

研究论文

曲古抑菌素A(TSA)对骨肉瘤细胞株143B 增殖和凋亡的作用及其机制

杨 阳¹ 严树涓¹ 夏 菁² 石庆强² 姚 娟¹ 幸艺芳¹ 翁亚光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, 重庆市重点实验室, 重庆 400016;²重庆医科大学基础医学院, 组织学与胚胎学教研室, 重庆 400016)

摘要 观察曲古抑菌素A(TSA)对骨肉瘤细胞株143B增殖及凋亡的作用, 并探讨其机制。TSA与p38抑制剂(SB203580, 3 $\mu\text{mol/L}$)及JNK抑制剂(SP600125, 0.5 $\mu\text{mol/L}$)单独或同时处理143B细胞, 分别以MTT、台盼蓝染色、流式细胞术和JC-1(测定线粒体跨膜电位)法检测TSA对143B细胞的增殖、存活、周期以及凋亡的影响。应用RT-PCR、Western blot检测Bax、Bcl-2、p38/JNK表达。结果显示, TSA能够以时间和剂量依赖方式抑制143B细胞增殖, 使细胞周期阻滞于G₀/G₁与G₂/M期, 并能诱导143B细胞凋亡, 引起线粒体膜电位降低, 促凋亡蛋白Bax表达上调, 抑凋亡蛋白Bcl-2表达下调, 同时使p38/JNK活化增加。p38/JNK抑制剂则能逆转TSA对Bax/Bcl-2的上调及抑制作用。研究结果揭示, TSA可以时间剂量依赖方式抑制143B细胞增殖, 阻滞细胞周期, 诱导细胞凋亡; 其诱导细胞凋亡的机制可能与活化MAPK通路中p38和JNK的活性从而激发线粒体凋亡通路有关。

关键词 曲古抑菌素A; 骨肉瘤; 增殖; 凋亡

Effects and Potential Mechanisms of Trichostatin A (TSA) on the Proliferation and Apoptosis of Osteosarcoma Cell Line 143B

Yang Yang¹, Yan Shujuan¹, Xia Jing², Shi Qingqiang², Yao Juan¹, Xing Yifang¹, Weng Yaguang¹, Zuo Guowei^{1*}¹The Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education, College of Laboratory Medicine,Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Histology and Embryology Department,

School of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This paper studied the effects of Trichostatin A (TSA) on the proliferation and apoptosis of osteosarcoma cell line 143B and its potential mechanisms. 143B cells were treated with indicated doses of TSA in the presence or absence of p38 inhibitor (SB203580, 3 $\mu\text{mol/L}$) and JNK inhibitor (SP600125, 0.5 $\mu\text{mol/L}$), and then the proliferation activity of cell line was determined with MTT assay and trypan blue staining. Cell apoptotic and cell cycle were observed by flow cytometry. The mitochondrial membrane potential detection was observed with JC-1 assay. The expression levels of Bax, Bcl-2, p38/JNK were determined by RT-PCR and Western blot. The results showed that TSA could significantly suppress the proliferation of 143B in a time- and dose-dependent manner

收稿日期: 2013-09-16 接受日期: 2013-11-19

国家自然科学基金(批准号: 81102035)和重庆市教委基金(批准号: KJ110328)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485240, E-mail: zuoguowei@gmail.com

Received: September 16, 2013 Accepted: November 19, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81102035) and Chongqing Board of Education Funds (Grant No.KJ110328)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485240, E-mail: zuoguowei@gmail.com

网络出版时间: 2014-01-17 15:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0301.html>

with MTT/trypan blue staining analysis. The apoptotic rate was increased with TSA treatment, and the cell cycle arrest was observed (staying in G₀/G₁ and G₂/M), and the decrease of mitochondrial membrane potential detection was also visible. RT-PCR and Western blot showed that the expressions of Bax, Bcl-2 and p38/JNK were increased. p38/JNK inhibitors could reverse the effects of TSA on the expression level of Bax/Bcl-2. These data demonstrated that TSA could inhibit the proliferation of 143B cell in a time- and dose-dependent manner. TSA could also induce apoptosis and cell cycle arrest of 143B with different concentrations. The mechanisms of TSA induced apoptosis may attribute to the stimulation of mitochondrial apoptosis pathway by activating p38/MAPK and JNK/MAPK pathways.

Key words Trichostatin A; osteosarcoma; proliferation; apoptosis

骨肉瘤是最常见的恶性成骨性肿瘤之一。近年来,随着外科手术以及辅助化疗技术的进步和发展,骨肉瘤的治疗效果取得了不少进步,但其预后仍然较差,有超过一半以上的病人发生转移且转移病人的5年生存率<50%^[1]。同其他恶性肿瘤一样,表观遗传学修饰在骨肉瘤的发生发展中发挥着重要的作用。组蛋白的乙酰化修饰可以通过影响DNA-组蛋白间的相互作用来改变染色质的结构,与基因的活化与沉默关系密切^[2]。组蛋白的乙酰化水平通过乙酰化转移酶(HATs)和去乙酰化转移酶(HDACs)的可逆性调节维持着动态平衡,精确地调控着基因的转录和表达^[3]。研究发现,组蛋白的乙酰化与细胞生长密切相关,而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^[4]。

20世纪90年代以来,越来越多的组蛋白去乙酰化抑制剂(HDACIs)被发现和验证,这些抑制剂可用于逆转组蛋白乙酰化的促癌作用。曲古抑菌素A(Trichostatin A, TSA),是四大类组蛋白去乙酰化抑制剂代表药物之一,主要通过下调HDAC4表达来特异性抑制HDAC的活性,通过在纳摩尔的浓度水平抑制组蛋白的乙酰化来阻断异常基因的募集,从而达到抗肿瘤的效应^[5-6]。TSA的抗肿瘤效应在多种恶性肿瘤中都得到了验证,然而对骨肉瘤细胞的作用国内外的研究却甚少。因此在本研究中,旨在研究和观察TSA对人类骨肉瘤细胞143B的增殖及其凋亡的作用,并探讨其机制。

1 材料与方 法

1.1 材料及分组

1.1.1 药品和主要试剂 DMEM/高糖培养基(美国

Hyclone公司),胎牛血清(美国Gibco公司),曲古抑菌素A(TSA,美国Sigma公司),MTT试剂、DMSO(北京Solarbio公司),RT-PCR及PCR相关试剂(大连TaKaRa公司),抗p-JNK、JNK、p-p38、p38、Bax、Bcl-2单克隆抗体(美国Santa Cruz公司),Trizol(美国Invitrogen公司),台盼蓝试剂盒、线粒体膜电位(JC-1)检测试剂盒、p38/JNK抑制剂(江苏碧云天生物公司)。

1.1.2 实验分组 实验分25 ng/mL对照组(1组)、25 ng/mL TSA实验组(2组)、50 ng/mL对照组(3组)和50 ng/mL TSA实验组(4组)。1、3组为加入与相应TSA实验组所用溶剂等量的DMSO。每次实验重复3次。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 人骨肉瘤细胞143B细胞(本实验室保存),以含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素/链霉素的DMEM/高糖培养基,于37℃、5% CO₂培养箱培养。取生长良好的对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT法分析细胞增殖能力 取对数生长期的143B细胞,以2.5×10⁴/mL接种于96孔细胞培养板中,培养6 h后,改用加入不同浓度的TSA(10, 12.5, 25, 50, 100, 200, 1 000, 2 000 ng/mL)的无血清培养基(空白组仅加入相同体积的无血清培养基),作用24, 48, 72 h。每孔加入20 μL 5 mg/mL MTT,继续培养4 h。每孔加入150 μL DMSO溶液,吹打混匀,于酶标仪492 nm波长处测吸光度值。按下列公式计算细胞生长抑制率和IC₅₀值:

细胞生长抑制率=(1-实验组平均D值/空白组平均D值)×100%

1.2.3 台盼蓝染色法分析细胞存活率 收集对照组和处理组细胞(1、2、3、4组处理24 h),用适量细胞重悬液重悬细胞。吸取100 μL重悬细胞加入100 μL台盼蓝染色液(2×),轻轻混匀,染色5 min,注入血细

胞计数板计数。每组计数500个细胞, 数出蓝色细胞和细胞总数。按下列公式计算细胞存活率: 细胞存活率=(细胞总数-蓝色细胞数)/细胞总数 \times 100%。

1.2.4 流式细胞仪分析TSA对细胞周期和细胞凋亡的影响 (1)细胞凋亡的检测。收集对照组和处理组细胞(1、2、3、4组处理24 h), 重悬于Binding buffer中, 加荧光标记的Annexin V和PI染液, 室温、避光孵育5 min。流式细胞仪进行结果检测。(2)细胞周期的检测。收集细胞之后, 以70%冰无水乙醇/PBS固定过夜, PBS洗涤一次, 加入400 μ L溴化乙锭, 100 μ L RNase A, 4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。流式细胞仪进行结果检测。

1.2.5 JC-1分析线粒体跨膜电位变化 JC-1是一种广泛用于检测线粒体跨膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的理想荧光探针。线粒体跨膜电位较高时, JC-1聚集在线粒体基质中, 形成聚合物(J-aggregates), 产生红色荧光; 线粒体跨膜电位较低时, JC-1不能聚集在线粒体的基质中, 则产生绿色荧光。通过JC-1从红色荧光到绿色荧光的转变可检测到细胞跨膜电位的下降, 并可作为细胞凋亡的检测指标。按1、2、3、4组于六孔培养板培养并处理细胞24 h后, 清洗两次, 加入1 mL细胞培养液及1 mL JC-1染色工作液, 充分混匀, 放置于细胞培养箱中, 37 $^{\circ}$ C孵育20 min。孵育结束后, 吸除上清, 用JC-1染色缓冲液(1 \times)洗涤2次, 加入2 mL细胞培养液。荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.6 RT-PCR检测凋亡相关基因 细胞培养及药物处理同前, 用Trizol试剂收集细胞总RNA, 抽提总RNA之后, 逆转录(反应条件: 70 $^{\circ}$ C 1 h, 37 $^{\circ}$ C 5 min)以合成cDNA。PCR反应扩增Bax、Bcl-2基因产物, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性30 s, (Bcl-2: 53 $^{\circ}$ C; Bax: 52 $^{\circ}$ C; GADPH: 53 $^{\circ}$ C)退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 循环30次。引物序列参照表1。扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪成像。

1.2.7 Western印迹法检测Bax、Bcl-2、p-p38、p38、p-JNK、JNK 收集前述方法培养并处理的细胞,

加入200 μ L细胞裂解液(含磷酸化及蛋白酶抑制剂)。冰上放置30 min。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心25 min。取上清液, 按4:1加入5 \times loading buffer, 沸水中煮8 min使其变性, 经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 湿转, 37 $^{\circ}$ C封闭2 h, 用Bax(1:3 000)、Bcl-2(1:3 000)、p38(1:500)、JNK(1:500)、p-p38(1:500)、p-JNK(1:500)、 β -actin(1:1 000)单克隆抗体于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗膜3次, 再以相应二抗抗体37 $^{\circ}$ C孵育1 h, 电化学发光法显影。

1.2.8 统计学分析 组间比较采用t检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 不同浓度TSA可抑制143B细胞的增殖及存活

通过MTT法检测TSA对143B细胞的增殖作用, 结果显示: 143B细胞经不同浓度TSA作用24, 48, 72 h后, 与空白组相比, TSA处理组以时间和剂量依赖方式抑制143B细胞增殖(图1A)。通过台盼蓝染色法检测TSA对143B细胞存活率的影响, 结果显示: 不同浓度的TSA作用24 h后, 处理组细胞存活率与空白组相比有明显的降低(图1B, $P < 0.05$), IC_{50} 值=50 ng/mL。

2.2 不同浓度TSA可阻滞细胞周期转化进程并诱导细胞凋亡

不同浓度TSA(25, 50 ng/mL)作用24 h后, 与其相应对照组相比, 实验组中 G_0/G_1 期与 G_2/M 期均有显著的积累。因此, TSA不仅阻滞细胞周期由 G_0/G_1 期向S期转化, 并且同时作用于 G_2/M 期, 从而共同阻滞细胞周期转化进程, 导致143B细胞周期的停止(图2A、表2)。对其细胞凋亡的影响则表现在实验组中细胞凋亡的数目明显增多(图2B, $P < 0.05$)。

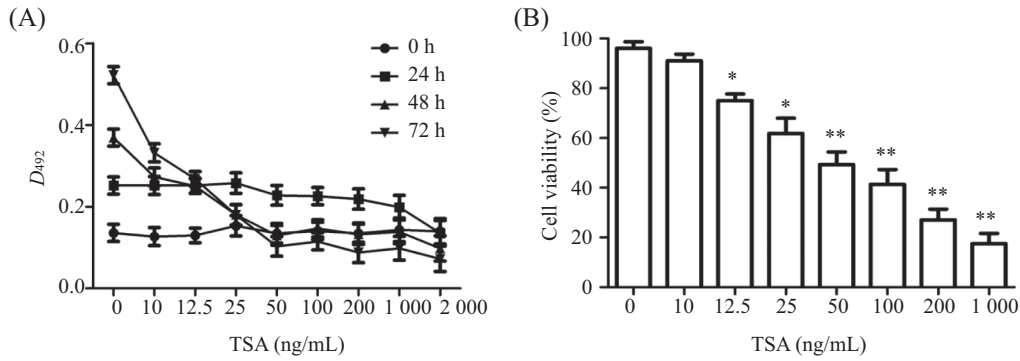
2.3 TSA可明显降低143B细胞线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)

实验结果显示, 不同浓度TSA(25, 50 ng/mL)作用24 h后, 实验组中线粒体跨膜电位降低的细胞(绿色荧光)明显多于对照组(图3), 说明TSA能够促进线

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游序列(5' \rightarrow 3')	下游序列(5' \rightarrow 3')	长度
Gene	Forward sequence (5' \rightarrow 3')	Reverse sequence (5' \rightarrow 3')	Length
Bax	CCC TTT TGC TTC AGG GTT TC	TGT TAC TGT CCA GTT CGT CC	150 Kb
Bcl-2	GAG ACA GCC AGG AGA ATC A	CCT GTG GAT GAC TGA GTA CC	128 Kb
GADPH	CAG CGA CAC CCA CTC CTC	TGA GGT CCA CCA CCC TGT	122 Kb

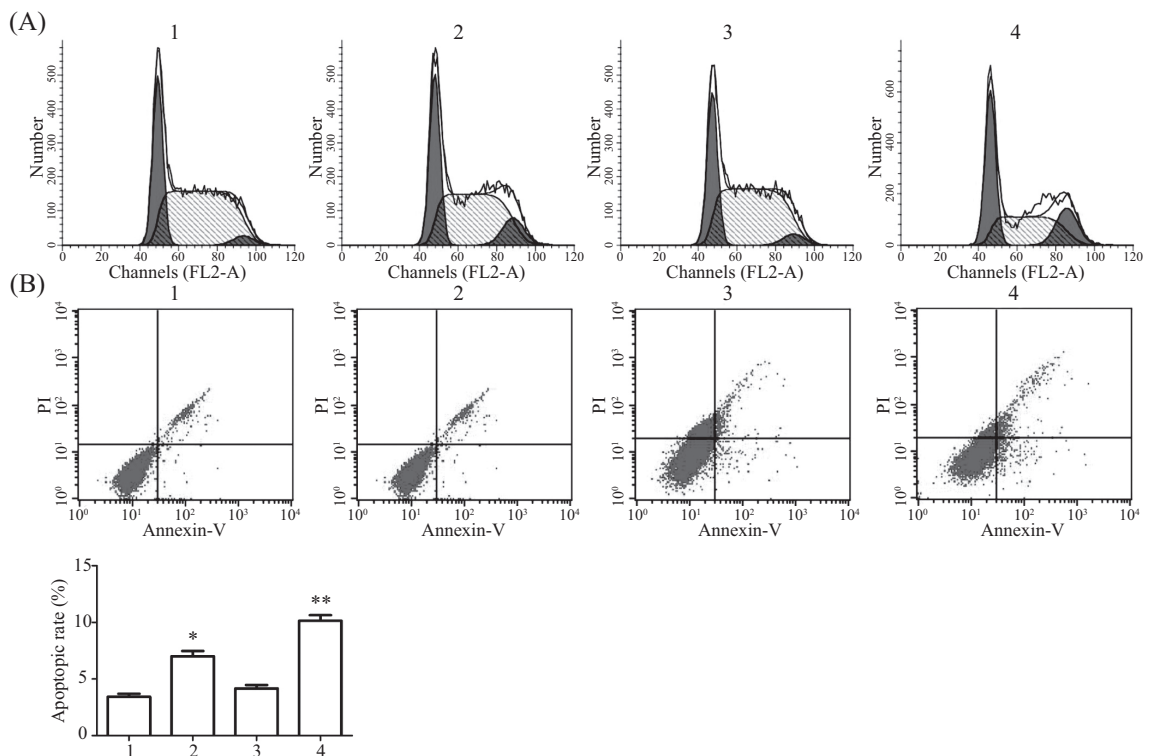


*P<0.05,**P<0.01, 与对照组相比。

*P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

图1 TSA对143B的增殖及细胞存活的抑制作用

Fig.1 Inhibition of TSA on 143B cell proliferation and viability



1: 25 ng/mL对照组; 2: 25 ng/mL TSA实验组; 3: 50 ng/mL对照组; 4: 50 ng/mL TSA实验组。*P<0.05, **P<0.01, 与对照组相比。

1: 25 ng/mL control group; 2: 25 ng/mL TSA group; 3: 50 ng/mL control group; 4: 50 ng/mL TSA group. *P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

图2 流式细胞仪检测不同浓度TSA对143B周期和凋亡的影响

Fig.2 Effects of TSA on cell cycle and apoptotic of 143B in different concentrations

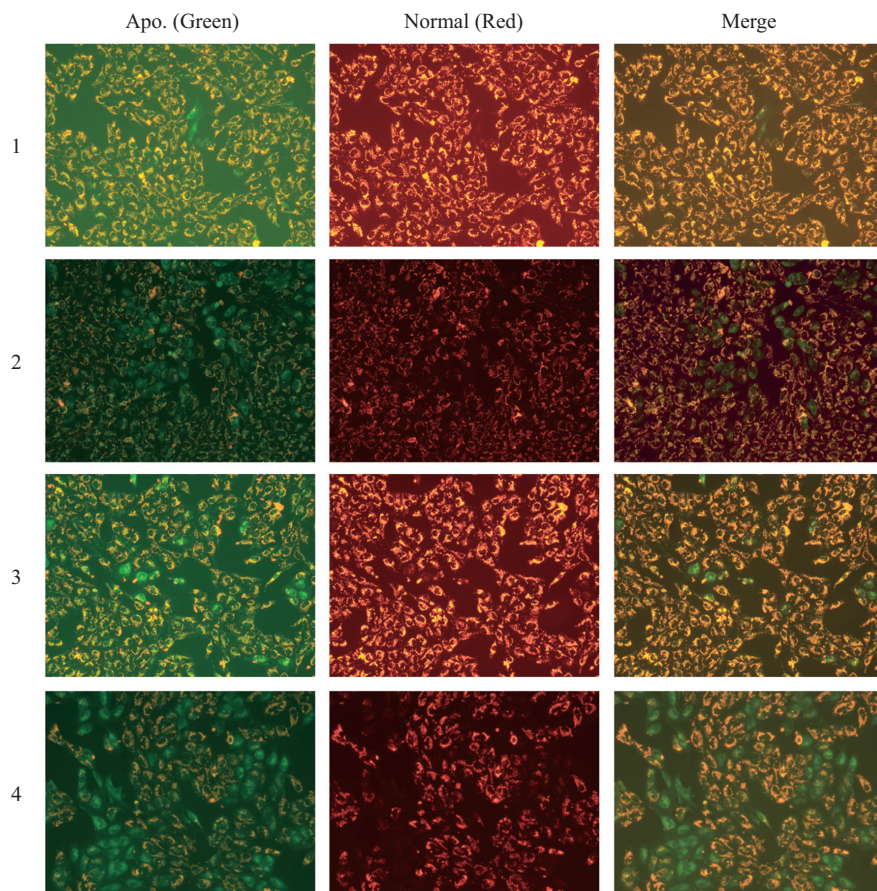
表2 不同浓度TSA对143B细胞周期的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effects of TSA on 143B cell cycle in different concentrations ($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	G ₀ /G ₁ 期(%)	G ₂ /M期(%)	S期(%)
Groups	G ₀ /G ₁ (%)	G ₂ /M (%)	S (%)
1	31.74±3.22	3.35±3.36	65.29±3.40
2	39.93±2.72 ^a	10.37±2.78 ^a	56.29±2.28 ^a
3	29.46±2.21	4.38±2.53	65.44±2.87
4	40.43±2.76 ^a	19.08±2.19 ^a	40.86±2.18 ^a

^aP<0.05, 与对照相比。

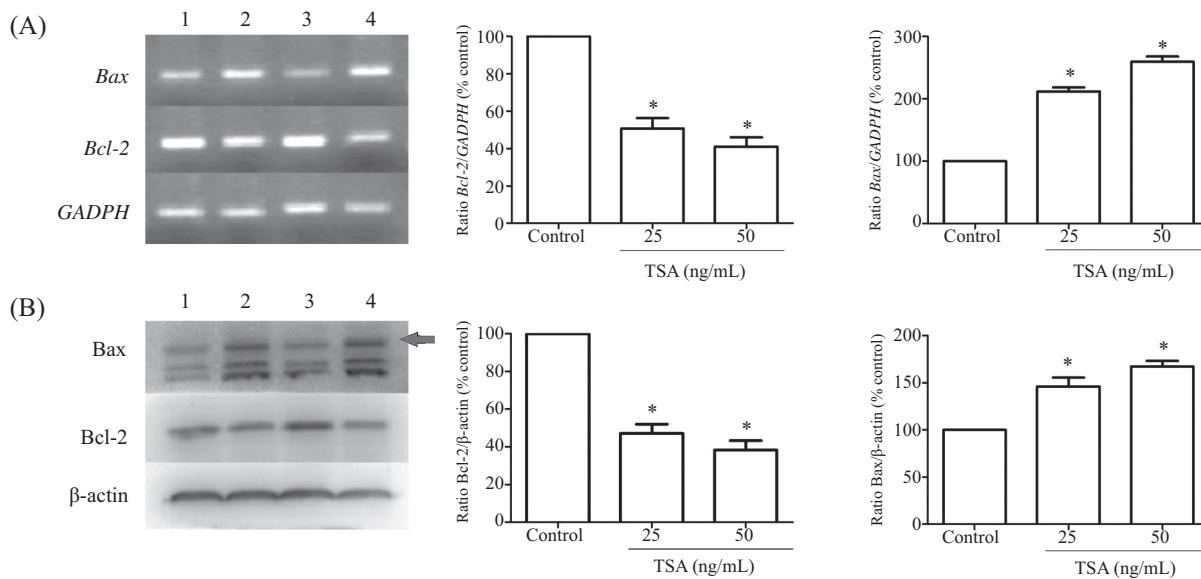
^aP<0.05 compared with control group.



1: 25 ng/mL对照组; 2: 25 ng/mL TSA实验组; 3: 50 ng/mL对照组; 4: 50 ng/mL TSA实验组。
1: 25 ng/mL control group; 2: 25 ng/mL TSA group; 3: 50 ng/mL control group; 4: 50 ng/mL TSA group.

图3 TSA对线粒体膜电位的作用

Fig.3 Effects of TSA on mitochondrial membrane potential



A: *Bax/Bcl-2*的mRNA表达水平; B: *Bax/Bcl-2*的蛋白表达水平。1: 25 ng/mL对照组; 2: 25 ng/mL TSA实验组; 3: 50 ng/mL对照组; 4: 50 ng/mL TSA实验组。* $P < 0.05$, 与对照组相比。

A: the mRNA expression level of *Bax/Bcl-2*; B: the protein expression level of *Bax/Bcl-2*. 1: 25 ng/mL control group; 2: 25 ng/mL TSA group; 3: 50 ng/mL control group; 4: 50 ng/mL TSA group. * $P < 0.05$ compared with control group.

图4 TSA对Bax/Bcl-2的表达水平的影响

Fig.4 Effects of TSA on expression level of *Bax/Bcl-2*

粒体跨膜电位的降低,使细胞通过线粒体凋亡通路进入凋亡进程。

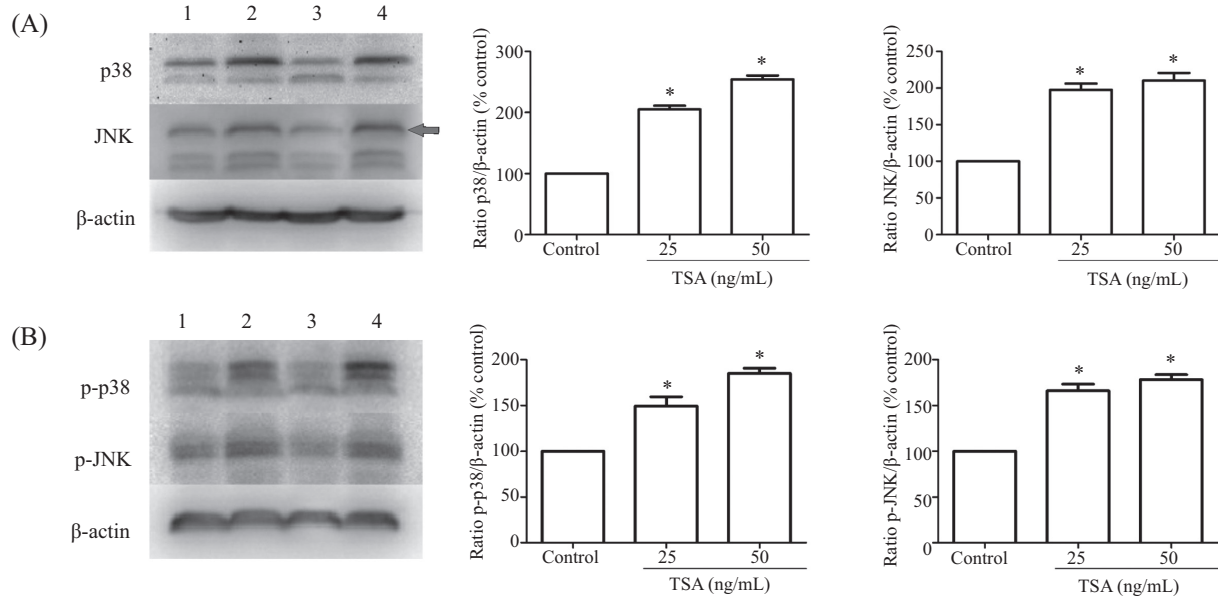
2.4 TSA能够改变凋亡相关基因的表达水平

不同浓度TSA(25, 50 ng/mL)作用24 h后,凋亡相关基因的表达改变如下:促凋亡基因*Bax*表达明显上调,而抑凋亡基因*Bcl-2*则明显受到抑制(图4A,

$P < 0.05$)。Western blot法检测其蛋白水平表达变化,结果显示:促凋亡蛋白*Bax*表达明显上调,而抑凋亡蛋白*Bcl-2*表达则明显受到抑制(图4B, $P < 0.05$)。

2.5 TSA能够上调143B细胞内p38/JNK表达水平及其磷酸化水平

Western印迹法检测p38/JNK表达水平及其p38/

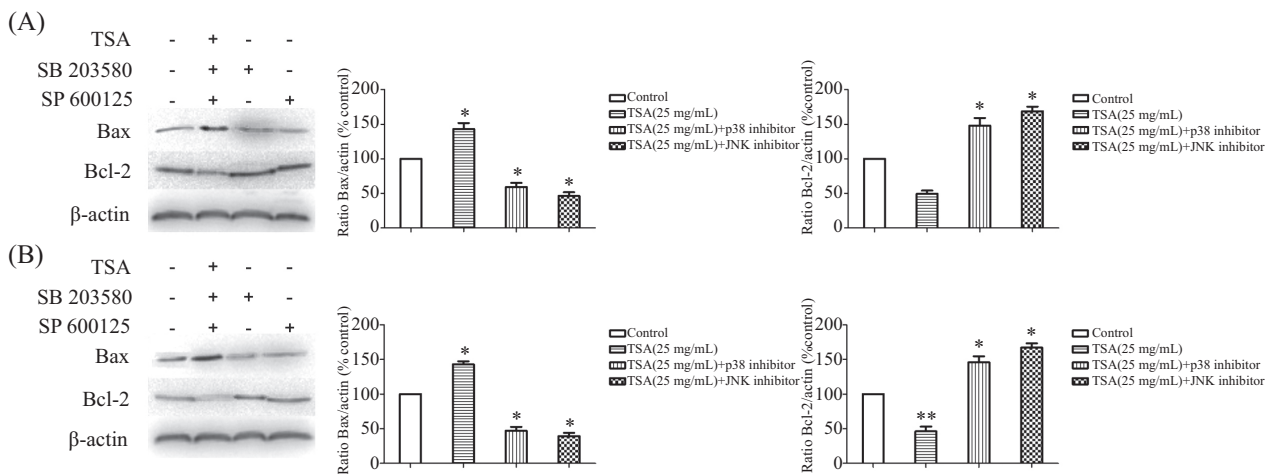


A: p38/JNK的蛋白表达水平; B: p-p38/p-JNK的蛋白表达水平。1: 25 ng/mL对照组; 2: 25 ng/mL TSA实验组; 3: 50 ng/mL对照组; 4: 50 ng/mL TSA实验组。* $P < 0.05$, 与对照组相比。

A: the protein expression level of p38/JNK; B: the protein expression level of p-p38/p-JNK; 1: 25 ng/mL control group; 2: 25 ng/mL TSA group; 3: 50 ng/mL control group; 4: 50 ng/mL TSA group. * $P < 0.05$ compared with control group.

图5 TSA对p38/p-p38以及JNK/p-JNK的表达水平的影响

Fig.5 Effects of TSA on expression levels of p38/p-p38 and JNK/p-JNK



A: TSA(25 mg/mL)与p38/JNK抑制剂共同作用后Bax/Bcl-2的蛋白表达水平; B: TSA(50 mg/mL)与p38/JNK抑制剂共同作用后Bax/Bcl-2的蛋白表达水平。* $P < 0.05$, 与对照组相比。

A: the protein expression level of Bax/Bcl-2 by TSA (25 mg/mL) cotreated with p38/JNK inhibitors; B: the protein expression level of Bax/Bcl-2 by TSA (50 mg/mL) cotreated with p38/JNK inhibitors. * $P < 0.05$ compared with control group.

图6 p38/JNK抑制剂对TSA作用下Bax/Bcl-2表达水平的影响

Fig.6 Effects of TSA cotreated with p38/JNK inhibitors on expression level of Bax/Bcl-2

JNK磷酸化水平变化, 结果显示: 与对照组相比, 经不同浓度TSA处理24 h后, 实验组总p38及p-p38、总JNK及p-JNK均有明显增加(图5, $P < 0.05$), 说明TSA对143B细胞的抑制增殖和诱导凋亡的作用有可能是通过调节p38/MAPK及JNK/MAPK信号通路实现的。

2.6 p38及JNK抑制剂能够反转TSA所改变的凋亡相关基因的表达水平

Western印迹法检测经p38抑制剂(SB203580, 3 $\mu\text{mol/L}$)及JNK抑制剂(SB203580, 0.5 $\mu\text{mol/L}$)处理后的Bax及Bcl-2表达水平变化, 结果显示: 经TSA与SB203580及SB203580共同处理24 h后, 与未加抑制剂处理的实验组相比, 其Bax及Bcl-2表达水平呈相反变化(图6, $P < 0.05$), 说明p38抑制剂及JNK抑制剂能够逆转TSA对Bax/Bcl-2的上调及抑制作用, 反向验证了TSA对143B细胞的抑制增殖和诱导凋亡的作用有可能是通过调节p38/MAPK及JNK/MAPK信号通路实现的。

3 讨论

染色质和核小体结构的改变在基因转录调控中发挥着极为重要的作用。核小体中核心组蛋白的N-端赖氨酸残基通过进行可逆的乙酰化修饰来削弱/增强DNA与其的结合, 改变核小体与转录因子的结合活性, 最终影响核小体的结构^[7]。组蛋白的乙酰化水平取决于乙酰化转移酶(HATs)和去乙酰化转移酶(HDACs)的共同作用^[8]。组蛋白的乙酰化和去乙酰化通过改变染色质的结构来调节基因转录水平的活性, 由于转录异常所导致的许多癌基因和抑癌基因的异常表达则可导致肿瘤的发生, 因此推测组蛋白的乙酰化可能与肿瘤的发生发展密切相关^[9]。许多研究表明, 编码乙酰化转移酶和去乙酰化转移酶的基因的表达的改变与癌变相关, 并且去乙酰化转移酶的异常募集与多种肿瘤的恶性程度联系密切^[10], 因此去乙酰化抑制剂(HDACIs)可以通过抑制HDACs活性, 提高组蛋白乙酰化水平, 调节基因转录活性, 从而发挥抗癌的作用^[11]。

曲古抑菌素A(TSA)是HDACIs的代表药物, 源自于链霉菌代谢产物, 最初作为抗真菌药物广泛使用。后续研究发现, TSA可以其氧肟酸基团与HDACs的锌离子相结合, 使HDACs失活^[12]。TSA可以提高多种抑癌转录因子的乙酰化水平, 也有许多研究证明TSA能够抑制多种肿瘤细胞的生长并诱导

其凋亡^[13], 但TSA对骨肉瘤细胞的抑癌效应的报道仍较少。本研究首先通过MTT和台盼蓝染色法发现TSA能够以时间、剂量依赖关系明显抑制骨肉瘤细胞143B的增殖, 同时降低143B的24 h细胞存活率, 并以此为依据确定了后续实验的药物浓度。由于细胞凋亡程度与药物抗肿瘤的效应相关^[14], 于是采用了流式细胞仪对TSA诱导143B细胞的凋亡活性进行检测, 结果证明TSA能够显著诱导其凋亡。同时, 观察细胞周期的变化时发现, TSA作用后的143B细胞周期G₁/S期与G₂/M期发生紊乱, 细胞周期被阻滞于G₀/G₁期与G₂/M期。G₂期是细胞进行有丝分裂前的重要准备间隙, 而G₁期中晚期则是调节细胞周期得以正确执行的重要时期, 也是药物等其他因素作用时的关键点^[15], 因此, TSA抑制细胞周期可能与其发挥抗癌效应的机制相关。

许多研究表明, HDACIs能够通过线粒体通路诱导肿瘤细胞的凋亡, 而其可能的机制是由于HDACIs能够上调促凋亡基因并下调抑凋亡基因的表达, 从而逆转细胞凋亡的平衡^[16]。当某些凋亡诱导因素(如促凋亡基因Bax)作用于线粒体跨膜电位并使之变化时, 可导致线粒体膜通透性增大, 使细胞凋亡的启动因子从线粒体内释放出来, 激活caspase-3, 导致细胞凋亡^[17]。而细胞内的Bax与Bcl-2往往成比例存在, Bax表达上调能够拮抗Bcl-2的抑凋亡效应^[18]。亦有研究证实p38/MAPK、JNK/MAPK与线粒体凋亡通路相关^[19], 活化的p38/MAPK、JNK/MAPK能够诱导Bcl-2磷酸化, 使Bax表达上调, 激活线粒体凋亡通路, 促使细胞凋亡^[20-21]。本研究证实了以上说法: TSA通过活化p38/MAPK、JNK/MAPK信号通路, 使Bax/Bcl-2分别受到上调及抑制, 作用于线粒体, 使线粒体跨膜电位发生明显改变, 触发线粒体凋亡通路, 从而诱导细胞凋亡, 并利用p38抑制剂(SB203580, 3 $\mu\text{mol/L}$)及JNK抑制剂(SB203580, 0.5 $\mu\text{mol/L}$)对该结论进行反向验证, 发现p38/JNK抑制剂能够逆转TSA对Bax/Bcl-2的上调及抑制, 进一步说明TSA是通过活化p38/MAPK、JNK/MAPK信号通路, 使Bax/Bcl-2分别受到上调或抑制, 从而诱导细胞凋亡。

本研究发现了TSA对骨肉瘤细胞143B的抑制增殖、诱导凋亡及阻滞细胞周期等抗肿瘤作用, 并发现TSA诱导骨肉瘤细胞凋亡的机制与活化p38/MAPK、JNK/MAPK信号通路有关, 使其可能成为骨肉瘤临床治疗的新方向。然而需要指出的是,

TSA作为一种小分子化合物,可能直接作用肿瘤细胞异常激活的信号通路,也可能作为去乙酰化酶抑制剂通过调节组蛋白或其他蛋白的乙酰化状态,间接地改变肿瘤细胞中的异常信号通路。因此,TSA对骨肉瘤抗癌作用的机制还需进一步研究和探讨。

参考文献 (References)

- Liu S, Cheng H, Kwan W, Lubieniecka JM, Nielsen TO. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in clear cell sarcoma models. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(6): 1751-61.
- Cheng DD, Yang QC, Zhang ZC, Yang CX, Liu YW. Antitumor activity of histone deacetylase inhibitor trichostatin A in osteosarcoma cells. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2012; 13(4): 1395-9.
- Roh MS, Kim CW, Park BS, Kim GC, Jeong JH, Kwon HC, *et al.* Mechanism of histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induced apoptosis in human osteosarcoma cells. *Apoptosis* 2004; 9(5): 583-9.
- Emonds E, Fitzner B, Jaster R. Molecular determinants of the antitumor effects of trichostatin A in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 2010; 16(16): 1970-8.
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, *et al.* Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 1999; 401(6749): 188-93.
- Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T. Trichostatin A and trapoxin: Novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays* 1995; 17(5): 423-30.
- 刘春艳, 孙海晶, 陆军, 黄百渠. 组蛋白乙酰化与癌症. *生物化学与生物物理进展*(Liu Chunyan, Sun Haijing, Lu Jun, Huang Baiqu. Histone acetylation and cancer. *Prog Biochem Biophys*) 2003; 30(1): 19-23.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: Molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007; 26(37): 5541-52.
- 童汪霞, 廖爱军. 组蛋白乙酰化的研究进展. *肿瘤基础与临床*(Tong Wangxia, Liao Aijun. The research progress of histone acetylation. *J Blast Clinial Oncology*) 2008; 21(6): 544-7.
- Wittenburg LA, Bisson L, Rose BJ. The histone deacetylase inhibitor valproic acid sensitizes human and canine osteosarcoma doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67(1): 83-92.
- Okada T, Tanaka K, Nakatani F, Sakimura R, Matsunobu T, Li X, *et al.* Involvement of P-glycoprotein and MRP1 in resistance to cyclic tetrapeptide subfamily of histone deacetylase inhibitors in the drug-resistant osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells. *Int J Cancer* 2006; 118(1): 90-7.
- Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(15): 1210-6.
- 陈维凯, 陈燕, 谷俊侠, 崔国惠. 曲谷菌素A对HL-60细胞组蛋白乙酰化水平和凋亡的作用. *中国实验血液学杂志*(Chen Weikai, Chen Yan, Gu Junxia, Cui Guohui. Effect of trichostatin A on histone acetylation level and apoptosis in HL-60 cells. *J Exp Hematology*) 2004; 12(3): 324-8.
- Watanabe K, Okamoto K, Yonehara S. Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through downregulation of cellular FLIP. *Cell Death Differ* 2005; 12(1): 10-8.
- Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(6): 738-41.
- Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* 2008; 269(1): 7-17.
- 黄霏, 于超, 刘洪涛, 杨竹, 丁裕斌, 王应雄, 等. 土贝母皂甲作用线粒体途径促进人绒毛膜癌Bewo细胞凋亡. *细胞生物学杂志*(Huang Pei, Yu Chao, Liu Hongtao, Yang Zhu, Ding Yubin, Wang Yingxiong, *et al.* Tubeimoside I induces apoptosis of human choriocarcinoma cells through mitochondrial damage pathway. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2009; 31(6): 831-6.
- 石熠慧, 汤雪明. 细胞凋亡的传递途径及其调控. *细胞生物学杂志*(Shi Yihui, Tang Xueming. Pipeline and regulation of cell apoptosis. *Chinese Journal of Cell Biology*) 1999; 21(2): 49-53.
- Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Cancer* 2009; 9(8): 537-49.
- de Chiara G, Marcocci ME, Torcia M, Lucibello M, Rosini P, Bonini P, *et al.* Bcl-2 phosphorylation by p38 MAPK: Identification of target sites and biologic consequences. *J Biol Chem* 2006; 281(30): 21353-61.
- Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis: Life and death decisions. *Science* 2003; 299(5604): 214-5.