论著

文章编号:1000-5404(2012)20-2086-04

硫链丝菌肽对人喉癌 Hep-2 细胞生长及 FoxM1 表达的影响

林 力[1],邓 碧[2],寿 铸[1],梁 佳[1],陈鸿雁[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科[1];401120 重庆,重庆市渝北区人民医院麻醉科[2])

[摘要] **目的** 研究硫链丝菌肽(thiostrepton,TST)对人喉癌 Hep-2 细胞株增殖能力及 FoxM1 表达的影响。**方法** 用 MTT 法测定 TST 作用于人喉癌 Hep-2 细胞 48 h 的增殖抑制率;通过流式细胞仪(FCM)检测不同浓度 TST 分别作用于 Hep-2 细胞 48 h 后对其细胞周期动力学的影响;采用免疫细胞化学法、RT-PCR 和 Western blot 检测 Hep-2 细胞中 FoxM1 mRNA 及蛋白表达,以及不同浓度 TST 作用于 Hep-2 细胞 48 h FoxM1 蛋白表达的变化。**结果** 不同浓度(1、2、4、8、12、16 μmol/L)TST 作用于 Hep-2 细胞 48 h 后的增殖抑制率分别为 5.27%、9.43%、20.25%、41.61%、67.96%、96.95%;浓度分别为 2、3 μmol/L 的 TST 作用于 Hep-2 细胞 48 h 后,均使 Hep-2 细胞停滞于 G_1/G_0 期($P<0.05$),且呈剂量依赖性($P<0.05$);同时将 TST 作用于 Hep-2 细胞 48 h 后,经免疫细胞化学法、RT-PCR 和 Western blot 均检测到 FoxM1 mRNA 及蛋白在 Hep-2 细胞中表达显著降低($P<0.05$)。**结论** TST 对人喉癌 Hep-2 细胞株具有明显的增殖抑制作用,其可能机制是与降低肿瘤细胞中 FoxM1 蛋白表达有关。

[关键词] 硫链丝菌肽;FoxM1;Hep-2 细胞;细胞增殖

[中图法分类号] R730.23;R739.65;R978.19 [文献标志码] A

Effect of thiostrepton on proliferation and FoxM1 expression in human laryngocarcinoma Hep-2 cell line

Lin Li[1], Deng Bi[2], Shou Zhu[1], Liang Jia[1], Chen Hongyan[1] ([1]Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Anesthesiology, Yubei People's Hospital, Chongqing, 401120, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of thiostrepton (TST) on proliferation of and FoxM1 expression in human laryngocarcinoma Hep-2 cell line. **Methods** Proliferation inhibition rate of TST for human laryngocarcinoma Hep-2 cell line was measured by MTT reduction assay 48 h after it was used. Effect of TST at different concentrations on cell cycle of human laryngocarcinoma Hep-2 cells was assayed by flow cytometry. Expression of FoxM1 mRNA and protein in human laryngocarcinoma Hep-2 cells and effect of TST at different concentrations were detected by immunocytochemistry, RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** The proliferation inhibition rate of TST at the concentrations of 1, 2, 4, 8, 12 and 16 μmol/L on proliferation of Hep-2 cells was 5.27%, 9.43%, 20.25%, 41.61%, 67.96% and 96.95%, respectively, in 48 h after treatment. TST at the concentrations of 2 μmol/L and 3 μmol/L arrested Hep-2 cells at the stage G_1/G_0 in a dose-dependent manner in 48 h after treatment ($P<0.05$). Immunocytochemistry, RT-PCR and Western blotting showed that the expression levels of FoxM1 mRNA and protein were significantly lower in Hep-2 cells in 48 h after TST treatment ($P<0.05$). **Conclusion** TST significantly inhibits the proliferation of human laryngocarcinoma Hep-2 cell line, which is possibly with the down-regulated FoxM1 protein expression in the cells.

[**Key words**] thiostrepton;forkhead box protein M1;Hep-2;proliferation

Corresponding author: Chen Hongyan, E-mail: cchhyy787@sohu.com

[通信作者] 陈鸿雁,E-mail:cchhyy787@sohu.com

FoxM1(forkhead box protein M1)是一种上调细胞增殖的转录因子,属叉头框家族(Fox家族),它与胚胎发育、细胞再生、衰老和肿瘤发生等许多病理、生理过程密切相关[1]。本研究小组前期工作中发现FoxM1在喉癌组织中高表达,与喉癌的分期及转移程度成正相关[2]。硫链丝菌肽(thiostrepton,TST)是一种噻唑类抗生素,在动物医学中已广泛使用[3]。最近有研究发现TST可通过靶向作用于FoxM1转录因子抑制人乳腺癌细胞增殖,并且对其他转录因子的转录活性无影响;此外,用TST处理不同来源的人肿瘤细胞株,可在下调FoxM1基因表达的同时诱导细胞凋亡[4]。因此,本研究从细胞角度检测FoxM1在喉癌Hep-2细胞株中的表达;同时检测TST对喉癌Hep-2细胞株增殖抑制的作用及可能机制,为喉癌分子靶向治疗提供一定的实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 肿瘤细胞系 人喉癌Hep-2细胞株(购自中科院上海细胞所)。

1.1.2 试剂与药品 RPMI1640(Gibco公司),新生小牛血清(杭州四季青公司),四甲基偶氮唑盐(MTT,上海华舜生物工程有限公司),二甲亚砜(DMSO,重庆医药股份有限公司),TST(德国Merck公司),免疫组化SABC试剂盒、DAB显色试剂盒、山羊抗兔二抗(北京中杉公司),兔抗人FoxM1多克隆抗体、兔抗人β-actin(Santa Cruz公司),RT-PCR试剂盒套装(TaKaRa公司),引物合成(Invitrogen公司),Western blot相关试剂套装(碧云天生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将Hep-2细胞接种到含10%热灭活小牛血清的RPMI1640培养液中,置37 ℃、5% CO_2饱和湿度孵箱内培养,细胞呈单层粘壁生长。传代时用0.1%胰酶-0.02% EDTA溶液消化,台盼蓝拒染法计算活细胞数。

1.2.2 TST对Hep-2细胞体外抑制实验 取对数生长期的Hep-2细胞,胰酶消化,离心,制成细胞悬液,调整细胞数为5×10^4/ml。取96孔培养板,每孔加入200 μl细胞悬液,加入TST,使其终浓度分别为1、2、4、8、12、16 μmol/L,每一浓度重复6孔,设未处理组作为对照,置37 ℃、5% CO_2饱和湿度孵箱内分别培养48 h。离心1 000 r/min×10 min,小心去除上清液,每孔加无血清培养液200 μl及5 mg/ml MTT 20 μl继续培养4 h。离心1 000 r/min×10 min,小心吸去上清液,每孔加200 μl DMSO,置于振荡器上振荡10 min,自动酶标读数仪上测出各孔光密度值[D(490)]。上述实验均重复3次,计算细胞生长抑制率。

1.2.3 TST对Hep-2细胞周期变化的影响 分别将浓度为2、3 μmol/L的TST处理细胞48 h后,实验设置未处理组作为对照,收集Hep-2细胞,PBS洗涤2次。1 000 r/min离心5 min,去上清液,缓慢加入-20 ℃预冷的75%乙醇,固定1 h。PBS洗涤2次,将等体积的细胞悬液和PI染液混合,4 ℃放置30 min。将样品放入流式细胞仪的样品室,以激发波长488 nm测定,并用Modfit LT 2.0软件分析细胞周期分布。

1.2.4 免疫细胞化学法测定不同浓度TST作用于Hep-2细胞48 h后FoxM1的蛋白表达 分别将终浓度为2、3 μmol/L的TST处理细胞48 h,同时设空白对照组和以PBS代替FoxM1一抗的未处理组。参照免疫组化SABC试剂盒中的说明书进行。

1.2.5 RT-PCR检测Hep-2细胞FoxM1 mRNA表达 将终浓度分别为2、3 μmol/L的TST作用Hep-2细胞48 h后,Trizol法获得各组细胞总RNA,逆转录反应采用ReverTra Dash™RT-PCR Kit,按说明书进行。FoxM1引物序列上游:5′-GAGCACTTGGAATCACAGCA-3′,下游:5′-CACCGGGAACTGGATAGGTA-3′,产物长度为150 bp;β-actin引物序列上游:5′-GGAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3′,下游:5′-TGGACCTGACCTGCCGTCTA-3′,产物长度为350 bp。PCR反应条件为94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,扩增40个循环;72 ℃ 5 min。反应产物在1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳,用Bio-Rad凝胶成像系统采集图片,实验重复3次。

1.2.6 Western blot检测Hep-2细胞FoxM1蛋白表达 将终浓度分别为2、3 μmol/L的TST作用Hep-2细胞48 h后,细胞裂解液提取胞浆蛋白,Bradford法测定含量后,取等质量的蛋白进行SDS-PAGE电泳分离,半干法转膜(220 mA 2 h)后封闭1 h,然后加入兔抗人FoxM1、内参β-actin一抗37 ℃振摇孵育。洗涤后加入辣根过氧化酶标记的羊抗兔二抗孵育2 h,TBST缓冲液洗涤膜3次,加入ECL化学发光试剂,曝光,成像。用Bio-Rad凝胶成像系统采集图片,用Quantity One分析软件测定各条带光密度值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,进行多组均数比较的单因素方差分析。

2 结果

2.1 MTT法检测TST对Hep-2细胞的生长抑制作用

通过MTT观察到,TST对Hep-2细胞生长抑制作用较为显著。经各浓度TST作用48 h后,Hep-2细胞的生长抑制率在5.27%~96.95%。由此计算出TST作用于Hep-2细胞48 h的IC_{50}为6.011 μmol/L。后续实验均选择浓度为2、3 μmol/L的TST药物处理Hep-2细胞。见表1。

2.2 TST对Hep-2细胞周期变化的影响

流式细胞仪检测TST处理48 h后Hep-2细胞周期的变化结果显示,经TST处理的2组细胞G_0/G_1期细胞百分率均高于未处理组($P<0.05$);经浓度为3 μmol/L TST处理的实验组G_0/G_1期百分率高于2 μmol/L($P<0.05$)。见表2。

表1 不同浓度TST作用48 h后对Hep-2细胞增殖抑制作用的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	D(490)	抑制率(%)
未处理组	0.721 ± 0.042	-
TST组		
1 μmol/L	0.683 ± 0.027	5.27
2 μmol/L	0.653 ± 0.018	9.43
4 μmol/L	0.575 ± 0.006	20.25
8 μmol/L	0.421 ± 0.013	41.61
12 μmol/L	0.231 ± 0.011	67.96
16 μmol/L	0.022 ± 0.029	96.95

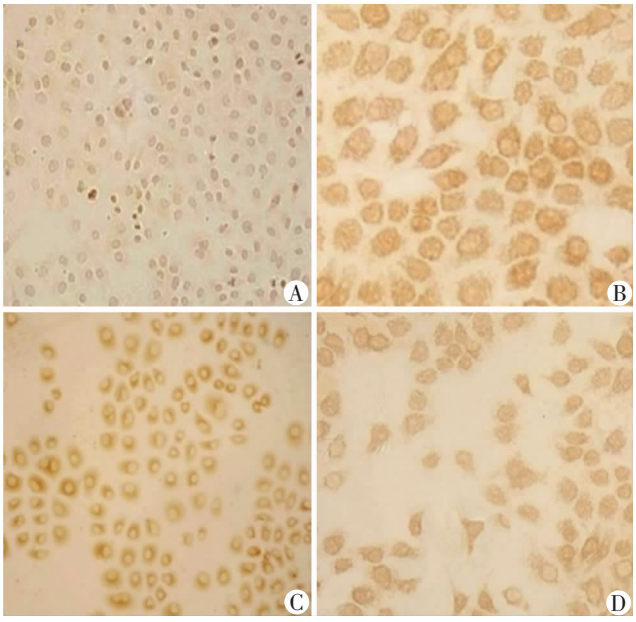
表2 不同浓度TST对Hep-2细胞周期变化的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
未处理组	52.98 ± 4.26	25.41 ± 1.17	21.61 ± 1.53
TST组			
2 μmol/L	69.79 ± 3.44[a]	18.64 ± 1.08[a]	11.57 ± 2.21[a]
3 μmol/L	73.26 ± 3.03[ab]	14.03 ± 1.07[ab]	12.71 ± 2.36[ab]

a:$P<0.05$,与未处理组比较;b:$P<0.05$,与TST 2 μmol/L组比较

2.3 免疫细胞化学法测定不同浓度TST作用于Hep-2细胞48 h FoxM1蛋白表达

FoxM1在空白对照组细胞质中表达明显,不同浓度TST作用于Hep-2细胞48 h FoxM1蛋白表达减少,并且TST浓度越大,FoxM1蛋白表达减少越明显。见图1。各浓度TST组的光密度值[2 μmol/L组:(0.207 ± 0.008),3 μmol/L组:(0.186 ± 0.006)]与未处理组(0.224 ± 0.008)比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

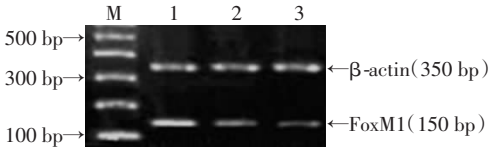


A:空白对照组;B:未处理组;C:TST 2 μmol/L组;D:TST 3 μmol/L组

图1 不同浓度TST作用于Hep-2细胞48 h FoxM1蛋白表达(SABC ×400)

2.4 RT-PCR检测不同浓度TST作用于Hep-2细胞48 h FoxM1 mRNA表达

作用48 h后细胞未处理组和各浓度TST组均可见明显的FoxM1 mRNA表达,在未经TST处理的细胞组上表达尤其明显。各浓度TST组FoxM1与内参光密度比值[2 μmol/L组:(0.882 ± 0.015),3 μmol/L组:(0.694 ± 0.022)]与未处理组(1.367 ± 0.017)比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图2。

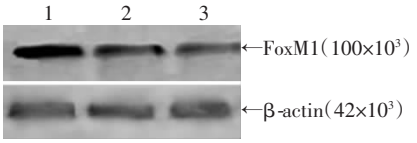


M:标准;1:未处理组;2:TST 2 μmol/L组;3:TST 3 μmol/L组

图2 不同浓度TST处理Hep-2细胞后FoxM1 mRNA的表达

2.5 Western blot检测不同浓度TST作用于Hep-2细胞48 h FoxM1蛋白表达

作用48 h后细胞未处理组和各浓度TST组均可见明显的FoxM1蛋白表达,在未经TST处理的细胞组上表达尤其明显。各浓度TST组FoxM1与内参光密度比值[2 μmol/L组:(1.432 ± 0.014),3 μmol/L组:(0.898 ± 0.026)]与未处理组(1.962 ± 0.016)比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图3。



1:未处理组;2:TST 2 μmol/L组;3:TST 3 μmol/L组

图3 TST处理Hep-2细胞后FoxM1蛋白的表达

3 讨论

喉癌是头颈部最为常见的恶性肿瘤,手术治疗给患者发声功能造成了不同程度的影响[5]。随着肿瘤发生、发展过程中新的肿瘤分子机制的不断阐明,靶向治疗是目前肿瘤治疗的研究热点。因而有必要探寻喉癌诊治的新靶点。

目前有研究发现,FoxM1在肝癌、基底细胞癌、乳腺癌、肺癌等肿瘤中有高表达,参与肿瘤的发生、发展[6-9]。这些研究充分表明了FoxM1基因在抗肿瘤中具有良好的应用前景。文献[9]报道发现TST可特异性抑制乳腺癌细胞中FoxM1的表达。但目前国内外尚少见TST与喉癌的相关报道。

本研究从细胞角度检测FoxM1在喉癌Hep-2细胞株中的表达,同时检测TST对喉癌Hep-2细胞株增殖抑制的作用及与FoxM1相关的可能机制,结果显示:①TST对Hep-2有明显的增殖抑制作用,并且随浓度的增加,增殖抑制作用增强,这与Nicolaou等[10]报道的TST对肺癌、乳腺癌等细胞株具有较强的增殖抑制作用相符。②TST作用后的Hep-2细胞中,G_0/G_1期细胞百分率增加,导致Hep-2细胞阻滞在G_0/G_1期,并

且呈剂量依赖性,这与 Kwok 等[4]报道的 TST 阻滞乳腺癌细胞株于 G_0/G_1 期相符。③通过免疫组化检测显示,FoxM1 在 Hep-2 细胞株的细胞质表达明显,细胞膜上表达少有。④通过免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 法检测不同浓度 TST 作用于 Hep-2 细胞 48 h 的 FoxM1 mRNA 及蛋白表达量发现:随 TST 浓度的增加,FoxM1 蛋白表达量的表达逐渐减少,由此我们推断,TST 对 Hep-2 细胞的增殖抑制作用是通过抑制 FoxM1 蛋白表达实现的。这与文献[11-12]报道相符。

综上所述,通过本实验可以推测 TST 对人喉癌 Hep-2 细胞株具有较好的体外增殖抑制作用,其机制是通过特异性抑制肿瘤细胞中 FoxM1 转录因子的蛋白表达实现的。本实验可为 FoxM1 基因成为喉癌治疗的新靶点及其特异性抑制剂 TST 的临床应用奠定一些实验室基础。

参考文献:

[1] Myatt S S, Lam E W. The emerging roles of forkhead box(Fox) proteins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(11): 847-859.
[2] Jiang L Z, Wang P, Deng B, *et al*. Overexpression of Forkhead Box M1 transcription factor and nuclear factor-κB in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis[J]. Hum Pathol, 2011, 42(8): 1185-1193.
[3] Adami G R, Ye H. Future roles for FoxM1 inhibitors in cancer treatments[J]. Future Oncol, 2007, 3(1): 1-3.
[4] Kwok J M, Myatt S S, Marson C M, *et al*. Thiostrepton selectively targets breast cancer cells through inhibition of forkhead box M1 expression[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7): 2022-2032.
[5] 邓碧, 叶琳, 王驰, 等. 5-氟尿嘧啶核苷前药脂质体对人喉癌 HEP-2 细胞株增殖与凋亡作用的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(17): 1679-1681.
[6] Carter S L, Eklund A C, Kohane I S, *et al*. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers[J]. Nat Genet, 2006, 38(9): 1043-1048.
[7] Yoshida Y, Wang I C, Yoder H M, *et al*. The forkhead box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2007, 132(4): 1420-1431.
[8] Liu P, Cheng H, Roberts T M, *et al*. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(8): 627-644.
[9] Penzo M, Massa P E, Olivotto E, *et al*. Sustained NF-kappaB activation produces a short-term cell proliferation block in conjunction with repressing effectors of cell cycle progression controlled by E2F or FoxM1[J]. J Cell Physiol, 2009, 218(1): 215-227.
[10] Nicolaou K C, Zak M, Rahimipour S, *et al*. Discovery of a biologically active thiostrepton fragment[J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(43): 15042-15044.
[11] Bhat U G, Halasi M, Gartel A L. FoxM1 is a general target for proteasome inhibitors[J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6593.
[12] Bhat U G, Halasi M, Gartel A L. Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells[J]. PLoS One, 2009, 4(5): e5592.

(收稿:2012-04-22;修回:2012-06-05)
(编辑 张 维)

“儿童难治性癫痫治疗的新策略及关键技术”重点号2012年第22期即将出版

专家述评

1 神经电刺激技术在癫痫治疗中的应用(杨 辉,第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心)
2 小儿难治性癫痫的研究进展(刘晓燕,北京大学第一医院儿科)

论著

1 皮质发育障碍所致儿童癫痫176例手术治疗的临床分析(刘仕勇,第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心)
2 颅内埋藏电极脑电图监测在难治性婴儿痉挛症外科中的应用(杨梅华,第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心)
3 改良大脑半球切除术治疗25例儿童半球病损致难治性癫痫的临床疗效分析(侯 智,第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心)
4 促肾上腺皮质激素治疗婴儿痉挛症的疗效分析(钟金花,廖建湘,深圳市儿童医院癫痫中心)

志谢

衷心感谢为学报重点号积极组稿和撰稿的第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心杨辉教授

本刊编辑部