

# HDAC6 在肿瘤细胞侵袭与凋亡自噬中的作用

王琪琳<sup>1,2</sup>, 刘相国<sup>2</sup>

关键词: HDAC6; Hsp90;  $\alpha$ -tubulin; 乙酰化; 侵袭; 自噬

中图分类号: Q291 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)02-0227-04

## 0 引言

近年来研究发现, 组蛋白脱乙酰化酶 HDAC6 在肿瘤的发生和转化中具有重要的作用<sup>[1]</sup>。HDAC6 是第Ⅱ类组蛋白脱乙酰化酶的一个特殊成员, 具有两个同源的催化结构域, 每一个催化结构域都具有完整的生物功能, 可以使 HDAC6 蛋白完全激活<sup>[2]</sup>。HDAC6 在羧基端含有一个泛素结合的锌指结构(称为 ZnF-UBP 结构域)和动力蛋白结合结构域。HDAC6 的泛素结合结构有利于形成压力颗粒(stress granules, SG), 干扰微管的排列或者损伤动力蛋白都会阻止 SG 的形成; HDAC6 的锌脂结构域(ZnF-UBP)在清除错误折叠的蛋白质所造成的细胞毒性方面起关键作用。HDAC6 的酶作用底物以及相互作用的一些蛋白质已经被鉴定, 如  $\alpha$ -tubulin、Hsp90、cortactin, 还有 p97 (VCP, Cdc48p)、p150glued (dynactin)、mDia2、Ubiquitin、PLAP、NF- $\kappa$ B (p50, 65)、Runx2、Sumoylated p300、PP1 等<sup>[3]</sup>。HDAC6 主要通过对  $\alpha$ -tubulin、cortactin 和 Hsp90 的乙酰化调节, 并与微管蛋白等相互作用, 促进细胞运动及肿瘤的转移。

## 1 HDAC6 促进肿瘤的发生与转化

HDAC6 可促进肿瘤的发生和转化, 使转化的细胞进行锚定非依赖性的增殖<sup>[4]</sup>。失巢凋亡现象是由于缺乏与周围基底膜以及胞外基质的充分黏附而发生的一种凋亡现象, 非锚定的细胞增殖可使细胞逃避失巢凋亡现象而存活。Ras/MAPK 信号通路对于肿瘤的发生具有重要的作用, Ras 诱导的致癌

基因的转化需要 HDAC6, 它可以促进非锚定的细胞进行增殖, 这是恶性转化的一个主要标志。敲除 HDAC6 也可以使小鼠细胞质中的 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化水平降低, 这两种信号通路均与肿瘤的生长有关, 因此 HDAC6 可以激活致癌 Ras 信号通路和肿瘤细胞存活信号通路。

HDAC6 可以维持已经建立的致癌细胞系的转化和生长<sup>[4]</sup>。在敲除 HDAC6 的 SKOV3 卵巢癌、SKBR3 和 MCF7 乳腺癌细胞系中, 这些癌细胞的非锚定性生长抑制率可达到 5%~30%。在 SCID-Beige 小鼠中静脉注射 HDAC6 特定的 shRNA 和对照 shRNA, HDAC6 敲除的肿瘤细胞其生长明显地被延迟。如果 HDAC6 敲除细胞与野生型 HDAC6 细胞重新组合, 可以恢复细胞的表型。在 HDAC6 缺陷鼠中, 肿瘤诱发两周之后其大小减半, 肿瘤的生长受阻。这些结果显示 HDAC6 可以促进肿瘤的发生和维持转化型细胞的表型。

分子伴侣 VCP/p97 可被 HDAC6 募集到 Hsp90/HSF1 复合体上, 并在非应激条件下形成一个基本的复合体, Hsp90 使 HSF-1 保持非活性状态。HSF-1 是一个转录因子, 由于热激或者蛋白酶体受到抑制可使 Hsps 募集错误折叠的蛋白质。蛋白酶体如果受到抑制, HDAC6 就会结合泛素化的蛋白质而不能结合 VCP/p97, 复合体各组分发生分离形成泛素化的 HDAC6、Hsp90、HSF-1 和 VCP/p97。所以, VCP/p97 ATPase 活性对于 Hsp90/HSF-1 复合体的解离起关键作用。HIF-1- $\alpha$  在肿瘤血管转录基因激活中具有重要的作用。据研究<sup>[5]</sup>, 组蛋白脱乙酰化酶抑制剂 LAQ824 可以抑制肿瘤血管再生和 HIF-1- $\alpha$  蛋白的表达, HDAC6 与 HIF-1- $\alpha$  的表达有关, 用 siRNA 抑制 HDAC6 可以降低 HIF-1- $\alpha$  的表达和转录活性。HIF-1- $\alpha$  和 HDAC6 都调控致癌性的 Ras/MAPK 信号通路, 它们的存在对于维持肿瘤细胞的转化表型非常重要。

收稿日期: 2011-05-14; 修回日期: 2011-09-19

基金项目: 山东省博士基金资助项目(BS2009YY004); 山东省科学技术发展计划资助项目(2010GSF10218)

作者单位: 1. 252059 山东聊城, 聊城大学生命科学学院; 2. 山东大学生命科学学院

作者简介: 王琪琳(1972-), 女, 博士在读, 副教授, 主要从事肿瘤细胞信号转导及抗肿瘤药物筛选的研究

## 2 HDAC6 调节微管蛋白、皮肌动蛋白的乙酰化

细胞运动在肿瘤的迁移中具有重要的作用,因此成纤维细胞被用来作为体内研究肿瘤细胞迁移的模型。研究显示,HDAC6 过表达可增加细胞的趋化性运动,这是因为至少一种细胞质蛋白乙酰化过低造成的。用曲古抑菌素 A(TSA)或者 SAHA 抑制 HDAC6 可阻止细胞的侵袭性运动。用 tubacin 抑制 HDAC6<sup>[6]</sup>,导致  $\alpha$ -tubulin 的过度乙酰化,阻止成纤维细胞的侵袭性运动。HDAC6 被抑制的细胞,微管动力学降低,黏着斑增加,因而导致成纤维细胞运动性降低。

HDAC6 可以促进动力蛋白介导的细胞过程<sup>[7-8]</sup>,微管的乙酰化可使马达蛋白 kinesin-1 与微管结合。用 TSA 抑制 HDAC6 可使  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化水平升高,在体内可以增加动力蛋白和马达蛋白 kinesin-1 结合到微管上,促进脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factors, BDNF)在细胞间的运输。相反,如果  $\alpha$ -tubulin 的 lys 乙酰化被抑制,马达蛋白复合体以及 BDNF 的运输都会降低。在亨廷顿氏综合征(Huntington)中,微管的乙酰化程度降低,微管依赖性的运输降低。据研究 EGFR 在细胞间和细胞内的转移运输也是受  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化状态所调控,抑制 HDAC6 表达可促进 EGFR 沿着微管网路运输<sup>[9]</sup>。因而 HDAC6 的表达与肿瘤转移有密切的关系。

皮肌动蛋白(cortactin)可以与 HDAC6 结合并作为它的底物,HDAC6 过表达可以导致皮肌动蛋白的乙酰化降低,而抑制 HDAC6 可使皮肌动蛋白过度乙酰化。HDAC6 可以改变皮肌动蛋白结合 F-肌动蛋白的功能,主要是通过调控皮肌动蛋白的重复结构中的所带电荷。皮肌动蛋白电荷突变细胞的运动性比对照组细胞要低,说明细胞运动依赖于皮肌动蛋白的电荷稳定性。上述实验结果说明,HDAC6 除了在微管-依赖的细胞运动中起作用,还可以通过调控皮肌动蛋白的乙酰化状态而影响 F-肌动蛋白依赖的细胞运动。

$\alpha$ -SMA(smooth muscle  $\alpha$ -actin)是一种细胞骨架蛋白,可以促进细胞的收缩和纤维化、肿瘤细胞的形态改变、组织的愈合和癌症的发展。HDAC6 与 HDAC4、HDAC8 一起作为 TGF- $\beta$ 1 介导的平滑肌  $\alpha$ -SMA 的基本表观调控因子。最近研究发现,迁移和侵袭抑制蛋白(migration and invasion inhibitory protein, MIIP)不仅可以调控胰岛素样生长因子结合蛋白 2 (insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP2),而且可以结合和抑制 HDAC6,MIIP 还可以调节细胞有丝分裂检验点,

这也是一个微管相关的生理过程<sup>[10]</sup>,与细胞运动有密切的关系。HDAC6 也可以与乳腺癌转移抑制因子(BRMS1)相互作用<sup>[11]</sup>。BRMS1 是一个受 Hsp90 稳定的蛋白质分子,Hsp90 的脱乙酰化可以使 BRMS1 去稳定并降低转移抑制活性,这种机制还不是很明确。

## 3 HDAC6 调节 Hsp90 的乙酰化

HDAC6 是 Hsp90 的一个脱乙酰化酶,抑制 HDAC6 可以促进 Hsp90 的乙酰化而干扰它的生物学功能,促进底物蛋白持续性降低<sup>[12]</sup>。HER-2 是 Hsp90 的一个底物蛋白,用卡巴咪嗪(又称立痛定)抑制 HDAC6 可以促进 Hsp90 的乙酰化与 HER-2 的降解<sup>[13]</sup>;由于 Hsp90 的功能受到干扰,而 HER-2 通过泛素蛋白酶体途径被降解。用 HDAC6 泛抑制剂 LBH589 处理癌细胞,可使组蛋白、Hsp90 乙酰化,使致癌蛋白 EGFR、HER-2 与磷酸化的 Akt 和 ERK 表达水平降低。用 RNAi 抑制 HDAC6 可以增加细胞对放射的敏感度以及 Hsp90 的乙酰化,减少底物蛋白与 Hsp90 的相互作用。相反,外源性过表达 HDAC6 可以增加 p-EGFR 和 p-AKT 的表达水平,减少 LBH589 介导的对放射的敏感度<sup>[14-15]</sup>。所以,HDAC6 在维持肿瘤细胞的信号转导方面具有重要作用。

## 4 HDAC6 介导的 SG 运输

细胞对环境压力的一个基本细胞反应就是可逆性的转录抑制,主要表现在细胞质中的动态结构 SG (stress granules)上。HDAC6 是 SG 的一个关键组成成分,与 tubulin、Hsp90 和泛素化的蛋白质有高度的亲和性。研究发现<sup>[16]</sup> HDAC6 还与其他的 SG 蛋白,如 G3BP(Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1)相互作用,在压力条件下转位到 SG 上,药物抑制或者遗传敲除 HDAC6 可以抑制 SG 的形成。SG 的形成依赖于 HDAC6 的泛素结合结构域,干扰微管的排列或者损伤动力蛋白会阻止 SG 的形成。这些实验结果显示 HDAC6 是 SG 颗粒的一个组成成分,通过调节马达蛋白驱动的单个 SG 组分沿着微管的运动而调控 SG 的形成,有利于细胞在压力环境下的存活,甚至与肿瘤的发生有关。

## 5 HDAC6 在泛素蛋白酶体与聚集小体通路中的作用

靶向蛋白酶体或聚集小体诱导细胞凋亡是靶向癌症细胞的一种方法。转化的细胞会聚集更多的错误折叠的蛋白质,这些蛋白质可被蛋白酶体或者聚

集小体分解<sup>[17]</sup>，因此肿瘤细胞的存活比正常细胞更依赖于蛋白酶体和聚集小体。蛋白质降解的主要途径是泛素-蛋白酶体系统，它是由多个蛋白质组成的蛋白水解复合体，可以降解泛素标记的蛋白质。其他重要的降解途径还包括聚集小体和大自噬-溶酶体途径<sup>[18]</sup>。在蛋白酶体抑制剂作用下，错误折叠的蛋白质聚集增加，细胞生物活性降低。HDAC6 与泛素化蛋白的高度结合可激活聚集小体通路<sup>[19]</sup>。HDAC6 结合泛素化的蛋白质并把它们传递给马达蛋白，沿着微管把这些蛋白质运输到 MTOC。错误折叠的蛋白质会形成 200 nm 左右的小颗粒，在颗粒中心周围的微丝骨架形成聚集小体。聚集小体是动态变化的，它可以募集分子伴侣和蛋白酶体，一旦这种情况发生，它就会激活自噬清除和自噬流到溶酶体从而降解错误折叠的蛋白质。当泛素蛋白酶体系统被抑制，HDAC6 可以通过增强大自噬体系来调控细胞毒性，这种增强作用是通过微管介导的和动力蛋白介导的运输，确保大自噬泡被运输到溶酶体上。HDAC6 的参与组分 VCP/p97 是一个具有分离酶活性的分子伴侣，通过螯合 HDAC6 可以分开泛素化的聚集小体/HDAC6 的复合体，因而泛素化的蛋白质可通过蛋白酶体而不是聚集小体而降解。

聚集小体是在蛋白酶体缺乏的条件下形成的。HDAC6(ZnF-UBP)在清除错误折叠的蛋白质所造成的细胞毒性方面起关键作用<sup>[20]</sup>。动力蛋白从细胞质中运输和去除错误折叠的蛋白质，并把它们重新定位在聚集小体中。HDAC6 在多泛素化的蛋白质和动力蛋白之间起到一个桥梁作用，HDAC6 的脱乙酰化酶活性和它的 ZnF-UBP 结构域有利于形成聚集小体。在 HDAC6 沉默的细胞中，泛素化错误折叠蛋白质的聚集可导致 20% 以上的细胞凋亡。HDAC6 能促进泛素化蛋白的聚集可以被分子伴侣 p97/VCP 所拮抗，因为它可以结合到 HDAC6 上。p97/VCP 的结合可以控制泛素化多肽链从 HDAC6 上释放，从而调控它们的生命周期。

在卵巢癌细胞中，新陈代谢增加导致泛素-蛋白酶体应激反应，HDAC6 表达也增加<sup>[21]</sup>。用 HDAC6 的抑制剂 tubacin 和它的衍生物 NK84 处理卵巢癌细胞，相对于卵巢表面正常的上皮细胞，可显著抑制卵巢癌上皮细胞的生长存活。蛋白酶体和 HDAC6 介导的聚集小体降解途径的抑制效应可分别由由 PS-341 和 NK84 所介导，两种药物诱导细胞凋亡具有协同效应。

在多发性骨髓瘤中，HDAC6 抑制剂 tubacin 介导的  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化可干扰 HDAC6-动力蛋白

复合体的形成，同时增加多发性骨髓瘤细胞中硼替佐米(又称万珂，bortezomib)诱导的细胞凋亡。这种凋亡是通过 JNK/Caspase 活化途径。多发性骨髓瘤属于细胞膜癌，对传统的化疗具有抗性。在体外 bortezomib 和 tubacin 联合用药可抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖，更为重要的是 tubacin 不会影响正常的外周血单核细胞，所以 tubacin 抑制 HDAC6 可与化疗联合来治疗多发性骨髓瘤和其他类型的癌症。

## 6 结论

近来蛋白质组分析确定了 1 750 个蛋白质中的 3 600 个 Lys 乙酰化位点，Lys 乙酰化位点涉及不同的细胞过程，如染色质重建、细胞周期、剪切、细胞核运输以及肌动蛋白成核等<sup>[22]</sup>。HDAC6 作为一种重要的脱乙酰化酶(脱 Lys 乙酰基)，确定哪些蛋白质被 HDAC6 脱乙酰化，对于很好理解该酶调节整个细胞过程是非常重要的。随着对 HDAC6 生理功能的研究发现，HDAC6 在细胞的极化运动以及胚胎发生和出生后血管的形成中也具有重要的作用<sup>[23-24]</sup>。HDAC6 主要通过调节 Hsp90、tubulin 以及 cortactin 的乙酰化，在细胞运动中参与癌症细胞的侵袭与转移。如果 HDAC6 受到抑制，导致错误折叠的泛素化蛋白质聚集和细胞的凋亡，表明 HDAC6 通过调节微管蛋白的乙酰化和与泛素化的蛋白质结合而参与物质的分类和运输。综上所述，由于 HDAC6 在许多信号通路中促进肿瘤细胞的存活并维持其转化表型，因此，HDAC6 可作为癌症治疗的一个潜在的分子靶标。HDAC6 过表达与肿瘤发生有关，因而也可作为预后的一个辅助标志。HDAC6 介导的对细胞压力的应激保护效应可能也存在于不同的细胞系，因此，应该深入研究更多不同的肿瘤细胞系以及抑制肿瘤发生的可能凋亡途径，为癌症的预防和治疗提供更深入的理论基础。

## 参考文献：

- [1] Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy[J]. Cancer Lett, 2008, 269(1): 7-17.
- [2] Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, et al. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin[J]. Mol Cell, 2007, 27(2): 197-213.
- [3] Valenzuela-Fernández A, Cabrero JR, Serrador JM, et al. HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions[J]. Trends Cell Biol, 2008, 18(6): 291-297.
- [4] Lee YS, Lim KH, Guo X, et al. The cytoplasmic deacetylase

- HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(18): 7561-7569.
- [5] Qian DZ, Kachhap SK, Collis SJ, et al. Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (17): 8814-8821.
- [6] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell [M]. 5th edition. New York: Garland Science, 2008: 968-973.
- [7] Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, et al. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(8): 4389-4394.
- [8] Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS[J]. *Nature*, 2007, 447(7146): 859-863.
- [9] Deribe YL, Wild P, Chandrashaker A, et al. Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6[J]. *Sci Signal*, 2009, 2(102): ra84.
- [10] Wang Y, Wen J, Zhang W. MIIP, A cytoskeleton regulator that blocks cell migration and invasion, delays mitosis, and suppresses tumorigenesis[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2011, 12 (1): 68-73.
- [11] Zhang D, Li J, Costa M, et al. JNK1 mediates degradation HIF-1 alpha by a VHL-independent mechanism that involves the chaperones HSP 90/HSP 70[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 813-823.
- [12] Giommarelli C, Zuco V, Favini E, et al. The enhancement of antiproliferative and proapoptotic activity of HDAC inhibitors by curcumin is mediated by Hsp90 inhibition[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(6): 995-1004.
- [13] Meng Q, Chen X, Sun L, et al. Carbamazepine promotes Her-2 protein degradation in breast cancer cells by modulating HDAC6 activity and acetylation of Hsp90[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 348(1-2): 165-171.
- [14] Kim IA, No M, Lee JM, et al. Epigenetic modulation of radiation response in human cancer cells with activated EGFR or HER-2 signaling: potential role of histone deacetylase 6[J]. *Radiother Oncol*, 2009, 92(1): 125-132.
- [15] Rao R, Fiskus W, Yang Y, et al. HDAC6 inhibition enhances 17-AAG-mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells[J]. *Blood*, 2008, 112(5): 1886-1893.
- [16] Kwon S, Zhang Y, Matthias P. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(24): 3381-3394.
- [17] Miller CP, Ban K, Dujka ME, et al. NPI-0052, a novel proteasome inhibitor, induces caspase-8 and ROS-dependent apoptosis alone and in combination with HDAC inhibitors in leukemia cells[J]. *Blood*, 2007, 110(1): 267-277.
- [18] Rubinsztein DC. Autophagy induction rescues toxicity mediated by proteasome inhibition[J]. *Neuron*, 2007, 54(6): 854-856.
- [19] Boyault C, Sadoul K, Pabion M, et al. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination[J]. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5468-5476.
- [20] Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy[J]. *EMBO J*, 2010, 29(5): 969-980.
- [21] Bazzaro M, Lin Z, Santillan A, et al. Ubiquitin proteasome system stress underlies synergistic killing of ovarian cancer cells by bortezomib and a novel HDAC6 inhibitor[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(22): 7340-7347.
- [22] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions[J]. *Science*, 2009, 325(5942): 834-840.
- [23] Lee YS, Lim KH, Guo X, et al. The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(18): 7561-7569.
- [24] Li D, Xie S, Ren Y, et al. Microtubule-associated deacetylase HDAC6 promotes angiogenesis by regulating cell migration in an EB1-dependent manner [J]. *Protein Cell*, 2011, 2 (2): 150-160.

[编辑校对:周永红]