

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.04.003

· 基础研究 ·

西达本胺通过调控肿瘤相关巨噬细胞功能增强对结肠癌细胞的抑制作用

高阳, 霍苗苗, 刘梅, 徐宁志, 朱红霞(国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院 细胞生物及分子生物学研究室/分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

[摘要] **目的:** 探讨肿瘤相关巨噬细胞(TAM)对西达本胺(chidamide)抑瘤效果的影响及其作用机制。**方法:** 体外培养小鼠巨噬细胞系 Ana1 和 Raw264.7, 用肿瘤上清诱导成为 TAM。用西达本胺处理 TAM 后, 用比色法检测 HDAC 酶活性, 用 qPCR 检测 TAM 中 IL-6、IL-12、TNF、IL-1 β 等细胞因子的 mRNA 表达水平, 用 Wb 实验检测西达本胺处理后 TAM 中 NF- κ B 和 STAT3 蛋白的表达水平。将 TAM 和结肠癌 CT26 细胞混合后, 接种到裸鼠体内构建皮下移植瘤模型, 灌喂西达本胺(3.87 mg/kg), 观察西达本胺对皮下移植瘤生长的影响, 并通过免疫组化检测移植瘤组织中 PCNA、F4/80、Arg1、iNos 蛋白的表达水平。**结果:** 西达本胺抑制 CT26 细胞的增殖活性, 在裸鼠体内西达本胺单独处理 CT26 细胞皮下移植瘤的抑制率约为 18.7%; 当 TAM 存在时, 西达本胺处理可以将移植瘤抑制率提高到 57.2%。西达本胺可以抑制 TAM 的 HDAC 酶活性, 进而使得组蛋白乙酰化水平升高; 西达本胺能影响核内转录因子 NF- κ B 水平, 并且降低 Arg1、IL-6、IL-12 表达, 提高 iNos、Tnf、IL-1 β 表达。**结论:** 西达本胺通过抑制 TAM 中 HDAC 活性和调控细胞因子表达, 增强其对于结肠癌 CT26 细胞的抑制作用。

[关键词] 结肠癌; CT26 细胞; 西达本胺; 组蛋白去乙酰化酶; 肿瘤相关巨噬细胞

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)04-0381-08

Chidamide enhances inhibitory effect on colon cancer cells by modulating tumor-associated macrophage

GAO Yang, HUO Miaomiao, LIU Mei, XU Ningzhi, ZHU Hongxia (Laboratory of Cell and Molecular Biology/State Key Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of tumor-associated macrophage (TAM) on the anti-tumor function of chidamide and to explore the mechanism. **Methods:** Mouse macrophage cell lines Ana1 and Raw264.7 were cultured *in vitro* and induced into TAM with tumor supernatant. HDAC enzyme activity was detected after TAM treated with chidamide. The mRNA expressions of cytokines, such as IL-6, IL-12, TNF and IL-1 β , in TAM were detected by qPCR. The protein expression of NF- κ B and STAT3 in TAM treated with chidamide were detected by Wb. The mixture of TAM and colon cancer CT26 cells was inoculated into nude mice to construct the subcutaneous xenograft model; and the efficacy of chidamide (3.87 mg/kg) on the growth of CT26 xenograft tumors was observed. The protein expressions of PCNA, F4/80, Arg1 and iNos were detected by immunohistochemistry. **Results:** Chidamide inhibited the proliferation of CT26 cells. In the *in vivo* experiment, the inhibition rate of chidamide alone on CT26 xenograft was about 18.7%; however, the inhibition rate was up to 57.2% with the presence of TAM. Chidamide could inhibit the activity of HDAC enzyme in TAM, and further increase the Histone acetylation level. Chidamide could affect the expression of nuclear transcription factor NF- κ B, inhibit the expressions of Arg1, IL-6 and IL-12, but up-regulate the expressions of iNOS, TNF and IL-1 β in TAM. **Conclusion:** Chidamide can enhance its inhibitory effect on colon cancer CT26 cells *via* regulating the expression of cytokines and inhibiting the activity of HDAC in TAM.

[Key words] colon cancer; CT26 cell; chidamide; histone deacetylase (HDAC); tumor-associated macrophages (TAM)

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(4): 381-388. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.04.003]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81772638)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81772638)

[作者简介] 高阳(1995-), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤相关信号通路研究, E-mail: 3371202@qq.com

[通信作者] 朱红霞(ZHU Hongxia, corresponding author), 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事肿瘤相关信号通路研究, E-mail: drhx-zhu@cicams.ac.cn

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)在多种肿瘤中存在过表达或活性异常现象,因此HDAC已经成为针对表观遗传学领域肿瘤治疗药物开发的一个主要靶标^[1]。已经有多个HDAC抑制剂被批准用于临床淋巴瘤和多发性骨髓瘤治疗中^[2-3]。西达本胺(chidamide)是中国自主研发的首个HDAC抑制剂类抗癌药物,获国家食品药品监督管理局(CFDA)批准用于外周T细胞淋巴瘤治疗^[3]。在实体肿瘤中,HDAC抑制剂的研究还处于临床前实验阶段。有文献^[4-5]报道,HDAC抑制剂除了可以直接抑制肿瘤细胞增殖,还可以通过调控肿瘤相关免疫细胞的功能而发挥抗肿瘤作用。在结直肠癌的肿瘤微环境中,巨噬细胞是数量最多的免疫群体之一^[6]。肿瘤微环境中的巨噬细胞具有促进肿瘤发生发展的作用^[7-9],而且还可以影响肿瘤治疗疗效^[10]。因此,本研究目的是探讨HDAC抑制剂西达本胺是否可以通过调控巨噬细胞功能抑制结肠癌,为西达本胺的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系、实验动物及主要试剂

小鼠结肠癌细胞系CT26、巨噬细胞Ana1和Raw264.7均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,于90% RPMI 1640+10% FBS培养基中,在37℃、5%CO₂的恒温培养箱中培养。

20只雌性、体质量18~20g、6周龄的BALB/c-nu裸鼠购自北京华阜康公司(实验动物合格证号:11401300089103)。

西达本胺购自Selleck公司,DMSO、0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、胎牛血清均购自ExCell Bio公司,RPMI 1640培养基购自北京细工公司,抗HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC10、H3、p65及Stat3抗体均购自CST公司,抗Acetyl-H3抗体购自Active Motif公司,抗GAPDH、β-actin抗体购自Proteintech公司,抗mouse IgG/HRP、rabbit IgG/HRP抗体购自中杉金桥公司,PV-9000通用型第二步法检测试剂盒购自中杉金桥公司,TRIzol试剂购自Invitrogen公司,qPCR PowerUp™ SYBR® Green Master Mix qPCR试剂盒购自Applied Biosystems公司,HDAC Activity Assay Kit HDAC酶活试剂盒购自BioVision公司,Cell Counting Kit-8购自Dojindo公司,NC膜购自Millipore公司,脱脂奶粉购自北京普利莱基因技术公司,Enlight™显色剂购自Engreen公司,PrimeScript™ RT Master Mix逆转试剂盒购自TaKaRa公司,核浆分离试剂盒购自Invent公司。

1.2 qPCR检测TAM细胞的Arg1、IL-6、IL-12、Nos2、

TNF、IL-1β等细胞因子mRNA表达水平

当Ana1或Raw264.7细胞汇合度达到40%时,给予50%肿瘤细胞培养上清或肿瘤上清与4 μmol/L西达本胺联合处理,36 h后收获各组细胞。用TRIzol裂解法提取总RNA,用逆转试剂盒逆转得到cDNA。按照20 μl体系(10 μl Mix、1 μl正向引物、1 μl反向引物、1 μl cDNA和7 μl H₂O)加样,qPCR扩增程序为95℃预变性3 min,95℃变性15 s,60℃退火/延伸30 s,共40个循环。用2^{-ΔΔCt}法计算mRNA的相对表达量。PCR引物由生工公司合成验证,其序列见表1。实验重复3次。

表1 引物序列

Tab.1 Sequences of primer

Gene	Sequences
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTG R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
IL-6	F: CTCTGCAAGAGACTTCCATCCA R: GACAGGTCTGTTGGGAGTGG
iNos	F: GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA R: GTGGACGGGTTCGATGTCAC
IL-12	F: ACTCTGCGCCAGAAACCTC R: CACCCCTGTTGATGGTCACGAC
Arg1	F: TGGCTTGCGAGACGTAGAC R: GCTCAGGTGAATCGGCCTTTT
TNF	F: CGAGTGACAAGCCTGTAGCC R: ACAAGGTACAACCCATCGGC
IL-1β	F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG R: AAGGTCCACGGGAAAGACAC

1.3 Wb实验检测Ana1及Raw264.7细胞的HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC10、H3、p65及Stat3蛋白的表达水平

收获各组细胞用PBS冲洗后,用含蛋白酶抑制剂和蛋白磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取总蛋白。通过BCA法进行蛋白定量,然后进行10%SDS-PAGE,半干转NC膜后,孵抗HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC10、H3、p65及Stat3的一抗(1:1 000)4℃过夜,洗膜后孵HRP标记的IgG二抗(1:1 000)室温1 h,之后用显色剂显色,暗室曝光。实验重复3次。

1.4 比色法检测Ana1及Raw264.7细胞中HDAC的活性

提取Ana1、Raw264.7(Control)、4 μmol/L处理24 h后的Ana1、Raw264.7(Chi-24 h)细胞核蛋白,通过BCA法进行蛋白定量,利用HDAC Activity Assay Kit检测酶活性。按照100 μl检测体系,核蛋白样稀释至

85 μl , 阳性对照使用 HeLa 细胞核提取物, 阴性对照在核提取物中添加 2 μl 曲古柳菌素 (trichostatin)。在 96 孔板中, 每孔加入 85 μl 核蛋白样、10 μl 10 \times HDAC 分析缓冲液、5 μl HDAC 显色底物, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后每孔加 10 μl 赖氨酸显影剂 (lysine developer), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 最后酶标仪上检测波长在 450 nm 处的光密度 (D) 值。实验设置 2 个平行孔, 实验重复 3 次。

1.5 结肠癌细胞小鼠皮下移植瘤的治疗实验

在 6 周龄的裸鼠皮下接种 100 μl CT26 细胞悬液, 细胞密度为 $5\times 10^6/\text{ml}$ 。CT26 细胞对照组每只接种 5×10^5 个细胞, CT26-AT 组中额外添加 5×10^4 个经过肿瘤细胞上清诱导的 Ana1 细胞 (TAM)^[13]。灌喂西达本胺的 CT26 组标记为 CT-Chi 组, 灌喂西达本胺的 CT26-AT 组标记为 CT26-AT-chi 组。接种前称体质量, 待皮下瘤长径达到 5 mm 时开始每天灌喂西达本胺 (3.87 mg/kg)。给药后隔天称体质量, 待肿瘤达到足够大小后处死裸鼠, 取出移植瘤称体质量并测量肿瘤体积, 比较 CT26-chi 组及 CT26-AT-chi 组治疗效果。并将部分肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定作后续检测。

1.6 免疫组化检测移植瘤组织中 F4/80、PCNA、Arg1 及 iNos 的表达

用 4% 多聚甲醛固定皮下移植瘤后, 石蜡包埋, 4 μm 连续切片后 4 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。实验时将切片正对出风口 68 $^{\circ}\text{C}$ ~72 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 2 h 以上, 常规脱蜡、梯度乙醇水化, PBS 洗片, 室温避光灭活内源性过氧化物酶 15 min; 微波炉加热至 90 $^{\circ}\text{C}$ 后, 使用微波炉 P-60 模式加热 4 min, 之后用微波炉 P-40 模式加热 6 min 进行抗原修复, 冷却移至室温后, 用山羊血清封闭液封闭 1 h; PBS 洗片 3 min \times 3 次, 滴加 F4/80、PCNA、Arg1 及 iNos 一抗 (1:60) 孵育过夜; 将一抗弃去, 依次用 1 \times PBST 和 PBS 冲洗 3 min \times 3 次; 加反应增强剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min; PBS 洗片 3 min \times 3 次, 滴加偶联 HRP 的 IgG 二抗 (1:200), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min; 将二抗弃去, 依次用 1 \times PBST 和 1 \times PBS 冲洗 3 min \times 3 次; DAB 显色, 蒸馏水洗片; 苏木素复染, 自来水洗片、返蓝; 梯度乙醇上行脱水, 二甲苯透明后树脂封片, 光学显微镜下观察染色情况并拍照保存。以细胞膜 (F4/80)、细胞质 (iNOS 及 Arg1) 或细胞核 (PCNA) 内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性, 对每张组化切片在高倍镜 ($\times 400$) 下计数 5 个视野。将所染蛋白的染色数量及染色强度依据以下标准半定量, 结果取平均值。染色强度: 不着色 0 分, 淡黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 棕褐色 3 分。染色数量: 阳性细胞数占总细胞数比率 $\leq 5\%$ 为 0 分, 6%~25% 为 1 分, 26~50% 为 2 分, 51~75% 为 3 分,

$\geq 76\%$ 为 4 分。染色强度计分与染色数量计分相乘, 结果 ≤ 4 为低表达, ≥ 5 为高表达。

1.7 统计学处理

应用 GraphPad Prism 5.0 软件, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间数据比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 西达本胺抑制 Ana1 及 Raw264.7 细胞中 HDAC 酶活性

西达本胺处理 Ana1 细胞 18、36 和 72 h 后, Wb 实验结果显示, 西达本胺不影响 Ana1 的 HDAC 本身的表达水平, HDAC1/2/3/10 蛋白表达水平均无明显改变。随着西达本胺浓度的增加, 组蛋白 H3 的乙酰化水平随之升高 (图 1A)。在 Raw264.7 细胞中也能看到类似的结果 (图 1B)。随后, 用 4 $\mu\text{mol/L}$ 西达本胺处理 Ana1 细胞 24 h 后检测 HDAC 活性结果发现, 西达本胺可以抑制 Ana1 细胞 HDAC 酶活性, 其活性显著下降 [$36.4\pm 1.1\%$, $t=15.21$, $P<0.01$; 图 1C]。在 Raw264.7 细胞中, 也能得到类似的结果 (图 1D)。以上结果表明, 西达本胺可以抑制 Ana1 及 Raw264.7 细胞的 HDAC 酶活性。

2.2 西达本胺通过调控 TAM 极性抑制促癌细胞因子的表达

qPCR 检测结果 (图 2A) 显示, 与 Control 组比较, T 组中巨噬细胞 M2 型标志 Arg1 显著升高 ($t=69.21$, $P<0.01$); 与 T 组比较, 西达本胺处理的 T-chi 组中巨噬细胞极性由 M2 转变为 M1, M1 型标志 Nos2 显著升高 ($t=16.65$, $P<0.01$), M2 型标志 Arg1 显著下降 ($t=56.42$, $P<0.01$)。与 Control 组比较, T 组中促进肿瘤生长相关的细胞因子 IL-6、IL-12 表达升高。T 组比较, 西达本胺处理的 T-chi 组中这些促瘤细胞因子表达下降; 而抑制肿瘤生长相关的细胞因子 TNF、IL-1 β 则在西达本胺处理后升高。在 Raw264.7 细胞中也能得到类似结果 (图 2B)。

Wb 检测结果 (图 2C) 发现, 肿瘤上清的诱导能使 TAM 细胞核内 p65 含量升高, 而西达本胺可以抑制这个改变, 但细胞核内 STAT3 的含量则不受西达本胺影响。结果提示, 西达本胺可能通过抑制 NF- κB 转录活性而影响某些细胞因子的表达。

因此, 西达本胺可能通过调控 TAM 极性抑制其细胞因子的表达, 进而使得巨噬细胞的促瘤功能减弱而抑瘤功能增强。

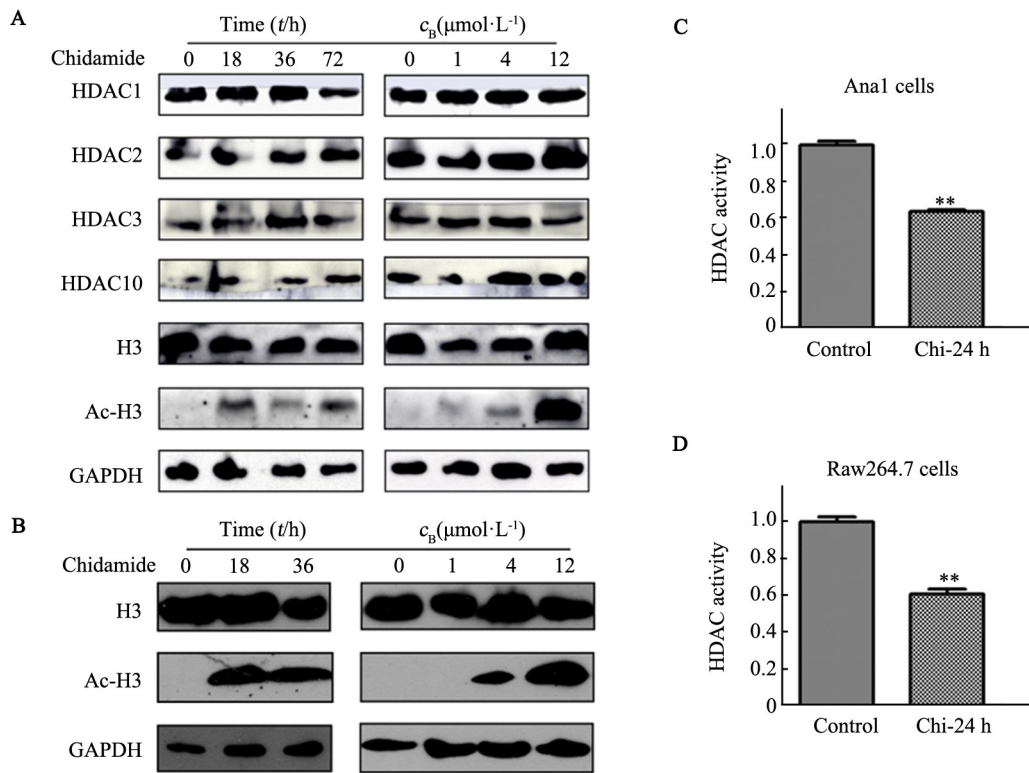
2.3 TAM 显著促进西达本胺对结肠癌 CT26 细胞移植瘤的抑制作用

移植瘤治疗实验 3 周后处死裸鼠, 解剖得到皮下

瘤块(图3A)。西达本胺灌喂处理后,肿瘤体积明显减小。在TAM存在的情况下,西达本胺抑制肿瘤的作用更加明显(图3B)。

移植瘤质量分析可以看出,西达本胺处理可以抑制移植瘤生长,抑制率为18.7%。与CT26组比较,CT26-AT组移植瘤的平均质量显著增大($t=3.904, P<$

0.01)。与CT26-AT组比较,CT26-AT-chi组西达本胺处理能更为显著地抑制移植瘤体质量增长,抑制率为57.2%(图3C、D)。因此,TAM的存在可以显著增强西达本胺对结肠癌CT26细胞皮下瘤抑制能力($t=5.542, P<0.05$)。



** $P<0.01$ vs Control group

A: The expression of HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC10, histone H3 and acetylated histone Ac-H3 in Ana1 cells; B: The expression of histone H3 and acetylated histone Ac-H3 in Raw264.7 cells; C: The activity of HDAC at 24 h after treatment with 4 μmol/L chidamide in Ana1 cells; D: The activity of HDAC at 24 h after treatment with 4 μmol/L chidamide in Raw264.7 cells

图1 西达本胺抑制TAM的HDAC活性

Fig.1 Chindamide inhibited HDAC activity in TAM

2.4 西达本胺调控移植瘤组织中TAM从M2型向M1型转变

免疫组化染色结果(图4)显示,CT26-AT组相对于CT26组,移植瘤组织中F4/80阳性的细胞比例更多,说明TAM确实存在于皮下移植瘤中(图4A)。CT26-AT组相对于CT26组,PCNA阳性细胞比例更多,说明TAM确实促进了移植瘤细胞增殖(图4B)。与CT26-AT组比较,CT26-AT-chi组具有促癌作用的Arg1阳性的巨噬细胞比例由(8.90±1.87)%显著减少到(3.39±0.80)%($t=6.181, P<0.01$;图4C),而抑制肿瘤生长的iNOS阳性的巨噬细胞比例由(1.14±0.41)%显著增多到(4.03±0.73)%($t=7.742, P<0.01$;图4D)。结果提示,西达本胺可以调控TAM的极性,使其由促

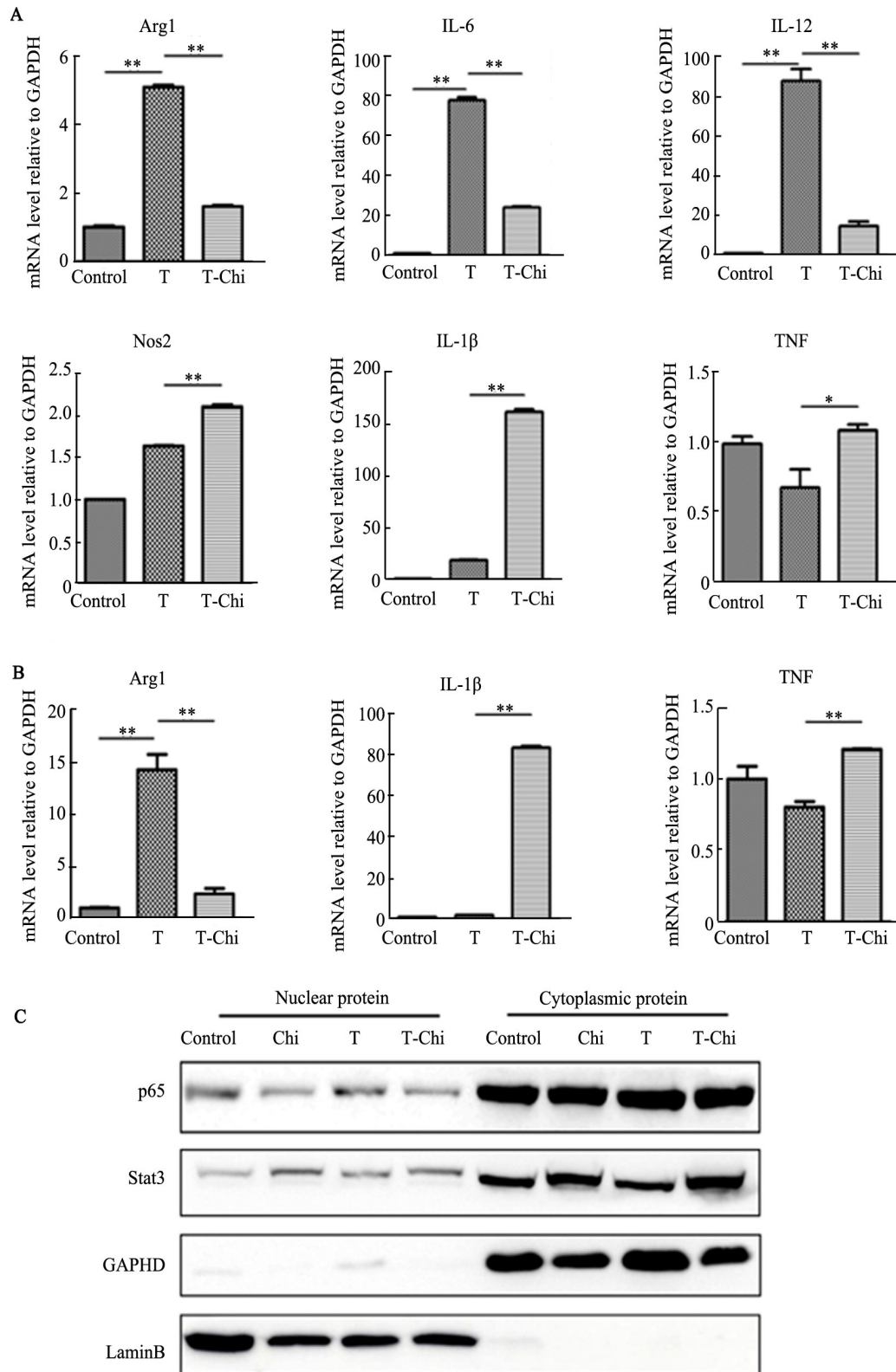
瘤作用转化为抑瘤作用,进而抑制肿瘤细胞生长。

3 讨论

微环境中的免疫细胞和细胞因子与结直肠癌的发生发展、转移乃至治疗效果密切相关,甚至可以影响患者的预后^[11-12]。结直肠癌组织中包含大量的TAM^[6],这些TAM与结直肠癌的发生发展及治疗疗效密切相关^[10]。因此,巨噬细胞具备成为结直肠癌治疗新靶点的条件,非常值得关注。本课题组利用肿瘤细胞的培养上清处理巨噬细胞模拟肿瘤微环境中的TAM,随后将该TAM进而肿瘤细胞共同接种小鼠^[13]。利用西达本胺治疗的结果发现,当TAM存在时,西达本胺对肿瘤细胞的抑制作用明显强于单纯

肿瘤细胞。该结果提示,西达本胺可能通过调控 TAM 而进一步抑制肿瘤细胞的生长。因此,与其他

HDAC 抑制剂类药物类似,西达本胺也可以作为一种免疫调节类药物用于肿瘤的治疗^[4, 14]。

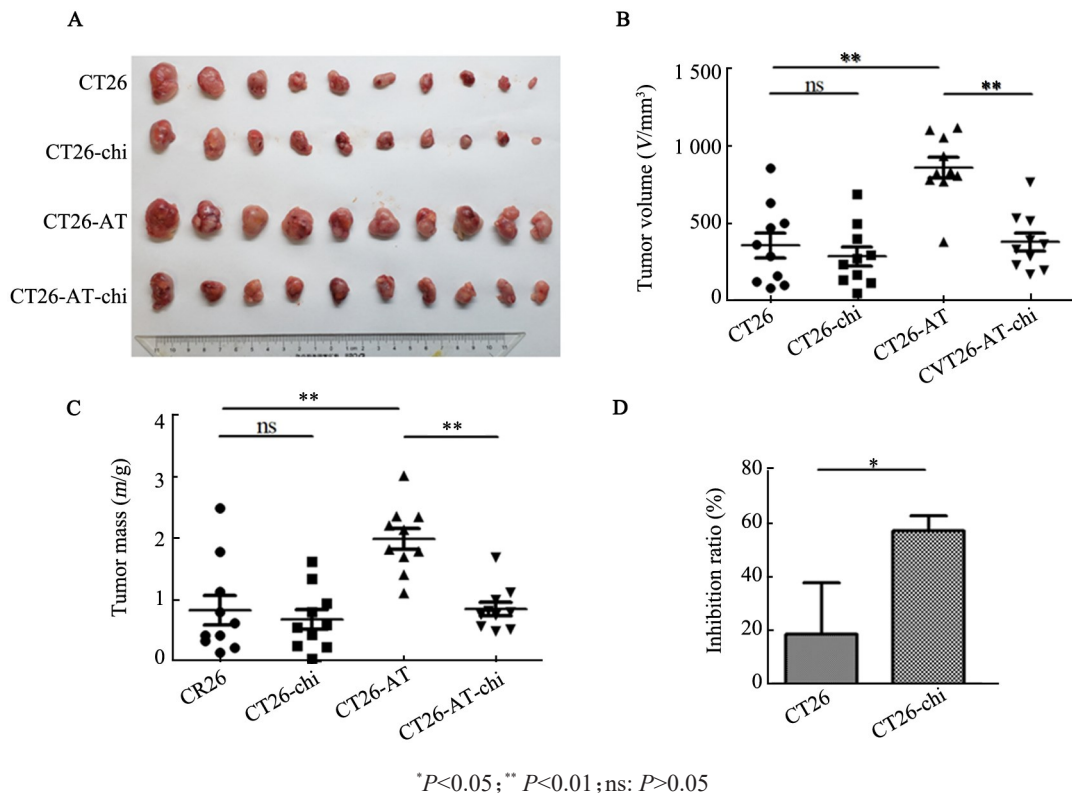


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: The cytokine expressions in Ana1 cells; B: The cytokine expressions in Raw264.7 cells; C: The expression of p65 and STAT3 in Ana1 cells; Control: Untreated group; Chi: Treated with 4 $\mu\text{mol/L}$ chidamide for 36 h; T: Treated with tumor condition medium; T-Chi: Treated with tumor condition medium and 4 $\mu\text{mol/L}$ chidamide

图2 西达本胺调控 TAM 细胞因子的表达

Fig.2 Chidamide modulated the expressions of cytokines in TAM



A: CT26 xenograft tumors; B: Tumor volume; C: Tumor mass; D: Inhibition rate of chidamide based on tumor mass; CT26: Untreated group of CT26 xenograft; CT26-Chi: CT26 cells treated with chidamide; CT26-AT: Untreated group of CT26 cells with TAM; CT26-AT-chi: CT26-AT group treated with chidamide

图3 混合 TAM 时西达本胺对 CT26 细胞的抑制率增高

Fig.3 The inhibition rate of chidamide on CT26 cells was enhanced in the presence of TAMs

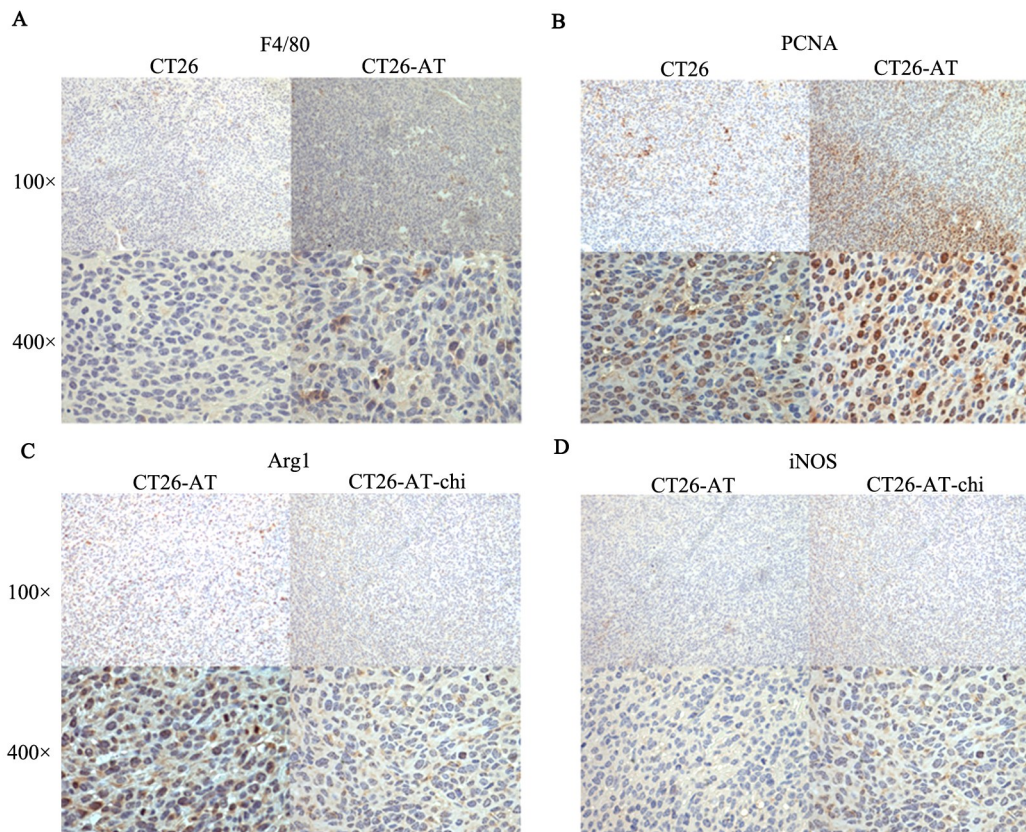


图4 西达本胺使移植瘤组织中 TAM M1 型增加而 M2 型减少(免疫组化染色)

Fig.4 Chidamide increased M1 type and decreased M2 type of TAM in xenograft tumor (immunohistochemical staining)

GUERRIERO 等^[5]发现 II 型 HDAC 抑制剂 TMP195 可以使得促瘤作用的巨噬细胞比例减少, 而巨噬细胞的吞噬功能和激活 T 细胞的功能增强, 进而抑制 AOM-DSS 小鼠模型肠道成瘤, 并且增强化疗药物卡铂及 PD-1 抗体治疗效果。而 HDAC 抑制剂类药物贝利司他 (belinostat) 可以改变肿瘤微环境中巨噬细胞的极性, 使得抗瘤作用的 M1 型巨噬细胞增多^[15]。本实验检测了西达本胺处理 TAM 后巨噬细胞标志分子, 结果发现, M1 型巨噬细胞标志升高, 而 M2 型标志降低, 提示西达本胺可以调控 TAM 的极性从 M2 向 M1 型转变, 使得抗肿瘤作用的 M1 型巨噬细胞增多, 而促瘤作用的 M2 型巨噬细胞减少, 进而抑制肿瘤细胞的增殖。

西达本胺属于选择性 HDAC 抑制剂, 在多种肿瘤细胞中可以抑制 I 类 HDAC 中的 1、2、3 亚型和第 II b 类的 10 亚型的组蛋白去乙酰化酶活性^[16]。本研究利用西达本胺处理巨噬细胞 Ana1, 发现西达本胺可以抑制 HDAC 的酶活性, 同时 HistoneH3 的乙酰化水平升高。证明西达本胺在巨噬细胞同样可以发挥 HDAC 抑制剂的作用。

巨噬细胞主要通过吞噬和分泌细胞因子发挥功能。HDAC 抑制剂可以通过调控巨噬细胞的细胞因子分泌而参与自身免疫及炎症性病变^[17]。本研究检测 TAM 细胞因子的表达结果发现, HDAC 抑制剂可以改变包括 IL-6、IL-12、TNF、IL-1 β 在内的一系列巨噬细胞细胞因子的表达, 这些细胞因子可以影响肿瘤细胞的增殖。

HDAC 主要在转录水平发挥调控作用, 尤其是 I 类 HDAC, 主要存在于细胞核内, 参与不同的转录抑制复合物的形成, 由此调控下游靶基因转录。另外, HDAC 还可以在细胞质中调控包括转录调控因子、细胞结构分子等非组蛋白底物的乙酰化, 从而调控细胞的增殖等。RelA 不同位点的乙酰化水平与作用不同, 有些促进 RelA 与 DNA 的结合而促进转录活性, 有些位点乙酰化则使得 RelA 与 I κ B 结合而使得 RelA 转位出核, 抑制 NF- κ B 的活性^[18], 而 NF- κ B 可以调控多种炎性细胞因子的表达。在 DC 中, HDAC 抑制剂 LBH589 可以通过抑制 NF- κ B 的 RelB 亚基的表达而抑制 IL-6、IL-10 和 TNF- α 等多种细胞因子的表达^[19]。西达本胺处理使得细胞核内磷酸化的 NF- κ B 减少, 但是不影响 STAT3 的量。而 RÖSLER 等^[20]在研究 T 细胞对真菌感染的反应时, 利用帕比司他 (panobinostat) 处理 T 细胞, 发现 STAT1 的磷酸化水平受到抑制, 而 STAT3 的磷酸化水平无变化。LEUS 等^[21]发现, HDAC-3 抑制剂并不影响 p65 的乙酰化, 但是依然可以抑制 NF- κ B 的活性。这些结果提示, 不

同的 HDAC 抑制剂在不同的细胞系可能通过不同的信号通路发挥作用。在本研究中, 西达本胺处理巨噬细胞可能通过抑制 NF- κ B 信号通路而影响相应细胞因子的分泌, 进而影响肿瘤细胞的增殖。

总之, 本研究结果提示选择性 HDAC 抑制剂西达本胺可以抑制结肠癌细胞增殖, 而且在 TAM 存在的情况下, 西达本胺的抑瘤效果更好。其机制可能是通过调控巨噬细胞和相关细胞因子的分泌, 改变肿瘤微环境。该研究结果为西达本胺在结直肠癌治疗中的临床应用提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] WEST A C, JOHNSTONE R W. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(1): 30-39. DOI: 10.1172/JCI69738.
- [2] ECKSCHLAGER T, PLCH J, STIBOROVA M, et al. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): E1414[2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5535906/>. DOI:10.3390/ijms18071414.
- [3] 董梅, 胡兴胜, 陈闪闪, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂在肿瘤治疗领域的进展[J]. *中华肿瘤杂志*, 2013, 35(7): 481-485. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2013.07.001.
- [4] 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. DOI:10.1016/j.biocel.2018.03.004.
- [5] GUERRIERO J L, SOTAYO A, PONICHTERA H E, et al. Class II a HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages[J]. *Nature*, 2017, 543(7645): 428-432. DOI:10.1038/nature21409.
- [6] FRANKLIN R A, LIAO W, SARKAR A, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages[J/OL]. *Science*, 2014, 344(6186): 921-925[2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4204732/>. DOI:10.1126/science.1252510.
- [7] QIAN B Z, POLLARD J W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis[J/OL]. *Cell*, 2010, 141(1): 39-51[2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4994190/>. DOI:10.1016/j.cell.2010.03.014.
- [8] MIAO H M, OU J J, PENG Y, et al. Macrophage ABHD5 promotes colorectal cancer growth by suppressing spermidine production by SRM[J/OL]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11716[2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4873969/>. DOI: 10.1038/ncomms11716.
- [9] WANG J, CAO Z Q, ZHANG X M, et al. Novel mechanism of macrophage-mediated metastasis revealed in a zebrafish model of tumor development[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(2): 306-315. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2819.
- [10] DE PALMA M, LEWIS C E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(3): 277-286. DOI:10.1016/j.ccr.2013.02.013.
- [11] LASRY A, ZINGER A, BEN-NERIAH Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(3): 230-240. DOI:10.1038/ni.3384.

- [12] FRIDMAN W H, PAGÈS F, SAUTÈS-FRIDMAN C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 298-306. DOI:10.1038/nrc3245.
- [13] ZHANG W N, CHEN L C, MA K, et al. Polarization of macrophages in the tumor microenvironment is influenced by EGFR signaling within colon cancer cells[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(46): 75366-75378[2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5342747/>. DOI:10.18632/oncotarget.12207.
- [14] ASPESLAGH S, MOREL D, SORIA J C, et al. Epigenetic modifiers as new immunomodulatory therapies in solid tumours[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(4): 812-824. DOI:10.1093/annonc/mdy050.
- [15] LLOPIZ D, RUIZ M, VILLANUEVA L, et al. Enhanced anti-tumor efficacy of checkpoint inhibitors in combination with the histone deacetylase inhibitor Belinostat in a murine hepatocellular carcinoma model[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(3): 379-393. DOI:10.1007/s00262-018-2283-0.
- [16] NING Z Q, LI Z B, NEWMAN M J, et al. Chidamide (CS055/HBI-8000): a new histone deacetylase inhibitor of the benzamide class with antitumor activity and the ability to enhance immune cell-mediated tumor cell cytotoxicity[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(4): 901-909. DOI:10.1007/s00280-011-1766-x.
- [17] MOHAMMADI A, SHARIFI A, POURPAKNIA R, et al. Manipulating macrophage polarization and function using classical HDAC inhibitors: implications for autoimmunity and inflammation[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 128: 1-18. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.05.009.
- [18] CHEN L F, MU Y J, GREENE W C. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB[J/OL]. *EMBO J*, 2002, 21(23): 6539-6548[2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC136963/>.
- [19] SONG W, TAI Y T, TIAN Z, et al. HDAC inhibition by LBH589 affects the phenotype and function of human myeloid dendritic cells [J/OL]. *Leukemia*, 2011, 25(1): 161-168[2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3839585/>. DOI: 10.1038/leu.2010.244.
- [20] RÖSLER B, WANG X, KEATING S T, et al. HDAC inhibitors modulate innate immune responses to micro-organisms relevant to chronic mucocutaneous candidiasis[J / OL]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 194(2): 205-219[2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6194342/>. DOI:10.1111/cei.13192.
- [21] LEUS N G, VAN DER WOUDE P E, VAN DEN BOSCH T, et al. HDAC 3-selective inhibitor RGFP966 demonstrates anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophages and mouse precision-cut lung slices by attenuating NF-κB p65 transcriptional activity[J/OL]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 108: 58-74[2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4844503/>. DOI:10.1016/j.bcp.2016.03.010.

[收稿日期] 2019-02-22

[修回日期] 2019-03-23

[本文编辑] 党瑞山