

姜黄素和 TSA 对胃癌 c - myc 表达影响

胡光胜 石 巍 廖爱军 曹文涛 曾 斌 廖 丹

摘 要 **目的** 了解姜黄素和 TSA 对胃癌 c - myc 基因表达影响,探讨组蛋白乙酰化/去乙酰化的动态平衡在胃癌基因表达和调控中的意义。**方法** 进行胃癌细胞株 SGC - 7901 和 MGC803 培养,然后加入不同浓度的组蛋白乙酰化酶抑制剂姜黄素和组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 分别进行干预,RT - PCR 检测 c - myc 的 mRNA 的表达。**结果** 通过 RT - PCR 的检测我们发现随着姜黄素的浓度增加及 TSA 浓度的减小 c - myc 的表达受到抑制($P < 0.01$)。**结论** 姜黄素与 TSA 对 c - myc 表达影响作用是相反的。

关键词 姜黄素 TSA 胃癌 c - myc p53

Effect of Curcumin and TSA on Human Gastric Cancer Cell Line c - myc Expression. Hu Guangsheng, Shi Wei, Liao Aijun, et al. First Affiliated Hospital of Nanhua University, Department of Digestion Medicine, Hunan 421001, China

Abstract Objective To understand the effect of curcumin and TSA on c - myc gene expression in human gastric cancer and to explore the dynamic balance of the histone acetylation / deacetylation in gene expression in gastric cancer and the significance of the regulation. **Methods** Gastric cancer cell line SGC - 7901 and MGC803 were cultured, and then different concentrations of histone acetylase inhibitors curcumin and histone deacetylase inhibitor TSA were added, respectively. mRNA of c - myc expression was detected by RT - PCR. **Results** With increasing of the concentration of curcumin and reducing of the TSA concentrations c - myc expression was inhibited ($P < 0.01$). **Conclusion** The effect of curcumin and TSA on c - Myc expression is contrary.

Key words Curcumin; TSA; Gastric cancer; c - myc; p53

在真核生物基因表达调控中,组蛋白乙酰化与去乙酰化是其中一个很重要的修饰机制。组蛋白乙酰化与去乙酰化可通过改变染色质周围电荷或参与染色质构型重建而影响基因表达。组蛋白的乙酰化和去乙酰化是一个动态的可逆过程,两类重要的酶催化并调控这一过程:组蛋白乙酰化酶 HAT (histone acetyltransferase) 和组蛋白去乙酰化酶 HADC (histone deacetyltransferase)^[1-3]。而在特定的基因的表达和调控是如何保持这个平衡的,在真核基因组表达的整体策略方面,组蛋白的乙酰化/去乙酰化作用又有什么样的意义呢?目前还不清楚。本文通过组蛋白乙酰化酶和去乙酰化酶的抑制剂对胃癌细胞株 SGC - 7901 和 MGC803 作用后检测特定基因 c - myc 的表达来探讨组蛋白的乙酰化和去乙酰化对基因的表达和调控,进一步组蛋白乙酰化和去乙酰化是如何实现基因整体水平的调控。

材料与方 法

1. 材料:人胃腺癌细胞系 SGC - 7901 购自第四军医大学实验动物中心、MGC803 为南华大学肿瘤所惠赠。RNA 提取

试剂盒、AMV cDNA 第 1 链合成试剂盒、即用 PCR 扩增试剂盒购自上海生工生物工程公司;p53 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;乙酰化组蛋白 H3(Lys9)抗体购自美国基因公司;c - myc 抗体购自武汉博士德公司, β - actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,姜黄素、TSA 均购自 Sigma 公司产品。

2. 实验方法及步骤:(1)药物的配制:姜黄素、TSA 用 DMSO 稀释成 $1 \times 10^5 \mu\text{mol/L}$ 用 $0.22 \mu\text{mol/L}$ 微孔滤膜除菌,放 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 冰箱内避光保存,临用前解冻,处理细胞时加入到 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中。(2)细胞的培养及处理:人胃腺癌细胞系 SGC - 7901、MGC803 按常规方法培养,10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液,在 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度下培养,隔天换液,待细胞生长至 80%~90% 密度时,用 0.02% EDTA 和 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:4 比例传代。根据试验的要求,将试验分为:溶媒对照组、姜黄素处理组、TSA 处理组、两种药物作用处理组。药物浓度选择参照文献[4]。(3)Rt - PCR 反应:收集上述处理的各组 24h 细胞,用 RNA 提取试剂盒、AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒(上海生工)提取 RNA 和反转录为 cDNA,在经 PCR 扩增,进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,结果用 AlphaImager3400 型凝胶图像分析仪(美国 Alpha Innotech 公司产品)照相,以 GAPDH 面积灰度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。引物及反应条件如下:c - myc 的上游引物为:5' - GGA TCG CGC TGA GTA TAA AAG CCG - 3'(224 - 247bp),下游引物为:5' - CTA TTC GCT CCG

GAT CTC CCT TC - 3'(366 - 388bp), 基因登录号: M14206. 1, 反应条件: 94℃、5min, 94℃、1min, 52℃、1min 72℃、1min, 30 cycle, 72℃、5min; 内参 GAPDH 上游引物为: 5' - TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG - 3'(273 ~ 293bp) 下游引物为: 5' - TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG - 3'(901 ~ 920bp) 基因登录号: BC083511. 1, 反应条件: 94℃、5min, 92℃、40s, 58℃、40s, 72℃、50s, 30 cycle, 72℃、5min。

3. 统计学分析: 应用 SPSS10.0 软件包进行统计分析, 主要统计指标均进行正态性检验, 正态分布的各统计指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两水平以上的单因素分析采用 *one-way ANOVA* 检验; 各药物处理组均数与对照组比较用 *LSD-t* 检验, 各药物处理组均数之间的两两比较用 *SNK-q* 检验。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

结 果

c-myc 在胃癌 SGC - 7901 (图 1) 和 MGC803 (图 2) 细胞中 mRNA 的表达: 从图 1 和图 2 的 RT - PCR 结果示 *c-myc* 基因无论在 SGC - 7901 还是在 MGC803 细胞中, 空白对照组与溶媒对照组比较是都没有差异 ($P > 0.05$)。同时从图中可以看出 *c-myc* 基因则随姜黄素的作用表达较对照组明显降低, 而经姜黄素作用后则明显增加 ($P < 0.05$), 两者联合作用较对照组则表达降低 ($P < 0.05$), 但与姜黄素比较明显增加 ($P < 0.05$)。我们将两种细胞进行比较差异具有统计学意义 ($P > 0.05$)。

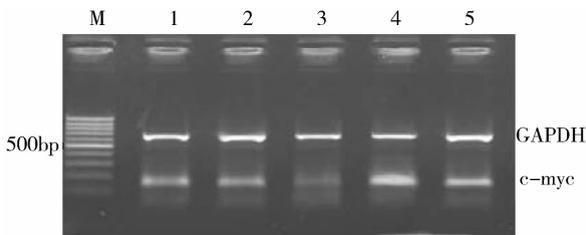


图 1 *c-myc* 在胃癌 SGC - 7901 细胞株中 mRNA 的表达

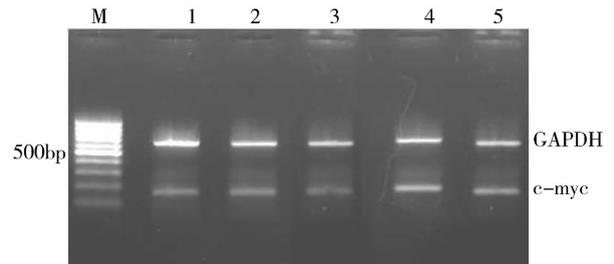


图 2 *c-myc* 在胃癌 MGC803 细胞株中 mRNA 的表达

M. Marker; 1. 空白对照组; 2. 溶媒对照组; 3. 姜黄素处理组; 4. TSA 处理组; 5. 两种药物作用处理组

讨 论

真核生物中基因的遗传表现遗传修饰是胃癌基因治疗的一个研究方向, 而组蛋白的乙酰化是目前的研究的热点。本研究组已研究到 TSA 和姜黄素对胃癌 SGC - 7901 细胞的增生的影响^[5], TSA 是组蛋白去乙酰化酶的抑制剂, 能抑制胃癌细胞的生长和增生, 而姜黄素也能抑制胃癌细胞的增生, 其机制是能抑制组蛋白乙酰化酶 P300 的表达^[6], 进而抑制 *c-myc* 的表达。两者对组蛋白作用是相反的, 但两者都能抑制胃癌细胞的表达, 但对基因的表达的作用理论是相反的, 具体到个体基因的表达是否是理论是一致的, 有待我们进一步研究。从本研究我们得知 TSA 和姜黄素对 *c-myc* 的表达呈现负向作用, 姜黄素能抑制 *c-myc* 的表达, 其机制可能与姜黄素抑制组蛋白乙酰化酶 P300 的表达, 本实验组前期研究已经证实, 且姜黄素能维持 HDAC2 的活性和表达^[7], 进而影响组蛋白的乙酰化, 抑制 *c-myc* 的表达和转录, 通过它来抑制胃癌细胞株增生。而本实验表明 TSA 能促进 *c-myc* 表达, 但 TSA 能抑制胃癌株生长, 其可能是通过抑制 *c-myc* 相关的调控基因而发挥抗癌作用的^[8]。而两者共同作用时虽然是对单个基因的调控是相反的, 但它们却又都能抑制细胞的增生, 可

能的机制是他们通过不同的途径而发挥抑制肿瘤作用的, 这也是我们人体整体调节的一部分。为我们下一步的研究提供一定的理论依据。

参 考 文 献

- 1 沈翔排, 方福德. 真核基因表达调控 (修订版). 北京: 高等教育出版社、施普林格出版社, 1997: 1 - 14
- 2 黄百渠, 曾庆华. 组蛋白和核小体在基因转录中的作用. 科学通报, 2000, 45: 2033 - 2040
- 3 Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. Nature, 2000, 403: 41 - 45
- 4 Spencer VA, Davie JR. Role of covalent modification of histones in regulating gene expression. Gene, 1999, 240: 1 - 12
- 5 胡光胜, 石巍, 廖爱军. 姜黄素对胃癌细胞 P300、P53、*c-myc* 及乙酰化组蛋白 H3 和 H4 表达的影响. 南华大学 (医学版), 2005, 33 (4): 457 - 460
- 6 Balasubramanyam K, Varier A, Altaf M, et al. Curcumin, a Novel p300/CREB-binding Protein-specific Inhibitor of Acetyltransferase, Represses the Acetylation of Histone/Nonhistone Proteins and Histone Acetyltransferase-dependent Chromatin Transcription. J Biol Chem, 2004, 279 (12): 51163 - 51171
- 7 Meja K K, Rajendrasozhan S, Adenuga D, et al. Curcumin Restores Corticosteroid Function in Monocytes Exposed to Oxidants by Maintaining HDAC2. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39: 312 - 323
- 8 Daniel Y L, Dalia B L, Cynthia S W, et al. Promoter-binding and repression of PDGFRB by *c-Myc* are separable activities. Nucleic Acids Res, 2004, 32: 3462 - 3468

(收稿: 2009 - 12 - 29)

(修回: 2010 - 03 - 12)