

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000135

雌激素促乳腺癌细胞 MCF-7 增殖中组蛋白乙酰化的作用及其意义

叶霞, 邓华瑜, 张力, 赵敬, 袁磊

(重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室、干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究组蛋白乙酰化水平改变在雌激素促乳腺癌细胞增殖中的作用及其意义。**方法:**以人乳腺癌细胞 MCF-7 为研究对象,应用 CCK-8 法检测 17β -雌二醇 (17β -estradiol, 17β -E₂) 对 MCF-7 细胞增殖影响,根据增殖率确定后续实验处理浓度;应用 CCK-8 法检测 Garcinol 对 17β -E₂ 促 MCF-7 细胞增殖作用的影响,根据抑制率求取其中效抑制浓度;流式细胞术检测细胞周期、细胞凋亡情况;Western blot 检测乙酰化 H3 (acetylated histone 3, ac-H3)、乙酰化 H4 (acetylated histone 4, ac-H4)、细胞周期蛋白 1、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤/白血病-x1 (B cell lymphoma/leukemia-x1, Bcl-x1) 蛋白水平表达;RT-PCR 检测 CyclinD1 mRNA、Bcl-2 mRNA、Bcl-x1 mRNA 水平。**结果:** 17β -E₂ 的促 MCF-7 细胞增殖作用受到乙酰化酶抑制剂 Garcinol 抑制,使细胞周期转化阻滞于 G0/G1 期,细胞凋亡率增加 ($P=0.000$); 17β -E₂ 促进 MCF-7 细胞 ac-H3、ac-H4 的表达 ($P=0.007$ 、 $P=0.013$),促进 CyclinD1、Bcl-2、Bcl-x1 蛋白表达 ($P=0.000$ 、 $P=0.002$ 、 $P=0.000$),Garcinol 能抑制 17β -E₂ 对 ac-H3 的促进表达 ($P=0.006$),对 ac-H4 无显著影响 ($P=0.347$), 17β -E₂ 的促 CyclinD1、Bcl-2、Bcl-x1 表达亦受到 Garcinol 抑制 ($P=0.000$ 、 $P=0.001$ 、 $P=0.001$);相应可见, 17β -E₂ 促进 CyclinD1、Bcl-2、Bcl-x1 mRNA 转录 ($P=0.007$ 、 $P=0.044$ 、 $P=0.007$),该作用受到 Garcinol 抑制 ($P=0.001$ 、 $P=0.017$ 、 $P=0.002$)。**结论:** 17β -E₂ 促 MCF-7 细胞增殖、凋亡抑制作用与组蛋白乙酰化水平增高有关,Garcinol 对雌激素促乳腺癌细胞增殖具有抑制作用。

【关键词】组蛋白;乙酰化;Garcinol;乳腺癌**【中图分类号】**R737.9;R730.231+3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-09-13

Role and significance of histone acetylation in proliferation of breast cancer cell line MCF-7 induced by estrogen

Ye Xia, Deng Huayu, Zhang Li, Zhao Jing, Yuan Lei

(Teaching and Research Section of Pathophysiology, College of Basic Medicine Laboratory for Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role and significance of histone acetylation in proliferation of breast cancer cell line MCF-7 induced by estrogen. **Methods:** Human breast cancer MCF-7 cells were used as the research object. Effect of 17β -estradiol (17β -E₂) on proliferation of MCF-7 cells was investigated with CCK-8 assay and the optimal concentration of 17β -E₂ in the following experiment was determined according to the proliferation rate. Effect of Garcinol on proliferation of MCF-7 cells by 17β -E₂ was investigated with CCK-8 assay and the intermediate concentration of Garcinol in the following experiment was determined according to the inhibition rate. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. Expression of acetylated histone 3 (ac-H3), acetylated histone 4 (ac-H4) protein was determined by Western blot. CyclinD1 mRNA, B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) mRNA, B cell lymphoma/leukemia-x1 (Bcl-x1) mRNA expression in MCF-7 cells was measured by RT-PCR and expression of CyclinD1, Bcl-2, Bcl-x1 protein was determined by Western blot. **Results:** Proliferation of MCF-7 cells treated with 17β -E₂ was inhibited by acetyltransferase inhibitor Garcinol and transformation of MCF-7 cell cycle was arrested at G0/G1 phase and rate of apoptosis was increased ($P=0.000$). Expression level of ac-H3, ac-H4 protein in MCF-7 cells treated with 17β -E₂ was increased ($P=0.007$, $P=0.013$), in which ac-H3 was inhibited by Garcinol ($P=0.006$) but no ac-H4 ($P=0.347$). Correspondingly, 17β -E₂ promoted the mRNA transcription ($P=0.007$, $P=0.044$, $P=0.007$) and protein expression ($P=0.000$, $P=0.002$, $P=0.000$) levels of CyclinD1, Bcl-2, Bcl-x1 in MCF-7 cells, which were also inhibited by Garcinol ($P=0.001$, $P=0.017$, $P=0.002$, $P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.001$). **Conclusions:** 17β -E₂ promoting proliferation and inhibiting apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells is related with elevated acetylation level of histone. Garcinol plays an inhibitive role in 17β -E₂ promoting proliferation of MCF-7 cells.

作者介绍: 叶霞, Email: yexiaoyu666@126.com,

研究方向: 乳腺癌发生发展分子机制。

通信作者: 邓华瑜, Email: cqdenghy@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30900651)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000135.html>**【Key words】**histone; acetylation; Garcinol; breast cancer

组蛋白的乙酰化和去乙酰化修饰是一个与基因活化和抑制密切相关的动态过程,在调节真核生物基因转录过程中起重要作用。组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase,HAT)和组蛋白去乙酰基转移酶(histone deacetylase,HDAC)共同调节组蛋白乙酰化水平的动态平衡。包括乳腺癌在内的许多恶性肿瘤的发生发展中,其癌基因与抑癌基因的表达失调与组蛋白乙酰化修饰失衡密切相关,其中 HAT 导致的组蛋白高乙酰化可能是激活癌基因的重要方式。雌激素是促进雌激素受体(estrogen receptor,ER)阳性乳腺癌细胞增殖的重要因素,目前研究提示其促癌效应与组蛋白乙酰化异常改变有关^[1-2]。雌激素可能影响癌基因组蛋白乙酰化水平,由此促进癌基因表达、促进肿瘤细胞转化、增殖增强和凋亡抑制。细胞周期蛋白 1(CyclinD1)可能是重要靶基因蛋白之一,其表达是促进肿瘤细胞增殖的重要基础。雌激素亦能激活抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2,Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤/白血病-xl(B cell lymphoma/leukemia-xl,Bcl-xl),下调促凋亡蛋白[(Bcl-2 associated X protein,Bax)、(Bcl-2/Bcl-xl-associated death promoter,Bad)、(B-cell lymphoma/leukemia-x short,Bcl-xs)]的表达,从而抑制细胞凋亡。

Garcinol($C_{38}H_{50}O_6$;分子量 602)是从生长在印度热带地区藤黄属果皮中提取出来的一种苯甲酮,Garcinol 通过其结构中邻苯二酚上 C_{13} 、 C_{14} 位的-OH 基团能与组蛋白竞争性结合 HAT 上的(乙酰-辅酶 A)结合位点,产生乙酰化抑制作用^[3]。经鉴定 Garcinol 具有较好的细胞渗透性,能有效抑制组蛋白乙酰化酶 p300/CBP[(cAMP-responsive element binding protein)-binding protein]和(p300/CBP 相关因子)PCAF 的活性和功能^[4],实验研究中作为乙酰化酶抑制剂应用。

本研究以 ER(+)人乳腺癌细胞 MCF-7 为实验对象,应用乙酰化酶抑制剂 Garcinol,观察其对雌激素促乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、抑制凋亡的效应影响,探讨组蛋白 3(histone 3,H3)、组蛋白 4(histone 4,H4)乙酰化水平改变,以及 CyclinD1、Bcl-2、Bcl-xl 变化,分析其间关系,认识组蛋白乙酰化水平改变在雌激素促乳腺癌细胞增殖中的作用及其意义。

1 材料和方法

1.1 材料

乳腺癌细胞 MCF-7 由重庆医科大学病理生理学教研室提供。无酚红 DMEM 干粉培养基(美国 SAFC Bioscience 公

司)。新生牛血清(美国 Gibco 公司)。17- β 雌二醇(17 β -estradiol,17 β -E₂)(Cayman 公司)。Garcinol(Enzo Life Science 公司)。CCK-8 试剂盒(碧云天生物技术研究)。ac-H3K9、ac-H4K5 兔抗人单克隆抗体(Abcam 公司)。H3 兔抗人单克隆抗体(Biolegend 公司)。CyclinD1 兔抗人单克隆抗体(Epito-mics 公司)。Bcl-xl 兔抗人多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。Bcl-2 兔抗人多克隆抗体、 β -actin 鼠抗人单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥)。RT-PCR 试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 去雌激素新生牛血清的制备^[5] 分别称取 5 g 活性炭和 500 mg 葡聚糖 T40,用去离子水定容至 100 ml,充分搅拌 1 h 后,3 000 r/min 离心 10 min,弃上清,往沉淀物中加入 100 ml 新生牛血清,在 56 ℃水浴中搅拌混匀 30 min,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,连续处理 2 次以除去血清中雌激素。处理后的血清用金属滤器(0.22 μ m)过滤除菌后,于-20 ℃保存备用。

1.2.2 细胞培养 乳腺癌细胞 MCF-7 常规复苏,培养于含 10%去雌激素新生牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的无酚红高糖 DMEM 培养液中。置于 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度的孵箱中培养。

1.2.3 CCK-8 法检测 17 β -E₂ 对 MCF-7 增殖影响 取对数生长期的 MCF-7 细胞,调整细胞密度为 2×10^3 个/ml,分别接种于 3 块 96 孔板中,每组设 5 个复孔,每孔接种细胞悬液 200 μ l,细胞接种 24 h 后给予不同浓度的雌激素(0.01、0.1、1、10、500、1 000 nmol/L)。置培养箱中继续孵育 24、48、72 h,每孔加入 20 μ l CCK-8 试剂,在培养箱中孵育 3 h 后用酶标仪在 450 nm 波长测吸光度(absorbance,A)值,计算增殖率。增殖率=(17 β -E₂ 组平均 $A_{450\text{nm}}$ -未处理组平均 $A_{450\text{nm}}$)/未处理组平均 $A_{450\text{nm}} \times 100\%$ 。根据增殖率选择后续实验处理细胞的时间和浓度。实验重复 3 次。

1.2.4 CCK-8 法检测 Garcinol 对 17 β -E₂ 促 MCF-7 增殖的影响 取对数生长期的 MCF-7 细胞,调整细胞密度为 2×10^4 个/ml,接种于 3 块 96 孔培养板中,每孔接种细胞悬液 200 μ l。设置试剂对照组、未处理细胞组、雌激素处理组(100 nmol/L)、100 nmol/L 雌激素联合 Garcinol(10、20、30、40、50 μ mol/L 5 个浓度)处理组,每组设 5 个平行孔。细胞接种 24 h 后加药,置于 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度的孵箱内培养。药物分别作用 24、48、72 h 后,按照 CCK-8 试剂盒说明书每孔加入 20 μ l CCK-8 试剂,继续在培养箱中培养 2 h 后用酶标仪在 450 nm 波长测 A 值($A_{450\text{nm}}$)。计算不同浓度、不同时间 Garcinol 对 MCF-7 细胞的抑制率,抑制率=[1-(17 β -E₂ 联合 Garcinol 组平均 $A_{450\text{nm}}$ -未处理组平均 $A_{450\text{nm}}$)/(17 β -E₂ 组平均 $A_{450\text{nm}}$ -未处理组平均 $A_{450\text{nm}})] \times 100\%$,并计算 Garcinol 对 17 β -E₂ 促 MCF-7 细胞增殖的半效抑制浓度(IC₅₀),确定后续实验处理细胞的时间和浓度。实验重复 3 次。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 实验分组:未处理组、雌激素处理组(100 nmol/L)、雌激素联合 Garcinol 处理组(雌激素浓度 100 nmol/L、Garcinol 浓度 35 μ mol/L)。细胞接种 24 h 后加药,培养 48 h,收集各组细胞,经预冷的 PBS 离心洗涤 2 次,以-20 ℃预冷的 70%乙醇固定,4 ℃冰箱放置 24 h,PBS

洗涤 1 次,然后加 20 mg/L 核糖核酸酶 A(RNase A),37 ℃ 水浴 1 h,再加 100 mg/L 碘化丙啶(propidium iodide,PI),4 ℃ 避光染色 30 min,流式细胞仪测定荧光强度(激发光波长为 488 nm)。采用 MODFIT2.0 分析软件进行细胞周期 DNA 含量分析。实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 实验分组及细胞处理同 1.2.5,用不含乙二胺四乙酸(elthylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的胰酶消化收集各组细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,取 1 ml 细胞悬液用预冷 PBS 离心洗涤 2 次(2 000 r/min 4 ℃ 离心 5 min)。加入 500 μ l 的结合缓冲液悬浮细胞,加入 5 μ l(膜联蛋白-异硫氰酸、荧光素)混匀后,加入 5 μ l PI,混匀,室温、避光反应 5~15 min。立即上流式细胞仪检测。光源为 488 nm 氩离子激光器,FITC 受激发后呈绿色荧光,PI 呈红色荧光。实验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 检测 ac-H3、ac-H4、CyclinD1、Bcl-2、Bcl-xl 表达 实验分组、细胞处理同 1.2.5。常规培养细胞,细胞接种 24 h 后加药,培养 48 h,收集各组细胞到 1.5 ml EP 管中,按 1×10^6 个细胞加 1 ml 裂解液和 10 μ l 蛋白酶抑制剂。置于冰上裂解 30 min,每间隔 10 min 在旋转振荡器上充分震荡裂解。12 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min,取上清于 -80 ℃ 保存。BCA 法测定蛋白浓度。ac-H3、ac-H4 行 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,CyclinD1、Bcl-2、Bcl-xl 行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后与 1:1 000 兔抗人单克隆 ac-H3、ac-H4 抗体,1:1 000 兔抗人单克隆 CyclinD1 抗体,1:500 兔抗人多克隆 Bcl-2 抗体,1:200 兔抗人多克隆 Bcl-xl 抗体 4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗膜后加入 1:3 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 37 ℃ 孵育 1 h,增强化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL)显色,用 Bio-Rad 图像分析系统拍照,Quantity One 软件分析蛋白相对含量。实验重复 3 次。

1.2.8 RT-PCR 检测 CyclinD1 mRNA、Bcl-2 mRNA、Bcl-xl mRNA 表达 细胞分组和处理同 1.2.5,按照高纯总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)说明书操作步骤提取各组 MCF-7 细胞总 RNA,测定 RNA 纯度和浓度,按反转录试剂盒说明书先反转录合成第 1 条 cDNA,再以等量的 cDNA 为模板进行 PCR 反应。CyclinD1 引物:上游 5'-GCGAGGAACAGAACT-GCG-3',下游 5'-TGG AGTTGTGCGTGTAGATGC-3'。Bcl-2 引物:上游 5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAAC-3',下游 5'-AGACAGCCAGGAGAAATCAAAC-3'。Bcl-xl 引物:上游 5'-CCACTTACCTGAATGACCACCTA-3',下游 5'-TGTTCCCATAGAGTTCACAAA-3'。β-actin 引物:上游 5'-CTG GGACGA-CATGGAGAAAA-3',下游 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3',扩增产物长度为 564 bp。反应条件:94 ℃ 预变性 3 min 后,95 ℃ 50 s,59.5 ℃ 40 s,72 ℃ 50 s,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μ l PCR 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,Good View 显色,Quantity One 软件分析各扩增条带产物的含量,以目的条带的灰度值/β-actin 条带的灰度值表示。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

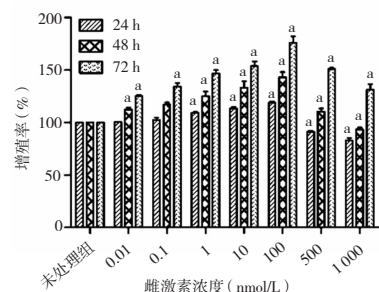
采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-t 方法。雌激素对 MCF-7 细胞增殖的影响及 Garcinol

对雌激素促 MCF-7 细胞增殖的影响,数据用重复测量的方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 雌激素对 MCF-7 细胞增殖的影响

与未处理组比较,雌激素对 MCF-7 细胞增殖有促进作用。图 1 显示,随雌激素浓度增加,作用时间延长,雌激素促 MCF-7 增殖作用增强($F_{\text{处理}}=140.253, P=0.000; F_{\text{时间}}=1\ 364.544, P=0.000; F_{\text{处理与时间交互}}=48.858, P=0.000$)。不同浓度雌激素作用 MCF-7 细胞 24、48、72 h,增殖率分别为(100.40 ± 0.10)%、(102.30 ± 2.34)%、(109.00 ± 1.00)%、(113.33 ± 1.53)%、(119.00 ± 1.00)%、(91.03 ± 0.95)%、(82.83 ± 2.25)% (24 h), (112.33 ± 2.08)%、(117.00 ± 2.00)%、(125.00 ± 4.58)%、(133.00 ± 6.25)%、(143.33 ± 4.73)%、(110.67 ± 2.52)%、(93.67 ± 1.53)% (48 h), (125.00 ± 1.00)%、(134.00 ± 1.53)%、(146.67 ± 3.21)%、(153.67 ± 4.51)%、(176.00 ± 6.00)%、(151.00 ± 1.00)%、(131.33 ± 5.13)% (72 h)。根据增殖率选择 100 nmol/L 的雌激素作用 48 h 用于后续实验。



a. 与未处理组比较, $P < 0.05$ ($n = 24, \bar{x} \pm s$)

图 1 17β-E₂ 对 MCF-7 细胞的增殖作用

Fig.1 Effect of 17β-E₂ on proliferation of MCF-7 cells

2.2 Garcinol 对雌激素促 MCF-7 细胞增殖的影响

与未处理组比较,Garcinol 对雌激素促 MCF-7 细胞增殖有抑制作用。图 2 显示 100 nmol/L 的雌激素+不同浓度 Garcinol(10、20、30、40、50 μ mol/L)分别作用 24、48、72 h。随剂量增加,时间延长,抑制作用增强($F_{\text{处理}}=3\ 049.534, P=0.000; F_{\text{时间}}=1\ 584.713, P=0.000; F_{\text{处理与时间交互}}=56.344, P=0.000$)。抑制率分别为(8.30 ± 0.00)%、(22.40 ± 0.02)%、(30.83 ± 0.01)%、(45.40 ± 0.01)%、(67.30 ± 0.01)% (24 h), (13.00 ± 0.02)%、(30.60 ± 0.01)%、(36.30 ± 0.00)%、(58.60 ± 0.00)%、(85.00 ± 0.02)% (48 h), (31.91 ± 0.01)%、(42.43 ± 0.01)%、(63.30 ± 0.02)%、(82.40 ± 0.01)%、(87.90 ± 0.01)% (72 h)。根据抑制率得出中效抑制浓度,以 35 μ mol/L Garcinol 作用 48 h 用于后续实验。

2.3 流式细胞术检测雌激素和 Garcinol 对 MCF-7 细胞周期及凋亡的影响

表 1 和图 3 显示,与未处理组比较,100 nmol/L 17β-E₂ 作用 48 h,G0/G1 期细胞比例降低,S 期和 G2/M 期比例增加($P=0.000$),凋亡率降低($P=0.000$),联合 Garcinol 处理后,与 17β-E₂ 处理组比较,G0/G1 期细胞比例增加,S 期和 G2/M 期

比例降低($P=0.000$),凋亡率增高($P=0.000$)。差异均具有统计学意义。

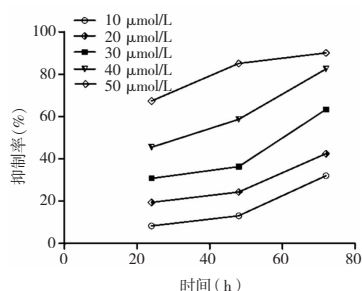
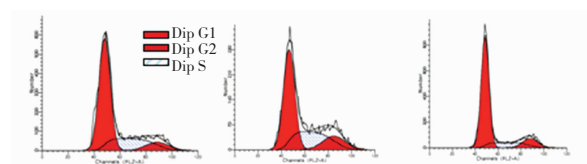
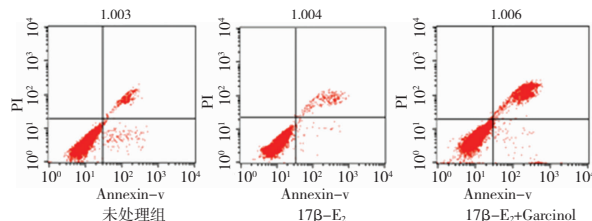


图2 Garcinol对17β-E₂处理的MCF-7细胞的抑制作用
($n=15, \bar{x} \pm s$)

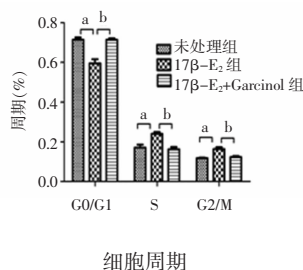
Fig.2 Inhibitory effect of Garcinol on MCF-7 cells treated with 17β-E₂ ($n=15, \bar{x} \pm s$)



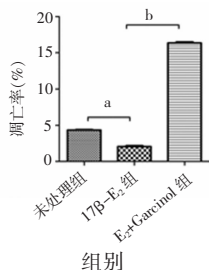
A. 流式分析细胞周期



B. 流式分析细胞凋亡率



C. 细胞周期百分比



D. 细胞凋亡率 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

a. 与未处理比较, $P<0.01$; b. 与17β-E₂组比较, $P<0.01$

图3 17β-E₂和Garcinol对MCF-7细胞周期与凋亡的影响
Fig.3 Effect of 17β-E₂ and Garcinol on MCF-7 cell cycle progression and apoptosis

表1 17β-E₂和Garcinol对MCF-7细胞周期与凋亡的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

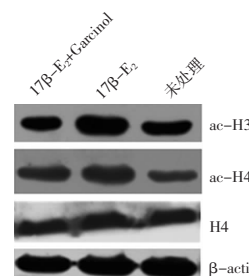
Tab.1 Effect of 17β-E₂ and Garcinol on MCF-7 cell cycle progression and apoptosis ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

分组	细胞周期			凋亡率
	G0/G1	S	G2/M	
未处理组	71.50 ± 1.20	17.10 ± 1.50	11.70 ± 0.30	4.30 ± 0.11
17β-E ₂ 处理组	59.60 ± 1.90 ^a	24.00 ± 0.90 ^a	16.30 ± 0.01 ^a	2.10 ± 0.20 ^a
17β-E ₂ +Garcinol处理组	70.60 ± 0.60 ^b	18.20 ± 1.10 ^b	12.30 ± 0.50 ^b	16.35 ± 0.22 ^b
F值	75.625	39.498	40.200	5 150.090
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

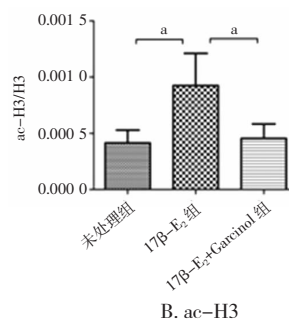
注: a, 与未处理组比较, $P<0.01$; b, 与17β-E₂组比较, $P<0.01$

2.4 Western blot 检测 MCF-7 细胞 ac-H3、ac-H4 蛋白表达水平

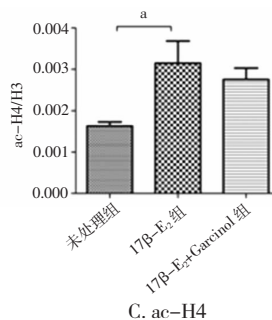
图4显示($F_{ac-H3}=11.503, P_{ac-H3}=0.009; F_{ac-H4}=6.404, P_{ac-H4}=0.032$), 未处理组中 ac-H4 比 ac-H3 基础表达水平偏低; 17β-E₂处理后 ac-H3 表达增高明显($P=0.007$), ac-H4 亦增高($P=0.013$); 联合 Garcinol 处理, ac-H3 表达明显降低($P=0.006$), ac-H4 表达未见明显变化($P=0.347$)。



A. Western blot 分析 ac-H3、ac-H4 的表达



B. ac-H3



C. ac-H4

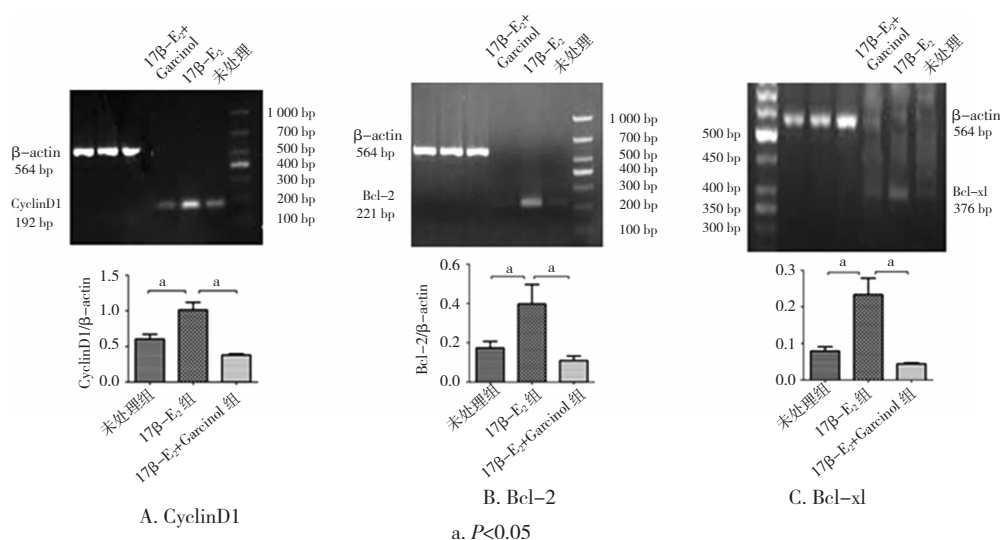
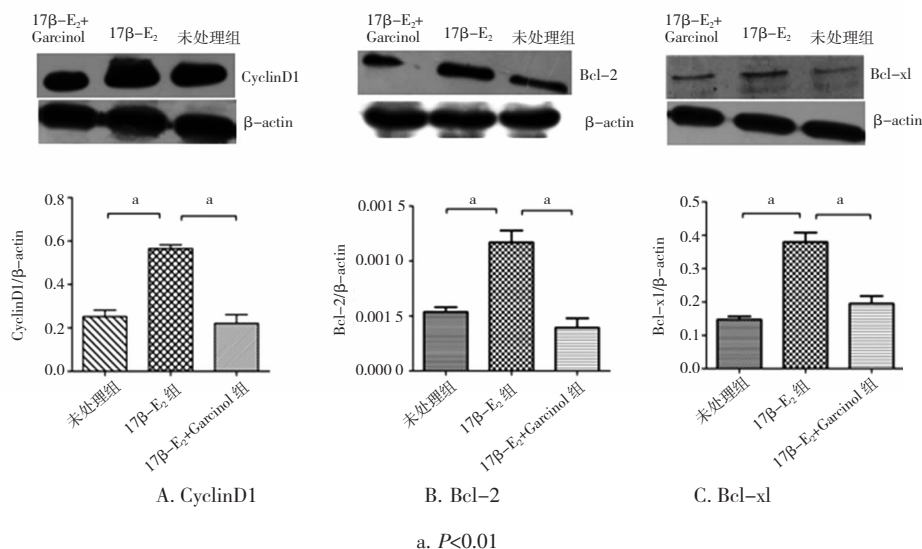
a. $P<0.05$

图4 17β-E₂和Garcinol对MCF-7细胞 ac-H3、ac-H4 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of 17β-E₂ and Garcinol on protein expression of ac-H3 and ac-H4 in MCF-7 cells

2.5 RT-PCR 检测 CyclinD1 mRNA、Bcl-2 mRNA、Bcl-xl mRNA 表达

图5显示($F_{CyclinD1}=19.820, P_{CyclinD1}=0.002; F_{Bcl-2}=5.909, P_{Bcl-2}=0.038; F_{Bcl-xl}=14.164, P_{Bcl-xl}=0.005$), 100 nmol/L 17β-E₂ 处理 MCF-7 细胞 48 h, CyclinD1 mRNA、Bcl-2 mRNA、Bcl-xl mRNA 表达均增加($P=0.007, P=0.044, P=0.007$), 联合 Garcinol 处理, 三者表达均降低($P=0.001, P=0.017, P=0.002$)。

图 5 17β-E₂ 和 Garcinol 对 MCF-7 细胞 CyclinD1 mRNA、Bcl-2 mRNA、Bcl-xl mRNA 表达的影响Fig.5 Effect of 17β-E₂ and Garcinol on expression of CyclinD1 mRNA, Bcl-2 mRNA, Bcl-xl mRNA in MCF-7 cells图 6 17β-E₂ 和 Garcinol 对 MCF-7 细胞 CyclinD1、Bcl-2、Bcl-xl 蛋白表达的影响Fig.6 Effect of 17β-E₂ and Garcinol on protein expression of CyclinD1, Bcl-2, Bcl-xl in MCF-7 cells

2.6 Western blot 检测 MCF-7 细胞 CyclinD1、Bcl-2、Bcl-xl 蛋白表达水平

图 6 显示 ($F_{\text{CyclinD1}}=38.322, P_{\text{CyclinD1}}=0.000; F_{\text{Bcl-2}}=24.332, P_{\text{Bcl-2}}=0.001; F_{\text{Bcl-xl}}=32.403, P_{\text{Bcl-xl}}=0.001$), 与未处理组相比, 100 nmol/L 的 17β-E₂ 作用 48 h, CyclinD1、Bcl-2、Bcl-xl 蛋白表达增多 ($P=0.000, P=0.002, P=0.000$)。100 nmol/L 的 17β-E₂ 联合 35 μmol/L 的 Garcinol 作用 48 h, CyclinD1、Bcl-2、Bcl-xl 蛋白表达减少 ($P=0.000, P=0.001, P=0.001$)。

3 讨论

组蛋白转录后的修饰异常在肿瘤的发生发展中有重要意义。组蛋白乙酰化是其染色质结构最具

特征的表现修饰方式, 赖氨酸残基是乙酰化修饰的主要靶点。一般而言, 组蛋白 H3、H4 乙酰化与基因转录激活调控有关。由 HAT 导致的高乙酰化可以是癌基因激活的重要方式^[6]。4 类主要的 HAT 包括: Gcn5 (general control of amino acid synthesis protein 5)/PCAF、MYST (MOZ, btf2, Sas3, Sas2, Tip60)/Hbo1 (human acetylase binding to ORC1)、p300/CBP 和 Rtt109 (regulator of Ty1 transposition 109), 每一类显示不同的组蛋白底物特异性^[7]。

在雌激素促乳腺癌的发生发展中乙酰化修饰异常可能具有重要作用, 已有的研究报道表明^[8], 核受体辅激活因子通常具有 HAT 活性, 随着细胞信号

通路活化,激素可诱导核 ER、糖皮质激素受体、视黄酸受体、维生素 D 受体靶基因组蛋白乙酰化水平增高、基因转录活化。转录结合因子的基因组分析发现^[9],雌激素调节基因启动子区 Pol II (聚合酶 II)募集与组蛋白乙酰化水平呈显著正相关关系。Kutanzi 等^[10]构建雌激素诱导的 ACI 大鼠乳腺癌模型,鉴定高雌激素水平与乳腺组织的形态学和表观变化的关系,发现其增生过多改变与表观失调相一致,认为雌激素引起的组蛋白残基高乙酰化表观改变在早期乳腺癌进展中有重要意义。有研究发现,组蛋白乙酰基转移酶 p300/CBP 和 PCAF 介导了雌激素诱导的 MCF-7 细胞 H3、H4 高乙酰化及受体靶基因转录激活,PCAF 主要乙酰化 H3^[1,2,8]。本课题组前期研究工作亦已证实 17 β -E₂ 可促进 MCF-7 细胞的 PCAF 基因转录和蛋白水平表达^[11]。本研究结果显示,17 β -E₂ 处理对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖有较强促进作用,细胞周期转化增强,凋亡抑制;同时 Western blot 方法显示细胞 ac-H3 表达水平明显增高,ac-H4 的基础表达较 ac-H3 偏低,17 β -E₂ 处理后亦表现增高。联合使用乙酰化酶抑制剂 Garcinol 处理后,可抑制 17 β -E₂ 的促 MCF-7 细胞增殖作用,使细胞周期转化阻滞于 G0/G1 期,细胞凋亡率增加;相应可见,组蛋白 ac-H3 的表达水平降低。研究表明,通过 Garcinol 抑制组蛋白乙酰化水平对雌激素促乳腺癌细胞增殖产生抑制作用,17 β -E₂ 促 MCF-7 细胞增殖、凋亡抑制效应与组蛋白的乙酰化水平增高有关。体外研究发现,Garcinol 具有与 PCAF 有较高的亲和性特点,主要能更有效地抑制 PCAF 活性^[4]。组蛋白 H4 的乙酰化主要通过 HAT(MYST/Hbo1)完成^[12]。本研究所见 Garcinol 对雌激素促 ac-H4 表达无明显抑制作用可能与此有关。

CyclinD1 是驱动细胞周期转化进行的重要周期素蛋白、促进细胞增殖的调控因子,主要能够促进细胞由 G0 期进入 G1 期,使处于有丝分裂期的细胞百分数增加。乳腺癌扩增性抗原 1 (amplified in breast cancer 1, AIB1) 是一种核受体辅激活因子,Planas-Silva 等^[13]发现 AIB1 增加雌激素依赖的 CyclinD1 表达。Bcl-2、Bcl-xl 属于抗凋亡家族成员,其表达能抑制细胞凋亡,使细胞持续生存,促进肿瘤细胞增殖的异常失控。本研究结果进一步显示,17 β -E₂ 促进乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡抑制的效应与组蛋白乙酰化水平增高表现一致的同时,亦可见与 CyclinD1、Bcl-2、Bcl-xl 的 mRNA 转录和蛋白表达水平增高成正性相关趋势;乙酰化酶抑制剂

Garcinol 亦能对 17 β -E₂ 的促 CyclinD1、Bcl-2、Bcl-xl 的表达产生抑制作用。由此可见,17 β -E₂ 可能通过组蛋白的乙酰化表观修饰增强基因转录调控活性,对促进 CyclinD1、Bcl-2、Bcl-xl 基因转录和蛋白表达产生重要作用,从而促进 MCF-7 细胞增殖和凋亡抑制效应。本课题组认为,在雌激素促乳腺癌发生发展的过程中,组蛋白乙酰化修饰异常具有关键的作用。

参 考 文 献

- [1] Jin W, Chen L, Chen Y, et al. UHRF1 is associated with epigenetic silencing of BRCA1 in sporadic breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 123(2): 359-373.
- [2] Jin W, Liu Y, Chen L, et al. Involvement of MyoD and c-myc in regulation of basal and estrogen-induced transcription activity of the BRCA1 gene[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 125(3): 699-713.
- [3] Arif M, Pradhan SK, Thanuja GR, et al. Mechanism of p300 specific histone acetyltransferase inhibition by small molecules[J]. J Med Chem, 2009, 52(2): 267-277.
- [4] Balasubramanyam K, Altaf M, Varier RA, et al. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression[J]. J Biol Chem, 2004, 279(32): 33716-33726.
- [5] Han D, Denison MS, Tachibana H, et al. Effects of estrogenic compounds on immunoglobulin production by mouse splenocytes[J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(10): 1263-1267.
- [6] Di Cerbo V, Schneider R. Cancers with wrong HATs: the impact of acetylation[J]. Brief Funct Genomics, 2013, 12(3): 231-243.
- [7] Marmorstein R, Trievel RC. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1789(1): 58-68.
- [8] Chen H, Lin RJ, Xie W, et al. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase[J]. Cell, 1999, 98(5): 675-686.
- [9] Kininis M, Chen BS, Diehl AG, et al. Genomic analyses of transcription factor binding, histone acetylation, and gene expression reveal mechanistically distinct classes of estrogen-regulated promoters[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(14): 5090-5104.
- [10] Kutanzi KR, Koturbash I, Kovalchuk O. Reversibility of pre-malignant estrogen-induced epigenetic changes[J]. Cell Cycle, 2010, 9(15): 3078-3084.
- [11] 李苏华, 邓华瑜, 郑维萍. ERK 抑制对乳腺癌细胞(MCF-7)PCAF 的影响和意义[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(8): 1155-1159.
- [12] Iizuka M, Takahashi Y, Mizzen CA, et al. Histone acetyltransferase Hbo1: catalytic activity, cellular abundance, and links to primary cancers[J]. Gene, 2009, 436(1-2): 108-114.
- [13] Planas-Silva MD, Shang Y, Donaher JL, et al. AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression[J]. Cancer Res, 2001, 61(10): 3858-3862.

(责任编辑:冉明会)