

组蛋白去乙酰化酶抑制剂-FK228对人非小细胞肺癌A549细胞纺锤体检查点的影响

张旭辉* 赵 名 陈国柱 成 祥 于晓婉

(军事医学科学院基础医学研究所应激医学研究室, 北京 100850)

摘要 HDACi-FK228是一种新型抗肿瘤药物,但其作用机制研究的尚未十分明确,为进一步阐明FK228杀伤肿瘤细胞的机制,该文应用流式细胞术检测FK228对非小细胞肺癌A549细胞周期的影响;应用免疫荧光染色和免疫印迹检测FK228对检查点蛋白Bub1及BubR1定位和表达的影响;采用纺锤体检查点功能实验检测FK228对细胞检查点功能的影响。结果提示,FK228处理24 h后, G₂/M期细胞比例由6.35%增至19.91%; FK228能够抑制检查点蛋白Bub1及BubR1着丝粒定位并上调两种蛋白表达;纺锤体检查点功能实验提示对照组经Nocodazole或Taxol处理后G₂/M期细胞比例最高分别达35.74%及29.24%,而FK228处理组经上述两种药物处理后各时间点G₂/M期细胞所占比例皆明显减少(最高所占比例分别为7.13%及6.03%),失去了随时相点的动态变化,提示FK228抑制了A549细胞纺锤体检查点在监测张力和黏附上的功能。该研究证实FK228能够通过影响纺锤体检查点蛋白着丝粒定位以及抑制纺锤体检查点的功能,进而干涉肿瘤细胞有丝分裂过程,有助于阐明HDACi杀伤肿瘤细胞的新机制。

关键词 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 肿瘤细胞; 纺锤体检查点

Histone Deacetylase Inhibitor-FK228 Inhibits the Spindle Checkpoint Function of Human Non-small-cell Lung Cancer A549 Cells

Zhang Xuhui*, Zhao Ming, Chen Guozhu, Cheng Xiang, Yu Xiaodan

(Stress Medical Science Lab, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract HDACi-FK228 is a novel and promising anticancer drug. However, the underlying molecular mechanism has not been well clarified. In this study, we investigated the effect of FK228 on the spindle checkpoint function of human non-small-cell lung cancer A549 cells. Using the flow cytometry to detect the influence of FK228 on the A549 cell cycle; Using immunofluorescence staining to detect the centromeric localization of checkpoint protein Bub1 and BubR1 and using Western blot to examine the checkpoint protein expression; The spindle checkpoint function of A549 cells after the FK228 treatment was determined by the spindle checkpoint function experiment. The results revealed that FK228 increased the G₂/M ratio of cells from 6.35% to 19.91% after 24 h treatment; In addition, FK228 inhibited the centromeric localization of Bub1 and BubR1 protein. However, western blot analysis indicated that FK228 treatment induced the protein expression of the Bub1 and BubR1. Spindle checkpoint experiment indicated that the G₂/M ratio in control group were increased highest to 35.74% by Nocodazole or

收稿日期: 2013-06-21 接受日期: 2013-08-07

国家自然科学基金(批准号: 81000981)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-66932310, E-mail: zhanghhsnow@hotmail.com

Received: June 21, 2013 Accepted: August 7, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81000981)

*Corresponding author. Tel: +86-10-66932310, E-mail: zhanghhsnow@hotmail.com

网络出版时间: 2013-09-13 17:21

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130913.1721.003.html>

29.24% by Taxol treatment, while the G₂/M ratio of FK228 group by Nocodazole or Taxol treatment in all the time point were decreased, for the highest is 7.13% by Nocodazole and 6.03% by Taxol treatment, which indicates that FK228 treatment inhibited the spindle checkpoint function of the A549 cells. Our data implicate that FK228 can inhibit the spindle checkpoint proteins Bub1 and BubR1 centromeric localization and inhibit the spindle checkpoint function of the A549 cells, which might be the possible reason of FK228 induced abnormal mitosis. This study contributes to elucidate the possible mechanism of FK228 to kill tumor cells.

Key words HDACi; tumor cell; spindle checkpoint

I类组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)-FK228(Romidepsin)是从紫色色杆菌分离的一种天然抗肿瘤药物, 其能够抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞分化和促进细胞凋亡, 并能有效抑制体内肿瘤的生长, 目前FK228已经被FDA批准用于皮肤和外周T细胞淋巴瘤的临床治疗^[1]。尽管作为表观调控药物, HDACi可以通过增强组蛋白乙酰化修饰调控相关基因表达进而发挥抗肿瘤作用, 越来越多的实验表明, 除组蛋白之外, 一些重要的非组蛋白, 如热休克蛋白90、Rel-A/p65等同样是HDACi的作用靶点^[2-3]。此外, 我们前期的研究工作还发现FK228可以通过影响着丝粒旁H3K9乙酰化而影响染色体乘客复合体的着丝粒定位, 进而诱导细胞有丝分裂灾难^[4]。

细胞周期检查点可概括为两大类型, 即DNA结构检查点(DNA structure checkpoint)和有丝分裂检查点(mitosis checkpoint), 前者主要是由DNA损伤或DNA复制不完全诱发, 后者是由纺锤体结构破坏诱发。有丝分裂灾难的发生与这两种类型的检查点存在着密切的联系。有丝分裂检查点又称为纺锤体检查点(spindle checkpoint), 是细胞长期进化过程中产生的一套确保DNA复制和染色体精确分配的“监控机制”, 其功能主要包括监控纺锤体形态、维持染色体动粒与微管联接及其张力、确保染色体正确排列和姐妹染色单体精确分离等。纺锤体检查点是通过检查点蛋白定位于着丝点而实现其监测染色体排列的功能的。有丝分裂检查点激酶BubR1和Bub1蛋白是哺乳动物检查点蛋白的关键组分, BubR1主要是监测纺锤体检查点在张力方面的功能, 其着丝粒定位依赖于Bub1蛋白的存在^[5-6]。

我们前期研究发现, FK228能够诱导肿瘤细胞出现染色体桥、滞后染色体等异常有丝分裂现象^[4], 提示我们研究FK228能否影响肿瘤细胞的纺锤体检查点功能。因此, 本研究采用FK228处理非小细胞

肺癌A549细胞, 通过免疫荧光染色和纺锤体检查点功能实验等来研究FK228对肿瘤细胞纺锤体检查点功能的影响, 从而阐明HDACi发挥其抗肿瘤作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

1.1.1 细胞 非小细胞肺癌A549细胞购自美国ATCC公司。A549细胞培养用含10% FBS的高糖DMEM完全培养基, 在5% CO₂、37 °C饱和湿度条件下培养, 以0.25%胰酶-EDTA进行消化传代。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养液为Gibco公司产品, 胎牛血清(FBS)购自北京元亨胜马生物技术研究。鼠源性抗Bub1单克隆抗体和抗actin单克隆抗体购自Sigma公司。鼠源性抗BubR1单克隆抗体购自Abcam公司。兔源性抗-phospho-Histone H3(ser10)抗体购自Upstate公司。人源CREST抗血清购自CORTEX公司。羊抗鼠和羊抗兔IgG-HRP标记二抗购自Cell Signaling公司, FITC-羊抗鼠IgG和TRITC-羊抗人IgG购自中杉金桥公司。PVDF膜和ECL发光底物试剂盒购自Pierce公司。Hoechst33258和Thymidine为Sigma公司产品。Laemmli Sample Buffer购自Bio-Rad公司。FK228由美国国立卫生研究院肿瘤研究所David S Schrupp博士提供, 用DMSO配制, 使用终浓度为25 ng/mL。RNase A购自Qiagen公司。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞分析 消化并离心收集FK228处理0, 6, 12, 24 h的细胞, PBS清洗1次, 经70%的乙醇重悬细胞沉淀, 于-20 °C固定细胞过夜, 而后PBS清洗细胞两次后用300 μL PBS重悬细胞沉淀, 加入5 μL的RNase A(1 mg/mL), 水浴消化30 min。加入PI, 避光染色20 min后上机检测。

1.2.2 免疫印迹实验 收集细胞样品经Laemmli Sample Buffer裂解后行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 而后

转移至PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST(0.3% Tris, 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.1% Tween-20, pH7.4)封闭1 h,加入相应稀释的一抗于4 °C过夜。次日用TBST洗涤PVDF膜3遍,每次5 min,加入相应抗性HRP标记二抗(1:2 000)室温孵育1 h。TBST洗涤同前,ECL化学发光显色。

1.2.3 免疫荧光染色实验 待检细胞接种于细胞爬片,37°C、5% CO₂培养箱中培养后24 h后经FK228处理24 h。应用PBS清洗细胞爬片后,用4%多聚甲醛室温固定细胞10 min,随后PBS清洗3遍,用含0.25% TritonX-100 PBS透膜10 min,PBS清洗细胞爬片后将细胞爬片封闭于含1% BSA的PBS中1 h,随后一抗4 °C过夜或者室温孵育1 h,PBS清洗后,经相应FITC/TRITC标记的二抗室温孵育1 h,PBS清洗3遍后,Hoechst33258复染核,经激光共聚焦显微镜观察并照相。

1.2.4 纺锤体检查点功能实验 采用胸苷饥饿法(2 mmol/L)同步化FK228处理组 and 对照组细胞于G₁/S期,而后PBS清洗去除胸苷作用。分别应用0.1 µg/µL Nocodazole和33 nmol/L的Taxol处理细胞,于药物处

理0, 6, 12, 18, 24, 30 h收集各组细胞。将前述收集的细胞用含1%的BSA的PBS冲洗后,固定于70%乙醇中,-20 °C过夜。次日将固定好的细胞离心,重悬于含0.5%的TritonX-100的PBS中,冰浴15 min。经含1%BSA的PBS离心洗后,采用抗-phos-Histone H3(ser10)抗体标记有丝分裂细胞,并于室温孵育30 min,而后1%的BSA-PBS离心洗2次,将细胞用FITC标记抗兔二抗室温孵育30 min。经RNase A (10 mg/mL) 37 °C消化30 min后冰浴终止。流式细胞分析检测前加入PI标记胞核。

2 结果

2.1 FK228对A549细胞细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果表明,FK228能够明显改变A549细胞的细胞周期分布,FK228能够时间依赖性地阻滞A549细胞于G₂/M期(图1)。

2.2 FK228对检查点蛋白Bub1和BubR1定位和蛋白表达的影响

通过免疫荧光染色观察FK228处理后,检查点蛋白Bub1、BubR1定位表达变化,结果显示,正常细胞

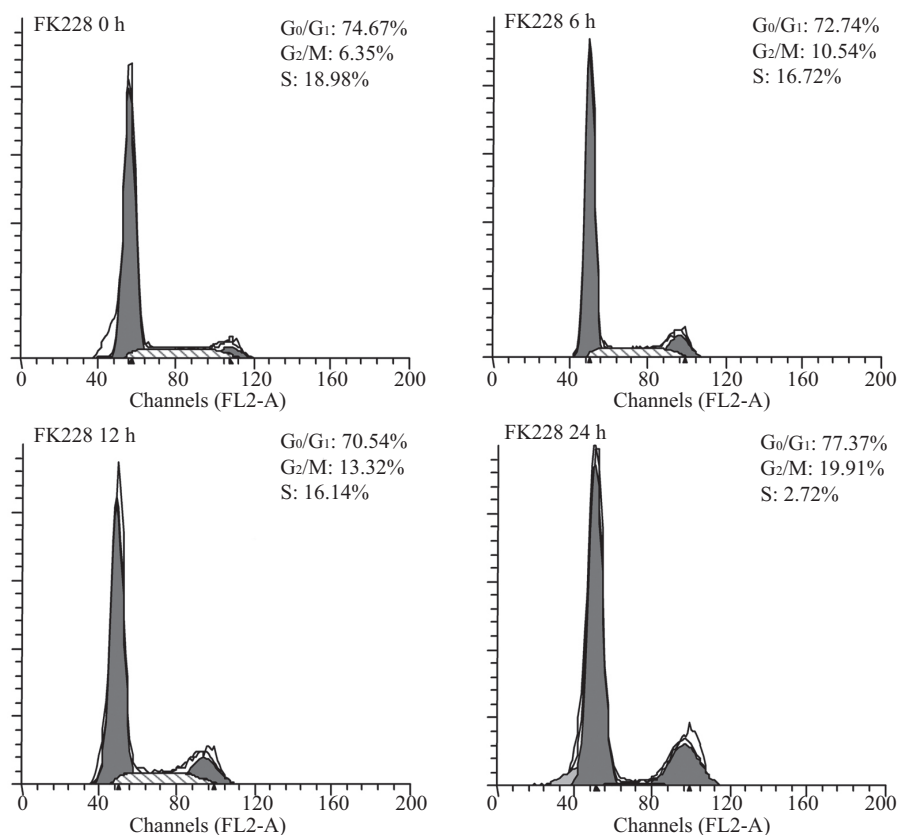


图1 流式细胞术检测FK228对A549细胞细胞周期的影响

Fig.1 Flow cytometry detection of FK228 induced cell cycle arrest in A549 cells

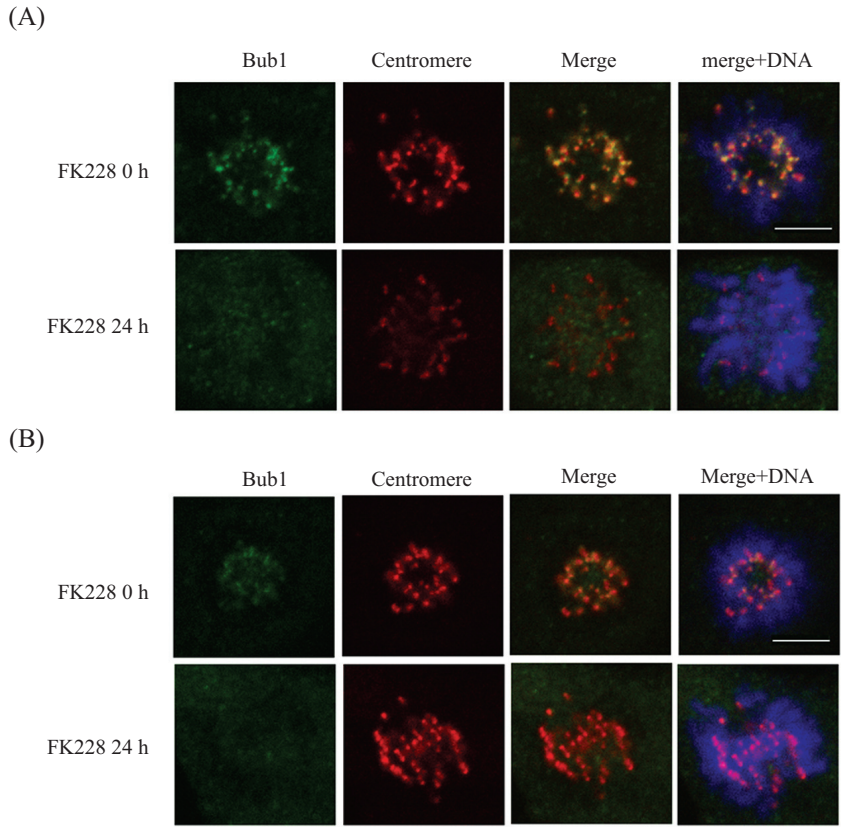


图2 免疫荧光染色检测FK228对检查点蛋白Bub1和BuR1蛋白着丝粒定位的影响(标尺=5 μm)

Fig.2 The detection of the centromeric localization of Bub1 and BuR1 by immunofluorescence staining after FK228 treatment (Scale bars=5 μm)

Bub1、BubR1定位于着丝粒, FK228处理24 h后, Bub1和BubR1蛋白于着丝粒的定位明显减弱, 说明FK228能够影响纺锤体检查点蛋白着丝粒定位(图2)。

为探讨FK228阻断检查点蛋白BubR1和Bub1着丝粒定位是否与其蛋白表达有关, 我们采用蛋白免疫印迹实验检测了两种蛋白的表达水平, 结果显示, FK228处理能够时间依赖性增强A549细胞BubR1和Bub1的蛋白表达(图3), 提示FK228并非通过影响蛋白表达而抑制其在着丝粒的定位。

2.3 FK228对A549细胞纺锤体检查点功能的影响

纺锤体检查点通常在两种情况下被激活, 一是着丝粒和微管失去连接, 二是虽然着丝粒与微管连接存在, 但微管张力松弛。图2A和2B的结果表明, FK228处理后细胞纺锤体检查点蛋白Bub1、BubR1蛋白不能有效定位于着丝粒,提示FK228直接影响了纺锤体检查点的功能。为证实这一推断, 本研究应用Nocodazole和Taxol两种微管毒性药物来检测FK228处理后细胞纺锤体检查点的功能。Nocodazole为一种微管去聚合药物, 能够通过影响微管的

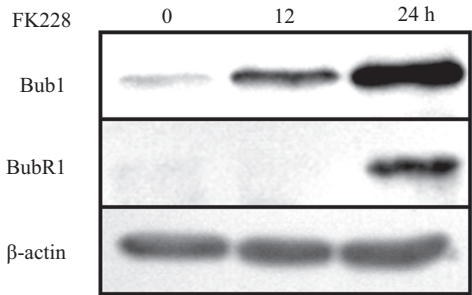
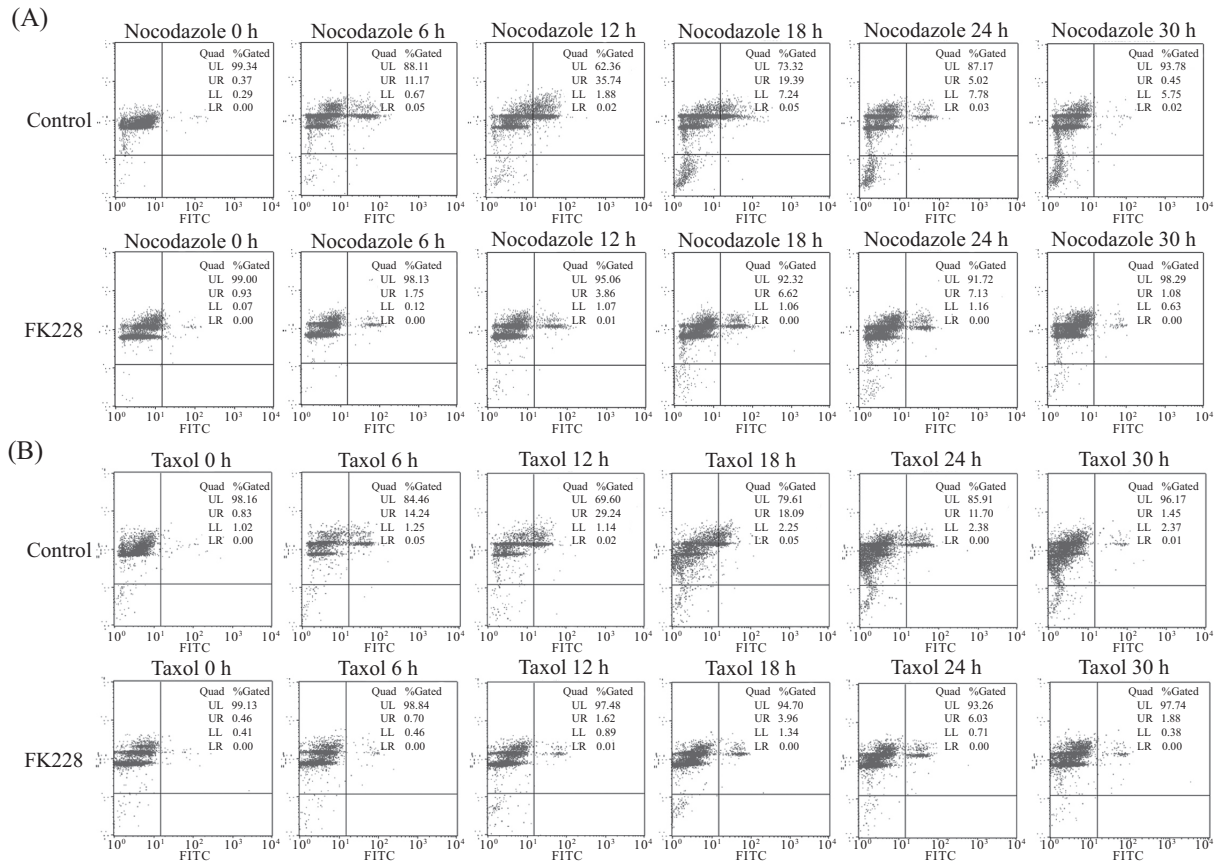


图3 Western Blot检测FK228对检查点蛋白Bub1和BuR1蛋白水平的影响

Fig.3 Detecting the effect of FK228 on the checkpoint protein Bub1 and BuR1 protein expression

结构而影响着丝粒和微管黏附, 应用Nocodazole处理A549细胞, 目的是检测FK228处理后纺锤体检查点在监测着丝粒-微管黏附方面的功能是否正常。Taxol为微管稳定药物, 能够破坏纺锤体的张力, 应用Taxol处理A549细胞, 目的是检测FK228处理后纺锤体检查点在监测纺锤体张力上功能是否正常。在细胞纺锤体检查点功能正常的情况下, 微管破坏药物Nocodazole和Taxol能够通过触发细胞纺锤体检



UL: 左上限; UR: 右上限; LL: 左下限; LR: 右下限。

UL: upper left; UR: upper right; LL: lower left; LR: lower right.

图4 流式细胞术检测Nocodazole或Taxol诱导的对照和FK228处理组有丝分裂期细胞比例改变

Fig.4 The FACS analysis of Nocodazole or Taxol induced mitotic cell ratio change in control and FK228 treated cells

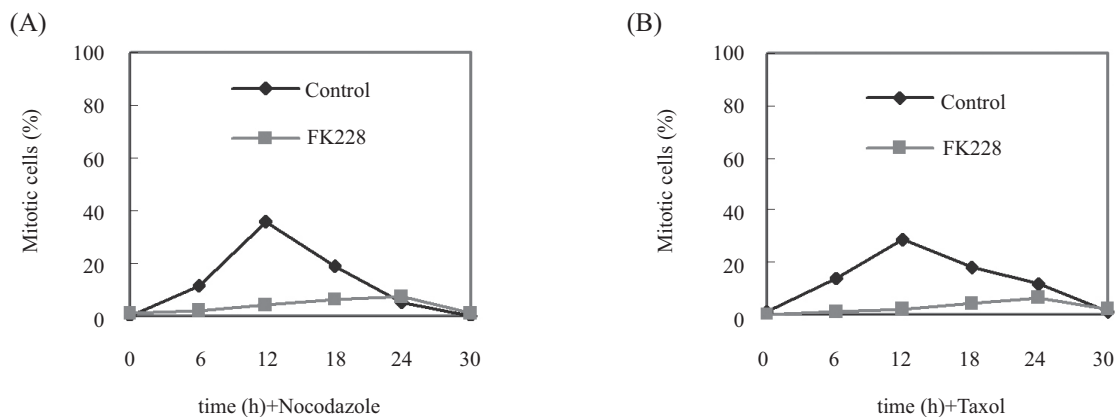


图5 Nocodazole或Taxol处理后对照和FK228处理组有丝分裂细胞比例随时间分布变化

Fig.5 The time dependent change of mitotic cell ratio in control and FK228 treated cells by Nocodazole or Taxol treatment

查点,从而诱发细胞发生有丝分裂期阻滞^[7]。采用抗-phos-Histone H3(ser10)抗体标记有丝分裂期细胞,通过流式细胞术监测有丝分裂期细胞数目的动态变化,从而检测FK228处理后细胞纺锤体检查点在监测黏附和张力方面的功能是否正常,流式细胞

检测结果见图4。

采用Nocodazole处理细胞后进行流式细胞测定,结果如图4A、图5A所示,对照组细胞经Nocodazole处理后,伴随细胞有丝分裂的进行有丝分裂期细胞呈动态分布变化,在同步化12 h后达到

高峰, 有丝分裂细胞数比例达35.74%, 30 h后恢复至初始水平, 提示细胞纺锤体检查点功能正常。而FK228处理组细胞, 经Nocodazole处理后有丝分裂细胞数目却明显减少, 且失去随时相点的动态分布, 提示FK228处理后细胞检查点监测着丝粒-微管黏附方面的功能受损, 失活的检查点不能诱发细胞发生有丝分裂阻滞。

我们同样采用流式细胞术检测了Taxol处理对照组和FK228处理组的细胞, 流式测定及分析结果如图4B、图5B所示, 对照组细胞经Taxol处理后, 伴随细胞有丝分裂的进行有丝分裂期细胞呈动态变化, 在同步化12 h后达到高峰, 有丝分裂细胞数比例达29.24%, 30 h后恢复至初始水平, 提示细胞具有正常的纺锤体检查点功能。而FK228处理组细胞, 经Taxol处理后有丝分裂细胞数目却明显减少, 且失去随时相点的动态分布, 提示FK228处理后细胞检查点监测张力方面的功能受损, 失活的检查点不能诱发细胞发生有丝分裂阻滞。

3 讨论

在众多真核细胞中, 细胞的分裂是在纺锤体检查点的监控下进行的。纺锤体检查点通常在两种情况下被激活, 一是当着丝粒和微管失去连接, 二是虽然着丝粒微管连接存在, 但微管张力松弛。纺锤体检查点蛋白的着丝粒定位对维持其正常的生物学功能是必需的。

FK228处理后, 能够明显阻滞细胞周期于G₂/M期, 提示FK228处理影响了肿瘤细胞的有丝分裂过程。免疫印迹结果表明, FK228处理能够显著增强A549细胞检查点蛋白BubR1和Bub1蛋白表达, 推测其原因可能是HDAC参与的转录抑制复合体调控了两个基因相应表达^[8], FK228处理后这种抑制被解除, 导致相应的基因的蛋白表达升高。结合上述实验, 可以得出结论FK228对BubR1和Bub1着丝粒定位的阻断并不是由于对其蛋白表达的抑制而造成的。

由于BubR1和Bub1主要监测张力信号, FK228处理后BubR1和Bub1蛋白的着丝粒定位的消失, 可以部分说明纺锤体检查点在监控张力方面的功能缺失。由于本部分实验没有观察到Mad2蛋白的正常定位, 所以通过免疫荧光染色实验还不能准确判定纺锤体检查点在监控黏附方面的功能是否正常。为了进一步验证FK228处理对细胞纺锤体检查点

功能的影响, 我们又进行了纺锤体检查点功能检测实验。FACS结果显示FK228处理后, 细胞经taxol和nocodazole两种药物作用后, 皆不能发生有效的细胞周期阻滞, 提示FK228处理后细胞检查点在监测微管-着丝粒黏附和纺锤体张力等两方面的功能皆出现异常。在有丝分裂前期细胞中, 检查点激酶蛋白Bub1首先定位于着丝粒, 其次CENP-F、BubR1、CENP-E蛋白才定位于着丝粒, 最后检查点蛋白Mad2才定位于末前中期着丝粒^[5]。着丝粒区检查点蛋白招募和Bub1、BubR1、Mps1等激酶蛋白的活性对于末端效应子蛋白Mad2的激活是必需的, 而研究表明Mad2蛋白能够竞争结合于Cdc20与的细胞周期后期促进复合体的结合位点, 从而抑制细胞周期后期促进复合体泛素连接酶活性, 调控细胞有丝分裂^[9-10]。BubR1激酶也被研究证实能够参与细胞周期后期促进复合体的抑制调控过程^[11]。提示我们先前研究所发现的FK228诱导异常有丝分裂是其抑制肿瘤细胞有丝分裂检查点蛋白着丝粒定位以及纺锤体检查点功能所致。

先前研究表明, 染色体乘客复合体蛋白Survivin蛋白对维持张力缺失条件下检查点的持续激活是必需的^[12]。而染色体乘客复合体蛋白Aurora B蛋白对于着丝粒微管粘附缺陷而激活的纺锤体检查点的维持是必需的^[13-14], 而我们先前研究也表明FK228处理能够有效抑制Survivin、Aurora B的定位^[15], 提示FK228或许能够通过影响染色体乘客复合体蛋白的定位和功能影响肿瘤细胞纺锤体检查点功能, 进而杀伤肿瘤细胞。

本研究表明, FK228能够通过影响肿瘤细胞纺锤体检查点蛋白Bub1和BubR1着丝粒定位以及通过影响肿瘤细胞纺锤体检查点功能从而影响肿瘤细胞的有丝分裂, 进而杀伤肿瘤细胞。靶向肿瘤细胞有丝分裂是目前临床肿瘤治疗中所应用的最成功的策略之一, 本研究有助于阐明HDACi抗肿瘤作用的新机制, 为HDACi的临床实验研究提供更好的理论指导。

参考文献 (References)

- 1 Ververis K, Hiong A, Karagiannis TC, Licciardi PV. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): Multitargeted anticancer agents. *Biologics* 2013; 7: 47-60.
- 2 Yu X, Guo ZS, Marcu MG, Neckers L, Nguyen DM, Chen GA, *et al.* Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228. *J Natl Cancer Inst*

- 2002; 94(7): 504-13.
- 3 Faraco G, Pittelli M, Cavone L, Fossati S, Porcu M, Mascagni P, *et al.* Histone deacetylase (HDAC) inhibitors reduce the glial inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. *Neurobiol Dis* 2009; 36(2): 269-79.
- 4 Zhang XH, Rao M, Lopricato JA, Hong JA, Zhao M, Chen GZ, *et al.* Aurora A, Aurora B and Survivin are novel targets of transcriptional regulation by histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(9): 1388-97.
- 5 Johnson VL, Scott MI, Holt SV, Hussein D, Taylor SS. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 8): 1577-89.
- 6 Bolanos-Garcia VM, Blundell TL. BUB1 and BUBR1: Multifaceted kinases of the cell cycle. *Trends Biochem Sci* 2011; 36(3): 141-50.
- 7 Blajeski AL, Phan VA, Kottke TJ, Kaufmann SH. G₁ and G₂ cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *J Clin Invest* 2002; 110(1): 91-9.
- 8 Li J, Lin Q, Wang W, Wade P, Wong J. Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev* 2002; 16(6): 687-92.
- 9 Yu H. Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14(6): 706-14.
- 10 Izawa D, Pines J. Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *J Cell Biol* 2012; 199(1): 27-37.
- 11 Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 2001; 154(5): 925-36.
- 12 Lens SM, Wolthuis RM, Klompmaker R, Kauw J, Agami R, Brummelkamp T, *et al.* Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J* 2003; 22(12): 2934-47.
- 13 Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, *et al.* The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 2003; 161(2): 281-94.
- 14 Becker M, Stolz A, Ertych N, Bastians H. Centromere localization of INCENP-Aurora B is sufficient to support spindle checkpoint function. *Cell Cycle* 2010; 9(7): 1360-72.
- 15 Zhang X, Zhang Z, Chen G, Zhao M, Wang D, Zhang X, *et al.* FK228 induces mitotic catastrophe in A549 cells by mistargeting chromosomal passenger complex localization through changing centromeric H3K9 hypoacetylation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2010; 42(10): 677-87.