

综 述

组蛋白去乙酰化酶抑制剂对食管癌细胞抗肿瘤活性及其相关机制的研究进展

吴 健,王晶晶综述,杨鲸蓉,曾志勇审校

【摘要】 食管癌是威胁人类身体健康的严重疾病之一,传统抗肿瘤药物因选择性差易引起较严重的不良反应。随着近年来临床医学研究水平的不断提高,有关肿瘤致病与发病机制的相关基本过程也逐渐被阐明,新型的抗肿瘤药物组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂在临床中广泛应用开来。HDAC 抑制剂能够作用于患者的肿瘤细胞,使肿瘤细胞的增殖受抑制,诱导肿瘤细胞凋亡,具有非常高的临床应用价值。HDAC 抑制剂已经在血液/淋巴系统肿瘤治疗方面取得了一定成果,而 HDAC 抑制剂在食管癌治疗方面的潜力正在被挖掘。HDAC 抑制剂能够抑制食管癌细胞生长并诱导其凋亡,还能增强食管癌细胞的放射敏感性。文章就 HDAC 抑制剂在抗肿瘤方面所取得的效果及对食管癌细胞抗肿瘤活性等问题进行综述。

【关键词】 组蛋白去乙酰化酶;组蛋白去乙酰化酶抑制剂;食管癌;肿瘤

【中图分类号】 R966 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2018)04-0394-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2018.04.015

0 引 言

食管癌是全世界高发的恶性肿瘤之一,近 20 年食管癌的发生率增加了 50%^[1]。在我国,食管癌发病率居各类恶性肿瘤第五位,我国食管癌的发病人数及死亡人数均超出世界 50% 以上^[2]。就目前而言,主流的食管癌治疗方式有如下几类,分别为:化学治疗、放射治疗、外科治疗、综合治疗。食管癌患者即使经过综合治疗,术后 5 年生存率仍小于 30%。食管癌术后高复发率及高死亡率给食管癌的治疗带来了挑战。食管癌发病过程的机制至今未阐明,故寻找食管治疗新靶点提高疗效、减少复发是亟待解决的难题。在表观遗传学理论的基础之上,发现了一类新型靶向抗肿瘤药物,即组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi),其治疗肿瘤效果良好,能够为食管癌的研究和治疗提供新的思路。

1 HDAC 抑制剂

表观遗传学是不涉及 DNA 序列改变的可遗传的基因表达变化研究,主要是从蛋白质、染色质和 RNA 等多个水平调控基因表达^[3]。在食管癌肿瘤的发生发展全过程中,HDAC 其抑制剂起到了关键的调控作用^[4-5]。以乙酰化、磷酸化、甲基化修饰等为代表的组蛋白的共价修饰作用,往往会对基因的表达调控产生重要影响。已有研究结果显示,甲基化、乙酰化在食管癌的发生和发展中具有重要的作用^[6]。组蛋白乙酰化及去乙酰化修饰是基因表达调控最主要的驱动力之一,组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HATs)和 HDACs 发挥了联合催化作用,进而对染色质各区域核心组蛋白的乙酰化程度起到了决定性的作用,直接关乎基因转录活化以及转录抑制间是否能够保持平衡状态。多项研究结果显示,在肿瘤发生与演进过程中, HATs/HDACs 调节的失衡经常扮演了一个关键的角色。HDACs 对肿瘤发生于发展的促进途径是多样化的,分别能从基因转录调控、分化凋亡、信号转到等渠道发挥作用^[7-8]。HDAC 蛋白的表达以及活性会在 HDACi 的作用下被抑制,在这一过程中,组蛋白会迅速恢复乙酰化状态,与此同时, HAT 的催化作用会有所增强,有助于抑制肿瘤细胞的存活^[9]。

基金项目:福建省自然科学基金(2017J01223)

作者单位:350025 福州,福建医科大学福总临床学院(吴 健、王晶晶);350025 福州,福州总医院心胸外科(杨鲸蓉、曾志勇)

通信作者:杨鲸蓉, E-mail: whale0053@163.com

目前所有 HDACi 按照化学结构可分为 4 大类:以 MGCD0103、MS-275 等为代表的苯酰胺类、以 TSA、PXD-101、SAHA 等为代表的异羟肟酸类、以丁酸钠、丙戊酸等为代表的羧酸类、以 Trapoxin、Acidipin、FK-228 等为代表的环肽类。选择性 HDAC 抑制剂与广谱 HDAC 抑制剂是以对 HDAC 的特异性为标准所划分出的两种抑制剂类型,后者又可以细分为 I 类 HDAC 选择性及 II 类 HDAC 选择性这两种类型。大部分异羟肟酸类 HDACi 均会对 I 类、II 类 HDAC 产生广谱抑制作用,而 Tubacin 则会对 HDAC6 产生特异性抑制;MS-275 对 I 类 HDAC 及 HDAC9 具备选择性等^[10-13]。

2 HDACis 抗肿瘤机制

2.1 HDACi 诱导肿瘤细胞凋亡 HDACi 对肿瘤细胞凋亡的诱导作用在诱导肿瘤细胞凋亡体内与体外的实验研究中均得到了证实,HDACi 诱导细胞凋亡的途径有分多种,目前研究比较明确的有外源性途径、内源性途径、活性氧产生与激活的调控途径。诱导外源性凋亡的途径即上调死亡受体、提高受体通路以及耐受性,进而调控相关蛋白的合成与表达。最主要可以诱导死亡受体 5 表达,此时 HDACi 与死亡受体将产生协同作用,通过激活 caspase3、caspase9、caspase10,促使肿瘤细胞凋亡。这也是 HDACi 对肿瘤细胞选择性杀伤作用的机制之一^[14]。诱导内源性凋亡的途径亦被称作线粒体途径,主要依靠以线粒体/细胞色素 c 介导的的凋亡途径来激活 caspase,进而诱导肿瘤细胞凋亡^[15]。调控与凋亡相关的蛋白 HDACi 能够诱导细胞凋亡,主要依靠对家族蛋白中的促凋亡担保、抗凋亡蛋白的上调或下调作用来实现,进而使多条信号转导通路活化,诱导细胞凋亡。但受肿瘤细胞中促凋亡蛋白以及抗凋亡蛋白基础水平差异的影响,HDACi 增强促凋亡蛋白与降低抗凋亡蛋白作用往往也会有所不同。

2.2 HDACi 诱导肿瘤细胞周期停滞 细胞周期调控异常是肿瘤发生的重要机制。HDACi 可以通过调节细胞周期蛋白和细胞周期蛋白激酶抑制物的表达,诱导肿瘤细胞发生 G1 和/或 G2 期停滞。尽管不同类 HDACi 的化学结构存在较大差异,但基因调控模式却十分相似。HDACi 诱导激活 *CDKN1A* 基因最常见。*CDKN1A* 编码 p21^{cipl},p21 可以抑制 CDK2 和 CDK4/6 的活性,使去磷酸化 Rb 水平升

高,抑制转录因子 E2F 所调控基因的激活,使细胞周期停滞于 G1 期。此外,HDACi 可使多种细胞发生 G2 期停滞,这可能是因为 HDACi 特异性抑制 cyclinD1 启动子组蛋白 H4 的乙酰化水平,抑制 G2 期 cyclinD1 的转录和表达^[16]。

2.3 HDACi 促进肿瘤细胞分化 诱导细胞发生分化从定义上来讲,诱导细胞分化的核心在于发挥诱导分化剂的作用,诱导肿瘤细胞的分化途径,使其接近于正常细胞的生长方式或生长速度等,尽可能的诱使其朝着正常细胞转变。诱导肿瘤细胞分化的特点在于诱导肿瘤细胞向高分化的方向转变,而不是单纯的杀伤肿瘤细胞^[17]。由此可见,这种治疗方式更为安全,对患者的损伤更小。就现阶段而言,此项技术在肿瘤治疗领域已经得到了认可与应用。

2.4 HDACi 抑制肿瘤细胞血管的生成 HDACi 对肿瘤习惯生成的抑制作用主要依靠对肿瘤细胞中的低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 与血管内皮因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 受体降解的抑制来发挥作用^[18]。相关研究表明,无论在生物体内还是体外,FK228 均会对血管的生成产生强抑制作用。以未处理的细胞作为空白对照,对比 FK228 处理 24 h 的 Hela 细胞,处理过的细胞中的 VEGF 受体、FLT 等表达严重受滞,且这些因子大多为刺激血管生成的因子。与此同时,以 pVHL、NF 等为代表的抑制血管生成因子则被诱导表达^[19]。因此,在许多文献中都将 HDACi 列为一种新型抗肿瘤药物,集中阐释了其对 HDAC 的抑制作用,强调了其在抗肿瘤血管生成、肿瘤细胞诱导凋亡等方面的特性。

3 HDACis 抗肿瘤优势

相比于其他抗肿瘤药物,HDACis 的优势是显而易见的,突出体现在如下几个方面:首先,HDACis 会在不显著危害正常组织细胞的同时对肿瘤细胞产生生长抑制或放射增敏作用。就目前而言,已经逐步开启了 HDACis 抗肿瘤治疗的临床一期以及二期研究。以 LAQ824、pyroxamide、MS-275、SA-HA 等为代表的新型 HDACis 的发现,有望为肿瘤治疗带来新的希望。随着此领域研究工作的不断深入,新的 HDACis 对于肿瘤疾病的治疗价值已经得到广泛认可,相关临床实验工作也在有序展开。其次,

HDACis 既能够单独作为抗癌药物而使用,还能够与其他抗癌药物或放疗联用,达到协同增效的作用。HDACis 与全反式维甲酸联合应用于急性早幼粒细胞白血病的治疗,取得了良好的临床效果。此外,组蛋白去乙酰化酶抑制剂能够对膀胱肿瘤有一定的抗癌效应,其不仅表现在能够阻滞膀胱肿瘤细胞周期和诱导细胞凋亡,而且还能够提高顺铂对顺铂耐药的人膀胱癌细胞的协同抗肿瘤作用。主要机制表现为阻滞细胞周期与激活凋亡基因^[20]。另外,目前医学界也就去乙酰化酶抑制剂苯甲酰胺 CI-994 与传统抗癌药吉西他滨的联用展开了临床试验,并取得了理想的预期效果。随着对肿瘤发生机制及 HDACis 构效关系地深入研究,HDACis 的设计开发对肿瘤的治疗产生重要意义。

4 HDACis 与食管癌的关系

目前 HDACis 在食管癌中的应用尚处于起步阶段,国内外其相关的研究并不多。Murakami 等^[21]研究了一种新型的 HDAC 抑制剂 CHAP31,可诱导 caspase9 的裂解和上调 Bax/Bcl-2 比率,从而诱导食管癌细胞凋亡。Furutani 等^[22]应用新型 HDAC 抑制剂 OBP-801/YM753 可抑制氟尿嘧啶诱导的胸苷酸合成酶的表达,增强食管癌细胞对氟尿嘧啶和放疗的敏感性。Tzao 等^[23]在体外及小鼠肿瘤模型中应用 HDAC 抑制剂 SAHA 可诱导食管癌细胞 E-cadherin 的表达,抑制食管癌细胞迁移,侵袭和细胞外基质黏附。

近年的研究发现 HDACs 在食管癌的发生和发展中具有一定作用。Toh 等^[24]研究表明食管癌细胞的组蛋白 H4 在肿瘤侵袭的早期阶段显著增加了高乙酰化,此后,根据肿瘤进展程度,转化为低乙酰化。若食管癌患者的癌细胞低表达 HDAC1,那么其会面临着较高的癌细胞侵犯食道壁深层的风险。Langer 等^[25]发现 HDAC2 高表达与食管腺癌的肿瘤侵袭性相关。这提示 HDAC2 与肿瘤的分化、增殖、侵袭、疾病进展和不良预后有关。在食管鳞癌患者,癌组织和癌旁组织中 HDAC2 呈现高表达。HDAC 抑制剂 TSA 通过抑制 HDAC2 的表达,减少 HDAC2 诱导的 MMP-2 和 MMP-9 表达,达到抗肿瘤侵袭作用^[26]。Zhang 等^[27]通过实时 RT-PCR 检测食管癌标本及癌旁组织发现 HDAC1 高表达。利用质粒为基础的 RNA 干扰(RNAi)降低 HDAC1 的表

达,结果表明,通过抑制 HDAC1 的表达可诱导食管癌细胞凋亡,并增强食管癌细胞的放射敏感性。Chen 等^[28]研究表明 NAD(+) 依赖的 III 型 HDAC (SIRT1) 与食管癌淋巴管浸润及预后相关。因此,HDACs 可成为食管癌治疗的新靶点。

5 HDAC 及其抑制剂的抗食管肿瘤细胞活性

5.1 丙戊酸钠(valproic acid, VPA) VPA 属于传统抗癫痫药物的一种,被归于短链脂肪酸(SCFA)的范畴内。其优势在于患者耐受性好且不会产生明显的副作用。研究显示,丙戊酸具有 HDACi 活性,能特异性的作用于 HDAC I 与 HDAC II,具有明确的抗肿瘤作用^[29]。目前关于丙戊酸应用食管癌的研究少见,仅 2 篇文献报道应用丙戊酸作为食管癌细胞放射增敏剂。丙戊酸可通过抑制非同源末端连接,延长放射诱导的食管癌 DNA 双链断裂;另外,丙戊酸可诱导组蛋白 H3 和组蛋白 H4 的乙酰化及诱导细胞凋亡,因此,丙戊酸可作为食管鳞癌放疗的增敏剂,提高放射疗效^[30-31]。但丙戊酸对食管癌细胞的直接作用尚未见报道。

5.2 曲古霉素 A(trichostatin A, TSA) 曲古霉素 A 亦称曲古抑菌素 A(TSA)的药用价值在近些年来被挖掘出来,被人们视作一类新型抗肿瘤药物。但是,受 HDACi 药物以及肿瘤特异性的影响,目前尚未完全阐明这种抑制剂的具体机制。已有研究结果显示,TSA 能够对多种肿瘤细胞的增殖产生抑制作用,主要通过剂量依赖性以及时间依赖性方式来发挥作用^[32]。EC9706 细胞会在施加以特定浓度 TSA 的条件下发生凋亡现象,这一过程主要与 TSA 作用 EC9706 细胞引起 Bax、Bcl-2 及 caspase.8、caspase.9 表达水平改变有关。Dong 等^[33]研究表明 HDAC 抑制剂曲古抑菌素 A 和丁酸钠可通过调节 Bmi-1 的表达,逆转食管鳞 KYSE-150R 细胞获得性放射抵抗。Ma 等^[34]研究表明 HDAC 抑制剂 TSA 通过抑制 PI3K/Akt 和 ERK1/2 通路激活,可抑制食管癌细胞生长。

5.3 丁酸钠(sodium butyrate) 丁酸钠属于肠道黏膜营养剂的一种,其属于四碳脂肪酸盐。相关文献显示,丁酸钠能够对多种肿瘤细胞的增殖产生抑制作用,最典型的为结肠癌、肝癌、胃癌等,通过对肿瘤细胞分化以及基因表达等生理活动的影响,引发细胞凋亡现象。研究表明丁酸钠通过超乙酰化

导致 DNA 和组蛋白分离,对 *NDRG1* 基因表达产生诱导作用并对食管癌 EC9706 细胞生长产生抑制作用^[35]。在这一过程中,食管癌细胞分化会受到刺激而增强。因此,丁酸钠可作为食管癌的诱导分化剂。

6 展 望

通过本研究可知,国内外学者就组蛋白去乙酰化酶抑制剂在肿瘤治疗领域的作用进行了深入的探究。就现阶段而言,组蛋白去乙酰化酶抑制剂已经逐渐成为一种前景较好的新型抗肿瘤药物。组蛋白去乙酰化酶抑制剂在食管癌治疗领域的应用价值极高,其能够对食管癌细胞的生长产生抑制作用,增强食管癌细胞的放射敏感性并诱导其凋亡。不过,从客观上来讲,目前关于此课题的研究尚未成熟,如尚未探明组蛋白去乙酰化酶抑制剂诱导食管癌细胞停滞与凋亡的具体机制,尚未探索出对食管癌特别敏感的组蛋白去乙酰化酶抑制剂的合成筛选途径等。另外目前还并未针对组蛋白去乙酰化酶抑制剂单独使用以及与其他药物合并使用的问题进行临床实验对比。尽管已有研究仍然有诸多不成熟之处,但是从客观上来讲,随着此领域研究工作的不断深入,组蛋白去乙酰化酶抑制剂在食管癌临床治疗领域的价值必然会不断增强,食管癌患者的生存率也将大幅提升。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Lin Y, Totsuka Y, He Y, *et al.* Epidemiology of esophageal cancer in Japan and China[J]. *J Epidemiol*, 2013, 23(4):233-242.
- [3] Luo Z, Lin C. Enhancer, epigenetics, and human disease[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 21, 36:27-33.
- [4] Ahrens TD, Werner M, Lassmann S. Epigenetics in esophageal cancers[J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 356(3):643-655.
- [5] Croagh D, Frede J, Jones PH, *et al.* Esophageal stem cells and genetics/epigenetics in esophageal cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1325:8-14.
- [6] Singh V, Singh LC, Singh AP, *et al.* Status of epigenetic chromatin modification enzymes and esophageal squamous cell carcinoma risk in northeast Indian population[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 15, 5(3):979-999.
- [7] Icardi L, De Bosscher K, Tavernier J. The HAT/HDAC interplay: multilevel control of STAT signaling[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2012, 23(6):283-291.
- [8] Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011:371832.
- [9] Matthews GM, Newbold A, Johnstone RW. Intrinsic and extrinsic apoptotic pathway signaling as determinants of histone deacetylase inhibitor antitumor activity[J]. *Adv Cancer Res*, 2012, 116:165-197.
- [10] Saito T, Nishida K, Furumatsu T, *et al.* Histone deacetylase inhibitors suppress mechanical stress-induced expression of RUNX-2 and ADAMTS-5 through the inhibition of the MAPK signaling pathway in cultured human chondrocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(1):165-174.
- [11] Knipstein J, Gore L. Entinostat for treatment of solid tumors and hematologic malignancies[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011, 20(10):1455-1467.
- [12] Ozaki T, Wu D, Sugimoto H, *et al.* Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) inhibits p53-dependent apoptosis through the collaboration with HDAC6 in response to DNA damage[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e610.
- [13] Lopez G, Bill KL, Bid HK, *et al.* HDAC8, A Potential Therapeutic Target for the Treatment of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors (MPNST) [J]. *PLoS One*, 2015, 22, 10(7):e0133302.
- [14] Makita N, Ninomiya I, Tsukada T, *et al.* Inhibitory effects of valproic acid in DNA double-strand break repair after irradiation in esophageal squamous carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(3):1185-1192.
- [15] 李宽钰. 线粒体铁代谢与人类疾病的基础研究[J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(1):24-28.
- [16] Marks PA. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as tar-geted anticancer drugs[J]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2010, 19:1049-1066.
- [17] 张国祥, 黄淑清, 苏 标, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂抗肿瘤机制研究进展[J]. *中国现代药物应用*, 2014, 8(13):238-240.
- [18] 徐 伟, 刘 政, 季国忠. 血管内皮生长因子在消化系统肿瘤中的研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2009, 22(10):1084-1087.
- [19] Ozaki T, Wu D, Sugimoto H, *et al.* Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) inhibits p53-dependent apoptosis through the collaboration with HDAC6 in response to DNA damage[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e610.
- [20] 刘志欢, 傅 斌, 王共先. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂在膀胱肿瘤中的研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(5):2105-2106.
- [21] Murakami K, Matsubara H, Hoshino I, *et al.* CHAP31 induces apoptosis only via the intrinsic pathway in human esophageal cancer cells[J]. *Oncology*, 2010, 78(1):62-74.
- [22] Furutani A, Sowa Y, Fujiwara H, *et al.* The novel HDAC inhibitor OBP-801/YM753 enhances the effects of 5-fluorouracil with radiation on esophageal squamous carcinoma cells[J]. *Oncol*

- Res, 2014, 21(5):281-286.
- [23] Tzao C, Jin JS, Chen BH, *et al.* Anticancer effects of suberoylanilide hydroxamic acid in esophageal squamous cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Dis Esophagus*, 2014, 27(7):693-702.
- [24] Toh Y, Yamamoto M, Endo K, *et al.* Histone H4 acetylation and histone deacetylase 1 expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(2):333-338.
- [25] Langer R, Mutze K, Becker K, *et al.* Expression of class I histone deacetylases (HDAC1 and HDAC2) in oesophageal adenocarcinomas: an immunohistochemical study[J]. *J Clin Pathol*, 2010, 63(11):994-998.
- [26] Wang F, Qi Y, Li X, *et al.* HDAC inhibitor trichostatin A suppresses esophageal squamous cell carcinoma metastasis through HDAC2 reduced MMP-2/9[J]. *Clin Invest Med*, 2013, 36(2):E87-94.
- [27] Zhang B, Wang Y, Pang X. Enhanced radiosensitivity of EC109 cells by inhibition of HDAC1 expression[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(1):340-348.
- [28] Chen GQ, Tian H, Yue WM, *et al.* SIRT1 expression is associated with lymphangiogenesis, lymphovascular invasion and prognosis in pN0 esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cell Bio Sci*, 2014, 4:48.
- [29] Yang H, Maddipati S, Quesada A, *et al.* Analysis of class I and II histone deacetylase gene expression in human leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(12):3426-3433.
- [30] Makita N, Ninomiya I, Tsukada T, *et al.* Inhibitory effects of valproic acid in DNA double-strand break repair after irradiation in esophageal squamous carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(3):1185-1192.
- [31] Shoji M, Ninomiya I, Makino I, *et al.* Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(6):2140-2146.
- [32] Činčárová L, Zdráhal Z, Fajkus J. New perspectives of valproic acid in clinical practice[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2013, 22(12):1535-1547.
- [33] Dong Q, Sharma S, Liu H, *et al.* HDAC inhibitors reverse acquired radio resistance of KYSE-150R esophageal carcinoma cells by modulating Bmi-1 expression[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 224(1):121-129.
- [34] Ma J, Guo X, Zhang S, *et al.* Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and promotes apoptosis of esophageal squamous cell lines[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6):4525-4531.
- [35] 尹惠卿, 张 岚, 贺付成, 等. 丁酸钠对食管癌细胞增殖的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(13):1158-1160.

(收稿日期:2017-12-19; 修回日期:2018-04-19)

(责任编辑:刘玉巧)