

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000735

硫链丝菌肽抑制 FoxM1 表达后对鼻咽癌细胞凋亡的影响及机制探讨

于 超¹, 雷 刚¹, 梁 云¹, 陈鸿雁²

(1. 重庆市中医院耳鼻喉科, 重庆 400021 2. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨硫链丝菌肽(thiostrepton, TST)抑制鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)细胞 CNE-2 中叉头框 M1(forkhead box M1, FoxM1)表达后凋亡作用的增强及可能机制。**方法:**细胞培养传代后过夜培养,将细胞分为 3 组:对照组未加 TST、只加 0.1%二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的培养液,4 $\mu\text{mol/L}$ TST 组, 8 $\mu\text{mol/L}$ TST 组,培养 48 h 后,进行不同的实验手段观察处理。显微镜下观察 TST 作用 CNE-2 后细胞形态学改变;Hoechst33342 染色后显微镜下计数凋亡细胞个数,检测 TST 对 CNE-2 细胞凋亡的影响;流式细胞术检测 TST 作用 CNE-2 细胞后,细胞凋亡率的变化;Western blot 检测 TST 作用 CNE-2 后细胞中 FoxM1 及凋亡相关蛋白的表达变化。**结果:**TST 作用 CNE-2 细胞后细胞形态逐渐向凋亡发展,呈剂量依赖性;Hoechst33342 染色检测凋亡结果显示各组凋亡细胞数为:对照组(0.1% DMSO),4 $\mu\text{mol/L}$ TST 组和 8 $\mu\text{mol/L}$ TST 组细胞凋亡数目分别为:0.60 $\pm$ 0.55, 3.60 $\pm$ 0.89, 7.00 $\pm$ 1.58, TST 对 CNE-2 细胞凋亡的影响呈剂量依赖性增加,对照组与 TST 组比较差别有统计学意义($F=42.72, P<0.01$);流式细胞术检测凋亡结果显示:对照组(0.1% DMSO)(1.87 $\pm$ 0.74)%;4 $\mu\text{mol/L}$ TST 组(10.55 $\pm$ 0.75)%;8 $\mu\text{mol/L}$ TST 组(19.35 $\pm$ 2.49)%,随着 TST 浓度增加,CNE-2 细胞凋亡率增加,对照组与 TST 组比较差别有统计学意义($F=94.50, P<0.01$);Western blot 检测发现 TST 作用 CNE-2 后细胞中 FoxM1 蛋白表达下降,凋亡相关蛋白表达发生变化。**结论:**硫链丝菌肽在体外可以有效降低 NPC CNE-2 细胞中 FoxM1 表达,并抑制 NPC CNE-2 细胞生长,诱导其凋亡。

【关键词】鼻咽肿瘤;叉头框 M1;硫链丝菌肽;细胞凋亡**【中图分类号】**R766.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2015-01-28

Effect of thiostrepton on the apoptosis of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cell line

Yu Chao¹, Lei Gang¹, Liang Yun¹, Chen Hongyan²

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital;

2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of thiostrepton(TST) on the apoptosis of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cell line. **Methods:** CNE-2 cells were delivered into a control group and a group treated with 4 $\mu\text{mol/L}$ or 8 $\mu\text{mol/L}$ of TST for 48 h. Then CNE-2 cell morphology was observed by inverted phase contrast microscope. The apoptosis rate was analyzed by Hoechst33342 and flow cytometry. Expressions of FoxM1 protein and apoptosis protein were detected by Western blot. **Results:** CNE-2 cells underwent dramatic changes in morphology after being treated with different concentrations of TST. Hoechst33342 assay showed that exposure to TST resulted in dose-dependent increase of CNE-2 cell apoptosis. Apoptosis cell numbers of control group, 4 $\mu\text{mol/L}$ TST group, 8 $\mu\text{mol/L}$ TST group were 0.60 $\pm$ 0.55, 3.60 $\pm$ 0.89, 7.00 $\pm$ 1.58. Flow cytometry assay indicated that the apoptosis rate was increased with the increase of TST concentration; apoptosis percentages of control group, 4 $\mu\text{mol/L}$ TST group, 8 $\mu\text{mol/L}$ TST group were (1.87 $\pm$ 0.74)%, (10.55 $\pm$ 0.75)%, (19.35 $\pm$ 2.49)%. Western blot showed that the expression levels of FoxM1 protein and apoptosis associated proteins

decreased with the increase of TST concentration. **Conclusion:** TST can effectively inhibit CNE-2 cell proliferation and induce apoptosis in nasopharyngeal carcinoma.**【Key words】**nasopharyngeal carcinoma; forkhead box M1; thiostrepton; cell apoptosis

作者介绍: 于 超, Email: 1024064843@qq.com,

研究方向: 头颈肿瘤。

基金项目: 国家临床重点专科建设经费资助项目(编号: 卫办医政函[2012]649 号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150805.1542.008.html>
(2015-08-05)

叉头框 M1 (forkhead box M1, FoxM1) 是 Fox 转录因子家族的一员, 曾也被命名为 HFH-11, MPP2, Win 和 Trident 等, 参与细胞的增殖、凋亡以及人体多种器官的发育形成^[1]。目前的研究显示: FoxM1 能够与多种分子信号传导通路产生交叉作用, 在肿瘤的发生、发展中扮演重要的角色^[2]。本研究小组前期研究发现 FoxM1 在鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 组织较正常鼻咽部组织呈现高表达状态, 显示此基因与 NPC 的发生发展有密切关系^[3]。

硫链丝菌肽 (thiostrepton, TST) 是一种自链霉菌提取出的天然的噻唑类抗生素, 具有广谱的抗革兰氏阴性和阳性细菌作用, 在动物医学中常常用来治疗乳腺炎。2008 年首次作为 FoxM1 抑制剂及蛋白酶体抑制剂在乳腺癌中进行研究, 因此受到大家关注^[4]。近几年, 发现 TST 在体内体外实验中均具有明显的抗肿瘤作用, 通过靶向作用 FoxM1 蛋白及蛋白酶体而诱导卵巢癌、肺癌等多种肿瘤细胞的凋亡发生或者凋亡作用增强^[5-7], 作为一种抗肿瘤的新药受到研究中的广泛关注。本研究从细胞水平研究 NPC 细胞中 TST 抑制 FoxM1 表达后, 凋亡的发生情况及可能机制, 为 NPC 分子靶向治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与细胞株

人 NPC 细胞株 CNE-2 (购自中科院细胞所), RPMI1640 和胎牛血清 (美国 Gibco 公司), TST (德国 Merck), Hoechst 33342 (碧云天), 山羊抗兔二抗 (北京中杉公司), FoxM1 抗体 (多克隆, Santa Cruz); caspase-3 抗体, caspase-9 抗体, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9, Cytochrome c (多克隆, Immunoway, USA); GAPDH 抗体 (多克隆, Santa Cruz), Western blot 相关试剂套装 (碧云天生物技术公司), FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒 (北京宝赛生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养

将 CNE-2 细胞接种到含 10% 热灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 置 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度孵箱内培养, 细胞呈单层贴壁生长, 细胞长至 70%~80% 传代, 传代时用 0.25% 胰酶消化, 按 1:3 比例传代, 2~3 d 传代 1 次。

1.3 药物配制

用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解 TST 粉末, 稀释成 100 mmol/L 的储存液, -20 °C 避光保存, 使用时用 RPMI1640 稀释成工作液, 阴性对照组使用含 0.1% DMSO 的

培养液。

1.4 Hoechst33342 染色检测 TST 对 CNE-2 细胞凋亡的影响

取对数生长时期的 CNE-2 细胞, 按每孔 1×10^6 个细胞数接种于 6 孔板中, 过夜培养贴壁后, 分为 3 组, 分别加入终浓度为 4、8 $\mu\text{mol/L}$ 含 TST 的培养基和对照组为加 0.1% DMSO 的培养液, 置 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度孵箱内培养 48 h 后, PBS 洗涤 2 次, 加入 1 ml 4% 的甲醛溶液于 -20 °C 固定 20 min, 取出后 PBS 洗涤 3 次, 晾干后, 加入 Hoechst33342 染液 1 ml, 室温避光染色 10 min, PBS 洗涤 3 遍, 避光晾干, 以紫外光 340 nm 波长激发, 荧光显微镜下观察细胞形态, 并随机拍照。实验时每个浓度重复 3 个孔, 实验重复 3 次, 将 3 次结果计算平均值纳入最终结果进行统计分析。

1.5 流式细胞仪检测 TST 对 CNE-2 细胞凋亡的影响

细胞凋亡培养条件与 Hoechst33342 染色细胞培养相同, 每个浓度重复 3 个孔, 分组同前面实验, 3 组分别为: TST 终浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$, 8 $\mu\text{mol/L}$ 和对照组未加 TST, 只加 0.1% DMSO 的培养液, 置 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度孵箱内培养 48 h 后, 胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤细胞 2 遍, 按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书对细胞进行染色, 避光 5 min, 上机检测, 实验重复 3 次。

1.6 Western blot 检测 TST 作用 CNE-2 细胞后 FoxM1 及凋亡相关蛋白表达

细胞培养传代后过夜开始贴壁生长后, 分为 3 组: 对照组未加 TST, 只加 0.1% DMSO 的培养液, 4 $\mu\text{mol/L}$ TST 组、8 $\mu\text{mol/L}$ TST 组, 细胞培养 48 h 后, PBS 洗涤 2 遍, 细胞刮刮取细胞收集细胞于 EP 管中后, 蛋白裂解液 4 °C 冰浴裂解 30 min 后, 每 5 min 吹打 1 次, 得到的裂解液于 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液测定蛋白质浓度, 调整各组蛋白浓度一致后进行 SDS-PAGE, 电泳后, 经过 100 V 电转 1 h 至硝酸纤维素膜, 将膜以 1% BSA 室温封闭 1 h, 一抗 (体积比 1:500 稀释) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 二抗 (体积比 1:5 000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 2 次, 最后 PVDF 膜用增强型化学发光剂 (ECL) 溶液浸润, 显影观察。实验重复 3 次, 得出稳定的实验结果。

1.7 统计学方法

计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件, 采用单因素方差分析及析因设计方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

细胞培养 48 h 后在倒置显微镜下观察, 未处理对照组细胞形态呈多边形, 细胞间连接紧密, 细胞密度较大, 极少见悬

浮的死细胞及细胞碎片,细胞胞浆透明,折光性好。TST 作用于 CNE-2 细胞 48 h 后,低浓度组见细胞边界收缩,变圆,一部分细胞生长受到抑制,细胞数量减少;高浓度组见细胞呈圆形,边界模糊不清,细胞内胞浆减少,许多细胞脱落呈悬浮状,可见细胞碎片,存活的细胞数明显减少(图 1)。

2.2 Hoechst33342 染色结果

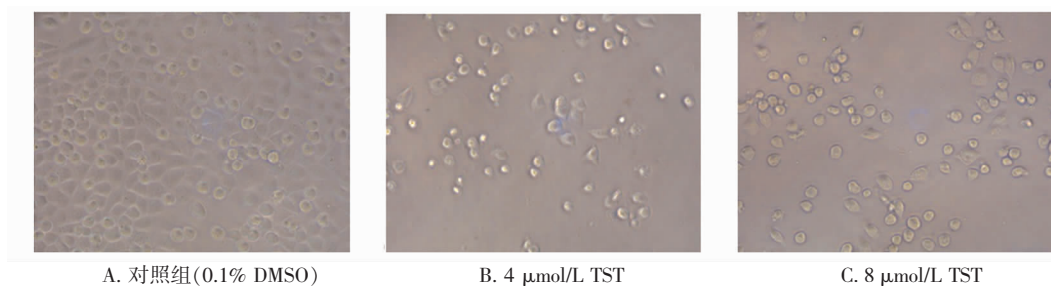
Hoechst33342 染色后可见,对照组细胞核大,核内的荧光染色浅,呈淡蓝色,且亮度均一,不同浓度的 TST 作用细胞后,可见细胞核内出现凋亡表现,细胞核固缩,核内的部分染色质断裂、皱缩,出现多个蓝色团块。采用在高倍镜下每组随机选取 5 个视野,计数发生凋亡的细胞数目,对照组(0.1% DMSO),4 $\mu\text{mol/L}$ TST 组和 8 $\mu\text{mol/L}$ TST 组细胞凋亡数目分别为:0.60 $\pm$ 0.55,3.60 $\pm$ 0.89,7.00 $\pm$ 1.58,差别有统计学意义($F=42.72, P=0.003$)(图 2)。

2.3 流式细胞仪检测凋亡结果

流式细胞仪检测结果如图 3 所示,从图中可以看出,作用 48 h 后,4 $\mu\text{mol/L}$ 组和 8 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率与对照组相比均有明显变化,凋亡率分别为:对照组(0.1% DMSO) (1.87 $\pm$ 0.74)%;4 $\mu\text{mol/L}$ TST 组(10.55 $\pm$ 0.75)%;8 $\mu\text{mol/L}$ TST 组(19.35 $\pm$ 2.49)%,差异有统计学意义($F=94.50, P=0.002$)(图 3)。

2.4 TST 抑制 CNE-2 细胞中 FoxM1 表达后, FoxM1 蛋白及凋亡相关蛋白表达变化

Western blot 结果(图 4)显示:经过 TST 作用细胞株 48 h 后,与对照组(0.1% DMSO)相比,随着药物浓度的增加,4 $\mu\text{mol/L}$ TST 组和 8 $\mu\text{mol/L}$ TST 组 FoxM1 蛋白表达逐渐下降, Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达亦均下降。蛋白 Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9 和 Cytochrome c 蛋白表达增加。

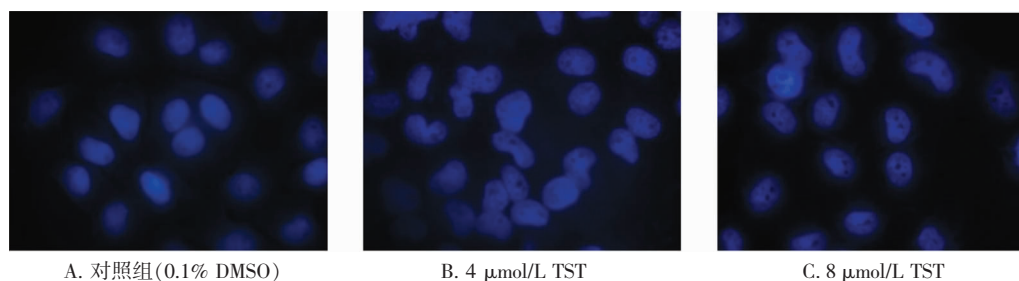


A. 对照组(0.1% DMSO)

B. 4 $\mu\text{mol/L}$ TSTC. 8 $\mu\text{mol/L}$ TST

图 1 不同浓度 TST 作用 CNE-2 细胞 48 h 后的细胞形态学改变

Fig.1 Changing of CNE-2 cell morphology treated with different concentrations of TST for 48 h

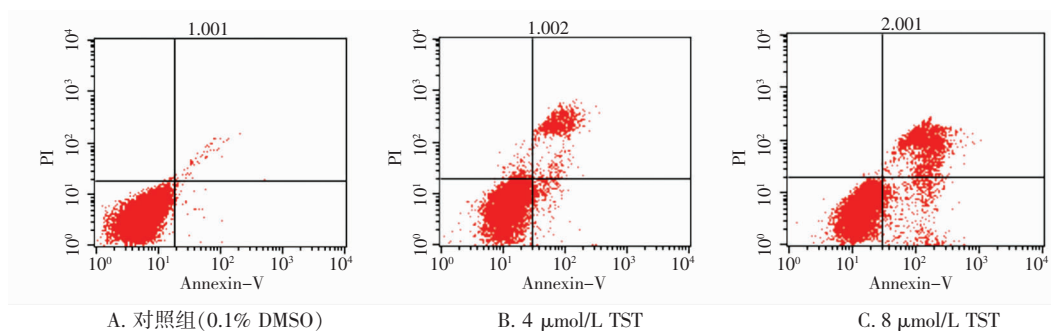


A. 对照组(0.1% DMSO)

B. 4 $\mu\text{mol/L}$ TSTC. 8 $\mu\text{mol/L}$ TST

图 2 不同浓度 TST 作用 CNE-2 细胞 48 h 后 Hoechst33342 染色结果

Fig.2 Changing of Hoechst33342 assay in CNE-2 cell treated with different concentrations of TST for 48 h



A. 对照组(0.1% DMSO)

B. 4 $\mu\text{mol/L}$ TSTC. 8 $\mu\text{mol/L}$ TST

图 3 不同浓度 TST 作用 CNE-2 细胞 48 h 后流式细胞仪检测凋亡结果

Fig.3 Flow cytometry assay results of CNE-2 cell treated with different concentrations of TST for 48 h

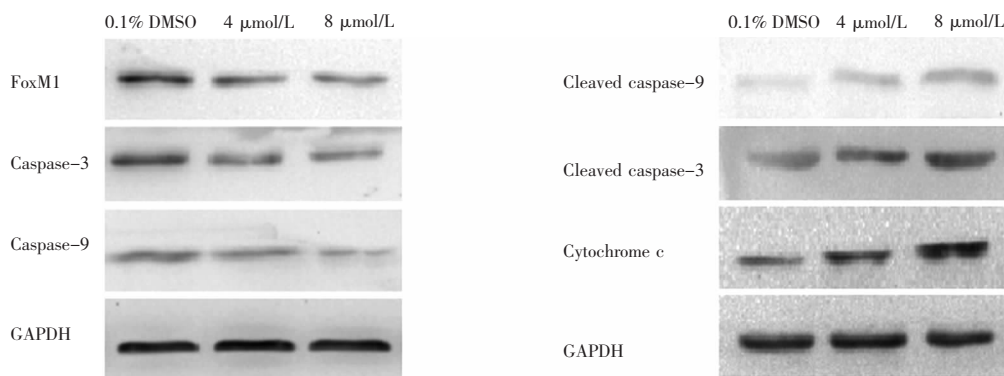


图 4 不同浓度 TST 作用 CNE-2 细胞 48 h 后 Western blot 结果

Fig.4 Western blot results of CNE-2 cell treated with different concentrations of TST for 48 h

3 讨 论

NPC是我国及东南亚地区常见的头颈部恶性肿瘤病变之一,其发生发展是多因素共同作用的结果。NPC 具有生长快速,高度恶性,容易在病变早期即可发生转移等特点;治疗后局部复发或者发生远处转移是此病最常见的治疗失败原因。分子靶向治疗是目前肿瘤治疗领域的研究热点,因而有必要探寻 NPC 诊治的新靶点。

FoxM1 参与细胞的增殖,凋亡以及人体多种器官的发育形成过程,维持着细胞增殖与细胞凋亡之间的动态平衡,所以当 FoxM1 的表达水平发生改变则意味着和癌变的发生有关^[2]。近来研究发现,FoxM1 在肝癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌^[8]等肿瘤中呈高表达状态,并参与这些肿瘤的发生发展过程。目前,FoxM1 诱导肿瘤生长的分子机制并未完全阐明。然而,据报道多种致癌途径的发生以及信号传导通路都与 FoxM1 有关联,例如:调节细胞增殖、分化、凋亡以及应激反应的 NF- κ B 信号传导通路,在 NF- κ B 信号传导的过程中,FoxM1 通过抑制 NF- κ B 的表达进而消除对靶基因的抑制作用^[9];抑癌基因 p53 的表达需要在 FoxM1 的表达被下调后方可发生^[10],而诱导 FoxM1 的高表达后能明显地抑制细胞衰老的发生以及 P21cip1 基因的表达^[11]。

目前,常规临床使用的化学治疗药物在治疗肿瘤时毒副作用很大,患者常难以耐受。因此有必要寻找新的毒副作用较小的药物来用于肿瘤的治疗。从青链霉菌中分离得到的 TST 已经被证实可以抑

制多种癌细胞的增殖,但相关的发生作用的分子机制还不清楚^[5]。在对乳腺癌的研究中报导,TST 除了能通过靶向抑制 FoxM1 蛋白表达从而抑制乳腺癌细胞的增殖之外^[4],还发现它能使对顺铂耐药的乳腺癌细胞重新对顺铂产生敏感作用^[12];TST 与蛋白酶抑制剂 Bortezomib 同时作用乳腺癌细胞时,能产生明显的协同作用^[13]。在对 B 细胞淋巴瘤的作用研究中发现,TST 能通过靶向抑制 FoxM1 表达从而诱导 B 细胞淋巴瘤细胞的凋亡发生,同时降低肿瘤细胞的转移能力^[14]。在对其它肿瘤的研究中还发现,TST 对恶性黑色素瘤细胞有明显的抵抗肿瘤生长的作用,而对良性的黑色素细胞的抑制作用不明显^[15];在间皮瘤研究中发现,TST 能通过靶向作用 Peroxiredoxin 3 诱导肿瘤细胞发生凋亡^[16]。

本研究通过研究 TST 不同浓度作用于 NPC CNE-2 细胞后,形态学观察实验显示,TST 能抑制 CNE-2 细胞的生长,促进 CNE-2 细胞凋亡的发生。Hoechst33342 染色结果及流式细胞术检测凋亡结果同时显示 TST 能诱导 CNE-2 细胞发生凋亡,其诱导凋亡的机制何在?本研究通过 western blot 检测不同浓度 TST 作用 NPC CNE-2 细胞后凋亡相关蛋白 Caspase-3, Caspase-9, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9, Cytochrome c 的变化情况显示,TST 抑制 FoxM1 表达后, Caspase-3, Caspase-9 蛋白表达下降, Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9, Cytochrome c 表达增加,表明其凋亡发生与线粒体通路关系密切。线粒体通路是细胞凋亡的一条重要途径,当各种损伤因子致使线粒体的正常结构受到破坏,线粒体出现肿胀、变形、嵴弯曲和膜破裂,线粒体中的基

质外流导致某些凋亡蛋白释放,比如 Cytochrome c, 进而激活下游的凋亡调控蛋白 Caspase-9 及 Caspase-3,使其活化为 Cleaved caspase-9 及 Cleaved caspase-3,最终引起 Caspase 级联反应,细胞凋亡发生。本次实验研究表明在 NPC CNE-2 细胞中 TST 通过特异性的抑制 FoxM1 表达后,通过线粒体相关途径抑制 NPC 细胞增殖,促进其凋亡发生。从而为临床 NPC 的治疗提供新思路,FoxM1 极有希望成为一个新的抗癌靶点^[8]。

参 考 文 献

- [1] Laoukili J, Stahl M, Medema RH. FoxM1: At the crossroads of ageing and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775(1): 92-102.
- [2] Wang Z, Ahmad A, Li Y, et al. Forkhead box M1 transcription factor: a novel target for cancer therapy[J]. *Cancer Treat Rev*, 2010, 36(2): 151-156.
- [3] 江黎珠, 王 鹏, 陈鸿雁. FoxM1 和 COX2 在鼻咽癌组织中的表达及临床意义[J]. *第二军医大学学报*, 2013, 34(6): 645-649.
- [4] Kwok JM, Myatt SS, Marson CM, et al. Thioistrepton selectively targets breast cancer cells through inhibition of forkhead box M1 expression[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2008, 7(7): 2022-2032.
- [5] Bhat UG, Halasi M, Gartel AL. Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5592.
- [6] Chan D W, Hui W W, Cai P C, et al. Targeting GRB7/ERK/ FOXM1 signaling pathway impairs aggressiveness of ovarian cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52578.
- [7] Wang Y, Wen L, Zhao S H, et al. FoxM1 expression is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and poor prognosis in advanced non-small cell lung cancer patients[J]. *Lung Cancer*, 2013, 79(2): 173-179.
- [8] Halasi M, Gartel AL. Targeting FOXM1 in cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(5): 644-652.
- [9] Penzo M, Massa P E, Olivetto E, et al. Sustained NF- κ B 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] Tan Y, Raychaudhuri P, Costa R H. Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(3): 1007-1016.
- [11] Li S K, Smith D K, Leung W Y, et al. FoxM1c counteracts oxidative stress-induced senescence and stimulates Bmi-1 expression[J]. *Biol Chem*, 2008, 283(24): 16545-16553.
- [12] Kwok JM, Peck B, Monteiro J, et al. FOXM1 confers acquired cisplatin resistance in breast cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(1): 24-34.
- [13] Wang M, Gartel AL. Combination with bortezomib enhances the antitumor effects of nanoparticle-encapsulated thioistrepton[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(3): 184-189.
- [14] Uddin S, Hussain AR, Ahmed M, et al. Overexpression of FoxM1 offers a promising therapeutic target in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Haematologica*, 2012, 97(7): 1092-1100.
- [15] Qiao S, Lamore SD, Cabello CM, et al. Thioistrepton is an inducer of oxidative and proteotoxic stress that impairs viability of human melanoma cells but not primary melanocytes[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(9): 1229-1240.
- [16] Newick K, Cunniff B, Preston K, et al. Peroxiredoxin3 is a redox-dependent target of thioistrepton in malignant mesothelioma cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39404.

(责任编辑: 关蕴良)

《重庆医科大学学报》

在线投稿网址: cyxb.alljournals.ac.cn