

# 组蛋白去乙酰化下调对肾细胞癌 *BNIP3* 基因表达的影响

刘健帮<sup>1,2</sup>, 王海舟<sup>1,2</sup>, 刘振华<sup>1,2</sup>, 徐苗<sup>3</sup>, 李响<sup>1,2△</sup>

1. 四川大学华西医院 泌尿外科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 泌尿外科研究所(成都 610041);  
3. 四川大学华西医院 病理研究室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 探讨肾细胞癌中线粒体促凋亡蛋白 *BNIP3* 表达下调机制。方法 运用 CCK-8 法及流式细胞技术检测组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古霉素 A(TSA)对肾癌细胞株 786-O、ACHN、A498 增殖、凋亡的影响;运用实时荧光定量 PCR(Q-PCR)和蛋白质免疫印记(Western blot)技术检测 TSA 对肾癌细胞 *BNIP3* 表达的影响;运用染色质免疫沉淀(ChIP)技术检测 TSA 对肾癌细胞 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白 H3 乙酰化状态的影响。结果 经 TSA 处理后,3 种肾癌细胞增殖均受到显著抑制( $P < 0.05$ ),细胞早期凋亡明显增加,*BNIP3* mRNA( $P < 0.05$ )和蛋白表达水平上调。786-O、ACHN 的 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白 H3 呈去乙酰化状态,TSA 恢复了其乙酰化状态;A498 的 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白 H3 呈乙酰化状态。结论 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白去乙酰化是其在肾癌中表达下调的主要机制,并可能参与了肾癌的发生发展。

**【关键词】** 肾细胞癌 *BNIP3* 组蛋白去乙酰化 曲古霉素 A 染色质免疫沉淀

**Histone Deacetylation Down-regulates the Expression of *BNIP3* in Renal Cell Carcinoma** LIU Jian-bang<sup>1,2</sup>, WANG Hai-zhou<sup>1,2</sup>, LIU Zhen-hua<sup>1,2</sup>, XU Miao<sup>3</sup>, LI Xiang<sup>1,2△</sup>. 1. Department of Urology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Institute of Urology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: xiangli.87@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the down-regulation mechanism of (bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3 (*BNIP3*) expression in renal cell carcinoma (RCC). **Methods** RCC cell lines 786-O, ACHN and A498 were treated with different concentrations of histone deacetylase inhibitor TSA. Thereafter, the proliferation of RCC cells was determined with CCK-8 assay, cell apoptosis was observed by flow cytometry, and the expression levels of *BNIP3* were determined by Q-PCR and Western blot, and the acetylation status of histone H3 in the promoter of *BNIP3* was detected by ChIP. **Results** After the treatment with TSA, the proliferation of the three RCC cell lines was significantly inhibited ( $P < 0.05$ ), the early apoptosis of cells obviously increased, and the expression levels of *BNIP3* mRNA ( $P < 0.05$ ) and protein were up-regulated. The histone H3 in *BNIP3* promoter of both 786-O and ACHN was deacetylated, while the histone H3 in *BNIP3* promoter of A498 was acetylated. **Conclusion** Histone deacetylation may be the important mechanism of *BNIP3* silencing in RCC.

**【Key words】** Renal cell carcinoma *BNIP3* Histone deacetylation TSA ChIP

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)简称肾癌,是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,其对放化疗不敏感,约 40% 的患者最终死于肿瘤进展,致死性强。近年来分子靶向药物治疗肾癌取得显著进展,这主要得益于肾癌分子发病机制研究的不断深入,尤其是肾透明细胞癌(clear cell RCC, ccRCC)中 Von Hippel-Lindau 基因(*VHL*)-低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)-缺氧反应基因通路的阐明<sup>[1]</sup>。*BNIP3*(bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3)是一种线粒体促凋亡蛋白,可

通过线粒体相关途径诱导细胞凋亡、坏死及自噬<sup>[2-3]</sup>。*BNIP3* 基因启动子中存在缺氧反应原件(hypoxia response element, HRE),是 HIF 调控的下游缺氧反应基因之一<sup>[4]</sup>。现有研究表明,ccRCC 中 *BNIP3* 呈低表达,与癌组织中 HIF 的高表达相矛盾,提示可能存在某种调控机制下调 *BNIP3* 的表达<sup>[5]</sup>。目前 *BNIP3* 在肾癌中的研究不多,其表达下调的机制仍不明确。本研究利用组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)抑制剂曲古霉素 A(trichostatin A, TSA)处理肾癌细胞株 786-O、ACHN、A498,通过检测 TSA 对肾癌细胞增殖、凋亡、*BNIP3* 表达以及 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白

H3 乙酰化状态的影响,探讨组蛋白乙酰化/去乙酰化修饰与肾癌 *BNIP3* 表达的关系,明确肾癌中 *BNIP3* 表达下调机制,为寻找新的肾癌治疗策略和靶点奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肾透明细胞癌细胞株 786-O,人肾细胞癌细胞株 A498、ACHN,均由四川大学华西医院病理研究室提供、鉴定并保存。RPMI1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco,USA)。Trizol 试剂(Carlsbad,USA)。DEPC、氯仿、异丙醇(Sigma,USA)。随机逆转录引物 5'-(dN)9-3'(TaKaRa,大连)。逆转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase RnaseH(TOYOBO,Japan)。Taq DNA 聚合酶(天根,北京)。dNTP 混合物(Roche Diagnostics,Germany)。SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa,大连)。*BNIP3* 鼠抗人单克隆抗体(Sigma,USA)。*GAPDH* 鼠抗人单克隆抗体(Sigma,USA)。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(Zymed,USA)。TSA(Sigma,USA)。CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC 试剂盒(DOJINDO,JAPAN)。染色质免疫沉淀(ChIP)试剂盒(碧云天,中国)。ChIP 乙酰化组蛋白 H3 多克隆抗体 Anti-Acetyl-Histone H3 (Millipore,USA)。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计与合成** 根据 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 获得 *BNIP3* 基因启动子区序列以及成熟 mRNA 序列,并用 Primer5 软件设计相应的 PCR 扩增引物,由上海 Invitrogen 公司合成。相关引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

Table 1 The primer sequences of target gene

Gene	Sequence	Product /bp
<i>BNIP3</i>	F:5'-ACCAACAGGGCTTCTGAAC-3' R:5'-GAGGGTGGCCGTGCGC-3'	204
<i>BNIP3</i> (ChIP primer)	F:5'-AGCGGAAATTGAGAAAGCGA-3' R:5'-TCCATCCTGCTAGTGGGAA-3'	548
<i>GAPDH</i>	F:5'-GTCTTACCACCATGAGAA-3' R:5'-ATCCACAGTCTTCTGGGTGG-3'	268

**1.2.2 细胞培养** 人肾透明细胞癌细胞株 786-O 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,人肾细胞癌细胞株 A498、ACHN 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中培养。取处于对数期生长的细

胞进行后续实验。

**1.2.3 细胞增殖实验** 将处于对数期生长的肾癌细胞消化成单个细胞悬液,以每孔  $3 \times 10^3$  细胞接种于 2 块 96 孔培养板中,每组设 5 个复孔,培养 24 h 后换液,分别加入终浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、1.0  $\mu\text{mol/L}$ 、2.0  $\mu\text{mol/L}$  的含 TSA 的培养基,每孔 200  $\mu\text{L}$ 。阴性对照(control)只换液不加药,空白对照不含细胞。继续培养,每 24 h 更换相应培养基。分别于 0 h、24 h、48 h、72 h 取出培养板,加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,继续培养 2 h,酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度(OD)值,根据 OD<sub>450</sub> 值绘制细胞增殖曲线。

**1.2.4 细胞凋亡实验** 将处于对数期生长的肾癌细胞消化成单个细胞悬液,以每孔  $1.2 \times 10^6$  细胞接种于 6 孔培养板中,培养 24 h 后换液,分别加入终浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、1.0  $\mu\text{mol/L}$ 、2.0  $\mu\text{mol/L}$  的含 TSA 的培养基,每孔 2 mL,阴性对照只换液不加药。继续培养,加药后 48 h 分别收集 1 孔细胞沉淀,洗涤细胞 2 次后,加入预先配好的  $1 \times$  Annexin V Binding Solution 100  $\mu\text{L}$  重悬细胞。将上述细胞悬液移至流式管,避光依序加入 2  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 结合物、1  $\mu\text{L}$  PI Solution。1  $\times$  Annexin V Binding Solution 补足 500  $\mu\text{L}$  后,1 h 内流式细胞仪上机检测。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR(Q-PCR) 检测肾癌细胞 *BNIP3* mRNA 表达** 肾癌细胞处理方法同 1.2.4。加药后 24 h 参照 Trizol 试剂说明书,提取 6 孔板 1 孔细胞总 RNA,最后溶于 20  $\mu\text{L}$  经 DEPC 处理的 ddH<sub>2</sub>O 中,紫外分光光度计检测其浓度和纯度。取 2 g 总 RNA 逆转录成 cDNA,取 1  $\mu\text{L}$  cDNA 为模板行 Q-PCR。扩增反应条件为:预变性 95 °C 1 min,95 °C 10 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s 进行 40 个循环。最后从 65 °C 持续升温到 95 °C 绘制熔解曲线。以 *GAPDH* 为内参,每组设 3 个复孔,以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值计算相对拷贝数。

**1.2.6 Western blot 检测肾癌细胞 *BNIP3* 蛋白表达** 除不设 200  $\mu\text{mol/L}$  TSA 浓度组外,肾癌细胞处理方法同 1.2.4。加药后 48 h 收集 6 孔板 1 孔细胞沉淀,加入 100  $\mu\text{L}$  含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白。BCA 法蛋白定量,−80 °C 冻存储备用。50 g 上样量,聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转至 PVDF 膜,10% 脱脂奶粉 TBST 常温封闭 60 min,*BNIP3* 鼠抗人单克隆抗体 4 °C 摇床孵育过夜,工作浓度 1 : 3 000。洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,工作浓度 1 : 5 000,37 °C

摇床孵育 2 h。洗涤后化学发光,曝光,显影。以 GAPDH 为内参,用 Quantity One 软件进行灰度值分析。

**1.2.7 ChIP 检测肾癌细胞 *BNIP3* 启动子区组蛋白乙酰化状态** 将处于对数期生长的肾癌细胞消化成单个细胞悬液,接种于 2 块直径 10 cm 的细胞培养皿中,培养 24 h 后换液,实验组加入终浓度为  $1.0 \mu\text{mol/L}$  的含 TSA 的培养基,对照组只换液不加药,每块培养皿培养基 10 mL。继续培养 48 h,参照 ChIP 试剂盒说明书,细胞经甲醛固定交联、甘氨酸终止交联、裂解、超声剪切后,取  $20 \mu\text{L}$  样品(含基因组 DNA)作为 Input,此为阳性对照。余下样品经非特异性沉淀处理后均分为两份,一份加入乙酰化组蛋白 H3 多克隆抗体  $1 \mu\text{g}$ (工作浓度 1:1 000),一份加入正常兔 IgG 抗体  $1 \mu\text{g}$ ,此为阴性对照。经一抗特异性结合、二抗特异性沉淀、洗涤、洗脱、解交联、DNA 纯化,最终目的基因行 PCR 检测。PCR

反应条件为:预变性  $95^\circ\text{C}$  1 min,  $95^\circ\text{C}$  10 s,  $55^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  30 s 进行 35 个循环,  $72^\circ\text{C}$  延伸 5 min。产物经  $20 \text{g/L}$  琼脂糖凝胶电泳定性分析,阳性条带代表 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白 H3 发生了乙酰化,阴性则代表 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白 H3 发生了去乙酰化。

**1.2.8 统计学方法** 多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 法,  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 TSA 抑制肾癌细胞增殖

细胞增殖实验结果如图 1 所示。相对于未加药组(control),786-O、ACHN、A498 分别经不同浓度 TSA 处理后,细胞增殖均受到了抑制,其中以 72 h 的差异最为显著,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。各 TSA 浓度组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 2.2 TSA 促进肾癌细胞凋亡

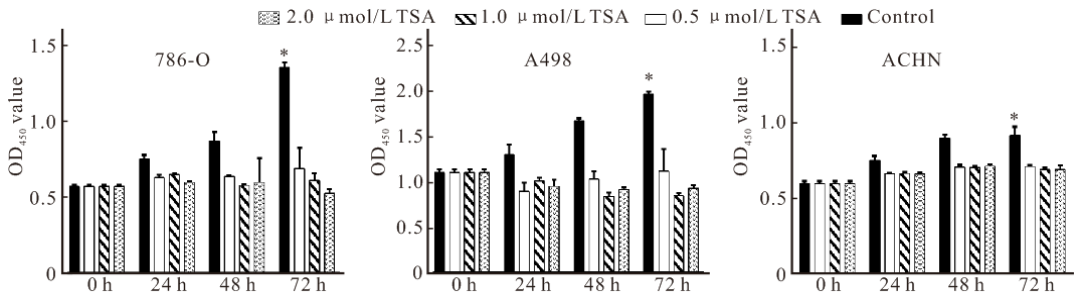


图 1 不同浓度 TSA 对肾癌细胞增殖的影响

Fig 1 Effect of different concentrations of TSA on proliferation in RCC cell lines

\*  $P<0.05$ , vs. other groups at the same time point

流式细胞学结果显示:相对于未加药组,786-O、ACHN、A498 分别经  $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.0 \mu\text{mol/L}$  的 TSA 处理 48 h 后,细胞早期凋亡明显增加;786-O 晚期凋亡及坏死亦有所增加。见表 2。

### 2.3 TSA 上调肾癌细胞 *BNIP3* 的表达

#### 2.3.1 TSA 上调肾癌细胞 *BNIP3* mRNA 的表达

水平 见图 2。设未加药组(control) *BNIP3* 表达量为 1,786-O 分别经不同浓度的 TSA 处理 24 h 后, *BNIP3* mRNA 表达水平上调,与未加药组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ),各 TSA 浓度组间差异无统计学意义。TSA 也可使 A498、ACHN 中 *BNIP3* mRNA 表达水平上调,与未加药组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但上调幅度小于 786-

表 2 各 TSA 浓度组肾癌细胞凋亡率

Table 2 The apoptosis rates in RCC cell lines treated with TSA

Cell	Stage	TSA			
		$0 \mu\text{mol/L}$	$0.5 \mu\text{mol/L}$	$1.0 \mu\text{mol/L}$	$2.0 \mu\text{mol/L}$
786-O	Early apoptosis	(0.61±0.07)%	(5.79±1.56)%*	(6.74±1.31)%*	(9.91±2.17)%*
	Late apoptosis and necrosis	(2.35±0.09)%	(5.47±1.86)%*	(6.23±1.44)%*	(9.89±2.49)%*
A498	Early apoptosis	(0.81±0.04)%	(18.87±1.49)%*	(18.10±2.65)%*	(19.37±2.40)%*
	Late apoptosis and necrosis	(0.85±0.08)%	(0.75±0.12)%	(0.68±0.13)%	(0.95±0.22)%
ACHN	Early apoptosis	(1.50±0.06)%	(25.12±3.10)%*	(23.50±2.20)%*	(22.43±1.90)%*
	Late apoptosis and necrosis	(1.25±0.43)%	(0.55±0.29)%	(0.50±0.26)%	(0.49±0.36)%

\*  $P<0.05$ , vs. control group ( $0 \mu\text{mol/L}$  TSA) at the same stage in the same cell line

O;各 TSA 浓度组间差异无统计学意义。

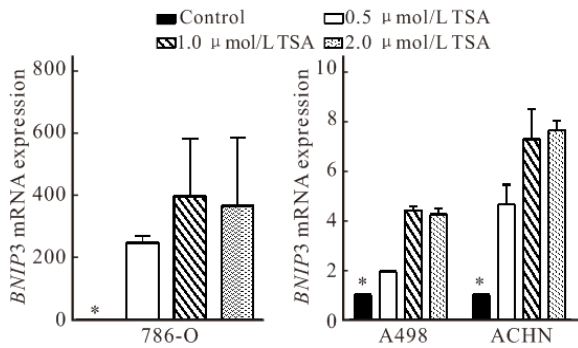


图 2 不同浓度 TSA 对肾癌细胞株 786-O、A498、ACHN 中 *BNIP3* mRNA 表达的影响

Fig 2 Effect of different concentrations of TSA on the expression of *BNIP3* mRNA in 786-O, A498 and ACHN

\*  $P < 0.05$ , vs. other groups

2.3.2 TSA 上调肾癌细胞 *BNIP3* 蛋白的表达水平 见图 3、表 3。786-O、ACHN、A498 中 *BNIP3* 几乎不表达。相对于未加药组，786-O、ACHN、A498 分别经 0.5 μmol/L、1.0 μmol/L 的 TSA 处理 48 h 后，*BNIP3* 蛋白的表达水平上调 ( $P$  均  $< 0.05$ )，以 786-O 最为突出，与 Q-PCR 结果相符。

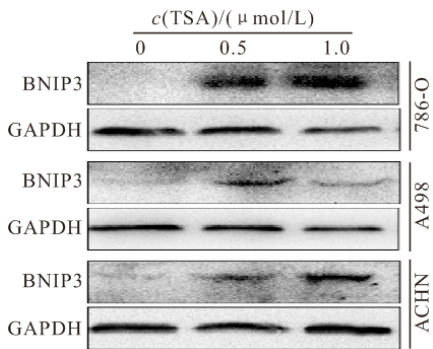


图 3 不同浓度 TSA 对肾癌细胞 *BNIP3* 蛋白表达的影响

Fig 3 Effect of different concentrations of TSA on the expression of *BNIP3* protein in RCC cell lines

$M_r(\text{BNIP3}) = 30 \times 10^3$ ;  $M_r(\text{GAPDH}) = 36 \times 10^3$

表 3 各 TSA 浓度组肾癌细胞中 *BNIP3* 蛋白的相对表达量

Table 3 Relative expression of *BNIP3* protein in RCC cell lines treated with TSA

RCC cell line	TSA		
	0 μmol/L	0.5 μmol/L	1.0 μmol/L
786-O	0.11 ± 0.01	1.52 ± 0.35*	5.04 ± 1.22*
A498	0.13 ± 0.01	0.93 ± 0.19*	0.49 ± 0.22*
ACHN	0.14 ± 0.01	0.65 ± 0.11*	0.73 ± 0.14*

\*  $P < 0.05$ , vs. control (0 μmol/L TSA)

2.4 肾癌细胞 *BNIP3* 启动子区组蛋白乙酰化状态 见图 4。786-O、ACHN 的 *BNIP3* 基因启动子

区组蛋白 H3 呈去乙酰化状态，A498 的 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白 H3 呈乙酰化状态。即经 1.0 μmol/L 的 TSA 处理 48 h 后，786-O、ACHN 的 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白 H3 恢复了乙酰化，A498 则无变化。

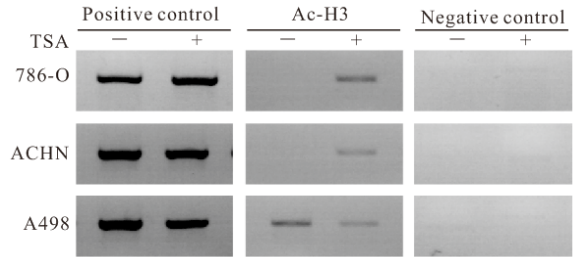


图 4 TSA 对肾癌细胞 *BNIP3* 启动子区组蛋白 H3 乙酰化状态的影响

Fig 4 Effect of TSA on the acetylation status of histone H3 of *BNIP3* promoter in RCC cell lines

Ac-H3: The acetylated histone H3

### 3 讨论

组蛋白乙酰化/去乙酰化是一种与肿瘤发生密切相关的表观遗传学机制，在真核生物的基因表达调控中发挥重要作用。通常情况下，组蛋白乙酰化激活基因表达；组蛋白去乙酰化则抑制基因表达。*BNIP3* 是一种线粒体促凋亡蛋白，可介导细胞的凋亡、坏死以及自噬，在多种肿瘤的发生发展中起着重要作用。已有研究表明，在胃癌、结直肠癌、胰腺癌和血液系统等肿瘤中 *BNIP3* 表达缺失<sup>[6]</sup>，且这种表达缺失与肿瘤的侵袭、转移和患者的不良预后密切相关<sup>[7]</sup>。目前 *BNIP3* 在肾癌中的研究相对缺乏，其表达下调机制及其在肾癌分子发病中所起的作用仍不明确。本研究结果发现，肾癌细胞株 786-O、ACHN 的 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白 H3 处于去乙酰化状态，经 HDACs 抑制剂 TSA 处理后，恢复了其乙酰化状态，同时上调肾癌细胞 *BNIP3* 表达，抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡。因此认为，组蛋白去乙酰化很可能是肾癌 *BNIP3* 表达下调的主要原因，并参与了肾癌的发生发展。

RCC 中约 75% 为 ccRCC，现有研究表明，ccRCC 中多数因 VHL 失活致 HIF 高水平蓄积，进一步激活下游缺氧反应基因血管内皮生长因子 (VEGF)、血小板衍生因子 (PDGF)、转化生长因子 (TGF-α) 等过表达，促进细胞增殖和新生血管形成，进而在肿瘤的发生发展中发挥重要作用<sup>[1, 8]</sup>。*BNIP3* 作为 HIF 下游的缺氧反应基因，理论上在

ccRCC 中也应激活表达。然而,罗琳等<sup>[9]</sup>应用免疫组化检测了 104 例肾透明细胞癌和 48 例癌旁正常肾组织后发现,肾透明细胞癌中 HIF-1、VEGF 多为高表达,而 BNIP3 多为低表达,且与 HIF-1、VEGF 的表达无相关性。黄龙等<sup>[5]</sup>应用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测了 30 例肾透明细胞癌及癌旁正常肾组织后也获得了同样的结果。而我们的前期研究也发现,相对于正常肾小管上皮细胞 HK-2,肾癌细胞株 786-O、ACHN、A498、GRC 中 BNIP3 呈低表达或不表达<sup>[10]</sup>。故而推测可能存在某种下调机制使得肾透明细胞癌中 BNIP3 表达下调。

MURAI 等<sup>[11]</sup>发现在结直肠癌和胃癌细胞株中,DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化是 BNIP3 表达下调的调控机制。BACON 等<sup>[12]</sup>也在结直肠癌细胞株中获得了同样的结果。然而经过我们前期研究发现,不管是在 ccRCC 组织中,还是肾癌细胞株(786-O、ACHN、A498、GRC)中,均未发现 BNIP3 启动子区甲基化的证据<sup>[10]</sup>。本研究发现,肾癌细胞株 786-O、ACHN 的 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白 H3 呈去乙酰化状态,经 1.0  $\mu\text{mol/L}$  TSA 处理 48 h 后,均恢复了乙酰化;恢复了乙酰化的肾癌细胞株 786-O、ACHN, *BNIP3* 在 mRNA 水平和蛋白水平均表达上调。因此我们认为,组蛋白去乙酰化是肾癌中 BNIP3 表达下调的主要原因。

BACON 等<sup>[12]</sup>在研究结直肠癌时还发现,对于那些既未发生启动子区甲基化,又未发生组蛋白去乙酰化的结直肠癌细胞株,经甲基转移酶抑制剂 5-Aza-dc 或 TSA 处理后均可上调 BNIP3 的表达,提示可能存在其他调控机制。本研究发现,肾癌细胞株 A498 的 *BNIP3* 基因启动子区组蛋白 H3 呈乙酰化状态,经 TSA 处理后,其乙酰化状态未发生改变,但也上调了 BNIP3 的表达。故而我们认为,可能还有其他调控机制参与了肾癌 BNIP3 低表达的调控。

TSA 是一种异羟肟酸类化合物,是目前研究比较广泛的一类 HDACs 抑制剂,可通过抑制 HDACs 活性,逆转组蛋白乙酰化状态。现有研究表明,TSA 可抑制包括肾癌在内的多种肿瘤细胞增殖,诱导凋亡<sup>[13]</sup>。本研究结果发现,经不同浓度的 TSA 处理后,3 种肾癌细胞增殖均受到了抑制,肿瘤细胞凋亡增加,与文献报道<sup>[13]</sup>相一致。但在细胞增殖实验中,本研究并未发现明显的浓度依赖性,可能和所设浓度较高且浓度梯度较窄有关。通过细胞增殖实验、细胞凋亡实验以及 Q-PCR,我们发现肾癌细胞

的增殖、凋亡以及 *BNIP3* mRNA 的表达在本研究设定的浓度梯度下无浓度依赖性,尤其是 1.0、2.0  $\mu\text{mol/L}$  TSA 组,两组差异均无统计学意义,故在 Western blot 实验未再检测 2.0  $\mu\text{mol/L}$  TSA 组。后续的 ChIP 实验也只选择了其中的 TSA 1.0  $\mu\text{mol/L}$  TSA 组。

PARK 等<sup>[13]</sup>发现,TSA 可诱导肾癌细胞株 Caki-1 和 A498 发生 Caspase 依赖性细胞凋亡,徐米清等<sup>[14]</sup>在研究肾癌细胞株 OS-RC-2 时也发现 TSA 可通过 Bcl-2/Bax 相关途径诱导细胞凋亡。*BNIP3* 作为一种线粒体促凋亡蛋白,可通过其 BH3 结构域与抗凋亡蛋白 Bcl-2 或 Bcl-XL 形成异二聚体,促使与 Bcl2/Bcl-xl 结合的 Bax/Bak 游离、活化,进而介导 Caspase 依赖性细胞凋亡<sup>[2]</sup>。本研究结果显示,TSA 在上调肾癌细胞 *BNIP3* 表达的同时,抑制了肾癌细胞增殖,诱导细胞凋亡。故而我们猜测 *BNIP3* 可能参与了 TSA 诱导肾癌细胞凋亡的过程,然而 *BNIP3* 在肾癌分子发病机制中所起的作用还有待进一步研究。

自从分子靶向药物问世以来,肾癌的治疗取得了重大进展。现有的分子靶向药物如索拉非尼和舒尼替尼等,通过作用于 VHL-HIF-缺氧反应基因通路中的一些分子靶点,使疾病控制率可达 80% 左右。但按实体瘤疗效评价标准(RECIST)其疗效以疾病稳定为主,而客观有效率不高<sup>[15]</sup>。因此,寻找 HIF 下游其它对肾癌细胞生物学行为起重要作用的缺氧反应基因,对其进行深入研究,有可能发现全新的肾癌治疗靶点,丰富肾癌的治疗策略和手段。*BNIP3* 作为 HIF 下游缺氧反应基因,可以编码线粒体促凋亡蛋白,对肾癌细胞生物学行为或可发挥重要作用。

本研究的局限性在于仅从体外细胞水平证实了组蛋白去乙酰化参与了肾癌 *BNIP3* 的表达下调,缺乏体内研究证据,还需进一步动物实验证明。同时,TSA 作为一种广谱 HDACs 抑制剂,可作用于多种组蛋白去乙酰化基因,进一步特异性上调肾癌 *BNIP3* 表达,分析 *BNIP3* 在肾癌分子发病机制中的作用至关重要。

综上所述,*BNIP3* 基因启动子区组蛋白去乙酰化是其在肾癌中表达下调的主要机制,并可能参与了肾癌的发生发展。进一步研究 *BNIP3* 在肾癌分子发病机制中所起的作用,对发现新的肾癌治疗靶点,丰富肾癌治疗策略和手段具有重要意义。(下转第 393 页)

mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. *Blood*, 2002, 100(8):3041-3044.

- [8] HOFMANN WK, DE VOS S, ELASHOFF D, *et al.* Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet*, 2002, 359(9305):481-486.
- [9] 周建军, 乐秀芳, 韩家娴, 等. 评价抗癌物质活性的改良 MTT 方法. *中国医药工业杂志*, 1993, 24(10):455-457.
- [10] BOAG JM, BEESLEY AH, FIRTH MJ, *et al.* Altered glucose metabolism in childhood pre-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 2006, 20(10):1731-1737.
- [11] RIVENZON-SEGAL D, RUSHKIN E, POLAK-CHARCON S, *et al.* Glucose transporters and transport kinetics in retinoic acid-differentiated T47D human breast cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 279(3):E508-E519.
- [12] GABY AR. Adverse effects of dietary fructose. *Altern Med Rev*, 2005, 10(4):294-306.
- [13] LIU H, HUANG D, MCARTHUR DL, *et al.* Fructose induces transketolase flux to promote pancreatic cancer growth. *Cancer Res*, 2010, 70(15):6368-6376.
- [14] KUMAMOTO R, UTO H, ODA K, *et al.* Dietary fructose enhances the incidence of precancerous hepatocytes induced by administration of diethylnitrosamine in rat. *Eur J Med*

*Res*, 2013, 8: 54 [2016-10-15]. <http://www.eurjmedres.com/content/18/1/54>. doi:10.1186/2047-783X-18-54.

- [15] AUNE D, CHAN DS, VIEIRA AR, *et al.* Dietary fructose, carbohydrates, glycemic indices and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Ann Oncol*, 2012, 23(10):2536-2546.
- [16] ZAMORA-LEON SP, GOLDE DW, CONCHA II, *et al.* Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(5):1847-1852.
- [17] SHU R, DAVID ES, FERRARIS RP. Luminal fructose modulates fructose transport and GLUT-5 expression in small intestine of weaning rats. *Am J Physiol*, 1998, 274(2 Pt 1):G232-G239.
- [18] CUI XL, SCHLESIER AM, FISHER EL, *et al.* Fructose-induced increases in neonatal rat intestinal fructose transport involve the PI3-kinase/Akt signaling pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(6):G1310-G1320.
- [19] BURANT CF, SAXENA M. Rapid reversible substrate regulation of fructose transporter expression in rat small intestine and kidney. *Am J Physiol*, 1994, 267(1 Pt 1):G71-G79.

(2016-11-22 收稿, 2017-01-13 修回)

编辑 沈进

(上接第 388 页)

## 参 考 文 献

- [1] CLARK PE. The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney Int*, 2009, 76(9):939-945.
- [2] RAY R, CHEN G, VANDE-VELDE C, *et al.* BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem*, 2000, 275(2):1439-1448.
- [3] ZHANG H, BOSCH-MARCE M, SHIMODA LA, *et al.* Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*, 2008, 283(16):10892-10903.
- [4] GUO K, SEARFOSS G, KROLIKOWSKI D, *et al.* Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene *BNIP3*. *Cell Death Differ*, 2001, 8(4):367-376.
- [5] 黄龙, 赵涛, 田义阳, 等. 肾透明细胞癌组织中 *BNIP3* 的表达及意义. *四川大学学报(医学版)*, 2014, 45(3):396-399.
- [6] 曾浩, 黄颖, 陈锐, 等. 促凋亡线粒体蛋白 *BNIP3* 的表达调控与功能. *现代泌尿生殖肿瘤杂志*, 2010, 2(2):117-120.
- [7] ERKAN M, KLEEFF J, ESPOSITO I, *et al.* Loss of *BNIP3* expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene*, 2005, 24(27):4421-4432.
- [8] GUNARATNAM L, MORLEY M, FRANOVIC A, *et al.* Hypoxia inducible factor activates the transforming growth

factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL (-/-) renal cell carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(45):44966-44974.

- [9] 罗琳, 熊子兵, 曾浩, 等. *BNIP3* 在肾透明细胞癌中的表达及其与 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的相关性研究. *四川大学学报(医学版)*, 2012, 43(1):79-82.
- [10] 王海舟. 肾细胞癌 *BNIP3* 的表达及其表观遗传调控机制的初步研究. 四川:四川大学华西临床医学院, 2016.
- [11] MURAI M, TOYOTA M, SUZUKI H, *et al.* Aberrant methylation and silencing of the *BNIP3* gene in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3):1021-1027.
- [12] BACON AL, FOX S, TURLEY H, *et al.* Selective silencing of the hypoxia-inducible factor 1 target gene *BNIP3* by histone deacetylation and methylation in colorectal cancer. *Oncogene*, 2007, 26(1):132-141.
- [13] PARK KC, HEO JH, JEON JY, *et al.* The novel histone deacetylase inhibitor, N-hydroxy-7-(2-naphthylthio) heptonamide, exhibits potent antitumor activity due to cytochrome-c-release-mediated apoptosis in renal cell carcinoma cells. *BMC Cancer*, 2015, 15:19 [2017-02-20]. <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-014-1003-1>. doi:10.1186/s12885-014-1003-1.
- [14] 徐米清, 洪明, 谢辉, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂通过激活 p-JNK 信号通路诱导肾癌细胞凋亡. *南方医科大学学报*, 2013, 33(10):1409-1415.
- [15] SANTOS N, WENGER JB, HAVRE P, *et al.* Combination therapy for renal cell cancer: what are possible options? *Oncology*, 2011, 81(3/4):220-229.

(2016-11-17 收稿, 2017-02-14 修回)

编辑 吕熙