

曲古菌素 A 对 K562 细胞周期蛋白的影响

田凡清

(武汉科技大学医学院, 湖北 武汉 430080)

摘要: 目的 探讨曲古菌素 A (Trichostatin A, TSA) 对 K562 细胞增殖和细胞周期的影响。方法 50~400 nmol/L 的 TSA 分别处理 K562 细胞 12~60 h 后, MTT 法检测 K562 细胞的生长活性; 流式细胞仪 (FCM) 检测细胞凋亡; 免疫组化检测 24 h 不同浓度 (100~300 nmol/L) 细胞周期素 (cyclin E)、Rb (retinoblastoma, Rb) 基因在 K562 细胞中的表达。结果 TSA 可呈时间及剂量依赖性抑制 K562 细胞的增殖, 抑制率为 37.83%~78.57% ($P<0.01$)。流式细胞仪检测 K562 细胞, 凋亡率为 14.38%~61.18%。免疫组化结果显示 cyclin E 的吸光度值分别为 0.2154 ± 0.2015 、 0.1501 ± 0.1978 、 0.1183 ± 0.0521 与对照组 0.3274 ± 0.1093 比较, 差异有显著性 ($P<0.05$); Rb 蛋白的吸光度值分别为 0.3017 ± 0.1356 、 0.2134 ± 0.1283 、 0.1527 ± 0.0216 与对照组 0.4186 ± 0.1870 比较, 差异也有显著性 ($P<0.05$); 随着 TSA 浓度增高而表达下调, 呈剂量依赖性下调。结论 TSA 能干扰细胞周期进程, 其作用机制诱导 K562 细胞的凋亡, 下调 cyclin E 的表达, 从而抑制其相应基因 Rb 的表达, 调控 G₁/S 期检测点有关。

关键词: TSA; 周期调控蛋白; cyclin E; Rb 基因

中图分类号: R979.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)04-0205-03

A study of effect of trichostatin A on the expression of cell cycle related protein in K562 cell line

TIAN Fan-qing

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

Abstract Objective To explore the effect of Trichostatin A (TSA) on cell proliferation and cell cycle in K562 cell lines. **Method** K562 cells were treated with (50—400) nmol/L Trichostatin A for 12—60 h and the growth inhibition rate of K562 cells was measured by MTT and cell apoptosis was inspected by flow cytometry (FCM). The expressions of cyclin E and retinoblastoma protein (Rb) in K562 cells was observed by immunohistochemistry at varied concentrations of TSA (100—300 nmol/L) for 24 hours. **Result** Proliferation of K562 cells was selectively inhibited by TSA in a dose- and time-dependent manner, with inhibitory rates of 37.83%—78.57% ($P<0.01$) and K562 cell apoptosis rates were 14.38%—61.18% by FCM. Optical absorbance by immunochemistry for cyclin E was 0.2154 ± 0.2015 , 0.1501 ± 0.1978 and 0.1183 ± 0.0521 and that for Rb was 0.3017 ± 0.1356 , 0.2134 ± 0.1283 and 0.1527 ± 0.0216 at varied concentrations of TSA (100—300 nmol/L), respectively, as compared to that of 0.3274 ± 0.1093 and 0.4186 ± 0.1870 , respectively, in controls ($P<0.05$), showing an decreasing trend with increase in TSA concentration in a dose- and time-dependent manner. **Conclusion** TSA could disturb the progress of cell cycle of K562 cells with mechanisms of induction of cell apoptosis, regulation of G₁/S checkpoints and down-regulation of the expression of cyclin E, leading to inhibition of the expression of Rb.

Key words: Trichostatin A; K562 cell; Cyclin E; Retinoblastoma (Rb)

曲古菌素 A (Trichostatin A, TSA) 源自链霉素代谢产物, 最初被当作抗真菌药物使用。1987 年, Yashida 等发现 TSA 可诱导鼠红白血病细胞分化^[1], 随后 TSA 被发现可诱导组蛋白去乙酰化, 并抑制组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 活性^[2]。因此, TSA 作为一种高特异性、稳定而有效的组蛋白去乙酰化酶抑制剂而备受关注。目前细胞周期调控研究已取得了突破性进展^[3], 其中细胞周期素 (cyclin)、细胞周期素依赖性激酶 (cyclins dependent kinase, CDK) 被认为是作用的核心因子, 尤其是 cyclin E 蛋白表达在肿瘤发生中的作用引起了人们重视, 认为 cyclin E 表达过多参与

了肿瘤的发生与发展, 而 Rb (retinoblastoma, Rb) 基因是近年来发现的重要抑癌基因之一, 它参与了细胞周期调控与增殖^[4,5]。本研究以白血病细胞株 K562 细胞为研究对象, 旨在探讨 TSA 对细胞周期调控蛋白 cyclin E 及 Rb 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

TSA 购自基因公司, 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 (MTT, Sigma, USA), 培养基 RPMI-1640 (Gibco, USA), 胎牛血清 (中山凌飞公司), cyclin E、Rb 抗体 (购自基因公司); TC3123 型二氧化碳培养箱 (Sheldon, USA), 酶标仪 (NOVAPATH-MIPEADER 型, 荷兰 BIO-RAD); K562 细胞株购自上海科学院细胞中心, 在含有 10% 的胎牛血

收稿日期: 2005-01-07; 修回日期: 2005-03-24

作者简介: 田凡清 (1954—), 男, 副教授, 从事血液病教学和临床工作。

清、青霉素 100 $\mu\text{mol/L}$ 及链霉素 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 RPMI-1640 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。

1.2 细胞体外生长活性检测

采用溴化二甲噻唑二苯四氮唑比色法检测 50 ~ 400 nmol/L TSA 分别作用于 K562 细胞 12、24、36、48、60 h 后的吸光度(A)值。细胞计数,并调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml,同时取未加 TSA 的为对照组、DMSO 组(等同于加药组最大 DMSO 浓度)和加药组,每组设 3 个平行孔。96 孔培养板中每孔加入 180 μl 细胞、20 μl 药物或培养基。每孔加 MTT 20 μl ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 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)150 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) $\times 100\%$ 。

1.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期细胞用含 10% 的小牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞配成 5×10^6 个/ml,取 24 孔板,每孔加入稀释好的细胞 5 μl ,分别按终浓度为 100 nmol/L、200 nmol/L、300 nmol/L 加入 TSA。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中,用不同浓度的 TSA 处理 K562 细胞分别作用 24 h,用 70% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h, PBS 缓冲液洗去固定液,用缓冲液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,用 195 μl 细胞悬液加 5 μl Annexin-V-FITC。混匀,室温温浴 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。

1.4 免疫组化(SP)法检测 cyclin E、Rb 蛋白表达

按照试剂盒说明书操作:收集细胞,在 24 h 分别按终浓度为 100 nmol/L、200 nmol/L、300 nmol/L 加入 TSA,按不同处理组将细胞进行涂片,采用 SABC 法进行免疫组织细胞化学染色。简而言之,先用 3% H_2O_2 ,室温封闭 5 ~ 10 min, PBS 洗 5 min。滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,滴加一抗(一抗浓度均为 1 : 100),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h。PBS 洗 3 次每次 2 min,滴加生物素二抗,20 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, PBS 洗 3 次每次 2 min。滴加试剂 SABC,20 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, PBS 洗 4 次每次 5 min, DAB 显色。37 $^{\circ}\text{C}$ PBS 终止显色,应用凝胶成像分析系统(英国 UVP 公司)进行图像分析。

1.5 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 K562 细胞的抑制作用

对照组 K562 细胞体外生长活跃,经 50 ~ 400 nmol/L 的 TSA 处理 12 ~ 60 h 后, K562 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 TSA 作用 24 h 后 K562 细胞生长抑制率在 37.83% ~ 78.57% 之间,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 K562 细胞凋亡的动态变化

K562 细胞经 100 ~ 300 nmol/L TSA 分别作用 24 h 后,早期凋亡率分别是 14.38%、21.60% 和 61.18%,与对照组相比差异均有显著性, $P < 0.05$ 。

2.3 免疫组化检测 cyclin E、Rb 蛋白表达

结果显示,未加药的 K562 细胞的 cyclin E、Rb 蛋白表达呈强阳性,分别用 100 ~ 300 nmol/L TSA 处理 K562 细胞 24 h 后,其表达均下降($P < 0.05$)。见表 1、图 1 ~ 4。

表 1 100 ~ 300 nmol/L TSA 处理 K562 细胞

24 h cyclin E、Rb 的 OD 值

TSA 浓度	cyclin E	Rb
对照组	0.327 4 $\pm$ 0.109 3	0.418 6 $\pm$ 0.187 0
100 nmol/L	0.215 4 $\pm$ 0.201 5 *	0.301 7 $\pm$ 0.135 6 *
200 nmol/L	0.150 1 $\pm$ 0.197 8 *	0.213 4 $\pm$ 0.128 3 *
300 nmol/L	0.118 3 $\pm$ 0.052 1 *	0.152 7 $\pm$ 0.021 6 *

与对照组比较, * $P < 0.05$

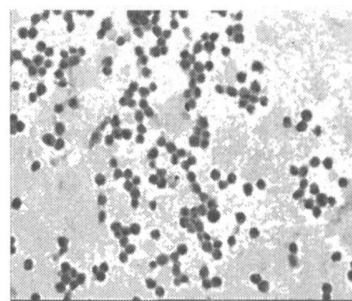


图 1 K562 细胞 cyclin E 的表达(未处理组)

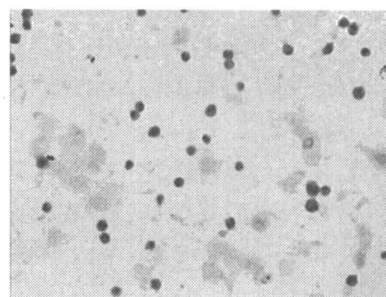


图 2 300 nmol/L TSA 处理 K562 细胞 cyclin E 的表达

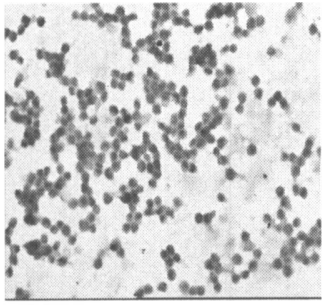


图 3 K562 细胞 Rb 的表达(未处理组)

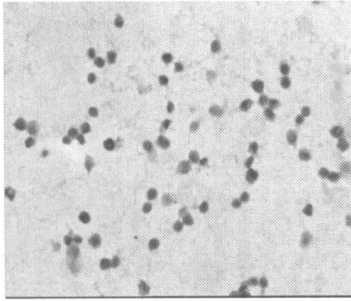


图 4 300 nmol/L TSA 处理 K562 细胞 Rb 的表达

3 讨论

TSA 是一种高效、低毒的化疗新药, 可通过多种途径发挥其抗癌效应, 在体内外均可抑制白血病细胞增殖、诱导分化和凋亡。实验结果表明 TSA 能有效地抑制 K562 细胞增殖, 其抗增殖作用与时间、剂量呈正依赖关系。本实验采用免疫组化技术检测 K562 细胞在用不同浓度 TSA 处理 24 h 后其 cyclin E、Rb 的蛋白表达水平。结果显示, K562 细胞未处理组, 其 cyclin E、Rb 均呈强阳性表达, 两者之间差异无显著性; 分别用 100、200、300 nmol/L TSA 处理 K562 细胞 24 h 后, 其表达量呈浓度依赖式下降 ($P < 0.05$)。

近年来对细胞周期的研究取得了许多重要的进展, 其中 cyclin E 与 CDK2 特异结合形成 cyclin E/CDK2 复合物是重要进展之一, 该复合物在 G_1 末期达到高峰。复合物的浓度是细胞通过 G_1 -S 期调节的关键因素。cyclin E 过度表达, 可促进细胞由 G_1 -S 期过度增殖而形成肿瘤, 能使视网膜神经胶质瘤蛋白 (Rb) 磷酸化。Rb 定位于人 13 染色体 (13q14), 于 1986 年由 Friend 等成功克隆测序, 在多种人类肿瘤, 如视网膜母细胞瘤、肺癌、骨癌、膀胱癌及卵巢癌中均发现其缺失和突变^[9]。有实验证据表明 Rb 不但参与细胞周期的调控, 而且可能是细胞生长、分化调控的中心环节^[7]。

G_1 期周期蛋白基因失调、蛋白表达过量在多种肿瘤中可以见到。乳腺癌、结肠癌、胃癌及白血病等肿瘤中均可发现 cyclin E 的基因扩增和蛋白表达上调^[8]。Keyomarsi^[9] 等对乳腺癌实体瘤 cyclin E 进行 Western 检

测发现 90% 肿瘤组织表达增高, 随着乳腺癌的分期、分级的增加, cyclin E 表达逐渐增高。进一步的研究发现^[10], cyclin E 相关激酶活性在肿瘤组织中明显高于正常组织。而在成年复发性白血病中 cyclin E 的表达较初发时高, 表达水平反映疾病的进展。在本研究中发现, 在未用 TSA 处理的细胞中, cyclin E 和 Rb 的表达明显高于实验组, 但随着 TSA 浓度的增高 cyclin E 和 Rb 的表达明显受抑, 而小剂量的 TSA, 却未见明显改变。这和 Lida^[11] 等研究的结果类似。表明 TSA 可通过诱导肿瘤细胞凋亡而抑制细胞增殖。TSA 作用 24 h 后, 流式细胞结果显示, G_0/G_1 期细胞数量增加, S 期细胞减少, 表明 TSA 同时具有调节 G_1 /S 期监测点的能力。

我们的研究认为 cyclin E-CDK2-Rb 环路为调控细胞 G_1 期最重要的途径。结合本实验结果, 分析 TSA 诱导分化信号可能经不同水平、不同途径调控靶基因表达, 使周期调控蛋白与转录因子、生长因子、细胞信使间形成一相互作用的网, 推测 G_1 期周期蛋白 cyclin E 及 Rb 基因表达下调可能为 TSA 诱导 K562 细胞分化分子机制中的重要事件。

参考文献:

- [1] Yoshida M, Nomura S, Beppu T. Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells[J]. Cancer Res, 1987, 47: 3688-3691.
- [2] Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function[J]. Bioassays, 1995, 17: 423-430.
- [3] Rooks S C, Sturgill R, Choi J, et al. An RXR-selective analog attenuates the RAR-selective analog-induced differentiation and non- G_1 -restricted growth arrest of K562 cell[J]. Exp Cell Res, 1997, 234(2): 259.
- [4] Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, et al. Expression of cyclin E in human gastric adenomas and adenocarcinomas: correlation with proliferative activity and p53 status[J]. Exp Ther Oncol, 1996, 1: 88-94.
- [5] Gonh J, Ardeit B, Tragana F, et al. Unscheduled expression of cyclinB1 and cyclin E in leukemic and solid tumor cell lines[J]. Cancer Res, 2003, 54: 1669-1679.
- [6] Liu Y. Molecular analysis of the retinoblastoma gene in primary ovarian cancer cells[J]. Int J Cancer, 2000, 58: 663.
- [7] Lukas J, Panty D, Aagaard L, et al. Retinoblastoma. Protein dependent cell cycle inhibition by the tumor suppressor p16[J]. Nature, 2002, 375: 503.
- [8] Scuderi R, Yasui W, Yokozaki H, et al. Frequent amplification of the cyclin E gene in gastric carcinomas[J]. Cancer Res, 2001, 10(6): 3360-3367.
- [9] Keyomarsi K, Nuala O. Cyclin E a potential prognostic marker for breast cancer[J]. Cancer Res, 2002, 54: 380-385.
- [10] Scuderi R, Palucka KA, Podrovska K, et al. Cyclin E overexpression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B-cell lineage[J]. Blood, 1996, 87(8): 3360-3367.
- [11] Lida H, Towatari M, Tannoto M, et al. Over expression of cyclin E in acute myelogenous leukemia[J]. Blood, 1999, (9): 3707-3713.