肿瘤诊断与治疗

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000787

SAHA对骨肉瘤 143B 细胞的抑制作用及机制研究

姚　娟[1]，翁亚光[1]，严树涓[1]，侯梦一[1]，靳雅倩[2]，王　豪[1]，左国伟[1]
（1. 重庆医科大学检验医学院 临床检验诊断学教育部重点实验室，重庆 400016；
2. 河北北方学院医学检验学院，张家口 075000）

[摘　要]目的：探讨伏立诺他（suberoylanilide hydroxamic acid，SAHA）对骨肉瘤细胞 143B 增殖和凋亡的影响及其可能机制。方法：以 2~32 μmol/L 的 SAHA 作用于体外培养的 143B 细胞，采用 MTT 法检测 SAHA 对细胞活力的影响；选用 SAHA 作用的最适浓度和时间点进行后续的研究，并以加入最大剂量为 1 ml/L 的 DMSO 处理组作为空白对照。流式细胞仪检测细胞周期和凋亡水平变化；real-time PCR 检测细胞周期和凋亡相关基因 Cyclin D1、Bax、Bcl-2 以及组蛋白去乙酰化酶（histone deacetylases，HDACs）的基因表达；化学比色法检测 143B 细胞中 HDACs 活性的变化；荧光素酶报告基因筛选 SAHA 处理后细胞内可能激活的信号通路；Western blot 检测 143B 细胞中 Cyclin D1、Bax、Bcl-2、cleaved-Caspase-3、cleaved-PARP 及 AP1 蛋白的表达水平。结果：SAHA 在 2~32 μmol/L 浓度范围内可以抑制 143B 细胞的增殖，并且呈时间和剂量依赖性，48 h 引起 143B 细胞半数抑制的浓度约为 8 μmol/L。SAHA 可将 143B 细胞周期阻滞在 G0/G1 期，并且可以引起细胞的早期凋亡及 Cyclin D1、Bcl-2、HDAC1、HDAC3 的 mRNA 表达量下调，Bax 的 mRNA 表达量上调；SAHA 处理 143B 细胞后可以降低细胞内 HDACs 的活性，促进细胞中转录因子 AP1 的表达，并且能够下调细胞中 Cyclin D1、Bcl-2 的蛋白表达，促进 Bax、cleaved-Caspase-3、cleaved-PARP 及 AP1 的蛋白表达。结论：SAHA 可以通过抑制 HDACs 的活性，激活 AP1 信号通路从而诱导 143B 细胞的凋亡及周期阻滞。

[关键词]伏立诺他；骨肉瘤；细胞周期；凋亡；组蛋白去乙酰化酶
[中图分类号]R738.1　　[文献标志码]A　　[收稿日期]2015-05-25

Inhibitory effect of SAHA on human osteosarcoma 143B cells and its related mechanism

Yao Juan[1], Weng Yaguang[1], Yan Shujuan[1], Hou Mengyi[1], Jin Yaqian[2], Wang Hao[1], Zuo Guowei[1]
(1. Key Laboratory of Medical Diagnostics Founded by Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. College of Lab Medicine, Hebei North University)

[Abstract] ***Objective*** To investigate the effects of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) on the proliferation and apoptosis of human osteosarcoma 143B cells *in vitro* and to explore its underlying mechanisms. ***Methods*** 143B cells were treated with SAHA at various concentrations (2–32 μmol/L) and the cell viability was measured by MTT assay. The optimal concentration and time point of SAHA function were chosen for subsequent research, and the group adding the maximum dose of 1 ml/L DMSO was taken as blank control. Flow cytometry (FCM) was used to evaluate the level of cell cycle and apoptosis rate; the expression levels of Cyclin D1, Bax, Bcl-2, and HDACs mRNAs were examined by RT-PCR; the HDACs activity of 143B cells was measured by chemical colorimetry. The probable signaling pathways activation after SAHA treatment was tested by luciferase reporter assay. Western blot was used to detect the protein expression levels of Cyclin D1, Bax, Bcl-2, cleaved-Caspase-3, cleaved-PARP and AP1. ***Results*** The cell viability of 143B cells was inhibited by SAHA (2–32 μmol/L) in a dose- and time-dependent manner, and the concentration of IC50 at 48 h was 8 μmol/L. Compared with that of control group, SAHA arrest the cell cycle at G0/G1 phase and induce apoptosis of 143B cells. SAHA treatment inhibited the expression level of cyclinD1, bax, bcl-2 and HDACs while induced the bax expression, both in mRNA and protein levels. HDAC activity of 143B cells treated with SAHA was reduced. Luciferase reporter assay indicated that AP1 transcription factor expression can be promoted by SAHA treatment. At the same time, the expression level of cleaved-Caspase-3, cleaved-PARP and AP1 protein were elevated significantly in 143B cells after SAHA treatment. ***Conclusion*** SAHA can induce apoptosis and cell cycle arrest of 143B cells in vitro, which may be possibly via inhibition of the activity of HDACs and activation of the AP1 signaling pathways.

[Key words] suberoylanilide hydroxamic acid; osteosarcoma; cell cycle; apoptosis; histone deacetylase

作者介绍：姚　娟，Email：396597795@qq.com，
研究方向：分子肿瘤与分子诊断学。
通信作者：左国伟，Email：17305105@qq.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81102035）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20151022.2102.006.html（2015-10-22）

骨肉瘤是起源于间叶组织的恶性结缔组织肿瘤，多发于青少年，具有较高的转移能力。目前针对于骨肉瘤的治疗主要以外科手术切除辅以化疗为主，但预后极差，5 年生存率仅为 5%~20%[1-2]。因此，积极寻找新的治疗药物以改善骨肉瘤病人的生存率成为亟待解决的问题。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂（histone deacetylase inhibitors，HDACIs）是近年来出现的一类新型抗肿瘤药物，因其具有的高效、低毒的优势而备受关注[3]。伏立诺他（suberoylanilide hydroxamic acid，SAHA）是一组新型的 HDACI，能通过诱导细胞分化，阻断细胞周期而发挥作用，目前主要用于治疗加重、持续和复发或用两种全身性药物治疗后无效的皮肤 T 细胞淋巴瘤[4]。研究表明 SAHA 对于多种实体肿瘤有显著的抑制作用，已有部分应用到 II 期临床试验[5]。然而，有关 SAHA 在骨肉瘤中的作用却鲜有报道。

本课题以恶性程度较高的骨肉瘤 143B 细胞为目标检测 SAHA 对其增殖、周期、凋亡等方面的影响，并对相关机制初步探讨，以期为骨肉瘤的临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨肉瘤细胞株 143B 由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室何通川教授惠赠（来源于 ATCC）。DMEM 高糖培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。SAHA 粉末 5 mg 购自美国 Sigma 公司；噻唑蓝（methyl thiazolyl tetrazolium，MTT）和二甲基亚砜（DMSO）购自北京索莱宝科技有限公司；TRIzol 试剂和脂质体购自美国 Invitrogen 公司；RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司；PCR 引物由上海生工生物合成；HDAC 活性检测试剂盒（比色法）和细胞核/浆组分分离试剂盒购自美国 BioVision 公司；荧光素酶报告质粒（pAP1-luc、pMYC-luc、pSTAT-luc、pNFAT-luc、pNFkB-luc）为本课题组前期保存；蛋白质提取及 Western blot 相关试剂购自上海碧云天生物技术有限公司；细胞周期及凋亡检测试剂盒由重庆医科大学生命科学院流式细胞实验室提供。兔抗人 Bcl-2、cleaved-Caspase-3、cleaved-PARP、AP1 单克隆抗体购自 ImmunoWay 公司；小鼠抗人 Cyclin D1、Bax、β-Actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔 IgG 和抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人骨肉瘤细胞株 143B 用含有 10%胎牛血清，100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的温育箱中培养。当细胞达 70%~80%融合率时，0.25%胰酶消化并传代。

1.2.2 MTT 法检测 143B 细胞活力 取对数增殖期细胞悬液，调整密度为 3×10^4 个/ml 接种于 96 孔板中，每孔 100 μl，约 3 000 个细胞。12 h 后更换无血清培养基，并加入不同处理因素：药物组为 2~32 μmol/L 的不同浓度的 SAHA，同时设加入最大剂量为 1 ml/L 的 DMSO 的空白对照组，每组设 5 个复孔），此时记为 0 h。分别培养 24、48、72 h 后，每孔加入 5 mg/ml MTT 试剂 10 μl，继续培养 4 h。小心吸尽上清，加入 150 μl/孔 DMSO，避光振荡混匀 10 min 至结晶完全溶解，酶标仪 490 nm 处检测各孔吸光度（absorbance，A）值，并计算药物对细胞的抑制率及确定药物作用浓度。抑制率（IR%）=[1-A 处理/A 空白]×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡 常规接种细胞于 6 孔板中，待细胞密度为 60%~70%时，分别加入不同浓度的 SAHA，并设只加 DMSO 的空白对照组，更换无血清培养基继续培养。48 h 后收集各组细胞，PBS 洗涤 2 次，1 000 r/min 离心 10 min 后收集细胞送重庆医科大学生命科学院流式细胞实验室检测；FACScan 分析实验结果。

1.2.4 Real-time PCR 检测 Cyclin D1、Bax、Bcl-2、HDACs 基因的 mRNA 表达水平 收集经过不同处理的各组细胞，提取总 RNA，取 2 μg 反转录为 cDNA，以 1 μl cDNA 为模板进行 PCR 反应。引物序列及产物长度如下：Cyclin D1 上游：5'-CCTGTCGCTGGAGCCCGTG-3'，下游：5'-TCCGCCTCTGGCATTTTGG-3'，产物 252 bp；Bax 上游：5'-CCCTTTTGCTTCAGGGTTTC-3'，下游：5'-TGTTACTGTCCAGTTCGTCC-3'，产物 150 bp；bcl-2 上游：5'-GAGACAGCCAGGAGAAATCA-3'，下游：5'-CCTGTGGATGACTGAGTACC-3'，产物 128 bp；HDAC1 上游：5'-AGTGCGGTGGTCTTACAGTG-3'，下游：5'-TCTCCCTCCTCTTCAGAATCG-3'，产物 521 bp；HDAC2 上游：5'-AGTCAAGGAGGCGGCAAAA-3'，下游：5'-TGCGGATTCTATGAGGCTTCA-3'，产物 103 bp；HDAC3 上游：5'-TCTCCCTCCTCTTCAGAATCG-3'，下游：5'-GACTCTTGGTGAAGCCTTGC-3'，产物 199 bp。反应结束后 PCR 产物行 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，并采用 Quantity One 4.6.2 软件对电泳结果进行灰度值分析，以 GAPDH 为内参照，计算各基因的 mRNA 相对表达水平。

1.2.5 化学比色法检测 SAHA 对 143B 细胞 HDACs 活性的影响 收集药物处理 12 h 后各组细胞，预冷 PBS 漂洗 2 次，按照细胞核/浆组分分离试剂盒（BioVision，K266-100）说明提取核蛋白，并按照 HDAC 活性检测试剂盒（比色法）（BioVision，K332）说明操作，检测 405 nm 波长处的 A 值。

1.2.6 荧光素酶报告基因检测信号通路激活情况 取对数生长期 143B 细胞，以 2×10^6 个/ml 的密度接种于 24 孔板中，待细胞贴壁后，以无血清 DMEM 培养基洗 3 次，重新加入 250 μl 无血清的 DMEM 培养基，并加入脂质体与荧光报告

基因质粒，37 ℃孵育 4 h，弃去上清，加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，同时加入不同处理因素，于 24 h 后检测荧光素活性。

1.2.7 Western blot 法检测 Cyclin D1、Bax、Bcl-2、cleaved-Caspase-3、cleaved-PARP 及 AP-1 等蛋白的表达 不同浓度药物处理细胞 24 h 后，收集细胞提取总蛋白，BCA 法检测蛋白浓度。经 10% SDS-PAGE 电泳，转膜，5% BSA 封闭，加入一抗（1∶1 000 稀释），4 ℃孵育过夜。次日预冷 TBST 洗膜 3 次，加入二抗（1∶5 000 稀释），37 ℃孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，ECL 发光液显色成像。采用 Quantity One 4.6.2 软件分析灰度值，以 β-Actin 为内参照，计算蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

实验结果采用 SPSS 17.0 统计软件分析。各实验均独立重复 3 次，结果数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间均数比较采用单因素方差分析，实验组与对照组比较采用 Dunnett-t 法。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 SAHA 对骨肉瘤 143B 细胞的增殖抑制作用

MTT 法检测结果显示，SAHA 作用 143B 细胞 48 h 后，在 2~32 μmol/L 浓度范围内具有明显的抑制增殖作用，并具有一定的剂量依赖性（图 1，表 1）。SAHA 作用于 143B 细胞的 48 h 的半数抑制浓度约为 8 μmol/L。

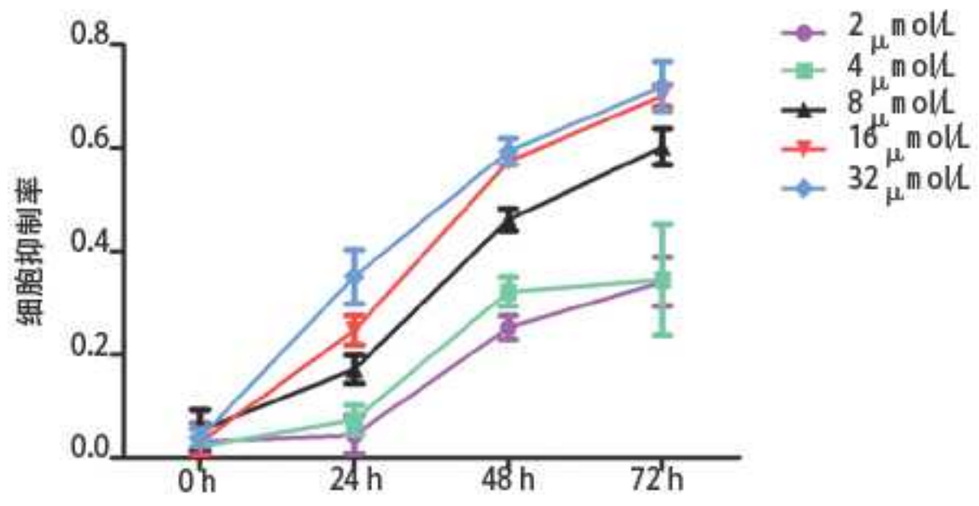
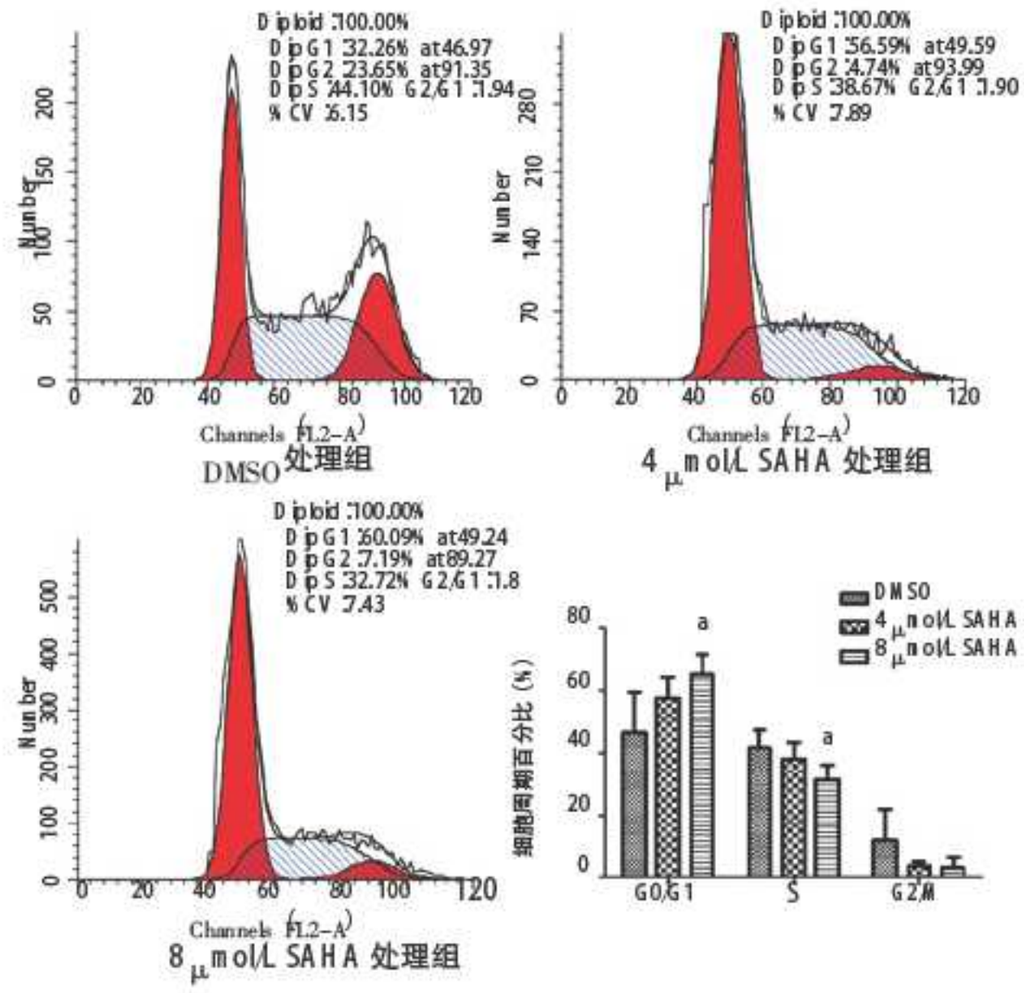


图 1 MTT 法检测 SAHA 对 143B 细胞活力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.1 MTT assay of cell viability of 143B cells with SAHA treatment（$\bar{x}\pm s$，n=3）

2.2 SAHA 可诱导 143B 的细胞周期阻滞

FCM 结果显示，8 μmol/L SAHA 处理组与空白对照组相比，G0/G1 期细胞比例明显增多（P=0.026），S 期减少（P=0.013），细胞周期被阻滞于 G0/G1 期，且差异具有统计学意义（图 2，表 2）。



a，与空白对照组（DMSO 处理组）比较，P<0.05

图 2 流式细胞仪检测 143B 细胞周期改变（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.2 Flow cytometry analysis of cell cycle of 143B cells with SAHA treatment（$\bar{x}\pm s$，n=3）

2.3 SAHA 可诱导 143B 细胞的早期凋亡

4 μmol/L 和 8 μmol/L SAHA 能够诱导 143B 细胞发生凋亡，且浓度越高，凋亡率越大，与空白对照组相比，差异具有统计学意义（P=0.012，图 3，表 3）。

2.4 SAHA 调控 143B 细胞中的 Cyclin D1、Bax、Bcl-2、HDAC1、HDAC2、HDAC3 等基因的 mRNA 表达

Rea-time PCR 结果显示，8 μmol/L SAHA 处理组 Cyclin D1、Bcl-2、HDAC1、HDAC3 的 mRNA 表达量均低于空白对照组（P<0.05），而 Bax 的 mRNA 表达量则明显高于空白对照组（P=0.007），差异具有统计学意义。HDAC2 的基因表达水平则无明显改变（P>0.05，图 4、表 4）。

表 1 MTT 法检测各处理组的细胞抑制率（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1 Inhibition rate of each group detected by MTT（$\bar{x}\pm s$，n=3）

细胞抑制率	2 μmol/L	4 μmol/L	8 μmol/L	16 μmol/L	32 μmol/L	F 值	P 值
0 h	0.03± 0.03	0.03± 0.02	0.03± 0.02	0.03± 0.02	0.04± 0.02	0.454	0.768
24 h	0.05± 0.04	0.07± 0.03	0.17± 0.03	0.25± 0.03	0.35± 0.05	36.876	0.000
48 h	0.25± 0.02[a]	0.32± 0.03[a]	0.46± 0.02[a]	0.57± 0.02[a]	0.59± 0.03[a]	132.534	0.000
72 h	0.34± 0.05	0.35± 0.11	0.60± 0.34	0.70± 0.02	0.72± 0.05	29.548	0.000

注：a，48 h 各浓度处理组比较，P=0.000

表 2　流式细胞仪检测各组 143B 细胞周期分布（$\bar{x}\pm s$，n=3，%）

Tab.2　Cell cycle distribution of 143B cells detected by FCM（$\bar{x}\pm s$，n=3，%）

组别	G0/G1	S	G2/M
空白对照组（组 1）	49.74± 8.13	45.02± 0.81	8.61± 4.37
4 mol/L SAHA 处理组（组 2）	56.20± 4.09	38.14± 5.25	4.12± 1.24
8 mol/L SAHA 处理组（组 3）	66.64± 5.42	31.28± 5.05	3.60± 3.12
F 值	5.836	7.913	2.247
P 值	0.039	0.021	0.187

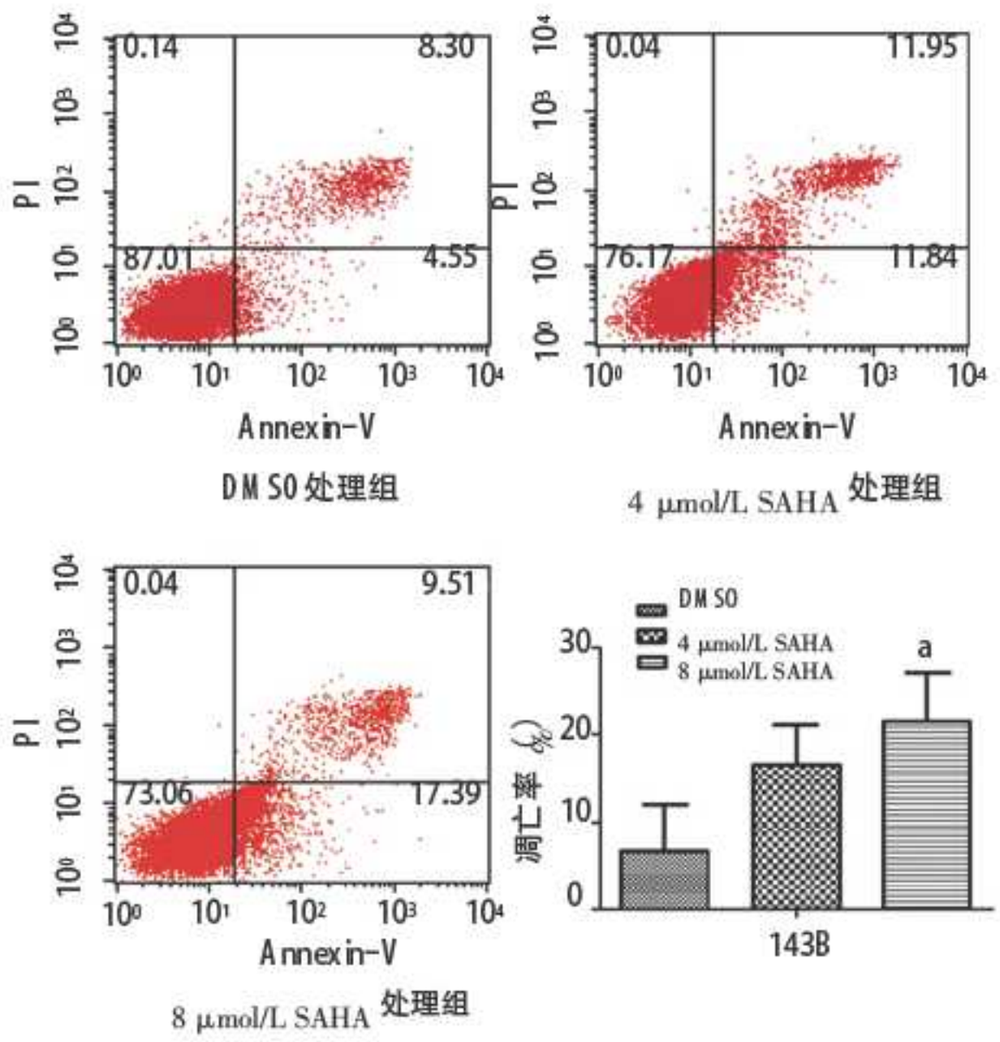
注：G0/G1 期：组 2 与组 1 比，P=0.384；组 3 与组 2 比：P=0.026；S 期：组 2 与组 1 比，P=0.157；组 3 与组 2 比：P=0.013；G2/M 期：组 2 与组 1 比，P=0.223；组 3 与组 2 比：P=0.171

表 3　流式细胞仪检测各组 143B 细胞凋亡水平（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3　Cell apoptosis rate of 143B cells detected by FCM（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	细胞凋亡率（%）
空白对照组（组 1）	6.63± 5.37
4 mol/L SAHA 处理组（组 2）	16.61± 4.43
8 mol/L SAHA 处理组（组 3）	21.46± 5.53
F 值	6.517
P 值	0.031

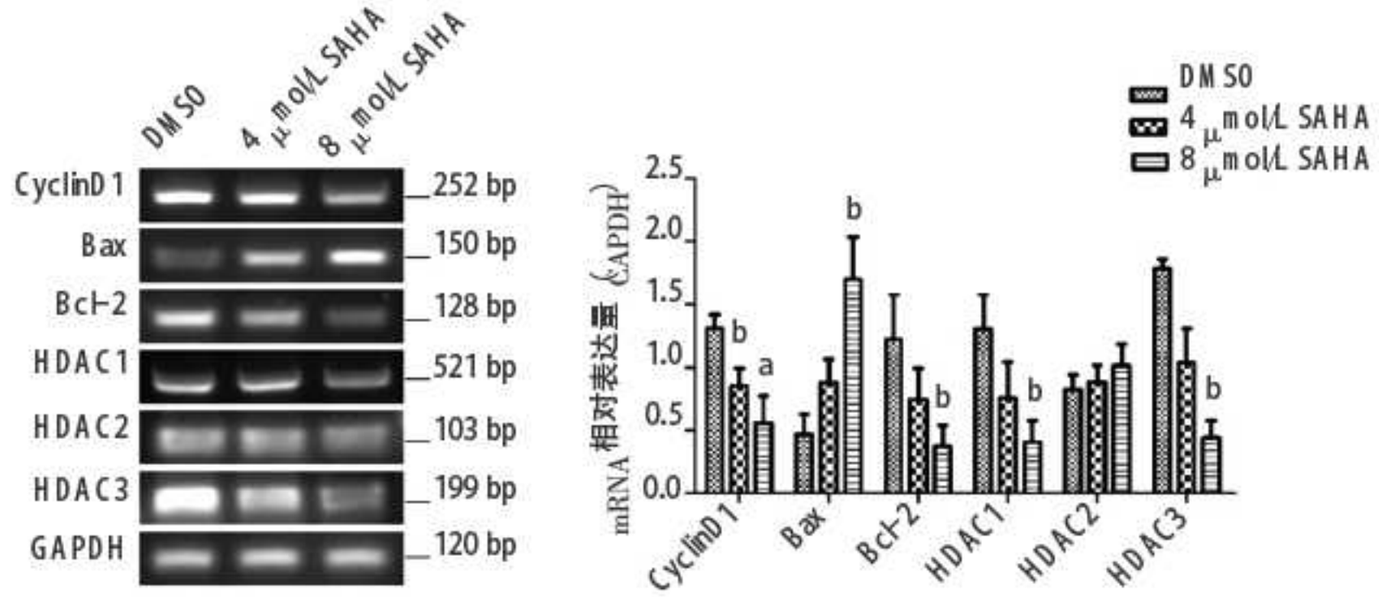
注：组 2 与组 1 比，P=0.094；组 3 与组 2 比：P=0.022



a，与空白对照组（DMSO 处理组）比较，P=0.022

图 3　流式细胞仪检测 143B 细胞早期凋亡率（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.3　Flow cytometry analysis of apoptosis rate of 143B cells with SAHA treatment（$\bar{x}\pm s$，n=3）



a，与空白对照组（DMSO 处理组）比较，P<0.01；b，与空白对照组（DMSO 处理组）比较 P<0.05

图 4　Real-time PCR 检测 143B 细胞 Cyclin D1、Bax、Bcl-2、HDAC1、HDAC2、HDAC3 mRNA 的表达（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.4　Detection of mRNA expression levels of Cyclin D1，Bax，Bcl-2，HDAC1，HDAC2，HDAC3 in 143B cells by real-time PCR（$\bar{x}\pm s$，n=3）

表 4　Real-time PCR 检测各组 143B 细胞基因的表达（$\bar{x}\pm s$，n=3）

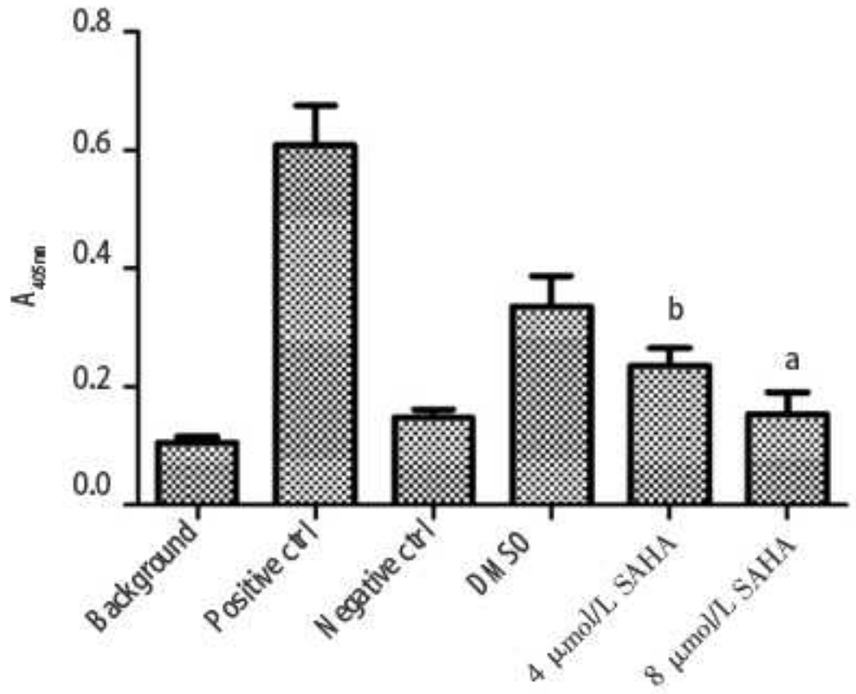
Tab.4　Detection of mRNA expression levels in 143B cells by real-time PCR（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	Cyclin D1	Bax	Bcl-2	HDAC1	HDAC2	HDAC3
空白对照组（组 1）	1.310± 0.106	0.467± 0.164	1.227± 0.352	1.170± 0.361	0.823± 0.115	1.647± 0.289
4 mol/L SAHA 处理组（组 2）	0.857± 0.137	0.883± 0.180	0.747± 0.248	0.760± 0.282	0.887± 0.132	1.007± 0.409
8 mol/L SAHA 处理组（组 3）	0.560± 0.214	1.500± 0.488	0.367± 0.172	0.307± 0.151	1.013± 0.170	0.510± 0.347
F 值	17.000	8.169	7.768	7.209	1.409	7.867
P 值	0.003	0.019	0.022	0.025	0.315	0.021

注：Cyclin D1：组 2 与组 1 比，P=0.023；组 3 与组 2 比：P=0.002；Bax：组 2 与组 1 比，P=0.256；组 3 与组 2 比：P=0.012；Bcl-2：组 2 与组 1 比，P=0.120；组 3 与组 2 比：P=0.014；HDAC1：组 2 与组 1 比，P=0.202；组 3 与组 2 比：P=0.016；HDAC2：组 2 与组 1 比，P=0.812；组 3 与组 2 比：P=0.247；HDAC3：组 2 与组 1 比，P=0.115；组 3 与组 2 比：P=0.013

2.5 SAHA 可调节 143B 细胞中 HDACs 的活性

化学比色法检测 HDACs 活性结果显示，经 4 μmol/L SAHA 处理后，143B 细胞中 HDACs 的活性有所下降（$P=0.011$）；增加药物浓度后，HDACs 活性减低的程度进一步增加，与空白对照组相比，差异具有统计学意义（$P<0.001$，图 5，表 5）。



a，与空白对照组（DMSO 处理组）比较，$P=0.003$；

b，与空白对照组比较，$P=0.045$

图 5 化学比色法检测 143B 细胞内 HDACs 活性变化（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig.5 Colorimetric assay of HDACs activity in 143B cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

表 5 化学比色法检测各组 143B 细胞 HDACs 活性（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

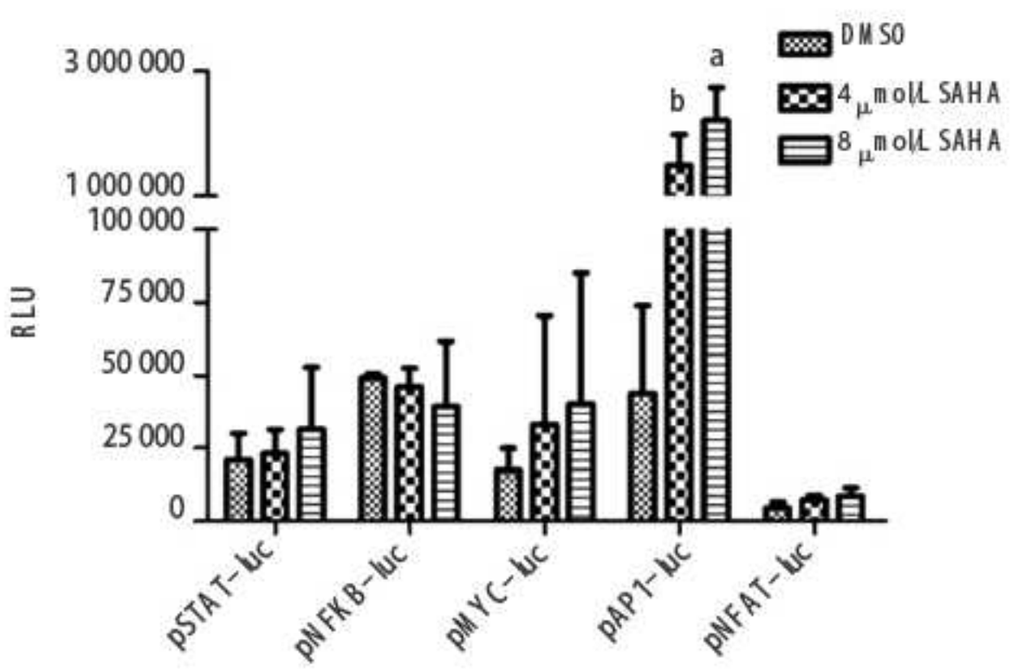
Tab.5 Colorimetric assay of HDACs activity in 143B cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	HDACs 活性
背景组（H_2O）（组 1）	0.107± 0.009
阳性对照组（HeLa NE）（组 2）	0.609± 0.066
阴性对照组（HeLa NE+TSA）（组 3）	0.148± 0.014
空白对照组（DMSO）（组 4）	0.335± 0.053
4 mol/L SAHA 处理组（组 5）	0.236± 0.030
8 mol/L SAHA 处理组（组 6）	0.153± 0.037
F 值	65.677
P 值	0.000

注：组 5 与组 4 比，$P=0.045$；组 6 与组 4 比：$P=0.003$

2.6 SAHA 可激活 143B 细胞中凋亡相关信号通路

荧光素酶报告基因结果显示，在各不同处理组转染不同的报告质粒进入 143B 细胞后，pAP1-luc 的荧光素表达量在药物处理组中显著增高，与对照组相比差异具有统计学意义（$P=0.001$）。而 pMYC-luc、pSTAT-luc、pNFκB-luc、pNFAT-luc 的荧光素表达量升高并不明显（$P>0.05$），提示 SAHA 能够诱导转录因子 AP1 的表达（图 6，表 6）。



a，与空白对照组（DMSO 处理组）比较，$P=0.001$；

b，与空白对照组比较，$P=0.010$

图 6 荧光素酶报告基因检测 143B 细胞信号通路激活水平（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig.6 Detection of probable signaling pathways activation in 143B cells by luciferase reporter assay ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.7 SAHA 调控 143B 细胞中的 Cyclin D1、Bax、Bcl-2、cleaved-Caspase-3、cleaved-PARP 及 AP1 蛋白的表达

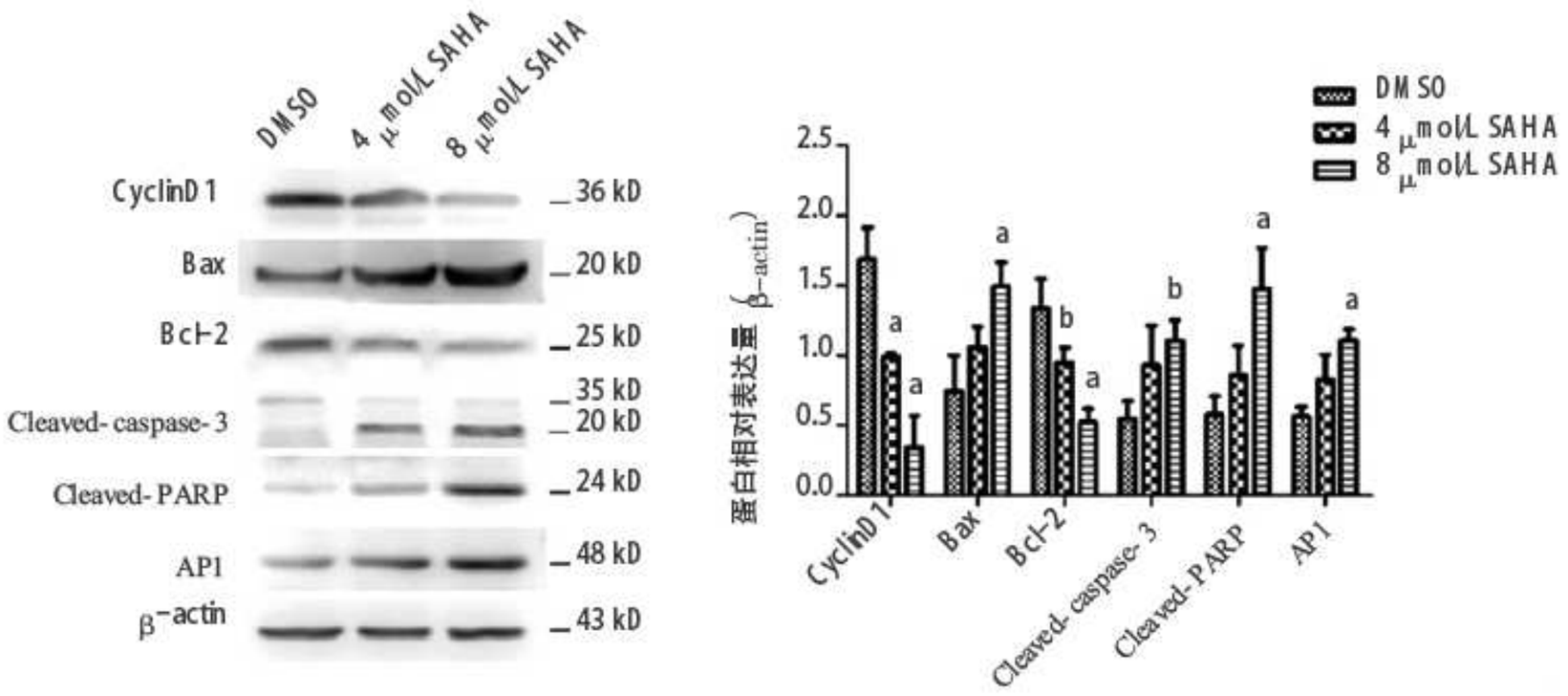
Western blot 检测结果显示，经不同浓度 8 μmol/L SAHA 作用于 143B 细胞后，与空白对照组相比较，143B 细胞 Cyclin D1，Bcl-2 蛋白表达水平均明显下降（$P<0.01$）；Bax、cleaved-Caspase-3、cleaved-PARP 及 AP1 蛋白表达水平均明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 7，表 7）。

表 6 荧光素酶报告基因检测各组 143B 细胞转录因子激活水平（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab.6 Transcription factors activation in 143B cells detected by luciferase reporter assay ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	pSTAT- luc	pNFkB- luc	pMYC- luc	pAP1- luc	pNFAT- luc
空白对照组（组 1）	2.086E4± 9.235E3	4.923E4± 1.227E3	1.738E4± 7.505E3	4.380E4± 3.017E4	4.607E3± 1.887E3
4 mol/L SAHA 处理组（组 2）	2.316E4± 8.211E3	4.596E4± 6.577E3	3.301E4± 3.746E4	1.487E6± 4.985E5	7.406E3± 1.512E3
8 mol/L SAHA 处理组（组 3）	3.145E4± 2.136E3	3.930E4± 2.231E4	4.019E4± 4.505E4	2.207E6± 5.326E5	8.594E3± 2.844E3
F 值	0.459	0.426	0.351	20.483	2.707
P 值	0.652	0.672	0.718	0.002	0.145

注：pSTAT- luc：组 2 与组 1 比，$P=0.591$；组 3 与组 2 比：$P=0.712$；pNFkB- luc：组 2 与组 1 比，$P=0.938$；组 3 与组 2 比：$P=0.594$；pMYC- luc：组 2 与组 1 比，$P=0.805$；组 3 与组 2 比：$P=0.647$；pAP1- luc：组 2 与组 1 比，$P=0.010$；组 3 与组 2 比：$P=0.001$；pNFAT- luc：组 2 与组 1 比，$P=0.266$；组 3 与组 2 比：$P=0.109$



a，与空白对照组（DMSO 处理组）比较，$P<0.01$；b，与空白对照组（DMSO 处理组）比较 $P<0.05$

图 7　Western blot 检测 143B 细胞 Cyclin D1、Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase-3、Cleaved-PARP、AP1 蛋白的表达（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig.7　Western blot analysis of protein expression levels of CyclinD1, Bax, Bcl-2, Cleaved-caspase-3, Cleaved-PARP, and AP1 in 143B cells（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

表 7　Western blot 检测各组 143B 细胞蛋白的表达（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab.7　Protein expression in 143B cells detected by Western blot（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	CyclinD1	Bax	Bcl-2	Cleaved-caspase-3	Cleaved-PARP	AP1
空白对照组（组 1）	1.690± 0.223	0.747± 0.257	1.337± 0.212	0.547± 0.127	0.577± 0.133	0.563± 0.068
4 mol/L SAHA 处理组（组 2）	0.990± 0.026	1.057± 0.150	0.950± 0.108	0.930± 0.288	0.860± 0.209	0.827± 0.180
8 mol/L SAHA 处理组（组 3）	0.343± 0.227	1.493± 0.176	0.523± 0.095	1.107± 0.146	1.477± 0.295	1.110± 0.076
F 值	40.051	10.589	22.719	6.123	12.854	15.693
P 值	0.000	0.011	0.002	0.036	0.007	0.004

注：Cyclin D1：组 2 与组 1 比，$P=0.006$；组 3 与组 2 比：$P=0.000$；Bax：组 2 与组 1 比，$P=0.177$；组 3 与组 2 比：$P=0.007$；Bcl-2：组 2 与组 1 比，$P=0.033$；组 3 与组 2 比：$P=0.001$；Cleaved-caspase-3：组 2 与组 1 比，$P=0.099$；组 3 与组 2 比：$P=0.025$；Cleaved-PARP：组 2 与组 1 比，$P=0.276$；组 3 与组 2 比：$P=0.005$；AP1：组 2 与组 1 比，$P=0.062$；组 3 与组 2 比：$P=0.002$

3　讨　论

骨肉瘤好发于长骨干骺端，是一种多见于儿童和青少年的死亡率很高的骨恶性肿瘤，其主要发生机制为骨组织成骨、破骨功能紊乱[1-2]。上世纪 80 年代以来，依赖于早期发现和及时治疗，骨肉瘤患者的生存率大幅提高，但由于其极高的转移率和耐药性的产生，患者往往预后极差，截肢后生存率仅 5%~20%[6]。因此，探索一种新型的疗效好、不良反应小的药物是目前极为迫切的问题。组蛋白的乙酰化修饰可以通过改变染色质的结构精确地调控基因的转录和表达[7]。目前越来越多的研究发现，组蛋白的低乙酰化出现于结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中，并且与转录抑制、细胞生长紊乱、细胞分化和凋亡关系紧密[8]。SAHA 作为一组新型的 HDACI，可以通过细胞周期阻滞、诱导分化和凋亡等机制对血液系统肿瘤和一些实体瘤产生明显抑制作用[5]。目前有关于 SAHA 对骨肉瘤的作用的相关报道还比较少，因此观察其对骨肉瘤细胞的作用以及探索其中的机制显得很有价值。

本研究使用不同浓度的 SAHA 作用于骨肉瘤 143B 细胞，观察其是否对肿瘤细胞有一定的增殖抑制作用。运用 MTT 法证实 SAHA 在一定浓度范围内能够以时间和剂量依赖性有效抑制 143B 细胞的活力，侧面证实其对 143B 细胞增殖的抑制作用。为了实验方便进行，选取了在 24 h 能够使 143B 细胞达 50%抑制率的药物浓度 8 μmol/L 做后续研究，并以较低浓度 4 μmol/L 和仅以 DMSO 处理组作为相应的对照。经流式细胞仪检测发现，SAHA 能够阻

滞143B细胞周期于G0/G1期，并且诱导细胞发生早期凋亡。为了进一步证实该结果，通过PCR及Western blot检测了与周期和凋亡相关细胞因子的变化情况，发现细胞周期蛋白Cyclin D1和抗凋亡因子Bcl-2表达水平下降，而促凋亡因子Bax表达上调，与上述现象相互佐证。

乙酰化酶和去乙酰化酶活性异常是导致肿瘤发生的一个重要原因[7]。研究表明SAHA能够有效抑制HDAC 1、HDAC 2和HDAC 3（Ⅰ型）以及HDAC 6（Ⅱ型）酶活性，在调控细胞增殖方面Ⅰ型HDAC更具有显著性[9-11]。经检测发现SAHA能够抑制143B细胞内HDAC 1和HDAC 3的表达并使其活性减低，表明SAHA对143B细胞的抑制作用主要通过Ⅰ型HDAC来实现。细胞的增殖凋亡受到多种转录因子及信号通路的调控[12]。前期研究发现AP1转录因子在多种抗肿瘤药物作用过程中发挥促进凋亡作用[13]，相反，NF-κB却因其促进增殖的特性在肿瘤细胞产生耐药性中担当重要角色[14]。荧光素酶报告基因是一种检测转录因子与目的基因启动子区DNA相互作用的方法[15]，为寻找SAHA作用143B细胞后异常激活的转录因子，对实验室保存的几种报告质粒进行了检测，发现SAHA作用143B细胞后能够促进转录因子AP1的表达，表明与AP1相关的信号通路参与到了SAHA抑制143B细胞的作用当中。此外，还通过Western blot检测了与凋亡密切相关的Caspase家族蛋白，结果发现几个成员表达都有一定上调，这与上述结论相一致。

综上所述，本研究证实SAHA对骨肉瘤143B细胞具有抑制增殖、诱导凋亡及阻滞细胞周期等抗肿瘤作用，并且其机制可能与HDACs活性下降以及AP1相关信号通路激活有关，为骨肉瘤临床治疗提供了新的方向。

参 考 文 献

[1] Eyre R，Feltbower RG，Mubwandarikwa E，et al.Epidemiology of bone tumours in children and young adults[J].Pediatr Blood Cancer，2009，53(6)：941-952.

[2] Mirabello L，Troisi RJ，Savage SA.International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents，middle ages and elderly persons[J].Int J Cancer，2009，125(1)：229-234.

[3] Marks PA，Xu WS.Histone deacetylase inhibitors：potential in cancer therapy[J].J Cell Biochem，2009，107(4)：600-608.

[4] Mann BS，Johnson JR，Cohen MH，et al.FDA approval summary：vorinostat for treatment ofadvanced primary cutaneous T-cell lymphoma[J].Oncologist，2007，12(10)：1247-1252.

[5] Richon VM.Targeting histone deacetylases：development of vorinostat for the treatment of cancer[J].Epigenomics，2010，2(3)：457-465.

[6] Botter SM，Neri D，Fuchs B.Recent advances in osteosarcoma[J].Curr Opin Pharmacol，2014，16：15-23.

[7] Yang XJ，Seto E.HATs and HDACs：from structure，function and regulation to novel strategies for therapy and prevention[J].Oncogene，2007，26(37)：5310-5318.

[8] 童汪霞，廖爱军.组蛋白乙酰化的研究进展[J].肿瘤基础与临床，2008，21(6)：544-547.

[9] Mayo MW，Denlinger CE，Broad RM，et al.Ineffectiveness of histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis involves the transcriptional activation of NF-kappa B through the Akt pathway[J].J Biol Chem，2003，278(21)：18980-18989.

[10] Reichert N，Choukrallah MA，Matthias P.Multiple roles of class HDACs in proliferation，differentiation，and development[J].Cell Mol Life Sci，2012，69(13)：2173-2187.

[11] Pang M，Ma L，Liu N，et al.Histone deacetylase1/2 mediates proliferation of renal interstitial fibroblasts and expression of cell cycle proteins[J].J Cell Biochem，2011，112(8)：2138-2148.

[12] Shaulian E，Karin M.AP-1 in cell proliferation and survival[J].Oncogene，2001，20(19)：2390-2400.

[13] Kankaanranta H，Ilmarinen P，Zhang X，et al.Tumour necrosis factor-α regulates human eosinophil apoptosis via ligation of TNF-receptor 1 and balance between NF-kB and AP-1[J].PLoS One，2014，9(2)：e90298.

[14] Zheng L，Fu Y，Zhuang L，et al.Simultaneous NF-kB inhibition and E-cadherin upregulation mediate mutually synergistic anticancer activity of celastrol and SAHA in vitro and in vivo[J].Int J Cancer，2014，135(7)：1721-1732.

[15] Naylor LH.Reporter gene technology：the future looks bright[J].Biochem Pharmacol，1999，58(5)：749-757.

责任编辑：冉明会）