

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 CUDC-101 对前列腺癌 DU145 细胞 DNA 损伤、迁移和上皮-间质转化的影响

那佈其^{1,2}, 权春姬¹, 赵芳¹, 杨凡¹, 肖茹¹, 金雪梅¹, 李玲玲¹

(1. 延边大学附属医院病理科, 吉林 延吉 133000; 2. 健康产业集团铁煤总医院病理科, 辽宁 调兵山 112700)

[摘要] **目的:** 探讨泛素化组蛋白 (H2AX) 在前列腺癌 (PCa) 和癌旁良性前列腺组织中的表达及其与 PCa 患者临床病理参数之间的关系, 阐明新型组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (HDACi) CUDC-101 对 PCa 的 DNA 损伤、迁移及上皮-间质转化 (EMT) 的影响。**方法:** 肿瘤基因组谱 (TCGA) 数据库和 UALCAN 数据库检索各种癌症组织中 H2AX mRNA 的表达情况及其在 PCa 与正常前列腺组织中的表达差异, 分析其表达与 PCa 患者临床预后的关系; 采用免疫组织化学染色法检测在 PCa 组织和癌旁良性前列腺组织中 H2AX 蛋白的表达情况, 分析 H2AX 蛋白表达与 PCa 患者临床病理参数的关系; 体外培养 DU145 细胞, 分为对照组、5% FBS 组、5% FBS+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CUDC-101 组和 5% FBS+200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CUDC-101 组, 采用细胞划痕实验和 Transwell 小室实验检测 CUDC-101 处理前后 PCa DU145 细胞的细胞划痕面积及迁移细胞数; 免疫荧光染色法检测 CUDC-101 处理后 PCa DU145 细胞中上皮细胞标志物 E 钙黏蛋白 (E-cadherin) 和磷酸化组蛋白 γ -H2AX 表达情况; Western blotting 法检测 CUDC-101 处理后 EMT 相关蛋白、 γ -H2AX 和磷酸化蛋白激酶 B (p-AKT) 表达情况。**结果:** TCGA 数据库和 UALCAN 数据库分析, H2AX mRNA 在 PCa 组织中高表达, 并且 H2AX 低表达组患者的无病生存期 (DFS) 明显高于 H2AX mRNA 高表达组 ($P<0.001$); 免疫组织化学染色, 在 PCa 组织中 H2AX 蛋白强阳性表达率高于在癌旁良性前列腺组织 (64.34% vs 14.29%), 其过表达与 PCa 的 T 分期 ($P=0.001$) 和世界卫生组织/国际泌尿科病理学会 (WHO/ISUP) 预后分级分组 ($P=0.004$) 有关, 但与 PCa 患者的年龄、Gleason 评分、淋巴结转移、神经和脉管浸润无关 ($P>0.05$); 免疫荧光染色法检测, 与对照组和 EMT 诱导组比较, CUDC-101 处理组 E-cadherin 和 γ -H2AX 蛋白的荧光表达增强; 细胞划痕实验和 Transwell 小室实验检测, 与对照组比较, CUDC-101 处理组 DU145 细胞愈合面积和迁移细胞数明显下调; Western blotting 法检测, 与 EMT 诱导组比较, CUDC-101 处理组 E-cadherin 和 γ -H2AX 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 波形蛋白 (Vimentin) 和 p-AKT 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:** H2AX 蛋白过表达与 PCa 患者的不良预后密切相关。新型 HDACi 抑制剂 CUDC-101 可调控 H2AX 和 AKT 的磷酸化, 抑制 PCa 细胞 EMT 过程。

[关键词] CUDC-101; 泛素化组蛋白; 前列腺肿瘤; 上皮-间质转化; DNA 损伤

[中图分类号] R737.2 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-05-11

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目 (81860043); 国家自然科学基金青年基金项目 (81902790); 吉林省科技厅科技发展计划项目 (20200201571JC); 延边大学应用基础项目 (延大科合字 [2019] 第 27 号)

[作者简介] 那佈其 (1994-), 女, 内蒙古自治区兴安盟人, 医师, 医学硕士, 主要从事肿瘤诊断方面的研究。

[通信作者] 金雪梅, 副主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: 15526771571@163.com);

李玲玲, 主治医师 (E-mail: 674439345@qq.com)

Effect of histone deacetylase inhibitor CUDC-101 on DNA damage, migration, and epithelial-mesenchymal transition of prostate cancer DU145 cells

NA Buqi^{1,2}, QUAN Chunji¹, ZHAO Fang¹, YANG Fan¹, XIAO Ru¹, JIN Xuemei¹, LI Zhenling¹

(1. Department of Pathology, Affiliated Hospital, Yanbian University, Yanji 133000, China;

2. Department of Pathology, Tiemei General Hospital of Health Industry Group, Diaobingshan 112700, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the expression of ubiquitinated histone (H2AX) in the prostate cancer (PCa) and adjacent benign prostate tissues, and its relationship with the clinicopathological parameters of the PCa patients, and to clarify the effect of the novel histone deacetylase inhibitor (HDACi) CUDC-101 on the DNA damage, migration, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in PCa. **Methods:** The expression levels of H2AX mRNA in various cancer tissues were retrieved from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and UALCAN Databases to analyze the expression differences between PCa and normal prostate tissues and its connection with the clinical prognosis of the patients with PCa; immunohistochemistry method was used to detect the expression of H2AX protein in PCa tissue and adjacent benign prostate tissue, and its relationship with the clinicopathological parameters of the PCa patients was analyzed. The DU145 cells were cultured *in vitro* and divided into control group, 5% FBS group, 5% FBS+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CUDC-101 group, and 5% FBS+200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CUDC-101 group. Cell scratch assay and Transwell chamber assay were used to detect the scratch area of the cells and the number of migration cells in the PCa DU145 cells before and after treated with CUDC-101; immunofluorescence staining was used to detect the expressions of epithelial cell marker E-cadherin (E-cadherin) and phosphorylated histone γ -H2AX in the PCa DU145 cells after treated with CUDC-101; Western blotting method was used to detect the expression levels of EMT-related protein, γ -H2AX, and phosphorylated protein kinase B (p-AKT) in the PCa DU145 cells after treated with CUDC-101. **Results:** The TCGA Database and UALCAN Database analysis results showed that H2AX mRNA was highly expressed in the PCa tissue, and the disease-free survival (DFS) of the patients with low expression of H2AX was longer than those patients with high expression of H2AX mRNA ($P<0.001$); the immunohistochemistry results showed that compared with adjacent benign prostate tissue, the rate of strong positive expression of H2AX protein in PCa tissue was increased (64.34% vs 14.29%), and its over-expression was associated with the T stage of PCa ($P=0.001$) and World Health Organization (WHO)/International Society of Urological Pathology (ISUP) prognostic grade group (GG) ($P=0.004$), but was not associated with the patients' age, Gleason score, lymphnode metastasis, or nerve and vascular invasion ($P>0.05$); the immunofluorescence staining results showed that the compared with control and EMT induction groups, the fluorescence expressions of E-cadherin and γ -H2AX proteins in CUDC-101 treatment group were increased; the cell scratch assay and Transwell chamber assay results showed that compared with control group, the scratch healing area and number of migration DU145 cells in CUDC-101 treatment group was significantly decreased; the Western blotting results showed that compared with EMT induction group, the expression levels of E-cadherin and γ -H2AX proteins in the cells in CUDC-101 treatment group were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the expression levels of Vimentin and p-AKT proteins were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** Over-expression of H2AX protein is closely associated with poor prognosis of the patients with PCa. The novel HDACi inhibitor CUDC-101 can regulate the

phosphorylations of H2AX and AKT and inhibit the EMT process in the PCa cells.

KEYWORDS CUDC-101; Histone H2A family member X; Prostate neoplasm; Epithelial-mesenchymal transition; DNA damage

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤之一,约占男性恶性肿瘤的30%。随着我国人口老龄化和生活方式的西方化,PCa发病率和死亡率也呈上升趋势^[1]。虽然PCa的治疗方法不断完善,但肿瘤的远处转移、复发以及化疗耐药仍是亟待解决的问题。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞来源的肿瘤细胞获取迁移和侵袭能力的重要过程,促进肿瘤细胞向周围组织或远端器官的转移^[2-3]。因此,寻找肿瘤细胞演进过程中EMT发生的分子机制,抑制EMT的发生,在一定程度上减少肿瘤细胞发生侵袭和转移。泛素化组蛋白(histone H2A family member X, H2AX)是组蛋白H2A家族的变体分子,在DNA双链结构断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)发生时,使丝氨酸-谷氨酰胺-谷氨酸(Ser-Gln-Glu, SQE)结构域的139Ser发生磷酸化,形成磷酸化组蛋白 γ -H2AX,参与DNA损伤修复,调节肺癌、乳腺癌、宫颈癌和白血病等肿瘤细胞的增殖、凋亡及EMT的发生^[4-5]。CUDC-101作为新型的组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi),同时抑制表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2),并且对非小细胞肺癌、甲状腺癌和胰腺癌细胞具有抑制增殖及迁移的作用^[6-7],但对DNA损伤修复的影响尚未见相关报道。本研究通过数据库分析和免疫组织化学染色检测,探讨H2AX在PCa组织中的表达,分析其强阳性表达与患者临床病理参数之间的关联;进一步通过体外实验探讨CUDC-101抑制PCa细胞EMT过程中 γ -H2AX的表达,为PCa患者的预后评估、临床靶向药物的使用以及治疗方案的选择提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 数据库检索 利用肿瘤基因组谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库获取H2AX mRNA在多种肿瘤中的表达情况。UALCAN数据库检索并分析H2AX蛋白在PCa组织和正常前列腺组织中的表达水平以及与患者年龄、肿瘤分期、

Gleason评分、淋巴结转移和临床预后的关系。

1.2 临床资料 回顾性收集2015年3月—2020年9月于延边大学附属医院病理科确诊并存档的PCa手术标本129例,其中42例标本包含癌旁良性前列腺组织。将收集的病理切片由高年资医师重新阅片并整理临床资料。患者术前均未接受过化疗、放疗、激素及免疫抑制等治疗。本研究通过延边大学附属医院伦理委员会的批准(批准号:2022296号)。

1.3 临床分组 对所有PCa组织切片,依据患者年龄、肿瘤T分期、Gleason评分(Gleason score, GS)、世界卫生组织(World Health Organization, WHO)/国际泌尿科病理学会(International Society of Urological Pathology, ISUP)分级分组(grade group, GG)系统、淋巴结转移、神经浸润和脉管浸润进行分组。根据患者年龄分为 ≤ 65 岁组(23例)和 > 65 岁组(106例);根据肿瘤T分期分为T1-T2组(48例)和T3-T4组(81例);根据GS分为 ≤ 7 分组(78例)和 > 7 分组(51例);根据WHO/ISUP GG系统分为GG 1组(14例)、GG 2组(34例)、GG 3组(30例)、GG 4组(22例)和GG 5组(29例);根据有无淋巴结转移分为有淋巴结转移组(18例)和无淋巴结转移组(111例);根据有无神经浸润分为有神经浸润组(57例)和无神经浸润组(72例);根据有无脉管浸润分为有脉管浸润组(6例)和无脉管浸润组(123例)。

1.4 细胞、主要试剂和仪器 人PCa DU145细胞由延边大学附属医院中心实验室提供;CUDC-101购自美国MedCham Express生物科技公司;胎牛血清、RPMI-1640、青霉素-链霉素和0.25%胰酶-EDTA均购自美国Gibco公司,兔抗波形蛋白(Vimentin)抗体、鼠抗E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、兔抗蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)抗体、兔抗磷酸化AKT(phosphorylated AKT, p-AKT)抗体、兔抗 γ -H2AX抗体和鼠抗 β -actin抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司,兔抗H2AX抗体购自江苏Affinity Biosciences公司,Western blotting荧光抗兔二抗和荧光抗鼠二抗购自美国LI-COR公司,免疫荧光抗兔二抗和抗鼠二抗

购自美国 APEX BIO 公司; CO₂ 恒温培养箱购自美国 Thermo 公司, Odyssey CLX 成像系统购自美国 LI-COR 公司, ECHO 荧光显微镜购自美国 ECHO 公司。

1.5 免疫组织化学染色检测 PCa 组织中 H2AX 蛋白表达情况 所有标本经 10% 甲醛溶液固定后进行取材, 常规石蜡包埋、连续切片, 经 EDTA 液高压高温抗原修复, 过氧化物酶孵育后, H2AX 一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗 37 °C 孵育后, DAB 显色剂显色。显色结束后, 常规酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封闭固定, 显微镜下观察、摄片。阴性对照组的一抗为磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS)。免疫组织化学染色判定标准: ①着色细胞数。当阳性细胞所占百分率 < 10% 判定为 0 分, 阳性细胞所占百分率 10%~50% 判定为 1 分, 阳性细胞所占百分率 > 50% 判定为 2 分。②着色程度。无着色视为阴性判定为 0 分, 着淡黄色判定为 1 分, 着棕黄色判定为 2 分。取着色细胞数和着色程度积分的乘积, 作为本次实验的结果: 0 分为阴性表达 (-), 1 分为弱阳性表达 (+), 2 分为中等强度阳性表达 (++) , 4 分为强阳性表达 (+++)。将表达 (++)~(+++) 划分为强阳性组, 即高表达组。

1.6 细胞培养 DU145 细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 完全培养液中, 置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养。

1.7 免疫荧光染色检测各组 PCa 细胞中 γ -H2AX 和 E-cadherin 蛋白表达水平 取对数生长期 PCa DU145 细胞, 进行消化、离心、重悬后, 接种到已铺盖玻片的 6 孔细胞培养板中, 每孔中加入 2 mL 培养基, 置于培养箱中培养。待细胞生长至 30%~40%, 分为对照组、5% FBS 组和 CUDC-101 组。对照组: 无血清细胞培养液; 5% FBS 组: 含 5% FBS 的细胞培养液; CUDC-101 组: 含 5% FBS 的细胞培养液中加入 200 nmol·L⁻¹ CUDC-101。干预 48 h 后进行实验。PBS 缓冲液冲洗 2 次后, 甲醛固定 15 min, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 3 min。滴加 1:100 稀释的一抗溶液 (γ -H2AX、E-cadherin 和鬼笔环肽), 4 °C 冰箱过夜。次日, 1×PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 3 min, 再滴加相应的荧光二抗。4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液核染色, 抗荧光衰减封片剂封片后, ECHO 荧光显微镜下观察各组细胞的荧光染色强度, 并摄像。

1.8 细胞划痕实验检测各组细胞的划痕面积

取生长状态良好的对数生长期细胞, 将细胞密度调整为 2×10^5 mL⁻¹, 分别接种至 6 孔细胞培养板内, 待细胞融合约 70% 时, 用 200 μ L 的移液枪枪头垂直于孔板表面均匀划痕, 弃培养液后加入不同浓度 (100 和 200 nmol·L⁻¹) CUDC-101, 分别在 0、24 和 48 h 时用显微镜拍照并分析划痕的修复程度, 实验分为对照组、100 nmol·L⁻¹ CUDC-101 组和 200 nmol·L⁻¹ CUDC-101 组。采用 Image J 软件测量各组的面积, GraphPad Prism 8.0 进行统计分析和统计图绘制, 实验重复 3 次。

1.9 Transwell 小室实验检测各组细胞的迁移细胞数

进行常规细胞消化、离心后, 将细胞密度调整为 1×10^4 mL⁻¹, 取 100 μ L 接种在小室上室培养箱孵育 24 h, 待细胞贴壁后, 吸出上室的培养液, 加入适量浓度 CUDC-101 (含 1% FBS) 100 μ L, 24 孔细胞培养板下室加入完全培养基 (含 20% FBS) 750 μ L, 继续孵育 16~20 h。轻拿取小室用 PBS 缓冲液清洗, 甲醛固定 15 min, 0.1% 结晶紫溶液染色后, 棉棒小心擦掉残留于小室内的细胞, 显微镜下观察并随机选取 5 个高倍镜视野进行拍照。采用 Image J 软件进行各组细胞计数, GraphPad Prism 8.0 进行统计分析和统计图绘制。

1.10 Western blotting 法检测各组细胞中 EMT 相关蛋白、 γ -H2AX 和 p-AKT 蛋白表达水平

采用高效蛋白裂解液提取药物处理前后 PCa DU145 细胞的总蛋白, 利用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测提取蛋白的浓度, 取 30 μ g 蛋白经 6%~12% SDS-PAGE 胶分离, 转膜后 5% 脱脂奶粉封闭, 分别加入兔抗 Vimentin 抗体 (1:1 000)、鼠抗 E-cadherin 抗体 (1:1 000)、兔抗 γ -H2AX 抗体 (1:1 000)、兔抗 p-AKT 抗体 (1:1 000) 和鼠抗 β -actin 抗体 (1:1 000), 置于摇床上, 4 °C 抗体孵育过夜, TBS-T 缓冲液漂洗, 二抗 (1:10 000) 孵育 2 h 后置于成像系统中曝光, 图像采集并分析。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参 β -actin 蛋白条带灰度值, 磷酸化目的蛋白表达水平 = 磷酸化蛋白条带灰度值 / 总蛋白条带灰度值。

1.11 统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析, GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。计数资料以 n (%) 表示, H2AX 蛋白表达强度与 PCa 患者临床病理参数的关系采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法; 各组细胞迁移率, EMT 相

关蛋白表达水平, p-AKT和 γ -H2AX蛋白表达水平均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK-*q*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 数据库检索结果 TCGA数据库检索结果显示: H2AX mRNA在结肠癌、胃癌、食管癌和卵巢癌等多种肿瘤组织中表达水平较高(图1)。UALCAN数据库分析结果显示: 在PCa组织中H2AX mRNA表达水平明显高于正常前列腺组织

($P<0.001$, 图2A); 与正常前列腺组织比较, Gleason评分为6、7、8和9分的PCa组织中H2AX mRNA表达水平明显升高(图2B); PCa无淋巴结转移(N0)组和有淋巴结转移(N1)PCa组织中H2AX mRNA表达水平均高于正常前列腺组织(图2C)。预后生存曲线分析结果显示: H2AX mRNA低表达组患者的无病生存期(disease free survival, DFS)显著优于H2AX mRNA高表达组($P<0.001$), 而2组患者的总生存期(overall survival, OS)比较差异无统计学意义($P=0.074$)(图3)。

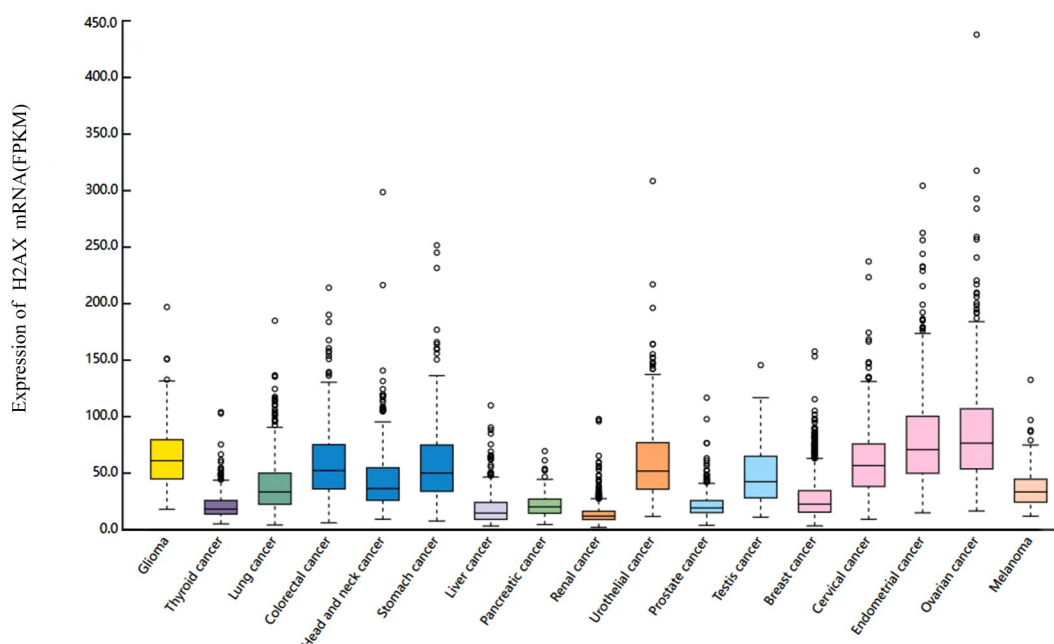


图1 在不同肿瘤组织中H2AX mRNA的表达情况

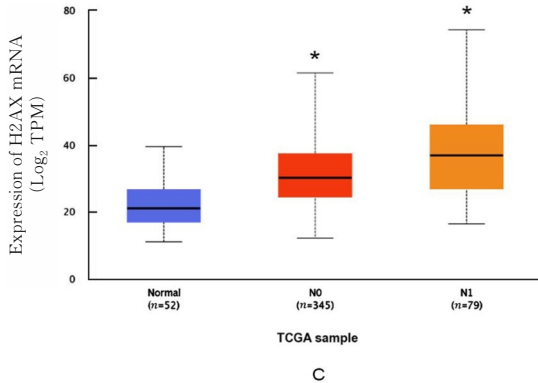
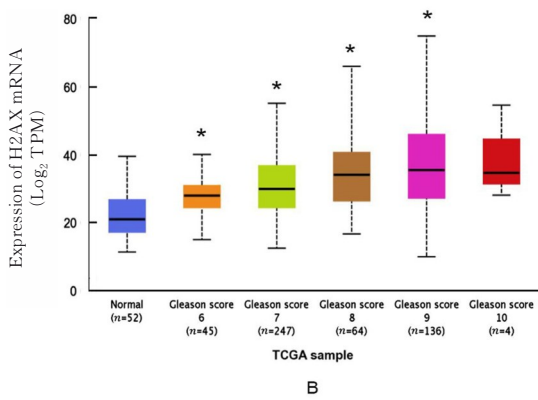
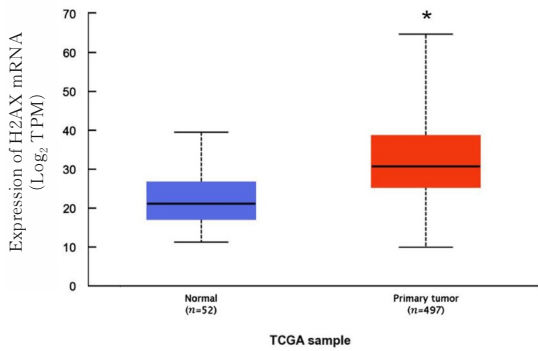
Fig. 1 Expression of H2AX mRNA in different kinds of tumor tissues

2.2 PCa组织中H2AX蛋白的表达水平 免疫组织化学染色检测结果显示: H2AX蛋白染色主要定位于细胞质, 在癌旁良性组织中呈阴性或弱阳性表达, 而在PCa组织中呈阳性或强阳性表达。见图4。PCa组织中H2AX蛋白强阳性表达率明显高于癌旁良性组织(64.34% vs 14.29%) ($P<0.01$)。见表1。H2AX强阳性表达与PCa的T分期($P<0.001$)和WHO/ISUP GG ($P=0.004$)有关联, 而H2AX强阳性表达与患者年龄、Gleason评分、淋巴结转移和神经管浸润无关联($P>0.05$)。见表2。在8例PCa组织中H2AX蛋白表达定位于细胞核(图4B中箭头所示), 其中T2期5例, T3期3例; Gleason评分 ≤ 7 分4例, Gleason评分 >7 分4例; ISUP GG: GG 1组1例、GG 2组1例、

GG 3组2例、GG 4组1例、GG 5组3例。

2.3 各组PCa DU145细胞中 γ -H2AX和E-cadherin蛋白表达 免疫荧光染色法检测结果显示: 与对照组比较, EMT诱导(5% FBS处理)组中红色荧光表达减弱, 表明E-cadherin蛋白表达水平降低; 与对照组和EMT诱导(5% FBS处理)组比较, CUDC-101组的绿色和红色荧光表达均升高, 表明 γ -H2AX和E-cadherin蛋白表达水平升高。见图5。

2.4 各组PCa DU145细胞的划痕面积和迁移细胞数 细胞划痕实验检测结果显示: 与对照组比较, 100和200 nmol \cdot L⁻¹CUDC-101处理组PCa DU145细胞的划痕面积增加($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。见图6和7。Transwell小室实验检测结果显示: 与对

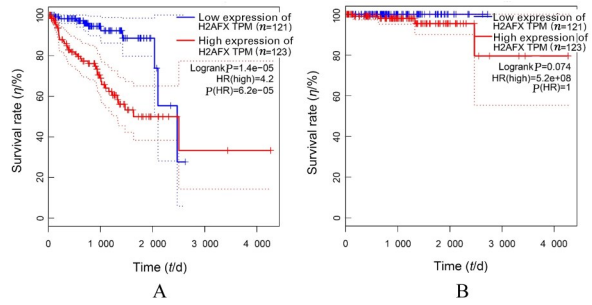


A: Expression of H2AX mRNA in PRAD based on sample types; B: Expression of H2AX mRNA in PRAD based on patient's Gleason scores; C: Expression of H2AX mRNA in PRAD based on lymphode metastasis status. * $P < 0.01$ compared with normal group.

图2 在不同临床病理参数PCa患者癌组织中H2AX mRNA的表达情况

Fig. 2 Expression of H2AX mRNA in cancer tissue of PCa patients with different clinicopathological factors

照组比较, 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CUDC-101 处理组的PCa DU145 细胞迁移数明显减少 ($P < 0.05$)。见图8和9。



A: DFS; B: OS.

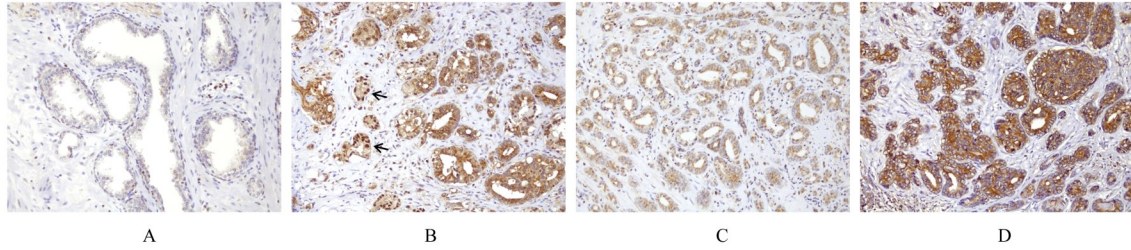
图3 H2AX表达与PCa患者临床预后的关系

Fig. 3 Relationship between H2AX expression and clinical prognosis of PCa patients

2.5 各组细胞中E-cadherin、Vimentin、 γ -H2AX和p-AKT蛋白表达水平 Western blotting法检测结果显示: 与对照组和5% FBS处理组比较, 5% FBS+100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和5% FBS+200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CUDC-101处理组的E-cadherin和 γ -H2AX蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Vimentin和p-AKT蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图10。

3 讨论

H2AX是染色质核小体组蛋白(包括H2A1、H2A2、H2AZ和H2AX)的核心成员之一,在DSBs发生时,位于DSBs周围的磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)家族成员迅速移向DNA断裂部位,使SQE结构域的139Ser发生磷酸化,形成 γ -H2AX,成为DNA损伤的早期生物学标志物^[8]。为了探讨H2AX蛋白对PCa发生发展的影响,本研究首先检索TCGA数据库和UALCAN数据库中H2AX的表达谱数据,结果显示: H2AX mRNA在大部分包括PCa的实性肿瘤中表达水平升高,在PCa组织中H2AX mRNA的表达水平高于正常组织,且其表达水平与Gleason评分、淋巴结转移和患者无病生存率存在密切关联,提示H2AX可能参与PCa的发生发展,认为H2AX可作为PCa诊断和评判预后的重要指标。本研究对129例PCa样本中H2AX蛋白表达水平与患者临床病理参数的关系进行分析,结果显示: PCa组织中H2AX蛋白阳性表达率明显高于在癌旁良性组织,其表达与PCa患者的肿瘤T分期和WHO/ISUP GG有关,与数据库检索结果基本一致。本研究中,8例PCa组织中H2AX蛋白的表达定位于细胞核,其中WHO/ISUP GG为1级1例、2级



A: BPH tissue; B-D: PCa tissue; B: Nucleus and cytoplasm location; C: Positive expression; D: Strongly positive expression. Arrow: H2AX protein.

图4 H2AX蛋白在PCa组织及癌旁良性组织中的表达(免疫组织化学, $\times 200$)

Fig. 4 Expression of H2AX proteins in PCa and adjacent benign tissues (Immunohistochemistry, $\times 200$)

表1 H2AX蛋白在PCa组织及癌旁良性组织中的表达情况

Tab. 1 Expression of H2AX protein in PCa tissue and adjacent benign tissue

Group	n	H2AX expression				Strong positive rate($\eta/\%$)	χ^2	P
		-	+	++	+++			
Adjacent benign tissue	42	9	27	6	0	14.29	31.808	<0.01
PCa tissue	129	10	36	51	32	64.34		

表2 H2AX蛋白表达与PCa患者临床病理特征的关系

Tab. 2 Relationships between expression of H2AX protein and clinicopathological characteristics of PCa patients

Clinicopathological characteristic	n	H2AX protein expression		Strong positive rate($\eta/\%$)	χ^2	P
		--+	++-+++			
Age (year)						
≤ 65	23	11	12	52.1	1.806	0.179
> 65	106	35	71	66.9		
Tumor stage						
T1-T2	48	26	22	45.8	11.413	0.001
T3-T4	81	20	61	75.3		
Gleason score						
≤ 7	78	32	46	58.9	2.477	0.116
> 7	51	14	37	72.5		
WHO/ISUP						
GG1	14	9	5	35.7		
GG2	34	18	16	47.0		
GG3	30	5	25	83.3	15.641	0.004
GG4	22	6	16	72.7		
GG5	29	8	21	72.4		
Lymphnode metastasis						
Yes	19	7	12	63.1	0.014	0.907
No	110	39	71	64.5		
Perineural invasion						
Yes	57	16	41	71.9	2.563	0.109
No	72	30	42	58.3		
Vascular invasion						
Yes	6	2	4	66.7	0.015	0.636
No	123	44	79	64.2		

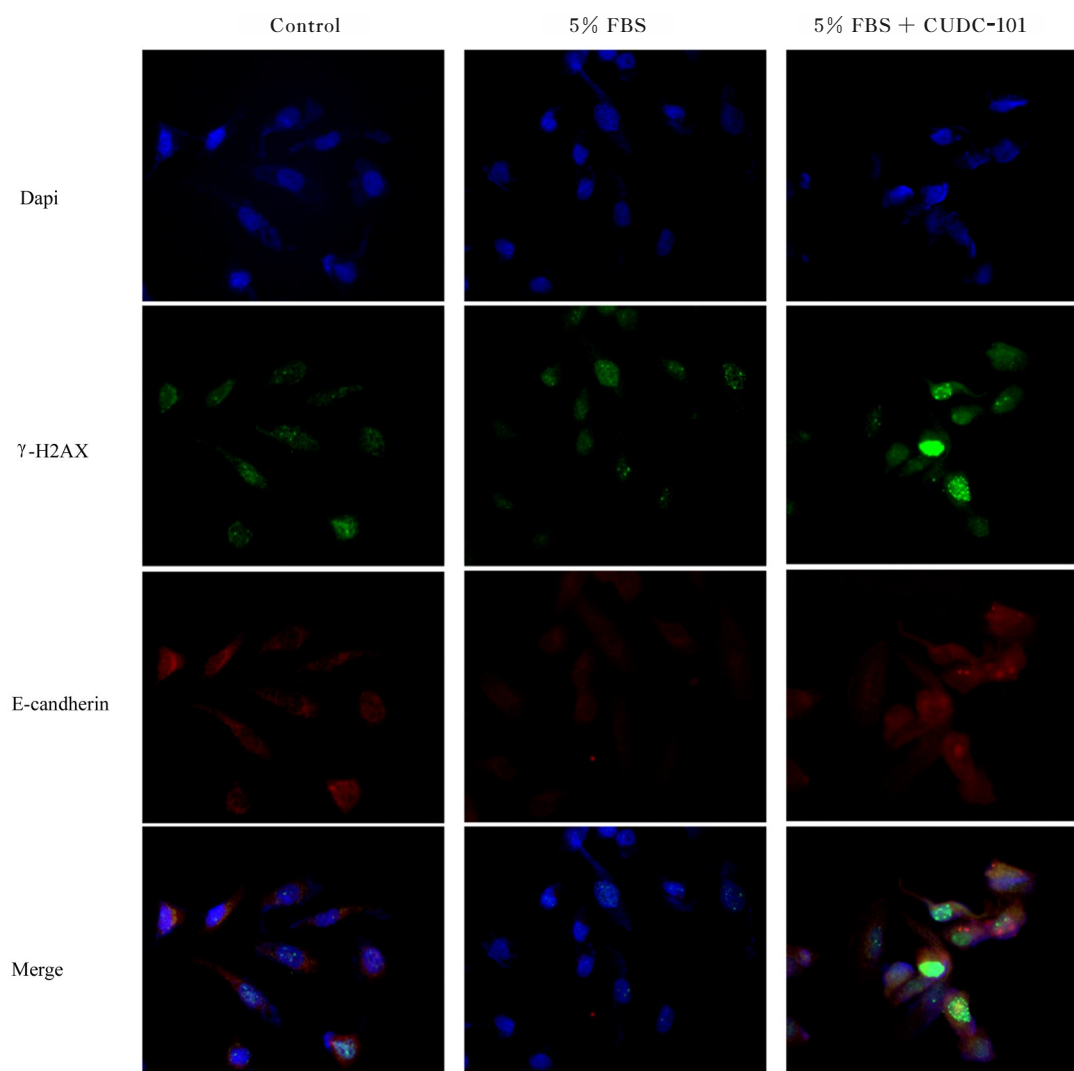


图5 各组PCa DU145细胞中 γ -H2AX和E-cadherin蛋白表达(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 5 Expressions of γ -H2AX and E-cadherin protein in DU145 cells in various groups (Immunofluorescence, $\times 400$)

1例、3级2例、4级1例和5级3例,表明H2AX蛋白的细胞核表达与PCa的恶性程度和不良临床预后有密切关联,但因例数较少未进行统计学分析。研究^[9]显示:接受^[177Lu]前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)放射性配体治疗(radioligand therapy, RLT)的转移性趋势抵抗性PCa患者的外周血淋巴细胞中 γ -H2AX的低表达预示患者的不良预后。 γ -H2AX是癌细胞暴露于辐照后DNA损伤反应(DNA-damage response, DDR)的基础,也是监测肿瘤放疗敏感性的标志物。研究^[10]显示:漆树酸可调控H2AX和 γ -H2AX的表达,增加细胞凋亡,减少细胞侵袭,增加PCa的化疗敏感性;组蛋白去甲基化酶JMJD1A通过调节DDR相关基因(γ -H2AX)的表达,促进DSB修复,增加PCa细胞的放疗敏感

性^[11]。另有研究^[12]显示:黄夹次甙乙(Neriifolin)可诱导DNA损伤和DSB,通过增加 γ -H2AX表达来抑制PCa细胞的增殖,诱导细胞凋亡。因此,DDR和DSB修复是抗肿瘤治疗的新靶标,但在PCa靶向治疗中的具体作用尚未完全阐明。

CUDC-101作为新型的多靶点抑制剂,其抗肿瘤能力明显优于单靶点EGFR、Her-2和HDAC抑制剂,在多种肿瘤中展现出其多靶点的优势。研究^[13]显示:在转移性未分化甲状腺癌中CUDC-101有效抑制肿瘤细胞的生长和转移;CUDC-101可增强吉西他滨对胰腺癌细胞的抗肿瘤能力,抑制细胞的增殖及迁移^[14]。肿瘤细胞迁移和侵袭是评价肿瘤预后的重要标志,而EMT作为肿瘤侵袭转移的关键步骤涉及多个信号通路和复杂的分子机制,如PI3K/AKT信号通路、组蛋白修饰、微环

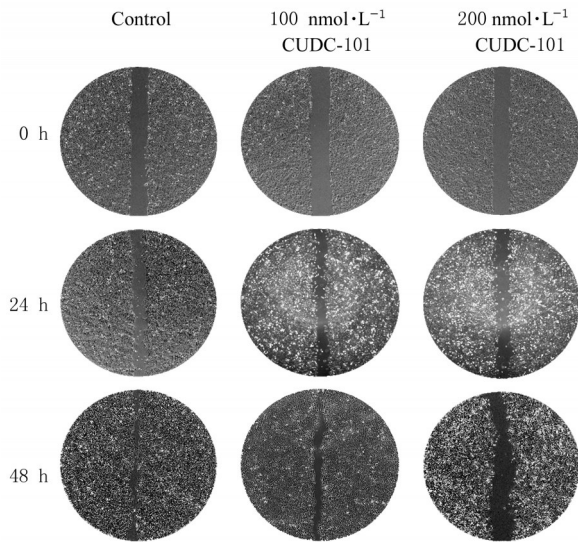
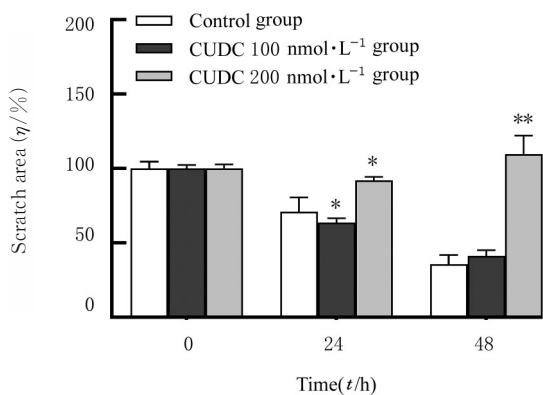


图6 各组PCa DU145细胞的迁移情况(×100)

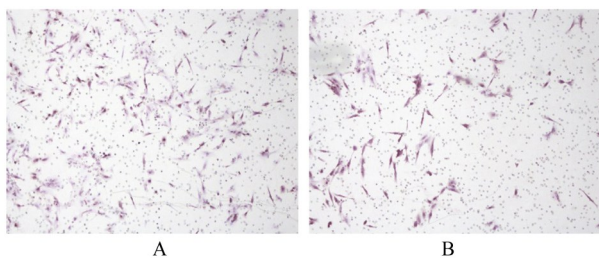
Fig. 6 Migration of PCa DU145 cells in various groups (×100)



* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared with control group.

图7 各组PCa DU145细胞划痕面积

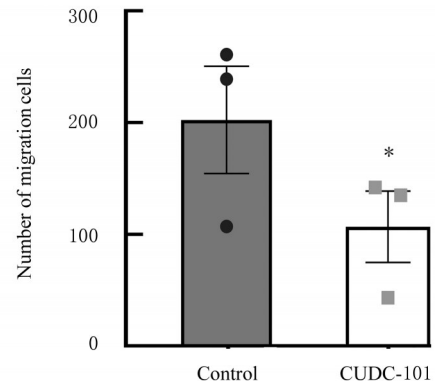
Fig. 7 Scratch areas of PCa DU145 cells in various groups



A: Control group; B: CUDC-101 group.

图8 2组PCa DU145细胞的迁移情况(结晶紫, ×40)

Fig. 8 Migration of PCa DU145 cells in two groups (Crystal violet, ×40)



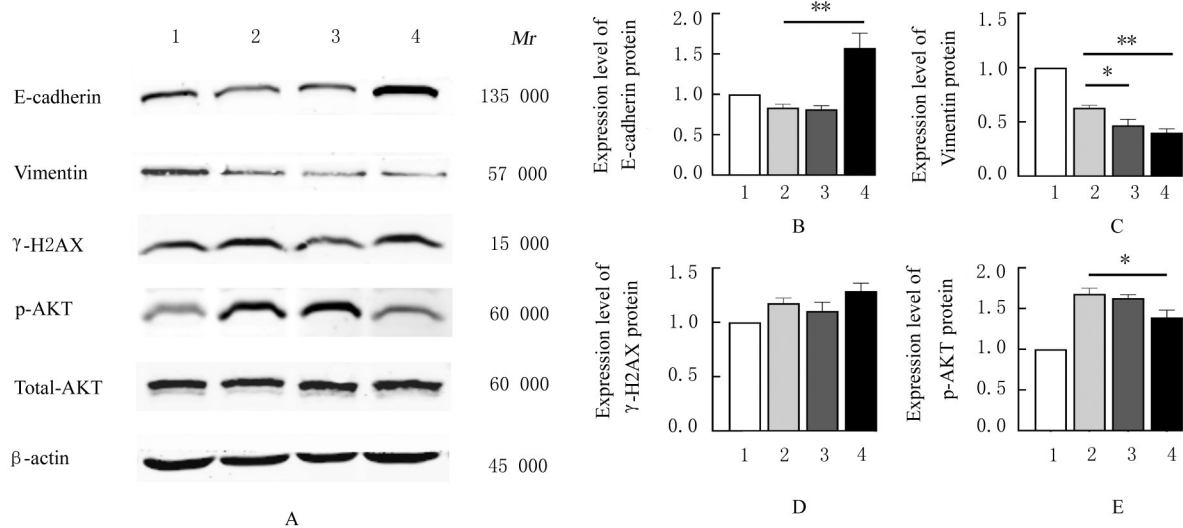
* $P < 0.05$ compared with control group.

图9 2组PCa DU145细胞的迁移细胞数

Fig. 9 Numbers of migration PCa DU145 cells in two groups

境和细胞代谢等。研究^[15-17]显示:丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)和PI3K/AKT/mTOR信号通路参与调节TGF- β 介导Vimentin的表达,诱导EMT的发生,影响PCa细胞的迁移。另有研究^[18-20]显示:在PCa组织样本中,其原发灶和转移灶中均可检测到EMT相关基因的表达,认为E-cadherin表达与PCa预后呈正相关关系,而Vimentin表达与PCa患者短期内的生化复发、骨转移及肿瘤低分化密切相关。研究^[21-22]显示:FBS可导致细胞形态和功能发生改变,诱导细胞的EMT。本研究中,免疫荧光染色法和Western blotting法检测结果显示:DU145细胞经5% FBS处理后上皮细胞标志物E-cadherin蛋白明显减少,5% FBS可诱导细胞的EMT过程。本研究结果显示:CUDC-101下调PCa DU145细胞的迁移能力,抑制EMT过程,并且CUDC-101处理后p-AKT蛋白的表达也随之下调,表现存在浓度依赖性,其可能机制为CUDC-101通过抑制AKT的磷酸化抑制PCa细胞迁移和EMT过程。

组蛋白翻译后修饰主要有乙酰化、磷酸化、甲基化、泛素化以及ADP核糖基化等。单个组蛋白的修饰往往不能单独发挥作用,单个或多个组蛋白残基的不同修饰递次发挥作用或组合在一起,形成一个修饰级联,通过相互协同或拮抗来共同发挥作用^[23]。组蛋白的磷酸化与乙酰化修饰密切相关,HDACi可通过去乙酰化反应来干扰组蛋白的磷酸化。本研究结果显示:CUDC-101处理后PCa DU145细胞中 γ -H2AX蛋白表达上调,认为抑制HDAC活性可促进H2AX的磷酸化,使DNA损伤



A: Electrophoregram (Lane 1: Control group; Lane 2: 5% FBS group; Lane 3: 5% FBS+100 nmol·L⁻¹ CUDC-101 group; Lane 4: 5% FBS+200 nmol·L⁻¹ CUDC-101 group); B-E: Histograms (1: Control group; 2: 5% FBS group; 3: 5% FBS+100 nmol·L⁻¹ CUDC-101 group; 4: 5% FBS+200 nmol·L⁻¹ CUDC-101 group); B: E-cadherin protein; C: Vimentin protein; D: γ-H2AX protein; E: p-AKT protein.**P*<0.05, ***P*<0.01 compared with 5% FBS group.

图 10 各组细胞中 E-cadherin、Vimentin、γ-H2AX、p-AKT 和 AKT 蛋白表达情况

Fig. 10 Expressions of E-cadherin, Vimentin, γ-H2AX, p-AKT, and AKT proteins in cells in various groups

修复能力增加，提高 PCa DU145 细胞对 HDACi 抑制剂治疗的敏感性。然而，组蛋白在 CUDC-101 抑制肿瘤细胞迁移和 EMT 过程中的具体作用及其机制尚待进一步研究。

综上所述，H2AX 与 PCa 的发生发展、恶性程度和不良预后密切相关。HDACi 抑制剂 CUDC-101 有效抑制 PCa 细胞 DNA 损伤、迁移和 EMT 的发生。本研究为 PCa 的早期诊断、临床治疗和预后评估提供了新的理论依据，但具体调节机制及相关信号通路有待进一步研究。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

那佈其负责论文的撰写和免疫组织化学实验，权春姬负责细胞功能实验和数据分析，赵芳、杨凡和肖茹负责文献检索和数据整理，金雪梅负责论文的统计学分析和课题指导，李珍玲负责论文的整体设计和论文修订。

[参考文献]

[1] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J, 2022,135(5):584-590.
 [2] HUANG Y H, HONG W Q, WEI X W. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of

EMT in tumor progression and metastasis[J]. J Hematol Oncol, 2022,15(1):129.
 [3] BROWN T C, SANKPAL N V, GILLANDERS W E. Functional implications of the dynamic regulation of EpCAM during epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Biomolecules, 2021,11(7):956.
 [4] KATSUTA E, SAWANT DESSAI A, EBOS J M, et al. H2AX mRNA expression reflects DNA repair, cell proliferation, metastasis, and worse survival in breast cancer[J]. Am J Cancer Res, 2022,12(2):793-804.
 [5] 乔婷婷, 葛淑静, 罗 渊, 等. H2AX 磷酸化抑制肺癌细胞发生上皮-间质转化的作用机制[J]. 中国癌症杂志, 2021,31(4): 277-284.
 [6] LAI C J, BAO R D, TAO X U, et al. CUDC-101, a multitargeted inhibitor of histone deacetylase, epidermal growth factor receptor, and human epidermal growth factor receptor 2, exerts potent anticancer activity [J]. Cancer Res, 2010,70(9):3647-3656.
 [7] YUAN B, ZHAO X F, WANG X, et al. Patient-derived organoids for personalized gallbladder cancer modelling and drug screening [J]. Clin Transl Med, 2022,12(1):e678.
 [8] BARROSO S I, AGUILERA A. Detection of DNA double-strand breaks by γ-H2AX Immunodetection [J]. Methods Mol Biol, 2021,2153:1-8.
 [9] WIDJAJA L, WERNER R A, KRISCHKE E, et al. Individual radiosensitivity reflected by γ-H2AX and

- 53BP1 foci predicts outcome in PSMA-targeted radioligand therapy [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2023,50(2):602-612.
- [10] YAO K, JIANG X Z, HE L Y, et al. Anacardic acid sensitizes prostate cancer cells to radiation therapy by regulating H2AX expression[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015,8(12): 15926-15932.
- [11] FAN L L, XU S H, ZHANG F B, et al. Histone demethylase JMJD1A promotes expression of DNA repair factors and radio-resistance of prostate cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2020,11(4):214.
- [12] ZHAO W L, LI G H, ZHANG Q B, et al. Cardiac glycoside neriifolin exerts anti-cancer activity in prostate cancer cells by attenuating DNA damage repair through endoplasmic reticulum stress [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023,209:115453.
- [13] DALVA-AYDEMIR S, AKYERLI C B, YÜKSEL Ş K, et al. Toward *in vitro* epigenetic drug design for thyroid cancer: the promise of PF-03814735, an aurora kinase inhibitor[J]. *OMICS*, 2019,23(10):486-495.
- [14] JI M Y, LI Z L, LIN Z H, et al. Antitumor activity of the novel HDAC inhibitor CUDC-101 combined with gemcitabine in pancreatic cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2018,8(12): 2402-2418.
- [15] GENG X Q, MA A, HE J Z, et al. Ganoderic acid hinders renal fibrosis via suppressing the TGF- β /Smad and MAPK signaling pathways[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020,41(5):670-677.
- [16] ODERO-MARAH V, HAWSAWIO, HENDERSON V, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and prostate cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1095: 101-110.
- [17] DU H Y, GU J Y, PENG Q, et al. Berberine suppresses EMT in liver and gastric carcinoma cells through combination with TGF β R regulating TGF- β /smad pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021,2021: 2337818.
- [18] WANG Y, GUO Y B, HU Y M, et al. Endosulfan triggers epithelial-mesenchymal transition via PTP4A3-mediated TGF- β signaling pathway in prostate cancer cells[J]. *Sci Total Environ*, 2020,731:139234.
- [19] RATNAYAKE W S, APOSTOLATOS C A, BREEDY S, et al. Atypical PKCs activate vimentin to facilitate prostate cancer cell motility and invasion [J]. *Cell Adh Migr*, 2021,15(1):37-57.
- [20] QUAN Y J, ZHANG X D, BUTLER W, et al. The role of N-cadherin/c-Jun/NDRG1 axis in the progression of prostate cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2021,17(13):3288-3304.
- [21] MALM S W, AMOUZOUGAN E A, KLIMECKI W T. Fetal bovine serum induces sustained, but reversible, epithelial-mesenchymal transition in the BEAS-2B cell line[J]. *Toxicol In Vitro*, 2018,50:383-390.
- [22] TIAN H B, XU J Y, TIAN Y, et al. A cell culture condition that induces the mesenchymal-epithelial transition of dedifferentiated porcine retinal pigment epithelial cells[J]. *Exp Eye Res*, 2018,177:160-172.
- [23] 田园芳, 陈伟. 外显子跳跃模式中组蛋白修饰的组合模式分析[J]. *电子科技大学学报*, 2022,51(5):668-674.