

组蛋白去乙酰化酶抑制剂协同紫杉醇对 人肺癌细胞株抑制作用及机制

张东¹, 刘长庭¹, 于晓姝², 刘岩¹

Synergistic cytotoxicity effect of histone deacetylase inhibitor combined with paclitaxel on lung cancer cell lines and its mechanism

Dong Zhang,¹ Chang-Ting Liu,¹ Xiao-Dan Yu² and Yan Liu¹

1. 解放军总医院南楼
呼吸科,
北京 100853

2. 解放军军事医学科学院
基础所,
北京 100850

1. Geriatric Respiratory
Department,
PLA General Hospital,
Beijing 100853,
P. R. China

2. Institute of Basic Medical
Sciences,
Academy of Military Medical
Science, Beijing 100850,
P. R. China

通讯作者: 张东

Correspondence to: Dong Zhang

Tel.: 86.013521291696

Email: zhangd1117@yahoo.com

基金项目: 军队“十一五”面上课题 B 类

Grant: Army “11th Five-Year
Plan” Surface Project Class B

收稿日期: 2009-06-10

修回日期: 2009-08-07

[Abstract] **Background and Objective:** Histone deacetylase (HDAC) inhibitors can inhibit cell signal network function through decreasing expression of multiple genes and proteins, thus affect cell proliferation, survival and chemosensitivity. HDAC inhibitors combined with paclitaxel may enhance the inhibitory effect of drugs on lung cancer cells. This study was to observe the synergistic anti-proliferative effect of HDAC inhibitor trichostatin A (TSA) combined with paclitaxel on lung cancer cell lines H322 and H1299, and to investigate its mechanism. **Methods:** H322 and H1299 cells were divided into control group, paclitaxel (TAX) group, TSA group, and combination group (TF group, TSA followed by paclitaxel). Cell proliferation was determined by MTT assay. Cell cycle and apoptosis were determined by flow cytometry. The protein expression levels of survivin, ERK, and PARP were determined by Western blot analysis. **Results:** When combined with TSA, the 50% inhibition concentration (IC_{50}) of paclitaxel decreased from (48.07 ± 26.12) nmol/L to (6.34 ± 5.72) nmol/L in H322 cells and from (110.6 ± 38.7) nmol/L to (63.7 ± 11.8) nmol/L in H1299 cells, with significant differences ($P < 0.05$). Apoptosis rate of H322 cells was higher in the TF group than in the TAX group ($P < 0.05$). There were more necrosis cells in the TF group of H1299 cell line than in the other groups. pERK was up-regulated in the TAX group of H322 cell line. Expression of Survivin was up-regulated in the TAX group of two cells. Expressions of Survivin and pERK were down-regulated in the TSA and TF groups of two cell lines. Cleaved PARP was detected in the TAX and the TF groups of H322 cells, and its expression was significantly higher in the TF group than in the TAX group. Cleaved PARP was not detected in each group of H1299 cells. **Conclusions:** TSA combined with paclitaxel has a synergistic cytotoxicity effect on lung cancer cell lines H322 and H1299 when the cells were treated with TSA followed by paclitaxel. The mechanism may be that TSA down-regulates the survivin high-expression induced by paclitaxel, and blocks pERK protein expression.

Key words: lung cancer, histone deacetylase, trichostatin A, paclitaxel, apoptosis, ERK

【摘要】 背景与目的: 组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂通过抑制多种基因或蛋白介导的信号转导网络的功能, 影响细胞增殖及对化疗药物的敏感性。HDAC 抑制剂可能会提高紫杉醇对肺癌细胞的抑制作用。本研究评价 HDAC 抑制剂曲古抑菌素 A(trichostatin A, TSA)协同紫杉醇抑制肺癌细胞 H322 及 H1299 的作用及机制。方法: 将 H322 和 H1299 细胞分别分成 4 组: (1) 对照组; (2) 紫杉醇组(TAX); (3) TSA 组; (4) 以 TSA 预先作用 12 h 后, 再使用紫

杉醇的联合用药组(TF)。分别以 MTT 法、流式细胞术检测细胞增殖情况以及细胞周期、细胞凋亡等指标的变化,荧光显微镜观察细胞核形态的改变,Western blot 检测 Survivin、PARP 蛋白及细胞外信号调节激酶(ERK)的表达。结果:TSA 明显增强了紫杉醇对两种肺癌细胞的抑制率。紫杉醇作用 96 h 对 H322 细胞的 IC_{50} 由 (48.07 ± 26.12) nmol/L 下降至 (6.34 ± 5.72) nmol/L,对 H1299 细胞的 IC_{50} 由 (110.6 ± 38.7) nmol/L 下降至 (63.7 ± 11.8) nmol/L,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。TF 组 H322 细胞凋亡率较 TAX 组明显增加($P < 0.05$); 各组 H1299 细胞出现少量凋亡细胞,TF 组的死亡细胞明显多于其他组。TAX 上调 H322 细胞中 pERK 的表达,TSA 及 TF 减低两种细胞中 pERK 表达;TAX 明显增加 Survivin 的表达,TSA 及 TF 下调了 Survivin 的表达。TAX 组和 TF 组 H322 细胞中均检测到剪切 PARP 蛋白,TF 组较 TAX 组剪切 PARP 蛋白明显增加,而 H1299 细胞各组均未检测到剪切 PARP 蛋白。结论:HDAC 抑制剂 TSA 联合紫杉醇可以协同抑制 H322 及 H1299 细胞增殖,促进 H322 细胞凋亡和 H1299 细胞死亡。协同机制可能与通过下调肺癌细胞由紫杉醇诱发的 Survivin 高表达和阻断 ERK 通路的激活有关。

关键词:肺癌;组蛋白去乙酰化酶;曲古抑菌素 A;紫杉醇;细胞凋亡;细胞外信号通路激酶

中图分类号:R73-3 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2009)12-1270-07

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂是一类新型的、对多种肿瘤具有抑制功能的制剂,通过抑制多种基因或蛋白介导的信号转导网络的功能,影响细胞的增殖及对化疗药物的敏感性。HDAC 抑制剂的诸多功能使其联合其他治疗方法成为新的治疗思路。我们检测 HDAC 抑制剂 TSA 联合紫杉醇对肺癌细胞的协同抑制作用,期望为临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌细胞株 H322、H1299 由军事医学科学院惠赠。四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)均为 Sigma 公司产品;兔抗人总 ERK 多克隆抗体、鼠抗人磷酸化 ERK(pERK)多克隆抗体、鼠抗人 PARP 单克隆抗体、鼠抗人 β -actin 单克隆抗体、鼠抗人 Survivin 单克隆抗体为美国 Cell Signaling 公司产品;BCA 蛋白测定试剂盒为美国 Pierce 公司产品;紫杉醇为美国 Sigma 公司产品;TSA 为美国 CalBiochem 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H322、H1299 细胞常规培养于

高糖 DMEM 完全培养液中(含 10%胎牛血清,100 u/mL 青霉素,100 u/mL 链霉素),经 0.25%胰蛋白酶溶液消化传代,在 37℃、饱和湿度、含 5% CO_2 的培养箱中进行培养。

1.2.2 MTT 实验 取对数生长期的细胞,以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板中,培养过夜后将两种细胞分为紫杉醇 96 h 组(TAX)、TSA 12 h 组(TSA)和 TSA 作用 12 h 再加紫杉醇 84 h 组(TF),12 h 时换培养液。联合用药时 TSA 浓度为 300 nmol/L,紫杉醇浓度梯度为 0.001、0.01、0.1、1、10、100、1000 nmol/L;变换用药时,以吸管吸出原培养液,PBS 缓冲液 200 μ L 洗涤一次,再加入相应浓度的药物。TSA 浓度梯度为 18.75、37.5、75、150、300、600、1 200 nmol/L;12 h 时换为空白培养液。每组设 3 个复孔,同时设正常和空白对照组。置 96 孔板于培养箱中共培养 96 h。按常规方法依次加入 MTT 溶液、裂解液,振荡后测吸光度值(A 值)。并按下式计算细胞存活率:存活率=(处理组 A 值/阴性对照组 A 值) $\times 100\%$ 。采用曲线回归模型拟合其量效关系,得到各时段 TSA 作用的半数抑制浓度(IC_{50})。实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞仪分析细胞周期及检测凋亡率 取对数生长期的细胞,以 1×10^4 /孔接种于 6 孔板中,当细胞生长至 60%密度时,分为正常对照组、紫杉醇 24 h 组(TAX)、TSA 12 h 组(TSA)、TSA 作用 12 h 再加紫杉醇 24 h 组(TF)4 组。12 h 时换培养液。TSA 用药浓度为 300 nmol/L,紫杉醇用药浓度为 10 nmol/L。按分组时间到期时分别用 0.25%胰蛋白酶溶液消化收集细胞,1 000 r/min 离心 10 min,PBS 洗 2 次,重悬细胞于 0.6 mL 的 PBS 液(含 1%胎牛血清),加入 1.4 mL 冷乙醇,混匀固定,-20℃保存。检测当天离心,PBS 液洗 2 次,重悬细胞于 0.5 mL 的 PBS,加入 5 μ L RNase,37℃水浴 30 min,再加 1 mg/mL 碘化丙啶(PI)50 μ L,避光,室温 20 min,上机检测。实验重复 3 次。

1.2.4 荧光显微镜观察细胞核形态变化 取对数生长期细胞接种于 6 孔培养板,每孔加入 1×10^5 个细胞,培养液 2 mL,按 1.2.3 的分组,分组时间到期后,按 1:1 000 的终浓度加入 Hoechst33342,于 37℃、饱和湿度、含 5% CO_2 的培养箱中反应 20 min,荧光显微镜下紫外光激发 Hoechst33342 呈蓝色,20 倍显微镜下观察拍照,同时摄取普通光镜下照片。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达 总细胞外信号调节激酶及其磷酸化蛋白(total and phosphorylation

extracellular signal regulated kinase, tERK and pERK)、人多聚 ADP 核糖聚合酶(human Poly ADP ribose polymerase,PARP)以及 Survivin 蛋白的表达。

按 1.2.3 的分组,分组时间到期后,用三去污试剂提取总蛋白,用 Bradford 方法测定蛋白质浓度。等量蛋白质分别采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离,然后转至 PVDF 膜上,5%牛奶室温下摇动封闭后加入一抗,4℃过夜,室温下洗膜后加入二抗,用 ECL PLUS (Amersham)进行发光显影。

1.3 统计学方法

应用 SPSS11.0 统计软件处理数据,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)作各组间差异的显著性检验,并对部分指标进行相关性分析,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。应用中位效应分析法(median effect analysis)的联合指数(combination index, CI)法来判断^[1]: CI<1 表示协同,CI>1 提示拮抗,CI=1 表示附加作用。如果曲线上多于两点以上 CI<1 表示协同,提示两种药物的作用是协同。

2 结 果

2.1 HDAC 抑制剂 TSA 对体外培养细胞的增殖抑制作用

TSA 与紫杉醇联合应用后,从抑制曲线上看,TSA 明显提高了紫杉醇对 H322 和 H1299 细胞的抑制水平,紫杉醇对 H322 细胞的 IC₅₀ 由 (48.07±26.12) nmol/L 下降至 (6.34±5.72) nmol/L,差异有统计学意义(P<0.05)。紫杉醇对 H1299 细胞的 IC₅₀ 由 (110.6±38.7) nmol/L 下降至 (63.7±11.8) nmol/L,差异有统计学意义(P<0.05)。根据 CI 方法分析,两种细胞 TF 组抑制曲线的各点 CI 值均<1,提示 TSA 联合应用紫杉醇达到了协同效应。两组细胞的生长曲线见图 1,2。

2.2 TSA 对 H322、H1299 细胞周期及凋亡的影响

TSA 作用 H322 及 H1299 细胞 12 h 后,与对照组相比细胞周期无明显变化。紫杉醇作用 24 h 后,G₂/M 期 H322 细胞较对照细胞显著增加(P<0.05),同时伴有细胞凋亡;TF 组较对照组及 TSA 组 G₀/G₁ 期细胞减少,而与 TAX 组相比则是明显 G₀/G₁ 期细胞阻滞,细胞凋亡数较 TAX 组明显增加(P<0.05),见表 1 和图 3。TAX 及 TF 组中 G₀/G₁ 期 H1299 细胞较对照细胞明显增加(P<0.05),G₂/M 期及 S 期细胞较对照细胞明显减少(P<0.05),4 组细胞凋亡率均较低,见表 2 及图 4。

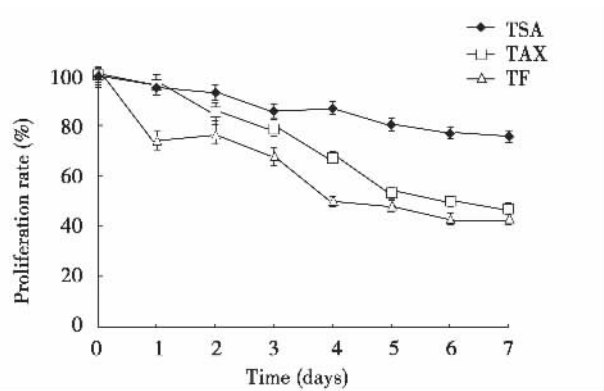


图 1 TSA 作用 12 h、TAX 作用 96 h 及联合作用(TSA 12 h, TAX 84 h)后 H322 细胞增殖情况

Figure 1 Proliferation curves of H322 cells treated with TSA at 12 h, TAX at 96 h, and combined action(TSA 12 h then TAX 84 h)

TSA, trichostatin A; TAX, paclitaxel; TF, TSA followed by TAX.

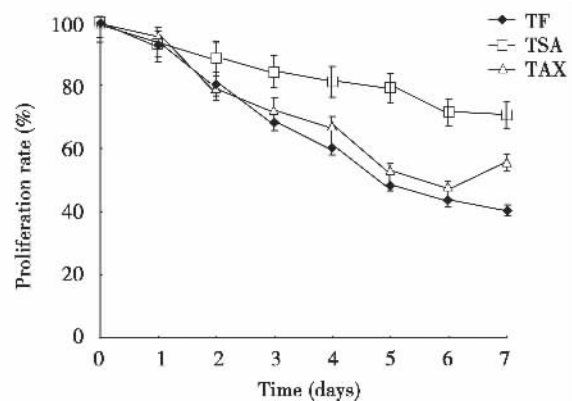


图 2 TSA 作用 12 h、TAX 作用 96 h 及联合作用(TSA 12 h, TAX 84 h)后 H1299 细胞增殖情况

Figure 2 Proliferation curve of H1299 cells treated with TSA at 12 h, TAX at 96 h, and combined action(TSA 12 h then TAX 84 h)

Abbreviations as in Figure 1.

表 1 各组 H322 细胞周期及凋亡的影响

Table 1 Cell cycle and apoptosis changes of H322 cells in each group (% $\bar{x}\pm s$)

Group	Cell proportion			Apoptosis rate
	G ₀ /G ₁ phase	S phase	G ₂ /M phase	
Control	55.80±4.43	31.25±2.06	12.95±2.17	0.91±0.76
TSA	53.47±4.81	31.64±2.85	14.89±2.23	1.47±0.54
TAX	11.75±1.12	29.84±2.36	58.41±5.37	12.33±1.78
TF	42.70±3.96	38.49±3.35	18.81±2.14	30.00±4.56 ^a

^aApoptosis rate of H322 cells is significantly higher in combined group (TF) than in other groups (P<0.05).

TSA, trichostatin A, TAX, paclitaxel; TF, TSA followed by TAX.

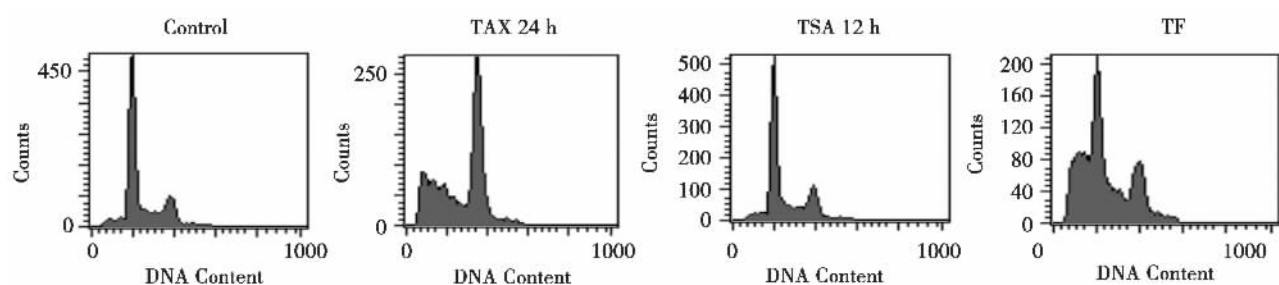


图3 流式细胞仪检测各组 H322 细胞的凋亡情况

Figure 3 Flow cytometric analysis of each group of H322 cells

表 2 各组 H1299 细胞周期及凋亡的影响

Table 2 Cell cycle and apoptosis changes of H1299 cells in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

Group	Cell proportion			Apoptosis rate
	G ₀ /G ₁ phase	S phase	G ₂ /M phase	
Control	53.25±4.56	30.46±3.14	16.29±2.12	0.03±0.05
TSA	58.51±5.54	28.23±3.07	13.26±1.81	0.02±0.05
TAX	69.92±5.63 ^a	18.80±2.32 ^b	11.29±2.09 ^b	0.33±0.28
TF	78.82±6.38 ^a	12.26±1.84 ^b	8.91±1.17 ^b	1.47±0.89

^a $P<0.05$, comparing with control group with significant increase; ^b $P<0.05$, comparing with control group with significant decrease.

Abbreviations as in Table 1.

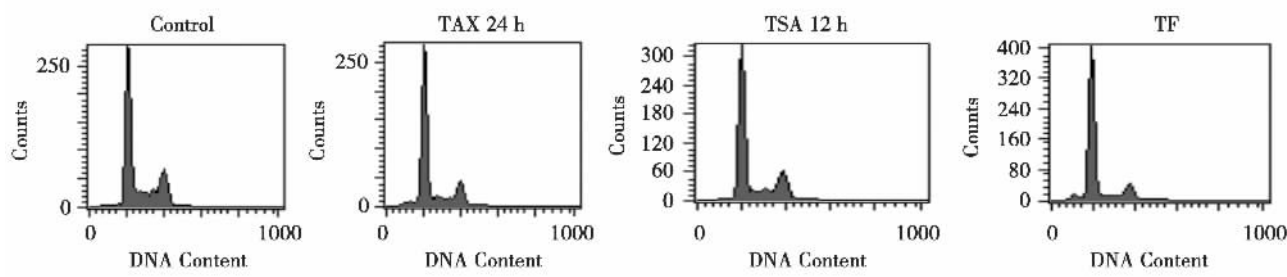


图4 流式细胞仪检测各组 H1299 细胞凋亡情况

Figure 4 Flow cytometric analysis of each group of H1299 cells

pERK/tERK 为 1.26, TAX 组 pERK/tERK 为 1.42, 提示 TAX 应用后 H322 pERK 蛋白表达略有增加; H1299 正常组 pERK/tERK 为 0.45, TAX 组 pERK/tERK 为 0.23, pERK 蛋白表达下降。TSA 的单独应用下调了 H322、H1299 细胞中 pERK 蛋白的表达水平。TF 组明显抑制 pERK 蛋白的表达, H322 及 H1299 细胞均较 TAX 组下降。见图 6。

TAX 作用 24 h 后 H322 及 H1299 细胞中

对照组 H322 和 H1299 细胞核为圆形、椭圆形, 少量呈半月形; TSA 组、紫杉醇组及联合应用组 H1299 细胞核多呈偏心性改变, 细胞核呈马蹄铁样改变, 伴有多核、空泡变性等死亡象, 只有很少的凋亡小体。TF 组较其他组有更多的细胞死亡。在 Hoechst33342 染色下, TAX 及 TF 组可见较多 H322 细胞破碎及凋亡小体, TSA 组有少量凋亡小体。见图 5。

2.3 TSA 对 ERK 及 Survivin 蛋白表达的影响

将正常组和 TAX 组的 pERK 表达水平分别与相应组的 tERK 进行比较, H322 正常组

Survivin 蛋白的表达均增加, 分别是正常对照组的 1.71 倍、1.61 倍; TSA 下调 Survivin 蛋白的表达, 分别是对照组的 78%、46%。TSA 联合 TAX 应用明显下调了由 TAX 引起的 Survivin 蛋白的高表达, Survivin 蛋白表达水平分别是 TAX 组的 51%、33%。见图 6。

TAX 和 TF 组均检测到 PARP 蛋白表达, TF 组较 TAX 组 PARP 蛋白明显增强; 而 H1299 各组均未检测到剪切 PARP 蛋白。见图 6。

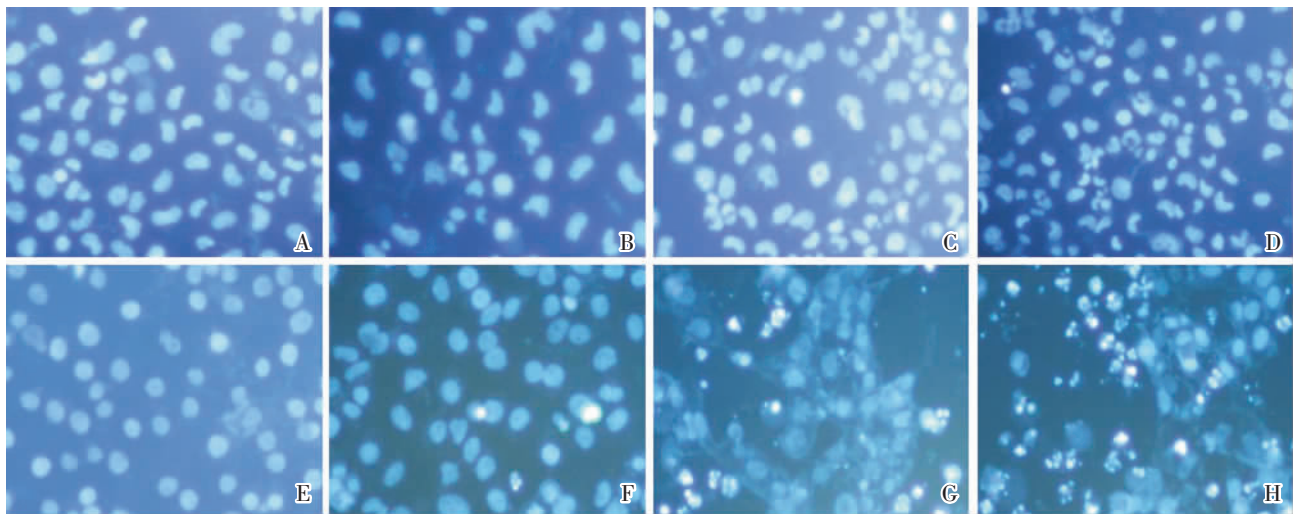


图 5 各组细胞核形态的变化 (Hoechst 33342×20)

Figure 5 Nuclear morphology of each group of cells stained with Hoechst 33342(×20)

- A, H1299 cells control (H1299 cells nuclei are round and oval, and a small number of them half-moon);
- B, H1299 cells treated with TSA for 12 h (H1299 cell nuclei show horseshoe-like changes accompanied by multi-core and death of the phenomenon, such as vacuolar degeneration);
- C, H1299 cells treated with TAX for 24 h (H1299 cell nuclei show horseshoe-like changes accompanied by multi-core and death of the phenomenon, such as vacuolar degeneration, a small number of apoptotic bodies);
- D, H1299 cells treated with TF (H1299 cell nuclei show horseshoe-like changes; accompanied by multi-core and death of the phenomenon, such as vacuolar degeneration, a small number of apoptotic bodies);
- E, H322 cells control (H322 cells show round nuclei, including a small number of oval-shaped nuclei);
- F, H322 cells treated with TSA for 12 h (a small amount of H322 cell nuclei fragmentation and a small number of apoptotic bodies are shown);
- G, H322 cells treated with TAX for 24 h (more H322 cell nuclei fragmentation, dissolution, and more apoptotic bodies are shown);
- H, H322 cells treated with TF (more H322 cell nuclei fragmentation, dissolution, and more apoptotic bodies are shown).

3 讨论

化疗是治疗肿瘤的主要方法,但由于耐药率的上升,化疗的有效率一直不尽如人意。近年的研究发现,HDAC抑制剂可以通过抑制信号转导网络,影响细胞增殖及细胞对化疗药物的敏感性^[2]。HDAC抑制剂联合化疗可能会减少化疗的耐药率,提高化疗的有效率。Fuino等^[3]应用HDAC抑制剂LAQ824与多种化疗药物同时作用于乳腺癌细胞,发现LAQ824可以增强紫杉醇、吉西他滨等化疗药物诱导的细胞凋亡,提高乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性。Imanishi等^[4]的研究显示,HDAC抑制剂都可以增加紫杉醇致肿瘤细胞死亡作用。本研究结果显示,HDAC抑制剂TSA与紫杉醇联合应用,能提高紫杉醇对肺腺癌细胞H1299及H322的抑制率,使紫杉醇对两种细胞的 IC_{50} 明显下降,提高对这两种细胞的抑制敏感性。但联合用药后紫杉醇对两种细胞的 IC_{50} 下降程度却不同,对H322细胞的 IC_{50} 下降约7倍,而对H1299细胞下降2倍,

这一结果提示联合用药会因细胞特性的不同而产生不同效果。

HDAC抑制剂通过引起细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡达到抑制肿瘤生长的目的。不同HDAC抑制剂作用于不同细胞,会出现不同的细胞周期改变。Blagosklonny等^[5]的研究显示,TSA和丁酸导致A549细胞阻滞于 G_1 期,而DP则导致A549细胞周期阻滞于 G_2/M 期。本研究结果显示,TSA导致H1299和H322细胞周期阻滞于 G_1 期,较单独用药更为复杂的是,联合用药后的细胞周期改变。TSA与紫杉醇联合应用后,在H1299细胞维持或增加了 G_1 期阻滞,而在H322细胞则出现 G_2 及S期的阻滞;紫杉醇主要在 G_2 期发挥功能, G_1 期阻滞相对减少了紫杉醇作用的靶细胞数,因此 G_1 期的细胞阻滞可能会影响紫杉醇的药物敏感性。在本研究中,我们所检测的细胞周期变化是36h内的早期变化,结合细胞生长抑制曲线的结果,早期 G_1 期的阻滞并不会降低紫杉醇的细胞生长抑制能力,因为HDAC抑制剂诱导 G_1 期的阻

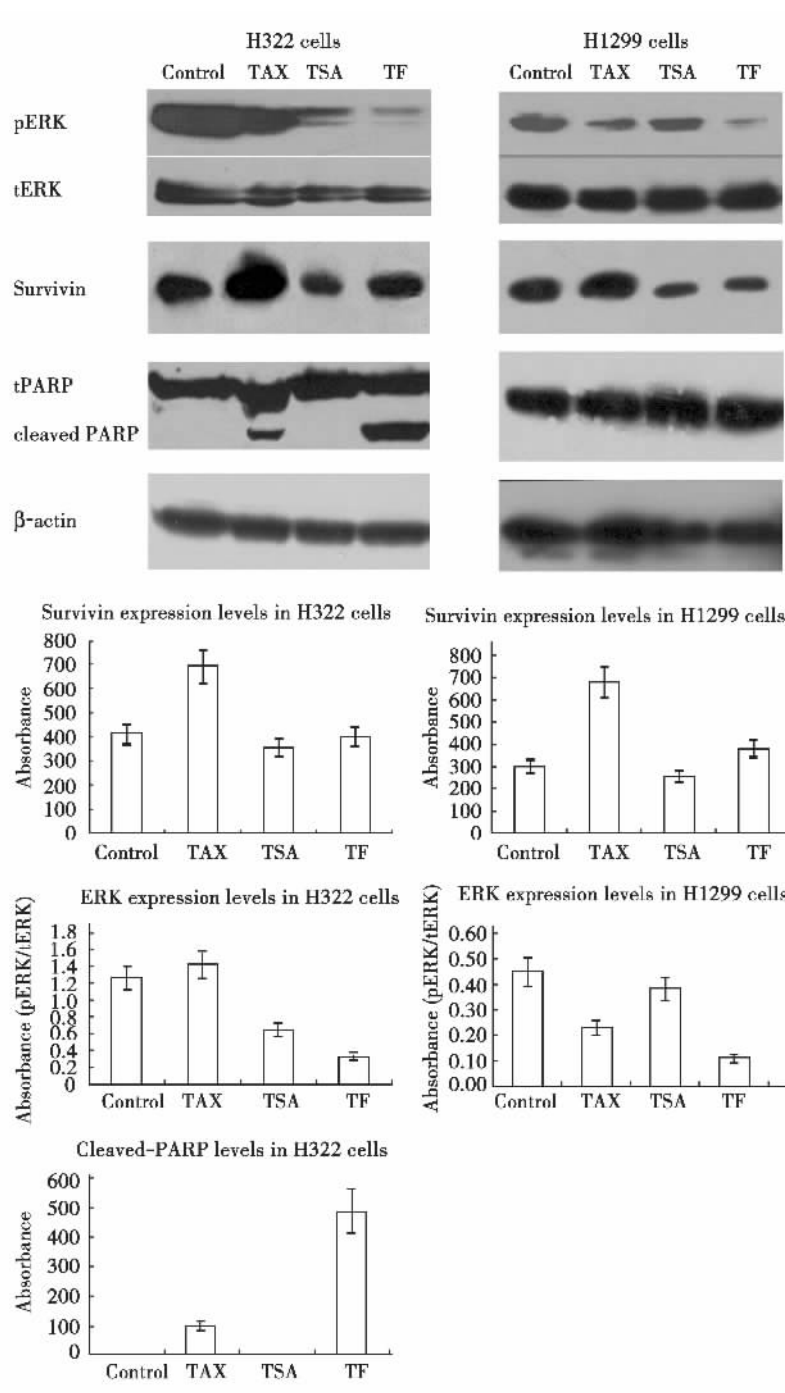


图 6 各组 H322 及 H1299 细胞中 ERK、Survivin 及 PARP 蛋白的表达

Figure 6 Expression levels of Survivin, ERK, and PARP proteins in each group of H322 cells and H1299 cells
Abbreviations as in Figure 1.

滞,同时也激活了细胞凋亡或细胞死亡程序,同样对肿瘤细胞有杀伤作用^[6]。联合应用 TSA 与紫杉醇导致的不同细胞周期的变化,可能是联合方法协同效果不同的原因之一。如分时间段对联合用药的细胞周期的变化进行持续观察,可能更好地解释上述不同的对联合用药协同效果的影响。

本研究检测了细胞凋亡的早期标志蛋白 PARP 蛋白^[7],紫杉醇及联合作用 H322 细胞后检测到剪切的 PARP 蛋白,而且联合应用后的剪切 PARP 的蛋白表达明显高于紫杉醇单独应用,提示 TSA 与紫杉醇联合应用较单独应用紫杉醇增加了 H322 细胞凋亡。流式细胞仪的检测结果也同样显

示 TSA 与紫杉醇联合应用较单独应用紫杉醇增加了 H322 细胞的凋亡。Hoechst33342 染色的结果进一步证实 TSA 增强了紫杉醇诱导的细胞凋亡。与 H322 细胞不同的是, H1299 细胞凋亡的发生较少, 在联合用药组, 流式细胞仪只检测到 1.47% 的细胞凋亡, 虽然都较单独应用紫杉醇诱导的细胞凋亡率高, 但这样低的凋亡水平不足以解释抑制曲线的变化。另外 PARP 蛋白的检测未见剪切 PARP 的出现, Hoechst33342 染色显示细胞核形态改变及发现非常少的凋亡小体, 这些结果均提示 TSA 与紫杉醇联合应用于 H1299 细胞的协同作用不是诱导的细胞凋亡的增加, 可能存在细胞非凋亡性死亡。Chobanian 等^[8]的研究也提示, HDAC 抑制剂 TSA、SAHA 联合紫杉醇作用于卵巢癌细胞所致的细胞凋亡, 只是最终细胞死亡的部分原因。因此我们认为在紫杉醇及与 TSA 联合应用的早期, 对 H1299 细胞的抑制作用中细胞凋亡不是主要机制, 可能存在非凋亡性死亡因素。两种细胞株不同的死亡机制是否与联合用药后紫杉醇对两种细胞的 IC₅₀ 值下降程度不同有关, 有待进一步研究。

抗肿瘤药物激活肿瘤细胞一系列的致死相关基因, 引发肿瘤细胞的坏死和凋亡, 但同时诱导肿瘤细胞的自身保护反应, 释放抗凋亡基因, 激活细胞信号通路, 使肿瘤细胞得到继续增殖, 避免死亡。在这些保护反应中, survivin 基因表达增加及 ERK 通路的激活都有很重要的作用, 而且这种保护反应与肺癌患者的分期、预后及药物敏感性有着密切的关系, 阻断这种保护反应将有助于提高化疗的有效性^[9,10]。本研究结果也显示, 0.01 μmol/L 的紫杉醇作用 24 h 后, H322 和 H1299 细胞的 Survivin 表达是正常组的 1.71 倍和 1.61 倍, pERK 在 H322 细胞有轻度的增高, 而在 H1299 细胞则有下降, pERK 的变化与紫杉醇的浓度及作用时间有关, 研究显示低浓度长时间或高浓度紫杉醇才激活 ERK 通路, 即增加 pERK 的表达^[11]。本研究应用 0.01 μmol/L 的紫杉醇作用 24 h, 因此可能尚未达到激活 ERK 通路的浓度或时间。TSA 单独应用及联合紫杉醇后, 在两种细胞中均明显抑制了 Survivin 及 pERK 的表达, 重要的是联合应用后 Survivin 及 pERK 的表达均较紫杉醇单独应用后明显下降, 提示 TSA 抑制了两种细胞的自身保护反应, 这可能是协同紫杉醇毒性作用的机制。

总之, HDAC 抑制剂 TSA 与化疗药物紫杉醇联合应用, 可以提高紫杉醇对肺癌细胞 H1299 和

H322 的生长抑制功能, 联合应用的协同作用在 H322 细胞表现为细胞凋亡的增加, 而在 H1299 细胞则可能存在非凋亡因素。联合应用后, TSA 抑制了 survivin 及 pERK 的表达, 这可能是协同紫杉醇毒性作用的机制。

[参 考 文 献]

- [1] Edelman MJ, Quam H, Mullins B. Interactions of gemcitabine, carboplatin and paclitaxel in molecularly defined non-small lung cancer cell lines [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 48(2):141-144.
- [2] Yu X, Guo ZS, Marcu MG, et al. Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by decapeptide FR901228 [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94(7):504-513.
- [3] Fuino L, Bali P, Wittmann S. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine, and epothilone B [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(10):971-984.
- [4] Imanishi R, Ohtsuru A, Iwamatsu M, et al. A histone deacetylase inhibitor enhances killing of undifferentiated thyroid carcinoma cells by p53 gene therapy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(10):4821-4824.
- [5] Blagosklonny MV, Robert R, Sackett DL, et al. Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(11):937-941.
- [6] Kim YB, Ki SW, Yoshida M, et al. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2000, 53:1191-1200.
- [7] Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, et al. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis [J]. *Cancer Res*, 1993, 53:3976-3985.
- [8] Chobanian NH, Greenberg VL, Gass JM, et al. Histone deacetylase inhibitors enhance paclitaxel-induced cell death in ovarian cancer cell lines independent of p53 status [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(2B):539-545.
- [9] Lu B, Gonzalez A, Massion PP, et al. Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer [J]. *Br J Cancer*. 2004, 91(3):537-540.
- [10] Suyama H, Igishi T, Sano H, et al. ERK activation and subsequent RB phosphorylation are important determinants of the sensitivity to paclitaxel in lung adenocarcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(6):1499-1504.
- [11] Okano J, Rustgi AK. Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(22):19555-19564.

[编辑及校对:张 菊]