于 Bid (Bcl-2 家族促凋亡成员)。剪切后的 Bid 转位至线粒体内, 诱导线粒体膜电位的丧失和细胞色素 C 的释放, 后者与 Apaf-1 (apoptosis associated factor-1) 和 caspase 9 形成凋亡小体, 启动线粒体下游 caspase 效应的激活, 最终诱导细胞凋亡。Western blot 分析结果显示效应酶 caspase 6 水平明显升高, 有力地说明了这一点。

总之, 本实验首次证明了 TSA 诱导的 U937 细胞凋亡中, 半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 细胞凋亡的内外信号途径均参与了 TSA 诱导的细胞凋亡, 而 TSA 对早期 U937 细胞的增殖和凋亡无影响, 随着时间的延长 TSA 则抑制 U937 细胞的增殖并促进其凋亡, 且呈一定的剂量依赖性、时间相关性和选择性。

### 参考文献:

[1] Suzuki T, Yokozaki H, Kuniyasu H, et al. Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines [J]. Int J Cancer, 2000, 88: 992-997.

(下转至第 13 页)

我们对广东珠海地区接触性皮炎患者的斑贴试验分析表明, 硫酸镍是最常见的接触变应原, 其斑贴试验阳性率达 35.5%, 明显高于北京<sup>[2,12]</sup>、南京<sup>[9]</sup>、沈阳<sup>[13]</sup>等地区 (14.0%~23.2%)。本组中约半数镍敏感患者在珠海生活 1 年后出现皮炎症状, 而既往接触同样含镍物品后并未出现过皮肤损害, 更证明了镍皮炎易在湿热环境中因长期接触含镍物品, 且在体液或汗液作用下金属离子被激活而导致缓慢发病。本组镍皮炎患者大多因日常接触电镀物品而发病, 少数与职业环境有关。目前镍过敏与手湿疹相关性的研究尚有争议。李林峰报告<sup>[14]</sup>手湿疹斑贴试验总阳性率为 46.7%, 其中对镍过敏者占 9.6%, 故对所有慢性手部湿疹进行斑贴试验寻找可能的发病原因是值得提倡的。除了传统的皮肤耳穿刺外, 目前流行的大多数金属制品如珠宝首饰以及含镍化合物的日常生活用品是镍暴露的主要危险因素<sup>[7]</sup>, 手湿疹或汗疱疹患者对硫酸镍呈阳性反应者也与体内合金牙齿及含镍物质有关, 故提醒人们长期接触金属类物品时应注意对其安全性的防护, 必要时先行斑贴试验排除金属过敏的可能。

金属镍引起皮肤的改变是过敏还是毒性刺激反应至今尚有争议。以往对接触性皮炎的组织学资料多数是通过大鼠或小鼠实验而获得, 而在病理条件下取材会受到一定限制, 因而国内尚缺乏系统的镍过敏或毒性的皮肤病理学资料。本研究对 13 例镍皮炎患者不同时相硫酸镍阳性反应的组织病理观察结果表明, 镍皮炎病理学符合变应性接触性皮炎的特征。斑贴试验 24 h 时主要以表皮海绵变性为主, 48~72 h 表皮和真皮炎症达高峰, 变性表皮处细胞外渗, CD45RO<sup>+</sup>T 细胞和 CD68<sup>+</sup>巨噬细胞分布于炎症表皮及真皮血管周围, 并可见散在少数嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞。96 h~5 d 表皮棘层细胞增厚, CD68<sup>+</sup>巨噬细胞逐渐减少。由此可见, 多种细胞成分参

与硫酸镍诱导的皮肤致敏过程, 表皮角质形成细胞和巨噬细胞很可能在其中具有重要的免疫作用。进一步了解镍过敏的发病机制, 对预防和治疗变应性接触性皮炎均有重要的经济和社会意义。

#### 参考文献:

- [1] 陆东庆, 王雅坤, 陈洪铎, 等. 镍、钴、铬、汞变应性超敏反应 (附 180 例斑贴试验结果分析) [J]. 中国皮肤性病学杂志, 1997, 11 (2): 83.
- [2] 刘玲玲, 高嵩, 朱学骏. 906 例皮炎湿疹类皮肤病斑贴试验结果分析及抗原阳性率变化 [J]. 中华皮肤科杂志, 1999, 32 (4): 256.
- [3] 叶筱燕. 海南地区 113 例皮炎湿疹斑贴试验结果分析 [J]. 中国热带医学, 2002, 2: 173.
- [4] 刚葆琪, 庄志雄. 我国镍毒理学研究进展 [J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14 (3): 129-134.
- [5] 李林峰. 接触性皮炎与皮肤变态反应 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2003. 155.
- [6] 范卫新, 赵辨. 关于接触性皮炎斑贴试验标准抗原的研究 [J]. 中华皮肤科杂志, 1991, 24: 150-153.
- [7] Flint GN. A metallurgical approach to metal contact dermatitis [J]. Contact Dermatitis, 1998, 39 (5): 213-221.
- [8] 赵敏, 王春炜, 王璞山. 镍皮炎 53 例分析 [J]. 宁夏医学杂志, 1999, 21 (3): 182.
- [9] 王予平, 张守民, 李彦, 等. 皮带扣致脐周接触性皮炎 46 例 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2000, 14 (6): 389.
- [10] Christensen OB. Prognosis in nickel allergy and hand eczema [J]. Contact Dermatitis, 1982, 8 (1): 7-15.
- [11] Anderassi M, Di Giacchino M, Sabbioni E, et al. Serum and urine nickel in nickel-sensitized women: effects of oral challenge with the metal [J]. Contact Dermatitis, 1998, 38 (1): 5-8.
- [12] Zhang XM, Nikkasson B, Li SY. Patch test in cases of eczema and dermatitis in Beijing, China [J]. Contact Dermatitis, 1991, 25 (4): 224-229.
- [13] 陆东庆, 王雅坤, 陈洪铎, 等. 沈阳地区 150 例接触性皮炎及湿疹患者斑贴试验分析 [J]. 临床皮肤科杂志, 1996, 4: 207-208.
- [14] Li IF, Wang J. Contact hypersensitivity in hand dermatitis [J]. Contact Dermatitis, 2002, 47 (4): 206-209.

(上接第 10 页)

- [2] David M, Vigushin, Simak Ali, et al. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent Antitumor activity against breast cancer in vivo [J]. Clinical Cancer Research, 2001, 7: 971-976.
- [3] Clara Nervi, Ugo Borello, Francesco Fazi, et al. Inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A modulates gene expression during mouse embryogenesis without apparent toxicity [J]. Cancer Research, 2001, 61: 1247-1249.
- [4] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 1-4.
- [5] Lin J K, Jin-shiau S Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by trichostatin

A [J]. Proc Natl Sci Counc POC (B), 2001, 25 (2): 59-66.

- [6] Sawa H, Murakami H, Ohshima Y, et al. Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the Bcl-2-related protein bad [J]. Brain Tumor Pathol, 2001, 18: 109-114.
- [7] Park WH, Jung CW, Park JO, et al. Trichostatin inhibits the growth of ACHN renal cell carcinoma cells via cell cycle arrest in association with P27 or apoptosis [J]. Int J Oncol, 2003, 22: 1129-1134.
- [8] MacLachlan T K, Eideiry W S. Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase 6 [J]. PANS, 2002, 99 (14): 9492-9497.
- [9] Cowling V, Downward J. caspase 6 is the direct activator of caspase 8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase 6 prodomain [J]. Cell Death Differ, 2002, 9 (10): 1046-1050.