

## 曲古抑菌素 A 对细胞 PANC-1 株凋亡和肿瘤转移相关基因表达的影响

杨云秀<sup>1</sup>, 胡孙宽<sup>2</sup>, 叶星照<sup>2</sup>, 白永恒<sup>3</sup>, 王斯璐<sup>3</sup>, 刘彪<sup>1</sup>, 王本泉<sup>1</sup>, 陈必成<sup>3</sup>, 陈宗静<sup>1</sup>

(温州医学院附属第一医院 1. 肝胆胰外科; 2. 消化内科; 3. 外科实验室, 浙江温州 325000)

**摘要:**目的 探讨曲古抑菌素 A (TSA) 诱导胰腺癌细胞 PANC-1 细胞凋亡机制。方法 TSA 0.1 ~ 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  培养 PANC-1 细胞 0~48 h, MTT 法检测细胞存活率并计算  $\text{IC}_{50}$ 。TSA 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PANC-1 培养 0~48 h, Hoechst 33258 染色观察细胞核形态变化。TSA 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PANC-1 培养 0~12 h, 检测胱天蛋白酶 3 活性。TSA 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  与 PANC-1 培养 24 h, 实时定量 PCR 检测 c-myc, p53, Bcl-2, Bax, 存活素, 基质金属蛋白酶 1 (MMP1) 和基质金属蛋白酶 1 组织抑制剂 (TIMP-1) 和 Notch-1 基因的表达。TSA 0.4 和 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  与 PANC-1 培养 24 h, 细胞免疫化学方法检测 Notch-1 蛋白的胞内活性形式 NICD 表达。结果 TSA 可以明显抑制 PANC-1 细胞增殖, 12, 24 和 48 h 的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.42, 0.32 和 0.19  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 具有量效 ( $r=0.640, P=0.01$ ) 和时效 ( $r=0.768, P=0.002$ ) 关系。Hoechst 33258 染色结果表明, TSA 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  增加 PANC-1 细胞核的蓝色荧光并出现凋亡特征。TSA 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 4, 8 和 12 h 后, 胱天蛋白酶 3 的活性分别为正常对照组的  $1.62 \pm 0.12$ ,  $2.68 \pm 0.17$  和  $(3.92 \pm 0.23)$  倍。PCR 结果显示, TSA 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 后, p53, c-myc 和存活素 mRNA 表达下降, 分别为对照组的  $(18.3 \pm 5.1)\%$ ,  $(24.2 \pm 0.9)\%$  和  $(15.8 \pm 1.0)\%$ , Bcl-2 和 Notch-1 mRNA 未见明显变化, 而 Bax, MMP1 和 TIMP-1 mRNA 升高 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2/Bax 比值降低到正常对照组的  $(13.0 \pm 2.8)\%$ 。Notch-1 活性分子 NICD 明显升高 ( $P < 0.05$ )。结论 TSA 可通过线粒体途径诱导胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡, 而且使 Notch-1 激活, 促进转移相关基因表达。

**关键词:** 曲古抑菌素 A; 胰腺癌; 细胞凋亡; Notch 通路

**中图分类号:** R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)05-0624-06

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.05.005

胰腺癌的临床治疗效果一直不理想, 临床常用的化疗药物不能显著延长胰腺癌患者的生存率, 其 5 年生存率仅为 3%。近年研究显示, 影响表观遗传的化学药物具有抗肿瘤作用, 除 DNA 甲基化外, 组蛋白乙酰化也是表观遗传修饰的重要内容<sup>[1]</sup>。组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 催化的乙酰化反应在真核基因的表达调控中起重要作用, 可通过对核心组蛋白的可逆修饰来调节组蛋白的乙酰化水平, 从而调控转录的起始和延伸。HDAC 抑制剂能够抑制 HDAC 的活性, 改变组蛋白和非组蛋白的乙酰化水平, 从而可以选择性地调控部分肿瘤相关基因<sup>[2]</sup>。研究表明, HDAC 抑制剂可通过改变组蛋白的乙酰化状态调控肿瘤相关基因

的表达、阻碍细胞周期、抑制肿瘤血管生成以及改变热激蛋白 90 的乙酰化状态等机制<sup>[3-6]</sup>, 在体外诱导多种肿瘤细胞的生长停滞、分化或凋亡。曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 是一种得到广泛关注的 HDAC 抑制剂, 本研究主要通过 TSA 体外处理胰腺癌细胞, 检测肿瘤增殖、凋亡和转移的相关基因表达, 探讨 TSA 诱导胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂和仪器

TSA 购自 Sigma 公司 (美国), 用二甲亚砜 (DM-SO, Sigma) 溶解至  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 使用前用培养基稀释至工作浓度。DMEM 培养基、胎牛血清、Trizol 购自 Gibco BRL 公司, Hoechst 33258 购自 Sigma 公司。逆转录试剂盒和 SYBRGreen I 荧光定量试剂盒购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司, 荧光 PCR 所用引物由周蒙滔教授馈赠 (引物序列见表 1)。Notch 受体胞内区 (Notch intracellular domain, NICD) 兔抗人一抗以及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗购于 Abcam 生物公司。胱天蛋白酶 3 活性检测试剂

**基金项目:** 温州市科技局项目 (Y20090028); 浙江省重中之重学科外科学项目

**作者简介:** 杨云秀 (1984 -), 男, 住院医师, 硕士研究生, 主要从事胰腺肿瘤及其治疗的研究; 陈宗静 (1971 -), 男, 副主任医师, 主要从事胰腺癌的基础以及临床研究。

**通讯作者:** 陈宗静, E-mail: Chenbicheng@hotmail.com, Tel: (0577) 88069447

**Tab. 1 Sequence of primers used with real-time PCR**

Gene	Sense(5' - 3')	Antisense(5' - 3')
Survivin	AGAACTGGCCCTTCTTGGAGG	CTTTTATGTTCTCTATGGGGTC
p53	AGAGTCTATAGGCCACCCC	GCTCGACGCTAGGATCTGAC
C-myc	CAGCGAGGATATCTGGAAGA	CTCTGGTTCACCATGTCTCC
Bcl-2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAG	CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
Bax	GGACGAACTGGACAGTAAACATGG	GCAAAGTAGAAAAGGGCGACA AC
TIMP-1	TCATCAGGGCCAAGTTCGTG	GAAACTCCTCGCTGCGGTTGT
MMP1	GATGAAGTCCGGTTTTTCAAAG	GGGGTATCCGTGTAGCACCAT
GAPDH	TCCCATCACCATCTTCCAGG	GATGACCCTTTTGGCTCCC

TIMP-1: tissue inhibitor of metalloproteinase-1; MMP1: matrix metalloproteinase 1.

盒购自上海碧云天生物技术有限公司。酶标仪为 ELX800 (Bio-Tek) 产品, 荧光 PCR 仪为 ABI7500 (ABI)。

## 1.2 细胞培养

PANC-1 培养在含 10% 胎牛血清、链霉素 100 g·L<sup>-1</sup>、青霉素 100 g·L<sup>-1</sup> 的 DMEM 培养液里, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。取对数生长期的细胞处理后分组, TAS 组加入 TAS 0.1, 0.2, 0.4 和 0.6 μmol·L<sup>-1</sup>, 正常对照组加入等量的培养液共同培养。

## 1.3 MTT 法检测细胞存活

取对数生长期 PANC-1 细胞, 用 0.25% 的胰酶消化, 收集并调整细胞密度为 5 × 10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μl, 待细胞贴壁后弃去培养基, 分别加入 100 μl 终浓度为 0.1, 0.2, 0.4 和 0.6 μmol·L<sup>-1</sup> 的 TSA, 分别作用 0, 12, 24 和 48 h, 正常对照组不加 TSA, 同时设置空白调零组 [不加细胞仅加入等量的磷酸盐缓冲液 (PBS)]。培养结束前 4 h 每孔加入 20 μl MTT (5 g·L<sup>-1</sup>), 继续培养 4 h 后弃去上清液, 每孔加入 150 μl DMSO, 震荡 10 min 左右, 使结晶充分溶解后, 立即于酶标仪 490 nm 处测定吸光度值 (absorbance, A<sub>490 nm</sub>)。计算肿瘤细胞增殖抑制率 (inhibitory rate, IR), IR (%) = 1 - (实验组 A<sub>490 nm</sub> - 空白组 A<sub>490 nm</sub>) / (正常对照组 A<sub>490 nm</sub> - 空白组 A<sub>490 nm</sub>) × 100%。每个浓度设 6 个平行孔。

## 1.4 Hoechst 33258 荧光染色法观察细胞凋亡

TSA 0.4 μmol·L<sup>-1</sup> 处理 0, 12, 24, 48 h 后, 移去培养基, 用冷 PBS 洗 2 次, 4% 甲醛液固定 10 min, 弃固定液, 双蒸水冲洗 2 次, Hoechst 33258 (5 mg·L<sup>-1</sup>) 避光染色 5 min, 然后用双蒸水冲洗 2 次, 室温下凉干后于荧光 (激发波长 360 nm, 发射波长 450 nm) 显微镜下观察, 并随机选取位置进行拍照。

## 1.5 胱天蛋白酶 3 活性的测定

将 PANC-1 细胞接种在 12 孔板后, TSA 0.4 μmol·L<sup>-1</sup> 处理细胞 0, 4, 8 和 12 h 后, 按照胱天蛋白酶 3 活性测定试剂盒操作说明进行。实验重复 3 次, 结果取平均值。

## 1.6 实时定量 PCR 方法检测靶基因表达

取 TSA 0.4 μmol·L<sup>-1</sup> 处理 24 h 和正常对照组细胞, 用 Trizol 试剂盒提取两组细胞的总 RNA, 每组吸取 2 μg RNA 样本在 10 μl 体系中进行逆转录反应, 参照逆转录试剂盒说明书进行。取逆转录产物 1 μl 进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系: 5 μl 2 × SYBR Green 荧光定量试剂, 2 μl 引物 (上、下游各 1 μl, 终浓度 200 nmol·L<sup>-1</sup>), 2 μl 反应缓冲液, 1 μl cDNA。检测靶基因包括: 存活素、p53、c-myc、Bcl-2, Bax、金属蛋白酶 1 组织抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase 1, MMP1) 以及 Notch 通路关键分子 Notch-1。扩增程序为: 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 62℃ 10 s, 40 个循环。得到的 Ct 值用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 mRNA 表达。

## 1.7 细胞免疫化学检测 NICD 蛋白的表达

将细胞经胰酶消化收集后, 分别以 2 × 10<sup>5</sup> 个细胞接种于含载玻片的 6 孔板中, 常规培养。培养细胞至 80% ~ 90% 融合后, 分别用 TSA 0, 0.4 和 0.6 μmol·L<sup>-1</sup> 处理 24 h, 弃去培养基, PBS 清洗细胞 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定 60 min。5% ~ 10% 正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭, 在各细胞爬片上滴加一抗工作液抗 NICD, 37℃ 孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 滴加生物素标记二抗工作液, 37℃ 孵育 30 min; PBS 冲洗 3 次。二氨基联苯胺显色, 细胞胞质和胞核呈棕黄色为阳性着色, 苏木精复染后常规脱水、透明、封片。每组取 3 张片, 每张片子取 8 个高倍视野 (200 ×), 运用

Image Pro Plus 软件分析 NICD 染色的平均吸光度值。

### 1.8 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 Spss12 统计软件进行单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TSA 对 PANC-1 细胞存活的影响

图 1 结果显示,TSA 对 PANC-1 细胞存活有显著的抑制作用,且抑制作用具有较好的量效( $r = 0.640, P = 0.01$ )和时效( $r = 0.768, P = 0.002$ )关系。作图法求出 TSA 的半数抑制浓度为 12 h: $IC_{50} = 0.42 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;24 h: $IC_{50} = 0.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;48 h: $IC_{50} = 0.19 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

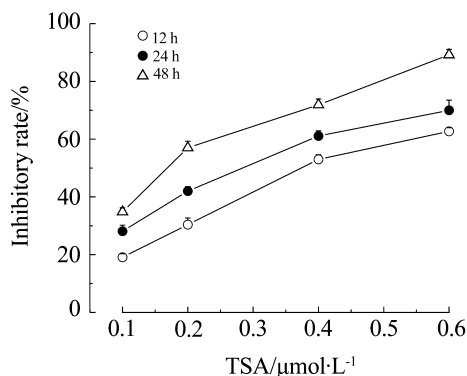


Fig. 1 Effect of trichostatin A (TSA) on PANC-1 cell proliferation by MTT.  $\bar{x} \pm s, n = 6$ .

### 2.2 TSA 诱导 PANC-1 细胞凋亡

TSA  $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  分别处理 0, 12, 24 和 48 h, Hoechst 33258 染色发现,未经 TSA 处理的正常细胞核染色较淡(图 2A),早期凋亡细胞核由于染色体发生皱缩而染成亮蓝色容易与正常细胞区分。随着

药物作用时间延长,细胞核亮蓝色染色比例明显增加,TSA 作用 48 h PANC-1 细胞核染成亮蓝色数目最多(图 2B,C,D)。

### 2.3 TSA 对 PANC-1 细胞胱天蛋白酶 3 活性的影响

图 3 结果显示,TSA  $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 0, 4, 8 和 12 h 后,PANC-1 细胞内激活的胱天蛋白酶 3 随时间的增加活性增强,分别为正常对照组的( $1.62 \pm 0.12$ )倍,( $2.68 \pm 0.17$ )倍和( $3.92 \pm 0.23$ )倍( $F = 97.8, P < 0.01$ )。

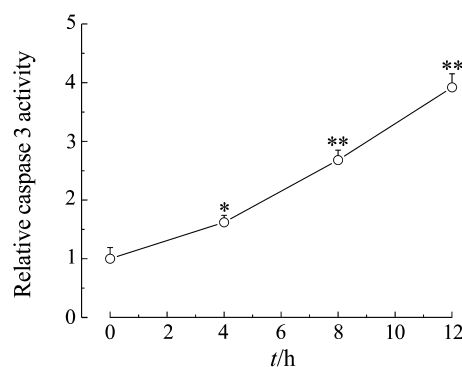


Fig. 3 Effect of TSA on caspase 3 activity of PANC-1 cells. PANC-1 cells were cultured with TSA  $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 0, 4, 8 and 12 h.  $\bar{x} \pm s, n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control (0 h) group.

### 2.4 TSA 对 PANC-1 细胞凋亡和肿瘤转移相关基因表达的影响

表 4 结果显示,与正常对照组相比,TSA  $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 PANC-1 细胞 24 h 后凋亡相关基因存活素, c-myc 和 p53 mRNA 表达均明显下降, Bax 表达明显上升, Bcl-2 mRNA 未见明显变化,但 Bcl-2/Bax 值降低明显,仅为对照组的 14%。肿瘤转移相关基因 MMP1 和 TIMP1 mRNA 的表达显著升高( $F = 39.2, P = 0.003$ ;  $F = 9.5, P = 0.039$ )。

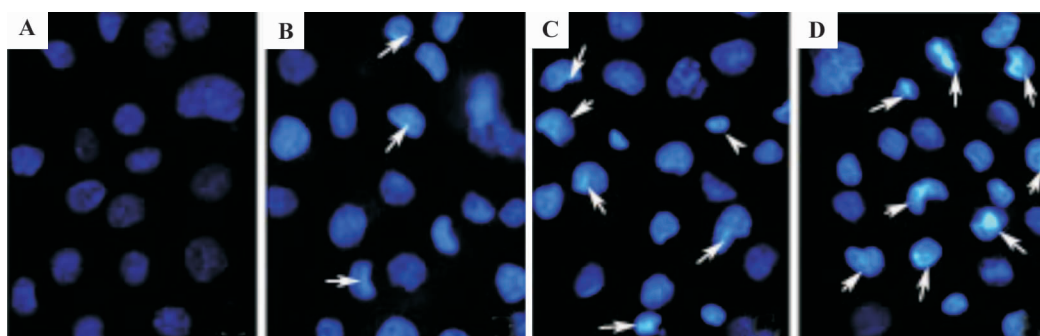


Fig. 2 Effect of TSA on PANC-1 cell apoptosis detected by Hoechst 33258 staining ( $\times 200$ ). A - D: TSA  $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  treated PANC-1 for 0, 12, 24 and 48 h, respectively. Arrows show apoptotic cells.

**Tab. 4** Effect of TSA on apoptosis-related and metastasis-related gene expression in PCNA-1

Group	mRNA expression( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )			
	Survivin	c-myc	p53	Bcl-2
Normal control	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.17
TSA 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.15 ± 0.04**	0.24 ± 0.02**	0.16 ± 0.06**	0.97 ± 0.22

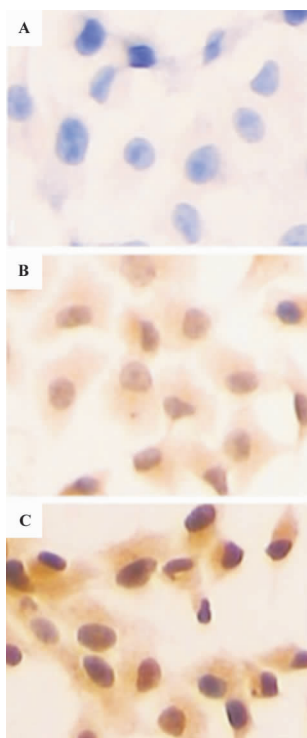
  

Group	mRNA expression( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )			
	Bax	Bcl-2/Bax	MPP1	TIMP-1
Normal control	1.00 ± 0.24	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.08
TSA 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	6.64 ± 0.33**	0.13 ± 0.03**	2.02 ± 0.54*	2.09 ± 0.68*

PANC-1 cells were cultured with TSA 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared with normal control (0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group.

### 2.5 TSA 对 PANC-1 细胞 Notch-1 mRNA 及其活化分子 NICD 表达的影响

TSA 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理 PANC-1 细胞 24 h 后, Notch-1 mRNA 表达与正常对照组相比变化不明显, 无统计学意义 ( $F = 6.87$ ,  $P > 0.05$ )。细胞免疫化学检测 Notch-1 的活化分子 NICD 发现, 正常对照组仅显示苏木素蓝染的细胞核 (图 4A), 而 TSA 0.4 和 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 均有棕黄色 NICD 染色阳性细胞, 并随药物浓度增加阳性细胞棕黄色逐渐加深 (图 4B, C)。Image Pro Plus 软件定量分析结果显示, TSA 0.4 和 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 NICD 蛋白的相对表达分别为  $0.143 \pm 0.009$  和  $0.264 \pm 0.013$ , 与正常对照组  $0.072 \pm 0.009$  相比有明显差异 ( $F = 131.1$ ,  $P < 0.05$ )。



**Fig. 4** Effect of TSA on expression of Notch intracellular domain (NICD) in PANC-1 cells by immunocytochemistry ( $\times 200$ ). A: normal control; B: TSA 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 h; C: TSA 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 24 h.

### 3 讨论

组蛋白乙酰化是调节基因表达的表观遗传修饰的一种, 调节组蛋白乙酰化程度主要有组蛋白乙酰化酶和 HDAC 的相互协调来完成。组蛋白乙酰化紊乱可能会导致染色体结构变化, 调节细胞周期、分化以及凋亡的基因转录水平的失调, 进而影响细胞的生长导致凋亡<sup>[7]</sup>。由于大多数肿瘤细胞中都呈高度乙酰化状态<sup>[8]</sup>, 因此具有抑制 HDAC 的活性的化疗药物成为抗癌治疗的研究热点。TSA 是一种去乙酰化酶抑制剂, 能够有效地抑制 HDAC 的活性, 促进组蛋白和非组蛋白的乙酰化修饰, 在转录和翻译水平调控肿瘤生长、增殖以及凋亡相关蛋白的表达和降解, 活化凋亡信号通路<sup>[9]</sup>。本研究发现, TSA 可以抑制 PANC-1 的生长导致其凋亡, 并通过 MTT 法、Hoechst 33258 核染色和胱天蛋白酶 3 的激活情况得以证实。虽然 TSA 并不影响 Notch-1 的表达, 但是 NICD 表达增加, 提示 Notch 通路激活。并且 TSA 可上调凋亡基因的表达如 Bax, 下调抗凋亡基因 c-myc, 存活素和 Bcl-2 mRNA 的表达。在本实验中 TSA 诱导胰腺癌细胞出现了明显的凋亡特性, 同时伴随着凋亡相关基因的改变。

研究发现, TSA 能通过它的氧肟酸螯合 HDAC 活化位点上的锌离子而抑制 I 型和 II 型 HDAC 的活性, 达到调控基因表达的作用, 从而改变肿瘤细胞内重要的生长通路促进其凋亡<sup>[10]</sup>。目前已有文献证明 TSA 可以诱导多种肿瘤细胞的凋亡, 而细胞凋亡的启动和发展受到多种蛋白酶的控制, 控制凋亡的途径主要有两条: 死亡受体途径和线粒体途径。线粒体途径是细胞凋亡的经典途径, 在凋亡的过程中胱天蛋白酶 3 被激活而发挥功能。实验结果表明, 胱天蛋白酶 3 活性随着 TSA 作用时间的延长而增强, 与 Sato 等<sup>[11]</sup> 研究结果相一致, 可见 MTT 方法检测到的细胞增殖抑制是通过 TSA 诱导 PANC-1 细胞凋亡的结果, 在这一过程中大量胱天蛋白酶 3 被激活; 同时 Hoechst 33258 荧光染色也证实了大量细

胞发生了凋亡。

P53 可调控凋亡途径中的多种蛋白如 Bax 和 Apaf1, 但 PANC-1 表达的可能为突变的 P53<sup>[12]</sup>, TSA 下调突变 p53 mRNA 的表达促进其凋亡。存活素作为凋亡抑制蛋白家族之一, 在正常组织中不表达, 而在肿瘤组织中有较高的表达, 是目前为止发现的最强的凋亡抑制因子, 可直接作用于细胞凋亡途径中胱天蛋白酶 3, 胱天蛋白酶 7 抑制细胞凋亡, 其抑制凋亡的效果远远大于 Bcl-2 家族<sup>[13]</sup>。本实验结果表明, TSA 处理细胞导致存活素 mRNA 表达明显下降, 可通过减除对胱天蛋白酶 3 的抑制而促进细胞凋亡。Bcl-2 家族蛋白调控细胞凋亡, 其中促凋亡基因 Bax、抑凋亡基因 Bcl-2 在细胞凋亡中发挥着重要的作用。尤其是 Bcl-2/Bax 蛋白比率的降低被认为是凋亡过程中一个重要因素。二者在线粒体膜上形成二聚体, 调控着线粒体膜的通透性。当其比值降低时, 线粒体膜通透性升高, 细胞色素 c 大量释放, 进而激活胱天蛋白酶 3 导致细胞凋亡。本实验结果显示, TSA 对 Bcl-2 mRNA 表达无影响, 但显著升高 Bax mRNA 表达, 导致 Bcl-2/Bax mRNA 比率降低。表明线粒体通路参与了 TSA 诱导细胞凋亡的过程。

Notch 通路在肿瘤细胞生长、增殖、分化过程中起重要作用, 因而成为治疗肿瘤的重要靶点。但研究者对 Notch 通路激活影响细胞凋亡的意见却不尽一致, Wang 等<sup>[14]</sup>发现通过抑制肿瘤细胞 Notch 通路可抑制胰腺癌细胞的生长并促进肿瘤细胞的凋亡, 而 Greenblat 等<sup>[15]</sup>则发现在髓质型甲状腺癌中, Notch 通路的激活可以诱导癌细胞发生凋亡。由此可见可能是由于肿瘤性质不同, 具体机制还需进一步研究。在本研究中, TSA 并不影响 Notch-1 mRNA 表达, 但对 Notch 通路有激活作用, 活化分子 NICD 蛋白入核现象明显。同样 MMP1 和 TIMP-1 也具有一定的抗凋亡作用。在诱导凋亡的模型中, 广谱 MMP1 抑制剂会增加胱天蛋白酶 3 活性和 DNA 片段出现的时间<sup>[16]</sup>, 推测 MMP1 具有抑制肿瘤细胞凋亡的作用。研究结果显示, TSA 使 PANC-1 细胞 MMP1 和 TIMP-1 mRNA 表达明显升高, 其凋亡机制可能激活 Notch 通路、MMP1 和 TIMP-1 通路有关。

#### 参考文献:

- [1] Ballestar E, Wolffe AP. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression[J]. *Eur J Biochem*, 2001, **268**(1):1-6.
- [2] Kim DH, Kim M, Kwon HJ. Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents[J]. *J Biochem Mol Biol*, 2003, **36**(1):110-119.
- [3] Nozell S, Laver T, Patel K, Benveniste EN. Mechanism of IFN-beta-mediated inhibition of IL-8 gene expression in astrogloma cells[J]. *J Immunol*, 2006, **177**(2):822-830.
- [4] Kamitani H, Taniura S, Watanabe K, Sakamoto M, Watanabe T, Eling T. Histone acetylation may suppress human glioma cell proliferation when p21 WAF/Cip1 and gelsolin are induced[J]. *Neuro Oncol*, 2002, **4**(2):95-101.
- [5] Harper J, Yan L, Loureiro RM, Wu I, Fang J, D'Amore PA, et al. Repression of vascular endothelial growth factor expression by the zinc finger transcription factor ZNF24[J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(18):8736-8741.
- [6] Yu X, Guo ZS, Marcu MG, Neckers L, Nguyen DM, Chen GA, et al. Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, **94**(7):504-513.
- [7] Hess-Stumpp H, Bracker TU, Henderson D, Politz O. MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases-the development of an anticancer agent[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, **39**(7-8):1388-1405.
- [8] Batty N, Malouf GG, Issa JP. Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents[J]. *Cancer Lett*, 2009, **280**(2):192-200.
- [9] Marks PA, Dokmanovic M. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005, **14**(12):1497-1511.
- [10] Acharya MR, Sparreboom A, Venitz J, Figg WD. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, **68**(4):917-932.
- [11] Sato N, Ohta T, Kitagawa H, Kayahara M, Ninomiya I, Fushida S, et al. FR901228, a novel histone deacetylase inhibitor, induces cell cycle arrest and subsequent apoptosis in refractory human pancreatic cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2004, **24**(3):679-685.
- [12] Yamaguchi Y, Watanabe H, Yrdiran S, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, et al. Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with K-ras mutation[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, **5**(5):1147-1153.
- [13] Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting[J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(18):11177-11182.
- [14] Wang Z, Zhang Y, Li Y, Banerjee S, Liao J, Sarkar

- FH. Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, **5**(3):483-493.
- [15] Greenblatt DY, Cayo MA, Adler JT, Ning L, Haymart MR, Kunnimalaiyaan M, *et al*. Valproic acid activates Notch1 signaling and induces apoptosis in medullary thyroid cancer cells[J]. *Ann Surg*, 2008, **247**(6):1036-1040.
- [16] Limb GA, Matter K, Murphy G, Cambrey AD, Bishop PN, Morris GE, *et al*. Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis [J]. *Am J Pathol*, 2005, **166**(5):1555-1563.

## Effect of trichostatin A on expression of apoptosis-related genes and metastasis-related genes in human pancreatic cancer PANC-1 cells

YANG Yun-xiu<sup>1</sup>, HU Sun-kuan<sup>2</sup>, YE Xing-zhao<sup>2</sup>, BAI Yong-heng<sup>3</sup>, WANG Si-lu<sup>3</sup>,  
LIU Biao<sup>1</sup>, WANG Ben-quan<sup>1</sup>, CHEN Bi-cheng<sup>3</sup>, CHEN Zong-jing<sup>1</sup>

(1. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, 2. Department of Gastroenterology, 3. Surgery Laboratory, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

**Abstract: OBJECTIVE** To investigate the mechanism of trichostatin A (TSA) in inducing apoptosis in human pancreatic cancer PANC-1 cells and the genes involved in apoptosis. **METHODS** The proliferation inhibition rate and IC<sub>50</sub> of TSA were measured by MTT assay *in vitro* after PANC-1 cells were treated with TSA 0.1–0.6 μmol·L<sup>-1</sup> for 12, 24 and 48 h, respectively. Hoechst 33258 staining (TSA 0.4 μmol·L<sup>-1</sup> for 0–48 h) and caspase 3 activity assay (TSA 0.4 μmol·L<sup>-1</sup> for 0–12 h) were used to determine apoptosis. After the treatment with TSA 0.4 μmol·L<sup>-1</sup> for 24 h, the expression of c-myc, p53, Bcl-2, Bax, survivin, matrix metalloproteinases (MMP1), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) and Notch-1 were evaluated by SYBR GREEN based RT-PCR. The cytoplasmic tail of Notch-1 (NICD) in PANC-1 was semi-quantified by immunocytochemistry. **RESULTS** TSA could obviously inhibit proliferation of PANC-1 cells and the inhibition rate significantly increased in a concentration- and time-dependent manner. The IC<sub>50</sub> was 0.42, 0.32 and 0.19 μmol·L<sup>-1</sup> after PANC-1 cells were treated with TSA for 12, 24 and 48 h, respectively. TSA could promote apoptosis of PANC-1 cells. At 4, 8 and 12 h of TSA 0.4 μmol·L<sup>-1</sup> treatment, the activities of caspase 3 increased to 2.62 ± 0.12, 3.68 ± 0.17, 4.92 ± 0.23 fold as compared to untreated PANC-1. Compared with normal control, the expression of p53, c-myc and survivin mRNA was down-regulated to (18.3 ± 5.1)%, (24.2 ± 0.9)% and (15.8 ± 1.0)%, respectively (*P* < 0.05), Bax, MMP1 and TIMP-1 up-regulated (*P* < 0.05), and Bcl-2, Notch-1 were not affected. Significant increase of NICD in PANC-1 was detected after TSA 0.4 μmol·L<sup>-1</sup> was treated for 24 h (*P* < 0.05). **CONCLUSION** TSA inhibits pancreatic cancer cell line PANC-1 by inducing apoptosis through mitochondrial pathways, which can cause Notch-1 pathway action and transcription of target genes.

**Key words:** trichostatin A; pancreatic cancer; apoptosis; Notch pathway

**Foundation item:** The project supported by Wenzhou Municipal Science and Technology Plan Project (Y20090028); and by Extremely Key Subject of Surgery of Zhejiang Province

**Corresponding author:** CHEN Zong-jing, E-mail: Chenbicheng@hotmail.com, Tel: (0577)88069447

(收稿日期: 2012-02-22 接受日期: 2012-06-25)

(本文编辑: 乔虹)