

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.33.003

MS-275 联合平阳霉素对 Tca-8113 细胞生长和凋亡的影响

周建宇 毛立民[△] 王 巍 吕少华 赵 晶

(哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:观察组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACIs)MS-275 联合抗生素类化疗药物平阳霉素(PYM)对口腔鳞状癌细胞 Tca-8113 的生长及凋亡的影响。**方法:**以体外培养的口腔鳞状细胞癌 Tca-8113 细胞为研究对象,应用 MTT 法检测不同浓度(0、1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$)MS-275、(0、0.05、0.1、0.2、0.4 $\mu\text{mol/L}$) 平阳霉素 (PYM) 单独和联合用药对 Tca-8113 细胞增殖活性的影响;Annexin-V-FITC/PI 双染流式细胞术定量检测细胞的凋亡情况。**结果:**不同浓度 (1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$)MS-275 和(0.05、0.1、0.2、0.4 $\mu\text{mol/L}$)PYM 均可显著抑制 Tca-8113 细胞的增殖,并促进其凋亡,且呈浓度依赖性($P<0.05$)。4 $\mu\text{mol/L}$ MS-275 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ PYM 联合应用时,其抑制 Tca-8113 细胞增殖和促进其凋亡的作用均显著高于单独应用 MS-275 或 PYM($P<0.05$)。**结论:**MS-275 能有效增强口腔鳞状细胞癌 Tca-8113 细胞对平阳霉素(PYM)的敏感性,体外实验中呈现较好的抗肿瘤效应。

关键词:MS-275;平阳霉素;口腔鳞状细胞癌;细胞凋亡;细胞增殖

中图分类号:Q813;R739.8 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)33-6407-04

Effect of Combined Application of Histone Deacetylase Inhibitors (HDACIs) MS-275 and Pingyangmycin (PYM) on the Growth and Apoptosis of Oral Squamous Carcinoma Cell

ZHOU Jian-yu, MAO Li-min[△], WANG Wei, LV Shao-hua, ZHAO Jing

(Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the influence of combined application of histone deacetylase inhibitors MS-275 and antibiotics, chemotherapy drugs Pingyangmycin on the growth and apoptosis of oral squamous carcinoma cell Tca-8113. **Methods:** Oral squamous cell carcinoma Tca-8113 cells cultured in vitro were used for the study, MTT was performed to examine the proliferative activity of Tca-8113 cells after separated or combined application of (0, 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$) MS-275 and (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 $\mu\text{mol/L}$) PYM; Annexin V-FITC/PI double dye, Flow cytometry were used to detect the effects of MS-275 plus PYM on the apoptosis of Tca-8113 cells. **Results:** Different concentrations (1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$) of MS-275 or (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 $\mu\text{mol/L}$) PYM could both inhibit the growth and induce the apoptosis of Tca-8113 cells at a concentration dependent manner ($P<0.05$). Compared with MS-275 or PYM alone, 4 $\mu\text{mol/L}$ MS-275 plus 0.2 $\mu\text{mol/L}$ PYM could more significantly inhibit the proliferation of Tca-8113 cells and promote the apoptosis ($P<0.05$). **Conclusion:** MS-275 could effectively enhance the sensitivity of Tca-8113 cells to PYM, which showed good anti-tumour effect in vitro.

Key words: MS-275; Pingyangmycin; Oral squamous carcinoma; Cell apoptosis; Cell proliferation

Chinese Library Classification(CLC): Q813; R739.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)33-6407-04

前言

组蛋白乙酰转移酶(histone acetyl transferases, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)活性的失衡与肿瘤的发生密切相关^[1]。MS-275 是 HDAC 抑制剂中的一种,属于苯甲酰胺类衍生物,主要通过影响细胞的信号传导和细胞周期调节的途径使肿瘤细胞生长受到抑制,并促进细胞凋亡^[2]。平阳霉素

为细胞周期非特异性药物,可以直接与 DNA 结合,通过与 DNA 形成复合物从而影响 DNA 的功能;也能使 DNA 单链断裂,并释放出部分游离核碱,破坏 DNA 模板,阻止 DNA 复制,从而促使癌细胞的变性、坏死^[3]。

本研究通过采用 MS-275 联合平阳霉素干预体外培养的 Tca-8113 细胞,观察 Tca-8113 细胞增殖、迁移、凋亡的情况,旨在探讨 MS-275 联合平阳霉素对口腔鳞状上皮细胞癌的体外抑制作用,从而为 MS-275 联合平阳霉素应用于治疗口腔鳞癌的可能性提供实验依据及参考。

1 材料和方法

1.1 细胞株、实验药物及试剂

人舌鳞状细胞系 Tca-8113 由上海第二医科大学口腔医学

作者简介:周建宇(1982-),男,医学硕士,住院医师,主要研究方向:口腔鳞状细胞癌的临床及基础研究,

E-mail:djy1234567890@163.com

[△]通讯作者:毛立民, E-mail:mlmhnu@126.com,

电话:0451-85555710

(收稿日期:2014-07-08 接受日期:2014-08-12)

院提供。MS-275(美国 Sigma 公司),无血清 DMEM 培养基(美国 Sigma 公司),胎牛血清(美国 Sigma 公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司),AnnexinV-FITC/PI 检测试剂盒(深圳晶美公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 当细胞复苏后,细胞长满培养瓶底 80%左右时,采用 0.25%胰蛋白酶消化进行传代培养。

1.2.2 药物诱导 分别以不同浓度的 MS-275(0、1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$)、PYM (0、0.05、0.1、0.2、0.4 $\mu\text{mol/L}$) 处理 Tca-8113 细胞,以未加药物组为空白对照组。选择适合浓度的 MS-275 及 PYM 联合应用处理 Tca-8113 细胞,以未加药物组为空白对照组。

1.2.3 MTT 法测定细胞的生长增殖情况 收集对数生长期的 Tca-8113 细胞,以 10^5 个 /mL 的浓度接种于 96 孔板。37℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱内培养,待细胞长至 60%-80%时,加入不同浓度的药物处理。继续培养 48 h 后,每孔分别加入 MTT 试剂 20 μL (浓度为 5 mg/mL),37℃ 孵育 4 h,弃上清,每孔加入 DMSO 150 μL ,震荡 10 min,使结晶物充分溶解,检测 590 nm 波长下每孔的吸光度值,取均值,计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率(IR)} = \frac{\text{对照组吸光度} - \text{处理组吸光度}}{\text{处理组吸光度}} \times 100\%$$

表 1 不同浓度的 MS-275 对 Tca-8113 细胞生长抑制率的影响(%)($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of different concentrations of MS-275 on the growth inhibition rate of Tca-8113 cell

对照组 Control group		实验组($\mu\text{mol/L}$) Experimental group			
		1	2	4	8
OD	0.515	0.401	0.378	0.284	0.221
IR		22.07 $\pm$ 1.1*	27.63 $\pm$ 0.8*	34.21 $\pm$ 1.4	43.05 $\pm$ 1.6

注:* 与浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$ 。

Note: Compared with group 4 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$.

2.1.2 PYM 对 Tca-8113 细胞增殖的影响 如表 2 所示,不同浓度 PYM 对 Tca-8113 细胞的生长均有抑制作用,浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 PYM 与 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 PYM 比较,差

1.2.4 流式细胞术检测细胞的凋亡情况 制备 Tca-8113 单细胞悬液,浓度为 10^6 个 /mL,接种于 6 孔板中,每孔 1 mL,37℃、5% CO_2 及饱和湿度的条件下培养,待细胞长至 60%-80%时加入药物处理。单独或联合加入 MS-275 或 PYM,继续培养 48 h 后,收集细胞并将其悬于 200 μL BindingBuffer 中,依次加入 10 μL AnnexinV-FITC 及 5 μL PI,混匀,避光 15 min,加入 300 μL BindingBuffer,流式细胞仪检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 14.0 软件,数据以均数 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MS-275 和 PYM 对 Tca-8113 细胞增殖的影响

2.1.1 MS-275 对 Tca-8113 细胞增殖的影响 如表 1 所示,不同浓度的 MS-275 对 Tca-8113 细胞的生长均有抑制作用,4 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS-275 与 1 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS-275 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),与 8 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS-275 比较无统计学差异($P > 0.05$)。

异均有统计学意义($P < 0.05$),与 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 PYM 比较无统计学差异($P > 0.05$)。

表 2 不同浓度的 PYM 对 Tca-8113 细胞的生长抑制率的影响(%)($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of different concentrations of PYM on the growth inhibition rate of Tca-8113 cell(%)($\bar{x} \pm s$)

对照组 Control group		实验组($\mu\text{mol/L}$) Experimental group			
		0.05	0.1	0.2	0.4
OD	0.522	0.353	0.324	0.240	0.202
IR		18.7 $\pm$ 0.8	37.9 $\pm$ 1.2	56.3 $\pm$ 1.7*	61.9 $\pm$ 1.5

注:* 与 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $P < 0.05$ 。

Note: Compared with group 0.2 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$.

2.1.3 MS-275 联合 PYM 对 Tca-8113 细胞增殖的影响 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS-275 与 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 PYM 联合作用于 Tca-8113 细胞,细胞生长抑制率较单用 MS-275 或 PYM 显著提高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

2.2 MS-275 和 PYM 对 Tca-8113 细胞凋亡的影响

散点图左上、左下、右上、右下象限分别为损伤细胞、正常

细胞、晚期凋亡及死细胞、早期凋亡细胞。结果显示:4 $\mu\text{mol/L}$ MS-275、0.2 $\mu\text{mol/L}$ PYM 及两者联合作用于 Tca-8113 细胞 24 h,细胞的早期凋亡率分别为 38.52%、44.03%和 48.92%,总凋亡率分别为 46.14%、57.95%和 61.13%,与对照组(早期凋亡率为 2.6%,总凋亡率为 8.7%)相比差异均有统计学意义($P < 0.05$) (见图 1)。

表 3 MS-275 联合 PYM 对 Tca-8113 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of MS-275 plus PYM on the growth inhibition rate of Tca-8113 cell($\bar{x} \pm s$)

	对照组 Control group	MS-275 MS-275	平阳霉素 PYM	MS-275+ 平阳霉素 MS-275+PYM
OD	0.522	0.284	0.240	0.173
IR		34.21 $\pm$ 1.4*	56.3 $\pm$ 1.7*	77.8 $\pm$ 1.7

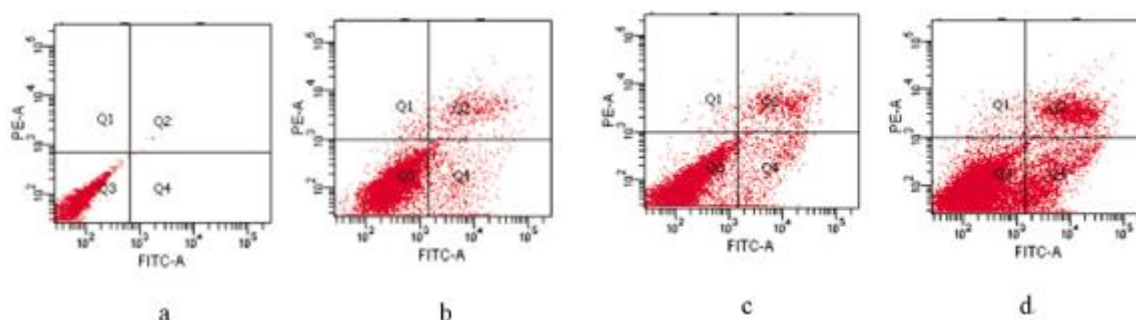
注:* 与联合用药组比较, $P < 0.05$ 。Note: Compared with MS-275+PYM group, $P < 0.05$.

图 1 单独及联合使用 MS-275、PYM 对 Tca-8113 细胞凋亡的影响

Fig.1 The effect of MS-275 and PYM on the apoptosis of Tca-8113 cells

注:a、b、c、d 分别代表对照组、MS-275 组、PYM 组、联合用药组。

Note: a, b, c, d represented for the control group, MS-275 group, PYM group, MS-275 + PYM group.

3 讨论

基因有序的转录调控是机体细胞维持正常功能的前提,基因转录调控功能紊乱可能导致细胞发生癌变。HAT 和 HDAC 当前被认为是致癌作用的关键调节器和癌症治疗的靶点^[46],已成为当前研究的热点。研究表明 HDACI 作为一类具有高潜能的抗癌因子复合物,可通过纠正肿瘤细胞中组蛋白异常的乙酰化状态,作用于细胞中多条信号转导通路,诱导肿瘤细胞凋亡,产生较强的抗肿瘤活性^[7-10]。

3.1 以平阳霉素为基础的联合用药方案

MS-275 是 HDACI 中的一种^[11-13],属于苯甲酰胺类衍生物,主要通过影响细胞的信号传导,诱导肿瘤细胞周期阻滞和凋亡途径,使肿瘤细胞生长受到抑制,诱导分化,产生凋亡^[14-17]。此外,MS-275 还可以抑制肿瘤新血管的生成,在和其他抗肿瘤化合物联合应用时可以有效的发挥协同作用,抑制肿瘤生长^[18-20]。基于此,我们选择了新的化疗药物 HDACI 与 PYM 联合应用,通过细胞毒性等实验研究,探索二者在抑制口腔鳞癌细胞生长增殖方面的协同作用。

3.2 联合用药的剂量及方式的选择

本实验在联合用药的剂量上,选择了低剂量的 HSACI 与 PYM 进行配伍组合,这是基于两方面的考虑:一方面,单独使用两种药物对 Tca8113 细胞都具有较好的敏感性,考虑尽量减少这种配伍组合的毒副作用,我们选择了低剂量的药物进行联合;另一方面,在口腔鳞癌细胞尚未对 PYM 耐药的情况下,为了减低药物的毒副作用,应尽量减小药物的剂量。因此,本研究采用低剂量的 MS-275、PYM 及二者联合作用于 Tca8113 细胞,旨在观察其对口腔鳞癌细胞增殖和凋亡的影响。

3.3 MS-275 和 PYM 对 Tca-8113 细胞增殖的影响

本实验通过单独及联合应用 PYM 及 MS-275 处理 Tca-8113 细胞,发现不同浓度的 PYM 及 MS-275 联合用药对 Tca-8113 细胞增殖具有协同作用。单独使用 MS-275 作用于 Tca-8113 细胞时,细胞的生长抑制率作用随着 MS-275 浓度的增加而升高,呈浓度依赖性,8 $\mu\text{mol/L}$ MS-275 作用于 Tca-8113 细胞 24 h 后,细胞生长抑制率达到 $43.05 \pm 1.6\%$,表明 Tca-8113 细胞对组蛋白去乙酰化酶抑制剂具有敏感性。此外,不同浓度 PYM 对 Tca-8113 细胞的生长抑制作用也呈浓度依赖性,MS-275 与 PYM 联合作用的 Tca-8113 细胞的生长抑制率较单用 MS-275 或 PYM 亦显著提高,表明二者对 Tca-8113 细胞的增殖具有协同抑制作用。BrackerTU 等研究表明 MS-275 在细胞增殖中影响蛋白的表达,使得 p21waf/cipl 在癌细胞中上调,而 p21waf/cipl 可与各种 cyclin/CDK 复合物结合,抑制 CDK 酶的活性,从而阻止细胞通过 G1/S 期而停留在 G1 期,与本实验对 Tca-8113 细胞增殖抑制结果相同。

3.4 MS-275 和 PYM 对 Tca-8113 细胞的凋亡的影响

Annexin-V-FITC 是检测细胞凋亡的指标之一^[1]。Gojo I 研究表明,在骨髓单核细胞,MS-275 能够诱导组蛋白 H3 和 H4 乙酰化,p21 蛋白表达,激活 caspase-3 而诱导细胞的凋亡,因而我们推测 MS-275 能够诱导口腔鳞癌的凋亡。本实验通过 Annexin-V-FITC/PI 检测 MS-275 和 PYM 对 Tca-8113 细胞的凋亡的影响,结果显示 4 $\mu\text{mol/L}$ MS-275、0.2 $\mu\text{mol/L}$ PYM 及二者联合作用于 Tca-8113 细胞 24 h 后,其早期凋亡率分别为 35.52%、44.03%、48.92%,总凋亡率分别为 46.14%、57.95%和 61.13%。这表明相对于两种药物的单独使用,低剂量的两种药物联用能更有效地诱导 Tca-8113 细胞发生凋亡。

综上所述,低剂量的 MS-275 和 PYM 联合应用可显著抑制 Tca-8113 细胞的增殖,并有效促进其凋亡,在口腔鳞癌的化

疗中可能具备良好的应用前景,值得进一步的深入研究。

参考文献(References)

- [1] Lihong H, Linlin G, Yiping G, et al. Proteomics approaches for identification of tumor relevant protein targets in pulmonary squamous cell carcinoma by 2D-DIGE-MS [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95121
- [2] Gong F, Peng X1, Luo C, et al. Cathepsin B as a potential prognostic and therapeutic marker for human lung squamous cell carcinoma [J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 125
- [3] Wang K1, Ling T, Wu H, et al. Screening of candidate tumor-suppressor genes in 3p21.3 and investigation of the methylation of gene promoters in oral squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2013, 29(3): 1175-1182
- [4] 杨凯,赵宁波,陈丹,等. 口腔鳞状细胞癌体内生长的昼夜生物节律特征[J]. 重庆医科大学学报, 2013, 12(7): 770-773
- Yang Kai, Zhao Ning-bo, Chen EN Dan, et al. Oral squamous cell carcinoma in vivo growth characteristics of biological rhythms of day and night [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2013, 12(7): 770-773
- [5] Sun ML, Wang CM, Wen YM. Anticancer effects of Pingyang mycin-activated carbon nanoparticles against human oral squamous carcinoma Tca8113 and BcaCD885 cell lines in vitro [J]. West China Journal of Stomatology, 2010, 28(3): 257-260
- [6] Tan J, Cang S, Ma Y, et al. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents [J]. J Hematol Oncol, 2010, 2(4): 3-5
- [7] Zaidi M1, Mallick A2. A study on assessment of mast cells in oral squamous cell carcinoma [J]. Ann Med Health Res, 2014, 4(3): 457-460
- [8] Rivera C1, Venegas B2. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review) [J]. Oncol Lett, 2014, 8(1): 7-11
- [9] Pathak J, Swain N, Patel S, et al. Histopathological variants of oral squamous cell carcinoma-institutional case reports [J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2014, 18(1): 143-145
- [10] Stockinger DE1, Fong DL2, Vogel KW2, et al. Oral Squamous Cell Carcinoma in a Pigtailed Macaque (Macaca nemestrina) [J]. Comp Med, 2014, 64(3): 234-239
- [11] Nafarzadeh S1, Jafari S2, Bijani A3. Assessment of bax and bcl-2 immunoexpression in patients with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Mol Cell Med, 2013, 2(3): 136-142
- [12] Prakash P1, Khandare M2, Kumar M3, et al. Immunohistochemical Detection of p16 (INK4a) in Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. J Clin Diagn Res, 2013, 7(12): 2793-2795
- [13] Nair S1, Kotrashetti VS, Nayak R, et al. HSP70 induces TLR4 signaling in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study [J]. J Cancer Res Ther, 2013, 9(4): 624-629
- [14] 江方方,赵玮,胡逢春,等. 反义 miR-222 靶向上调 PUMA 基因表达促进口腔鳞状细胞癌凋亡 [J]. 中华口腔医学研究杂志 (电子版), 2013, 23(3): 23-27
- Jiang Fang-fang, Zhao Wei, Hu Ying-chun, et al. As-miR-222 transfection target PUMA to induce cell apoptosis in oral squamous cell carcinoma [J]. Chinese Journal of Stomatology, 2013, 23(3): 23-27
- [15] Hehlhans S, Lange I, Eke I, et al. Human head and neck squamous cell carcinoma cell lines are differentially radiosensitised by the honeybee product Propolis [J]. Int J Radiat Biol, 2011, 87(3): 243-253
- [16] Yu L, Chen MH, Gu CP, et al. Cisplatin induces drug resistance in human esophageal squamous carcinoma cell line EC109 by decreasing CTR1 protein expression [J]. Journal of Southern Medical University, 2011, 31(5): 801-804
- [17] Zeng GQ, Zhang PF, Li C, et al. Comparative proteome analysis of human lung squamous carcinoma using two different methods: two-dimensional gel electrophoresis and iTRAQ analysis [J]. Technol Cancer Res Treat, 2012, 11(4): 395-408
- [18] Chen P, Liu B, Hu M. The effect of hydroxycamptothecin and pingyangmycin on human squamous cell carcinoma of the tongue [J]. Oncol Lett, 2013, 5(3): 947-952
- [19] Bracker TU, Sommer A, Fichtner I, et al. Efficacy of MS-275, a selective inhibitor of class I histone deacetylases, in human colon cancer models [J]. Int J Oncol, 2009, 35(4): 909-920
- [20] Gojo I, Jiemjit A, Trepel JB, et al. Phase 1 and pharmacologic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in adults with refractory and relapsed acute leukemias [J]. Blood, 2007, 109(7): 2781-2790