

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 联合 ZD55-TRAIL 溶瘤腺病毒对肝癌细胞杀伤作用的研究

仇 庆, 谢国良, 谌贺宽子, 李 敏, 周秀梅

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘 要: 研究组蛋白去乙酰化抑制剂 SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid)联合 ZD55-TRAIL 对人肝癌细胞株的体外杀伤效果, 实验采用 MTT 法检测 SAHA、ZD55-TRAIL 以及二者联合对肝癌细胞株 Huh-7、Bel-7404、Hep3B 以及人正常肝细胞株 QSG-7701 增殖的抑制作用; 利用 Hoechst33342 染色对联合处理的细胞进行凋亡形态学观察; 通过结晶紫实验进一步检测联合用药对肿瘤细胞的杀伤情况; 通过 Western blot 实验在蛋白水平上检测一些凋亡相关蛋白表达情况的变化。实验结果表明: SAHA 联合 ZD55-TRAIL 处理 3 d 后对肝癌细胞株 Huh-7 的增殖抑制率达到 50%, 对 Hep3B、Bel-7404 也达到近 40% 的杀伤效率, 并且联合治疗对人正常细胞株 QSG-7701 未见明显的毒副作用。同时结晶紫实验也证明联合治疗对肿瘤细胞的杀伤力强于用 SAHA 或 ZD55-TRAIL 单独使用。Western blot 实验证明了药物和病毒的联合作用使促凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 的表达量明显减少, caspase-8 和 caspase-9 蛋白也有相应剪切现象的发生。流式细胞仪同样检测出 SAHA 和 ZD55-TRAIL 联合作用对肝癌细胞有很好的杀伤作用。

关键词: 肿瘤/基因治疗; SAHA; ZD55-TRAIL; 肝癌细胞株; 凋亡

中图分类号: Q789

文献标识码: A

0 引 言

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一, 是我国位居第二的癌症“杀手”, 仅次于胃癌, 常见于中年男性。原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是我国常见的恶性肿瘤之一, 全世界每年死于肝癌的患者约 26 万人, 其中我国占 42.5%^[1]。

近几年, 肿瘤的基因治疗开始在临床方案中使用, 但迄今为止在临床上仍无重大突破。为此, 刘新垣院士于 2001 年首次提出靶向基因一病毒治疗(targeting gene-virotherapy)策略^[2], 即以溶瘤病毒作为基因的表达载体(所谓溶瘤病毒即病毒只特异性地在肿瘤中复制而在正常细胞中不复制), 将溶瘤病毒治疗与基因治疗的优势相结合。其疗效好, 是

今后基因治疗与病毒治疗的新趋势。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid)通过抑制 HDAC 的活性, 诱导靶细胞中组蛋白高度乙酰化, 由于乙酰化修饰可以改变组蛋白与 DNA 链间的结合状态, 使染色质结构变得疏松, 有利于转录因子与 DNA 链间的结合, 启动某些特异性基因的表达, 从而达到阻断肿瘤细胞的生长。TRAIL 能通过线粒体途径和细胞表面受体途径触发多种诱导凋亡肿瘤细胞发生凋亡反应, 而对正常细胞无明显毒性。TRAIL 和 SAHA 虽诱导不同的凋亡信号通路, 但两条通路之间却存在很大部分的交叉, 所以说二者是相辅相成, 发挥更强的凋亡效果。

SAHA 的长期使用易产生耐药性, 且浓度过高时具有较大的毒副作用; 并不是所有的肿瘤细胞都

对 TRAIL 敏感,研究证实由于肝癌中含有较高抑制凋亡的蛋白,故 TRAIL 较难启动肝癌细胞的凋亡。ZD55 系统能够满足肿瘤基因病毒治疗的两个要求:具有靶向性和可插入外源基因的特点,并且携带外源基因的增殖性溶瘤腺病毒理论上具有很高的抗肿瘤效应和比较低的毒副作用。本实验利用化学药物—基因—病毒策略,首次将 ZD55-TRAIL 与组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 联合治疗肿瘤。实验中利用药物剂量的减少和两者的协同作用,降低其副作用和增强其抗肿瘤效果,并为今后肝癌的治疗提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

组蛋白去乙酰化抑制剂 SAHA 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司,二甲基亚砜(DMSO)购自无锡展望化工试剂有限公司,胎牛血清、DMEM 购自 GIBCO 公司,Hoechst33342 凋亡试剂购自 Sigma 公司,结晶紫购自美国 Ameresco 公司,ZD55-TRAIL 病毒为本实验室所有,人肝癌细胞株 Hep3B、Bel-7404、Huh-7 和人正常肝细胞 QSG-7701 均购自中国科学院上海细胞库。细胞裂解液购自碧云天公司,蛋白酶抑制剂 protein cocktail 购自 Sigma 公司。Bcl-2、Bcl-xL、Caspase-8、Caspase-9 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司, β -actin 购自碧云天公司。

以 DMSO 在无菌条件下溶解组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA,配制成用 10 mmol/L 母液,分装, -80℃ 保存。

1.2 MTT 法检测细胞存活率

将处于对数生长期的 QSG-7701、Bel-7404、Hep3B、Huh-7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 按 10^4 /孔接种到 96 孔板中,设 SAHA 组、ZD55-TRAIL 组和 SAHA 联合 ZD55-TRAIL 组。其中 SAHA 的终浓度为 0.5 μ mol/L,ZD55-TRAIL 为 10 MOI,每个组设六个复孔,另设细胞对照、空白对照。培养 24 h 后,用 5% FBS 的 DMEM 将 SAHA 和 ZD55-TRAIL 稀释到工作浓度后加入到 96 孔板中,细胞对照孔和空白孔每孔加入等量的 5% FBS 的 DMEM。培养 3 d 后每孔加入 20 μ L 的 MTT (5 mg/mL),37℃ 孵育 4 h,吸去上清,每孔加入 150 μ L DMSO,在摇床上振荡 20 min 后用酶标仪检测 A_{570} 值。实验重复 3 次。按下式计算细胞的存活率:

细胞存活率=

$$\frac{\text{处理组吸光值}-\text{空白对照组吸光值}}{\text{对照组吸光值}-\text{空白对照组吸光值}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3 结晶紫分析细胞毒性

在 24 孔板中分别接种 QSG-7701、Bel-7404、Hep3B、Huh-7 这 4 种细胞,接种量为每孔 1×10^5 ,每孔加入 0.5 mL 的培养基。24 h 后对细胞进行以下处理,SAHA 组加入 0.5 μ mol/L SAHA,ZD55-TRAIL 组加入 10 MOI ZD55-TRAIL 病毒,SAHA 联合 ZD55-TRAIL 组中加入 10 MOI ZD55-TRAIL 和 0.5 μ mol/L SAHA,于 37℃,5% CO_2 培养箱中继续培养 3 d 后吸掉细胞培养液,每孔加入 250 μ L 结晶紫染色液(2% 结晶紫溶于 20% 甲醇),室温染色 15 min,在纯水中充分洗涤掉多余染液后拍照记录。

1.4 Hoechst33342 染色实验

在 96 孔板中分别接种 QSG-7701、Bel-7404、Hep3B、Huh-7 这 4 种细胞,接种量为每孔 1×10^4 ,每孔培养基体积 100 μ L,37℃,5% CO_2 温箱中培养 24 h 后,分别在 SAHA 组中加入 0.5 μ mol/L SAHA,ZD55-TRAIL 组加入 10 MOI ZD55-TRAIL 病毒,SAHA 联合 ZD55-TRAIL 组中加入 10 MOI ZD55-TRAIL 和 0.5 μ mol/L SAHA,给药 2 d 后,将 Hoechst33342 加入培养基中(终浓度 1 μ g/mL),放在 37℃,5% CO_2 温箱中孵育 20 min,然后立刻置荧光显微镜下观察并拍照。

1.5 Western blot 实验

在六孔板中分别接种 Bel-7404、Hep3B、Huh7 这 3 种细胞,接种量为每孔 3×10^5 ,每孔培养基体积为 2 mL,培养 24 h 后,其中一孔加入 10 MOI 的 ZD55-TRAIL,一孔加入 0.5 μ mol/L SAHA,还有一孔加入 10 MOI 的 ZD55-TRAIL 和 0.5 μ mol/L SAHA,37℃,5% CO_2 温箱中培养 48 h 后,吸去细胞培养液,加入细胞裂解液(碧云天公司)和蛋白酶抑制剂 protein cocktail(Sigma 公司),冰浴 15 min 后,刮下细胞,连同细胞裂解液移至 EP 管中。12 000 r/min 离心 5 min,取上清定量后加入 loading buffer 于 100℃ 水浴煮沸 5 min,然后每孔上样 40 μ g 蛋白到 15% 的 SDS-PAGE,胶跑完后转膜。膜用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,加入 1:1 000 稀释 Bcl-2、Bcl-xL、Caspase-8、Caspase-9 抗体及 β -actin 抗体,4℃ 摇床孵育过夜。TBST 洗 3 遍,每次 15 min,然后加入荧光二抗,37℃ 摇床孵育 1 h。TBST 洗 3 次,每次 15 min 后在红外激光成像系统

进行蛋白分析。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡实验

在六孔板中分别接种 Bel-7404, Hep3B 这 2 种细胞, 接种量为每孔 3×10^5 , 每孔培养基体积为 2 mL, 培养 24 h 后, 其中一孔加入 10MOI 的 ZD55-TRAIL, 一孔加入 $0.5 \mu\text{mol/L}$ SAHA, 还有一孔加入 10MOI 的 ZD55-TRAIL 和 $0.5 \mu\text{mol/L}$ SAHA, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 温箱中培养培养 48 h 后, 吸去细胞培养液, 加入 0.5 mL 胰蛋白酶消化液消化 5 min, 接着用 2 mL $10\%\text{DMEM}$ 培养基中和胰酶, 并将细胞吹起, $1\,000 \text{ r/min}$ 离心 3 min, 上清弃掉后用 PBS 重悬细胞两次, 最后用 BD 公司的试剂盒对细胞进行 Annexin V 和 PI 染色, 上流式细胞仪检测其凋亡。

1.7 统计学处理

统计学软件采用 Excel 2007 和 Sigmaplot, 所有定量实验均重复 3 次, 各组数据以“均值±标准差”表示。

2 结果

2.1 MTT 法检测 SAHA 联合 ZD55-TRAIL 处理后肿瘤细胞的存活率

如图 1 所示, 处理 3 d 后, 联合用药组对肿瘤细胞 Bel-7404 的杀伤效果达到 58%, 对 Huh-7 达到 55%, 对 Hep3B 达到 52%, 而 SAHA 或 ZD55-TRAIL 单独处理时对 3 株肝肿瘤细胞的杀伤效果只有 20% 左右。综上所述, ZD55-TRAIL 联合组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 后其对肿瘤细胞的杀伤明显增强, 增加了约 30%。同时, 实验没有发现联合用药增加对正常肝细胞 QSG-7701 的毒副作用, 可见联合作用实现了安全性与有效性很好的统一。

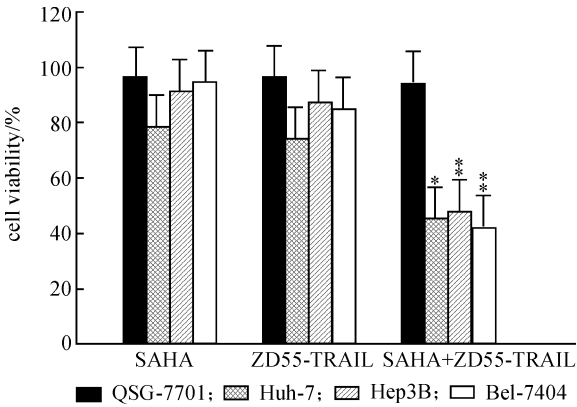


图1 MTT 分析细胞存活率

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.2 结晶紫实验评价联合用药对肿瘤细胞和正常细胞的毒性

为了观察比较 ZD55-TRAIL 单独使用和联合 SAHA 时对细胞的杀伤效果, 用不同的 MOI 处理 3 种肿瘤细胞, 药物与病毒单独或联合处理细胞 3 d 后, 结晶紫染色后进行分析。实验结果发现, 用 10MOI 病毒联合药物后对肿瘤细胞 Huh-7、Bel-7404、Hep3B 的杀伤效果相当于单用 ZD55-TRAIL 50MOI 的杀伤效果, 证明联合处理对肿瘤细胞的杀伤效果明显强于单独处理。同时, 实验结果也显示联合处理并没有增加对正常细胞 QSG-7701 的毒性。

2.3 Hoechst33342 染色检测各处理组的细胞凋亡现象

Hoechst33342 染色后, 荧光显微镜下观察各种处理组细胞形态学变化和凋亡情况。结果发现, 用 PBS 处理的对照组细胞基本上没有细胞凋亡; 单独用 SAHA 的处理组由于药物浓度较低, 虽然可以发现细胞因分裂受阻而体积变大, 但只偶有细胞凋亡; 单独用 ZD55-TRAIL 处理组中凋亡细胞也较少; 而 ZD55-TRAIL 联合 SAHA 处理组中细胞凋亡最明显, 包括染色体固缩, 片段化, 出现大量凋亡小体。正常肝细胞 QSG-7701 却没有凋亡情况出现(图 2, 放大倍数 $\times 100$)。

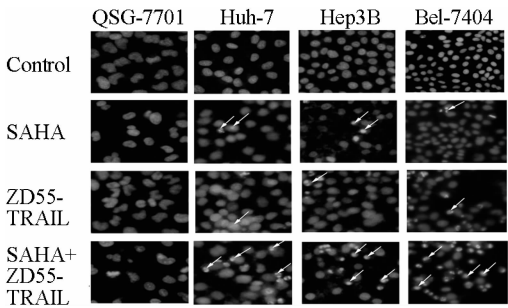


图2 Hoechst33342 检测 SAHA 联合 ZD55-TRAIL 处理四种细胞后形态学变化

2.4 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达

有文献报道, 线粒体依赖的(Ⅱ型)信号途径在 TRAIL 以及它联合药物作用诱导肿瘤细胞的凋亡中起重要的作用^[3-5]; 本实验选择Ⅱ型细胞凋亡信号通路中四种具有代表性的分子: 抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL, 发生在凋亡过程中的 Caspase-8 和 Caspase-9。收集 3 个处理组和 1 个对照组的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 如图 3(a), 抗凋亡蛋白 Bcl-2, Bcl-xL 在联合处理组出现明显减少; 图 3(b) Caspase-8, Caspase-9 在联合处理组发生明显剪切,

两图都说明联合处理组凋亡现象很明显。

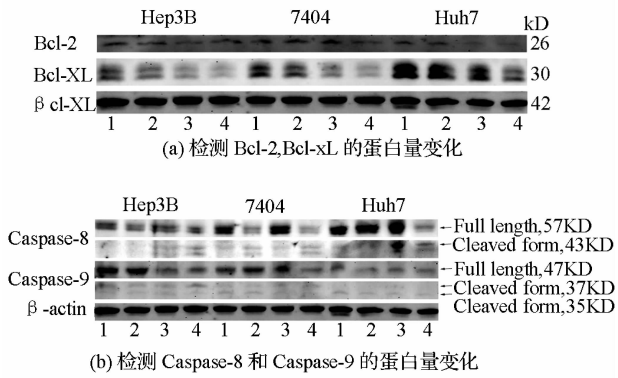


图 3 Western blot 分析细胞凋亡相关蛋白

注:泳道 1:对照组;泳道 2:0.5 μmol/L SAHA 处理组;泳道 3:10MOI ZD55-TRAIL 处理组;泳道 4:0.5 μmol/L SAHA、10 MOI ZD55-TRAIL 联合处理组

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

用 SAHA,ZD55-TRAIL 单独处理和二者联合处理细胞 Bel-7404 与 Hep3B,观察不用方式处理 48 h 后, Bel-7404 和 Hep3B 的凋亡情况分别如图 4。图 4(a)显示,SAHA 处理组 Bel-7404 凋亡早期的细胞比率为 2.59%,凋亡中晚期比率为 1.94%,ZD55-TRAIL 处理组 Bel-7404 凋亡早期的细胞比率为 3.75%,凋亡中晚期比率为 7.21%,二者联合处理组 Bel-7404 凋亡早期的细胞比率为 13.5%,凋亡中晚期比率为 21.8%。图 4(b)显示,SAHA 处理组 Hep3B 凋亡早期细胞比率为 1.59%,凋亡中晚期比率为 2.44%,ZD55-TRAIL 处理组 Hep3B 凋亡早期的细胞比率为 6.27%,凋亡中晚期比率为 5.91%,二者联合处理组 Hep3B 凋亡早期的细胞比率为 14.8%,凋亡中晚期比率为 9.24%。

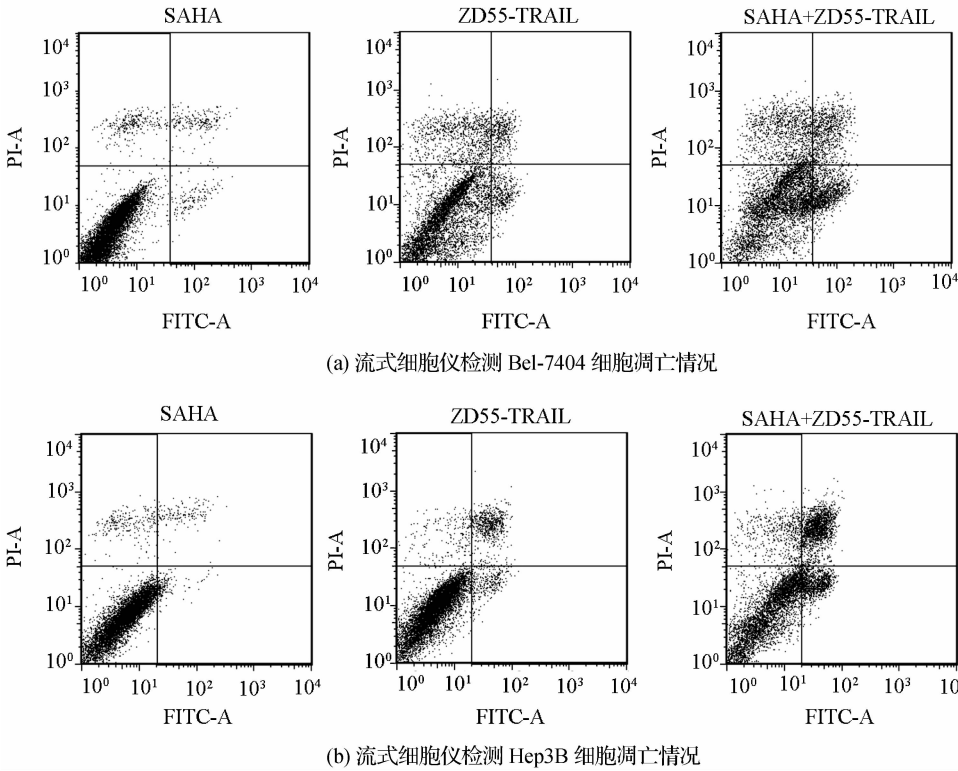


图 4 流式细胞仪检测细胞凋亡

3 讨论

肿瘤是多种基因突变累积所致,因此单基因治疗效果较差。ZD55 系统能够满足肿瘤基因病毒治疗的两个要求:具有靶向性和可插入外源基因的位点,为进一步开展肿瘤的基因病毒治疗提供了又一个理想的平台。由于单独应用 TRAIL 作用有限,研究发现,化疗药物与 TRAIL 联合应用可提高肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性,是一种有极大发展前

景的抗肿瘤候选方案。将组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 与 TRAIL 联合作用于人肝癌细胞株,研究其协同作用具有积极意义。

目前,HDACi(组蛋白去乙酰化抑制剂)化合物库中的化合物已经达到 800 多种,新的 HDACi 也在不断合成,与早期开发的 HDACi 相比,这些新的化合物毒副作用更低^[6]。作为一类新的化疗药物,HDACi 抑制多种肿瘤细胞的增殖,促进细胞分化并诱导细胞凋亡^[7]。在动物实验中 HDACi 也表现出

明显的抗肿瘤活性,显著抑制动物体内肿瘤的生长^[8]。HDACi 通过下调血管生成相关基因的表达也能抑制内皮细胞再生和血管生成^[9-10]。SAHA 的 I 期和 II 期临床实验已经提供了可靠的结果^[11-12]。SAHA 是继 HMBA 之后的第二代氧肟酸类组蛋白去乙酰化酶抑制药。它与 HMBA 相比活性更高,微摩尔($\mu\text{mol/L}$)浓度即对肿瘤细胞有很强的杀伤效果^[13]。

本实验发现联合 SAHA 后 ZD55-TRAIL 对肝癌细胞株 Huh-7、Bel-7404、Hep3B 的杀伤作用明显增强,MTT 的结果表明联合用药后 3 种肝癌细胞的存活率都大大降低,其中 Hep3B、Bel-7404 用药处理 3d 后细胞的存活率都只有 40%,并且联合用药后对正常肝细胞 QSG-7701 未见叠加的毒副作用。结晶紫毒性分析实验也显示 SAHA 和 ZD55-TRAIL 联合处理的癌细胞其凋亡程度要比 SAHA 或 ZD55-TRAIL 单独处理时严重。凋亡细胞染色实验进一步证明联合用药对肝癌细胞株的杀伤力要强于 SAHA 或 ZD55-TRAIL 单独处理,可见到明显的染色体固缩和细胞核凝集,而且对正常细胞没有发现毒副作用,显示了联合用药的安全性。Western blot 实验证明了药物和病毒的联合作用使促凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 的表达量明显减少,Caspase-8 和 Caspase-9 蛋白也有相应剪切现象的发生。

综上所述,SAHA 联合 ZD55-TRAIL 的使用改变了 ZD55-TRAIL 单独使用时效果不佳的缺点,同时又避免了使用常规化疗药物给癌症患者带来的痛苦与折磨,并且二者联合存在明显的协同作用,但是二者联合作用的具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴孟超. 原发性肝癌的诊断和治疗进展[J]. 中华外科杂志, 1998, 36(9): 515-518.
- [2] 刘新垣. 一种抗癌新策略: 肿瘤的基因病毒治疗[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2001, 8(1): 1.
- [3] Gall J G, Crystal R G, Falck-Pedersen E. Construction and characterization of hexon-chimeric adenoviruses; specification of adenovirus serotype[J]. J Virol, 1998, 72(12): 10260-10264.
- [4] O'Riordan C R, Lachapelle A, Delgado C, et al. PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo [J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(8): 1349-1358.
- [5] Escarpe P, Zayek N, Chin P, et al. Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations[J]. Mol Ther, 2003, 8(2): 332-341.
- [6] Acharya M R, Sparreboom A, Venitz J, et al. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review[J]. Mol Pharmacol, 2005, 68(4): 917-932.
- [7] Glaser K B. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 74(5): 659-671.
- [8] Lindemann R K, Newboid A, Whitecross K F, et al. Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(19): 8071-8076.
- [9] Kim S H, Ahn S, Han J W, et al. Apicidin is a histone deacetylase inhibitor with anti-invasive and anti-angiogenic potentials[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(4): 964-970.
- [10] Qian D Z, Kato Y, Shabbeer S, et al. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(2): 634-642.
- [11] Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, et al. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes[J]. Blood, 2008, 111(3): 1060-1066.
- [12] Blumenschein G R Jr, Kies M S, Papadimitrakopoulou V A, et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer[J]. Invest New Drugs, 2008, 26: 81-87.
- [13] Richon V M, Webb Y, Merger R, et al. Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1996, 93(12): 5705-5708.

Academic Ecological Study of Artistic Teaching in Sci-Tech University

LOU Li-juan

(School of Fashion, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: This paper is based on artistic teaching practice in Zhejiang Sci-Tech University. It demonstrates the inevitability and necessity of carrying out artistic education in sci-tech colleges and universities through discussing the academic ecological optimization and innovative quality cultivation in these institutions; the paper also theoretically analyzes the ecological value of college students’ orderly participation in a variety of contests and ecological development of faculty.

Key words: integration education of liberal arts and science; art education; educational ecology; cer-afivity personnel; campus culture

(责任编辑: 马春晓)

(上接第 422 页)

Study on Targeting Oncolytic Adenovirus that ZD55-TRAIL
Linked Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA)
for Liver Tumor Cells Therapy

QIU Qing, XIE Guo-liang, CHEN-HE Kuan-zi, LI Min, ZHOU Xiu-mei*

(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, Zhejiang Sci-Tech University,
Hangzhou 310018, China)

Abstract: The experiment is aimed at studying the anti-tumor effect in liver tumor cells by combining ZD55-TRAIL with a small molecule Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) . First, MTT assay is used to test the growth inhibition effects of single or combination therapy on tumor cell lines Huh7, Bel-7404, Hep3B and human normal cell line QSG-7701. Second, Hoechst33342 is added after administration in tumor cells Huh7, Bel-7404, Hep3B, and 48 hours later cells were observed under fluorescent microscope. Cytopathic effect assay then is conducted to further demonstrate the efficacy of the combination therapy. Results show that the anti-tumor efficacy of ZD55-TRAIL is significantly enhanced in combination with Suberoylanilide hydroxamic acid, while shows no overlapping toxicity against normal cell line QSG-7701. Crystal violet staining also demonstrates that the combination therapy shows better efficacy than single therapy with SAHA or ZD55-TRAIL, respectively. Western blot experiment showed that the protein of pro-apoptosis and the cleavage of both Caspase-8 and Caspase-9 increases by combination therapy on tumor cell lines. Flow cytometry also demonstrates that combination therapy shows better effect.

Key words: tumor/gene treatment; ZD55-TRAIL; Suberoylanilide hydroxamic acid; liver tumor cells; apoptosis

(责任编辑: 许惠儿)