

组蛋白去乙酰化酶抑制剂SAHA诱导骨髓瘤细胞的凋亡★

于涛, 张鹏, 鹿全意, 刘银梅

Novel histone deacetylase inhibitor SAHA induces the apoptosis of myeloma cells *in vitro*

Yu Tao, Zhang Peng, Lu Quan-yi, Liu Yin-mei

Department of
 Hematology, Xiamen
 University Zhongshan
 Hospital, Xiamen
 361004, Fujian
 Province, China

Yu Tao★, Studying
 for master's degree,
 Department of
 Hematology, Xiamen
 University Zhongshan
 Hospital, Xiamen
 361004, Fujian
 Province, China
 mdmqmdmq@
 163.com

Correspondence to:
 Zhang Peng, Chief
 physician,
 Department of
 Hematology, Xiamen
 University Zhongshan
 Hospital, Xiamen
 361004, Fujian
 Province, China
 xm2981@163.com

Received: 2011-08-16
 Accepted: 2011-10-21

厦门大学附属中
 山医院血液科, 福
 建省厦门市
 361004

于涛★, 男, 1983
 年生, 湖南省安化
 县人, 汉族, 厦
 门大学在读硕士,
 主要从事血液病学
 方面的研究。
 mdmqmdmq@
 163.com

通讯作者: 张鹏,
 主任医师, 厦
 门大学附属中山
 医院血液科, 福
 建省厦门市
 361004
 xm2981@
 163.com

中图分类号: R394.2
 文献标识码: B
 文章编号: 1673-8225
 (2012)06-01062-05

收稿日期: 2011-08-16
 修回日期: 2011-10-21
 (20110524004/G·C)

Abstract

BACKGROUND: SAHA is a new kind of histone deacetylase inhibitors (HDACI), the research about the effect of HDACI on myeloma cells is rare, and the molecular mechanism of its induction of apoptosis is still poorly understood.

OBJECTIVE: To investigate the effects of SAHA on proliferation and apoptosis of multiple myeloma cell line U266 cells *in vitro* and its possible mechanism.

METHODS: The proliferation of U266 cells was measured by trypan blue exclusion method and colorimetric tetrazolium; the AlllexinV and PI staining was used to detect the apoptosis rates of U266 cells by flow cytometry, and the apoptotic morphological change was observed with Hoechst33342 staining; the expression of cell signaling proteins Ras/Raf/Mek/Erk were detected by Western-blot analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: The trypan blue exclusion method and colorimetric tetrazolium showed that SAHA could inhibit the proliferation rate of U266 cells and in a time-dose dependent manner. After treated with 0.5, 2 and 4 μmol/L SAHA for 48 hours, the apoptosis of U266 cells were (17.61±1.30)%, (41.13±3.80)% and (74.01±4.39)% respectively detected by flow cytometry, and in a dose dependent manner ($P < 0.05$). Distinct morphology changes between SAHA-treated group and control group were observed through fluorescence microscope by Hoechst 33342 staining; cell apoptosis such as karyopyknosis and nuclear fragmentation were significant in SAHA-treated group while in control group such changes were not obvious. The Western blot analysis showed that the phosphorylation of Raf-1 and its downstream ERK kinases were inhibited obviously after treated with SAHA and remarkable down-regulated when treated with the agent for 48 hours. SAHA can inhibit the proliferation of multiple myeloma cell line U266 cells and induce their apoptosis, the intercept of the signal pathway Ras/Raf/Mek/Erk is one of the underlying mechanism.

Yu T, Zhang P, Lu QY, Liu YM. Novel histone deacetylase inhibitor SAHA induces the apoptosis of myeloma cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(6): 1062-1066. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: SAHA 是一种新型的组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 目前有关其对多发性骨髓瘤细胞作用的研究还少见报道, 而且其诱导细胞凋亡的分子机制还不十分清楚。

目的: 观察 SAHA 对多发性骨髓瘤细胞株 U266 细胞增殖和凋亡的影响, 并分析其可能机制。

方法: 采用锥虫蓝拒染法、四氮唑蓝比色法检测 SAHA 对 U266 细胞增殖的影响。AlllexinV 和 PI 染色后应用流式细胞仪检测 SAHA 作用 U266 细胞的凋亡率, Hoechst33342 染色法检测凋亡细胞的形态。Western-blot 方法检测信号转导通路 Ras/Raf/Mek/Erk 相关蛋白的表达水平。

结果与结论: 锥虫蓝拒染法和四氮唑蓝比色法均显示, SAHA 可明显抑制 U266 细胞增殖, 且具有时间剂量依赖性。0.5, 2, 4 μmol/L SAHA 作用 U266 细胞 48 h 后, 经流式细胞仪检测细胞凋亡率分别为 (17.61±1.30)%, (41.13±3.80)% 和 (74.01±4.39)%, 呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。Hoechst33342 染色荧光显微镜下可见, SAHA 组细胞核出现明显的核固缩、核碎裂, 而对照组改变不明显。Western-blot 结果显示 U266 细胞经 SAHA 处理后, Raf-1 和 Erk 蛋白的磷酸化水平受到明显抑制, 药物作用 48 h 时出现显著降低。提示 SAHA 抑制多发性骨髓瘤细胞株 U266 细胞增殖并诱导凋亡, 信号转导通路 Ras/Raf/Mek/Erk 阻断是机制之一。

关键词: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 多发性骨髓瘤; SAHA; 凋亡; 细胞外调节蛋白激酶
 doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.06.025

于涛, 张鹏, 鹿全意, 刘银梅. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 诱导骨髓瘤细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(6):1062-1066. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, HDACI) 是近年来出现的一类新型抗肿瘤药物, 因其高效、低毒作用, 使其在国内外受到广泛关注, HDACI 是一类具有广泛应用前景的抗肿瘤新药^[1-3]。被用于血液系统肿瘤和一些实体肿瘤的研究中, 显示出对

肿瘤生长的抑制作用^[4-8]。SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) 是一种新型的 HDACI, 已被证明对多种肿瘤有效, 目前已应用到 II 期临床试验^[9]。

本实验以多发性骨髓瘤细胞系 U266 为靶细胞观察 HDACI 类药物 SAHA 对该细胞增殖及凋亡的影响, 并探讨其可能的作用机制, 以便为临床寻找抗多发性骨髓瘤药物提供新的思路。

1 材料和方法

设计: 体外细胞学水平, 对比观察实验。

时间及地点: 于2011-02/03在厦门大学附属中山医院开放实验室完成。

材料:

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
U266 细胞株	福建医科大学中心实验室惠赠
SAHA	Cayman 公司
胎牛血清(FBS)	杭州赛乐生物公司
RPMI1640 培养液	赛默飞生物化学公司
Annexin V/PI 凋亡试剂盒	北京联科生物制品公司
ELISA 试剂盒	Adlileram Diagnosis Laboratories
Anti-Erk1/2 鼠抗人抗体、Anti-p-Erk 兔抗人抗体、Anti-Raf 兔抗人抗体	美国 Millipore 公司
Anti-p-Raf 兔抗人抗体	美国 CST 公司
辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗、兔抗羊二抗、ECL	北京联科生物制品公司
BCA 试剂盒	北京普利莱基因有限公司

实验方法:

细胞培养: U266细胞株以 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于含体积分数为10%FBS、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的新鲜RPMI1640培养液中, 于 37°C 、体积分数5%的 CO_2 孵箱中培养。每两三天传代1次, 取对数生长期细胞用于实验。

细胞计数法绘制细胞生长曲线: 取对数生长期U266细胞以 $7.7 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于24孔板, 设正常对照组及SAHA终浓度为0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组, 于药物作用细胞后1~5 d分别取细胞, 用0.4%锥虫蓝溶液混匀, 3 min内用血球计数板分别计数活细胞数, 并绘制细胞生长曲线。

MTT法测算细胞增殖率: 取对数生长期的U266细胞, 以 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种于96孔培养板中, SAHA处理浓度分别为0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ 。每一个药物浓度设6个复孔, 并设空白对照组。分别培养24 h及48 h后, 每孔加入MTT溶液10 μL , 在 37°C 继续孵育4 h, 终止培养, 1 000 r/min离心5 min, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入100 μL 的MTT溶解液, 震荡10 min, 使结晶物充分溶解。选择570 nm波长在酶标仪测定吸光度(A)值, 根据A值, 计算出细胞增殖率。增殖率(%) = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{本底}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{本底}}) \times 100\%$, $A_{\text{本底}}$ 为无细胞培养基的A值。记录结果, 以时间为横轴, 细胞增殖率为纵轴绘制直方图。

细胞凋亡率的检测: 采用流式细胞术。收集对照组和SAHA 0.5, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ 处理48 h细胞, 调整细胞浓度

为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 按Annexin V FITC/PI试剂盒说明书操作, 流式细胞仪检测Annexin V⁺/PI⁻、Annexin V⁺/PI⁺的细胞百分率, 即早期凋亡与晚期凋亡细胞之和的总凋亡率。试验重复3次。

Hoechst染色荧光显微镜观察: 用终浓度为2, 4 $\mu\text{mol/L}$ 的SAHA处理U266细胞48 h, 收集细胞, 用PBS洗2次, 加入1 mL Hoechst33342染液, 37°C 继续孵育30 min, 离心后用PBS洗2次, 将沉淀重悬于PBS中, 置荧光显微镜下观察细胞核形态。

Western Blot检测蛋白表达: 收集正常培养的U266细胞和经2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA处理24, 48 h的U266细胞, 根据细胞团块的大小, 加入一定量的蛋白裂解缓冲液, 充分混匀, 冰上裂解5~10 min, 15 000 r/min 4°C 离心10 min。移取上清至另一管中, 弃沉淀。取适量样品应用BCA试剂盒测量蛋白浓度, 具体步骤按照试剂说明书操作。取20 μg 蛋白在聚丙烯酰胺凝胶上电泳。转移蛋白至PVDF膜上。加一抗封闭膜, 4°C 孵育过夜。洗膜后与HRP标记的二抗(1:2 500封闭缓冲液稀释)室温孵育1 h, 洗膜3次。滴加ECL化学发光试剂, X射线片曝光、显影和定影。 β -actin作为内参对照。观察Erk1/2、Raf以及磷酸化的Erk1/2、磷酸化的Raf蛋白表达情况。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间率比较采用 χ^2 检验, 多组定量资料的比较采用one-way ANOVA检验, 多组间率及多组定量资料, 因各实验组均需与对照组之间做两两比较, 检验水准应根据比较次数做出调整, 当 $P < 0.05$ /实际比较次数时, 认为差异有显著性意义。

2 结果

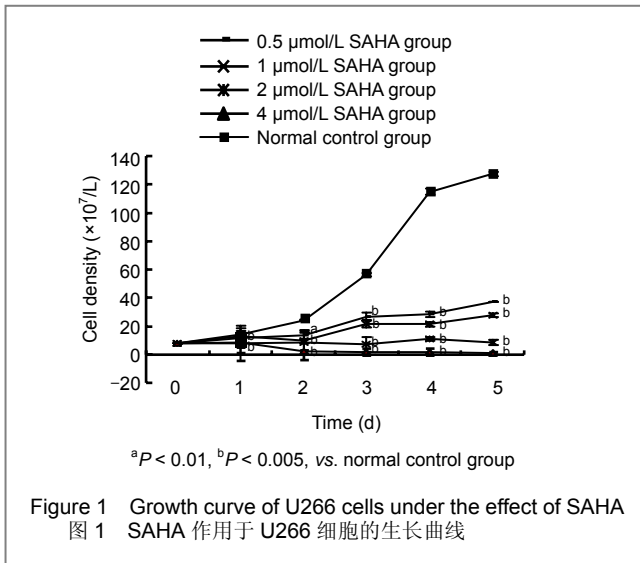
2.1 SAHA对U266细胞增殖的影响

锥虫蓝生长曲线: 与未经药物处理的正常对照组相比较, U266细胞经过不同浓度的SAHA处理后, 细胞增殖受到明显抑制, 见表1, 图1, 结果显示出时间剂量依赖性。

表1 SAHA对U266细胞生长的抑制作用(锥虫蓝细胞计数法)
Table 1 Inhibitory effect of SAHA on the growth of U266 cells (Trypanblue exclusion assay) ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, $\times 10^7 \text{ L}^{-1}$)

Time (d)	Normal control group	0.5 $\mu\text{mol/L}$ SAHA group	1 $\mu\text{mol/L}$ SAHA group	2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA group	4 $\mu\text{mol/L}$ SAHA group
1	14.33±0.38	11.50±0.43	13.17±1.38	7.92±2.25 ^b	8.67±1.42 ^b
2	24.17±6.90	13.25±2.14	10.00±2.65 ^a	8.50±1.95 ^b	2.25±0.00 ^b
3	56.38±2.26	26.75±7.28 ^b	21.50±2.50 ^b	7.00±1.32 ^b	1.88±1.30 ^b
4	114.75±12.28	28.50±8.11 ^b	21.25±5.04 ^b	10.75±1.21 ^b	1.62±1.85 ^b
5	127.46±7.64	36.88±5.96 ^b	27.75±2.46 ^b	8.50±2.26 ^b	0.88±0.78 ^b

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.005$, vs. normal control group. Inspection standard was 0.0125

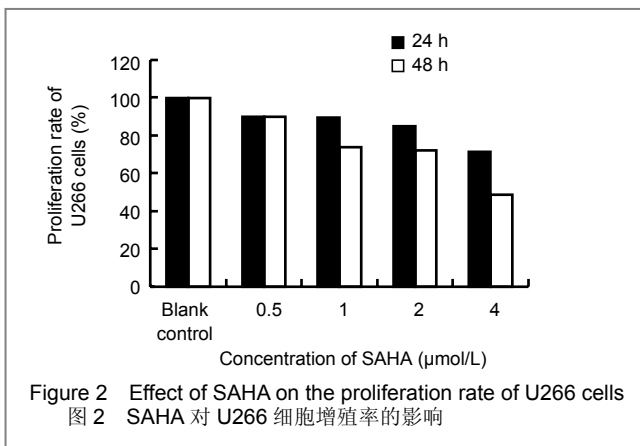


MTT法测算细胞增殖抑制率: 见表2, 图2。

表2 SAHA 对 U266 细胞生长的抑制作用(MTT 法)
Table 2 Inhibitory effect of SAHA on the growth of U266 cells (MTT assay) (n=6)

Group	A ₅₇₀ (x̄±s)		Proliferation rate (%)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Blank control	0.081 5±0.003 8	0.102 7±0.005 6	100.00	100.00
0.5 μmol/L SAHA	0.075 8±0.004 1	0.096 2±0.004 1	89.84	89.74
1 μmol/L SAHA	0.075 7±0.003 6	0.086 0±0.007 7 ^b	89.45	73.68
2 μmol/L SAHA	0.073 7±0.004 2 ^a	0.085 0±0.010 7 ^b	84.77	72.11
4 μmol/L SAHA	0.068 0±0.005 6 ^b	0.070 1±0.010 9 ^b	71.48	48.68

^aP < 0.005, ^bP < 0.001, vs. blank control group. Inspection standard was 0.012 5



不同浓度SAHA对U266细胞增殖有抑制作用, 而且这种作用呈时间-剂量依赖关系, 随SAHA浓度增加或作用时间延长, U266细胞增殖抑制率增加。

2.2 SAHA对U266细胞凋亡的影响

AnnexinV/PI双标法流式细胞术检测细胞凋亡: 见图3, 4及表3。

U266细胞经SAHA作用48 h后, 用流式细胞仪检测细

胞凋亡率。结果显示, 在一定的浓度范围内(0~4 μmol/L) SAHA诱导U266细胞的凋亡率随着SAHA浓度的增加而增加, 差异具有显著性意义(P < 0.01)。

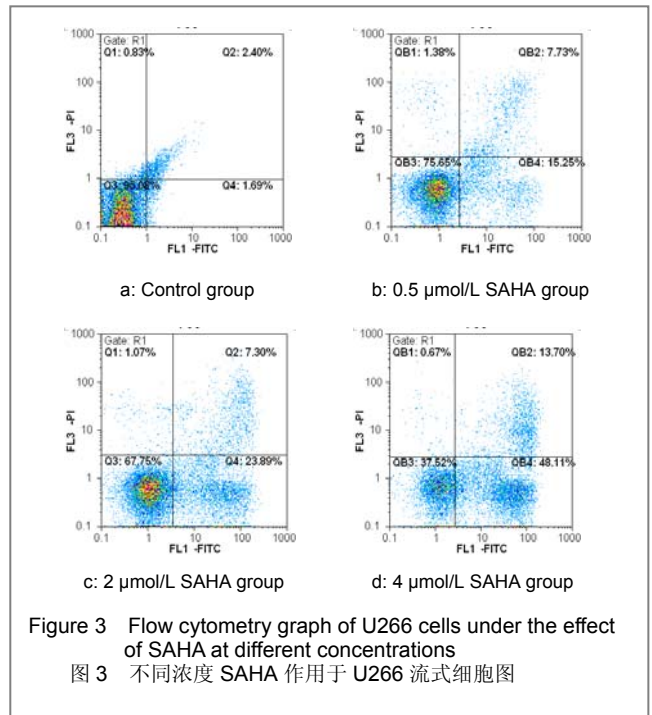
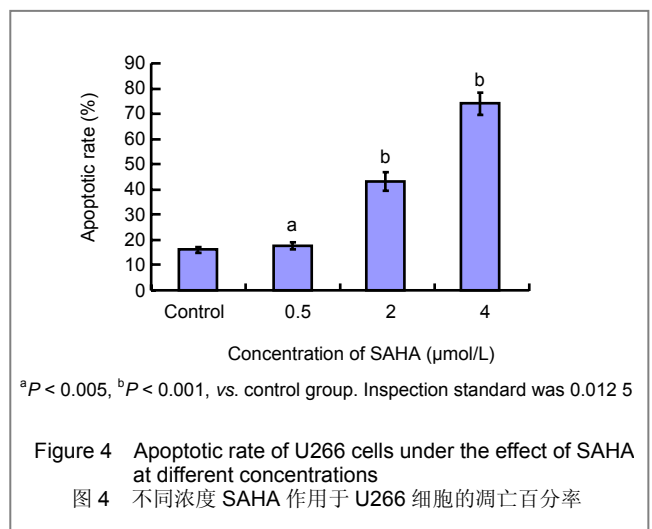


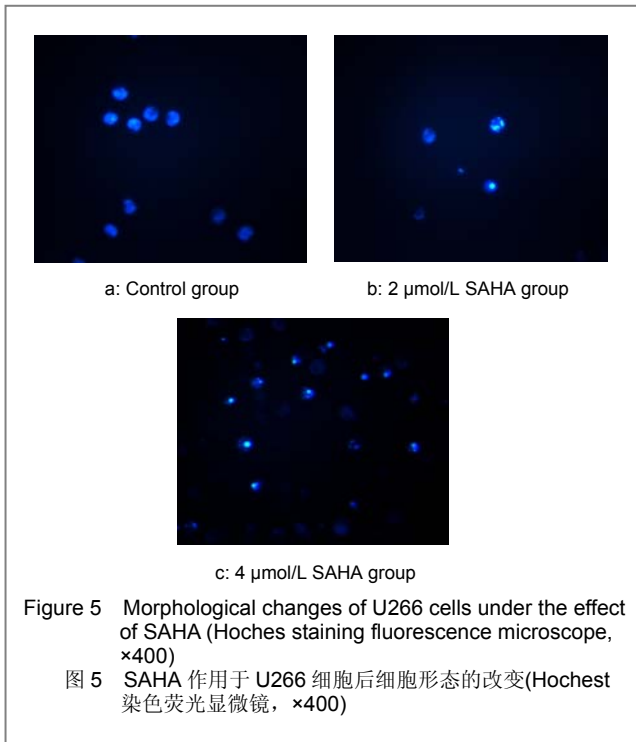
表3 不同浓度 SAHA 作用于 U266 细胞的凋亡百分率
Table 3 Apoptotic rate of U266 cells under the effect of SAHA at different concentrations (n=3, %)

Group	Apoptotic rate
Control	16.07±1.11
0.5 μmol/L SAHA	17.61±1.30 ^a
2 μmol/L SAHA	43.13±3.80 ^b
4 μmol/L SAHA	74.01±4.39 ^b

^aP < 0.005, ^bP < 0.001, vs. control group. Inspection standard was 0.012 5



Hochest染色荧光显微镜观察凋亡细胞的形态改变: 见图5。



经Hoechst 33342染色的U266细胞, 对照组细胞核大小均一, 呈圆形或椭圆形, 染色质分布均匀, 紫外光下显蓝色荧光, 出现个别凋亡细胞。而经SAHA处理48 h后的U266细胞, 细胞形态出现不同程度的皱缩, 变形, 胞浆浓缩、核染色质聚集、核固缩、部分核碎裂, 出现凋亡小体。

2.3 SAHA对U266细胞信号蛋白表达的影响 见图6。

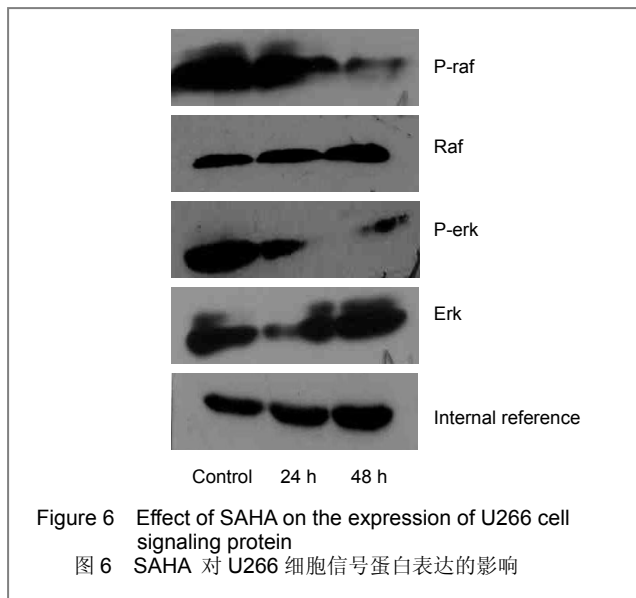


图6结果表明, 细胞内重要的信号通路Ras/Raf/Mek/Erk(p44/42MAPK)被阻断, 表现为Raf激酶及Erk激酶的磷酸化受到显著抑制。细胞p44/42MAPK信号通路在药物作用后24 h即出现活性降低, 至用药后48 h, 激酶活性出现明显降低, 提示

p44/42MAPK信号通路阻断在介导细胞凋亡中起重要的作用。

3 讨论

多发性骨髓瘤是一种起源于B细胞系并能够产生单克隆免疫球蛋白(M蛋白)的恶性增生性疾病, 约占血液恶性肿瘤的10%。其特点是骨髓中异常浆细胞恶性增殖并浸润骨骼及软组织而产生M蛋白, 临床症状为骨痛、骨质破坏、病理性骨折、高血钙、肾功能不全等^[10]。目前, 传统上的常规化疗难以达到完全缓解, 虽然近年来蛋白酶体抑制剂硼替佐米的出现, 但其缓解率仍不高^[11]。因此, 研究疗效好、不良反应小的药物是目前迫切的问题。HDACI可以通过细胞周期阻滞、诱导分化和凋亡等机制对血液系统肿瘤和一些实体瘤产生明显抑制作用^[12-13], 且其特异性的诱导肿瘤细胞凋亡, 对正常细胞影响较小^[14-15]。将其用于多发性骨髓瘤, 观察其对肿瘤细胞的作用以及探索其中的机制势必成为今后研究的热点。目前此方面报道还较少, 且HDACI本身抗肿瘤作用的分子机制尚不十分清楚, 存在许多问题尚待进一步阐明。

本实验应用SAHA作用于人多发性骨髓瘤细胞株U266细胞, 观察SAHA是否具有对U266的体外抗增殖作用。研究结果表明SAHA能有效抑制U266细胞增殖, 其抗增殖作用与时间、剂量呈正依赖关系。这说明SAHA具有对MM的抗肿瘤特性。流式细胞仪检测结果及Hoechst33342凋亡细胞形态学检测结果显示SAHA能诱导U266细胞凋亡, 这与其抑制增殖结果相符。

Ras/Raf/MEK/ERK通路与肿瘤细胞增殖的关系最为密切^[16-20]。上游激活蛋白Ras为小G蛋白; Raf/ MAPKKK是Ser/Thr蛋白激酶; ERK激酶(MEK)/ MAPKK有MEK1和MEK2两种, 属于少有的双重特异性蛋白激酶(dualspecificity protein kinase), 既为Tyr蛋白激酶, 又为Ser/Thr蛋白激酶; 胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)/ MAPK是一种Ser/Thr蛋白激酶, 有ERK1和ERK2两个亚族^[21-23]。Ras被生长因子、细胞因子激活, 由失活态Ras-GDP结合构象转变为活化态Ras-GTP结合构象, 招募Raf激酶家族到胞膜并激活Raf, 启动Ras通路。Raf通过其C端的激酶功能域催化MEK1/2的丝氨酸残基磷酸化而激活, 继而MEK1/2的激酶功能域催化ERK1/2亚功能区8中的酪氨酸和苏氨酸残基磷酸化而激活, ERK1/2由胞浆移位至细胞核, 磷酸化一系列转录因子, 调控基因表达, 细胞膜、细胞核、细胞骨架及内膜系统的多种功能都受其影响^[24-25]。因此, ERK通路中有3个关键的分子靶: Ras, Raf和MEK。ERK可被各种生长因子等有丝分裂原激活, 进入细胞核作用于c-jun、c-fos、c-Myc、cERK1等转录因子

及核蛋白, 促进多种癌基因及细胞周期调节相关基因的转录与表达, 促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡^[26-27]。本实验结果显示 SAHA 通过阻断 Ras/Raf/MEK/ERK (P44/42MAPK) 信号通路诱导 U266 细胞凋亡。Raf-1 和 Erk 蛋白的磷酸化水平, 经 SAHA 处理细胞 24 h 出现降低, SAHA 处理细胞 48 h 出现明显降低, 呈时间依赖性。

本实验结果证实, SAHA 作为组蛋白去乙酰化酶抑制剂通过阻断 Ras/Raf /MEK/ERK(P44/42MAPK) 信号通路, 有效抑制骨髓瘤细胞 U266 增殖并诱导凋亡。本实验结果加深了对 HDAC1 作用机制的认识, 为 SAHA 应用于临床及与其他药物的联合应用具有指导意义, 为将来多发性骨髓瘤的治疗提供了一个新的选择。

4 参考文献

- [1] Johnstone RW, Licht JD. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell*. 2003; 4(1):13-18.
- [2] Krämer OH, Göttlicher M, Heinzel T. Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol Metab*. 2001; 12(7):294-300.
- [3] Kelly WK, O'Connor OA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002; 11(12):1695-1713.
- [4] Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, et al. MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor with selectivity against HDAC1, induces degradation of FLT3 via inhibition of chaperone function of heat shock protein 90 in AML cells. *Leuk Res*. 2008; 32(9):1382.
- [5] Kang MR, Kang JS, Han SB, et al. A novel delta-lactam based histone deacetylase inhibitor, KBH-A42, induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2009; 78(5):486.
- [6] Sun C, Zhou J. Trichostatin A improves insulin stimulated glucose utilization and insulin signaling transduction through the repression of HDAC2. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76(1):120.
- [7] Gahr S, Peter G, Wissniowski TT. The histone-deacetylase inhibitor MS-275 and the CDK- inhibitor CYC-202 promote anti-tumor effects in hepatoma cell lines. *Oncol Rep*. 2008; 20(5):1249.
- [8] Hahold C, Poehlmann A, Bajbouj K, et al. Trichostatin A causes p53 to switch oxidative damaged colorectal cancer cells from cell cycle arrest into apoptosis. *J Cell Mol Med*. 2008; 12(2): 607.
- [9] Kelly WK, Marks PA. Drug insight. Histone deacetylase inhibitors development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005; 2(3):150-157.
- [10] Yan DX, Liu ZL, Mao ZM. *Zhongguo Yaofang*. 2007; 18(2):143 严冬翔, 刘增路, 毛振民. 多发性骨髓瘤治疗药物研究进展[J]. *中国药房*, 2007, 18(2):143.
- [11] Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood*. 2007; 110(10):3557.
- [12] Brandt WD, Matsui W, Rosenberg JE, et al. Rosenberg et al. Urothelial carcinoma: Stem cells on the edge. *Cancer Metastasis Rev*. 2009; 28(3-4):291-304.
- [13] Sang L, Roberts JM, Collier HA. Coller Hijacking HES1: Tumors Co-opt the anti-differentiation strategies of quiescent cells. *Trends Mol Med*. 2010; 16(1):17-26.
- [14] Qiu L, Kelso M J, Hansen C, et al. Anti-tumour activity in vitro and in vivo of selective differentiating agents containing hydroxamate. *Br J Cancer*. 1999; 80:1252-1258.
- [15] Mariadason JM, Corner GA, Augenlicht LH. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res*. 2000; 60:4561-4572.
- [16] Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802(4): 396-405.
- [17] Zhang F, Li N. *Zhongguo Zhongliu Shengwu Zhiliao Zazhi*. 2007; (14):497-500. 张丰, 李楠. ERK/MAPK 信号传导途径在乳腺肿瘤治疗中的意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, (14):497-500.
- [18] Maemura K, Shiraishi N, Sakagami K, et al. Proliferative effects of gamma-aminobutyric acid on the gastric cancer cell line are associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009; 24(4):688-696.
- [19] Huang D, Ding Y, Luo WM, et al. Inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo. *Cancer Res*. 2008; 68(1):81-88.
- [20] Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*. 2006; 24(1):21-44.
- [21] Bouhon TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, et al. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*. 1990; 249 (4964):64-67.
- [22] Buder-Hoffmann S, Palmer C, Vacek P, et al. Different accumulation of activated extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and role in cell-cycle alterations by epidermal growth factor, hydrogen peroxide, or asbestos in pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24(4):405-413.
- [23] Kawahara E, Nakada N, Hikichi T, et al. EGF and beta1 integrin converge to regulate migration of A431 carcinoma cell through MAP kinase activation. *Exp Cell Res*. 2002; 272(1):84-91.
- [24] Junttila MR, Li SP, Westermarck J, et al. Phosphatase mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*. 2008; 22(4):954-965.
- [25] Tanoue T, Nishida E. Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther*. 2002; 93(2-3):193-202.
- [26] Lenormand P, Broadello JM, Brunet A, et al. Growth factor-induced P42/P44 MAPK nuclear Translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol*. 1998; 142(3):625-633.
- [27] Coso OA, Chiariello M, Kalinec G, et al. Transforming G Protein-coupled receptors potentially activate JNK(SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. *J Biol Chem*. 1995; 270(10):5620-5624.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献: 实验为通讯作者设计, 第一、二、三作者共同实施评估, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 无涉及伦理冲突的内容。

本文创新性: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 已经 FDA 批准上市, 用于治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤, 它是首个上市的 HDAC1。目前实验研究表明, 其对多种实体瘤及血液系统肿瘤有较强的杀伤作用, 将其作用于多发性骨髓瘤细胞株的实验研究还鲜有报道。文章用 SAHA 作用于 U266 细胞, 为今后临床上 SAHA 治疗多发性骨髓瘤提供实验基础。