

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.024

10058-F4 诱导宫颈癌 CaSki 细胞凋亡及其机制探索*

陈 瑛, 宁 杨, 黄 磊, 李 莉, 王 玉 兰, 李 瑞, 田 训, 李 贺 梅, 张 庆 华[△]

(华中科技大学附属武汉中心医院妇产科, 武汉 430014)

[摘要] **目的** 探讨 10058-F4 诱导宫颈癌 CaSki 细胞凋亡的现象及机制。**方法** 用 CCK8 的方法检测不同浓度的 10058-F4 和 10058-F4 作用不同时间对 CaSki 细胞生长的影响; 流式细胞术检测 10058-F4 对 CaSki 凋亡率的影响; Western blot 方法检测 10058-F4 的药物有效性(c-MYC 的表达下调)及对 CaSki 细胞的凋亡诱导作用; Western blot 和 RT-PCR 的方法检测线粒体蛋白的表达情况, 流式细胞术检测细胞 ROS 产生。**结果** 通过 CCK8 实验检测出 10058-F4 对 CaSki 的增殖抑制具有时间依赖性和浓度依赖性, 始于第 48 小时, IC₅₀ 为 122 μmmol/L。用 122 μmmol/L 的 10058-F4 处理 CaSki 细胞 48 h, 通过流式细胞术检测凋亡发现处理组细胞出现明显凋亡(52%), 同时 Western blot 检测发现剪切型 PARP 表达量上调。Western blot 和 RT-PCR 检测发现 122 μmmol/L 的 10058-F4 处理 CaSki 细胞 48 h 可以明显降低线粒体氧化磷酸化蛋白(NDUFS1、SDHA、UQCRC2、COXIV、OSCP)的表达, 引起线粒体活性氧(ROS)产生明显增高, 从而诱导细胞凋亡。**结论** 10058-F4 可以通过降低线粒体氧化磷酸化蛋白的表达引起 ROS 产生来诱导 CaSki 细胞凋亡。

[关键词] 宫颈肿瘤; 细胞凋亡; 线粒体; 活性氧; 10058-F4

[中图分类号] R737.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)06-0796-03

10058-F4 could cause cervical cancer cells apoptosis*

Chen Ying, Ning Yang, Huang Lei, Li Li, Wang Yulan, Li Rui, Tian Xun, Li Hemei, Zhang Qinghua[△]

(Department of Gynaecology and Obstetrics, Wuhan Central Hospital Affiliated to Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hebei 430014, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role and mechanism of 10058-F4 on cervical cancer SaSki cells in the apoptosis. **Methods** The CCK8 assay was used to confirmed 10058-F4 inhibited the proliferation of CaSki cells in a dose-dependent and time dependent manner. Cell apoptosis and the ROS production was analyzed by flow cytometry. The mRNA and protein levels after cells treated with 10058-F4 were detected by real time PCR and Western blot. **Results** 10058-F4, an inhibitor of c-MYC, could inhibit the proliferation of CaSki cells in a dose-dependent and time dependent manner. Cells grow much slower after treated with 10058-F4 for 48 h, and IC₅₀ was 122 μmmol/L. In addition, cells which were treated with 10058-F4 for 48 h show apparent apoptosis and the level of cleaved-PARP confirm that. We also found that 10058-F4 reduced the expression levels of NDUFS1, SDHA, UQCRC2, COXIV and OSCP and caused excess production of ROS. **Conclusion** 10058-F4 leads to the decreased expression level of mitochondrial complexes, increased production of ROS, then induce apoptosis.

[Key words] uterine cervical neoplasms; apoptosis; mitochondria; reactive Oxygen species; 10058-F4

宫颈癌是当今世界上影响妇女健康最常见的肿瘤之一。现在恶性肿瘤的治疗手段有手术治疗、化疗、放疗和分子靶向药物, 而手术治疗和化疗为治疗宫颈癌的常用手段。现已有报道证实在多数宫颈癌病例中存在 c-MYC 基因高表达的情况且在宫颈癌病情进展中起着重要的作用^[1]。作为 c-MYC 基因的一种小分子靶向抑制剂, 10058-F4 已经被认作是治疗多种肿瘤的分子靶向药物^[2-4]。但是 10058-F4 对宫颈癌的治疗效果却鲜有报道。本研究拟观察 10058-F4 对宫颈癌细胞 CaSki 的杀伤作用, 并初步探讨 10058-F4 诱导 CaSki 细胞凋亡的作用机制, 为以后宫颈癌新化疗方案提供依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和培养条件 CaSki 细胞株来自美国细胞典藏中心(ATCC), 培养基为 DMEM (Gibico 公司) 添加 10% 四季青胎牛血清, 在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2 实验材料 10058-F4(中国 Selleck 公司), CCK8(日本的 Dojindo 公司), 凋亡试剂盒(美国 BD 公司), TRIzol 试剂盒(美

国 Life 公司), 逆转录试剂盒(日本 Toyobo), 蛋白裂解液 RIPA (碧云天), 抗体 c-MYC、GADPH、NDUFS1、SDHA、UQCRC2、COX IV、OSCP(武汉三鹰生物技术有限公司)、PARP(美国 Abcam 公司)。线粒体活性率(ROS)染料(美国 Life 公司)。

1.3 CCK8 实验 10058-F4 时间依赖实验: 取对数增长期的 CaSki 细胞, 消化接种到 96 孔板(4 000 个/孔), 12 h 后分别加入二甲亚砜(DMSO)和 100 μmol/L(共 100 μL)的 10058-F4(每组 4 个复孔)。在 24、36、48、60、72 h 后加入 10 μL CCK8, 37 ℃培养箱孵育 1 h, 450 nm 波长条件下读取吸光度(A)值。10058-F4 浓度依赖实验: 取对数增长期的 CaSki 细胞, 消化接种到 96 孔板(4 000 个/孔), 12 h 后分别加入 10、25、50、100、200、400 μmmol/L 的 10058-F4 和等体积的 DMSO, 48 h 后加入 10 μL CCK8, 37 ℃培养箱孵育 1 h, 450 nm 波长条件下读取 A 值。

1.4 流式细胞术检测凋亡 取处于对数增长期的 CaSki 细

* 基金项目: 武汉市卫生局临床医学科研项目资助(WX11B05)。通信作者, E-mail: zhangqh66@qq.com。

作者简介: 陈瑛(1979-), 主治医师, 硕士, 主要从事妇科研究。 △

胞,消化接种到六孔板,待细胞融合度为 50%左右时,加入 122 $\mu\text{mol/L}$ 的 10058-F4 和相同体积的 DMSO,48 h 后收取两组细胞,用 PBS 洗涤 1 次,800 r/min 离心 5 min。弃上清,每管加入 300 μL 的 1 \times Binding Buffer 悬浮细胞。加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 混匀后,避光,室温孵育 15 min,再加入 5 μL 的碘化丙啶(PI)染色 5 min 后上机以未加 10058-F4 细胞作为对照组。

1.5 Western blot 检测 10058-F4 处理细胞后的蛋白水平变化

取对数增长期的 CaSki 细胞,消化接种到六孔板,待细胞融合度为 50%左右时,加入 122 $\mu\text{mol/L}$ 的 10058-F4 和相同体积的 DMSO,48 h 后收取两组细胞。每组加入 60 μL RIPA 蛋白裂解液,冰浴 10 min,超声充分裂解细胞,12 000 \times g 离心 10 min,取上清液。每组取 1 μL 用考马斯亮蓝法检测蛋白浓度。在蛋白上清中加入 5 \times 的含还原剂的蛋白上样缓冲液,沸水中煮 10 min 充分变性。取 60 μg 的蛋白于 10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳 2 h。用湿转的方式将蛋白转移至聚偏氯乙烯(PVDF)膜上,5%牛血清清蛋白(BSA)室温封闭 10 min。一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育过夜。第 2 天用 ECL 显色。

1.6 实时荧光定量检测 10058-F4 处理细胞后的线粒体蛋白 mRNA 水平变化 按 TRIzol 试剂盒的说明书提取总 RNA,取 1 μg 总 RNA 按照 Toyobo 逆转录试剂盒的说明书进行逆转录(条件 42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min)。实时荧光定量 PCR 体系:1 μL cDNA,10 μL Mix (DBI),1 μL 引物(上游引物 0.5 μL ,下游引物 0.5 μL),8 μL 水。以 GAPDH 为内参。引物序列如下。见表 1。

表 1 引物序列

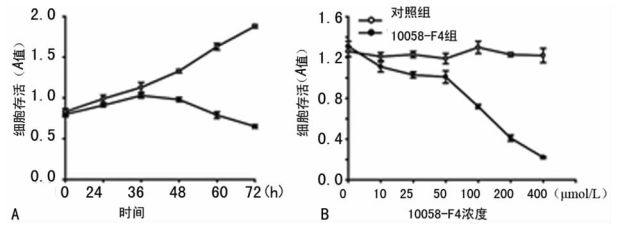
基因	引物(5'-3')
GAPDH	AATGACAACCTGGTCGTGGAC
	CCCTCCAGGGGATCTGTTTG
NDUFS1	TTAGCAAATCACCCATGGACTG
	CCCCTCTAAAAATCGGCTCCTA
SDHA	CAACAGGAACCCGAGGTTTT
	CAGCTTGGTAACACATGCTGTAT
UQCRC2	TTCAGCAATTTAGGAACCACCC
	GGTCACACTTAATTTGCCACCAA
COX IV	ACTACCCATGCCAGAAGAG
	TCATGGAGCGACGGTTTCATC
OSCP	GGGCGGGGAGATGCTTTAC
	CGCTCATAGACAGTCTCCAGG

1.7 流式细胞术检测线粒体 ROS 产生 将 Life 公司的 Mi-toSOX 加入培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育细胞 10 min 后收取细胞,800 r/min 离心,冰 PBS 洗涤 1 次,800 r/min 离心再用冰 PBS 重悬细胞,上机检测。

2 结 果

2.1 10058-F4 对宫颈癌 CaSki 细胞的作用具有时间依赖性和浓度依赖性 CCK8 检测显示,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 10058-F4 作用 24、36、48、60、72 h 对 CaSki 细胞的存活率分别为 96.4%、91.9%、91.1%、73.7%、48.5%、34.6%,见图 1A。说明 10058-F4 作用细胞 48 h 的时候开始对细胞有明显的生长存活,并具有时间依赖性。10、25、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 的 10058-F4 处理 48 h 后对 CaSki 细胞进行 CCK8 检测显示,生

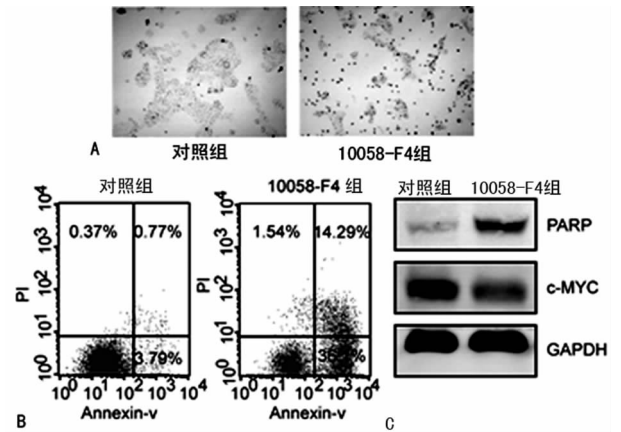
长抑制率分别为 91.7%、83.7%、84.9%、55.4%、33.3%、32.0%,见图 1B。通过 SPSS 软件计算,作用 48 h 10058-F4 的 IC₅₀ 为 122 $\mu\text{mol/L}$ 。同时表明,10058-F4 对宫颈癌 CaSki 细胞的作用具有浓度依赖性。



A: 时间依赖; B: 浓度值依赖; 以未加 10058-F4 细胞作为对照组。

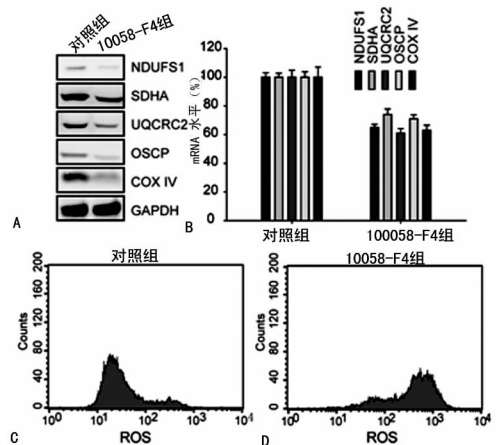
图 1 CCK8 实验用来检测 10058-F4 对 CaSki 细胞增殖的影响

2.2 10058-F4 可以诱导宫颈癌 CaSki 细胞凋亡 用 122 $\mu\text{mol/L}$ 的 10058-F4 作用 CaSki 细胞 48 h 后,白光显微镜下可以观察到细胞开始出现凋亡现象,见图 2A,流式细胞术检测显示 10058-F4 组较对照组细胞出现明显凋亡(凋亡率为 52%),见图 2B。同时 Western blot 实验显示处理组细胞的 c-MYC 表达受抑制的同时 PARP 表达量明显升高,见图 2C。流式细胞术和 Western blot 两个实验同时说明 10058-F4 能够明显诱导 CaSki 细胞凋亡。



A: 白光显微镜($\times 10$); B: 流式细胞术; C: Western blot。

图 2 10058-F4 可以诱导 CaSki 细胞发生明显凋亡



A: Western blot 图; B: PCR 分析图; C: 对照组流式细胞术; D: 10058-F4 组流式细胞术。

图 3 10058-F4 降低了线粒体氧化磷酸化蛋白的表达并引起线粒体活性氧簇增多

2.3 10058-F4 明显抑制线粒体氧化呼吸链组分的表达

Western blot 检测发现,与对照组比较,10058-F4 可以降低 NDIFS1(线粒体复合体一组分)、SDHA(线粒体复合体二组分)、UQCRC2(线粒体复合体三组分)、COX IV(线粒体复合体四组分)、OSCP(线粒体复合体五组分)的蛋白表达($P < 0.05$),见图 3A。实时荧光定量 PCR 表明 NDUFS1、SDHA、UQCRC2、COX IV、OSCPmRNA 水平也明显较对照组低($P < 0.05$),见图 3B。证明 10058-F4 可以抑制线粒体氧化呼吸链蛋白的转录从而降低氧化呼吸链蛋白的表达水平。

2.4 10058-F4 明显诱导 CaSki 细胞线粒体 ROS 产生 122 $\mu\text{mol/L}$ 的 10058-F4 处理细胞 48 h 后能够明显增高 CaSki 细胞线粒体 ROS 的产生量,对照组 ROS 产生量为 56.21,10058-F4 组 ROS 产生量为 519.46,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3C。

3 讨 论

很多宫颈癌患者在就诊时已失去最佳手术时机,改善这部分患者的手段目前主要包括系统性化疗、放疗、分子靶向治疗^[5],以及近年来取得进展的免疫靶向治疗。c-MYC 在肿瘤发生发展中起到了促进作用^[6],并且宫颈癌普遍存在 c-MYC 基因拷贝数的增高^[7]。有文献报道,宫颈癌组织中 c-MYC 的表达量较正常组织明显升高^[8]。而宫颈癌现在仍是威胁人类健康的恶性难治愈的疾病,近四十年发病率仍逐年上升。而 c-MYC 也是肿瘤治疗的一个新靶点^[9]。所以探寻宫颈癌新的治疗方式仍然是目前科研工作者关注的重要方面。为寻找并证明 10058-F4 成为针对宫颈癌的治疗药物的可能性,笔者进行了相关的实验。

首先通过 CCK8 实验,确定了 10058-F4 对 CaSki 细胞的生长抑制具有时间依赖性和浓度依赖性,并且作用 48 h 10058-F4 的 IC_{50} 为 122 $\mu\text{mol/L}$ 。药物对肿瘤细胞造成生长抑制的原因有两个:(1)抑制细胞通过有丝分裂进行增殖;(2)对肿瘤细胞进行杀伤,也就是诱导细胞凋亡。后续的流式细胞术检测凋亡的实验证实 10058-F4 对 CaSki 细胞的作用机制主要是诱导细胞凋亡。这一结果也通过 Western blot 进行了佐证。

目前关于 c-MYC 抑制剂诱导肿瘤细胞凋亡主要是通过抑制 Bcl-2 的表达同时促进 Bax 的表达^[2,10]。本文发现并确认 10058-F4 能够降低线粒体氧化呼吸链相关蛋白的表达。在用 122 $\mu\text{mol/L}$ 的 10058-F4 处理 CaSki 细胞 48 h 后,线粒体氧化磷酸化复合体一、二、三、四、五的组成成分 NDUFS1、SDHA、UQCRC2、COX IV、OSCP 在 mRNA 水平和蛋白水平都有明显下降。线粒体氧化呼吸链除了是产生 ATP 提供能量的主要场所以外,还是清除超氧化物的场所^[11-12]。因此,本研究进一步检测发现 10058-F4 处理 CaSki 细胞 48 h 后线粒体 ROS 产生明显增多。已经有多篇文献证明 ROS 产生增多可以促进细胞凋亡^[6,13]。

本文认为,10058-F4 抑制降低线粒体氧化呼吸链相关蛋白的表达,增加线粒体 ROS 产生,进而诱导细胞凋亡。目前越来越多的文献证实肿瘤细胞中线粒体的量和功能活跃,并给肿瘤细胞增殖提供原材料^[14]。本文中的细胞实验从 10058-F4 抑制线粒体功能的角度出发,发现 10058-F4 诱导宫颈癌细胞凋亡的机制,为以后 10058-F4 成为治疗宫颈癌的化疗药物提供理论依据。本实验结果为探寻宫颈癌新治疗方案提供了理论依据。

参考文献

- [1] Kubler K, Heinenberg S, Rudlowski C, et al. c-myc copy number gain is a powerful prognosticator of disease outcome in cervical dysplasia[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(2): 825-835.
- [2] Wang J, Ma X, Jones HM, et al. Evaluation of the antitumor effects of c-MYC-Max heterodimerization inhibitor 100258-F4 in ovarian cancer cells[J]. *J Transl Med*, 2014, 12:226.
- [3] Mu Q, Ma Q, Lu S, et al. 10058-F4, a c-Myc inhibitor, markedly increases valproic acid-induced cell death in Jurkat and CCRF-CEM T-lymphoblastic leukemia cells[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(3):1355-1359.
- [4] Holien T, Misund K, Olsen OE, et al. MYC amplifications in myeloma cell lines: correlation with MYC-inhibitor efficacy[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26):22698-22705.
- [5] 高琨,张彩虹,陈心秋,等.同步热放疗治疗中晚期宫颈癌的近期疗效观察[J]. *重庆医学*, 2013, 42(7):736-738.
- [6] Liu Y, Zhang X, Han C, et al. TP53 loss creates therapeutic vulnerability in colorectal cancer[J]. *Nature*, 2015, 520(7549):697-701.
- [7] Eid MM, Nossair HM, Ismael MT, et al. Clinical significance of hTERT and C-Myc genes amplification in a group of Egyptian patients with cancer cervix[J]. *Gulf J Oncolog*, 2011(10):18-26.
- [8] Mook OR, Baas F, de Wissel MB, et al. Allele-specific cancer cell killing in vitro and in vivo targeting a single-nucleotide polymorphism in POLR2A[J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(6):532-538.
- [9] Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data[J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(5):401-404.
- [10] Cinar M, Rosenfelt F, Rokhsar S, et al. Concurrent inhibition of MYC and BCL2 is a potentially effective treatment strategy for double hit and triple hit B-cell lymphomas[J]. *Leuk Res*, 2015, 39(7):730-738.
- [11] Ying H, Elpek KG, Vinjamoori A, et al. PTEN is a major tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates an NF-kappaB-cytokine network[J]. *Cancer Discov*, 2011, 1(2):158-169.
- [12] Hidalgo M. Pancreatic cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(17):1605-1617.
- [13] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(11):2913-2921.
- [14] Wallace DC. Mitochondria and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(10):685-698.