

研究简报

NDGA 上调宫颈癌 SiHa 细胞 p27 和 p53 的表达

高鹏 管蕾 翟斐 郑杰*

(东南大学医学院病理与病理生理学系, 南京 210009)

关键词 去甲二氢愈创木酸; 宫颈癌; p27; p53; HPV

去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)是脂氧合酶非特异性抑制剂,近年来发现NDGA及其衍生物具有抗病毒和抗肿瘤作用^[1-3]。我们先前发现NDGA能通过促进组蛋白H3乙酰化上调p21表达的方式将宫颈癌SiHa细胞抑制于G₁期^[4]。在此基础上,我们进一步探索了NDGA对其他调节G₁/S期转换关键因素:p27和p53的影响。

NDGA 贮存液: 取适量NDGA(Sigma)溶于DMSO,至终浓度为50 mmol/L,这样可以保证添加到培养基后的DMSO含量不超过0.2%。溶液装于棕色玻璃瓶中于4℃保存,整个操作注意避光。

细胞培养: 人乳头瘤病毒-16(human papillomavirus-16, HPV-16)阳性宫颈癌SiHa细胞用含10%小牛血清、100 U/ml青霉素和100 mg/l链霉素的DMEM高糖培养基(Invitrogen)于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

RT-PCR: 用RNAiso Plus(TaKaRa)提取不同浓度药物作用72 h后的SiHa细胞的总RNA,以此RNA逆转录得到的cDNA为模板进行PCR扩增,引物序列见表1, GAPDH为内参,所有引物由南京金斯瑞公司合成。三种基因的扩增体系及程序相同,按以下程序扩增30个循环: 94℃, 40 s; 56℃, 40 s; 72℃, 40 s。取适量PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶上电泳,电泳后在扫胶仪上拍照。用Gel-Pro4软件对电泳条带光密度值进行半定量分析。

蛋白质免疫印迹法: 设四组,分别为20 μmol/L、60 μmol/L和100 μmol/L NDGA处理组和不加药的对照组。培养72 h后提取总核蛋白,BCA法进行蛋白定量。取40 μg核蛋白于10% SDS-PAGE胶上电泳,将蛋白转至PVDF膜,封闭液[含1%牛血清白蛋白的TBST(10 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20)]室温封闭4 h后加入1:1 000

稀释的兔抗人p53(Phospho-Ser33)或兔抗人p27^{Kip1}(Phospho-Thr187)(SAB), 4℃反应过夜。0.1% TBST漂洗3次,每次15 min。加入0.1% TBST稀释(1:5 000)的羊抗兔IgG-HRP(Santa Cruz),室温作用2 h,0.1% TBST充分漂洗3次,每次15 min。加ECL显色液,于柯达活体成像仪中曝光5 min后拍照。目的蛋白的表达强度以目的条带/β-actin亮度比值表示。

染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP): 设三组,分别为80 μmol/L NDGA处理组,300 μmol/L曲古菌素A(trichostatin A, TSA)(Sigma)处理组和不加药的对照组。TSA是常用的组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi),能显著促进组蛋白的乙酰化,作为阳性对照。细胞培养72 h后加1%甲醛交联蛋白质和DNA,提取基因组DNA,超声处理将DNA断裂成约600 bp的片段,用兔抗人Ac-Histone H3 (Lys 9/14)(Santa Cruz)沉淀,后续步骤参照ChIP试剂盒(碧云天)。用于PCR的上下游引物(5'→3')分别为TGG AGA AGC ACT GCA GAG AC和GCG TGT CCT CAG AGT TAG CC。同时,以超声断裂但未沉淀的DNA(Input DNA)检测ChIP效率,正常兔血清处理组为阴性对照。以所得DNA为模板按以下程序扩增30个循环: 94℃, 1 min; 56℃, 1 min; 72℃, 1 min。取适量产物于1.5%琼脂糖凝胶上电泳,电泳后在扫胶仪上拍照。

统计学方法: 数据结果用($\bar{x} \pm s$)表示,全部数据用SPSS16.0统计软件分析,组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

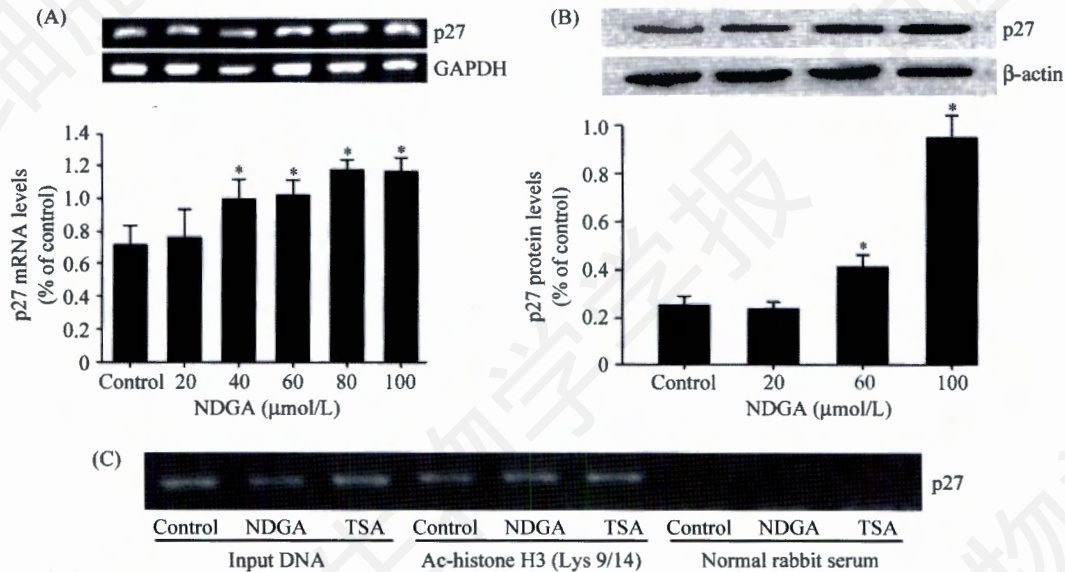
收稿日期: 2010-04-20 接受日期: 2010-07-14

2009年度东南大学优秀博士学位论文基金(No.YBJJ0915)资助项目

* 通讯作者。Tel: 025-83272358, E-mail: jiezheng54@126.com

Table 1 Primer sequences and product sizes

Genes	Primer sequences (5' → 3')	Product length(bp)
<i>p27</i>	Forward: CCG ACG ATT CTT CTA CTC Reverse: CTG ATA AAC AAG GAA ACA TA	165
<i>HPV-16 E6</i>	Forward: GAC CCA GAA AGT TAC CAC AG Reverse: CAT AAA TCC CGA AAA GCA AAG	130
<i>GAPDH</i>	Forward: ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC Reverse: TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	450

**Fig.1** Effects of NDGA on expression of p27 and histone H3 acetylation within p27 promoter

A: effect of NDGA on p27 mRNA by RT-PCR. The relative levels of mRNA were normalized with GAPDH; B: effect of NDGA on p27 protein by Western blot. The relative levels of protein were normalized with β-actin; C: effect of NDGA on histone H3 acetylation within p27 promoter by ChIP-PCR. * $P < 0.05$, relative to control.

NDGA 对 p27 表达及其启动子区域组蛋白 H3 的影响

NDGA 处理能上调 p27 的转录水平(图 1A)和蛋白水平(图 1B)。然而,相对于转录,NDGA 对 p27 蛋白水平的上调效应更显著,且呈剂量依赖性。ChIP 结果表明 NDGA 对 p27 启动子区域组蛋白 H3 的乙酰化水平几乎没有影响(图 1C)。与此同时,我们也排除了 NDGA 对 p27 启动子中段及远端区域组蛋白 H3 乙酰化的影响(结果未显示)。

NDGA 对 p53 和 HPV-16 E6 水平的影响

NDGA 处理能上调 SiHa 细胞中 p53 的蛋白水平(图 2A),呈浓度依赖性。与阳性对照 As_2O_3 (5 μmol/L) 类似(图 2C),NDGA 处理也显著抑制 HPV-16 E6 的转录(图 2B,图 2C),且呈浓度依赖性。然而, TSA (300 nmol/L) 没有该效应(图 2C)。

NDGA 及其衍生物是有潜力的抗肿瘤药物,然而这类药物的作用机制并未完全搞清楚。NDGA 处理细胞的一个典型特征就是 G_1 期阻滞,我们先前发现 NDGA 通过促进启动子区域组蛋白 H3 乙酰化上调 p21 的表达是其潜在的效应机制^[4]。在本研究中,我们发现 NDGA 对另外两个关键的细胞周期调节蛋白 p27 和 p53 的蛋白水平均有上调效应,提示 NDGA 介导的 SiHa 细胞 G_1 期阻滞是多种因素共同作用的结果。

与通过促进启动子区域组蛋白 H3 的乙酰化水平上调 p21 表达不同,NDGA 对 p27 没有该作用,这表明其他机制可能参与了 NDGA 介导的 p27 转录上调。值得注意的是,NDGA 对 p27 蛋白水平的上调效应要比转录显著的多,这暗示 NDGA 可能通过抑制 p27 的降解来上调 p27 蛋白水平。文献^[5]报道, p27 的蛋白水平主要由蛋白酶体介导的降解控制,在该过

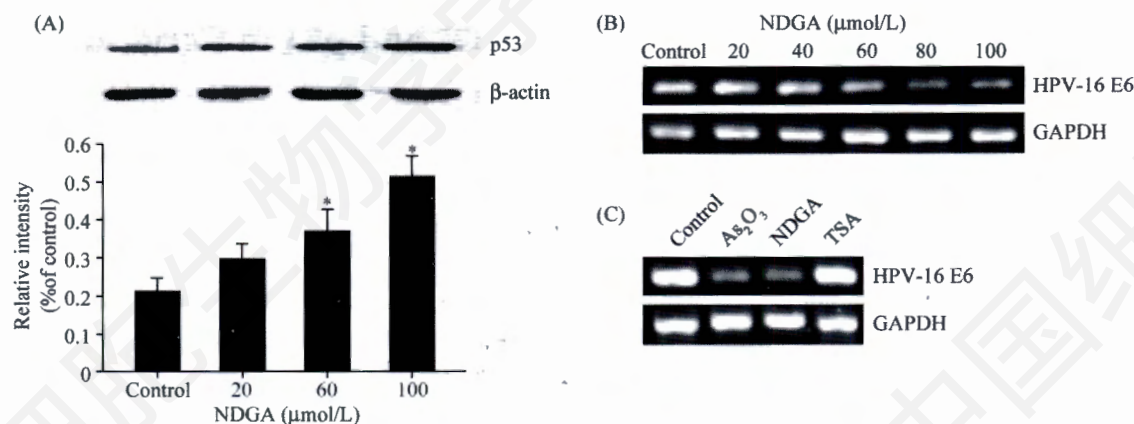


Fig.2 Effects of NDGA on expression of p53 and HPV-16 E6

A: effect of NDGA on p27 protein by Western blot. The relative levels of protein were normalized with β -actin; B: effect of NDGA on HPV-16 E6 mRNA by RT-PCR; C: effect of different drugs on HPV-16 E6 mRNA by RT-PCR. * $P < 0.05$, relative to control.

程中细胞周期素依赖性激酶2(cyclin-dependent kinase 2, CDK2)介导 p27 在 Thr187 位点的磷酸化, 磷酸化的 p27 随后与泛素连接酶 Skp2(S-phase kinase-associated protein 2)结合, 而 Skp2 过表达是 p27 在肿瘤中蛋白水平低的重要原因^[7], NDGA 是否对 Skp2 以及 CDK2 介导的磷酸化有抑制效应仍有待研究。

p53 是重要的细胞周期调节蛋白, 超过 50% 的人类肿瘤中发现有 p53 功能失活。p53 功能失活的方式有多种, 例如 p53 基因突变失活、被 DNA 肿瘤病毒蛋白失活、被 Mdm2 蛋白抑制和 p53 蛋白的误位等。SiHa 细胞是 p53 野生型细胞, 它的 p53 失活是通过 SiHa 细胞表达的 HPV-16 E6 所致^[8]。以往文献^[1]显示 NDGA 衍生物, 如 3-O-Methyl-NDGA 能通过抑制 HPV-16 E6 来稳定 p53。我们发现 NDGA 对 HPV-16 E6 也具有该效应。实验中, 我们用 As₂O₃ 作为阳性对照, 因为 As₂O₃ 能显著抑制 HPV-16 癌基因的表达^[9]。我们也发现 300 nmol/L 的 TSA 对 HPV-16 E6 转录几乎没有影响, 这提示 NDGA 对 HPV-16 E6 的抑制效应与其对组蛋白的乙酰化调节无关, 具体机制有待研究。

综上所述, NDGA 可通过上调 p27 和 p53 阻滞 SiHa 的细胞周期于 G₁ 期, 而 p53 的上调可能与 NDGA 抑制 HPV-16 E6 转录有关。

参考文献(References)

- Allen KL, Tschantz DR, Awad KS, Lynch WP, DeLucia AL. A plant lignan, 3'-O-methyl-nordihydroguaiaretic acid, suppresses papillomavirus E6 protein function, stabilizes p53 protein, and induces apoptosis in cervical tumor cells. *Mol Carcinog* 2007; 46(7): 564-75.
- Meyer GE, Chesler L, Liu D, Gable K, Maddux BA, Goldenberg DD, et al. Nordihydroguaiaretic acid inhibits insulin-like growth factor signaling, growth, and survival in human neuroblastoma cells. *J Cell Biochem* 2007; 102(6): 1529-41.
- Meyers RO, Lambert JD, Hajicek N, Pourpak A, Kalaitzis JA, Dorr RT. Synthesis, characterization, and anti-melanoma activity of tetra-O-substituted analogs of nordihydroguaiaretic acid. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19(16): 4752-5.
- 翟斐, 高鹏, 郑杰. NDGA 抑制宫颈癌 SiHa 细胞的生长与上调 p21 基因组蛋白乙酰化有关. *肿瘤* 2010; 30(8): 671-5.
- Lee J, Kim SS. The function of p27 KIP1 during tumor development. *Exp Mol Med* 2009; 41(11): 765-71.
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 1997; 11(11): 1464-78.
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S, et al. Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 2004; 6(5): 661-72.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63(6): 1129-36.
- Zheng J, Deng YP, Lin C, Fu M, Xiao PG, Wu M. Arsenic trioxide induces apoptosis of HPV16 DNA-immortalized human cervical epithelial cells and selectively inhibits viral gene expression. *Int J Cancer* 1999; 82(2): 286-92.

NDGA Up-regulates the Expression of p27 and p53 in Cervical Cancer SiHa Cells

Peng Gao, Lei Guan, Fei Zhai, Jie Zheng*

(Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medical Science, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract Our previous study showed that nordihydroguaiaretic acid (NDGA) treatment leads to cell cycle arrest at G₁ for elevated p21 which is mediated by elevated level of histone H3 acetylation in cervical cancer SiHa cells. Here, we further detected the effect of NDGA on two other cell cycle regulators: p27 and p53. Results showed that NDGA could up-regulate p27 both at transcription and protein levels, however, NDGA had no effect on acetylation level of histone H3 associated with p27 promoter. NDGA also up-regulated p53 protein level by inhibiting transcription of HPV-16 E6. These results suggest that NDGA can arrest cervical cancer cells at G₁ relating to up-regulating p27 and p53 levels, and the latter is associated with the inhibitory effect of NDGA on HPV-16 E6.

Key words nordihydroguaiaretic acid (NDGA); cervical cancer; p27; p53; HPV

Received: April 20, 2010 Accepted: July 14, 2010

This work was supported by the Scientific Research Foundation of Graduate School of Southeast University(No.YBJJ0915)

*Corresponding author. Tel: 86-25-83272358, E-mail: jiezheng54@126.com