

王海侠,刘瑞吉,于晓麟,等. 靶向 HDAC6 信号抑制非小细胞肺癌 A549 细胞上皮-间质转化的机制[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 61-67.

Hua HX, Liu RJ, Yu XL, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 signaling attenuates epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer A549 cells [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 61-67.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.08.010

靶向 HDAC6 信号抑制非小细胞肺癌 A549 细胞 上皮-间质转化的机制

王海侠¹, 刘瑞吉^{2*}, 于晓麟¹, 赵敏³

(1. 肿瘤内科; 2. 呼吸内科; 3. 病理科; 秦皇岛市第一医院, 河北秦皇岛 063000)

【摘要】 目的 观察组蛋白去乙酰化酶(HDAC6)在非小细胞肺癌(NSCLC)中表达的临床意义及其靶向 HDAC6 信号对 A549 细胞发生上皮间质转化(EMT)的作用机制。方法 采用免疫组织化学染色法检测 HDAC6 和 E-钙粘蛋白(E-ca)在 NSCLC 中的表达并分析其临床病理意义;采用转化生长因子(TGF)- β 1 诱导 A549 细胞,并予以 HDAC6、Rho 相关卷曲螺旋激酶(ROCK)和细胞外信号调节激酶(ERK)信号抑制剂预处理。CCK-8 法检测细胞增殖,划痕实验检测细胞迁移能力,transwell 实验检测细胞侵袭能力,免疫印迹法检测 E-cadherin、波形蛋白(vimentin)、 α -平滑肌肌动蛋白(SMA)和 HDAC6 的表达。结果 HDAC6 在 NSCLC 组织中高表达,与分化程度和淋巴结转移关系密切,且与 E-ca 表达呈负相关。TGF- β 1 能够诱导 A549 细胞发生 EMT,即 vimentin、 α -SMA 表达上调,而 E-ca 表达下调;予以 HDAC6、ROCK 和 ERK 信号抑制剂能够显著抑制该变化。结论 HDAC6 在 NSCLC 发生、发展中可能起到重要的调控作用,与肿瘤的 EMT 关系密切,其作用与 ROCK 和 ERK 信号的调控有关。

【关键词】 非小细胞肺癌;上皮间质转化;组蛋白去乙酰化酶;Rho 相关卷曲螺旋激酶;细胞外信号调节激酶
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 08-0061-07

Inhibition of histone deacetylase 6 signaling attenuates epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer A549 cells

HUA Haixia¹, LIU Ruiji^{2*}, YU Xiaolin¹, ZHAO Min³

(1. Department of Oncology; 2. Department of Endocrinology; 3. Department of Pathology;
The First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 063000, China)

【Abstract】 Objective To assess the clinical significance of histone deacetylase 6 (HDAC6) expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) and determine the relationship between HDAC6 and the epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** Tumor and noncancerous peritumoral lung tissues (controls) were collected from 52 patients with NSCLC and analyzed for HDAC6 and E-cadherin expression using immunohistochemistry. Correlation analyses between HDAC6, E-cadherin and clinicopathological parameters were performed using χ^2 tests. *In vitro* studies were conducted in transforming growth factor (TGF)- β 1-induced A549 cells to determine the effect of HDAC6 overexpression on molecular markers of EMT. **Results** Immunohistochemical analysis revealed significantly elevated HDAC6 expression in NSCLC

【基金项目】 河北省卫计委 2018 年度医学科学研究重点课题计划(20181185)。

【作者简介】 王海侠(1977—),女,副主任医师,研究方向:肺癌的发生机制与防治研究。E-mail: huahaixia1977@sina.com

【通信作者】 刘瑞吉(1972—),女,主任医师,研究方向:肺癌的诊断与防治研究。E-mail: 12327696@qq.com

tissues, which correlated with the differentiation stage and lymph node metastasis. Moreover, HDAC6 expression was inversely correlated with that of E-cadherin, an EMT marker. Treatment with an HDAC6 inhibitor and signaling inhibitors of Rho-associated protein kinase (ROCK) or extracellular signal-regulated kinases (ERK) significantly reduced the proliferation, migration and invasion of TGF- β 1-induced A549 cells. Furthermore, western blot analysis indicated that TGF- β 1 induced EMT in A549 cells, which was manifested by upregulated E-cadherin and vimentin and downregulated α -smooth muscle actin (α -SMA). Signaling inhibitors against HDAC6, ROCK and ERK reversed the effects of TGF- β 1 treatment. **Conclusions** Our data suggest that HDAC6 plays an important regulatory role in NSCLC tumorigenesis and progression and is closely related to tumor EMT and regulation of ROCK and ERK signaling. Targeting HDAC6 activity using HDAC6, ERK1/2 or ROCK inhibitors may be a potential therapeutic option for NSCLC.

[Keywords] non-small cell lung cancer (NSCLC); epithelial-mesenchymal transition (EMT); histone deacetylase 6 (HDAC6); rho-associated protein kinase (ROCK); extracellular signal-regulated kinases (ERK)

作为最常见的恶性肿瘤,肺癌的发病率和死亡率占全部恶性肿瘤的第一位,其中 70%~80% 的肺癌是非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC),但确诊为 NSCLC 时,70% 以上的患者已经失去了手术机会,即使辅以放、化疗等多种综合治疗手段,仍然不能显著提高肺癌的生存率^[1]。因此寻找 NSCLC 早期诊断标记物及靶向治疗位点一直是肿瘤研究领域的难点和热点问题。而上皮-间质转化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT) 这一重要的生理/病理过程可能参与了对肿瘤侵袭和转移的调控,同时也是肿瘤细胞发生放、化疗耐性的重要机制之一^[2]。

组蛋白去乙酰化酶家族 (histone deacetylases, HDACs) 是一类能够促进组蛋白/非组蛋白去乙酰化的种类酶类,与细胞增殖、凋亡、DNA 损伤关系密切。I 类 HDAC 主要包括 HDAC1、2、3 和 8; II 类 HDAC 由 HDAC4、5、6、7、9 和 10 组成; III 类 HDAC 包括 Sir2 相关酶类 (Sirtuins, SIRT) 1-7; IV 类 HDAC 目前仅有 HDAC11 被发现。最近研究显示 HDAC 家族与肿瘤发生、发展关系密切,能够抑制相关抑癌基因的转录,而一些 HDAC 抑制剂亦被发现在体内、外能够抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭^[3]。

在体外培养的 NSCLC 细胞株中,HDAC 抑制剂能够显著抑制肿瘤细胞增殖,并促进 E-钙粘蛋白 (E-cadherin) 的表达^[4]。而作为 IIb 类 HDAC, HDAC6 的缺失表达能够促进顺铂诱导的 NSCLC 细胞 DNA 损伤和凋亡,抑制 HDAC6 的表达能够减少裸鼠体内移植瘤的体积,并促进其坏死和凋亡的增加,而高表达 HDAC6 则可能促进对顺铂的抗性增加^[5]。同时 HDAC6 参与对肿瘤细胞增殖和迁移的调控受到 Rho 相关卷曲螺旋激酶 (Rho-associated

coiled-coil kinase, ROCK)^[6] 和细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1/2^[7] 信号的调控。在其他肿瘤中也发现,HDAC6 与泛素化失衡、微管蛋白的缺失表达和氧化应激关系密切,其在卵巢癌、乳腺癌和食管癌、胃癌的发生发展中也起到了重要的调控作用^[2]。因此本研究拟通过分析 HDAC6、E-cadherin 在 NSCLC 临床样本中的表达及其临床病理意义,并观察靶向 HDAC6 抑制转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 1 介导的 A549 细胞 EMT 的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

收集 2008 年 6 月~2012 年 6 月期间在秦皇岛市第一医院胸外科进行手术切除并经病理诊断证实的 NSCLC 标本 52 例,所有患者临床资料完整,均为肺癌原发病灶,无其他肿瘤病史;术前均未接受放、化疗治疗;无肝炎、肝硬化、自身免疫性疾病或其他严重的基础疾病。以肿瘤组织石蜡标本作为实验组,并挑选同例患者的癌周肺组织石蜡标本作为对照组 (镜下无癌细胞浸润及转移),所有标本采用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,4 μ m 切片,由病理科诊断、存档并提供。研究项目经秦皇岛市第一医院医学伦理委员会 (伦理编号:2017B018) 批准 (立项编号:20181185),所有患者均签署知情同意书。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

NSCLC A549 细胞购置于中科院上海细胞库,采用体积分数 10% FBS (美国 Gibco 公司)、1% 青-链霉素的 1640 培养基 (美国 Gibco 公司),于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。体外实验分组为:①对照

组:体积分数为 0.5% FBS 的 1640 培养基;②TGF- β 1 诱导组:0.5% FBS 1640 + 5 ng/mL TGF- β 1(美国 Peprotech 公司);③HDAC6 抑制剂组:0.5% FBS 1640 + 5 ng/mL TGF- β 1 + 10^{-6} mol/L TCS HDAC6 20b(英国 Tocris 公司);④ROCK 抑制剂组:0.5% FBS 1640+5 ng/mL TGF- β 1+ 10^{-3} mol/L Y-27632(美国 Cayman 公司);⑤ERK 抑制剂组:0.5% FBS 1640 + 5 ng/mL TGF- β 1 + 10^{-6} mol/L PD98059(美国 Cayman 公司)。TCS HDAC6 20b、Y-27632 和 PD98059 预诱导 1 h 后,再加入 TGF- β 1 共诱导 24 h。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖

调整细胞密度为每孔 1×10^4 种植于 96 孔板,次融合后同步化 24 h,按照实验设计分组(每组 10 孔),24 h 后加入每孔 10 μ L CCK-8(碧云天),37 培养箱中培养 3 h,酶标仪 450 nm 测定 OD 值。

1.2.3 免疫组织/细胞化学染色

常规石蜡包埋切片;按照文献方法制备细胞爬片,按实验设计分组,24 h 后 4%多聚甲醛固定 1 h。采用枸盐酸高压修复,一抗 E-cadherin(北京中杉金桥)、HDAC6(美国 Abcam 公司)、 α -SMA(美国 Abcam 公司)4 $^{\circ}$ C 过夜(浓度为 1:100),按照免疫组化试剂盒说明书(PV-6000,北京中杉金桥)进行,DAB 显色,苏木素轻度复染,中性树胶封片。临床样本检测中,HDAC6 定位于胞浆内,E-cadherin 定位于细胞膜,表达棕黄色。

1.2.4 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

按照每孔 2×10^5 的细胞密度接种于 24 孔板,用 10%的胎牛血清的 1640 培养基常规培养。当细胞次融合时,在单层培养细胞上,用 200 μ L 枪头沿培养板底部呈“—”字形划痕,镜下记录划痕区相对距离,然后按照实验设计更换培养基,每组设 4 个复孔,48 h 后倒置显微镜下观察细胞向划痕区迁移并拍照,用 IPP 6.0 图像分析软件测量划痕区面积,计算迁移率($1 \sim 48$ h 划痕区面积/0 h 划痕区面积) \times 100%作为细胞迁移能力的指标,迁移率越高代表迁移能力越强。

1.2.5 基质胶侵袭实验检测侵袭能力

收集细胞,离心重悬调整细胞密度为 1×10^5 /mL,在 transwell 小室上层加入 200 μ L 单细胞悬液,下室沿侧壁加入 600 μ L 含 10% FBS 的 1640

培养基。37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 24 h。取出小室,小心去除滤膜表面未穿膜的肿瘤细胞。95%酒精固定,吉姆萨染色。镜下计数侵袭细胞数,取 5 个视野的平均值。以侵袭细胞的相对数目反映细胞的侵袭能力。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达

RIPA 裂解细胞,收集上清 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清,分装冰冻保存。Bradford 法测定蛋白浓度,按 30~50 μ g 蛋白/泳道上样并常规电泳、转膜,一抗 E-cadherin、HDAC6)、 α -SMA 和 vimentin(美国 Abcam 公司)4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗 1:3000(美国 KPL 公司)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,ECL 发光(美国 GE 公司)并扫描。采用 Image Lab 图像分析软件测定条带的 OD 值,以目的蛋白与内参的比值作为该蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

用 Excel 建库,各组数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 11.0 进行统计分析。各组间采用方差分析,进行均数比较,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HDAC6 和 E-cadherin 在 NSCLC 组织表达的临床意义

如图 1 所示,HDAC6 在肺组织中主要表达于细胞浆,可见细胞核表达;E-cadherin 则阳性表达于细胞膜。HDAC6 在 NSCLC 组织中阳性表达率为 71.15%(37/52),显著高于癌旁组的 11.54%(6/52),经 χ^2 检验,差异具有统计学意义($\chi^2 = 38.103$; $P < 0.001$);E-cadherin 在 NSCLC 组织中阳性表达率为 28.85%(15/52),显著低于癌旁组的 80.77%(42/52),经 χ^2 检验,差异具有统计学意义($\chi^2 = 28.300$; $P < 0.001$),见表 2。

如表 1 所示,HDAC6 蛋白在 NSCLC 中的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型和临床分期等因素无关($P > 0.05$),而与分化程度、淋巴结转移关系密切。E-cadherin 在 NSCLC 中的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型、分化程度、临床病理分期和淋巴结转移等因素无关($P > 0.05$)。在 NSCLC 组织中,HDAC6 阳性表达与 E-cadherin 阳性表达呈负相关($r = -0.532$; $P < 0.001$),见表 2。

表 1 HDAC6 和 E-cadherin 在 NSCLC 中表达的临床意义

Table 1 The clinical significance of HDAC6 and E-cadherin in NSCLC tissues

临床意义 Clinical significance	<i>n</i>	HDAC6			E-cadherin		
		+	χ^2	<i>P</i>	+	χ^2	<i>P</i>
性别 Sex							
男 Male	36	27			11		
女 Female	16	10	0.843	0.358	4	0.123	0.726
年龄 Age							
≥60 years	30	22			9		
<60 years	22	15	0.164	0.685	6	0.164	0.686
肿瘤大小 Size of tumor							
≤3 cm	29	19			9		
>3 cm	23	18	1.015	0.314	6	0.153	0.696
组织学类型 Histological type							
鳞癌 squamous	29	19			4		
腺癌 adenocarcinoma	16	13			2		
鳞腺癌 Adeno-squamous	7	5	0.490	0.484	1	0.000	0.983
分化程度 Degrees of differentiation							
高+中分化 Well + moderately differentiated	37	23			13		
低分化 poorly differentiated	15	14	6.050	0.014	2	2.472	0.116
TNM 分期 TNM staging							
I+II	34	23			10		
III+IV	18	14	0.588	0.443	5	0.015	0.902
淋巴结转移 Lymph node metastasis							
-	31	18			13		
+	21	19	6.408	0.011	2	6.408	0.011

表 2 HDAC6 和 E-cadherin 在 NSCLC 中表达的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of HDAC6 and E-cadherin in the NSCLC tissues

	HDAC6		<i>r</i>	<i>P</i>	
	+	-			
E-cadherin	+	5	10	-0.532	<0.001
	-	32	5		

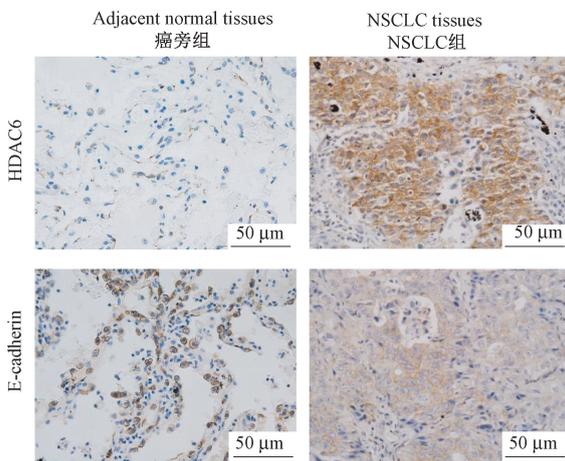


图 1 HDAC6 和 E-cadherin 在 NSCLC 中的表达 (免疫组织化学染色, ×400)

Figure 1 The positive expression of HDAC6 and E-cadherin in NSCLC tissues. IHC staining

2.2 抑制 HDAC6 能够抑制 A549 细胞增殖

CCK-8 结果显示, TGF-β1 诱导能够显著促进细

胞增殖, 其 OD 值为 (2.191 ± 0.045) , 是对照组 (0.649 ± 0.126) 的 3.38 倍, 而予以 TCS HDAC6 20b、Y-27632 和 PD98059 能够显著抑制 TGF-β1 诱导的细胞增殖, 其 OD 值 $(1.274 \pm 0.191; 1.197 \pm 0.083; 1.194 \pm 0.157)$ 分别为 TGF-β1 诱导组的 58.15%、54.63% 和 54.49%, 经方差分析 ($F = 90.287$), 差异均具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

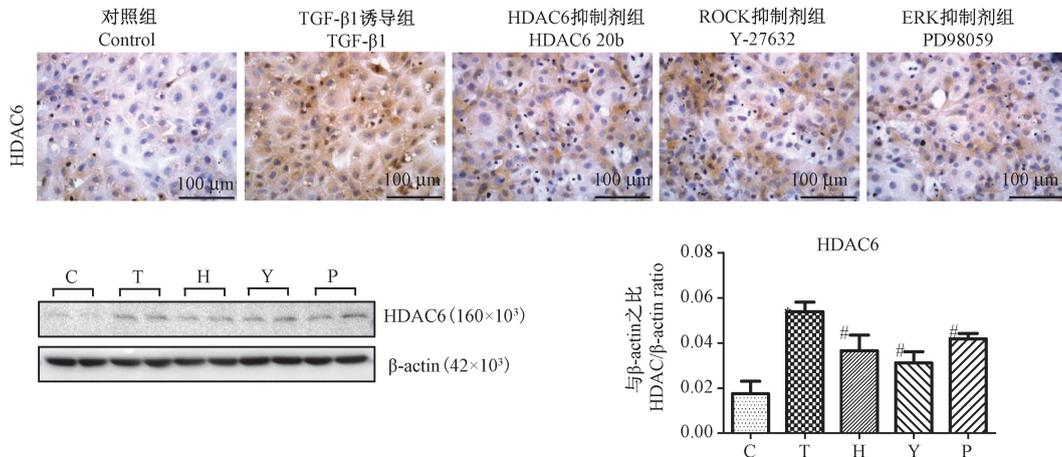
如图 2 所示, 免疫组织化学染色结果显示 HDAC6 在 A549 细胞中胞浆内阳性表达, 在 TGF-β1 诱导组中阳性表达上调, 予以 HDAC6 特异性抑制剂及 ROCK、ERK1/2 信号抑制剂能够显著抑制其阳性表达; 及免疫印迹结果显示, 予以 TGF-β1 诱导后, HDAC6 表达水平上调, 是对照组的 3.18 倍, 而给予 HDAC6 特异性抑制剂及 ROCK、ERK1/2 信号抑制剂后, 均能够显著抑制 HDAC6 蛋白的表达, 分别是 TGF-β1 诱导组的 68.52%、57.41% 和 77.78%, 经方差分析 ($F = 20.927$), 差异均具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2.3 抑制 HDAC6 能够抑制 A549 细胞的迁移和侵袭

划痕实验结果如图 3 显示, TGF- β 1 能够显著诱导 A549 细胞迁移, 迁移率为 (72.50 \pm 6.45)%, 显著高于对照组的 (34.50 \pm 3.11)%, 而在 HDAC6 抑制剂、ROCK 和 ERK1/2 抑制剂组中, 与 TGF- β 1 诱

导组相比, 迁移率明显下降, 经方差分析 ($F = 25.845$), 差异均具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

通过 Transwell 小室侵袭实验, 检测对照组、TGF- β 1 诱导组、HDAC6 20b 组、Y-27632 组和 PD98059 组的细胞侵袭能力, 显微镜下计数侵袭细胞数, 分别为 (57.50 \pm 21.39)、(260.50 \pm 70.09)、

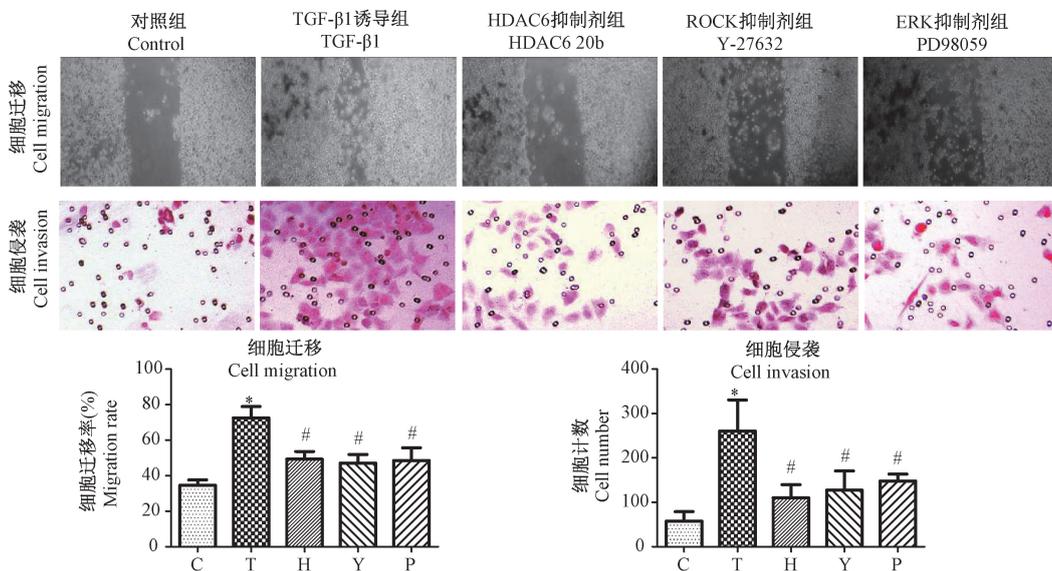


注: C: 对照组; T: TGF- β 1 诱导组; H: HDAC6 抑制剂组; Y: ROCK 抑制剂组; P: ERK 抑制剂组。与对照组相比较, * $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 诱导组相比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 HDAC6 在 TGF- β 1 介导的 A549 细胞发生 EMT 中的调节作用

Note. C, control group; T, TGF- β 1; H, HDAC6 20b; Y, Y-27632; P, PD98059. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the TGF- β 1 group, # $P < 0.05$.

Figure 2 The role of HDAC6 in regulation of EMT in A549 cells induced by TGF- β 1



注: C: 对照组; T: TGF- β 1 诱导组; H: HDAC6 抑制剂组; Y: ROCK 抑制剂组; P: ERK 抑制剂组。与对照组相比较, * $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 诱导组相比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 HDAC6 抑制剂对 TGF- β 1 介导的 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响

Note. C, control group; T, TGF- β 1; H, HDAC6 20b; Y, Y-27632; P, PD98059. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the TGF- β 1 group, # $P < 0.05$.

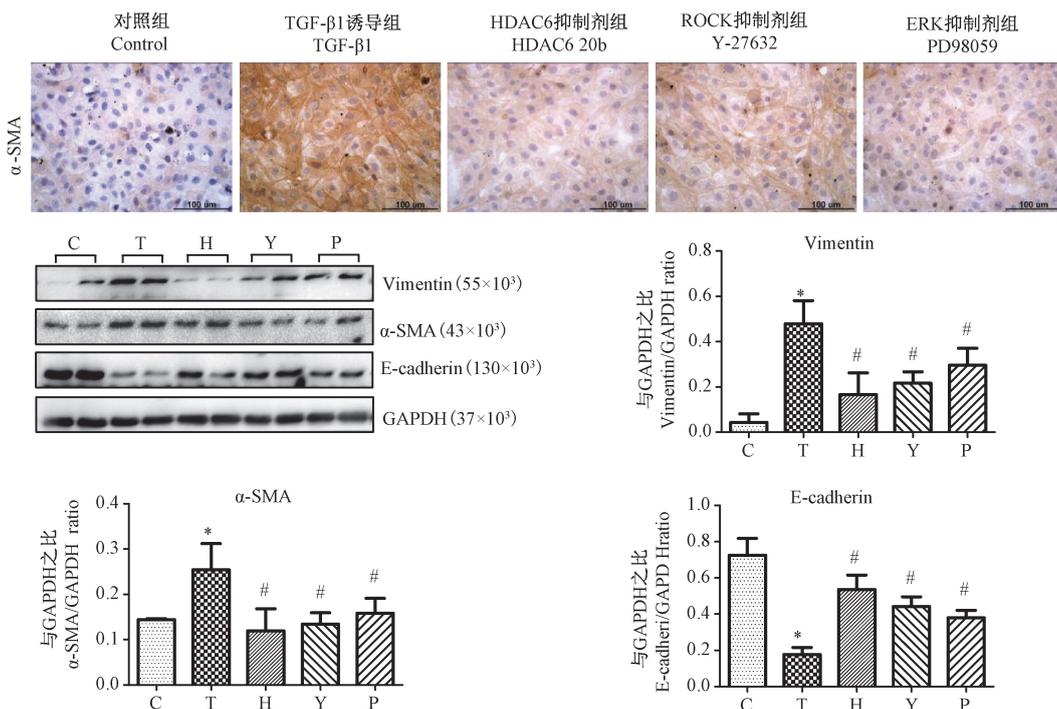
Figure 3 The effect of HDAC6 inhibitor on migration and invasion of A549 cells induced by TGF- β 1

(110.25 ± 29.55)、(127.50 ± 42.91) 和 (148.25 ± 15.19)。予以 HDAC6、ROCK 和 ERK 抑制剂后均能够显著抑制 TGF- β 1 诱导的细胞侵袭能力的提高,经方差分析($F = 13.486$),差异均具有统计学意义($P < 0.001$)。

2.4 抑制 HDAC6 能够抑制 A549 细胞发生 EMT

予以 TGF- β 1 诱导, A549 细胞出现典型的形态学改变,由原有“铺路石”样转变为长梭形,细胞连接消失,细胞间隙增大。免疫细胞化学染色结果如图 4 显示, TGF- β 1 诱导后, A549 细胞胞浆内出现 α -

SMA 阳性表达的肌丝样结构,而予以 TCS HDAC6 20b、Y-27632 和 PD98059 后, α -SMA 阳性表达明显减弱。免疫印迹结果显示, TGF- β 1 能够显著诱导 α -SMA 和 vimentin 的蛋白表达,分别是对照组的 1.79 倍、12 倍,同时抑制 E-cadherin 的蛋白表达下调,是对照组的 25.00%,而予以 HDAC6、ROCK 和 ERK 抑制剂后,能够显著抑制上述变化。经方差分析($F = 5.502$; $F = 13.313$; $F = 28.459$),差异均具有统计学意义($P < 0.001$)。



注: C: 对照组; T: TGF- β 1 诱导组; H: HDAC6 抑制剂组; Y: ROCK 抑制剂组; P: ERK 抑制剂组。与对照组相比较, * $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 诱导组相比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 HDAC6 抑制剂对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞 EMT 的调节作用

Note. C, control group; T, TGF- β 1; H, HDAC6 20b; Y, Y-27632; P, PD98059. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the TGF- β 1 group, # $P < 0.05$.

Figure 4 The effect of HDAC6 inhibitor on EMT of A549 cells induced by TGF- β 1

3 讨论

本研究发现, HDAC6 在 NSCLC 临床样本中高表达,与淋巴结转移、分化程度和临床分期关系密切,且与 E-cadherin 的表达呈负相关,提示 HDAC6 可能参与了 NSCLC 的发生、发展,并与 EMT 具有一定的关系。体外研究也显示,在 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞发生 EMT 的过程中, HDAC6 高表达并伴随着间质细胞表型 α -SMA 和 vimentin 表达的上调, E-cadherin 表达下调,同时细胞增殖、迁移和侵袭的

能力增加,与 ROCK 和 ERK1/2 信号的活化有关。

以往研究发现, HDAC6 可能是肿瘤潜在的治疗靶点之一。在乳腺癌患者的临床样本中,可观察到 HDAC6 蛋白水平的高表达,同时 HDAC6 蛋白高表达与组织学类型、p53 过表达关系密切,且多提示预后不良^[8]。绿原酸(chlorogenic acid, CGA)能够通过抑制 HDAC6 的作用,从而抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP-2)的表达和细胞增殖能力,在体内外能够显著抑制 A549 细胞的成瘤活性^[9]。在本研究中,也发现 HDAC6 高表达于

NSCLC, 并与肿瘤分化程度、淋巴结转移和临床分期关系密切。其表达多于 NSCLC 细胞胞浆内, 可见核内表达, 由于样本例数较少且缺乏定量分析手段, 且相关文献报道较少, 课题组未对其核/浆表达进行具体分析, 是本研究的缺陷之一。但综合文献支持, HDAC6 与肿瘤的发生、发展关系较为密切, 可能与 EMT 的发生有关。

现有研究发现, EMT 是肿瘤侵袭和转移、肿瘤耐药性和肿瘤干细胞形成的重要机制^[1]。TGF- β 1 诱导的 A549 细胞发生 EMT 是较为经典的体外 EMT 模型^[10], 形态上上皮细胞失去极性、细胞间粘附, 表现在上皮标记物 E-cadherin、ZO-1、黏着斑蛋白表达的缺失, 同时间质表型 vimentin、 α -SMA 表达上调, 并伴有张力纤维的形成, 使细胞获得迁移、侵袭的能力, 同时耐受凋亡的能力增加^[11]。在本研究中也发现, 予以 TGF- β 1 诱导后, A549 细胞由原有铺路石状转变为长梭形、纺锤形, 同时细胞间隙增大, E-cadherin 表达下调, 而 vimentin 和 α -SMA 表达上调, 同时伴有细胞增殖、迁移和侵袭能力的增加。而予以 HDAC6 特异性抑制剂 TCS HDAC6 20b 后, 能够显著抑制该变化, 提示 HDAC6 可能在 NSCLC 的 EMT 进程中起到了重要的调控作用。

在本研究中, 采用 ERK1/2 和 ROCK 抑制剂也能够观察到对 TGF- β 1 介导的 A549 细胞发生 EMT 的抑制作用, 并与 HDAC6 的失活有关。ROCK 信号的活化, 能够磷酸化失活微管多聚化促进蛋白 1 (tubulin polymerization promoting protein 1, TPPP1), 从而抑制 TPPP1 对 HDAC6 的抑制作用, 进而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭^[6], 同时能够影响细胞周期蛋白从而促进肿瘤细胞的增殖^[12-13]。而 ERK1/2 信号的活化能够磷酸化 HDAC6 1035 位点, 并促进细胞运动能力的提高, 反过来 HDAC6 也能够激活 ERK1/2 信号促进肿瘤细胞的生长^[7,14]。结合本研究结果, 提示针对 ERK1/2 和 ROCK 信号的阻断, 能够通过调节 HDAC6 的调节, 阻断 A549 细胞的 EMT 的发生, 抑制细胞的增殖、侵袭和转移。

参考文献:

[1] Camidge DR, Doebele RC, Kerr KM. Comparing and contrasting predictive biomarkers for immunotherapy and targeted therapy of NSCLC [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2019, 16(6): 341-355.
[2] Chen HT, Liu H, Mao MJ, et al. Crosstalk between autophagy and epithelial-mesenchymal transition and its application in

cancer therapy [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1):101.
[3] Conte M, De Palma R, Altucci L. HDAC inhibitors as epigenetic regulators for cancer immunotherapy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 98: 65-74.
[4] Kakihana M, Ohira T, Chan D, et al. Induction of E-cadherin in lung cancer and interaction with growth suppression by histone deacetylase inhibition [J]. J Thorac Oncol, 2009, 4(12):1455-1465.
[5] Wang L, Xiang S, Williams KA, et al. Depletion of HDAC6 enhances cisplatin-induced DNA damage and apoptosis in non-small cell lung cancer cells [J]. PLoS One, 2012; 7(9): e44265.
[6] Schofield AV, Steel R, Bernard O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) protein controls microtubule dynamics in a novel signaling pathway that regulates cell migration [J]. J Biol Chem, 2012, 287(52):43620-43629.
[7] Williams KA, Zhang M, Xiang S, et al. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylates histone deacetylase 6 (HDAC6) at serine 1035 to stimulate cell migration [J]. J Biol Chem, 2013, 288(46):33156-33170.
[8] Li C, Cao L, Xu C, et al. The immunohistochemical expression and potential prognostic value of HDAC6 and AR in invasive breast cancer [J]. Hum Pathol, 2018, 75:16-25.
[9] Liu HT, Guo XO, Liu JN, et al. Chlorogenic-induced inhibition of non-small cancer cells occurs through regulation of histone deacetylase 6 [J]. Cell Mol Biol, 2018, 64(10):134-139.
[10] Wang L, Zhang P, Li X, et al. Low-molecular-weight fucoidan attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis: possible role in inhibiting TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through ERK pathway [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(4): 2590-2602.
[11] Miyazono K, Katsuno Y, Koinuma D, et al. Intracellular and extracellular TGF- β signaling in cancer: some recent topics [J]. Front Med, 2018, 12(4):387-411.
[12] Kang CG, Lee HJ, Kim SH, et al. Zerumbone suppresses osteopontin-induced cell invasion through inhibiting the FAK/AKT/ROCK pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. J Nat Prod, 2016, 79(1):156-160.
[13] Grassi ES, Vezzoli V, Negri I, et al. SP600125 has a remarkable anticancer potential against undifferentiated thyroid cancer through selective action on ROCK and p53 pathways [J]. Oncotarget, 2015, 6(34): 36383-36399.
[14] Zhang SL, Zhu HY, Zhou BY, et al. Histone deacetylase 6 is overexpressed and promotes tumor growth of colon cancer through regulation of the MAPK/ERK signal pathway [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 2409-2419.