维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0312-05

曲古菌素 A 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的作用

姜小良,张 徽,刘香丽,林 晓

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase,HDAC)抑制剂曲古抑菌素 A(Trichostatin A,TSA)对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖、侵袭、细胞周期及 ERα 表达的影响。方法:100 ~ 400nmol/L 的 TSA 分别处理 MDA-MB-231 细胞 6 ~ 48h 后用四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT 法)检测 MDA-MB-231 细胞的生长活性。应用流式细胞仪观察细胞周期的变化。采用 RT-PCR 法检测 MDA-MB-231 细胞在 24h 不同浓度 100 ~ 400nmol/L TSA 作用下对 ERα,MMP-9 mRNA 表达的影响。采用免疫组织化学法检测 MDA-MB-231 细胞在 24h 不同浓度 100 ~ 400nmol/L TSA 作用下对 ERα,MMP-9 在细胞中表达的影响。采用细胞侵袭实验检测 MDA-MB-231 细胞在 24h 不同浓度 100 ~ 400nmol/L TSA 作用下细胞侵袭力的变化。结果:TSA 可显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖,呈时间及剂量依赖性。TSA 能够延缓细胞周期 G_2/M 期进程,阻滞细胞于 G_2 期。RT-PCR 显示,TSA 能够上调 ERα mRNA 在 MDA-MB-231 细胞中的表达,下调 MMP-9 在 MDA-MB-231 细胞中的表达。侵袭实验显示 TSA 能够较明显的抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭。结论:TSA 能够较明显的上调 ERα 与下调 MMP-9 的表达可能是抑制 MDA-MB-231 细胞增生侵袭与转移的重要机制之一。

【关键词】曲古抑菌素 A(TSA);MDA-MB-231 细胞;雌激素受体 α(ERα);基质金属蛋白酶 9(MMP-9)
【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-17

The investigation of effect of trichostatin A to breast cancer MDA-MB-231 cell line

JIANG Xiao-liang,et al

(*Department of Pathology,College of Basic Medicine,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the influence of histone deacetylase inhibitor(Trichostatin A) to multiplication, invasion, cell cycle of breast cancer MDA-MB-231 cell line. *Methods*:After 6 ~ 48hours treatment with the concentration(100 ~ 400nmol/L)of Trichostatin,the growth activity of MDA-MB-231 cell line was detected by MTT. The expression of ERα,MMP-9 mRNA was detected by RT-PCR with different concentration(100 ~ 400nmol/L TSA) during 24 hours to MDA-MB-231 cell line. The expression of ERα,MMP-9 protein was examined by immunohistochemistry with different concentration(100 ~ 400nmol/L TSA) during 24 hours treatment to MDA-MB-231 cell line. With cell invasion experiment to detect the change of invasive power by using different concentration(100 ~ 400nmol/L TSA) during 24 hours to MDA-MB-231 cell line. *Results*: Trichostatin can inhibit the growth of MDA-MB-231 cell line,which was time and dose dependent. Trichostatin can delay the cell cycle G_2/M stage,stop the cell stage in G_2 stage. Trichostatin can up-regulate the expression of ERα mRNA, down-regulate the expression of MMP-9 mRNA in cells. The invasion experiment indicate that Trichostatin can conspicuous inhibit the invasion of MDA-MB-231 cell line. *Conclusions*:Trichostatin can inhibit the accrementition, invasion and metastasis of MDA-MB-231 cell line evidently,and one of the mechanism may be the up-regulation of ERα and the down-regulation of MMP-9.

【Key words】Trichostatin A;MDA-MB-231 cell line;Estrogen receptor;Matrix metalloproteinases-9

近年来研究发现,组蛋白乙酰化酶和组蛋白去乙酰化酶的异常与肿瘤的发生有着密切的关系[1],应用组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以诱导肿瘤细胞分化和凋亡,抑制肿瘤细胞增殖,因而组蛋白去乙酰化酶抑制剂被认为是新一代抗肿瘤药物[2]。TSA 是 1 种来源于链霉菌属的抗真菌抗生素,它能抑制哺乳动物的组蛋白去乙酰化酶,现已经被用来

作者介绍:姜小良(1981-),男,硕士,
研究方向:肿瘤病理研究。
通讯作者:张 徽,男,教授,E-mail:zhanghui200157@sina.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

作为潜在的抗肿瘤药物。很多肿瘤抑制基因能被HDAC 抑制剂如 TSA 所活化，其中一些基因，包括 ERα 基因，甲基化的启动子区域能被 TSA 单独修复。本文通过 TSA 对 MDA-MB-231 细胞的作用，试图在组蛋白去乙酰化水平这一转录调节水平对曲古菌素 A 的抗肿瘤机制能够作出新的解释。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 TSA，购自 SIGMA 公司(由晶美生物工程有限公司代理)，溶解于无水乙醇，稀释成 1mmol/L，置于 -20℃冰箱。

1.1.2 细胞系 乳腺癌细胞株 MDA-MB-231，MCF-7 由重庆医科大学基础医学院病理学教研室保存。

1.1.3 主要试剂 RPMI1640 培养基，小牛血清，溴化二甲噻唑二苯四氮唑，一抗雌激素受体 α，一抗基质金属蛋白酶 9。

1.1.4 细胞培养 在含有 10%的胎牛血清、青霉素 100U/ml 及链霉素 100U/ml 的 RPMI1640 培养基中 37℃、5%CO_2 条件下培养。每 48h 换液传代 1 次。取生长良好，细胞活性大 98%的细胞进行实验。

1.2 MTT 比色法检测细胞增殖抑制率

调整细胞浓度为 5×10^5 个/ml。将实验分为 3 组：阴性对照组(未用药组)、无水乙醇组(等同于用药组最大无水乙醇浓度)和用药组，每组设 3 个平行孔。96 孔培养板中每孔加入 180μl 细胞，和 20μl 药物经 100～400nmol/L TSA 分别作用不同时间 6、12、24 和 48h 后，终止培养。每孔加 MTT20μl(5mg/ml)，37℃孵育 4h 后，离心 5min，弃孔内上清液，加入二甲基亚砜 150μl，震荡至溶解。选择 490nm 波长，酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 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%。

1.3 流式细胞仪检测细胞周期

各收集 3 管未用药处理和用 200nmol/LTSA 作用后的细胞，用 70%的预冷乙醇固定 24h 以上，加 1mlPC 缓冲液和 100mg/LRNase50μl 后，再加入 50mg/L 碘化丙锭 500μl，4℃室温避光 30min，而后用流式细胞仪分析细胞周期。

1.4 RT-PCR 检测

用不同浓度(100～400nmol/L)TSA 分别作用 MDA-MB-231 细胞 24h 后，提取 RNA。步骤按 Trizol(Gbico 公司)试剂盒说明书进行，所提取的总 RNA 溶解后用 RNA 纯度和浓度(A_{260}/A_{280}>18)。在 Genebank 检索基因 cDNA 序列，自行设计 PCR 引物，由上海生物工程公司合成。1 对引物各 40pmol，1 对人 18SrRNA 引物各 40pmol，Taq 酶 2U，加水至 50μl，ERα 引物序列(赛百盛合成)：上游引物 5'-AGCAGCAAGCCDCGCCGTGTACAAC-3'，下游引物：5'-CTCGCGCACCGTGTAGCCGCTGGGC-3'，扩增产物为 294bp。PCR 扩增条件为：94℃ 5min，94℃ 30s，62℃ 30s，72℃ 延伸 1min，共进行 35 个循环，最后 72℃延伸 5min。MMP-9 引物序列(赛百盛合成)：上游引物 5'-GACTCGGTCTTTGAGGAGCC-3'，下游引物：5'-GAACTCACGCGCCAGTAGAA-3'，扩增产物为350bp。PCR 扩增条件为：94℃5min，94℃30s，57.8℃30s，72℃延伸 55s，共进行 35 个循环，最后 72℃延伸 10min。用 1%的琼脂糖胶，每孔点样 10μl，60V 电压，同时点 DNAmarkerDL2000 作分子标准。以 MCF-7 中 ERα，MMP-9mRNA 作为阳性对照，用数码凝胶图像分析系统(Kodak EDAS290)作条带密度扫描，结果以目的条带与对应的 18S 密度值表示。

1.5 免疫组织细胞化学检测

取对数期生长细胞，以 200nmol/LTSA 处理 16h 后细胞爬片，按照 S-P 染色法分别检测 ERα，MMP-9 的表达。用 PBS 代替一抗作为阴性对照，MCF-7 乳腺癌细胞作为阳性对照。按每高倍视野下(×400) 随机观察 100 个细胞，计算细胞阳性率，7 次染色细胞阳性率的结果计算均值。阳性染色结果采用二级记分法，阳性细胞记数 <5%为 0 分，5%～25%为 1 分，25%～50%为 2 分，50%～75%为 3 分，75%及以上为 4 分。染色强度：淡黄色 1 分，黄或深黄色 2 分，褐或棕褐色 3 分，两者计分相乘，0 分为无表达，1～4 分为弱阳性表达，5～7 分为中等阳性表达，8～12 分为强阳性表达。

1.6 侵袭实验

采用 Transwell 和 Matrigel 研究 TSA 对细胞侵袭性的影响，具体操作按产品说明书进行。5×10^4 个/ml 的细胞置于 Transwell 的上层小室，分别与不同浓度(0、100、200、300、400 nmol/L) 的 TSA 共同培养 24h。取出上层小室，经 10%福尔马林固定和 HE 染色后，于光镜下观察细胞的侵袭情况。随机选择 10 个高倍视野(×400)，计算平均每一视野中的细胞数。

1.7 统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用 SPSS10.0 for windows 专业统计软件进行数据分析处理，两样本均数间比较用 t 检验。多个样本均数间的比较用方差分析，多个样本均数间的两两比较用 q 检验(Newman-Keuls 法)。

2 结 果

2.1 TSA 对 MDA-MB-231 细胞的抑制作用

TSA 以时间剂量依赖性方式抑制 MDA-MB-231 细胞增殖，6、12、24、48h 后，细胞抑制率(表 1)所示：随着药物浓度与时间的增加，细胞生长抑制率呈现逐步增加的趋势，各个不同浓度与时间组之间的差别有显著性意义(P<0.05)，24h IC_{50}(细胞 50%抑制时的给药浓度)为 200nmol/L。

2.2 TSA 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

流式细胞记数分析，结果显示：TSA 处理后，G_2/M 从 20.1%升高到 43%(P<0.05)，用药前后细胞周期 G_2/M 的变化具有显著性差异(图 1)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同浓度药物与不同时间处理 MDA-MB-231 后细胞的生长抑制率(%)($\bar{x} \pm s$)

组别	时间			
	6h	12h	24h	48h
未用药组	1.03 ± 0.2	0.78 ± 0.5	3.66 ± 0.7	4.41 ± 0.1
100 nmol/L	1.05 ± 0.6*	6.83 ± 0.9°	19.35 ± 1.0°	24.33 ± 2.3°
200 nmol/L	4.38 ± 0.6°	14.44 ± 3.4°	35.25 ± 3.0°	43.12 ± 1.0*
300 nmol/L	12.25 ± 1.5*	30.00 ± 1.3°	53.25 ± 1.8*	64.00 ± 3.9°
400 nmol/L	16.27 ± 2.0*	47.89 ± 3.7°	56.58 ± 2.5°	78.89 ± 3.6°

P^*<0.05,不同浓度药物之间比较。P° <0.05, 与未用药组进行比较。

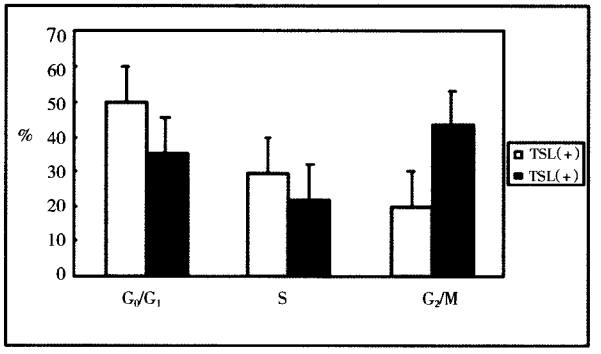


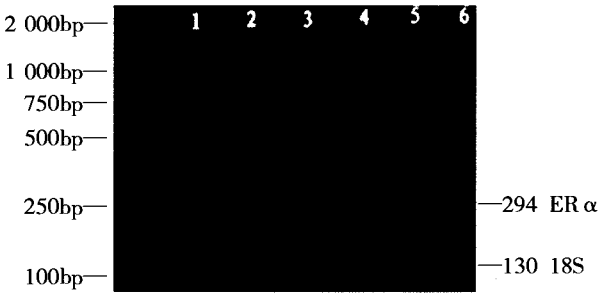
图 1 TSA 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

2.3 TSA 对 MDA-MB-231 细胞 ERα,MMP-9mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测发现 TSA 浓度为100nmol/L 时,ERα mRNA 已经有少量表达,随着药物浓度的逐渐增加,ERα mRNA 表达有增强的趋势(P<0.05),各个加药组间相互比较,ERα mRNA 表达有逐渐增强的趋势(P<0.05),但 TSA 浓度为 300nmol/L 以上时,ERα mRNA 表达差异性不明显(P>0.05)(图 2)。用药组与未用药组比较,MMP-9mRNA 的表达,用药后明显减少(P<0.05),各用药组间 MMP-9mRNA 的表达随着 TSA 浓度的增加呈现逐渐减少的趋势(P<0.05)(图 3)。

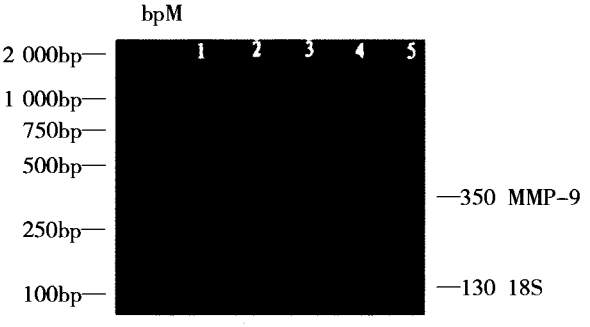
2.4 免疫组织化学检测 TSA 对 MDA-MB-231 细胞 ERα,MMP-9 蛋白表达的影响

对于 ERα 的表达,MDA-MB-231 乳腺癌细胞 TSA 处理前免疫组织化学结果为阴性。阳性对照 MCF-7 乳腺癌细胞结果为强阳性,阳性染色细胞 >75%,阳性反应部位呈棕黄色颗粒,主要位于胞核,染色深。TSA 处理后的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞结果为弱阳性表达,阳性表达部位呈黄色颗粒,主要位于胞核(图 4),ERα 表达平均计分为 2.30 ± 0.35,与处理前比较明显表达增强(P<0.05)。而对于



1. MCF-7 细胞;2. 未用药 MDA-MB-231 细胞;3. 用 100 nmol/LTSA 处理 MDA-MB-231 细胞;4. 用 200nmol/LTSA 处理 MDA-MB-231 细胞;5. 用 300nmol/LTSA 处理 MDA-MB-231 细胞;6. 用 400nmol/LTSA 处理 MDA-MB-231 细胞

图 2 RT-PCR 检测 MDA-MB-231 细胞 ERα 表达的变化



1. MCF-7 细胞;2. 未用药 MDA-MB-231 细胞;3. 用 100nmol/LTSA 处理 MDA-MB-231 细胞;4. 用 200nmol/LTSA 处理 MDA-MB-231 细胞;5. 用 300nmol/LTSA 处理 MDA-MB-231 细胞;6. 用 400nmol/LTSA 处理 MDA-MB-231 细胞

图 3 RT-PCR 检测 MDA-MB-231 细胞 MMP-9 表达的变化

MMP-9 的表达,MDA-MB-231 乳腺癌细胞 TSA 处理前免疫组织化学结果为强阳性表达,阳性染色细胞 >75%,染色部位主要在胞浆,MCF-7 乳腺癌细胞结果也为强阳性,阳性染色细胞 >75%,染色深。TSA 处理后的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞结果为中等阳

维普资讯 http://www.cqvip.com

性表达，阳性反应部位呈棕黄色颗粒，主要位于胞浆，颜色较深(图 5)，MMP-9 表达平均计分为 5.25 ± 0.24，与处理前表达相比明显减弱($P<0.05$)。

2.5 侵袭实验检测 TSA 对 MDA-MB-231 细胞转移潜能的影响

Transwell 的结果显示，与用药前相比，穿过纤维素膜的细胞明显减少(图 6)($P<0.05$)，随着 TSA 浓度的增加，各浓度组穿过纤维素膜的细胞数目有逐渐减少的趋势。

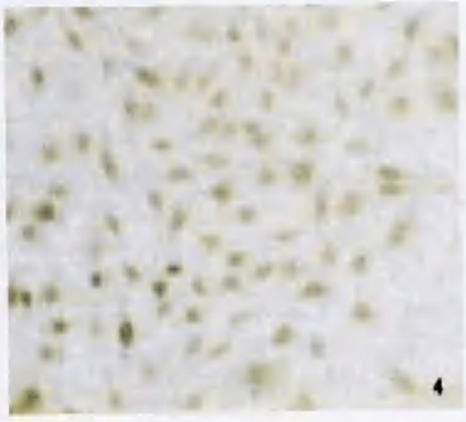


图 4 用 TSA 处理后 ERα 在 MDA-MB-231 细胞中的弱阳性表达

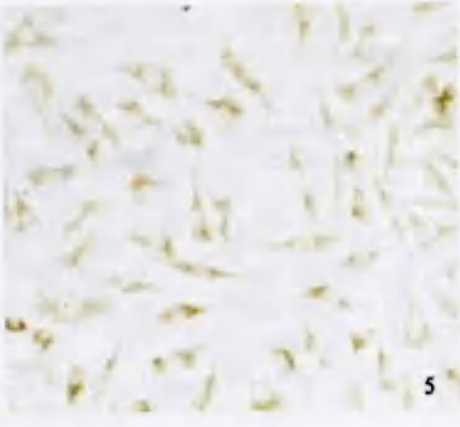
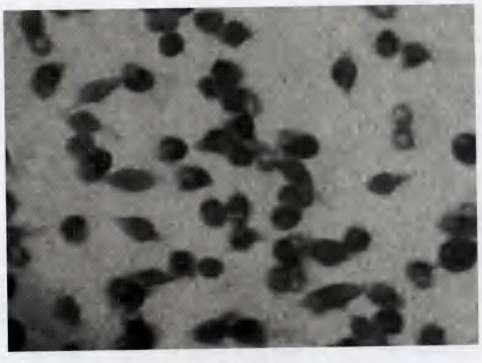


图 5 用 TSA 处理后 MMP-9 在 MDA-MB-231 细胞中的中阳性表达



A 用药前



B 用药后

图 6 用药前后 MDA-MB-231 细胞穿过纤维素膜的数目对比

3 讨 论

乳腺癌的发生和发展是 1 个极其复杂过程。在这个过程中，有许多不同基因通过相互间的调节来调控乳腺癌的进程，而组蛋白乙酰化是调节各种基因进行转录的重要一环，由于组蛋白乙酰化 / 去乙酰化这种平衡的打破将导致基因表达调控紊乱而引起疾病发生；已发现多种疾病(特别是恶性肿瘤)的发生与组蛋白乙酰化去乙酰化平衡失调有关，而组蛋白乙酰化/去乙酰化是 1 个可逆过程，其平衡失调可被纠正。本实验通过一种非竞争性可逆的 HDAC 活性抑制剂 TSA 作用于乳腺癌细胞，能够抑制 HDAC1mRNA 的表达，并且呈一定的浓度依耐性，调节组蛋白乙酰化 / 去乙酰化的平衡，进而影响一些与癌细胞增殖侵润转移相关基因的表达。我们进一步通过细胞增殖实验研究 TSA 的抗肿瘤作用，实验结果表明 TSA 能有效抑制 MDA-MB-231 细胞增殖，呈一定的量效关系和时间依赖性。

有研究报道 HDAC 抑制剂 TSA 能够诱导多种肿瘤细胞的生长停滞[3]，本研究中采用 200nmol/LTSA 处理 MDA-MB-231 细胞后用流式细胞计数发现 G_2/M 期细胞明显增多，细胞周期 G_2/M 期进程被延缓，细胞阻滞在 G_2 期，与文献[4]报道相一致。

在乳腺癌中出现的雌激素受体的主要形式在蛋白水平与 mRNA 水平都存在的 ERα，国内外目前研究认为：缺乏 ERα 的表达即所谓的 ER 阴性的乳腺癌是对抗激素药物治疗耐药的主要原因[5]。关于 ERα 阴性乳腺癌 ERα 基因表达沉默的机制

维普资讯 http://www.cqvip.com

以及 ERα 基因各启动子甲基化状态和 ERα 基因表达沉默的关系，目前尚不十分明确。近期研究表明，ERα 阴性乳腺癌中 ERα 基因缺失、突变等遗传学改变发生率低，推测与其启动子区 CpG 岛甲基化有关，而甲基化的密度限制了组蛋白乙酰化水平[6]，HDACs 也可以和 DNA 甲基化酶(DNA Methyl transferases，DNMT)、组蛋白甲基化酶(histone Methyl-transferases，HMT)等结合，共同被转录抑制因子招募，参与基因转录抑制，本实验以终浓度 200nmol/L TSA 通过与 ERα 阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 作用后，免疫组织化学结果显示去乙酰化作用后，MDA-MB-231 乳腺癌细胞 ERα 的阳性表达率明显增高。这与 Ottaviano 等[7]，Ferguson 等[8]以及 Lapidus 等[9]研究结果一致。而通过 TSA 与 MDA-MB-231 细胞作用，RT-PCR 检测结果显示，随着 TSA 浓度的升高，ERα mRNA 表达水平也大致呈现 1 个逐渐升高的趋势，与文献报道一致。

乳腺癌的侵袭和转移是一个复杂的多步骤的、多阶段的病理过程。MMP-TIMP 失衡导致细胞外基质降解在这一过程中起决定作用，为肿瘤早期侵润的标志。因为人体在正常情况下，MMPs 在其体内组织抑制剂(TIMPs)保持着相对平衡。一旦肿瘤细胞通过各种机理下调 MMPs 和(或)上调 TIMPs 的表达，则肿瘤细胞的生长、侵润及转移均有减弱。本研究发现，而通过 TSA 与 MDA-MB-231 细胞作用，免疫组织化学和 RT-PCR 结果显示，随着 TSA 浓度的升高，MMP-9 mRNA 与蛋白表达水平也呈现一个逐渐降低的趋势，而本实验进一步的侵袭实验表明，随着 TSA 的浓度逐渐升高，乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭能力也呈现一个逐渐下降的趋势，所以我们推测，TSA 可能通过影响 MMP-TIMP 的平衡而影响乳腺癌细胞的侵润与转移。

乳腺癌的形成和发展是一个极其复杂过程，在这个过程中，通过药物影响组蛋白乙酰化/去乙酰化的平衡而能够改变 ERα 等基因的表达从而进一步影响乳腺癌的生物学特性，但其中是否有另外的机制参与其中，仍需进一步研究。

参 考 文 献

[1] CressW D,Steo E. Histone deacetylase,transcrip tional control and cancer[J]. Cell Physiol,2000;184(1):1-16.

[2] YoshidaM,Beppu T. Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fi2 brblasts in both G_1 and G_2 phases by trichostatin A[J]. Exp Cell Res,1998;177(1):122-131.

[3] Peltone K,Kivihariu TM,Jarvinen PM,et al. Melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis[J]. Pigment Cell Res,2005;18(3):196-202.

[4] John Patrick Alao,Eric W-F. Lam,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):8094-9104.

[5] Jordan VC. Molecular biology of the estrogen receptor aids in the understanding of tamoxifen resistance and breast cancer prevention with raloxifene [J]. Recent Results Cancer Res,1998;152:265-276.

[6] Schubeler D,Lorincz MC,Cimbora DM,et al. Genomic targeting of methylated DNA:influence of methylation on transcription, replication,chromatin structure,and histone acetylation[J]. Mol Cell Biol,2000;20(24):9103-9112.

[7] Ottaviano YL,Issa JP,Parl FF,et al. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells[J]. Cancer Res,1994;54(10):2552-2555.

[8] Ferguson AT,Lapidus RG,Baylin SB,et al. Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression[J]. Cancer Res,1995;55(11):2279-2283.

[9] Lapidus RG,Ferguson AT,Ottaviano YL,et al. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors[J]. Clin Cancer Res,1996;2(5):805-810.

(责任编辑：谭乐勤)