



· 论著选登 ·

ZP-20f对口腔鳞癌的抑制作用及机制研究

孙学丽, 曹钟义

南昌大学第一附属医院口腔颌面外科, 江西 南昌 330000

[关键词] ZP-20f; 口腔鳞癌; 作用机制

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.11.010

中图分类号: R739.8 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2018)11-0858-05

Effect of ZP-20f on oral squamous cell carcinoma and its mechanism SUN Xueli, CAO Zhongyi (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China)

Correspondence to: CAO Zhongyi E-mail: caozygw@163.com

[Key words] ZP-20f; Oral squamous cell carcinoma; Effect and mechanism

以口腔上皮鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)为主的口腔癌是常见的肿瘤之一, 2015年中国新增病例约48 100例, 死亡约22 100例^[1]。虽然近年来手术、化疗和放疗等治疗手段发展迅速, 但效果不甚满意, 患者5年生存率约60%^[2]。化疗抵抗、不良反应及肿瘤细胞的扩散转移使得现有化疗药物远不能满足临床需求。因此, 针对OSCC, 开发效果显著、不良反应轻微的新型治疗药物, 是药物研发领域的重点。

微管是由 α -微管蛋白和 β -微管蛋白组成的异二聚体, 是细胞骨架的重要组成部分^[3]。微管蛋白与微管之间聚集-解聚的动态平衡对维持细胞形态、细胞分裂、信号转导和物质运输等方面都具有十分重要的作用^[4-5], 已成为抗肿瘤药物研究领域的重要靶点之一, 如临床上常用的抗肿瘤药物紫杉醇能抑制微管解聚成微管蛋白, 长春新碱则能抑制微管蛋白聚集形成微管。

化合物ZP-20f(图1)是一种结构新颖的新型二芳基- β -内酰胺类化合物, 可以抑制微管蛋白聚集形成微管, 从而抑制细胞有丝分裂, 体外、体内研究表明, 其对卵巢癌、宫颈癌等肿瘤细胞的生长具有较好的抑制作用^[6]。为了研

究ZP-20f对OSCC的抗肿瘤作用, 拓展其抗肿瘤谱, 本文在体外研究了该化合物对OSCC细胞系CAL-27、SCC-9增殖的抑制作用及机制。

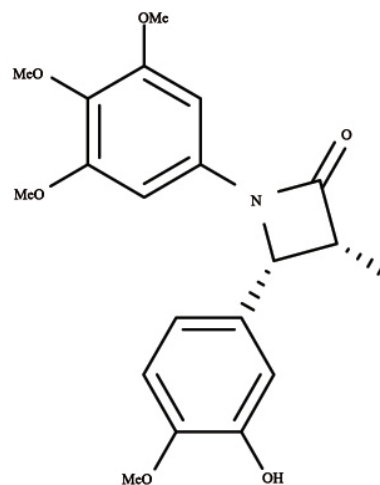


图1 ZP-20f的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of ZP-20f

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人舌鳞状细胞癌细胞株CAL-27、SCC-9购自上海富衡生物科技有限公司, ZP-20f由复旦大学

药学院王洋教授惠赠, DMEM培养基、双抗和胰蛋白酶购自美国GE公司, 胎牛血清购自美国GENIMI公司, 细胞凋亡及周期检测试剂盒购自美国BD公司。

1.2 细胞培养

人舌癌细胞株CAL-27和SCC-9于37 °C、CO₂体积分数为5%、饱和湿度的条件下, 在含有10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基中培养, 细胞生长至约85%汇合时, 用0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.3 四甲基偶氮唑盐实验

取对数期生长细胞, 按 4×10^3 个/孔接种于96孔板, 培养24 h, 加入不同浓度的受试样品继续培养48 h后, 每孔加入20 μ L 5 mg/L的四甲基偶氮唑盐溶液继续培养4 h后, 弃去培养基, 再加入150 μ L/孔DMSO, 振荡溶解15 min, 酶标仪检测波长570 nm时各孔吸光度(D)。每次试验设置3个复孔, 独立重复3次, 计算受试样品的IC₅₀。

1.4 细胞周期检测

取对数生长的细胞, 按 5×10^5 个/皿接种于60 mm细胞培养皿, 培养24 h后加入不同浓度的受试样品, 继续培养48 h后, 胰蛋白酶消化, 收集各皿中贴壁细胞, 75%乙醇固定后, 加入RNase和碘化丙啶(propidium iodide, PI)充分混匀后, 室温避光温育20 min, 采用流式细胞术检测。

1.5 细胞凋亡检测

取对数生长的细胞, 按 5×10^5 个/皿接种于60 mm细胞培养皿, 培养24 h后加入不同浓度的受试样品, 继续培养72 h后, 胰蛋白酶消化, 收集细胞, 采用磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤后, 用结合液重悬, 分别加入Annexin V-FITC和PI染色, 室温避光温育20 min, 上机检测。

1.6 平板克隆实验

取对数生长期细胞, 胰蛋白酶消化后, 充分吹打成单个细胞, 以1 500个/皿接种于6孔板中培养24 h后, 加入不同浓度的受试样品培养48 h后, 更换新鲜培养基继续培养2周, 弃去培养基用无水甲醇固定, 结晶紫染色后计数。

1.7 蛋白质印迹法(Western blot)检测

取对数生长期细胞, 经受试样品处理后, 胰蛋白酶消化, 离心收集沉淀, 使用细胞裂解液裂解细胞, 用BCA蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度后, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 室温封闭, 一抗二抗温育后, 采用ECL显影液曝光。

2 结果

2.1 化合物ZP-20f显著抑制OSCC细胞增殖

化合物ZP-20f对OSCC细胞株SCC-9和CAL-27的增殖具有较好的体外抑制作用, 具有浓度依赖性, IC₅₀分别达到7.66和9.62 nmol/L(表1), 与阳性对照药物CA-4活性相当。克隆形成实验结果也显示, 化合物ZP-20f对两种肿瘤细胞的克隆形成具有显著的抑制作用(图2)。

表1 化合物ZP-20f、CA-4抑制OSCC细胞SCC-9和CAL-27增殖的IC₅₀

Compound	IC ₅₀ μ g/(nmol·L ⁻¹)	
	SCC-9	CAL-27
ZP-20f	7.66	9.62
CA4	7.21	14.21

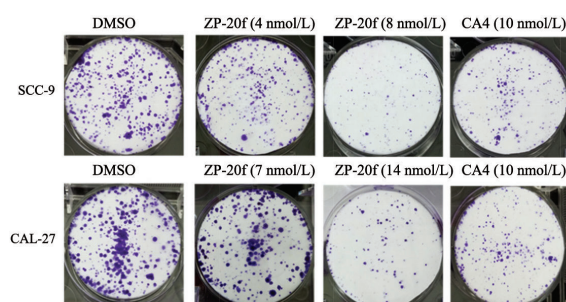


图2 化合物ZP-20f抑制OSCC细胞SCC-9和CAL-27集落的形成并具有浓度依赖性

Fig. 2 Compound ZP-20f inhibited SCC-9 and CAL-27 colony formation in a dose-dependent manner

2.2 ZP-20f可在G₂/M期阻滞细胞周期

为研究ZP-20f对OSCC细胞周期的影响, 我们用受试样品处理细胞后, 进行PI染色, 并采用流式细胞术分析细胞中DNA含量, 结果表明, ZP-20f可以显著诱导G₂/M细胞周期阻滞, 受试化

合物浓度的增加, G₂/M期细胞比例随之增加, 呈浓度依赖性(图3)。

2.3 ZP-20f可诱导细胞凋亡

作用于微管-微管蛋白的抗肿瘤药物主要通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。为检测ZP-20f诱导细胞凋亡的作用, 我们用受试样品处理细胞后, 采用PI-Annexin V双染色法染色后, 用流式细胞术检测凋亡细胞比例。结果显示, ZP-20f可以显著诱导CAL-27和SCC-9细胞株凋

亡, 且具有浓度依赖性(图4)。

2.4 ZP-20f调控细胞周期凋亡相关蛋白变化

为进一步研究ZP-20f抗肿瘤作用机制, 我们采用Western blot检测了细胞周期和凋亡相关蛋白的变化情况。结果显示, ZP-20f浓度依赖的诱导组蛋白3(histone 3)磷酸化的上调、cyclin B1表达的上调和多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]的切割, 且具有浓度依赖性(图5)。

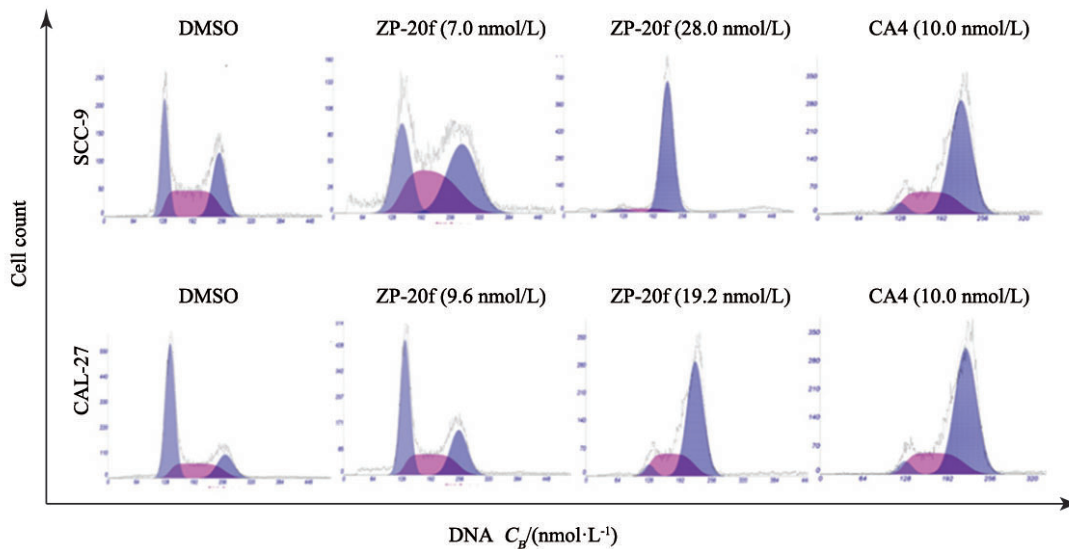


图3 ZP-20f诱导OSCC细胞SCC-9和CAL-27细胞G₂/M期阻滞并具有浓度依赖性

Fig. 3 ZP-20f induced SCC-9 and CAL-27 cell cycle arrest at G₂/M phase in a dose-dependent manner

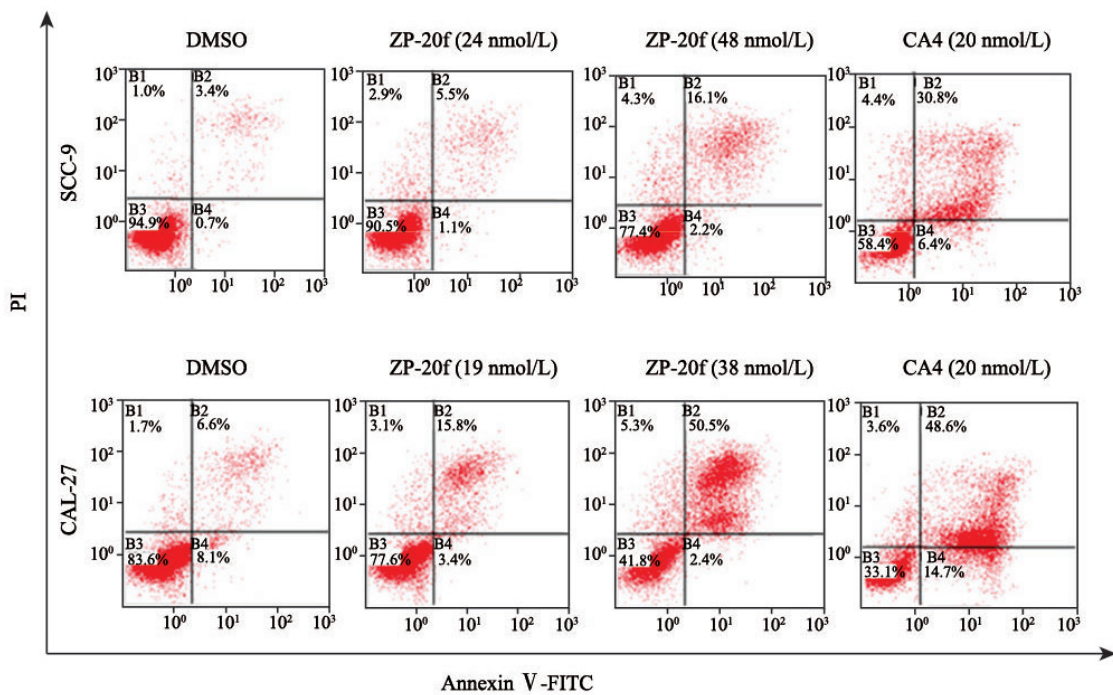


图4 ZP-20f诱导OSCC细胞SCC-9和CAL-27细胞凋亡并具有浓度依赖性

Fig. 4 ZP-20f induced SCC-9 and CAL-27 cellular apoptosis in a dose-dependent manner

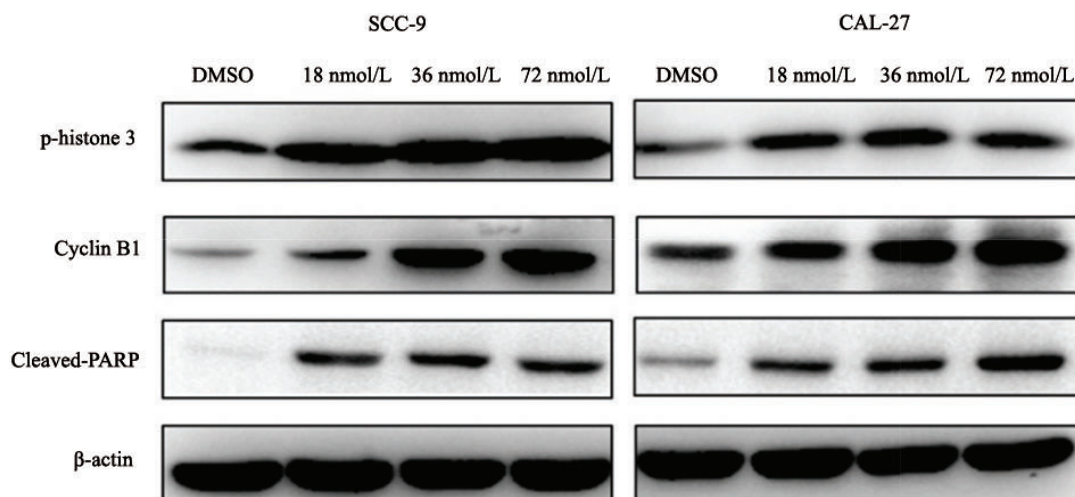


图5 ZP-20f调节OSCC细胞SCC-9和CAL-27细胞周期和凋亡相关蛋白表达

Fig. 5 ZP-20f regulated SCC-9 and CAL-27 cell cycle and apoptosis-related protein

3 讨 论

化疗是临床治疗OSCC的主要手段之一，特别是对于已经发生转移、失去手术机会的患者来说，化疗几乎是唯一的治疗手段，临床研究表明，许多化疗药物可以改善预后，延长患者生存期^[5, 7]。但肿瘤耐药性的出现和化疗药物引起的不良反应使得现有化疗药物远不能满足临床需求。由于在细胞有丝分裂中的重要作用，微管和微管蛋白现已成为研究抗肿瘤化合物的重要作用靶点。微管蛋白与小分子药物结合位点有3个，分别是紫杉醇结合位点、长春碱结合位点和秋水仙碱结合位点。紫杉醇、埃博霉素等结合于紫杉醇结合位点，抑制微管解聚成微管蛋白。长春碱、长春新碱结合于长春碱结合位点，抑制微管蛋白聚集形成微管。这两类药物在临床上作为抗肿瘤药物已有广泛应用。作用于秋水仙碱结合位点尚未有上市的抗肿瘤药物，CA-4、BNC105等作为抗肿瘤药物目前正在临床试验阶段。ZP-20f是根据CA-4结构改造获得的小分子化合物，与CA-4相比具有水溶性好、结构稳定等特点。本研究表明，ZP-20f对口腔鳞癌细胞SCC-9和CAL-27具有较强的体外抑制活性，IC₅₀为7~10 nmol/L，与CA-4作用相当。与CA-4、紫杉醇等药物类似，ZP-20f可以诱导细胞周期阻滞于G₂/M期，主要与其抑制微管形成从而干扰细胞有

丝分裂中纺锤体的形成有关^[8-9]。此外，ZP-20f可以上调组蛋白3的磷酸化水平和cyclin B1的表达。研究表明，cyclin B1在细胞中合成于S期，G₂期含量达到最大值，M期被降解^[10]。因此G₂/M期细胞中cyclin B1含量比正常周期的细胞多。组蛋白3是染色质中主要的蛋白组分，组蛋白3的磷酸化是高度保守的，起始于G₂期晚期，在染色质凝聚时扩散到整个染色体，在有丝分裂结束时发生脱磷酸化。因此磷酸化的组蛋白3在G₂/M期阻滞的细胞中表达量较高^[11]。此外，细胞发生凋亡时，凋亡核心成员caspase 3被激活，细胞内的PARP被切割成cleaved-PARP而失去酶活力。因此细胞中cleaved-PARP量增加可以证明细胞凋亡的发生^[12]。

综上所述，本研究表明微管蛋白聚集抑制剂ZP-20f在体外对OSCC细胞的增殖具有良好的抑制作用，且具有浓度依赖性，能阻滞细胞周期于G₂/M，诱导细胞凋亡。研究结果为开发这类化合物作为治疗口腔上皮鳞癌的化疗药物提供了依据。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] RODRIGUEZ C P, ADELSTEIN D J. Survival trends in head and neck cancer: opportunities for improving outcomes [J]. Oncologist, 2010, 15(9): 921-923.

- [3] JORDAN M A, WILSON L. Microtubules as a target for anticancer drugs [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(4): 253-265.
- [4] 尚海, 潘莉, 杨澍, 等. 微管蛋白抑制剂的研究进展 [J]. *药学报*, 2010, 45(9): 1078-1088.
- [5] DENT E W. Of microtubules and memory: implications for microtubule dynamics in dendrites and spines [J]. *Mol Biol Cell*, 2017, 28(1): 1-8.
- [6] ZHOU P, LIU Y, ZHOU L, et al. Potent antitumor activities and structure basis of the chiral beta-lactam bridged analogue of combretastatin a-4 binding to tubulin [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(22): 10329-10334.
- [7] MACHIELS J P, LAMBRECHT M, HANIN F X, et al. Advances in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *F1000Prime Rep*, 2014, 6: 44.
- [8] 任莹, 林莉萍, 丁健. Combretastatin A4的抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(17): 1336-1341.
- [9] KRUCZYNSKI A, BARRET J M, ETIÉVANT C, et al. Antimitotic and tubulin-interacting properties of vinflunine, a novel fluorinated Vinca alkaloid [J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55(5): 635-648.
- [10] TAKIZAWA C G, MORGAN D O. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(6): 658-665.
- [11] 孙谦, 周浩, 黄熙泰. 细胞分裂过程中的组蛋白H3磷酸化 [J]. *生命的化学*, 2008, 28(5): 591-594.
- [12] CASAO, A, MATA-CAMPUZANO M, ORDÁS L, et al. Cleaved PARP-1, an apoptotic marker, can be detected in ram spermatozoa [J]. *Reprod Domest Anim*, 2015, 50(4): 688-691.

(收稿日期: 2018-05-02 修回日期: 2018-07-30)

《抗癌》杂志征稿启事

《抗癌》杂志于1988年创刊, 主管单位为上海市科学技术协会, 主办单位为上海市抗癌协会, 杂志刊号: CN31-1664/R ISSN 1008-3065。征稿栏目及内容如下。

一、《抗癌博客》栏目

记录癌症患者自强不息、热爱生活、勇敢面对病痛和生活压力的故事, 能够启发其他患者自信和勇敢的精神, 帮助他们建立积极、知足、感恩和达观的生活态度。可以是你的亲身经历, 也可以是医生治疗患者时的所见所闻, 或是你身边发生的故事。

二、《正谊明道、大医精诚》栏目

真实记录医生对患者的关怀; 或是爱岗敬业、精益求精富有专业精神的事迹, 能让更多医道同仁敬重和学习。可以讲述患者眼里的医生, 也可以记录你的同事。

以上稿件《抗癌》杂志编辑部在发表时有修改的权力, 如果不同意修改请注明, 谢谢! 欢迎各位作者踊跃投稿。

通信地址: 上海市东安路270号6号楼3楼《抗癌》杂志社

邮 编: 200032

电 话: 021-64188274; 021-64175590转83574

E-mail: anti-cancer@163.com

《抗癌》编辑部