

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.01.009

· 基础研究 ·

曲古抑菌素 A 通过上调 KLF4 表达诱导人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡

赵智凝^{1,4}, 周强³, 白久旭¹, 闫博², 秦炜炜², 王涛¹, 贾林涛², 杨安钢¹(1. 第四军医大学基础医学部免疫学教研室, 肿瘤生物学国家重点实验室, 陕西西安710032; 2. 第四军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 陕西西安710032; 3. 第四军医大学口腔医院综合急诊科, 陕西西安710032; 4. 解放军第451医院临床实验室, 陕西西安710054)

[摘要] **目的:** 观察组蛋白乙酰基转移酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡的影响, 并研究其与 Kruppel 样因子 4(Krupell-like factor 4, KLF4)的关系。**方法:** 0、50、100、200、300、500 ng/ml TSA 作用于 Ishikawa 细胞 24 h, 或 100 ng/ml TSA 作用于 Ishikawa 细胞 0、4、8、12、24、48 h, 流式细胞术检测 Ishikawa 细胞凋亡情况, qRT-PCR 检测 Ishikawa 细胞中 KLF4 mRNA 的表达情况; 将 KLF4 真核表达载体 pcDNA3-KLF4 转染 Ishikawa 细胞, 流式细胞术检测 Ishikawa 细胞凋亡情况。**结果:** 100 ng/ml TSA 作用于 Ishikawa 细胞 24 h 后, Ishikawa 细胞的凋亡率显著高于对照组[(30.6 ± 4.5)% vs (7.53 ± 0.93)% , $P < 0.05$]; 不同质量浓度 TSA 处理 Ishikawa 细胞 24 h 后或 100 ng/ml TSA 作用 Ishikawa 细胞不同时间后, KLF4 mRNA 表达水平以剂量依赖和时间依赖方式明显增高($P < 0.05$); pcDNA3-KLF4 转染后 Ishikawa 细胞凋亡率显著增加[(27.3 ± 2.7)% vs (4.53 ± 1.75)% , $P < 0.05$]。**结论:** TSA 能通过诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中 KLF4 的表达, 促进 Ishikawa 细胞发生凋亡。

[关键词] 曲古抑菌素 A; 子宫内膜癌; Ishikawa 细胞; Kruppel 样因子 4; 凋亡

[中图分类号] R737.33; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)01-0052-04

Trichostatin A induces apoptosis of endometrial cancer Ishikawa cells by up-regulating expression of Kruppel-like factor 4

ZHAO Zhi-ning^{1,4}, ZHOU Qiang³, BAI Jiu-xu¹, YAN Bo², QIN Wei-wei², WANG Tao¹, JIA Lin-tao², YANG An-gang¹(1. State Key Laboratory of Cancer Biology, Department of Immunology, Department of Basic Medical, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Basic Medical, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 3. Department of General Dentistry and Emergency, Department of Basic Medical, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 4. Clinical Laboratory, No. 451 Hospital of Chinese PLA; Xi'an 710054, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Trichostatin A (TSA) on the apoptosis of endometrial cancer Ishikawa cells and to study its relationship with Kruppel-like-factor 4 (KLF4) in this course. **Methods:** Ishikawa cells were cultured with different concentrations of TSA 0, 50, 100, 200, 300, 500 ng/ml for 24 h or 100 ng/ml TSA for 0, 4, 8, 12, 24 and 48 h. FACS and qRT-PCR were used to detect apoptosis and KLF4 mRNA level, respectively. **Results:** The apoptosis rate was increased compared to the control in the Ishikawa cells treated with 100 ng/ml TSA for 24 h ([30.6 ± 4.5] % vs [7.53 ± 0.93] % , $P < 0.05$). The mRNA levels of KLF4 were up-regulated after Ishikawa cells were stimulated with different concentrations of TSA for 24 h or with 100 ng/ml TSA for 4, 8, 12, 24, 48 h ($P < 0.05$). Those effects were in a dose-dependent or time-dependent manner. The apoptosis rate was increased compared to the control in the Ishikawa cells over-expressed KLF4 ([27.3 ± 2.7] % vs [4.53 ± 1.75] % , $P < 0.05$). **Conclusion:** TSA induces apoptosis of Ishikawa cells by up-regulating the expression of KLF4.

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2010CB529905)。Project supported by the National Major Basic Research Program (973 Program) of China (No. 2010CB529905)

[作者简介] 赵智凝(1975-),女,黑龙江省哈尔滨市人,博士,主治医师,主要从事肿瘤基因治疗的研究。E-mail: Shirley_zzn@yahoo.com.cn

[通信作者] 杨安钢(YANG An-gang, corresponding author), E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

[**Key words**] trichostatin A; endometrial cancer; Ishikawa cell; Kruppel-like factor 4; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(1): 52-55]

曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 是一种常用的组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 抑制剂, 选择性抑制 HDAC^[1]。TSA 抑制 HDAC 后导致组蛋白乙酰化水平升高, 引起一些基因转录水平提高; TSA 也可升高其他一些蛋白的乙酰化水平, 改变其活力或稳定性^[2]。TSA 对多种肿瘤细胞具有明显的杀伤作用, 但是其作用的具体机制尚未完全阐明; TSA 对子宫内膜癌细胞生长和凋亡的作用尚未见报道。Krupell 样因子 4 (Krupell-like factor 4, KLF4) 是一种在多种组织中广泛表达的锌指转录因子^[3]。KLF4 基因与多种肿瘤的发生、发展有关^[4-5]。本研究通过检测 TSA 作用前后子宫内膜癌细胞 Ishikawa 中 KLF4 基因的表达情况, 探讨该基因表达的变化与 HDAC 抑制剂发挥促凋亡作用之间的关系, 证实 TSA 通过上调 KLF4 的表达引起 Ishikawa 细胞凋亡的机制, 以期为进一步探讨子宫内膜癌的发生机制以及寻求新的治疗靶点奠定实验基础。

1. 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 购于解放军总医院妇产科, TSA 购于 Sigma 公司。总 RNA 抽提试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司, DMEM 培养基为 Hyclone 产品, Taq 酶及 dNTP 均为 TaKaRa 产品。逆转录酶试剂盒购于 Invitrogen 公司, Annexin V-FITC 购于 Biovision 公司。真核表达载体 pcDNA3-KLF4 由第四军医大学免疫教研室王涛副教授惠赠, 菌种 *E. coli* DH5 α 由本室保存, 各种限制性内切酶、T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司。小剂量质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自优晶生物公司。兔抗人 KLF4 和兔抗人 β -actin 抗体购于 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 为中山公司产品。

1.2 细胞培养及实验分组

Ishikawa 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 液中, 定期传代。待贴壁细胞汇合率达到 80% 时, 取状态一致的细胞加入含无水乙醇 (对照) 和含 100 ng/ml TSA^[6-7] 的培养液, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 分别于 0、4、8、12、24、48 h 后收取细胞; 或取状态一致的细胞, 分别加入含 0、50、100、200、300、500 ng/ml TSA 的培养液培养。每种检测设 3 个复

孔, 实验至少重复 3 次。置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后收集细胞。

1.3 qRT-PCR 分析 TSA 对 KLF4 基因表达的影响

用 TRIzol 试剂提取 Ishikawa 细胞总 RNA。取总 RNA 2 μ g 进行逆转录反应。反应条件为: 42 °C 2 min、65 °C 5 min、42 °C 50 min、70 °C 15 min。cDNA 置 -20 °C 保存备用。qPCR 反应 20 μ l 反应体系中含有模板 cDNA 5 μ g, 反应条件为 94 °C 预变性 10 s, 94 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 45 个循环。以 GAPDH 作为内参, 重复实验 3 次。KLF4 相对定量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct, Q) - (\Delta Ct, C)$ 。“ $\Delta Ct, Q$ ”为 TSA 实验组 KLF4 基因的 Ct 值与管家基因 GAPDH Ct 值之差; “ $\Delta Ct, C$ ”为对照组 KLF4 的 Ct 值与管家基因 GAPDH Ct 值之差。KLF4、GAPDH 基因引物由金斯瑞公司合成, 其序列分别如下: KLF4-F 为 5'-CCCACACAGGTGAGAAACCT-3', KLF4-R 为 5'-ATGTGTAAGCCGAGGTGGTC-3', GAPDH-F 为 5'-CCAACCGC GAGAAGATGA-3', GAPDH-R 为 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'。

1.4 pcDNA3-KLF4 转染 Ishikawa 细胞

将对数生长期的 Ishikawa 细胞重新接种于 T25 细胞培养瓶, 待达到 80% 汇合率时, 取 3 μ g pcDNA3-KLF4、6 μ l Lipofectamin 2000TM, 各加入 100 μ l 无血清 DMEM, 混合, 室温孵育 20 min。用无血清 DMEM 洗 2 遍, 加 800 μ l 无血清 DMEM, 再滴加转染液, 培养 6 h 后弃转染液。换含 10% 小牛血清的 DMEM 继续培养。设转染 pcDNA3 为阴性对照。

1.5 流式细胞术检测 Ishikawa 细胞的凋亡

取对照组和实验组细胞, 胰酶消化细胞成单细胞悬液, PBS 洗涤。450 μ l 孵育缓冲液重悬, 加入 AnnexinV-FITC 和 PI (两种染料在孵育缓冲液中的终质量浓度均为 1 μ g/ml), 4 °C 避光染色 30 min。在流式细胞仪上检测细胞凋亡。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 显示, 使用 SPSS10.0 统计分析软件, 不同组之间比较用 *t* 检验。P < 0.05 或 P < 0.01 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TSA 对 Ishikawa 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果 (图 1) 显示, Ishikawa 细胞在 TSA (100 ng/ml, 24 h) 作用后发生了凋亡, 凋

亡率显著高于对照组[(30.6 ± 4.5)% vs (7.53 ± 0.93)% , P < 0.05]。

2.2 TSA 对 Ishikawa 细胞 KLF4 mRNA 表达的影响
qRT-PCR 检测结果显示, 与对照组相比, TSA 组 KLF4 mRNA 表达明显上调 (P < 0.05), 并且随着 TSA 质量浓度增高, KLF4 mRNA 表达量增高的幅度也逐渐增高(图 2A); 100 ng/ml 的 TSA 作用于 Ishikawa 细胞 0、4、8、12、24、48 h 后, KLF4 mRNA 表达量都明显上调 (P < 0.05), 且随着作用时间延长, KLF4 mRNA 也逐渐增高(图 2B)。由此可见, TSA 能够剂量和时间依赖地上调 KLF4 mRNA 的表达。

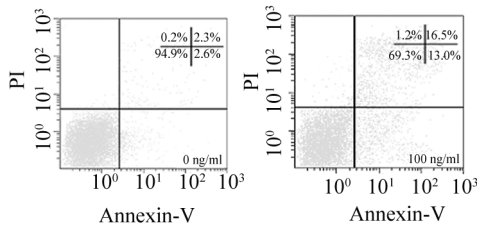


图 1 TSA 促进 Ishikawa 细胞凋亡

Fig. 1 Apoptosis of Ishikawa cells induced by TSA

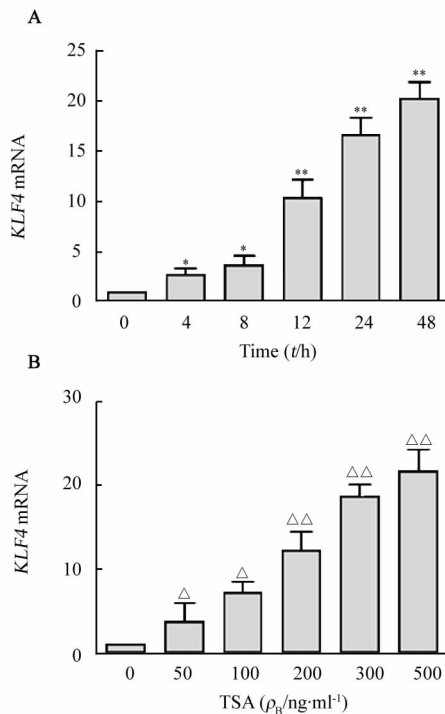


图 2 TSA 以时间(A)和剂量(B)依赖方式促进 Ishikawa 细胞 KLF4 mRNA 的表达

Fig. 2 Expression of KLF4 mRNA in Ishikawa cells promoted by TSA in a time-dependent manner(A) and dose-dependent manner(B)

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs 0 h;

△ P < 0.05, △△ P < 0.01 vs 0 ng/ml

2.3 TSA 对 Ishikawa 细胞 KLF4 蛋白表达的影响

Western blotting 检测发现, TSA 组 KLF4 蛋白表达与对照组相比明显上调(图 3)。TSA 能够上调 Ishikawa 细胞 KLF4 蛋白的表达。

2.4 pcDNA3-KLF4 转染促进 Ishikawa 细胞凋亡

将 pcDNA3-KLF4 真核表达载体转染入子宫内膜癌 Ishikawa 细胞, 流式细胞术检测。结果显示, 与对照组相比, 过表达 KLF4 的 Ishikawa 细胞凋亡比例显著增高[(27.3 ± 2.7)% vs (4.53 ± 1.75)% , P < 0.05]。结果说明, 子宫内膜癌 Ishikawa 细胞发生凋亡可能与 KLF4 的表达增高有关。

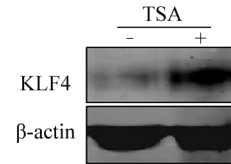


图 3 TSA 促进 Ishikawa 细胞 KLF4 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of KLF4 protein in Ishikawa cells promoted by TSA

3 讨论

在过去的几年里, 对于子宫内膜癌的治疗, 除内分泌治疗以外的其他类型的治疗方法已崭露头角, 特别是那些针对染色体结构的方法。染色质最本单位是核小体, 而核小体由真核生物的 DNA 围绕核心的组蛋白形成^[8]。组蛋白的翻译后修饰包括乙酰化、甲基化和磷酸化, 这种修饰改变了核小体的结构, 在调控基因转录过程中发挥着重要的作用^[9]。组蛋白乙酰化稳定状态的平衡是由两类酶调控的, 它们是组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase, HAT)和 HDAC。HDAC 抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDI)能够抑制多种 HDAC 的活性, 使组蛋白乙酰化, 这些组蛋白乙酰化作用导致特异基因的表达增加, 进而引起广泛的细胞形态学和代谢变化, 如细胞生长停滞、分化和凋亡^[10]。实验^[11]证明, HDI 能够在细胞学实验与动物实验中抑制癌细胞生长^[12], 能够逆转癌基因突变引起的细胞形态学改变^[13], 并促进细胞分化^[14]。此外, 研究^[15]表明, HDI 能够逆转细胞内发生的与肿瘤相关的异常变化, 在临床前研究中表现出了有效及特异性的抗癌活性, 因此作为一种新型的抗癌制剂被广泛地研究。TSA 是一种常用的 HDI。以往研究^[16-18]发现, TSA 可以引起多种肿瘤细胞凋亡, 但其对子宫内膜癌细胞的作用尚少有报道。本研究证实, TSA 能够引起子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡, 其机制可能与上调

KLF4 的表达有关。

KLF4 在人类多种组织不同的生理活动包括生长、分化和正常稳态的维持中具有重要作用^[19]。研究^[20-22]表明,*KLF4* 表达水平在细胞增殖、分化和凋亡中起着重要作用,可能与多种肿瘤的发生、发展有关,*KLF4* 在不同的肿瘤中可作为癌基因或抑癌基因,而 *KLF4* 在子宫内膜癌中的表达及其与子宫内膜癌发生发展的关系尚不清楚。本研究检测了 TSA 对于子宫内膜癌 Ishikawa 细胞中 *KLF4* mRNA 和蛋白水平表达的影响,结果显示,TSA 能够诱导 *KLF4* mRNA 的表达上调,且其上调呈剂量和时间依赖性。TSA 也能诱导 *KLF4* 蛋白表达增高。将 pcDNA3-KLF4 转染 Ishikawa 细胞,过表达 *KLF4* 的 Ishikawa 细胞的凋亡明显增加。总之,TSA 促进 Ishikawa 细胞凋亡可能与 *KLF4* 的表达增高有关,TSA 可能通过上调 *KLF4* 的表达导致细胞凋亡。结果还提示,*KLF4* 可能参与了子宫内膜癌的形成,这为探讨子宫内膜癌的发生机制提供了新的线索。

[参 考 文 献]

- [1] Davis T, Kennedy C, Chiew YE, et al. Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation and modulate cell cycle gene expression in normal mammary epithelial cells [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(11): 4334-4342.
- [2] Yang X, Ferguson AT, Nass SJ, et al. Transcriptional activation of estrogen receptor in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition [J]. Cancer Res, 2000, 60(24): 6890-6894.
- [3] Yet SF, McA'Nulty MM, Folta SC, et al. Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains [J]. J Biol Chem, 1998, 273(2): 1026-1031.
- [4] Hu R, Zuo Y, Zuo L, et al. KLF4 expression correlates with the degree of differentiation in colorectal cancer [J]. Gut Liver, 2011, 5(2): 154-159.
- [5] Yori JL, Seachrist DD, Johnson E, et al. Krüppel-like factor 4 inhibits tumorigenic progression and metastasis in a mouse model of breast cancer [J]. Neoplasia, 2011, 13(7): 601-610.
- [6] Marqueron R, Duong V, Bonnet S, et al. Histone deacetylase inhibition and estrogen receptor alpha levels modulate the transcriptional activity of partial antiestrogens [J]. J Mol Endocrinol, 2004, 32(2): 583-594.
- [7] Hodges-Gallagher L, Valentine CD, Bader SE, et al. Inhibition of histone deacetylase enhances the anti-proliferative action of antiestrogens on breast cancer cells and blocks tamoxifen-induced proliferation of uterine cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 105(3): 297-309.
- [8] Woodcock CL, Dimitrov S. Higher-order structure of chromatin and chromosomes [J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11(2): 130-135.
- [9] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications [J]. Nature, 2000, 403(6765): 41-45.
- [10] Zhu WG, Otterson GA. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells [J]. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2003, 3(3): 187-199.
- [11] Wharton W, Savell J, Cress WD, et al. Inhibition of mitogenesis in Balb/c-3T3 cells by trichostatin A. Multiple alterations in the induction and activation of cyclin-cyclin-dependent kinase complexes [J]. J Biol Chem, 2000, 275(43): 33981-33987.
- [12] Yoshida M, Hoshikawa Y, Koseki K, et al. Structural specificity for biological activity of trichostatin A, a specific inhibitor of mammalian cell cycle with potent differentiation-inducing activity in friend leukemia cells [J]. J Antibiot, 1990, 43(9): 1101-1106.
- [13] Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(15): 1210-1216.
- [14] Kosugi H, Towatari M, Hatano S, et al. Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: A new approach to anti-leukemia therapy [J]. Leukemia, 1999, 13(9): 1316-1324.
- [15] Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(9): 769-784.
- [16] Anh TD, Ahn MY, Kim SA, et al. The histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, induces G2/M phase arrest and apoptosis in YD-10B oral squamous carcinoma cells [J]. Oncol Rep, 2012, 27(2): 455-460.
- [17] Fortson WS, Kayarthodi S, Fujimura Y, et al. Histone deacetylase inhibitors, valproic acid and trichostatin-A induce apoptosis and affect acetylation status of p53 in ERG-positive prostate cancer cells [J]. Int J Oncol, 2011, 39(1): 111-119.
- [18] Emonds E, Fitzner B, Jaster R. Molecular determinants of the anti-tumor effects of trichostatin A in pancreatic cancer cells [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(16): 1970-1978.
- [19] Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, et al. A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells [J]. J Biol Chem, 1996, 271(49): 31384-31390.
- [20] Lin H, Xu L, Liu H, et al. KLF4 promotes the odontoblastic differentiation of human dental pulp cells [J]. J Endod, 2011, 37(7): 948-954.
- [21] Li IC, Chan CT, Lu YF, et al. Zebrafish Krüppel-like factor 4a represses intestinal cell proliferation and promotes differentiation of intestinal cell lineages [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20974.
- [22] An J, Golech S, Klaewsongkram J, et al. Krüppel-like factor 4 (KLF4) directly regulates proliferation in thymocyte development and IL-17 expression during Th17 differentiation [J]. FASEB J, 2011, 25(10): 3634-3645.

[收稿日期] 2011 - 10 - 05

[修回日期] 2011 - 12 - 03

[本文编辑] 韩丹