

Effects of NS-398 on the Acetylation of Histone H3 and P53 and the Proliferation of HepG2 Cells

WU Qing, GUO Xiao-peng, ZHU Chang-cai,
FAN Li-rong, SONG Shi-zhen
(School of Medicine, Wuhan University of Science and
Technology, Wuhan 430080, Hubei China)

NS-398 调节 HepG2 细胞 P53 和 组蛋白 H3 乙酰化 抑制细胞增殖的 研究

吴 青/郭晓鹏/朱长才/范丽蓉/宋世震*
(武汉科技大学医学院,湖北 武汉 430080)

【摘要】背景与目的:研究 NS-398 对 HepG2 细胞组蛋白 H3 和非组蛋白 P53 的乙酰化和细胞增殖的作用,并探讨 NS-398 的抗肿瘤机制。材料与方法:应用不同浓度(0, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{mol/L}$)的 NS-398 作用 HepG2 细胞不同时间(0, 12, 24, 36, 48 h)后,采用 MTT 法测定 NS-398 对 HepG2 细胞增殖的影响,用 Western blot 法检测乙酰化组蛋白 H3 和乙酰化 P53 的水平。结果:NS-398 可抑制 HepG2 细胞的增殖,且呈时间和剂量依赖性,在 24 h、36 h 和 48 h 的 IC_{50} 值分别为 300 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 。NS-398 能明显上调组蛋白 H3 的乙酰化水平,促进 P53 的表达和 P53 的乙酰化。结论:NS-398 具有去乙酰化酶抑制剂作用,能上调组蛋白 H3 乙酰化水平,促进肿瘤抑制因子 P53 表达和活化,抑制肿瘤细胞增殖。

【关键词】NS-398; 组蛋白 H3; P53 基因; HepG2 细胞

中图分类号:Q756

文献标识码:A

文章编号:1004-616X(2007)03-0227-03

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To investigate the effects of NS-398 on the acetylation of histone H3 and P53 and the proliferation of HepG2 cells. **MATERIALS AND METHODS:** The total protein was extracted from HepG2 cells treated with or without different concentrations of NS-398(0, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{mol/L}$) for different times(0, 12, 24, 36, 48 h). Western blot analysis was performed to determine the levels of acetylated histone H3 and acetylated P53. MTT assay was performed to examine the growth inhibition effect of NS-398 on HepG2 cells. **RESULTS:** NS-398 could inhibit the proliferation of HepG2 cells in a time and dose-dependent manner, with the IC_{50} at 24 h, 36 h and 48 h of 300 $\mu\text{mol/L}$, 200 $\mu\text{mol/L}$ and 150 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The levels of histone H3 acetylation, P53 expression and P53 acetylation were significantly increased. **CONCLUSION:** NS-398 functioned as an deacetylase inhibitor, which could increase the level of acetylated Histone H3, enhance the expression and activity of tumor suppressor P53, and inhibit the proliferation of HepG2 cells

【KEY WORDS】NS-398; Histone H3; P53; HepG2 cell

通过对组蛋白赖氨酸末端的乙酰化修饰而改变染色体的结构,是基因转录调控的重要调节方式之一。这种调节方式由组蛋白乙酰化酶(HATs)和组蛋白去乙酰化酶(HDACs)2类酶的活性决定。有研究表明恶性肿瘤细胞肿瘤抑制基因的转录沉默与该部位组蛋白乙酰化水平降低密切相关。因此,对组蛋白乙酰化酶和组蛋白去乙酰化酶

状态的研究也成为近年来抗肿瘤研究的热点。

NS-398 是近年发现的一种高度选择性的非甾体类抗炎药,在体内外可抑制肿瘤细胞的生长,阻止肿瘤细胞周期的进行,诱导细胞凋亡。我们通过研究 NS-398 对人肝肿瘤细胞株 HepG2 细胞信号分子组蛋白乙酰化的组蛋白 H3(Ac-Histon3)的影响,观察蛋白质 P53 和组蛋

收稿日期:2006-09-01; 修订日期:2007-01-20

基金项目:湖北教育厅基金项目(D200511008)

作者简介:吴青(1970-),女,博士研究生,主治医师,研究方向:恶性血液病研究。Tel:027-61021839, E-mail:wuqing1221@21cn.com

* Correspondence to: SONG Shi-zhen Tel 027-68862066; E-mail: songshizhen@wust.edu.cn

白 H3 的乙酰化水平变化, 从一个全新的角度探讨其抑制肝肿瘤细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 NS-398 分子式 $C_{13}H_{18}N_2O_5S$, 相对分子质量 314.4, 纯度 $\geq 98\%$, 购自 Sigma 公司。用二甲亚砜 (DMSO) 溶解, 浓度为 $5 \times 10^3 \mu\text{mol/L}$, 等量分装, -20°C 保存。乙酰化 P53 抗体、乙酰化组蛋白 H3 抗体、P53 抗体均购自 Santa Cruz 公司, 前 2 种抗体为兔抗人多抗, 后者为鼠抗人单抗, 羊抗兔和羊抗鼠二抗购自晶美生物技术公司, ECL 发光试剂盒购自 Piers 公司。

1.2 细胞培养 人肝肿瘤细胞株 HepG2 购自上海科学院细胞中心。细胞培养采用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 在 37°C , 5% CO_2 饱和湿度下培养, 每 48 h 换液传代 1 次。取生长良好、活性大于 98% 的细胞进行实验。

1.3 MTT 法检测 NS-398 对 HepG2 细胞增殖的作用 将各组细胞密度调整到 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 接种于 96 孔培养板中, 每孔加细胞 200 μl , 设 3 个平行孔。分别加入不同浓度 NS-398, 使 NS-398 工作浓度为 0、100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$, 培养 0、12、24、36 和 48 h, 同时分别设 RPMI 1640 组和等量 DMSO 组为阴性对照。培养结束每孔加入 20 μl MTT (5 mg/ml) 继续孵育 4 h, 终止培养, 弃去孔内的培养液, 每孔加入 150 μl DMSO, 振荡溶解

细胞后, 于 490 nm 波长酶标仪测定各孔光密度值 (OD)。按下式计算细胞的生长抑制率:

$$\text{细胞的生长抑制率} = (1 - \text{实验组平均 A 值} / \text{对照组平均 A 值}) \times 100\%$$

1.4 细胞总蛋白提取和免疫印迹实验 收集细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$, 参照文献 [1] 方法提取不同处理组细胞的总蛋白。抗体均用 5% 的脱脂奶粉 (TBST 配制) 1:1 000 稀释常规制胶、上样、电泳、转膜, 蛋白质转膜后, 先用 5% 的脱脂奶粉 (TBST 配制) 37°C 封闭 2 h。加稀释好的一抗 (乙酰化 P53 抗体, 乙酰化 H3 抗体和 P53 抗体) 4°C 过夜, 用 PBS (加入终浓度为 0.02% 的 Tween-20) 充分漂洗 3 次, 每次 10 min, 再用二抗 (1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠 IgG) 振荡孵育 2 h。洗去未结合的二抗, 滴加增强化学发光法 (ECL) 化学发光剂, X 片曝光显影。扫描 X 片, 用凝胶成像分析系统 (英国 UVP) 进行图象分析, 计算灰度值, 实验至少重复 3 次。

1.5 统计分析 采用 SPSS11.5 统计软件包进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 NS-398 对 HepG2 细胞增殖的作用 NS-398 在低于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时对 HepG2 细胞增殖影响很小, 和阴性对照组 (RPMI 1640 组和 DMSO 组) 比较, 差异无统计学意义, RPMI 1640 组和 DMSO 组相比, 差异亦无统

表 1 不同浓度 NS-398 作用 HepG2 细胞不同时间对细胞增殖的影响

Table 1 Effects of NS-398 on the proliferation of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Group	24 h		36 h		48 h	
	Absorbance value	Inhibition rate (%)	Absorbance value	Inhibition rate (%)	Absorbance value	Inhibition rate (%)
Control	1.884 ± 0.12	1.25 ± 0.12	1.7356 ± 0.11	3.14 ± 0.12	1.609 ± 0.03	5.32 ± 0.41
NS-398 100 $\mu\text{mol/L}$	1.457 ± 0.05	22.34 ± 8.22	1.3260 ± 0.10	30.47 ± 8.50	1.570 ± 0.16	45.07 ± 9.86
200 $\mu\text{mol/L}$	1.246 ± 0.15	33.62 ± 9.69*	1.0547 ± 0.08	46.56 ± 0.95*	0.697 ± 0.04	59.35 ± 2.36**
300 $\mu\text{mol/L}$	0.842 ± 0.06	45.03 ± 6.20**	0.6967 ± 0.08	62.12 ± 1.95**	0.519 ± 0.06	68.60 ± 3.77**
400 $\mu\text{mol/L}$	0.450 ± 0.02	62.06 ± 1.51**	0.3422 ± 0.01	70.29 ± 1.54**	0.155 ± 0.02	84.94 ± 1.28**

Compared with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

计学意义。随着浓度增加和时间延长, NS-398 对细胞增殖抑制作用明显增强, 24、36 和 48 h 的 IC_{50} 值分别为 300、200 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 。NS-398 以时间和浓度依赖方式抑制 HepG2 细胞增殖 (图 1)。

2.2 NS-398 对 P53 和 P53 乙酰化的作用

Western blot 结果表明, NS-398 能增加 P53 蛋白的表达, 24 h 实验组 (267.41 ± 5.23) 和对照组 (76.58 ± 1.54) 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), NS-398 作用后乙酰化 P53 的水平 (182.67 ± 2.12) 和对照组 (17.21 ± 2.4) 相比明显升高 ($P < 0.01$)。

2.3 NS-398 对组蛋白 H3 的乙酰化作用 300

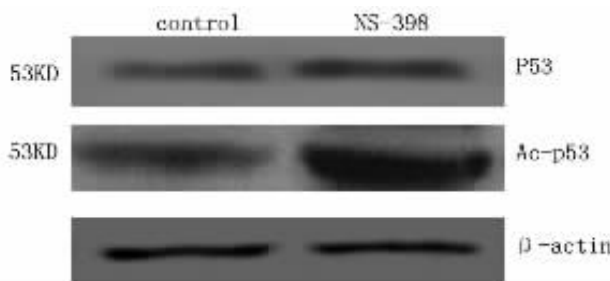


图 2 Western blot 分析 NS-398 作用 HepG2 细胞 24 h 后, P53 蛋白及乙酰化 P53 蛋白的变化

Figure 2 Expression of P53 and acetylated P53 in HepG2 cells after treated with NS-398 for 24 h, detected by Western blot.

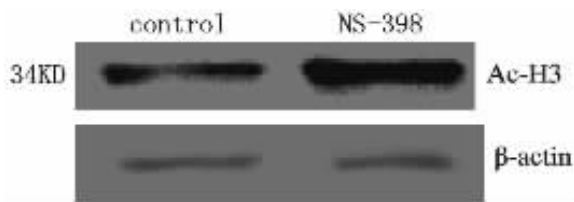


图 3 Western blot 分析 NS-398 作用 HepG2 细胞 10 h 后,组蛋白 H3 的乙酰化作用影响

Figure 3 Expression of acetylated histone H3 in HepG2 cells after treated with NS-398 for 10 h, detected by western blot.

$\mu\text{mol/L}$ NS-398 作用 HepG2 细胞 10 h 后乙酰化组蛋白 H3 水平 (115.54 ± 11.4) 和对照组相比, 明显升高 ($P < 0.01$)。

3 讨论

最近研究表明肿瘤细胞 HATs/HDACs 的功能紊乱, 组蛋白的乙酰化作用障碍, 细胞分化成熟基因转录沉寂, 转录抑制因子表达增高, 这类 HDACs 均与肿瘤的发生有关^[2-4]。NS-398 是一种磺胺类制剂的衍生物, 是 COX-2 选择性抑制剂。研究表明, NS-398 通过抑制 COX-2, 从而抑制其产物 PGE2 的合成, 使细胞停滞在 G1 期, 特异性上调细胞周期依赖激酶 (CDK) 的抑制因子 p27(kip1) 的表达^[5], 并且在结直肠癌的防治方面有重要作用^[6]。我们在 NS-398 对 HepG2 细胞的增殖影响实验中发现, 在大于 $100 \mu\text{mol/L}$ 浓度时随着时间延长和剂量增加, NS-398 对 HepG2 细胞的增殖具有明显抑制作用。我们采用 Western blot 检测了 NS-398 对 HepG2 细胞的组蛋白 H3 的乙酰化调节作用, 发现 NS-398 作用 10 h 明显上调 H3 的乙酰化水平, 和非药物作用组相比增加了 2.5 倍, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。并且发现 NS-398 明显促进 HepG2 细胞 P53 表达, 作用 24 h 使 P53 表达增加了 3.5 倍, 而乙酰化 P53 的水平则增加更多, 分别达 10.6 倍。说明 NS-398 具有 HDACs 抑制剂的作用。最近研究发现^[7], P53 被乙酰化修饰而活化, 反式作用于 DNA, 启动包括 *GADD45*, *MDM2*, *P21WAF1/cipl* 等靶基因的转录, 诱导细胞生长抑制和凋亡。P53 的乙酰化作用, 伴随有 HATs (P300/CBP, GCN5 等) 募集到核小体, 引起乙酰化 P53 反式激活基因位点的组蛋白 (H3, H4) 乙酰化, 染色体变构松弛打开, 促进该位点的基因转录。P53 乙酰化作用使 P53 和 HAT 间的结合, 更

稳定了 P53 的活性^[8]。有文献报道, HDAC1 和 MDM2 形成 HDAC1-MDM2 复合物介导 P53 的去乙酰化作用, 加速 P53 的降解^[9]。这也证明了 NS-398 抑制去乙酰化酶活性, 也就抑制了 P53 的去乙酰化作用, 从而稳定了 P53 的作用, 从另一个侧面解释了 HDACs 抑制剂介导肿瘤细胞凋亡和细胞周期阻滞的机制。

我们的实验结果证明, NS-398 以时间和剂量依赖方式抑制 HepG2 细胞增殖, 同时提高组蛋白 H3 的乙酰化水平, 在诱导肿瘤抑制因子 P53 表达的同时使其乙酰化水平升高, 活性增强。调节蛋白质的乙酰化作用可能是 NS-398 的抗肿瘤细胞增殖的机制之一。

参考文献:

- [1] Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, et al. Activation of P53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1[J]. *EMBO J*, 1999, 18(22): 6462 - 6471.
- [2] Secrist JP, Zhou X, Richon VM. HDAC inhibitors for the treatment of cancer[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2003, 4(12): 1422 - 1427.
- [3] Hu E, Dul E, Sung CM, et al. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(2): 720 - 728.
- [4] Buggy JJ, Sideris ML, Mak P, et al. Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8[J]. *Biochem J*, 2000, 350 (Pt 1): 199 - 205.
- [5] Hung WC, Chang HC, Pan MR et al. Induction of p27 (Kip1) as a mechanism underlying NS398-induced growth inhibition in human lung cancer cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 58(6): 1398 - 1403.
- [6] Bae SH, Jung ES, Park YM, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in Hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5): 1410 - 1418.
- [7] Gu W, Roeder RG. Activation of P53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the P53 C-terminal domain[J]. *Cell*, 1997, 90(4): 595 - 606.
- [8] Barlev NA, Liu L, Chehab NH, et al. Acetylation of P53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases[J]. *Mol Cell*, 2001, 8(6): 1243 - 1254.
- [9] Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, et al. MDM2-HDAC1 mediated deacetylation of P53 is required for its degradation[J]. *EMBO J*, 2002, 21(22): 6236 - 6245.