DOI:10.16016/j.1000-5404.201609123

TSA 可能通过抑制 APE1 BER 功能增强顺铂的肺腺癌细胞毒性

张志敏,杨镇洲 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

[摘要] **目的** 探讨曲古抑菌素 A(trichostatin A,TSA)对顺铂诱导的细胞毒性的影响。**方法** 给予 0、250、500 nmol/L TSA 预处理 A549 细胞 24 h 后,分别联合 0、5、10、15 μmol/L 顺铂处理 A549 细胞 24 h 后,通过 0、0.5、1、2 μmol/L APE1 InhibitorⅢ调控 APE1 BER 功能,应用 CCK-8 方法检测细胞增殖率,AP 内切酶活性实验检测 APE1 BER 功能,通过流式细胞仪检测细胞凋亡水平,immunoblot 检测 γ-H2AX 表达水平。**结果** TSA 联合顺铂处理 A549 细胞明显增强顺铂的细胞增殖抑制,并促进顺铂诱导的细胞凋亡;随着 TSA 浓度的升高 APE1 内切酶活性逐渐减弱,TSA 联合顺铂促进顺铂诱导的 γ-H2AX 表达;利用 inhibitor Ⅲ抑制 APE1 内切酶活性,促进顺铂诱导细胞增殖抑制和凋亡水平。**结论** TSA 可能通过抑制 APE1BER 功能增强顺铂诱导的细胞毒性反应。

[关键词] TSA;顺铂;AP 核酸内切酶活性;DNA 损伤
[中图法分类号] R73-361; R734.2; R979.1 [文献标志码] A

Trichostatin A enhances cisplatin-induced cytotoxicity through inhibiting base excision repair of AP endonuclease in lung adenocarcinoma cells

Zhang Zhimin, Yang Zhenzhou (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of trichostatin A (TSA) on the cytotoxicity induced by cisplatin in lung adenocarcinoma A549 cells. **Methods** After the A549 cells were pretreated with TSA at 0, 250 and 500 nmol/L for 24 h, the cells were treated by cisplatin at 0, 5, 10 and 15 μmol/L for another 24 h. CCK-8 assay and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis respectively. The effect of AP endonuclease (APE1) Inhibitor Ⅲ (0, 0.5, 1 and 2 μmol/L) was determined by AP endonuclease activity assay for the activity of base excision repair (BER). The expression of γ-H2AX was measured by immunoblotting. **Results** TSA enhances the inhibitory effect of cisplatin on cell proliferation and its promoting effect on cell apoptosis. With the increased of TSA dose, the BER activity of APE1 was gradually decreased. TSA also improved the expression of γ-H2AX induced by cisplatin. APE1 inhibitor Ⅲ suppressed the activity of endonuclease, and enhanced the cell proliferation and apoptosis induced by cisplatin. **Conclusion** TSA enhances cytotoxicity response caused by cisplatin through inhibiting the BER activity of APE1.

[**Key words**] trichostatin; cisplatin; AP endonuclease; DNA damage

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272499). Corresponding author: Yang Zhenzhou, E-mail: yangzz1970@163.com

非小细胞肺癌占肺癌总数的 80% ~85%[1],最近发现,顺铂为基础的化疗方案比非铂类为基础的化疗方案有更好的生存期[2]。但是顺铂抵抗的出现及顺铂自身的毒副反应限制着顺铂的临床应用。曲古抑菌素 A(trichostatin A,TSA),组蛋白去乙酰化抑制剂,与去乙酰化酶相互作用抑制其活性。TSA 在很多肿瘤中有很强的抗增殖和诱导凋亡的能力[3]。也有学者提出,去乙酰化酶抑制剂通过靶向于 DNA 提高抗癌药的细胞毒性[4]。还有研究认为,Bcl2 抗凋亡蛋白也是 TSA 增强顺铂细胞毒性的靶点[5]。TSA 促进顺铂细胞毒性的机制可能是抑制 BER 功能抑制 DNA 损伤修复,促进 DNA 损伤。因此,本研究利用荧光探针的方法检测 AP 内切酶活性,发现 TSA 抑制 APE1 BER 功能,利用 APE1 inhibitor Ⅲ抑制 APE1 内切酶活性,并检

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272499)
[通信作者] 杨镇洲,E-mail:;yangzz1970@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161223.1610.030.html

测对细胞增殖、凋亡的影响,探讨 APE1 BER 功能在 TSA 促进顺铂细胞毒性的作用,为 TSA 作为减少顺铂治疗剂量及毒副反应的辅助药提供进一步的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肺腺癌 A549 细胞由第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸外科实验室惠赠,大坪医院肿瘤中心实验室传代保存。胞浆胞核蛋白分离试剂、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、CCK-8 试剂盒购买于碧云天公司,鼠抗人 γ-H2AX 抗体购买用于 CST 公司。APE1 inhibitor Ⅲ(Merck Millipore 公司,德国),APE1 纯化蛋白本实验自制。AP 位点的 DNA 探针序列:5′-GTGGATCCGTACTCTGFGTACGTGTCAACACGAATTCGA-3′, F 代表 AP 位点;其互补序列:5′-TCGAATTCGTGTT-GACACGTACCCAGAGTACGGATCCAC-3′,由 TaKaRa 公司(大连)合成;含 AP 位点的探针 5′端由 IR700 标记(美国 IDT 公司专利);10 × TBE(Life Technologies 公司,美国),TSA, APS, TEMED(Sigma Aldrich 公司,美国)。

1.2 CCK-8 实验

接种处于对数生长期 A549 细胞 96 孔板,给予 0、250、500 nmol/L TSA 或 0、0.5、1、2 μmol/L Inhibitor Ⅲ预处理 A549 细胞 24 h 后,分别联合 0、5、10、15 μmol/L 顺铂处理 24 h 后,CCK-8 试剂染色后酶标仪检测。重复实验 3 次。

1.3 凋亡检测

接种处于对数生长期 A549 细胞 6 孔板,给予 250 nmol/L TSA 预处理 A549 细胞 24 h 后,联合 5 μmol/L 顺铂处理 24 h 后,凋亡检测试剂盒染色后流式细胞仪检测。重复实验 3 次。

1.4 荧光探针法 AP 内切酶活性检测

10 μL 反应体积(等量的、胞浆胞核蛋白分离试剂分离的细胞核蛋白),含(10 ~ 1 000 pg) APE1 纯化蛋白,1 pmol 荧光标记底物和 AP 反应缓冲液(10 mmol/L HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl2);37 ℃ 10 min,加 2 × Stop Buffer 甲酰胺终止反应 95 ℃ 5 min,15% 变性聚丙烯酰胺凝胶,预电泳 30 min,电泳 300 V 70 min,荧光扫描凝胶(LI-COR ODYSSEY 红外线双色扫描激光成像系统)[6]。

1.5 Immunoblot 检测

上样缓冲液稀释蛋白,电泳,NC 膜湿法转印,单克隆抗体及 HRP 偶联二抗孵育,Super Signal West Pico Chem I luminescent Substrate 化学发光,胶片显影。重复实验 3 次[7]。

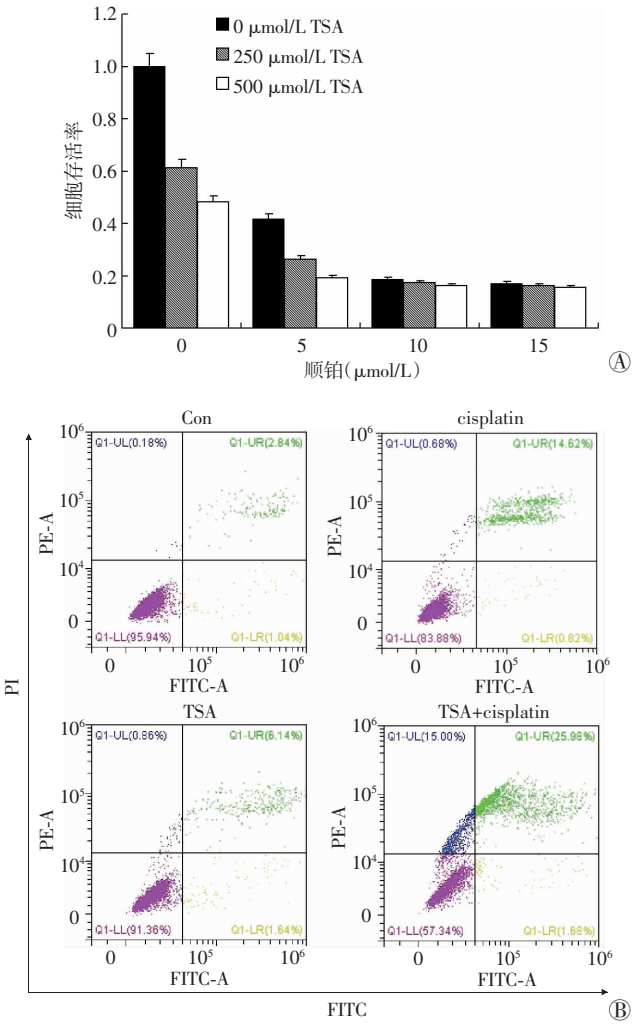
1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,不同药物处理后 A549 细胞增值率以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析比较多组间均数。

2 结果

2.1 TSA 增强顺铂诱导的细胞毒性

CCK-8 结果显示:TSA 增强顺铂的细胞增殖抑制水平(图 1A);结果显示,250 nmol/L TSA 联合 5 μmol/L 顺铂对 A549 细胞达到良好的抑制效果,故使用 5 μmol/L 顺铂作为 A549 细胞处理浓度。流式细胞仪检测发现,TSA 联合顺铂处理 A549 细胞,明显增强顺铂诱导的细胞凋亡水平(图 1B);提示 TSA 明显增强顺铂诱导的细胞毒,增强其疗效,可作为增强顺铂疗效、减少顺铂剂量及其毒副反应的辅助药。

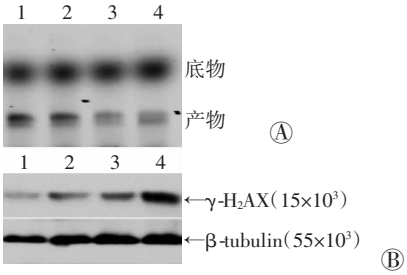


A:CCK-8 实验检测预处理 0、250、500 nmol/L TSA 后,分别联合 0、5、10、15 μmol/L 顺铂处理 A549 细胞 24 h 后细胞存活率; B:流式细胞仪检测预处理 250 nmol/L TSA 联合 5 μmol/L 顺铂处理 A549 细胞 24 h 后细胞凋亡情况

图 1 TSA 促进 cisplatin 细胞毒性

2.2　TSA 抑制 APE1BER 功能促进顺铂诱导的 DNA 损伤

TSA 随着剂量的增加而抑制 APE1 的酶切活性(图2A);结果发现250 nmol/L TSA 对 APE1 内切酶活性达到良好的抑制效果,故使用250 nmol/L TSA 作为 A549 细胞处理浓度;Immunoblot 结果显示,联合顺铂和 TSA 诱导 DNA 双链断裂的标志蛋白 γ-H2AX 的表达,明显高于单独顺铂的作用(图2B);表明 TSA 抑制 APE1 内切酶活性,即 BER 功能,明显增强顺铂诱导的 γ-H2AX 表达,即增强 DNA 损伤。



A:荧光探针法检测预处理 A549 细胞不同浓度 TSA 24 h 后 AP 内切酶活性　1:0 nmol/L;2:125 nmol/L;3:250 nmol/L;4:500 nmol/L;B:Western blot 检测预处理 A549 细胞 250 nmol/L TSA 联合 5 μmol/L 顺铂 24 h 后 γ-H2AX 的表达　1:对照组;2:TSA 组;3:cisplatin 组;4:TSA + cisplatin 组

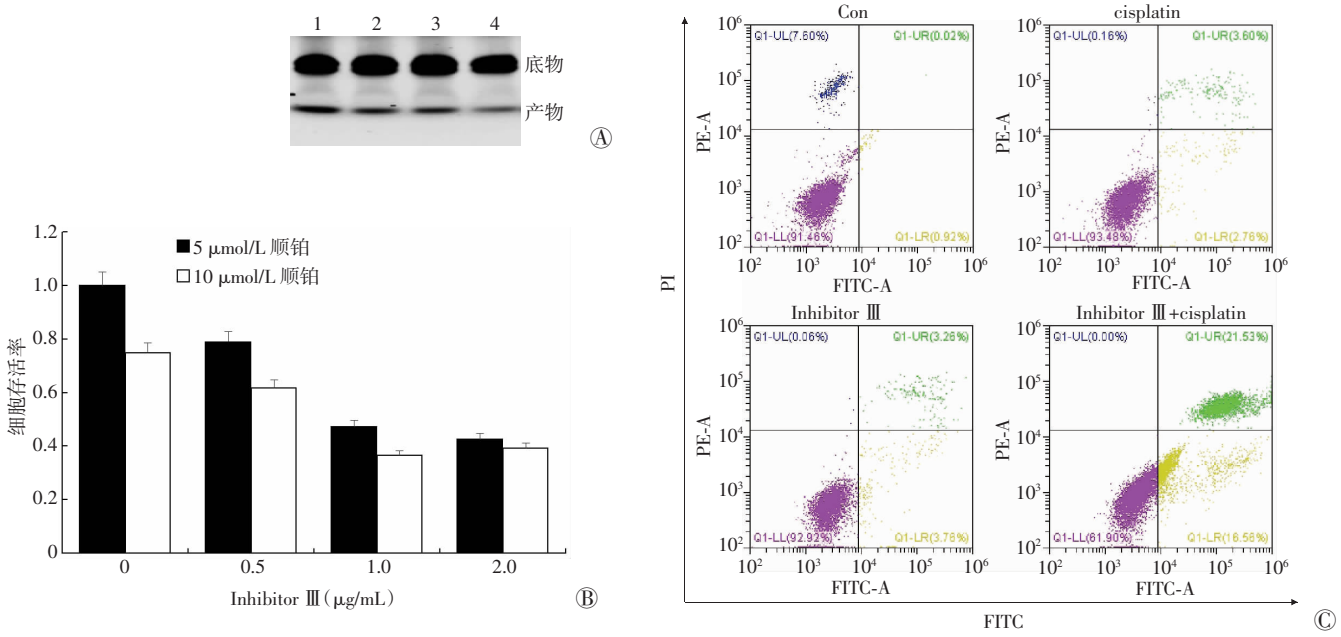
图2　TSA 抑制 APE1BER 功能,增强 cisplatin 诱导的 DNA damage

2.3　抑制 APE1 内切酶活性增强顺铂诱导的细胞毒性

CCK-8 结果 Inhibitor Ⅲ显示明显增强顺铂诱导的增殖抑制(图3B);结果显示:1 μmol/L 的 APE1 Inhibitor Ⅲ 24 h 处理后达到良好的抑制效果,因此我们使用1 μmol/L 的 APE1 Inhibitor Ⅲ 24 h 处理 A549 细胞;AP 内切酶活性实验发现,Inhibitor Ⅲ抑制 APE1 内切酶活性,增强 TSA 对 AP 内切酶活性的抑制(图3A);流式细胞仪检测示,Inhibitor Ⅲ同样增强顺铂诱导的细胞凋亡(图3C)。因此,抑制 APE1 内切酶活性增强顺铂诱导的细胞毒性效应。

3　讨论

TSA 不仅本身具有抗肿瘤活性[8],还能明显改善肺癌肿瘤化学治疗的疗效,增强顺铂对肿瘤细胞的杀伤效应并抑制顺铂耐药[9]。与我们的结果类似,通过联合 TSA 和顺铂处理 A549 细胞,明显增强顺铂诱导的细胞增殖抑制和凋亡水平。顺铂杀伤肿瘤细胞的机制类似于烷化剂类抗肿瘤药,烷化剂通过使细胞内的生物大分子蛋白失去活性或是 DAN 链断裂,导致细胞死亡。烷化剂诱导 DNA 损伤多能被 DNA 损伤修复系统所逆转,烷化剂诱导的 DNA 损伤修复系统,即碱基切除修复(base excision repair BER)发挥主要的作用。BER 过程重要的限速酶,APE1(apurinic/apyrimidinic endonuclease1),具有碱基切除活性和氧化还原活性



A:荧光探针法检测预处理 A549 细胞 1 μmol/L 的 APE1 Inhibitor Ⅲ或和 250 nmol/L TSA 处理 24 h 后 AP 内切酶活性　1:对照组;2:Inhibitor Ⅲ组;3:TSA 250 nmol/L 组;4:TSA + Inhibitor Ⅲ组;B:CCK-8 实验检测预处理 0、0.5、1.0、2.0 μmol/L Inhibitor Ⅲ分别联合0、5、10 μmol/L 顺铂处理 A549 细胞 24 h 后细胞存活率;C:流式细胞仪检测预处理 1 μmol/L 的 APE1 Inhibitor Ⅲ联合 5 μmol/L 顺铂处理 A549 细胞 24 h 后细胞凋亡情况

图3　抑制 APE1BER 功能增强 cisplatin 细胞毒性

(APE1 又称 ref-1redox effector factor-1)。APE1 过表达与顺铂耐药存在密切的关系,抑制 A549 细胞 APE1 表达增强顺铂的活性[10],通过 APE1 小分子抑制剂抑制 APE1 双功能,明显提高肿瘤细胞对顺铂的敏感性[11]。本研究结果发现,TSA 增强顺铂诱导的细胞增殖抑制和凋亡水平,是通过抑制 APE1 的 AP 内切酶活性,影响 BER 进程,促进顺铂诱导的 DNA 损伤,增强细胞杀伤效应。表明 TSA 能够抑制细胞核内 APE1 内切酶活性,我们认为 APE1 的 AP 内切酶活性可能是 TSA 增强顺铂细胞毒性的原因之一。

有研究显示,TSA 调节 APE1 细胞内外重新分布促进细胞凋亡的诱导[12],而且 TSA 通过改变 OGG1 的翻译后修饰状态抑制 BER 功能[13]。我们利用 APE1 BER 功能特异抑制剂调控抑制 APE1 BER 功能,发现 InhibitorⅢ增强 TSA 对 AP 内切酶活性的抑制。以上结果表明,TSA 通过抑制 APE1 BER 功能,联合顺铂增强 DNA 损伤的诱导,及其对肿瘤细胞的增殖抑制和凋亡水平。

总之,本研究虽然仅仅用 APE1 BER 功能特异抑制剂 InhibitorⅢ调控 APE1 内切酶活性,但足以提示 TSA 增强顺铂肿瘤细胞杀伤效应的机制与细胞核内 APE1 存在密切关系。现已明确 TSA 对 APE1 乙酰化水平具有调控功能,TSA 也调控 APE1 细胞外的分泌[12, 14],但 TSA 对 APE1 不同功能的影响是否与顺铂杀伤活性存在直接的关系有待进一步研究。

参考文献:

[1] Jemal A, Murray T, Ward E, *et al*. Cancer statistics, 2005 [J]. CA J Clin, 2005, 55(1): 10 – 30. DOI: 10.3322/caac.21254

[2] Rajeswaran A, Trojan A, Burnand B, *et al*. Efficacy and side effects of cisplatin- and carboplatin-based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials [J]. Lung Cancer, 2008, 59(1): 1 – 11. DOI: 10.1016/j.lungcan.2007.07.012

[3] Zhang X, Jiang S J, Shang B, *et al*. Effects of histone deacetylase inhibitor trichostatin A combined with cisplatin on apoptosis of A549 cell line [J]. Thorac Cancer, 2015, 6(2): 202 – 208. DOI: 10.1111/1759-7714.12167

[4] Kim M S, Blake M, Baek J H, *et al*. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA[J]. Cancer Res, 2003, 63(21): 7291 – 7300. DOI: 2003 Nov 1; 63(21): 7291-300

[5] Wu J, Hu C. Trichostatin A Induced Bcl-2 Protein Level Decrease Mediated A549/CDDP Cells Apoptosis by Mitochondria Pathway[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2009, 12(11): 1143 – 1149. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2009.11.03

[6] 李梦侠, 程燚, 王东. 基于远红外荧光标记的脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶活性检测方法的建立[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(24): 2492 – 2494. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201504010
Cheng Yi, Wang Dong, Li Mengxia. Establishment of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Activity Assay Based on Far Infrared Fluorescent Label[J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(24): 2492 – 2494. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201504010

[7] 张志敏, 杨镇洲, 何昊, 等. APE1 乙酰化调节电离辐射诱导的 HeLa 细胞自噬[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(4): 380 – 384. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201506152
Zhang Zhimin, Yang Zhenzhou, He Hao, *et al*. APE1 acetylation regulates autophagy induced by ionizing radiation in HeLa cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2016, 38(4): 380 – 384. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201506152

[8] Piao J, Chen L, Quan T, *et al*. Superior efficacy of co-treatment with the dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 and histone deacetylase inhibitor Trichostatin A against NSCLC [J]. Oncotarget, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.11109

[9] Zhang N H, Peng R Q, Ding Y, *et al*. Rejection of adenovirus infection is independent of coxsackie and adenovirus receptor expression in cisplatin-resistant human lung cancer cells[J]. Oncology reports, 2016, 36(2): 715-720. DOI: 10.3892/or.2016.4870

[10] Wang D, Xiang D B, Yang X Q, *et al*. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells[J]. Lung cancer, 2009, 66(2): 298 – 304. DOI: 10.1016/j.lungcan.2009.02.019

[11] Qian C, Li M, Sui J, *et al*. Identification of a novel potential antitumor activity of gossypol as an APE1/Ref – 1 inhibitor [J]. Drug Des Devel Ther, 2014, 8: 485 – 496. DOI: 10.2147/DDDT.S62963

[12] Lee Y R, Kim K M, Jeon B H, *et al*. Extracellularly secreted APE1/Ref-1 triggers apoptosis in triple-negative breast cancer cells via RAGE binding, which is mediated through acetylation[J]. Oncotarget, 2015, 6(27): 23383 – 23398. DOI: 10.18632/oncotarget.4345

[13] Sarga L, Hart N, Koch L G, *et al*. Aerobic endurance capacity affects spatial memory and SIRT1 is a potent modulator of 8-oxoguanine repair[J]. Neuroscience, 2013, 252(16): 326 – 336. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.020

[14] Park M S, Choi S, Lee Y R, *et al*. Secreted APE1/Ref-1 inhibits TNF-alpha-stimulated endothelial inflammol/Lation *via* thiol-disulfide exchange in TNF receptor[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23015. DOI: 10.1038/srep23015

(**收稿**:2016-09-19;**修回**:2016-12-07)

(编辑 汪勤俭)