重庆维普 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)09-1025-04

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

谢 静[1],王 锋[2],梅浙川[1],唐开福[3],任 红[3]

(1. 重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010; 2. 四川省华蓥市人民医院,四川 638600;
3. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010;)

【摘 要】目的:比较组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase,HDAC)抑制剂 HDAC 曲古抑菌素 A(Trichostain A,TSA)对不同肝癌细胞株和正常肝细胞株增殖和凋亡的作用。初步研究 TSA 对 HBV 复制的影响。方法:应用四氮唑蓝(MTT)法,DNA 琼脂糖凝胶电泳检测经不同浓度 TSA 处理过的 3 种肝癌细胞株 HepG2、QGY7701、HepG2.2.15 和正常肝细胞株 L02,观察细胞增殖和凋亡的改变。用微离子酶联免疫法检测 TSA 处理组和对照组 HepG2.2.15 细胞上清中 HBsAg 和 HBeAg 的含量,实时荧光定量 PCR 检测细胞上清中 HBV DNA 含量,初步探讨 TSA 对 HBV 复制的影响。结果:TSA 在一定浓度范围内能明显抑制不同肝癌细胞株的增殖,呈剂量依赖关系。对正常肝细胞株 L02 的增殖无明显影响。DNA 凝胶电泳结果显示:在 TSA 处理组的 3 种肝癌细胞株 HepG2、QGY7701、HepG2.2.15 中可观察到细胞凋亡特异的 DNA 梯形带,然而,在对照组及正常肝细胞株中未见 DNA 梯形带。经 TSA 处理后的 HepG2.2.15 细胞上清中 HBsAg、HBeAg 及 HBV DNA 的含量均高于对照组 1 倍以上($P<0.05$)。结论:组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 虽然可抑制肝癌细胞增殖并诱导凋亡,但是,TSA 刺激 HBV 的复制。因此,对 HBV 阳性的肝癌患者,应尽量避免使用 TSA。

【关键词】曲古抑菌素 A;肝癌细胞株;增殖;凋亡;HBV
【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-21

Effects of trichostatin A(TSA) on the proliferation and apoptosis of hepatoma cell lines and the the replication of hepatitis B virus(HBV)

XIE Jing,et al

(*Department of Gastroenterology,the Second Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To compare the effect of histone deacetylase inhititor trichostatin A(TSA) on the proliferation and apotosis of different hepatoma cell lines and to investigate the effect of TSA on hepatitis B virus(HBV) replication. *Methods*:Human hepatoma cell lines HepG2,HepG2.2.15,QGY7701 and normal liver cell line L02 were treated with TSA, the effects on proliferation and apoptosis were examined by MTT assay and agarose gel electrophoresis of DNA; The viral proteins of hepatitis B surface antigen(HBsAg)and e antigen(HBeAg) in culture medium were measured using the Abbott Microparticle Enzyme Immunoassay kits;The medium HBV DNA levels were quantified using HBV real-time PCR kit. *Results*: (a)TSA treatment repressed proliferation and induced apoptosis in hepatoma cell lines; (b)The normal repressed proliferation and induced apoptosis in hepatoma cell lines; (b) The normal liver cell line L02 was not sensitive to the treatment of TSA; (c)TSA stimulated HBV replication. *Conclusions*:TSA treatment could inhibit proliferation of different hepatoma lines,and the normal liver cell line L02 is not sensitive to TSA treatment. However,TSA stimulates HBV replication. Therefore,our results suggest that TSA might be a good chemotherapic candidate for hepatocellular carcinoma patients without HBV infection but may not be suited to treat hepatocellular cancer patients with HBV infection.

【Key words】 Trichostatin A;Hepatoma cell lines;Proliferation;Apoptosis;HBV replication

肝细胞肝癌是常见的癌症之一[1,2]。外科切除肿瘤被认为是治疗肝细胞肝癌最为有效的方法。但临床确诊患者大多数已为中晚期,失去了手术机会。另外,肝细胞肝癌对放、化疗不敏感[3]。因此,寻找有效

作者介绍:谢 静(1978-),女,硕士,
研究方向:消化道肿瘤的发病机理与治疗。
通讯作者:梅浙川,男,教授,E-mail:meizhechuan@21cn.com。
基金项目:国家自然科学基金(30700708 和 30671869)资助。

重庆维普 http://www.cqvip.com

的治疗方法是目前肝病临床和科研工作者最重要的任务之一。

TSA 是 HDAC 抑制剂，能特异地抑制组HDAC；使高度酰基化的组蛋白积累，改变染色体结构，抑制细胞增殖，诱导肿瘤细胞分化和(或)凋亡，是一类具有广泛应用前景的抗肿瘤药物之一[4]。本实验研究比较了 TSA 对体外不同肝癌细胞株及正常肝细胞株增殖和凋亡的作用，并初步探讨 TSA 对HBV 复制的影响。

1 材料与方法

1.1 药物

TSA 购自 sigma 公司(美国)，用无水乙醇配成 4mmol/L 储存溶液置于 -20℃保存。

1.2 细胞培养

HepG2(人肝癌细胞株)、QGY7701(人肝癌细胞株)、HepG2.2.15(HepG2 转染 HBV 全基因组形成)、L02(人正常肝脏细胞)由重庆医科大学附属第二医院病毒性肝病研究所提供，细胞培养在 10%小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司) RPMI1640(美国 GIBCO 公司)培养液中(内含 100U/ml 青链霉素)，置于 37℃，5%CO_2 孵箱中培养，取对数生长期细胞进行实验。

1.3 MTT 法检测细胞增殖

将不同细胞株制成 5×10^4 个 /ml 悬液，种植于 96 孔培养板内，每孔 200μl(1×10^4 个 / 孔)。每种细胞株分别设以下各组：TSA 组(加入不同浓度的 TSA)，对照组加等量体积的乙醇，另设空白对照组(只加培养基，无细胞)，每组设 3 个复孔。继续培养，分别在 24、48、72h 后吸去上清，每孔加无血清培养液 200μl 及 5mg/ml MTT20μl，继续培养 4h 后吸去上清液，每孔加 DMSO 200μl，振荡 15min，用全自动酶标仪检测 490nm 处的吸光度值(A 值)。计算各细胞各药物组的抑制率=($A_{对照}-A_{实验}$)/($A_{对照}$)×100% 和半抑制率(IC_{50})。IC_{50} 是细胞抑制率 50%的时候药物的浓度。把药品稀释成不同的浓度，然后计算各自的抑制率，以药品的浓度为横坐标，抑制率为纵坐标作图，然后得到 50%抑制率时候的药品浓度，就是 IC_{50}。

1.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳法检测确定凋亡

将不同细胞株制成 1×10^6 个 /ml 悬液，种植于 6 孔培养板内，每孔 500μl(5×10^5 个 / 孔)。每种细胞株分别设 2 组：TSA 组(加入 1μmol/L 的 TSA)，对照组加等量体积的培养基，培养 3d 后，收集细胞。加入 lysis buffer 1ml(10mmol/L Tris-Hcl，pH7.4，10mmol/L EDTA，0.5%硫酸钠，100μg/ml RNase A) 使细胞充分裂解，放在 37℃孵育 1h，随后加入 100μg/ml 的蛋白酶 K 在 50℃孵育 4h，然后加入 0.1ml 3mol/L 醋酸钠和 2.5ml 冰预冷的乙醇过夜沉淀 DNA。13 000g 离心 15min 获得 DNA 沉淀，然后重悬于 Tris-EDTA buffer(10mmol/L Tris，pH 7.4，1mmol/L EDTA)。DNA 样品加到含 10μg/ml 溴化乙锭的 1.8%的琼脂糖凝胶中电泳 1h 后在紫外灯下照射显像。

1.5 微粒子酶联免疫法(MEIA)测定 HepG2.2.15 细胞上清 HBSAg 与 HBeAg 含量及荧光定量 PCR 检测细胞上清中 HBV DNA 含量

将 HepG2.2.15 细胞制成 2.5×10^5 个 /ml 悬液，种植于 1 个 6 孔板内，每孔 2ml。设 2 组，TSA 组，加入 0.2μmol/L 的 TSA，对照组加乙醇 0.1μl，每组设 3 个复孔。TSA 作用 48h 后收集细胞的上清，(1)使用美国 Abbott 公司生产的第 3 代 HBV 血清学检测试剂，通过 MEIA 检测方法，用 AXSYM 自动酶标检测仪检测 HBSAg 与 HBeAg 的含量。(2)按照中山大学达安基因股份有限公司生产的 HBV DNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒操作说明书检测 HBV DNA 含量。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，统计学分析采用 SPSS14.0 软件进行方差分析。

2 结 果

2.1 TSA 抑制肝癌细胞增殖

MTT 法结果显示：与对照组细胞相比，经不同浓度 TSA 处理的 3 种肝癌细胞株(HepG2，QGY7701，HepG2.2.15)的增殖均受不同程度的抑制，并呈时间、浓度依赖性。然而，不同剂量的 TSA 对正常肝细胞株 L02 的抑制作用明显低于对 3 种肝癌细胞株的抑制作用($P<0.05$)。计算 IC_{50}，HepG2 和 QGY7701 均是 0.1μmol/L，HeapG2.2.15 的 IC_{50} 是 0.2μmol/L，然而正常肝细胞株 L02 的 IC_{50} 是 HepG2 和 QGY7701 的 8 倍，即 0.8μmol/L(表 1)。

2.2 TSA 诱导肝癌细胞凋亡

琼脂糖凝胶电泳可见：对照组细胞以及经 TSA 处理 3d 后的 L02 细胞均未发生凋亡，DNA 双链完整，分子量大，滞留在加样孔附近，未形成 DNA ladder。用 1μmol/L TSA 处理 3d 的 HepG2，QGY7701 和 HepG2 2.2.15 细胞核 DNA 裂解为 180～200bp 及其整数倍的寡核苷酸片断，出现典型的云梯状细胞凋亡 DNA ladder(图 1)。

2.3 TSA 刺激 HBV 复制

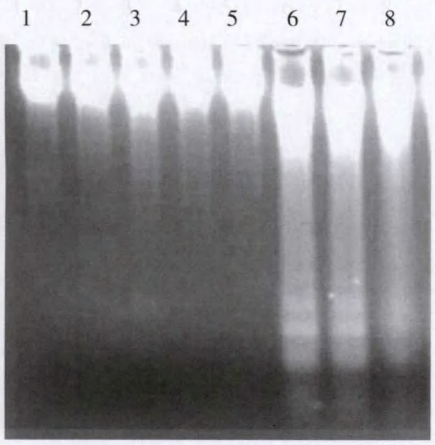
MEIA 法结果显示：经 TSA 处理 48h 后的 HepG2.2.15 细胞上清中 HBsAg 和 HBeAg 的水平均高于对照组，处理组上清 HBSAg 和 HBeAg 水平分别是对照组的 1.78 倍和 1.61 倍($P<0.05$ 图 2)。荧光定量PCR 结果显示：经 TSA 处理 48h 后的 HepG2.2.15 细胞上清中 HBV DNA 的表达量明显高于对照组，处理组细

重庆维普 http://www.cqvip.com

表 1 不同浓度 TSA 对不同肝癌细胞增殖的抑制（$\bar{x} \pm s$）

细胞	作用时间(h)	不同药物浓度的抑制率(%)			*IC_{50}(μmol/L)
		0.05 μmol/L	0.1 μmol/L	0.2 μmol/L	
HepG2	24	6 ± 0.72	12 ± 1.53	24 ± 1.64	0.1
	48	17 ± 1.73	34 ± 1.33	45 ± 1.34	
	72	31 ± 1.65	50 ± 1.23	67 ± 1.45	
QGY7701	24	7 ± 0.68	14 ± 1.43	30 ± 1.28	0.1
	48	15 ± 1.73	31 ± 1.41	43 ± 1.68	
	72	28 ± 1.85	49 ± 1.55	63 ± 1.73	
HepG2.2.15	24	5 ± 0.67	11 ± 1.89	23 ± 1.67	0.2
	48	13 ± 1.68	25 ± 1.73	37 ± 1.61	
	72	23 ± 1.41	36 ± 1.85	50 ± 1.76	
L02	24	3 ± 0.63	7 ± 0.63	12 ± 1.72	0.8
	48	7 ± 0.72	11 ± 1.08	18 ± 1.23	
	72	9 ± 0.21	14 ± 1.72	23 ± 1.58	

*IC_{50}:TSA 作用 72h 后，细胞被抑制 50%的半数抑制浓度



1～4. 对照组；5～8. TSA 处理组；1. HepG2; 2. QGY; 3. HepG2.2.15; 4. L02; 5. L02; 6. HepG2; 7. QGY; 8. HepG2.2.15

图 1 对照组与经 TSA 处理 72h 后细胞 DNA 电泳图

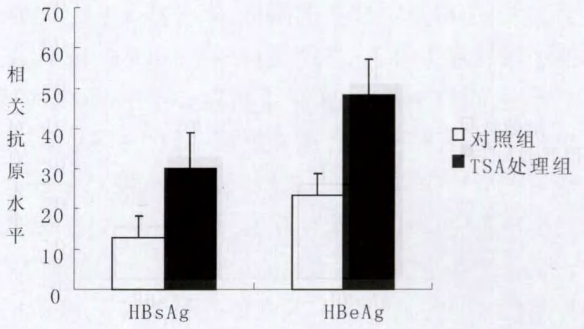


图 2 TSA 处理组与对照组 HepG2.2.15 细胞上清 HBSAg 与 HBeAg 表达量

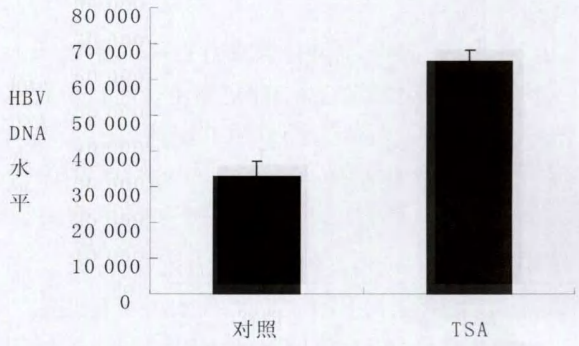


图 3 TSA 处理组与未处理组 HepG2.2.15 细胞上清 HBV DNA 的表达量

胞上清中的 HBV DNA 的含量是对照组的 1.98 倍（$P<0.05$，图 3）。

3 讨 论

核染色质结构的改变已经被证明与肿瘤的形成和发展有关。抑癌基因的异 P 常沉默是肿瘤形成的重要机制之一。组蛋白去乙酰化酶导致核染色质结构更紧密，转录因子及 RNA 多聚酶不容易结合靶基因，从而抑制基因表达[5]。因过度表达或组蛋白去乙酰化酶异常活化而导致的组蛋白乙酰化程度降低与肿瘤的发生、发展密切相关。HDAC 抑制剂可抑

重庆维普 http://www.cqvip.com

制多种肿瘤细胞体外增殖、促进分化和诱导凋亡，可能与影响 survivin，p53 等途径有关。HDAC 抑制剂可能解除肿瘤细胞中相关基因转录的异常抑制，恢复正常的基因表达谱。目前，有多个 HDAC 抑制剂正处于针对各种癌症的Ⅱ/Ⅲ期试验中。

TSA 源自链霉菌代谢产物，是组蛋白去乙酰化酶的强效抑制剂，可在 nmol/L 水平抑制酶的活性，对肝癌、胃癌、宫颈癌、前列腺癌及神经母细胞瘤等肿瘤细胞具有明显的抑制增殖，诱导分化或促进凋亡的作用[6,7]。本实验结果也证明 TSA 对肝癌细胞增殖有明显的抑制作用，这种抑制作用呈时间剂量依赖关系，而其对正常的肝细胞株 L02 的抑制作用不明显。

细胞凋亡最突出的生物学特征是染色质的有控降解，DNA 双链在核小体联结处断裂，形成约180～200bp 的片段或其倍数的片段，琼脂糖凝胶电泳呈现梯形图谱。本实验结果表明：在 1 μmol/L TSA 作用 3d 后，正常肝细胞 L02 组未发生凋亡，DNA 链完整，分子量大，滞留在加样孔的附近，未形成 DNA ladder。各肝癌细胞株出现了典型的 DNA ladder。TSA 促进了肝癌细胞的凋亡，抑制了增殖，对正常的肝细胞株 L02 无明显影响，与相关报道一致[8]。TSA 抑制肿瘤细胞增长促进凋亡的机制可能与依赖 Caspase 途径及非依赖 Caspase 途径有关，据报道 TSA 与依托泊苷联合依赖 AIF 促发 Caspase 诱导非小细胞肺癌细胞凋亡[9]。TSA 通过调节凋亡相关基因 Bax，Bcl-2 等非 Caspase 途径诱导胃癌细胞 SGC-7901 凋亡[10]。TSA 诱导细胞凋亡的分子机制是非常复杂的，弄清其中的关键基因及其调节方式将为肿瘤化疗开辟新途径[11]。

在我国，HBV 感染是原发性肝癌的重要诱因之一，原发性肝癌常常合并 HBV 感染。而在对肝癌的治疗过程中，乙肝病毒的复制可能造成进一步的肝损害。因此，本实验进一步研究了 TSA 与 HBV 复制的关系。MEIA 法及荧光定量 PCR 结果显示：TSA 作用 48h 后，HepG2.2.15 细胞上清中乙肝表面抗原、核心抗原以及 HBV DNA 明显高于对照组。本实验初步提示：TSA 可以刺激 HBV 复制，此结果作用机制可能是由于组蛋白乙酰化与基因的转录有关。在 TSA 作用下，与 HBV DNA 相结合的组蛋白乙酰化水平增加，染色体结构变得更为松散，有利于转录因子及 HBV DNA 多聚酶结合模板 DNA，增强转录，从而刺激 HBV 复制。该作用机制有待进一步的验证。目前该现象国内外还未见报道。

综上所述，TSA 在体外抑制肝癌细胞增殖并诱导凋亡，但对正常肝细胞株无明显影响。此外，TSA 刺激 HBV 复制。因此，TSA 可能用来治疗 HBV 阴性的肝细胞肝癌，但是，对于 HBV 阳性的肝细胞肝癌来说，应当慎用。

参 考 文 献

[1] Llovet JM, Buroughs A, Brix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2003; 362(2): 1907-1917.

[2] El-Serag HB, Davila JA, Petersen JN, et al. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update[J]. Ann Intern Med, 2003; 139(6): 817-823.

[3] Gish RG. Hepatocellular carcinoma: overcoming challenges in disease management[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006; 21(8): 252-261.

[4] Burroughs A, Hochhauser D, Meyer T. Systemic treatment and liver transplantation for hepatocellular carcinoma: two ends of the therapeutic spectrum[J]. Lancet Oncol, 2004; 64(5): 409-418.

[5] Zhang Y, Carr T, Dimtchev A, et al. Attenuated DNA damage repair by trichostatin A through BRCA 1 suppression[J]. Radiat Res, 2007; 168(1): 115-124.

[6] Alao Jp, Lam EW, Ali S, et al. Histone deacetylase inhibitor trich ostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation if cyclin D1 in human breastcarcinoma cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2004; 10(23): 8094-8104.

[7] Hu ED, Chen ZX, Fredrickson T, et al. Cloning and characterizat ion of a novel human class 1 histoned eacetylase that functionsas a tran scription repressor[J]. BioChem, 2000; 275(20): 15254-15264.

[8] 刘春燕，孙海晶，陆 军. 组蛋白乙酰化与癌症[J]. 生物化学与生物物理进展，2003; 30(1): 19-23.

[9] Haji N, Wallenboq K. Combinatorial action of the HDAC inhibitor trichostatin A and etoposide induces caspase-mediated AIF-dependent apoptotic cell death in non-small cell lung carcinoma cells[J]. Oncogene advance, 2007; 10(10): 1038-1045.

[10] Wu ZQ, zhanq R. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induced caspase-independent apoptosis in human gastric cancer cell [J]. Chin Med, 2007; 120(23): 2112-2118.

[11] 沈 蓉，陶仪声. 丁酸钠对食管癌 Eca-109 细胞增殖和凋亡的作用[J]. Bengbu Med coll, 2006; 31(4): 336-338.

（责任编辑：谭乐勤）