

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.006

PXD101 对口腔鳞癌 HN-6 细胞增殖及凋亡的初步研究 *

郭 峰 郭福林[△] 李国林 马 杰 王小龙

(哈尔滨医科大学附属口腔医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的: 本实验探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂 PXD101 对口腔鳞癌 HN-6 细胞的增殖、细胞凋亡及细胞周期的影响。**方法:** PXD101 对口腔鳞癌 HN-6 细胞进行干预, 倒置相差显微镜观察细胞形态学改变; MTT 法检测 PXD101 对 HN-6 细胞的增殖影响; Annexin-V-FITC/PI 双染流式细胞仪定量检测细胞凋亡; 流式细胞仪分析细胞周期。**结果:** PXD101 可明显抑制 HN-6 细胞的生长($P < 0.05$), 呈时间剂量依赖性。倒置相差显微镜下观察对照组细胞贴壁, 形态呈多边形, 生长活跃; 实验组细胞脱壁, 变小, 细胞核皱缩。绘制细胞生长曲线示, 随着 PXD101 的浓度和作用时间的增加, HN-6 细胞生长明显受到抑制, 各实验组细胞生长抑制率与对照组比较, $P < 0.05$ 差别有统计学意义。1 $\mu\text{mol/L}$ PXD101 作用 24 h, 48 h 细胞总凋亡率分别为 20.9%、38.6%, 与对照组相比有统计学意义($P < 0.05$); HN-6 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 与对照组相比, $P < 0.05$ 差别有统计学意义。**结论:** PXD101 体外实验能显著抑制口腔舌癌 HN-6 的细胞增殖, 诱导细胞凋亡。

关键词: HN-6; PXD101; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R739; R86 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)16-3021-04

Research on the Apoptosis of Oral Squamous Cell Carcinoma HN-6 Induced by Histone Deacetylase Inhibitor PXD101 *

GUO Feng, GUO Fu-lin^A, LI Guo-lin, MA Jie, WANG Xiao-long

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Stomatology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

Abstract Objective: This study was purposed to explore the effect of PXD101 on the cell proliferation, cycle arrest and apoptosis of oral squamous cell carcinoma (HN-6) *in vitro*. **Methods:** The oral squamous cell carcinoma HN-6 cells cultured in medium were intervened PXD101 and were observed by the inverted phase contrast microscope. The effect of PXD101 on Proliferative activity of HN-6 cells was detected by MTT method. The cell apoptotic rates were determined by flow cytometry through Annexin-V-FITC/PI staining. cell cycle arrest rates were analyzed by flow cytometry. **Results:** PXD101 can obviously inhibit the growth of HN-6 cells ($P < 0.05$) and show time dose dependent. Under the inverted phase contrast microscope, Control cell morphology has not changed, with cells polygonal, adherent and active. However, the morphology of the cells treated by PXD101 has changed. The groups form a smaller and shrivel, cells with the increase of concentration and action time of PXD101, cell growth is restrained obviously, the growth inhibition of the cells compared with control group, $P < 0.05$, differences have statistical significance. Cell apoptosis rate were 20.9%, 38.6%, respectively with 1 $\mu\text{mol/L}$ PXD101 treatment for 24 h, 48 h compared with the control group was statistically significant ($P < 0.05$). HN-6 block cell cycle in G₀/G₁ phase, compared with the control group, $P < 0.05$, differences have statistical significance. **Conclusion:** PXD101 *in vitro* experiment can significantly inhibit people HN-6 oral squamous carcinoma cell proliferation and induce apoptosis.

Key words: HN-6; PXD101; Cell apoptosis; Cell cycle

Chinese Library Classification: R739; R86 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)16-3021-04

前言

口腔鳞状上皮细胞癌是颌面部恶性肿瘤,严重影响病人的生命、生理功能及美观。口腔鳞状细胞癌对传统的治疗方法如化疗、放疗、免疫治疗具有耐受性,手术治疗又具有局限性,因此寻找一种理想有效的治疗口腔鳞状细胞药物成为国内外学

者的研究热点。组蛋白乙酰化在控制基因的表达方面起着重要的作用,影响许多基因的转录控制,包括肿瘤抑制基因。HDAC 抑制剂作为新一代潜在靶向抗肿瘤药物,研究发现,这种药物可以有效的抑制肿瘤细胞的生长和促进肿瘤细胞凋亡。PXD101 是一种新型的羟肟酸类 HDAC 抑制剂,它在针对血液学和一些固体恶性肿瘤研究方面,已经进行了一期和二期临床

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(QC2011C037)

作者简介:郭峰(1982-),男,硕士研究生,主要研究方向:从事口腔临床及基础研究工作,电话:15846389635, E-mail:105796174@qq.com

[△]通讯作者:郭福林,博士,副教授,口腔颌面外科,电话:13945134558, E-mail:flguo1967@yahoo.com.cn

(收稿日期:2013-11-28 接受日期:2013-12-25)

研究评估^[1,2],目前经研究发现能抑制子宫、肺、乳腺、前列腺癌细胞的组蛋白脱乙酰酶活性^[3],但对口腔鳞状细胞癌的研究却鲜有相关报道。本实验目的在于通过 HDAC 抑制剂 PXD101 作用 HN-6 细胞来初步探讨其相关作用效果。

1 材料和方法

1.1 试剂

PXD101(美国 Selleck 公司)。口腔鳞状癌细胞 HN-6(上海交大赠送)。胎牛血清(BISCO 公司)。DMSO(美国 Sigma)。MTT(Sigma)。DMEM(Gibco 公司)。细胞周期检测试剂盒购自(凯基生物)。AnnexinV-FITC/PI 检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司)。

1.2 方法和步骤

1.2.1 细胞培养 HN-6 细胞放于含有 10%的胎牛血清,1%双抗(青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 DMEM 培养液中进行培养,置于 37℃,5%CO₂ 培养箱中孵育。每日镜下观察,待细胞长满瓶底的 80%-90%用胰酶消化传代一次。

1.2.2 细胞形态学观察 将 HN-6 细胞每孔 1×10^5 个接种于 96 孔板中,设 PXD101 药液浓度分别为 0.01 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。每组设 6 个复孔,设阴性对照孔,分别在 24 h、48 h、72 h 倒置相差显微镜下观察细胞形态、大小、数量及贴壁等情况,并进行拍照。

1.2.3 MTT 法检测 PXD101 对 HN-6 细胞的增殖抑制率 将对数生长期的细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 将其调整为 6.0×10^4 个/mL 的密度接种于 3 块 96 孔板,置于 37℃,CO₂ 培养箱中进行孵育 24 h。用 DMSO 将药物的浓度梯度调整为 0.01、0.1、0.5、1、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$,共设置 5 个药物处理组及一个阴性对照组,每组设 6 个复孔,并设置阴性对照组,每板每个浓度设 6 个复孔,置于 37℃,CO₂ 培养箱中分别孵育 24、48、72 h 后加入 MTT 液 20 $\mu\text{L}/$ 孔,避光孵育 4 h 后弃去上清后加入 DMSO 200 $\mu\text{L}/$ 孔,震荡 10 min,将酶标仪波长设置为 490 nm,

进行检测并读取吸光度。细胞增殖抑制率 = (对照组吸光度 - 实验组吸光度) / 对照组吸光度 $\times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 将对数生长期的细胞的密度调整为 2×10^5 个/mL 后接种于培养瓶中,置于 37℃,CO₂ 培养箱中继续培养。24 h 后取出培养瓶,弃去旧培养液,对照组不加药,加入 PXD101 进行干预,设药物浓度分别为 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$,置于 37℃,CO₂ 培养箱中分别孵育 24、48 h,取出培养瓶收集细胞,调整细胞密度为 10×10^5 ,1000 转离心 10 min,弃除上清液,加入 1 mL 预冷的 PBS 洗涤 2 次,将细胞重悬于 200 μL Binding Buffer,再加入 10 μL Annexin V-FITC 轻轻混匀,避光室温反应 15 分钟,加入 300 μL Binding Buffer,200 目筛网过滤,加入 5 μL PI 避光染色 15 min,流式细胞仪上测定每个样品的凋亡细胞比率。

1.2.5 细胞周期分析 将对数生长期的 HN-6 细胞调整密度为 2×10^5 个/mL 后接种于细胞培养瓶中,置于 37℃,CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后取出培养瓶,弃去旧培养液,加入 PXD101 进行干预,药物浓度分别为 0.1、1、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$,37℃,CO₂ 培养箱中继续培养。孵育 24 小时后收集细胞,调整细胞数量为 1×10^6 个/mL,1000 转离心 10 min,弃去上清液,预冷 PBS 洗涤两次,加入 2 mL 70%乙醇,4℃ 固定 24 h 后收集细胞,加入 500 μL PI 染液(含 RNase),避光孵育 30 min,上机检测,重复 3 次。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计学软件对实验数据进行统计学分析,各实验组均数采用单因素方差分析,实际数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 存在统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

未加药细胞生长状态良好,贴瓶壁生长,形态呈现不规则多边形且折光度较高(图 1 A)。经 PXD101 作用后,随着药物浓度的增加和时间的延长,细胞变形皱缩,折光度逐渐减弱,大量的细胞悬浮,最后裂解(图 1 B、C、D)。

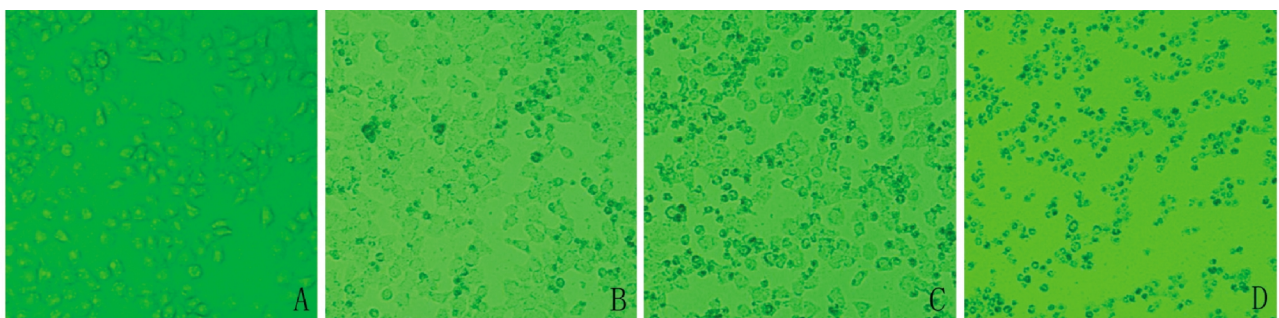


图 1 倒置显微镜下观察药物作用 HN-6 细胞后的形态变化($\times 100$ 倍)

Fig. 1 Morphological changes of HN-6 cells after drug effects were observed under inverted microscope($\times 100$)

2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率实验结果

PXD101 对 HN-6 细胞作用后的细胞生长情况,结果显示 HN-6 细胞经过 PXD101 作用后其生长受到显著地抑制,各实验组随着药物浓度和处理时间的增加,细胞的生长抑制率也逐渐的提高,具有剂量和时间的依赖性(见图 2)。各实验组吸光度和抑制率与对照组相比差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 Annexin V-FITC 试剂盒检测细胞凋亡

经药物浓度 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PXD101 作用 HN-6 细胞 24 h、48 h 后,检测结果显示,晚期凋亡率分别为 15.5%、37.8% (图 3 B C) 与对照组 0.2% (图 3 A) 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),细胞的总凋亡率分别为 21.9%、46.5% (图 3 B C),与对照组 1% (图 3 A) 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),上述实验结果显示,同一药物浓度处理后的时间越长,HN-6 细胞总凋亡率随之增加,晚期凋亡率逐渐增多。

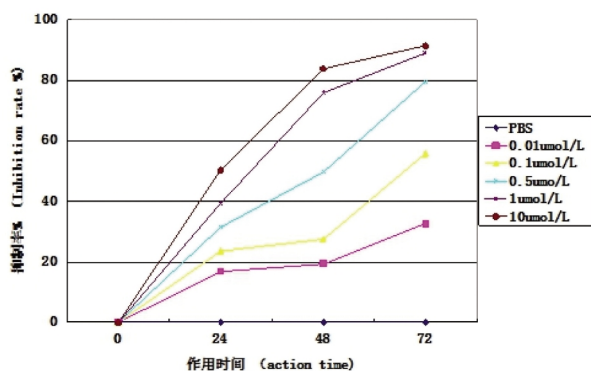


图2 不同浓度的PXD101作用于HN-6细胞24 h、48 h、72 h后的抑制率曲线

Fig. 2 Inhibition ratio curve of PXD101 on HN-6 cells at varying concentrations and in different treatment durations(24 h, 48 h, 72 h)

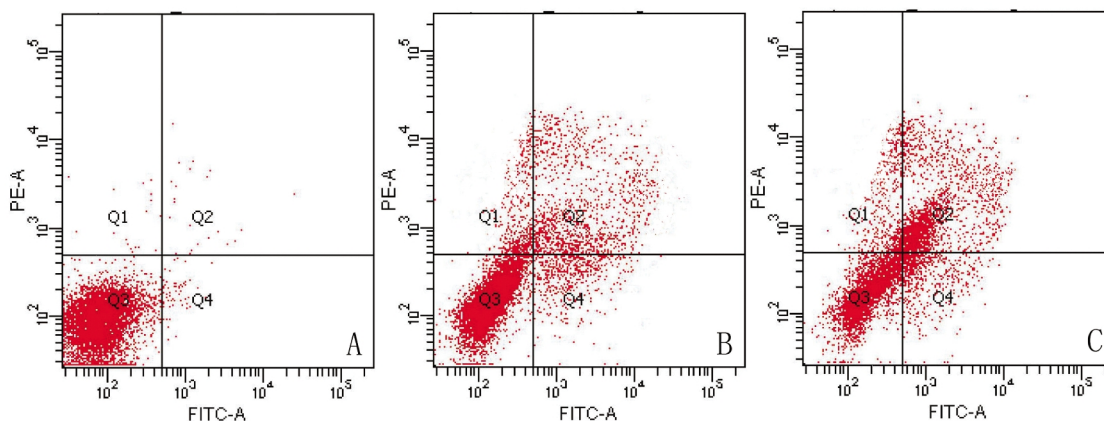


图3 PXD101对HN-6细胞的凋亡影响

Fig. 3 The apoptosis in HN-6 cells induced by PXD101

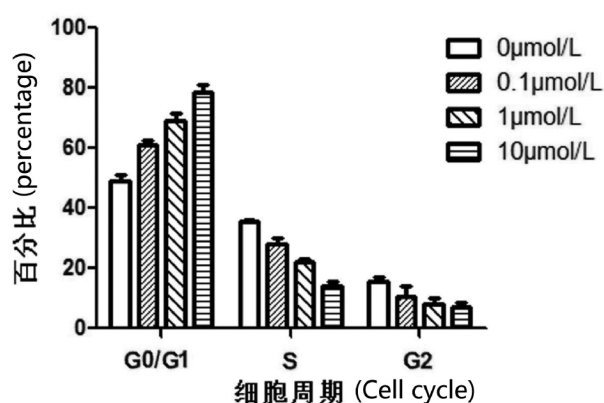


图4 HN-6细胞经PXD101 24小时作用后产生的细胞周期变化

Fig.4 Effect of PXD101 on cell cycle distribution of HN-6 after 24 hours

白乙酰化作用发生障碍和乙酰化水平降低,基因转录受抑制,肿瘤抑制基因沉默^[6,7]。因此在寻求理想的新型抗肿瘤药物方面组蛋白去乙酰化酶抑制剂就受到众多学者的高度重视。近来已有大量相关实验证实几种组蛋白去乙酰化酶抑制剂能起到强有力地抗肿瘤作用^[8-10],组蛋白去乙酰化酶抑制剂通过改变

2.4 细胞周期分析

通过流式细胞仪检测结果显示,在PXD101药物浓度不断增加后,HN-6细胞周期G0/G1细胞比例明显增加,表明细胞发生凋亡(图4)。实验组与对照组进行比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

肿瘤的发生是一个极其复杂的过程,其中细胞凋亡被抑制是导致肿瘤产生的一个重要因素^[4]。随着人类对肿瘤复杂的发病过程不断的深入研究,表观遗传学越来越受到学者们的重视,并有相关研究发现,表观遗传学在探索癌症的发生机制中起着重要的作用。其中表观遗传学里就包含着重要的组蛋白乙酰化方面,其影响着基因转录调节。组蛋白乙酰化酶和组蛋白去乙酰化酶决定组蛋白乙酰化状态^[5],组蛋白乙酰化和去乙酰化的功能状态发生紊乱将会导致多种恶性肿瘤的发生即:组蛋

组蛋白乙酰化状态来调节基因的表达和调控染色质结构。HDAC抑制剂能够有效的使多种肿瘤细胞发生凋亡^[11,12],而对正常细胞几乎无副作用^[13]。而PXD101作为一种新型的HDAC抑制剂,对于口腔鳞癌的研究,国内外却少有报道。

本实验结果显示,PXD101能够有效地抑制HN-6细胞的增殖并诱导其凋亡。经倒置显微镜观察发现,对照组细胞生长活跃,贴壁,形态呈多边形,通过药物对HN-6细胞作用后,存活率降低,脱壁,体积变小,折光率减弱,大量裂解。实验表明,HN-6细胞经过不同浓度(0.01、0.1、0.5、1、10 $\mu\text{mol/L}$)的PXD101作用后,MTT法检测显示,HN-6细胞经PXD101作用24小时后其抑制率由(16.9 $\pm$ 0.96)%逐渐增加到(50.30 $\pm$ 0.93)%,作用48小时后其抑制率由(19.39 $\pm$ 1.05)%逐渐增加到(83.46 $\pm$ 0.93)%,作用72小时后其抑制率由(32.55 $\pm$ 1.22)%逐渐增加到(91.31 $\pm$ 0.91)%,这一结果表明,相同药物浓度组随着时间的增加,HN-6细胞的增殖抑制率呈时间和剂量依赖性。目前相关报道显示HDAC抑制剂不仅在体外实验可诱导肿瘤细胞的凋亡,体内试验可以有效的抑制肿瘤组织内的血管生成^[14,15]。组蛋白乙酰化的产生可以通过HDAC抑制剂产生,从而阻碍肿瘤细胞的有丝分裂影响其细胞周期过程^[16]。笔

者又通过 Annexin-V-FITC/PI 检测细胞凋亡率,1 $\mu\text{mol/L}$ 的 PXD101 作用 HN-6 细胞 24、48 h 后,结果显示,晚期凋亡率分别为 15.5%、37.8%;细胞的总凋亡率分别为 21.9%、46.5%。表明药物作用时间的延长,HN-6 细胞总凋亡率明显提高,晚期凋亡率逐渐增多。经过细胞周期检测结果看到,在 PXD101 药物浓度的逐步递增条件下,HN-6 细胞对照组及实验组(0、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$) G_0/G_1 期所占百分比由 47.15% 渐增到 76.52%,同时 S 期及 G_2/M 期细胞比例逐渐减少,这一结果说明 PXD101 可阻滞 HN-6 细胞周期在 G_0/G_1 期。已有相关学者实验发现 PXD101 能够激发细胞周期对 p21^{Cip1/Waf1} 产生依赖性导致细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期^[17],笔者实验结果与之相符。细胞周期蛋白依赖激酶 p21^{Cip1/Waf1} 在参与细胞周期调解过程中起到关键的作用,HDAC 抑制剂通过提高 p21^{Cip1/Waf1} 启动因子周围的组蛋白乙酰化作用来激活 p21^{Cip1/Waf1} 的表达^[18]。目前已有报道,PXD101 作用肝癌、前列腺癌的肿瘤细胞后可引起其 p21 蛋白的高表达^[19]。PXD101 和其它种类的 HDAC 抑制剂在胰腺癌能够诱导 p21^{Cip1/Waf1} 上调已经得到了相关实验的证实^[20,21]。

综上所述,PXD101 对 HN-6 细胞具有抑制其增殖,阻滞细胞周期,诱导凋亡的生物活性。本实验为 PXD101 以后在口腔鳞癌的临床用药可能性提供了实用的参考依据。从而使其有望成为临床上治疗口腔鳞癌的新型化疗药物。PXD101 诱导 HN-6 细胞凋亡的具体生物机制还有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Giaccone G, Rajan A, Berman A, et al. Phase II study of belinostat in patients with recurrent or refractory advanced thymic epithelial tumors[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(15):2052-2059
- [2] Gimsing P, Hansen M, Knudsen LM, et al. A phase I clinical trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat in patients with advanced hematological neoplasia[J]. Eur J Haematol 2008, 81(3):170-176
- [3] Plumb JA, Finn PW, Williams RJ, et al. Pharmacodynamic Response and Inhibition of Growth of Human Tumor Xenografts by the Novel Histone Deacetylase Inhibitor PXD101[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2: 721-728
- [4] 蒋蕾,李向新,白玲,等.凋亡抑制蛋白 Livin 在口腔鳞癌中的表达及临床意义[J].口腔医学研究,2010,26(5):710-712
Jiang Lei, Li Xiang-xin, Bai Ling, et al. Expression and Clinical Significance of Livin in Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. Journal of Oral Science Research, 2010,26(5):710-712
- [5] Khochbin S, Verdel A, Lemercier C, et al. Functional significance of histone deacetylase diversity [J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11(2): 162-166
- [6] Secrist JP, Zhou X, Richon VM. HDAC inhibitors for the treatment of cancer [J]. Curr Opin Investig Drugs 2003, 4(12):1422-1427
- [7] 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
- [8] Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy[J]. Clin Oncol, 2009, 27:5459-5468
- [9] Paris M, Porcelloni M, Binaschi M, et al. Histone deacetylase inhibitors: from bench to clinic [J]. Med Chem, 2008, 51(6):1505-1529
- [10] Tan J, Cang S, Ma Y, et al. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents [J]. Hematol Oncol, 2010, 3:5-5
- [11] Lai JP, Yu C, Moser CD, et al. SULF1 Inhibits Tumor Growth and Potentiates the Effects of histone Deacetylase Inhibitors in hepatocellular Carcinoma [J]. Gastroenterology, 2006,130:2130-2144
- [12] Ueda T, Takai N, Nishida M, et al. Apicidin, a novel histone deacetylase inhibitor, has profound anti-growth activity in human endometrial and ovarian cancer cells [J]. Int J Mol Med, 2007, 19(2): 301-308
- [13] Guo Shan-yi, Zhang Yi-zhuo. Histone Deacetylase Inhibition: An Important Mechanism in the Treatment of Lymphoma[J]. Cancer Biol Med, 2012, 9(2):85-89
- [14] Ai T, Cui H, Chen L. Multi-targeted histone deacetylase inhibitors in cancer therapy[J]. Curr Med Chem, 2011, 19(4):475-487
- [15] Dickinson M, Johnstone R W, Prince H M. Histone deacetylase inhibitors: potential targets responsible for their anti-cancer effect[J]. Invest New Drugs, 2010, 28(1):3-20
- [16] Warrenner R, Beamish H, Burgess A, et al. Tumor cell-selective cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints[J]. FASEB J, 2003, 17 (11):1550-1552
- [17] Michael T Buckley, Joanne Yoon, Herman Yee, et al. The histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) suppresses bladder cancer cell growth in vitro and in vivo[J]. Journal of Translational Medicine, 2007, 5:49
- [18] Ocker M, Schneider-Stock R. Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21^{Cip1/Waf1}[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39 (7-8):1367-1374
- [19] Qian X, Ara G, Mills E, et al. Activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) in preclinical models of prostate cancer [J]. Int J Cancer, 2008, 122(6):1400-1410
- [20] Ammerpohl O, Trauzold A, Schniewind B, et al. Complementary effects of HDAC inhibitor 4-PB on gap junction communication and cellular export mechanisms support restoration of chemosensitivity of PDAC cells[J]. Br J Cancer, 2007, 96(1):73-81
- [21] Arnold NB, Arkus N, Gunn J, et al. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces growth inhibition and enhances gemcitabine-induced cell death in pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(1):18-26