

. 实验研究 .

TSA 联合 HSV-1 对 C6 鼠胶质瘤细胞株细胞增殖、细胞凋亡的影响

许强华 陈新军 刘平非 谢 腾 陈晓巍 陈治军

**【摘要】目的** 探讨曲古抑菌素 A(TSA)联合 I 型单纯疱疹病毒(HSV-1)对 C6 鼠胶质瘤细胞株细胞增殖、细胞凋亡的影响。**方法** 体外培养 C6 胶质瘤细胞,设对照组(加入等体积培养基)、TSA 组(加入  $0.5\times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/L}$  TSA 处理)、HSV-1(加入 10 MOI HSV-1 处理)及 TSA+HSV-1 组(加入  $0.5\times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/L}$  TSA 和 10 MOI HSV-1 处理)共 4 组,每组设 5 个复孔。CCK-8 法检测细胞增殖活性;流式细胞仪检测细胞凋亡率;RT-PCR、免疫印迹法检测血管内皮细胞生长因子(VEGF)的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 作用 48、72 h,与对照组相比,TSA 组、HSV-1 组、TSA+HSV-1 组 C6 细胞增殖活性显著降低( $P<0.01$ ),细胞凋亡率明显增高( $P<0.05$ ),VEGF mRNA 和蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ );而且,TSA+HSV-1 组明显优于 TSA 组和 HSV-1 组( $P<0.05$ )。**结论** TSA 联合 HSV-1 对体外培养的 C6 细胞可产生协同或叠加杀伤作用,抑制 VEGF 表达可能是作用机制之一。

**【关键词】** 胶质瘤;C6 胶质瘤细胞;细胞增殖;细胞凋亡;曲古抑菌素 A; I 型单纯疱疹病毒

**【文章编号】** 1009-153X(2020)05-0299-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Effects of TSA combined with HSV-1 on cell proliferation and apoptosis of C6 glioma cells

XU Qiang-hua<sup>1</sup>, CHEN Xin-jun<sup>2</sup>, LIU Pin-fei<sup>1</sup>, XIE Teng<sup>1</sup>, CHEN Xiao-wei<sup>1</sup>, CHEN Zhi-jun<sup>1</sup>. 1. Department of Neurosurgery, The First People's Hospital of Jingmen, Jingmen 448000, China; 2. Department of Neurosurgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of trichostatin A (TSA) combined with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) on the cell proliferation and apoptosis of C6 glioma cells. **Methods** C6 glioma cells were cultured in vitro, and then randomly divided into four groups, i.e., control group (treatment with equal volume of culture medium), TSA group (treatment with  $0.5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/L}$  TSA), HSV-1 group (treatment with 10 MOI HSV-1) and TSA+HSV-1 group (treatment with  $0.5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/L}$  TSA and 10 MOI HSV-1). CCK-8 method was used to detect cell proliferation activity. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. RT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), respectively. **Results** Compared with the control group, the proliferation rates of C6 cells were significantly reduced ( $P<0.01$ ), the apoptosis rates were significantly increased ( $P<0.05$ ), and the expression levels of VEGF mRNA and protein were significantly reduced ( $P<0.05$ ) in the TSA group, HSV-1 group, and TSA+HSV-1 group. Moreover, the effect of TSA+HSV-1 group was significantly better than the TSA group and HSV-1 group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** TSA combined with HSV-1 can produce synergistic killing effects on cultured C6 cells, which may be related to the inhibition of VEGF.

**【Key words】** Glioma; C6 cell line; Cell proliferation; Cell apoptosis; Trichostatin A; Herpes simplex virus type 1

传统的手术治疗联合术后放疗、化疗对恶性胶质瘤的治疗效果有限<sup>[1]</sup>。近年来,寻求恶性胶质瘤新的治疗方法越来越被重视。由于传统的肿瘤放疗、化疗与病毒生物疗法并无交叉耐药性,因此,可以联合传统放疗、化疗与病毒治疗,以达到协同或叠加效应<sup>[2]</sup>。本文探讨组蛋白去乙酰化酶(histone

deacetylase, HDAC)抑制剂曲古抑菌素 A(tropicostatin A, TSA)联合野生型 I 型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type I, HSV-1)对体外培养的大鼠神经胶质瘤细胞(C6 细胞)增殖、凋亡的影响,为 HDAC 抑制剂联合溶瘤病毒生物治疗恶性胶质瘤提供参考。

1 材料与方法

1.1 C6 细胞培养 常规复苏 C6 鼠胶质瘤细胞株(中科院细胞库),DMEM+10% FBS+1%双抗(美国 Gibco 公司),T25 细胞培养瓶培养。细胞长满培养瓶表面 80%~90%,0.25%胰酶(吉林省吉诺生物工程有限责

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.05.014  
基金项目:湖北省荆门市引导性科技项目(YDKY2015007)  
作者单位:448000 湖北,荆门市第一人民医院神经外科(许强华、刘平非、谢 腾、陈晓巍、陈治军);430071 武汉,武汉大学中南医院神经外科(陈新军)  
通讯作者:陈治军,E-mail:xuqianghua222@126.com

任公司)消化 2 min,加新鲜完全培养基终止消化,用移液器轻轻吹散细胞,收集至 15 ml 离心管中,1 000 转/min 离心 5 min,去上清,加入新鲜完全培养基吹散细胞团,细胞计数,细胞悬液按  $3 \times 10^4/\text{cm}^2$  移至新的培养瓶中传代。

1.2 HSV-1 病毒扩增及滴度测定 接种 HSV-1(武汉大学病毒研究所馈赠)悬液 0.5 ml 于已铺有细胞的培养瓶培养,待 80% 的细胞出现病变后,反复冻融三次,通过 CsCl 密度梯度离心法进行抽提、纯化 HSV-1。最后通过空斑形成实验准确测定其滴度。

1.3 CCK-8 法检测 C6 细胞增殖活性 细胞消化后计数并调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/ml。96 孔板上每孔加入 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液,恒温培养箱内培养过夜。次日置换新鲜培养基。每孔培养体积 200  $\mu\text{l}$ ,设对照组(加入等体积培养基)、TSA 组(加入  $0.5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/L}$  TSA 处理)、HSV-1(加入 10 MOI HSV-1 处理)及 TSA+HSV-1 组(加入  $0.5 \times 10^{-3}$   $\mu\text{mol/L}$  TSA 和 10 MOI HSV-1 处理)共 4 组,每组设 5 个复孔。另设空白调零孔。培养 48、72 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 溶液(东仁化学科技有限公司),培养箱内孵育 2 h。室温平衡后,用酶标仪测定 450 nm 处吸光度。计算各组细胞增殖活性。

1.4 C6 细胞凋亡率的检测 同 CCK-8 法制备细胞悬液及分组。培养 48、72 h 后,弃去培养基,漂洗后胰酶消化,加完全培养基离心,弃上清。将细胞重悬于 400  $\mu\text{l}$  结合缓冲液中,每管加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{l}$  PI(美国 BD 公司),室温避光孵育 15 min,混匀,70  $\mu\text{m}$  筛网过滤,转移至流式管,1 h 内上流式细胞仪检测。

1.5 RT-PCR 检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA 表达水平 取细胞样品,加入 1 ml RNAiso Plus(Trizol),吹打细胞,加入 200  $\mu\text{l}$  氯仿,混匀、离心,吸取上清至另一离心管中,加入等量的异丙醇混匀,  $-20^\circ\text{C}$  沉淀,  $4^\circ\text{C}$  离心,弃上清。加入 1 ml 75%乙醇,  $4^\circ\text{C}$  离心,弃上清,真空干燥 5~10 min。20  $\mu\text{l}$  DEPC  $\text{H}_2\text{O}$  溶解 RNA 样品, RNA 纯度的测定和 RNA 的定量以 DEPC  $\text{H}_2\text{O}$  为对照,取 2  $\mu\text{l}$  RNA 溶液于酶标仪上检测样本浓度和质量。将 RNA 样品进行逆转录反应及 PCR 扩增反应。引物序列: VEGF 正义链 5'-TCACCGGAAAGACCGATTAAC-3',反义链 5'-CCCTTCATGTCAGGCTTTCT-3'; 内参 GAPDH 正义链 5'-AGACAGCCGCATCTTCTTG-3',反义链 5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'。

1.6 免疫印迹法检测 VEGF 蛋白水平 将细胞样品用

胰酶消化、离心、洗涤后转移至 EP 管中,加入 200  $\mu\text{l}$  的 RIPA 冰上裂解 30 min,  $4^\circ\text{C}$  离心 15 min,上清转移至离心管,用 BCA 法检测细胞裂解液的蛋白浓度。通过制胶,样品处理后上样、电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育,显影拍照分析。

1.7 统计学方法 应用 SPSS 22.0 软件进行分析;计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TSA 联合 HSV-1 对 C6 细胞增殖活性的影响 处理 48、72 h, TSA 组、HSV-1 组、TSA+HSV-1 组 C6 细胞增殖活性较对照组显著降低 ( $P < 0.05$ ),而且, TSA+HSV-1 组 C6 细胞增殖活性较 TSA 组和 HSV-1 组明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

2.2 TSA 联合 HSV-1 对 C6 细胞凋亡率的影响 处理 48、72 h, TSA 组、HSV-1 组、TSA+HSV-1 组 C6 细胞凋亡率较对照组显著增高 ( $P < 0.05$ ),而且, TSA+HSV-1 组 C6 细胞凋亡率较 TSA 组和 HSV-1 组明显增高 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

2.3 TSA 联合 HSV-1 对 C6 细胞 VEGF 表达水平的影响 处理 48、72 h, TSA 组、HSV-1 组、TSA+HSV-1 组 C6 细胞 VEGF mRNA 和蛋白表达水平较对照组显著降低 ( $P < 0.05$ ),而且, TSA+HSV-1 组 C6 细胞 VEGF mRNA 和蛋白表达水平较 TSA 组和 HSV-1 组明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 3、4。

## 3 讨论

溶瘤病毒的溶瘤特性对治疗恶性胶质瘤具有极大潜力,并在很多基础研究及临床试验中得到了证实<sup>[3]</sup>。HSV-1 为研究最早的溶瘤病毒,为了提高溶瘤病毒治疗的安全性、靶向性及溶瘤效应,目前已研发出多种基因重组 HSV-1<sup>[4]</sup>。

组蛋白乙酰化调控基因表达是重要的表观遗传学修饰机制之一。研究表明,由于乙酰化的组蛋白分子电荷的改变,使染色体结构松散而增加转录因子和其它转录调节分子结合到基因启动子的机会,激活肿瘤抑制基因的表达,促进肿瘤细胞凋亡<sup>[5,6]</sup>;同时也通过导致肿瘤细胞周期停滞、阻止癌基因表达抑制肿瘤细胞增殖<sup>[7-9]</sup>。

一直以来,传统的放疗与化疗的联合作用较易出现交叉耐药,导致治疗效果不理想。由于目前还没有关于肿瘤细胞对化疗和溶瘤病毒交叉耐药的报道,更重要的是,大多数情况下,对化疗抵抗的肿瘤

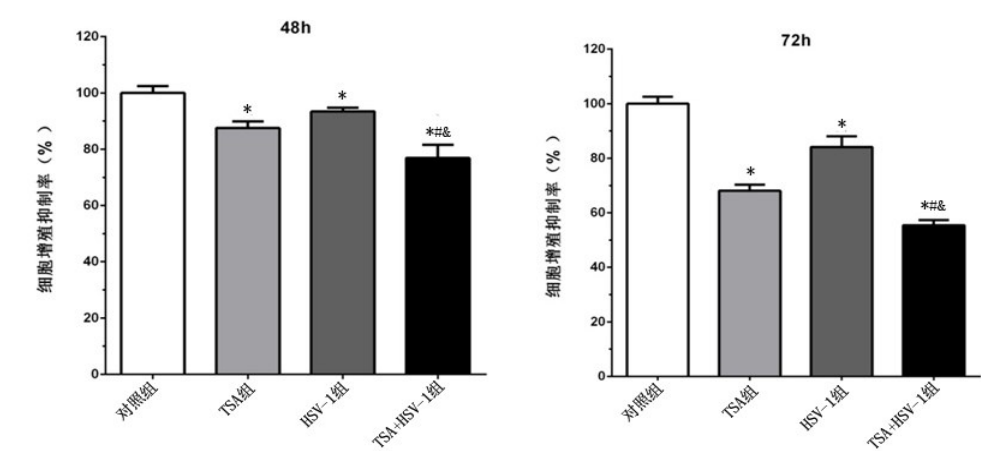


图1 TSA联合HSV-1对C6细胞增殖活性的影响  
与对照组相应值比,\* $P<0.05$ ;  
与TSA组相应值比,# $P<0.05$ ;  
与HSV-1组相应值比,& $P<0.05$ ;TSA. 曲古抑菌素A;  
HSV-1. 野生型I型单纯疱疹病毒

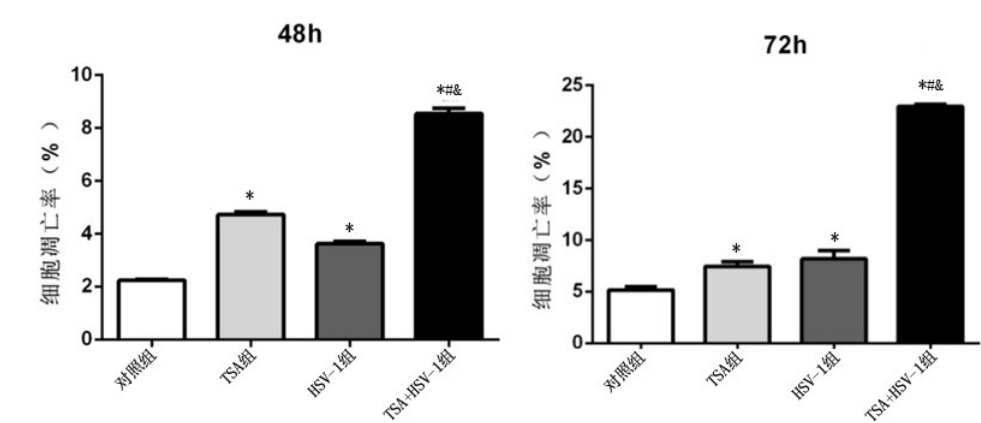


图2 TSA联合HSV-1对C6细胞凋亡率的影响  
与对照组相应值比,\* $P<0.05$ ;  
与TSA组相应值比,# $P<0.05$ ;  
与HSV-1组相应值比,& $P<0.05$ ;TSA. 曲古抑菌素A;  
HSV-1. 野生型I型单纯疱疹病毒

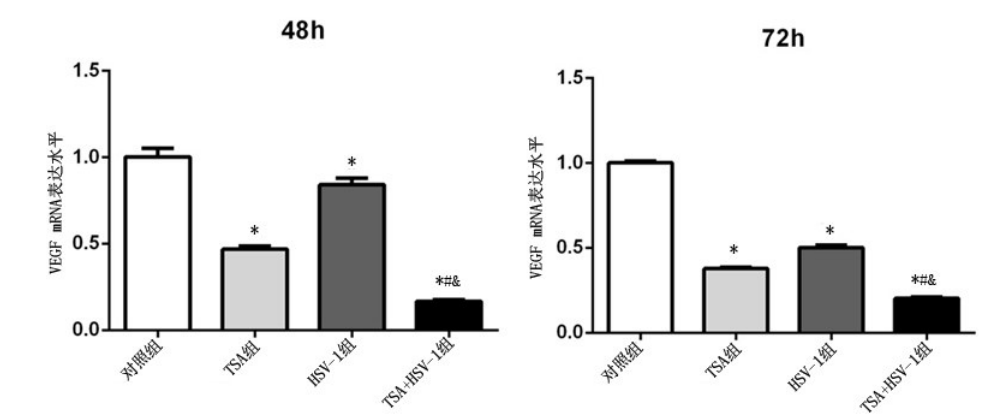


图3 TSA联合HSV-1对C6细胞VEGF mRNA表达水平的影响  
与对照组相应值比,\* $P<0.05$ ;  
与TSA组相应值比,# $P<0.05$ ;  
与HSV-1组相应值比,& $P<0.05$ ;TSA. 曲古抑菌素A;  
HSV-1. 野生型I型单纯疱疹病毒;VEGF. 血管内皮细胞生长因子

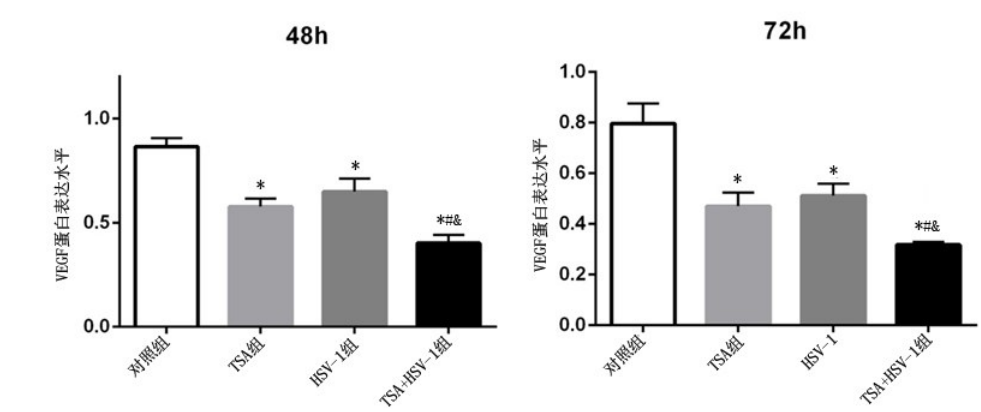


图4 TSA联合HSV-1对C6细胞VEGF蛋白表达水平的影响  
与对照组相应值比,\* $P<0.05$ ;  
与TSA组相应值比,# $P<0.05$ ;  
与HSV-1组相应值比,& $P<0.05$ ;TSA. 曲古抑菌素A;  
HSV-1. 野生型I型单纯疱疹病毒;VEGF. 血管内皮细胞生长因子

细胞表现出对溶瘤病毒治疗的敏感<sup>[3]</sup>。本研究应用体外 C6 细胞模型,结果显示,TSA+HSV-1 联合作用较各单一作用效果更好。这说明 TSA 联合 HSV-1 对体外培养的 C6 细胞可产生协同或叠加杀伤作用。另外,TSA+HSV-1 联合作用明显降低 C6 细胞 VEGF 表达水平,这提示 TSA+HSV-1 联合作用抗肿瘤效应可能与降低 VEGF 表达有关。

【参考文献】

[1] 蒋 静,陈 力,于顺江. 神经胶质瘤生物治疗的研究现状与进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2014,3:517-520.

[2] Ryuichi K, Hiroaki W, Tooba C, *et al.* Oncolytic herpes simplex virus vectors and chemotherapy: are combinatorial strategies more effective for cancer [J]? Future Oncol, 2010, 6: 619-627.

[3] Parer JN, Bauer DF, Cody JJ, *et al.* Oncolytic viral therapy of malignant glioma [J]. Neurotherapeutics, 2009, 6(3): 558-565.

[4] Wang JN, Xu LH, Zeng WG, *et al.* Treatment of human

thyroid carcinoma cells with the g47 deta oncolytic herpes simplex virus [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16: 1241-1267.

[5] De Souza C, Chatterji BP. HDAC Inhibitors as novel anti-cancer therapeutics [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2015, 10: 145-172.

[6] Marks PA, Richon VM, Breslow R, *et al.* Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs [J]. Curr Opin Oncol, 2001, 13: 477-497.

[7] Greer CB, Tanaka Y, Kim YJ, *et al.* Histone deacetylases positively regulate transcription through the elongation machinery [J]. Cell Rep, 2015, 13: 1444-1489.

[8] Kim YJ, Greer CB, Cecchini KR, *et al.* HDAC inhibitors induce transcriptional repression of high copy number genes in breast cancer through elongation blockade [J]. Oncogene, 2013, 32: 2828-2867.

[9] Chen JS, Faller DV. Histone deacetylase inhibition-mediated post-translational elevation of p27KIP1 protein levels is required for G1 arrest in fibroblasts [J]. J Cell Physiol, 2005, 202: 87-125.

(2019-09-28 收稿,2019-12-10 修回)

(上接第 298 页)

本文同样发现,血清外泌体 miRNA-30a-5p 诊断胶质瘤的价值较高,灵敏度和特异度分别为 78.05%和 93.55%。Lan 等<sup>[8]</sup>发现胶质瘤血清外泌体 miRNA-310a 的表达水平明显高于垂体腺瘤、脑膜瘤、中枢神经系统 B 细胞淋巴瘤。这提示血清外泌体 miRAN 有助于颅内肿瘤鉴别诊断。本文还发现,miRNA-30a-5p 高表达胶质瘤病人较低表达病人生存期明显缩短。多因素 Cox 比例回归风险模型分析结果显示血清外泌体 miRNA-30a-5p 高表达是胶质瘤病人预后不良的独立危险因素。这提示血清外泌体 miRNA-30a-5p 可作为胶质瘤预后评估指标。

【参考文献】

[1] Gusyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options [J]. Semin Cancer Biol, 2018, 51(1): 50-58.

[2] Mansoori B, Mohammadi A, Shirjang S, *et al.* MicroRNAs in

the diagnosis and treatment of cancer [J]. Immunol Invest, 2017, 46(8): 880-897.

[3] Yu X, Odenthal M, Fries JW. Exosomes as miRNA carriers: formation-function-future [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): E2028-E2037.

[5] 赵建辉,胡世颀,费 舟. miRNA 在胶质瘤临床诊疗中的研究进展 [J]. 中国临床神经外科杂志,2016,21(10): 642-645.

[6] Wang Z, Dai X, Chen Y, *et al.* MiR-30a-5p is induced by Wnt/beta-catenin pathway and promotes glioma cell invasion by repressing NCAM [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 465(3): 374-380.

[7] Yang JK, Yang JP, Tong J, *et al.* Exosomal miR-221 targets DNMT3 to induce tumor progression and temozolomide resistance in glioma [J]. J Neurooncol, 2016, 131(2): 1-11.

[8] Lan F, Qing Q, Pan Q, *et al.* Serum exosomal miR-301a as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma [J]. Cell Oncol (Dordr), 2018, 41(1): 25-33.

(2019-12-27 收稿,2020-03-02 修回)