

曲古菌素 A 影响 SCID 鼠人宫颈癌移植瘤生长的研究

李新春¹, 周彦杰², 周奕³, 曹味纯⁴

湖南省肿瘤医院, 湖南 长沙 410000

摘要:目的: 观察曲古菌素 A (Trichostatin A, TSA) 对 SCID 鼠人宫颈癌移植瘤生长的影响, 并观察药物干预后鼠移植瘤中 TR3 蛋白表达的变化。方法: 培养 Caski 细胞接种于 20 只 SCID 鼠右前肢腋下皮下, 1 周后将成瘤的 20 只 SCID 鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 甲组 (TSA 2mg/Kg), 乙组 (TSA 1mg/Kg), 丙组 (TSA 0.5mg/Kg), 丁组 (对照组)。连续 32 天腹腔内给药, 1 次/天, 观察各组 SCID 鼠宫颈癌移植瘤的生长情况, 计算抑瘤率。免疫组化分析检测各组移植瘤中 TR3 蛋白的表达情况。结果: 各治疗组小鼠移植瘤的生长曲线较对照组受到明显抑制, 瘤体重量及体积较对照组明显下降($P<0.05$)。2mg/kgTSA 浓度组小鼠移植瘤中 TR3 表达呈现强阳性, 1mg/kgTSA 浓度组小鼠移植瘤中 TR3 表达呈现中阳性, 0.5mg/kgTSA 浓度组小鼠移植瘤中 TR3 表达呈现弱阳性, 而在对照组细胞中 TR3 的表达为阴性。结论: TSA 抑制小鼠移植瘤的生长; TSA 影响了小鼠移植瘤细胞 TR3 蛋白的表达。

关键词:曲古菌素 A; 宫颈癌; SCID 鼠; TR3

Inhibitory effect of TSA on growth of grafted human cervical carcinoma in SCID mice

LI Xin-chun, ZHOU Yan-jie, ZHOU Yi, CAO Wei-chun

Hunan Cancer Hospital, Changsha, Hunan 410000, China

Abstract:
Objective: To establish a model of cervical cancer in SCID mice, explore the inhibition effect of TSA on growth of grafted tumor, and the expression of TR3. **Methods:** Caski cells were inoculated hypodermically into the forelimbs of 20 SCID mice. After 1 week, TSA was injected into the abdominal cavity of 20 SCID mice, which were randomized into 4 groups (group A 2mg/kgTSA, group B 1mg/kgTSA, group C 0.5mg/kgTSA, control group 0 mg/kgTSA). 32 days later, observe the growth of xenografts tumor in SCID mice in each group, the inhibition rate was calculated. Immunohistochemistry was used to detect the expression of TR3 protein in each group tumor. **Results:** Tumor growth curve of each treatment group, weight and volume, compared with the control group was significantly inhibited ($p<0.05$). The expression of TR3 protein in group A showed strong positive, positive in group B, and a weak positive in group C. The TR3 expression in control group was negative. **Conclusion:** The tumor growth in mice is inhibited by TSA, and TSA affect TR3 expression in mice transplanted tumor cells.

Key words: TSA, TR3, Casiki cells

表观遗传修饰(epigenetic modification) 主要涉及 DNA 甲基化、组蛋白翻译后修饰(甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、糖基化等)、基因印记、染色质重塑、SiRNA 和 MicroRNA 等几个方面, 在肿瘤发生中起着重要的作用。研究证实组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDACs) 异常导致的

作者简介: 李新春, 女, 1974 年, 医学硕士, 副主任医师, 擅长妇科肿瘤的规范化诊治。

组蛋白乙酰化状态失衡与肿瘤的发生和发展有密切关系，其可以作用于组蛋白及转录因子抑制正常细胞的分化、凋亡及衰老过程，并且在多种肿瘤细胞中均发现 HDAC 表达增加【1】。曲古菌素

A (Trichostatin A, TSA) 是一种广谱 HDACs 抑制剂，研究显示它可以抑制多种肿瘤组织的生长【2】。本研究通过 TSA 作用于人宫颈癌 Caski 细胞系 SCID 鼠移植瘤观察其生长情况，研究其可能抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞株 CaSki 由湖南省肿瘤研究所提供。试剂：TSA (美国 Sigma 公司)。兔抗鼠 TR3 多克隆抗体 (美国 santa cruz 公司)。PV-9001 兔超敏二步法检测试剂盒 (北京中杉金桥生物有限公司)。浓缩型 DAB 试剂盒 (北京中杉金桥生物有限公司)。RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司)。

SPF 级 SCID 鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 (实验动物生产许可证：SCXK (沪) 2007-0005) 于湘雅二医院动物实验中心屏障环境中饲养，实验动物使用许可证号为 SYXK (湘) 2011-0001，实验期间环境温度为 22℃~24℃，湿度 52%~58%。

1.2 细胞培养

常规方法复苏冻存于液氮罐中的宫颈癌 Caski 细胞，接种于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液，37℃ 5%CO₂ 饱和湿度条件下培养。观察细胞生长情况，待细胞长满约 90%以上时，消化传代。并选用对数生长期细胞进行实验。

1.3 动物模型及分组

20 只 SCID 鼠 (4-6 周龄) 预先在室内常规饲养 3 天，取对数生长期的人宫颈癌 Caski 细胞，配置成细胞数 $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ 的单细胞悬液，皮下注射 0.2ml 细胞悬液于 SCID 鼠右前肢腋下皮下，SCID 鼠接种 1 周后，瘤体直径平均长至约 100mm³ 大小，逐个称取小鼠体重，用随机数字表法将其分成 4 组，每组 5 只予腹腔注射用药，每天 1 次。甲组 (TSA 2mg/Kg) 0.2ml，乙组 (TSA 1mg/Kg) 0.2ml，丙组 (TSA 0.5mg/Kg) 0.2ml，丁组 (对照组) 生理盐水 0.2ml。

1.4 生物学特征观察

每天观察评估 SCID 鼠一般情况，包括 SCID 鼠毛色、食欲、精神状态、反应、活动力、皮下接种区域外观、触感及体质量等。每 2 天测量 1 次肿瘤体积、动物体重、饮食量、饮水量，绘制肿瘤生长曲线。移植瘤小鼠经治疗后 32 天颈椎脱臼处死 (甲组，乙组，丙组，丁组)，测量肿瘤径线、重量，瘤体重量抑制率 = $(1 - \text{治疗组瘤体重量} / \text{对照组瘤体重量}) \times 100\%$ ，瘤体积抑制率 = $(1 - \text{治疗组瘤体积} / \text{对照组瘤体积}) \times 100\%$ 。收集肿瘤组织，观察肿瘤形态、质地、活动度及肝、脾、肾、大网膜、子宫附件等脏器转移情况，测量肿瘤质量、长短径，计算抑瘤率。肿瘤组织置入 10%中性福尔马林中固定，石蜡包埋，常规切片和 HE 染色，镜检结果。

1.5 免疫组织化学检测 TR3 蛋白表达

颈椎脱臼处死所有小鼠后，完整剥离瘤体，10%中性福尔马林中固定，石蜡包埋，常规切片，采用 PV 二步法检测移植瘤组织中 TR3 蛋白的表达。阳性染色为细胞核及细胞浆中出现棕褐色颗粒。综合分析整张切片的阳性细胞率及染色强度，将免疫组化染色结果分为 4 级：肿瘤细胞胞浆及胞核呈现棕褐色颗粒视为阳性表达，每张切片中阳性细胞数 $\geq 75\%$ ，染色棕褐，可见到弥漫性颗粒者定为强阳性：“+++”为 3 分；阳性细胞数 50%–75%，染色棕黄，可见到颗粒者定为中度阳性：“++”为 2 分；阳性细胞数 25%–50%，染色淡，可见稀疏颗粒者定为弱阳性：“+”为 1 分；阳性细胞数 $< 25\%$ ，染色较淡，未见明显颗粒者定为阴性“-”为 0 分。对照组采用 PBS 代替一抗。

1.6 统计学方法

统计学分析采用 SPSS17.0 软件进行。所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。肿瘤指标方差齐时采用单因素方差分析，两组间比较行 LSD-t 检验，方差不齐时采用秩和检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 移植瘤 SCID 鼠一般状况

接种 7 天后 20 只鼠全部成瘤，成瘤率 100%。丁组小鼠活动逐渐减少，毛色变暗，反应欠灵敏。乙组、丙组小鼠反应差别不大，进食较丁组明显为多。甲组反应最灵敏，进食、活动与治疗前差别轻微。用药过程中未见明显不良反应。

2.2 瘤体重量、体积及瘤体抑瘤率

随着治疗的进行，各组肿瘤体积均逐渐增大，其中对照组肿瘤体积增长最为迅速。其余各组肿瘤体积增长速度逐渐减慢，以甲组最为明显，各组肿瘤体积增长曲线见图 1。治疗结束后各组小鼠瘤体重量及瘤体重抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$)。两两比较显示：治疗组肿瘤平均重量均显著小于对照组 ($P < 0.05$)，但治疗组间两两比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗结束后各组肿瘤体积及瘤体积抑制率差异有统计学意义($P < 0.05$)。两两比较示：治疗组肿瘤平均体积均显著小于对照组 ($P < 0.05$)，但治疗组间两两比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

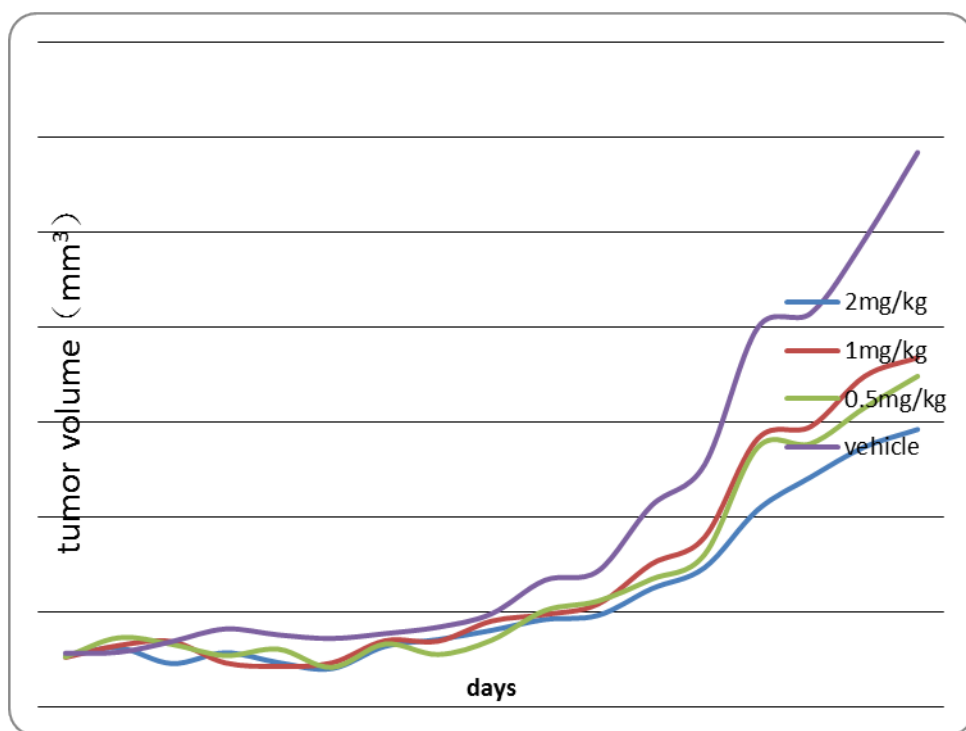


图 1 SCID 鼠移植瘤体积增长曲线

表 1 四组小鼠移植瘤体积及抑瘤率比较

分组	n	瘤体重量 (mg, $\bar{x} \pm s$)	瘤体重抑制率 (%)	瘤体体积 (mm ³ g, $\bar{x} \pm s$)	瘤体体积抑制率 (%)
甲组	5	856.66 \pm 249.35*	60.6%*	576.43 \pm 172.69	52.3%*
乙组	5	1073.62 \pm 493.58*	50.7%*	721.34 \pm 255.54	40.3%*
丙组	5	1021.37 \pm 217.23*	53.1%*	691.79 \pm 154.17	42.7%*
丁组	5	2175.61 \pm 455.26	0	1207.96 \pm 266.8	0

注: *与丁组比较, $P < 0.05$

2.3 SCID 鼠移植瘤中 TR3 蛋白表达

用免疫组化二步法检测 TR3 蛋白在小鼠移植瘤中的表达: 其阳性染色颗粒主要定位于肿瘤细胞胞核及胞浆。周围间质亦见少量阳性染色。对照组 (丁组) 肿瘤细胞大部分不着色, 仅少部分间质非特异性染色, 染色强度为阴性; 乙组肿瘤细胞少部分染色为棕褐色, 染色强度为弱阳性; 丁组肿瘤细胞部分染色为棕褐色, 染色强度为中阳性; 而甲组肿瘤细胞大部分染色为棕褐色, 染色强度为强阳。治疗组 TR3 蛋白的表达明显高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 2, 图 2-5。

表 2 四组小鼠移植瘤 TR3 染色指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	样本	染色指数
甲组	5	$2.8 \pm 0.45^*$
乙组	5	$2.4 \pm 0.55^*$
丙组	5	$1.6 \pm 0.89^*$
丁组	5	0.2 ± 0.45

注: *与丁组比较, $P < 0.05$

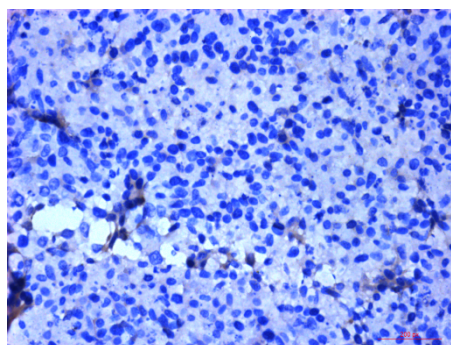


图 2 TR3 蛋白在丁组 (对照组) 中的表达情况 (SP $\times 200$)

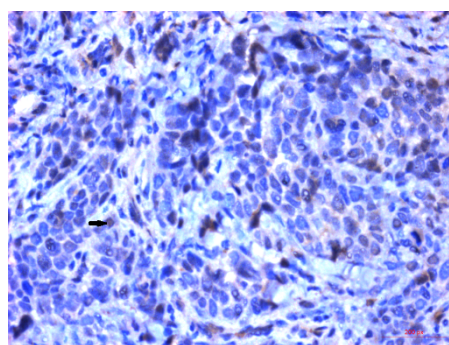


图 2 TR3 蛋白在丙组 (0.5mg/kgTSA) 中的表达情况 (SP $\times 200$)

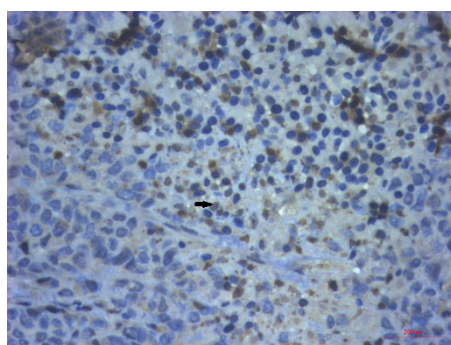


图 2 TR3 蛋白在乙组 (1mg/kgTSA) 中的表达情况 (SP $\times 200$)

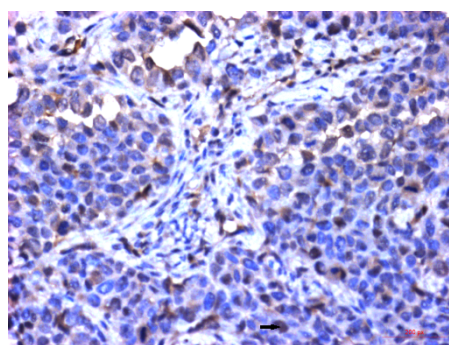


图 2 TR3 蛋白在甲组 (2mg/kgTSA) 中的表达情况 (SP $\times 200$)

3 讨论

宫颈癌是最常见的女性生殖道恶性肿瘤之一,在我国,由于人口基数大,宫颈癌的患病率占全球总患病率的 1/3,且病例具有年轻化的趋势。常规的宫颈癌治疗手段包括手术、放疗以及化疗,但手术的局限性、放化疗的耐药及不良反应等极大的限制了宫颈癌的治疗疗效。近年来小分子化合物抑制肿瘤的研究已成为热点,组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂是相对新型的抗癌药物,在表观和非表观调节领域有重要作用,包括选择性诱导肿瘤细胞死亡、凋亡以及细胞周期停滞等,并且有研究证实,组蛋白乙酰化的失衡与宫颈癌的发生发展密切相关【3】。

目前已经发现的 HDACs 主要分为四类: I 类包括 HDAC1、HDAC2、HDAC3 和 HDAC8,只存在于细胞核中; II 类包括 IIa 类 (HDAC4、HDAC5、HDAC7、HDAC9) 和 IIb 类 (HDAC6、HDAC10),在信号转导过程中穿梭于细胞核与细胞质之间; 第四类只有 HDAC11 一种,其包含有 I 类和 II 类 HDACs 的

催化位点；III 类与前几类有很大的区别，其活性不是依赖 Zn^{2+} ，而是依赖辅酶 I (NAD)，与酵母的 Sir2 同源，至少有 7 种亚型，它不能被 I、II 类 HDAC 抑制剂所抑制【4-5】。TSA 属于异羟氨酸，一种广谱的 HDAC 抑制剂，能抑制多种 HDACs 蛋白活性，具有抑制细胞增殖及诱导凋亡的能力。本实验中使用 TSA 作用于 CaSki 细胞荷瘤小鼠，观察各组小鼠移植瘤的生长情况，通过描绘 CaSki 宫颈癌移植瘤细胞体积增长曲线描述各组移植瘤的变化情况。甲组（2mg/mgTSA）对宫颈癌肿瘤的抑制最明显：生长曲线最低、抑瘤率最高。其次，乙组（1mg/mgTSA）、丙组（0.5mg/mgTSA）对宫颈癌的治疗作用效果比较好，与对照组比较也较明显抑制了肿瘤的生长。而对照组肿瘤体积最大，肿瘤呈持续生长状态；各组瘤体体积及体积抑瘤率有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。并且治疗后瘤体体重对比也可以明显看出，治疗组瘤体体重小于对照组（ $P < 0.05$ ），由此可见，TSA 抑制了荷瘤小鼠移植瘤的生长。但不同浓度治疗组间无显著差异（ $P > 0.05$ ），可能与各组小鼠标本量较少或浓度梯度不准确有关。

凋亡是多细胞生物保证个体正常生长发育和细胞新陈代谢、维持机体稳定及体内平衡的中药生物学功能之一，其功能异常与许多疾病的发生有关。被不同信号途径激活的各种凋亡终末因子从细胞浆或细胞核移位至线粒体膜，引起线粒体膜通透性增加并释放一些凋亡前提分子，如 caspases 酶前体、细胞色素 c 等，从而导致细胞凋亡的发生。TR3 蛋白是一种即刻早期反应蛋白，在细胞的生长、分化和凋亡等生物学过程中发挥重要的调节作用【6】。其广泛表达于肾上腺、甲状腺、垂体、肝脏、睾丸、卵巢、胸腺、肌肉、肺脏、前列腺及神经系统【7】。研究显示在小鼠胸腺细胞发育过程中，未成熟 T 细胞的阴性选择中有 TR3 蛋白的参与，并发现在 T 细胞诱导的细胞凋亡中 TR3 出现明显的过度表达【8】。在肿瘤细胞中，TR3 通过改变 Bcl-2 的表型作用于线粒体，通过诱导细胞色素 c 释放入细胞质，继而激活 Caspases，最终导致细胞凋亡【9】。本实验通过免疫组化检测小鼠肿瘤组织中 TR3 的表达，结果显示 TR3 主要在细胞核中表达，细胞浆中也有部分表达。对照组（丁组）肿瘤细胞大部分不着色，仅少部分间质非特异性染色，染色强度为阴性；乙组肿瘤细胞少部分染色为棕褐色，染色强度为弱阳性；丁组肿瘤细胞部分染色为棕褐色，染色强度为中阳性；而甲组肿瘤细胞大部分染色为棕褐色，染色强度为强阳。因而，TSA 的抗癌机制可能与 TR3 蛋白所介导的细胞凋亡途径有关。

综上所述，TSA 可抑制 SCID 鼠人宫颈癌移植瘤的生长，其作用机制可能涉及 TR3 蛋白表达的变化。TSA 有望成为宫颈癌有效的靶向药物，但仍需要更多机制研究及临床前试验的深入探索。

参考文献

- 【1】Zheng L, Annab LA, Afshari CA, et al. BRCA1 mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (17):9587-92.
- 【2】Vanhaecke T, Papeleu P, Elaut G, Rogiers V. Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. Curr Med Chem. 2004 Jun;11(12):1629-43.
- 【3】Dueñas-Conzalez A, Lizano M, Candelaria M, et al. Epigenetics of cervical cancer. an overview and therapeutic perspectives [J]. Mol Cancer, 2005, 25(4):38.
- 【4】MacDonald JL, Roskams AJ. Epigenetic regulation of nervous system development by DNA methylation and histone deacetylation [J]. P Neurobiol, 2009, 88(3):170-83.
- 【5】Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic

analysis [J]. J Mol Biol, 2004, 338(1): 17–31.

【6】 Martinez-Gonzalez J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells [J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(3): 609–18.

【7】 Crawford PA, Sadovsky Y, Woodson K, et al. Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(8): 4331–16.

【8】 Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, et al. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene *nur77* [J]. Nature, 1994, 367(6460): 281–4.

【9】 Lin B, Kolluri SK, Lin F, et al. Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3 [J]. Cell, 2004, 116(4): 527–40.