

新型靶向组蛋白去乙酰化酶抑制剂的抗肿瘤作用及其机制

金 惠^{1,2}, 刘力锋², 邓卫平², 刘建文^{2*}(¹ 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; ² 华东理工大学生物反应器国家重点实验室 & 药学院, 上海 200237)

摘 要 探讨 3 种新型靶向组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂 D16, D22, D29 的抗肿瘤活性作用及其抑制人宫颈癌细胞增殖的机制。MTT 法检测 D16, D22, D29 对 MCF-7、HCT-116、A549、HeLa 以及 K562 的增殖抑制作用; 测定 D16, D22, D29 对 HDAC 及其 HDAC-1 的酶活抑制作用; 流式细胞术观察 D16, D22, D29 对 HeLa 细胞周期及凋亡诱导作用; Western blot 测定 D16, D22, D29 对 HeLa 细胞中乙酰化组蛋白 H3 (Ac-H3), p21^{cip/WAF} 的蛋白表达影响。结果显示, D16, D22, D29 明显抑制多种肿瘤细胞株的增殖, 有效抑制 HDAC 及其 HDAC-1 的活性, 其效果优于阳性对照药 Vorinostat (SAHA), 并诱导 HeLa 细胞产生 G₁ 期细胞周期阻滞及凋亡, Ac-H3 及 p21^{cip/WAF} 的蛋白水平明显上升。D16, D22, D29 具有一定的抗肿瘤活性, 其机制与诱导细胞周期阻滞和凋亡产生, 促进 p21^{cip/WAF} 的蛋白表达有关。

关键词 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; HDAC-1; 咔啉骨架; 乙酰化组蛋白 H3; p21^{cip/WAF}; 抗肿瘤

中图分类号 R734 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)04-0352-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130413

Antitumor effects and molecular mechanisms of novel selective HDAC inhibitors in human cervix carcinoma HeLa cells

JIN Hui^{1,2}, LIU Lifeng², DENG Weiping², LIU Jianwen^{2*}

¹ School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200093; ² State Key Laboratory of Bioreactor Engineering & School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract Examine the antitumor activity of three new histone deacetylase (HDAC) and HDAC-1 inhibitors with the carboline structure named D16, D22, D29 and explore the molecular mechanisms underlying. The anti-proliferative effects were detected by MTT assays in MCF-7, HCT-116, A549, HeLa and K562. The inhibition in HDAC and HDAC-1 were detected by using fluorescent substrate. The effects on the cell cycle arrest and apoptosis induction were examined by flow cytometry. The protein expressions of acetylated-H3 and p21^{cip/WAF} were detected by Western blotting. D16, D22, and D29 inhibited the proliferation of multiple carcinoma cells at much lower concentrations than SAHA dose-dependently. D16, D22, D29 effectively inhibited the activity of HDAC and HDAC-1; D16, D22 and D29 induced G₁ phase cell cycle arrest and apoptosis while the protein expression of acetylation of histone H3 and p21^{cip/WAF} were significantly up-regulated. D16, D22 and D29 were potent antitumor agents with their cycle arrest and apoptosis mechanisms. The molecular mechanisms were associated with the promotion of acetylated-H3 and p21^{cip/WAF}.

Key words histone deacetylase inhibitor; HDAC-1; carboline structure; acetylated-H3; p21^{cip/WAF}; antitumor

This work was supported by China Postdoctoral Science Foundation (No. 2013M531221) and the Shanghai Committee of Science and Technology Basic Key Research Project (No. 09JC1404500)

组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂是基于表观遗传学理论发现的一类新型抗肿瘤药物, 其治疗肿瘤效果良好, 是当今抗肿瘤新药开发的热点, 具

有良好的应用前景^[1-2]。此类药物以 HDAC 为靶标, 通过抑制 HDAC 活性, 调节组蛋白的乙酰化状态, 促进抗肿瘤转录因子的转录和表达, 调控相关

信号通路,发挥抗肿瘤的生物学效应^[3]。研究显示,HDAC 抑制剂能通过促进细胞分化,阻滞细胞周期,诱导细胞凋亡,上调肿瘤抑制基因如 p21^{cip/WAF} 的表达等作用,发挥抗肿瘤效应^[4-8]。

HDAC-1 是发现的首个哺乳动物的 HDAC 亚型,以催化亚单位的形式直接参与多种蛋白质复合物的形成和多种生物化学过程。研究发现,在多种肿瘤(如,肺癌、乳腺癌、前列腺癌和胃肠道癌等)中,HDAC-1 的表达明显偏高^[9]。抑制 HDAC-1 表达能直接引起组蛋白 H3 乙酰化^[10-11]。这些研究表明,HDAC-1 具有特殊的生物学功能和作用,如能有效抑制 HDAC-1 的活性,可提高抗肿瘤作用效果,降低不良反应,这些结论对 HDAC 抑制剂的设计和研发具有启示性意义。近年来出现的新型 HDAC 抑制剂 FK228 (romidepsin, 商品名: Istodax, Gloucester 制药公司), MGCD0103 (mocetinostat, 2 期临床试验中), 均能有效抑制 HDAC-1 活性^[12-14]。但目前能有效抑制 HDAC-1 的先导化合物尚不多见。

本研究针对所获得的 HDAC 抑制剂小分子化合物 D16, D22, D29 (专利号: CN102153549A, 结构见图 1), 以阳性药物 Vorinostat (SAHA, 商品名: Zolinza, 用于治疗加重、持续和复发或用两种全身性治疗药物无效的皮肤 T 细胞淋巴瘤) 为对照, 采用 MTT 法, 对来自实体瘤或血液瘤的多株肿瘤细胞株进行了抗肿瘤活性测试; 同时进行了 HDAC 和 HDAC-1 酶水平活性筛选, 并对其抑制 HeLa 细胞增殖的作用和机制进行了研究, 初步从抑制肿瘤细胞增殖活性、周期阻滞和凋亡诱导 3 个方面, 探讨了化合物结构和抑制活性之间的关系, 为后期结构优化和新药开发的研究提供理论基础和实验依据。

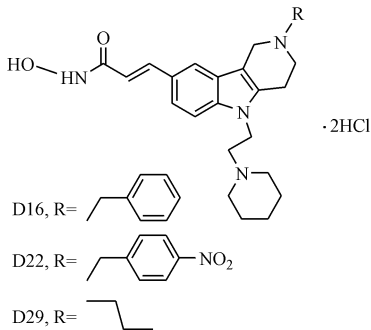


Figure 1 Structures of histone deacetylase (HDAC) inhibitors D16, D22 and D29

1 材料

1.1 试药及试剂

HDAC 抑制剂化合物 D16, D22, D29 及 SAHA 由华东理工大学邓卫平教授课题组合成并提供, 经核磁共振及红外光谱确定结构, 经高效液相色谱检测, 纯度大于 99%。

Ac-H3, p21^{cip/WAF} 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); MTT、Hoechst、PI 染料 (美国 Sigma 公司); Annexin-V/FITC 试剂盒 (上海美季生物公司), 其余试剂均为国产市售分析纯。荧光底物法采用组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 抑制活性检测试剂盒-组蛋白去乙酰化酶荧光检测试剂盒 (AK-500, 品牌: Biomol) 和组蛋白去乙酰化酶 1 (HDAC-1) 抑制活性检测试剂盒组蛋白去乙酰化酶 1 荧光检测试剂盒 (AK-511, 品牌: Biomol), 以荧光底物 (Fluor de lysTM) 为底物, 分别检测本研究中化合物对 HDACs 和 HDAC-1 半数抑制浓度 (IC₅₀)。

1.2 细胞及培养

人乳腺癌细胞株 (MCF-7)、人结肠癌细胞株 (HCT-116)、人肺癌细胞株 (A549)、人宫颈癌细胞株 (HeLa) 以及人白血病细胞株 (K562) 均购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。MCF-7 培养于含 10% 胎牛血清 (FBS) 的改良型完全培养基 (DMEM 培养基) 中, A549 培养于含 10% FBS 的 DMEM-F12 (1:1) 培养基中, HCT-116、HeLa 和 K562 培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中, 各培养基均购自美国 Gibco 公司, 并含有终浓度为 100 U/mL 的青霉素和 100 U/mL 的链霉素。

2 方法及结果

2.1 MTT 法检测 D16, D22, D29 对各肿瘤细胞株的生长抑制作用

按照文献^[15]进行 MTT 法操作, 以阴性对照组为参照, Origin 软件做图分析, 并计算化合物对肿瘤细胞株的半数抑制浓度 IC₅₀。

如图 2 所示, D16, D22, D29 对 MCF-7、HCT-116、A549、HeLa 以及 K562 细胞株均具有良好的增殖抑制作用, 且随剂量增大, 呈现出一定的剂量依赖性。

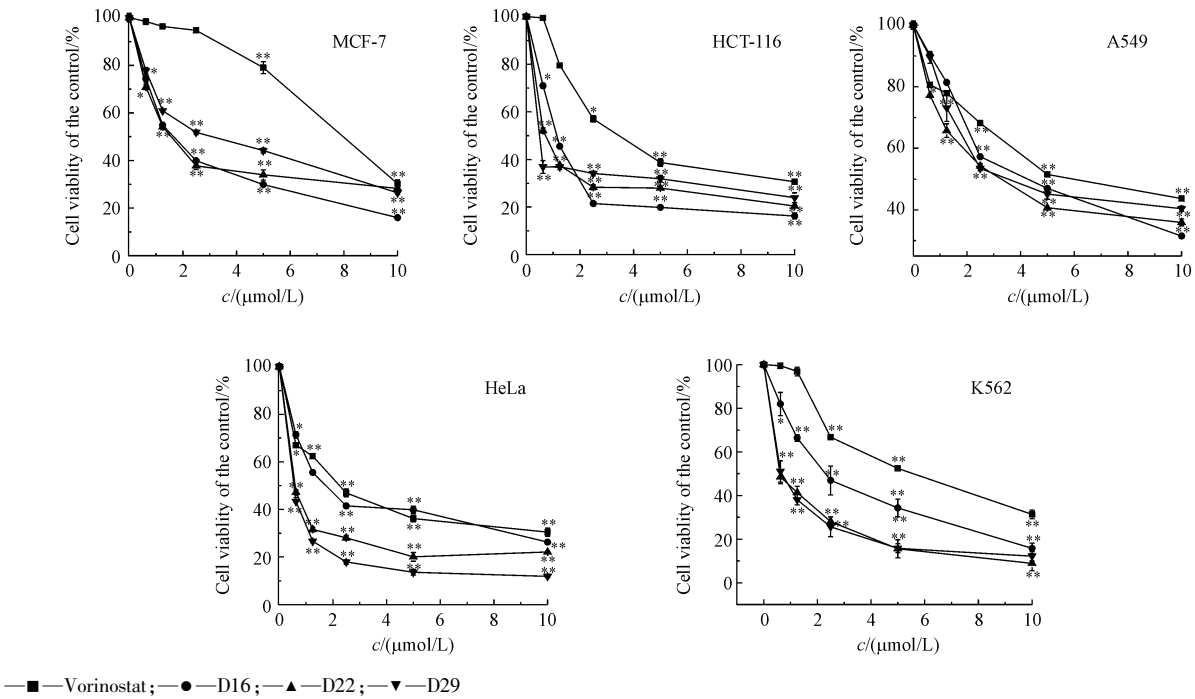


Figure 2 Anti-proliferation effects of D16, D22, D29 in various carcinoma cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

如表 1 所示,其中,D22 对 K562 的 IC_{50} 为 0.065 $\mu\text{mol/L}$,D29 对 HCT-116 的 IC_{50} 为 0.152 $\mu\text{mol/L}$,较阳性对照药物 SAHA 明显偏小。以 D16 为例,其对 MCF-7 的 IC_{50} 为 1.853 $\mu\text{mol/L}$,而 SAHA 的 IC_{50} 为 7.941 $\mu\text{mol/L}$,达 D16 的 IC_{50} 的 6 倍之多;D16 对 K562 细胞的 IC_{50} 为 0.552 $\mu\text{mol/L}$,明显低于 SAHA

对这株细胞的 IC_{50} (4.438 $\mu\text{mol/L}$),活性较其强达 10 倍左右;D16 对 HeLa、A549 和 HCT-116 也具有较好的增殖抑制作用, IC_{50} 分别为 0.731、4.191 和 2.815 $\mu\text{mol/L}$,均明显低于 SAHA 对这 3 株细胞的 IC_{50} (2.124、5.511 和 4.732 $\mu\text{mol/L}$),提示这些化合物具有良好的抑制肿瘤细胞增殖的作用。

Table 1 IC_{50} of D16, D22, D29 and vorinostat (SAHA) in various cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Cell line	$IC_{50}/(\mu\text{mol/L})$			
	SAHA	D16	D22	D29
MCF-7	7.941 \pm 0.35	1.853 \pm 0.11	1.523 \pm 0.57	3.145 \pm 0.25
HCT-116	4.732 \pm 0.17	2.815 \pm 0.24	0.865 \pm 0.05	0.152 \pm 0.18
A549	5.511 \pm 0.32	4.191 \pm 0.31	3.216 \pm 0.18	2.463 \pm 0.39
HeLa	2.124 \pm 0.21	0.731 \pm 0.52	0.404 \pm 0.37	0.461 \pm 0.08
K562	4.438 \pm 0.15	0.552 \pm 0.46	0.065 \pm 0.19	0.364 \pm 0.09

2.2 荧光底物法测定 D16, D22, D29 对 HDACs 和 HDAC-1 酶的抑制作用

采用 HDAC 及 HDAC-1 荧光底物试剂盒测定各化合物对 HDAC 和 HDAC-1 的抑制作用,按照试剂盒的说明进行酶活测定。向每孔中加入表中所示反应液,室温下反应 2 h 后,加入反应终止液,采用荧光酶标仪记录荧光值,激发波长为 380 nm,检测波长为 480 nm;采用 Prism Graph pad 5.0 进行非线性曲线拟合,并计算 IC_{50} 。

通过拟合计算,如表 2 所示,其中 D22 对 HDAC 抑制 $IC_{50} = 0.048 \mu\text{mol/L}$,D29 对 HDAC 抑制 $IC_{50} = 0.063 \mu\text{mol/L}$;D22 和 D29 对 HDAC-1 抑制分别为 0.083 和 0.021 $\mu\text{mol/L}$;提示这些化合物对 HDAC-1 具有良好的抑制作用。

Table 2 IC_{50} of D16, D22, D29 and SAHA in HDACs & HDAC-1

Enzyme	$IC_{50}/(\mu\text{mol/L})$			
	SAHA	D16	D22	D29
HDAC	0.065	0.117	0.048	0.063
HDAC-1	0.041	0.026	0.083	0.021

2.3 流式细胞术检测 D16,D22,D29 对 HeLa 的细胞周期及细胞凋亡诱导作用

按照文献[15]进行细胞周期影响及凋亡诱导作用检测。细胞与化合物作用 48 h 后,收集细胞并用 PBS 清洗两遍。采用 70% 乙醇固定,4 ℃ 过夜。弃去乙醇,悬浮于碘化丙吡 (PI) 500 μL 及 RNase A 中孵育后用 FACS 流式细胞仪检测,采用 Cell Quest 软件(Becton)及 Modifit 软件分析细胞周期数据;采用 Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒进行凋亡诱导检测。将作用后的细胞,重悬于 Annexin V-FITC 结合液中,加入 Annexin V-FITC 5 μL,室温(20 ~ 25 ℃)避光孵育 10 min,加入 FITC 结合液 195 μL 轻轻重悬细胞,加入 PI 染色液 10 μL,轻轻混匀,冰浴中避光放置 10 min;用

FACS 流式细胞仪检测样品,Cell Quest 软件及 Modifit 软件并分析凋亡诱导数据。

如表 3 显示,在 1.25 μmol/L 作用浓度下,D16,D22,D29 引起阻滞于 G₁ 期 HeLa 细胞的比例分别为 69.28%、66.09% 和 59.21%。这些结果,提示这些化合物能将细胞周期阻滞于 G₁ 期,从而影响 HeLa 细胞中 DNA 合成过程,G₁ 期阻滞程度呈现出一定的剂量依赖性。如表 3 显示,在 1.25 μmol/L 作用浓度下,D16,D22,D29 引起 HeLa 细胞中产生的总凋亡率分别为 29.72%、18.24% 和 9.11%,其中,D16 的总凋亡率最高。这些结果提示,这些化合物能引起 HeLa 细胞中产生凋亡,总凋亡率随浓度增大而增加,呈现出一定的剂量依赖性。

Table 3 Cell cycle arrest and apoptosis induction in HeLa cells by D16,D22,D29 treatment ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Group	Cell cycle			Apoptosis induction ^a
	G ₁ /%	S/%	G ₂ /%	Total apoptosis/%
Control	67.91 ± 2.62	23.02 ± 1.58	10.07 ± 1.19	3.97 ± 1.65
D16	69.28 ± 1.09	18.86 ± 0.99	11.85 ± 2.34	29.72 ± 1.07
D22	66.09 ± 1.35 *	16.55 ± 1.04	17.36 ± 2.75	18.24 ± 1.37 * *
D29	59.21 ± 2.26 * *	28.41 ± 2.07	12.38 ± 1.39	9.11 ± 1.28 * *

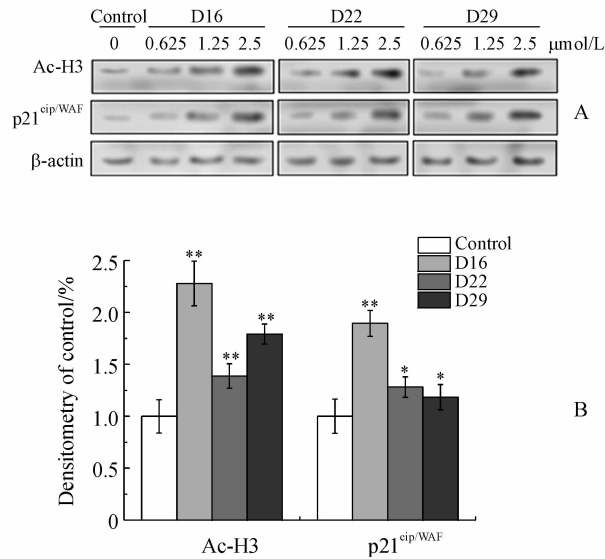
^a:Induction of cell block and apoptosis in HeLa cells by D16,D22,D29 treatment in different concentration as exhibited

* $P < 0.05$, * * $P < 0.05$ vs control group

2.4 Western blot 法检测 D16,D22,D29 对 HeLa 细胞中 Ac-H3,p21^{cip/WAF} 蛋白表达影响

按照文献[15]给药后弃去培养基,采用细胞刮片收集细胞,并提取蛋白。蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳,转至硝酸纤维素膜。加入抗体后采用 HRP 系统显色,记录结果并进行光密度值扫描分析,除以 β-actin 光密度值所得的比值,并进行统计学分析。

如图 3 显示,D16,D22,D29 能明显引起 HeLa 细胞中 Ac-H3 的表达,条带颜色随浓度增大而加深,提示这 3 个化合物均能上调 Ac-H3 的表达,提示 D16,D22,D29 能有效抑制 HDAC,从而上调 H3 的乙酰化,呈现出一定的剂量依赖性。同时,抑癌基因 p21^{cip/WAF} 的表达随 D16,D22,D29 浓度的增加,而呈现出明显的上调,呈现出一定的剂量依赖性,提示 D16,D22,D29 引起细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡的作用,与 p21^{cip/WAF} 的激活有一定的相关性。



A: Western blot results of the protein; B: Densitometry of the bands
Figure 3 Effects of D16, D22, D29 on acetylated-H3 (Ac-H3), p21^{cip/WAF} in HeLa cells

3 讨论

2010年Butler等^[16]报道了将咔啉环用于表面识别区的结构基团进行组蛋白去乙酰化酶抑制剂的设计,结果显示该类化合物对HDAC具有良好的抑制效果,同时还具有一定的HDAC亚型选择性。

本实验酶抑制活性测试结果显示,所合成的咔啉系列化合物D16、D22和D29对于HDACs和HDAC-1的抑制活性与SAHA相当或略低于SAHA,以D29为例,其对HDACs的 IC_{50} 达到63 nmol/L,对于HDAC-1的 IC_{50} 达到21 nmol/L。在细胞水平上,本研究发现D16、D22和D29对于以上多种肿瘤细胞的 IC_{50} 明显优于SAHA。

在对D16、D22和D29的抗肿瘤分子作用机制的研究中,流式细胞术结果显示,D16、D22和D29引起HeLa细胞细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡,呈现出一定的浓度依赖性。D16、D22和D29对HeLa细胞的中Ac-H3的影响的进一步研究结果显示,D16、D22和D29均能促进HeLa细胞中Ac-H3的表达,并呈现出一定的剂量依赖性。同时,D16、D22和D29 3个化合物还能增强重要的抑癌基因p21^{cip/WAF}的表达,其蛋白表达随化合物浓度的增加而上调,呈现出一定的剂量依赖性,提示D16、D22和D29引起细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡的作用,可能与p21^{cip/WAF}的激活有关。前期研究显示,D16(DWP0016)还能有效抑制神经胶质瘤细胞U251的增殖,诱导U251细胞周期阻滞和凋亡,同时上调U251细胞中p21的表达^[15],这些结果提示,D16、D22和D29具有一定的抗肿瘤潜力和开发前景。

研究结果发现,尽管取代基为丙基(D29)时,能获得较好的酶抑制活性,但浓度上升时,细胞出现G₂/M周期抑制,且其诱导凋亡的作用不强,而D22中引入了细胞毒性药物结构中常见的硝基结构,提示其可能对正常细胞会有一定的毒性。这些先导化合物的抗肿瘤活性仍需要进一步研究。综合考虑,将咔啉环作为链接区进行组蛋白去乙酰化酶抑制剂的设计合成具有一定的可行性。此骨架化合物能较好抑制HDAC和HDAC-1,有效抑制多种细胞增殖,并能阻滞HeLa细胞周期,诱导细胞凋亡,其作用机制与抑癌因子p21^{cip/WAF}的激活有关,具有一定的开发潜力和应用前景。

参考文献

- [1] Batty N, Malouf GG, Issa JPI. Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents [J]. *Cancer Lett*, 2009, **280** (2): 192–200.
- [2] Esteller M. Epigenetics in cancer [J]. *New Engl J Med*, 2008, **358** (11): 148–159.
- [3] Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6** (1): 38–51.
- [4] Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors [J]. *Cancer Lett*, 2009, **280** (2): 125–133.
- [5] Johnstone R, Ruefli A, Lowe S. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy [J]. *Cell*, 2002, **108** (2): 153–164.
- [6] Marks P, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: potential in cancer therapy [J]. *J Cell Biochem*, 2009, **107** (4): 600–608.
- [7] Balasubramanian S, Verner E, Buggy JJ. Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step [J]? *Cancer Lett*, 2009, **280** (2): 211–221.
- [8] Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases [J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, **70**: 81–120.
- [9] Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et al. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast [J]. *Breast Cancer Res*, 2005, **94** (1): 11–16.
- [10] Kim YK, Seo DW, Kang DW, et al. Involvement of HDAC1 and the PI3K/PKC signaling pathways in NF-kappa B activation by the HDAC inhibitor apicidin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **347** (4): 1088–1093.
- [11] Lucio-Eterovic A, Cortez M, Valera E, et al. Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hyporexpressed in glioblastomas [J]. *BMC Cancer*, 2008, **8** (1): 243–253.
- [12] Garcia-Manero G, Assouline S, Cortes J, et al. Phase I study of the oral isotype specific histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in leukemia [J]. *Blood*, 2008, **112** (4): 981–989.
- [13] Schrupp DS, Fischette MR, Nguyen DM, et al. Clinical and molecular responses in lung cancer patients receiving romidepsin [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, **14** (1): 188–198.
- [14] Whittaker SJ, Demierre MF, Kim EJ, et al. Final results from a multicenter, international, pivotal study of romidepsin in refractory cutaneous T-cell lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2010, **28** (29): 4485–4491.
- [15] Jin H, Liang L, Liu L, et al. Research on the block of cell cycle and apoptosis induction on glioma cell line U251 of a novel HDAC inhibitor named DWP0016 [J]. *Acta Neuropharmacol* (神经药理学报), 2011, **1** (1): 38–45.
- [16] Butler KV, Kalin J, Brochier C, et al. Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, **132** (31): 10842–10846.