

# 曲古抑菌素 A 对人 Tenon 囊成纤维细胞作用的研究

李晓艳, 邓颖, 杨建刚

**基金项目:**陕西省教育厅专项科研计划项目(No. 2013JK0785)  
**作者单位:**(710077) 中国陕西省西安市, 西安医学院第一附属医院眼科  
**作者简介:**李晓艳, 在职硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 青光眼、小儿斜视与弱视。  
**通讯作者:**杨建刚, 博士, 副教授, 研究方向: 青光眼. jgyaang0077@gmail.com  
**收稿日期:**2014-05-29 **修回日期:**2014-10-14

## Effects of trichostatin A on human Tenon capsule fibroblast

Xiao-Yan Li, Ying Deng, Jian-Gang Yang

**Foundation item:** Special Research Plan Project of Education Department of Shaanxi Province (No. 2013JK0785)  
 Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China  
**Correspondence to:** Jian-Gang Yang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China. jgyaang0077@gmail.com  
**Received:**2014-05-29 **Accepted:**2014-10-14

### Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of trichostatin A (TSA) on cell proliferation and the expressions of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 in cultured human Tenon capsule fibroblast (HTF).

• **METHODS:** Human Tenon capsule fibroblasts were cultured *in vitro* after glaucoma filtration surgery. The third to sixth passage of cell were treated by 600nmol/L TSA or none. Cell viability measured by MTT assay after 1, 2 and 3d respectively. The expressions of HDAC1 and HDAC2 were analyzed by Western blot 2d after TSA treatment.

• **RESULTS:** Compared to the control, cell viability decreased significantly after treatment with TSA at 1d ( $P < 0.05$ ), presented time-dependent manner. The expression of HDAC1 and HDAC2 significantly reduced in TSA-treated HTF compared with control cells at 2d after TSA treatment.

• **CONCLUSION:** TSA inhibits the proliferation of Tenon capsule fibroblast by inhibiting the expression of HDAC1 and HDAC2, and reduces subconjunctival scar formation.

• **KEYWORDS:** histone deacetylase inhibitor; trichostatin A; fibroblast; HDAC1; HDAC2

**Citation:** Li XY, Deng Y, Yang JG. Effects of trichostatin A on human Tenon capsule fibroblast. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(11):1953-1955

### 摘要

**目的:** 研究曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 对体外培养的人 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon capsule fibroblast, HTF) 增殖能力以及组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylase 1, HDAC1) 和 HDAC2 蛋白表达的影响。

**方法:** 取青光眼滤过术中 Tenon 囊组织进行 HTF 体外培养。选取第 3 ~ 6 代细胞进行实验。设置空白对照组及 TSA 组 (600nmol/L TSA 加入培养液中), 分别于培养后 1, 2, 3d 应用 MTT 法检测细胞活力变化; 以 600nmol/L TSA 处理 HTF 2d 后, Western blot 法检测细胞中 HDAC1 和 HDAC2 蛋白的表达。

**结果:** 与对照组比较, TSA 作用 1d 后 HTF 活力下降, 呈时间依赖性, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。TSA 处理 HTF 后 2d, Western blot 法检测 HDAC1 和 HDAC2 蛋白表达受到明显抑制。

**结论:** TSA 可以通过抑制 HDAC1 和 HDAC2 的表达量, 抑制人 Tenon 囊成纤维细胞增殖, 从而减少术后结膜瘢痕形成可能。

**关键词:** 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 曲古抑菌素 A; 成纤维细胞; 组蛋白去乙酰化酶 1; 组蛋白去乙酰化酶 2

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.11.10

**引用:** 李晓艳, 邓颖, 杨建刚. 曲古抑菌素 A 对人 Tenon 囊成纤维细胞作用的研究. 国际眼科杂志 2014;14(11):1953-1955

### 0 引言

流行病学研究表明, 青光眼是位居全球第二的致盲眼病。青光眼滤过术是治疗青光眼的主要手术方法。滤过区域内的创伤愈合及纤维增生反应是手术失败的主要原因<sup>[1]</sup>。寻找副作用少, 且能有效抑制滤过泡成纤维细胞增殖的新方法是学者们一直以来研究的课题。

组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 是一个大的酶家族, 在正常生理状态下, 由组蛋白乙酰基转移酶 (histone acetyltransferase, HAT) 和 HDAC 共同调控组蛋白乙酰化过程。HDAC 分为四大类, 其中 I 型包括 HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8; I 型 HDAC 在人类各种细胞和组织中均有表达。研究结果显示, 靶向干扰或敲除 HDAC1 和 HDAC2 会产生抑制细胞增殖、纤维化、促进细胞凋亡的作用<sup>[2-6]</sup>。

HDAC 抑制剂通过诱导组蛋白乙酰化引起包括染色质重组、转录活化和抑制、细胞停滞、细胞分化及凋亡等一系列生物效应。作为 HDAC 抑制剂的经典药物之一, 纳摩尔水平的曲古抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 就可以特异性地抑制 HDAC 的活性, 引起多种哺乳动物细胞乙酰化组蛋白聚集, 对细胞增殖和凋亡起调控作用。研究发现, TSA 作用于体外培养的兔角膜成纤维细胞, 能够抑制角膜成纤维细胞合成<sup>[7]</sup>。

本研究是通过 TSA 作用于体外培养的青光眼患者术眼成纤维细胞,研究其对成纤维细胞增殖能力以及 HDAC1 和 HDAC2 表达的影响,以探讨其作为青光眼滤过术后辅助用药的可能性及作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集 2013-06/09 在我院眼科行青光眼滤过术患者术中 Tenon 囊组织,大小 4mm×6mm×1mm,共计 6 例(经医院伦理委员会批准,并获得患者及家属同意)。其中男 2 例,女 4 例,年龄 46~78 岁。鼠抗 HDAC1 抗体、鼠抗 HDAC2 抗体(北京康为生物科技有限公司);鼠抗  $\beta$ -actin 抗体(美国 Santa Cruz)。

## 1.2 方法

**1.2.1 人 Tenon 囊成纤维细胞培养** 将滤过术中取下的 Tenon 囊组织用生理盐水冲洗干净,参照文献[8,9]进行细胞培养;用倒置相差显微镜观察细胞生长特点及形态,进行细胞鉴定,选取第 3~6 代细胞进行实验。

**1.2.2 MTT 法检测 TSA 对细胞活力的影响** 调整细胞浓度至  $3 \times 10^4$ /mL,接种于 96 孔板,置于 DMEM(含 10% FBS)培养 24h,设置空白对照组及 TSA 组(加入 600nmol/L TSA),分别培养 1,2,3d,每孔加入 MTT 20 $\mu$ L,继续培养 4h,弃原有培养液,每孔加入 150 $\mu$ L DMSO,15min 后用酶标仪检测各孔在 490nm 出的吸光度(A 值)。将空白对照组测定值绘制成曲线,TSA 组依据对照组的曲线作图。

**1.2.3 Western blot 检测细胞的 HDAC1 和 HDAC2 蛋白的表达** 设置空白对照组与 TSA 组,TSA 组中加入 600nmol/L TSA,均置于 DMEM(含 10% FBS)培养基培养 48h,用 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化细胞,RIPA 液裂解细胞,将裂解的细胞以 1400r/min,4 $^{\circ}$ C、离心 5min,吸取上清液,用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度,上样后行凝胶电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭 1h,分别加入 HDAC1、HDAC2、 $\beta$ -actin 抗体后 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,复温后清洗加入羊抗鼠 IgG,孵育 2h,ECL 显色,曝光胶片,采用捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统对条带光密度值进行分析,计算 HDAC1、HDAC2 条带与  $\beta$ actin 的光密度值比值。

统计学分析:采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,实验结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,均数间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HTF 的观察** 倒置显微镜下见细胞贴壁生长,呈紧密排列的单层长梭形或分支状,漩涡状或放射状排列,形态符合 HTF 细胞特征。

**2.2 TSA 对 HTF 增殖的抑制作用** MTT 实验研究发现,600nmol/L TSA 作用于培养的青光眼滤过术后成纤维细胞,1d 后 HTF 细胞活性下降,并随时间延长细胞活力明显逐渐下降,呈时间依赖性,具有统计学差异( $P < 0.05$ ,图 1)。

**2.3 TSA 抑制 HTF 中 HDAC1 和 HDAC2 的表达** 用 Western blot 方法检测 TSA 对 HTF 中 HDAC1 和 HDAC2 的蛋白表达。实验发现,600nmol/L TSA 作用于 HTF 后,HDAC1 和 HDAC2 蛋白的表达受到明显抑制(图 2)。

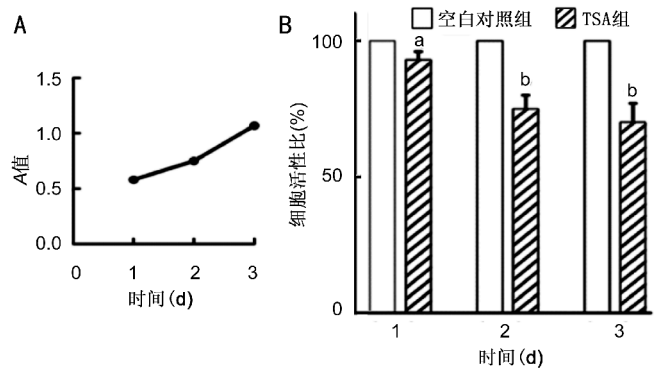


图 1 TSA 对 HTF 增殖的抑制作用 A:对照组 MTT 检测结果;B:对照组与 TSA 组细胞活性百分比(<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白对照组)。

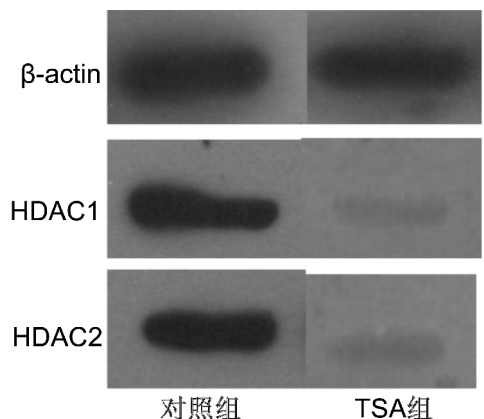


图 2 对照组与 TSA 组 HTF 中 HDAC1 和 HDAC2 的蛋白表达。

## 3 讨论

青光眼滤过术后滤过泡成纤维细胞增殖和结膜纤维化是影响青光眼手术疗效的主要问题。滤过泡瘢痕形成的机制尚未完全清楚,目前研究认为成纤维细胞大量增殖与凋亡抑制、细胞外基质合成与降解失衡、部分细胞因子大量产生构成了病理性瘢痕形成的生物学基础<sup>[10]</sup>。目前临床广泛采用抗代谢药物如 MMC 作为滤过术后抑制成纤维细胞增殖,防止瘢痕形成的辅助用药,但存在严重并发症:如伤口愈合不良、滤过泡渗漏等。由此,研究高效、低毒副作用的抑制成纤维细胞增殖的药物从而对抗青光眼滤过术后瘢痕化、维持功能性滤过泡是提高手术成功率的关键。

细胞的生长和分化有赖于一系列基因的有序激活,组蛋白乙酰化参与包括细胞周期控制、细胞增殖、凋亡、血管生成等多种基因的转录调控。在正常生理状态下,HAT 与 HDAC 对组蛋白乙酰化作用的调控处于平衡状态。细胞发生转化时,HDAC 活性明显增强,导致一些影响细胞增殖和调控细胞周期的分子表达失衡。研究发现,I 型 HDAC 中 HDAC1、HDAC2 过度表达与多种组织和器官纤维化的发生和发展密切相关<sup>[11]</sup>,而在瘢痕疙瘩成纤维细胞中也证实 HDAC1 和 HDAC2 的表达高于正常皮肤组织,并能促进成纤维细胞增殖并合成分泌大量 ECM<sup>[12]</sup>。

HDAC 抑制剂则通过诱导组蛋白过乙酰化引起包括

染色质重组转录活化和抑制细胞周期停滞、细胞分化及细胞凋亡等一系列生物学效应<sup>[13]</sup>。HDAC 抑制剂可抑制成纤维细胞胶原合成,并可通过抑制 HDAC,诱导异常增殖细胞凋亡<sup>[14-17]</sup>。TSA 作为 HDAC 抑制剂的经典代表,主要作用于 I 型 HDAC<sup>[18]</sup>,已经在恶性肿瘤治疗中应用,在小剂量、低浓度情况下能够诱导组蛋白高乙酰化,抑制肿瘤细胞增殖,对正常细胞无毒性。

TSA 在眼科领域中(特别是青光眼抗增殖方面)应用较少。既往的研究为我们提供了将 TSA 运用于眼科抗增殖治疗领域的新思路。Sharma 等<sup>[7]</sup>在 TSA 抑制兔角膜成纤维细胞合成的实验中证实,250nmol/L TSA 无细胞毒性,不能改变正常角膜成纤维细胞的形态和增殖状态,500nmol/L TSA 作用 72h 后能够引起活细胞数量的明显下降。Diao 等<sup>[12]</sup>在 TSA 诱导瘢痕疙瘩成纤维细胞凋亡的实验中证实,成纤维细胞对于 200nmol/L TSA 作用耐受良好,600nmol/L 和 800nmol/L TSA 作用 12h 后,细胞活力明显下降。而青光眼滤过术后早期进行干预调控,建立通畅的滤过通道是减少术后瘢痕形成的关键<sup>[1-3]</sup>。本实验中我们选取适中的 600nmol/L TSA 进行实验研究。实验发现,600nmol/L TSA 处理体外培养的 HTF 1d 后,结果表明 HTF 细胞增殖能力明显降低,并随时间延长细胞活力下降呈时间依赖性;同时 600nmol/L TSA 处理 HTF 后 2d,HDAC1 及 HDAC2 表达明显受到抑制。实验证实 TSA 通过抑制 HTF 中 HDAC1、HDAC2 的表达,选择性的改变凋亡基因和抗凋亡基因转录水平的表达,抑制细胞增殖,诱导细胞发生凋亡。

TSA 体外能有效抑制成纤维细胞的增殖,有应用于滤过性手术的前景,但其作用机制和安全性还需要更多的体内和体外实验予以进一步证实。

#### 参考文献

- 1 Collignon NJ. Wound healing after glaucoma surgery: how to manage it? *Bull Soc Belge Ophthalmol* 2005;295:55-59
- 2 Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007;26(37):5541-5552
- 3 Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(9):769-784

- 4 Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(1):38-51
- 5 Stimson L, Wood V, Khan O, et al. HDAC inhibitor-based therapies and hematological malignancy. *Ann Oncol* 2009;20(8):1293-1302
- 6 Witt O, Deubzer HE, Milde T, et al. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 2009;277(1):8-21
- 7 Sharma A, Mehan MM, Sinha S, et al. Trichostatin A inhibits corneal haze *in vitro* and *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(6):2695-2701
- 8 景娇娜,张美莎,刘和忠.人 Tenon 囊成纤维细胞的体外培养及增殖能力研究. *国际眼科杂志* 2011;11(10):1710-1712
- 9 朱晓燕,李磊,鲜光军,等.人眼 Tenon 囊成纤维细胞体外培养及生长特性的比较. *局解手术学杂志* 2012;21(3):233-235
- 10 Chihara E, Dong J, Ochiai H, et al. Effects of tranilast on filtering blebs: a pilot study. *J Glaucoma* 2002;11(2):127-133
- 11 Pang M, Zhuang S. Histone deacetylase: a potential therapeutic target for fibrotic disorders. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335(2):266-272
- 12 Diao JS, Xia WS, Yi CG, et al. Trichostatin A inhibits collagen synthesis and induces apoptosis in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2011;303(8):572-580
- 13 Remiszewski SW. Recent advances in the discovery of small molecule histone deacetylase inhibitors. *Cur Opin Drug Discov Devel* 2002;5(4):487-499
- 14 Venugopal B, Evans TR. Developing histone deacetylase inhibitors as anti-cancer therapeutics. *Curr Med Chem* 2011;18(11):1658-1671
- 15 Ghosh AK, Mori Y, Dowling E, et al. Trichostatin A blocks TGF-beta-induced collagen gene expression in skin fibroblasts: involvement of Sp1. *Biophys Res Commun* 2007;354(2):420-426
- 16 Thurn KT, Thomas S, Moore A, et al. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol* 2011;7(2):263-283
- 17 Rombouts K, Niki T, Greenwel P, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses collagen synthesis and prevents TGF-beta(1)-induced fibrogenesis in skin fibroblasts. *Exp Cell Res* 2002;278(2):184-197
- 18 Hu E, Dul E, Sung CM, et al. Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307(2):720-728