

· 基础研究 ·

硫链丝菌肽对人鼻咽癌 HNE-1 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△}

(1. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科 400016; 2. 重庆市渝北区人民医院麻醉科 401120)

摘要:目的 研究硫链丝菌肽(TST)对人鼻咽癌 HNE-1 细胞株增殖能力及 Forkhead box protein M1(Foxm1)表达的影响。方法 以 MTT 法分别测定不同浓度(1、2、4、8、12、16 $\mu\text{mol/L}$)TST 作用于人鼻咽癌 HNE-1 细胞 48 h 的增殖抑制率;通过流式细胞仪(FCM)检测不同浓度(1、2 $\mu\text{mol/L}$)TST 分别作用于 HNE-1 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和 Western blot 检测 HNE-1 细胞中 Foxm1 蛋白表达以及不同浓度 TST 作用于 HNE-1 细胞 48 h Foxm1 蛋白表达的变化。结果 不同浓度(1、2、4、8、12、16 $\mu\text{mol/L}$)TST 作用于 HNE-1 细胞 48 h 后的增殖抑制率分别为 8.31%、17.46%、34.28%、58.68%、87.91%、99.05%;浓度分别为 1、2 $\mu\text{mol/L}$ 的 TST 作用于 HNE-1 细胞 48 h 后,均使 HNE-1 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 HNE-1 细胞 48 h 后,经免疫细胞化学法和 Western blot 均检测到 Foxm1 蛋白在 HNE-1 细胞胞质中表达显著降低($P < 0.05$)。结论 TST 对人鼻咽癌 HNE-1 细胞株具有明显的增殖抑制作用,可能与降低肿瘤细胞中 Foxm1 蛋白表达有关。

关键词:硫链丝菌肽;Foxm1;HNE-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.31.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)31-3283-03

Effect of thioestrepton on proliferation and Foxm1 expression in HNE-1 cell lines

Lin Li¹, Deng Bi², Shou Zhu¹, Liang Jia¹, Chen Hongyan^{1△}

(1. Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Anesthesiology, People's Hospital of Yubei District, Chongqing 401120, China)

Abstract: Objective To explore the effect of thioestrepton(TST) on proliferation and Forkhead box protein M1(Foxm1) expression in HNE-1 cell lines. **Methods** MTT reduction assay was used to investigate the proliferation inhibition of different concentrations of TST(1,2,4,8,12,16 $\mu\text{mol/L}$) on HNE-1 cell lines after 48 h. The change of HNE-1's cell cycle after using different concentrations of TST(1,2 $\mu\text{mol/L}$) were analyzed by flow cytometry after 48 h; Immunocytochemistry and Western blot were used to investigate the Foxm1 expression in HNE-1 cell and its changes after using different concentrations of TST. **Results** The proliferation inhibition rates of TST on the HNE-1 cell after 48 h in each concentration group(1,2,4,8,12,16 $\mu\text{mol/L}$) were 8.31%, 17.46%, 34.28%, 58.68%, 87.91%, 99.05%; HNE-1 cell were kept at stage G_1/G_0 in 1 $\mu\text{mol/L}$ and 2 $\mu\text{mol/L}$ group($P < 0.05$), which was dose-dependent($P < 0.05$); Foxm1 protein decreased significantly in HNE-1 cell with TST in 48 h by immunocytochemistry and Western blot test($P < 0.05$). **Conclusion** TST inhibits the proliferation and Foxm1 expression in HNE-1 cell lines, and the reason may be that the TST could decrease the Foxm1 expression in tumor cells.

Key words: thioestrepton; Foxm1; HNE-1

硫链丝菌肽(thioestrepton, TST)是一种噻唑类抗生素,可从多株青链霉菌中分离获得^[1]。最近,有研究发现 TST 可通过靶向作用于 Forkhead box protein M1(Foxm1)转录因子抑制肿瘤细胞增殖,并且对其他转录因子的转录活性无影响;此外,用此类抗生素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^[2]。

Foxm1 是一种上调细胞增殖的转录因子,属叉头框家族(Fox 家族)。有研究表明,它与胚胎发育、再生、衰老和肿瘤发生等许多生理过程密切相关^[3]。本研究前期工作中发现 Foxm1 在鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)组织中高表达,与 NPC 的分期及转移程度呈正相关。因此,本研究从细胞角度检测 Foxm1 在鼻咽癌 HNE-1 细胞株中的表达;同时检测 TST 对鼻咽癌 HNE-1 细胞株增殖抑制的作用及可能机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 肿瘤细胞系 人鼻咽癌 HNE-1 细胞株(购自中科院上

海细胞所)。

1.1.2 试剂与药品 RPIM1640(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(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(Santa Cruz 公司),Western blot 相关试剂(碧云天生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 HNE-1 细胞接种到含 10% 热灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液中,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度孵箱内培养,细胞呈单层黏贴生长。传代时用 0.1% 胰酶-0.02% EDTA 溶液消化,台盼蓝拒染法计算成活细胞数。

1.2.2 TST 对 HNE-1 细胞体外抑制实验 取对数生长期的 HNE-1 细胞,胰酶消化,离心,制成细胞悬液,调整细胞数为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 。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 $\mu\text{mol/L}$,每一浓度

△ 通讯作者, Tel:13101293395; E-mail: cchyy787@sohu.com。

重复 6 孔, 设试剂对照组及细胞对照组, 置 37 °C、5%CO₂ 孵箱内培养 48 h。离心后, 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, 吸去上清液, 每孔加 200 μL DMSO, 置于振荡器上振荡 10 min, 自动酶标仪上测出各孔吸光度值[D(490)], 检测波长为 490 nm。上述实验均重复 3 次, 计算细胞生长抑制率。

1.2.3 TST 对 HNE-1 细胞周期变化的影响 分别将浓度为 1、2 μmol/L 的 TST 处理细胞 48 h 后, 实验设置对照组, 收集 HNE-1 细胞, PBS 洗涤 2 次。离心, 去上清液, 缓慢加入 -20 °C 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 °C 放置 30 min。将样品放入流式细胞仪 (FCM) 的样品室, 以激发波长 488 nm 测定, 并用 Modfit LT2.0 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 HNE-1 细胞 48 h 后 Foxml 的蛋白表达 分别将终浓度为 1、2 μmol/L 的 TST 处理细胞 48 h, 同时设细胞对照组和以 PBS 代替 Foxml 一抗的阴性对照组。参照免疫组化 SABC 试剂盒说明书进行。

1.2.5 Western blot 检测细胞 Foxml 蛋白表达 将终浓度分别为 1、2 μmol/L 的 TST 作用 HNE-1 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, 转膜 (220 mA 2 h) 后封闭 1 h, 加入兔抗人 Foxml、β-actin 一抗 37 °C 孵育。洗涤后加入羊抗兔二抗孵育 2 h, TBST 液洗涤膜 3 次, 加入 ECL 化学发光试剂, 曝光, 成像。用 Quantity one 分析软件测定各条带光密度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行多组均数比较的单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法检测 TST 对 HNE-1 细胞的生长抑制作用 通过 MTT 观察到, TST 对 HNE-1 细胞生长抑制作用明显。经各浓度 TST 作用 48 h 后, HNE-1 细胞的生长抑制率分别在 8.31%、17.46%、34.28%、58.68%、87.91%、99.05% (表 1)。由此计算出 TST 作用于 HNE-1 细胞 48 h 的 IC₅₀ 为 4.015 μmol/L。根据本结果, 本文后续实验均选择浓度为 1、2 μmol/L 的 TST 药物作用于 HNE-1 细胞。

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

组别	OD490	抑制率 (%)
对照组	0.951 ± 0.071	0.00
TST 1 μmol/L 组	0.872 ± 0.052	8.31
TST 2 μmol/L 组	0.785 ± 0.018	17.46
TST 4 μmol/L 组	0.625 ± 0.026	34.28
TST 8 μmol/L 组	0.393 ± 0.017	58.68
TST 12 μmol/L 组	0.115 ± 0.011	87.91
TST 16 μmol/L 组	0.009 ± 0.034	99.05

2.2 TST 对 HNE-1 细胞周期变化的影响 用 FCM 检测 TST 作用于 HNE-1 细胞 48 h 细胞周期的变化显示, 经 TST 处理的两组细胞的 G₀/G₁ 期细胞百分率 (68.49 ± 3.16%)、(72.31 ± 2.43)% 均高于对照组 (53.91 ± 5.13)%, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果还显示 2 μmol/L TST 组 G₀/G₁ 期百分率高于 1 μmol/L TST 组 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 免疫细胞化学法测定不同浓度 TST 作用于 HNE-1 细胞

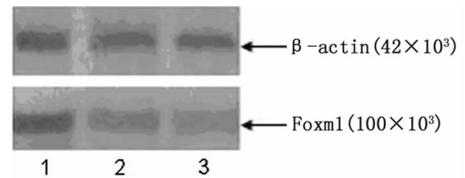
48 h 的 Foxml 蛋白表达量 Foxml 在对照组细胞质内表达明显, 不同浓度 TST 作用于 HNE-1 细胞 48 h 的 Foxml 蛋白表达减少, 并且 TST 浓度越大, Foxml 蛋白表达减少越明显。利用分析测量图像软件 Imagepro-Plus5.0 进行半定量分析, 各浓度 TST 组的平均光密度值 (TST 1 μmol/L 组: 0.207 ± 0.008, TST 2 μmol/L 组: 0.186 ± 0.006) 与对照组 (0.224 ± 0.008) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见封 3 图 1。

表 2 TST 对 HNE1 细胞周期变化的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	G ₀ ~G ₁	S	G ₂ /M
对照组	53.01 ± 5.13	26.66 ± 1.04	20.33 ± 1.03
TST 1 μmol/L 组	68.49 ± 3.16 ^a	18.33 ± 1.13 ^a	13.18 ± 2.31 ^a
TST 2 μmol/L 组	72.31 ± 2.43 ^{ab}	14.18 ± 1.21 ^{ab}	13.51 ± 2.52 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与空白对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 TST 1 μmol/L 组比较。

2.4 Western blot 检测不同浓度 TST 作用于 HNE-1 细胞 48 h 的 Foxml 蛋白表达 作用 48 h 后对照组和各浓度 TST 组均可见明显的 Foxml 蛋白表达, 在经 TST 处理的细胞上表达尤其明显。将各浓度 TST 组 Foxml/内参灰度比值 (TST 1 μmol/L 组: 0.831 ± 0.014, TST 2 μmol/L 组: 0.758 ± 0.026), 与对照组 (0.962 ± 0.016) 进行比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



1: 对照组; 2: TST 1 μmol/L 组; 3: TST 2 μmol/L 组。

图 2 Western blot 检测不同浓度 TST 作用于 HNE-1 细胞 48 h 的 Foxml 蛋白表达

3 讨 论

鼻咽癌是中国南方常见的头颈部恶性肿瘤之一, 化疗是目前晚期鼻咽癌的主要治疗方案之一, 但由于化疗药物毒副作用大, 临床应用受到限制^[4]。肿瘤的发生、发展是一个多因素协同作用的过程, 包括病毒感染、致癌物作用、癌基因激活和抑癌基因失活、细胞凋亡和增殖调节失调等多个因素多个环节^[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, 全新的肿瘤治疗策略应运而生。其中靶向治疗是目前肿瘤治疗的研究热点^[6]。

Foxml 基因是一种增殖特异性基因, 与胚胎发育、衰老、再生和肿瘤等许多病理、生理过程关系密切^[7]。目前, 有研究发现, Foxml 在肝癌、基底细胞癌、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤中高表达, 参与肿瘤的发生、发展^[8-12]。Foxml 有望成为一种潜在的全新肿瘤治疗靶点。另有报道, TST 可特异性抑制乳腺癌细胞中 Foxml, 而达到抑制肿瘤生长的作用^[7]。

作者的前期研究发现, Foxml 在人鼻咽癌组织中高表达, 并与鼻咽癌的分期及转移程度呈正相关。因此, 本研究从细胞角度检测 Foxml 在鼻咽癌 HNE-1 细胞株中的表达; 同时检测 TST 对鼻咽癌 HNE-1 细胞株增殖抑制的作用及与 Foxml 相关的可能机制, 结果显示: (1) TST 对 HNE-1 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^[13]报道 TST 对肺癌细胞株具有较强的增殖抑制作用相符。

(2)在 TST 作用后的 HNE-1 细胞中, G_0/G_1 期细胞百分率增加,导致 HNE-1 细胞阻滞在 G_0/G_1 期,并且呈剂量依赖性,这与 Koo 等^[2]报道 TST 阻滞乳腺癌细胞株于 G_0/G_1 期是相符的。(3)随 TST 浓度的增加,Foxm1 蛋白表达量的表达逐渐减少;TST 对 HNE-1 细胞的增殖抑制作用可能是通过抑制 Foxm1 蛋白表达实现的,这与 Bhat 等^[14]报道相符。

综上所述,TST 对人鼻咽癌 HNE-1 细胞株具有较好的体外增殖抑制作用,其机制可能是通过抑制肿瘤细胞中 Foxm1 转录因子的蛋白表达实现的。本实验可为 Foxm1 基因成为肿瘤治疗的新靶点及其特异性抑制剂 TST 的临床应用提供一定的实验室基础。

参考文献:

- [1] Adamii GR, Ye H. Future roles for Foxm1 inhibitors in cancer treatments[J]. *Future Oncol*, 2007, 3(1): 1-3.
- [2] Koo CY, Muir KW, Lam EW. FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(1): 28-37.
- [3] Teh MT, Wong ST, Neill GW, et al. Foxm1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(16): 4773-4780.
- [4] 沈娜,张潜英,陈鸿雁,等. siRNA 抑制 HPV16E6 基因对鼻咽癌细胞生物学特性的影响[J]. *重庆医学*, 2008, 37(20): 2263-2265.
- [5] 董玉芳,张莉萍. Foxm1 转录活性的调控及其与肿瘤的关系[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2009, 36(10): 736-738.
- [6] 林万隆,谷晓媛,倪克樑. 肿瘤分子靶向治疗研究现状[J]. *世界肿瘤杂志*, 2008, 7(3): 187-203.
- [7] Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box

(Fox) proteins in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(11): 847-859.

- [8] Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, 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.
- [9] Yeshida Y, Wang IC, Yoder HM, 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.
- [10] Liu P, Cheng H, Roberts TM, et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(8): 627-644.
- [11] Penzo M, Massa PE, Olivetto 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.
- [12] Francis RE, Myatt SS, Krol J, et al. Foxm1 is a downstream target and marker of HER2 overexpression in breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(1): 57-68.
- [13] Nicolaou KC, Zak M, Rahimipour S, et al. Discovery of a biologically active thioStrepton fragment[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(43): 15042-15044.
- [14] Bhat UG, Halasi M, Gartel AL. Foxm1 is a general target for proteasome inhibitors[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6593.

(收稿日期:2012-04-11 修回日期:2012-07-17)

(上接第 3282 页)

- [4] Ito R, Nakayama H, Yoshida K, et al. Expression of Cbl linking with the epidermal growth factor receptor system is associated with tumor progression and poor prognosis of human gastric carcinoma[J]. *Virchows Arch*, 2004, 444(4): 324-331.
- [5] Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(1): 168-172.
- [6] 王国栋,李侠,王连聪,等. 胃癌组织 EGFR 和 VEGF 的表达及其意义[J]. *实用肿瘤杂志*, 2009, 24(1): 34-39.
- [7] Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and epidermal growth factor receptor(EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(1): 69-79.
- [8] Gennaro G, Lieto E, Michele O, et al. Epidermal growth factor(EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients undergoing curative surgery[J]. *World J Surg*, 2007, 31(7): 1458-1468.
- [9] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(4): 337-345.

- [10] Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(2): 123-132.
- [11] Ott D, Taraborrelli C, Aguzzi A. Novel dominant negative prion protein mutants identified from a randomized library[J]. *Protein Eng Des Sel*, 2008, 21(10): 623-629.
- [12] Gang L, Ziwei W, Lin Z, et al. Inhibitory effects of cytoplasmic-domain substituted epidermal growth factor on growth, invasion and angiogenesis of human gastric cancer cells[J]. *Mol Med Report*, 2010, 3(2): 287-294.
- [13] Chan JK, Pham H, You XJ, et al. Suppression of ovarian cancer cell tumorigenicity and evasion of cisplatin resistance using a truncated epidermal growth factor receptor in a rat model[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3243-3248.
- [14] Lukas J, Bartbova J, Rohde M, et al. Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(5): 2600-2611.
- [15] Li X, Marani M, Yu J, et al. Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(1): 186-191.

(收稿日期:2012-03-13 修回日期:2012-07-07)