

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.17.010

HL-5 抑制 HCT116 细胞增殖作用及作用机制*

邹丽娟¹, 郑莉², 万丹¹, 甘萍^{1△}

(1. 中国人民解放军西部战区总医院, 四川 成都 610083; 2. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041)
摘要:目的 探讨组蛋白去乙酰化酶(HDAC)/磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K)双靶点抑制剂 HL-5 对肿瘤细胞增殖的抑制作用及作用机制。方法 选取部分实体瘤细胞株,测定 HL-5 与阳性药物 HDAC 靶点抑制剂辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)、PI3K 靶点抑制剂 4-羟基-2,6-二甲基苯甲腈(GDC-0941)的半数抑制率(IC_{50}),评价 HL-5, SAHA, GDC-0941 对肿瘤细胞增殖的抑制效果;同时,采用细胞克隆形成实验考察对肿瘤细胞的杀伤能力;通过碘化丙啶(PI)染色和流式细胞仪考察 HL-5 对细胞周期的影响;采用蛋白免疫印迹(Western blotting)法检测细胞周期阻滞标志分子 p-H3, P21, p-cdc2(161), cdc25c 的表达水平。结果 HL-5 对多株肿瘤细胞的 IC_{50} 均小于 $0.5 \mu\text{mol/L}$, 且均优于阳性药物 SAHA 和 GDC-0941 ($P < 0.05$); 25, 50, 100, 200, 400 nmol/L HL-5 对人结肠癌细胞系 HCT116 细胞克隆形成有很好的抑制效果 ($P < 0.01$), 且呈现一定的剂量依赖关系; HL-5 处理后, p-H3 和 P21 水平升高, p-cdc2(161)和 cdc25c 水平降低, HCT116 细胞周期阻滞在 G_2/M 期。结论 HL-5 具有广谱抗肿瘤细胞增殖效果, 其作用机制可能与抑制肿瘤细胞克隆形成和阻滞细胞周期有关。

关键词:组蛋白去乙酰化酶; 磷脂酰肌醇-3-羟激酶; 半数抑制率; 克隆形成; 细胞周期; 作用机制

中图分类号: R979.1; R965

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)17-0038-04

Inhibitory Effect of HL-5 on Proliferation of HCT116 Cells and Its Mechanism

ZOU Lijuan¹, ZHENG Li², WAN Dan¹, GAN Ping¹

(1. The General Hospital of Western Theater Command of Chinese PLA, Chengdu, Sichuan, China 610083; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China 610041)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of histone deacetylase (HDAC)/phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase (PI3K) dual-target inhibitor HL-5 on the proliferation of tumor cells and its mechanism. **Methods** Some solid tumor cell lines were selected to determine the half inhibition rate (IC_{50}) of HL-5 and positive drugs including HDAC target inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and PI3K target inhibitor pictilisib (GDC-0941), and evaluate the inhibitory effects of HL-5, SAHA and GDC-0941 on the proliferation of tumor cells. Meanwhile, the killing ability of HL-5 on the tumor cells was investigated by the colony formation assay. The effect of HL-5 on the cell cycle was investigated by the propidium iodide (PI) staining and the flow cytometry. The expression levels of cell cycle arrest markers including p-H3, P21, p-cdc2(161) and cdc25c were detected by the Western blotting. **Results** The IC_{50} of HL-5 on the many lines of tumor cells was lower than $0.5 \mu\text{mol/L}$, and lower than that of positive drugs SAHA and GDC-0941 ($P < 0.05$). The 25, 50, 100, 200, 400 nmol/L of HL-5 had a good inhibitory effect on the colony formation of human colon cancer cell line HCT116 ($P < 0.01$), and showed a certain dose-dependent relationship. After adding HL-5, the expression levels of p-H3 and P21 increased, while the expression levels of p-cdc2(161) and cdc25c decreased, and the cell cycle of HCT116 was arrested in the G_2/M phase. **Conclusion** HL-5 has a broad-spectrum anti-proliferation effect on the tumor cells, and its mechanism may be related to the inhibition of tumor cell colony formation and the arrest of cell cycle.

Key words: HDAC; PI3K; IC_{50} ; clone formation; cell cycle; mechanism

目前,大多数基于“单靶点单药物”模型的药物,在治疗复杂、异质、多基因的疾病如肿瘤方面正变得越来越无效。虽然药物组合疗法被用作实现疗效的替代方法,但其优势往往被不利的药物-药物相互作用、不可预测的药代动力学和安全性及患者服药依从性差所抵消。近年来,更倾向于研发“多靶点药物”,以解决许多单靶点或联合疗法的有限疗效和耐药性或毒性。磷脂酰肌醇3-羟基激酶(PI3K)和组蛋白去乙酰化酶(HDAC)是目前临床应用较广泛的抑瘤靶点,但PI3K和HDAC抑制剂都受到疗效不足和耐药突变的限制。有证据表明,同时抑制PI3K和HDAC,可协同抑制肿瘤

生长,并通过提高疗效、限制耐药性和提供比单一抑制剂更好的治疗窗口来克服这些限制^[1]。特异性HDAC和PI3K异构体的选择性抑制剂可能具有更好的低毒性特征,治疗窗更宽。治疗弥漫大B细胞淋巴瘤的双重抑制剂CUDC-907可通过协同效应抑制肿瘤细胞增殖和生存补偿途径,表现出HDAC和PI3K双向抑制作用,获得更好的治疗效益^[2]。临床迫切需要新的具有高效力和选择性的双重抑制剂^[3-4]。为此,本研究中以半数抑制率(IC_{50})评价HL-5与阳性药物辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA, HDAC靶点抑制剂)和4-羟基-2,6-二甲基苯甲腈(GDC-0941, PI3K靶点抑制剂)对肿瘤细胞增

*基金项目:四川省科技计划项目[2020YJ0090]。

第一作者:邹丽娟,女,大学本科,药师,研究方向为细胞和分子生物学,(电子信箱)zoulj4931@163.com。

△通信作者:甘萍,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药理药效学和药物分析,(电子信箱)ganping_2007@163.com。

殖的抑制效果,同时通过细胞克隆实验、流式细胞仪和蛋白免疫印迹(Western blotting)法,探讨HL-5抑制肿瘤细胞增殖的作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:Multiskan Spectrum-15型全波长酶标仪,SORVALLST 16型常温离心机,FASC420型流式细胞仪,均购自赛默飞世尔科技有限公司;CKX31型倒置显微镜(日本Olympus公司);CCL-170B-8型CO₂细胞培养箱(新加坡ESCO公司)。

试剂:HL-5由课题组自主设计、合成,化学结构见图1。SAHA(批号为J01764A),GDC-0941(Pictilisib,批号为J0315A),均购自大连美仑生物技术有限公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT,美国Sigma公司,批号为EZ7890D354);p-H3(批号为17AV0305),cdc25c(批号为E1616),P21(批号为F036118),p-cdc2(批号为K012443),均购自Abcam公司。

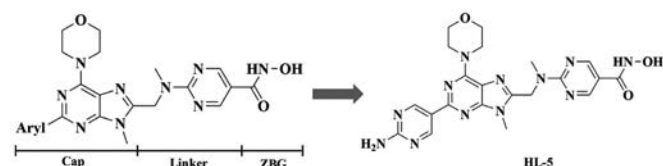


图1 HL-5的设计、合成与化学结构

Fig. 1 Design, synthesis and chemical structure of HL-5

1.2 方法

IC₅₀测定:选取对数生长期细胞,按(3~5)×10⁴个/孔铺于96孔板,培养过夜。依次按浓度梯度加入HL-5(1 000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 nmol/L),GDC-0941(20 000, 10 000, 5 000, 2 500, 1 250, 625, 312.5 nmol/L),SAHA(20 000, 10 000, 5 000, 2 500, 1 250, 625, 312.5 nmol/L),72 h后测定IC₅₀^[5]。

细胞克隆形成实验:细胞接种于6孔板(1×10⁵个/孔),24 h后用不同终浓度的HL-5(0, 25, 50, 100, 200, 400 nmol/L)干预48 h;更换新的6孔板,完成干预后的细胞重接种(500个/孔),行单克隆集落培养12 d;将细胞用甲醇固定15 min,0.1%结晶紫染液染色10 min,晾晒,次日拍照^[6-7]。

细胞周期的流式检测:选用6孔板接种人结肠癌细胞系HCT116细胞(1×10⁵个/孔),24 h后用不同终浓度的HL-5(0, 40, 200, 1 000 nmol/L),SAHA(1 000 nmol/L),GDC-0941(1 000 nmol/L)干预细胞24 h;收集细胞,依次行清洗、固定、碘化丙啶(PI)染色和流式细胞仪检测分析^[8-9]。

Western blotting实验:采用9 cm培养皿接种人结肠癌细胞系HCT116细胞,24 h后用不同终浓度的HL-5(0, 40, 200, 1 000 nmol/L),SAHA(1 000 nmol/L),GDC-0941(1 000 nmol/L)干预细胞24 h;分别提取总蛋白,行电泳、转膜、封闭、抗体孵育、显影和拍照。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗肿瘤细胞增殖活性

选取部分实体瘤细胞株进行考察,结果见表1。

表1 HL-5,SAHA,GDC-0941抗肿瘤细胞增殖活性比较
($\bar{X} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

Tab. 1 Comparison of anti-proliferation effect of HL-5,SAHA and GDC-0941 on the tumor cells ($\bar{X} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

细胞株	HL-5	SAHA	GDC-0941
Hcc827	0.282 ± 0.096	0.843 ± 0.044*	8.363 ± 0.127**
H1975	0.133 ± 0.007	0.305 ± 0.015*	0.323 ± 0.015*
A549	0.443 ± 0.025	1.808 ± 0.026*	0.511 ± 0.047*
MDA-MB-231	0.227 ± 0.011	0.823 ± 0.033*	3.408 ± 0.129***
MCF-7	0.114 ± 0.020	0.474 ± 0.018*	0.577 ± 0.044*
HCT116	0.077 ± 0.003	2.316 ± 0.102**	0.804 ± 0.036*
COC0205	0.079 ± 0.016	3.585 ± 0.089***	0.381 ± 0.038*
SW620	0.094 ± 0.009	5.631 ± 0.157***	5.664 ± 0.115***
HT29	0.032 ± 0.003	1.133 ± 0.068*	1.764 ± 0.092*
A2780s	0.208 ± 0.017	4.348 ± 0.135*	1.142 ± 0.086*
HepG2	0.347 ± 0.042	3.505 ± 0.096**	7.528 ± 0.150**

注:与HL-5比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with those of HL-5, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.2 对HCT116细胞克隆形成的影响

细胞克隆集落形成情况见图2A,HCT116细胞计数统计结果见图2B,可见,HL-5从25 nmol/L浓度开始,与二甲基亚砜比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明,HL-5对肿瘤细胞具有持久杀伤能力。

2.3 对细胞周期的影响

HDAC抑制剂SAHA与PI3K抑制剂GDC0941对细胞周期的作用效果不同,SAHA将细胞阻滞在G₂/M期,而GDC-0941将细胞阻滞在G₁期^[8]。通过PI染色考察HL-5对细胞周期的影响,结果见图3。可见,HL-5处理HCT116细胞24 h后,G₂/M期细胞比值随浓度增加而增加,且到达一定比值后不再增加,其阻滞细胞周期的结果与SAHA类似而不同于GDC-0941。

2.4 对细胞周期阻滞标志分子的影响

由图4可知,蛋白水平的结果与细胞流式仪分析结果相似,HL-5对各标志蛋白的影响类似于SAHA而不同于GDC-0941。经HL-5处理后,p-H3和P21水平升高;同时,细胞从G₂期至M期转化的关键催化因子p-cdc2(161)和cdc25c水平降低。

3 讨论

HDAC抑制剂作为抗肿瘤药物的效用在肿瘤学中越来越受到重视,临床不断涌现不同HDAC靶点的药物,治疗效果明显。但其适应证大多局限于血液学肿

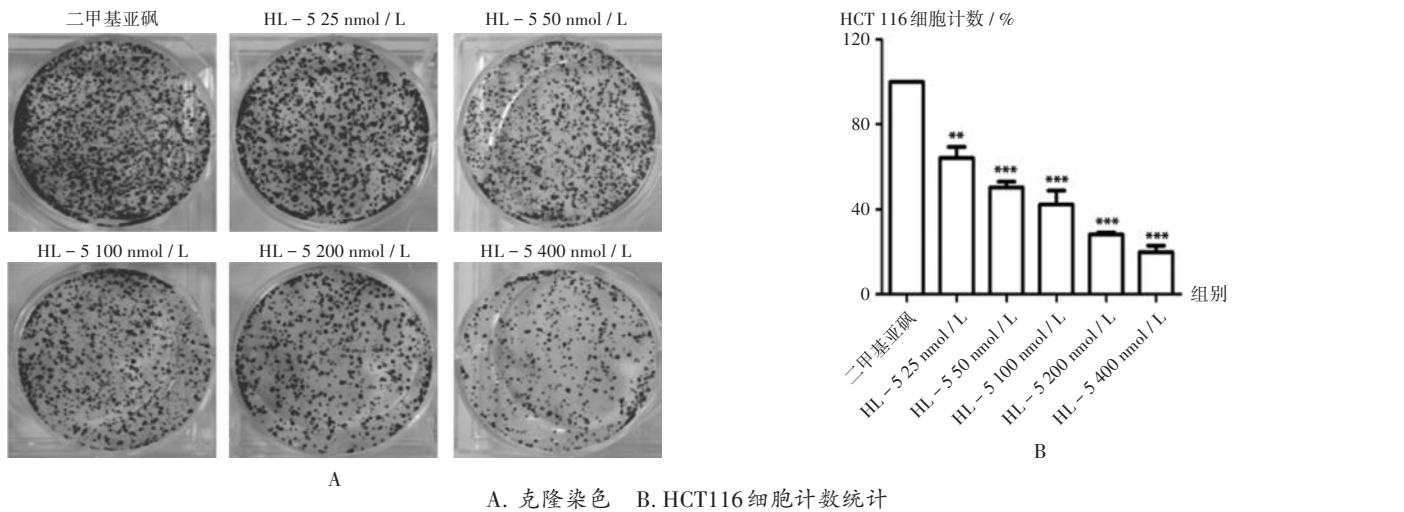


图2 HL-5对HCT116细胞克隆形成的影响

A. Clone staining B. Statistics of HCT116 cell count

Note: Compared with that of dimethyl sulfoxide,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$.

Fig.2 Effect of HL-5 on the clone formation of HCT116 cells

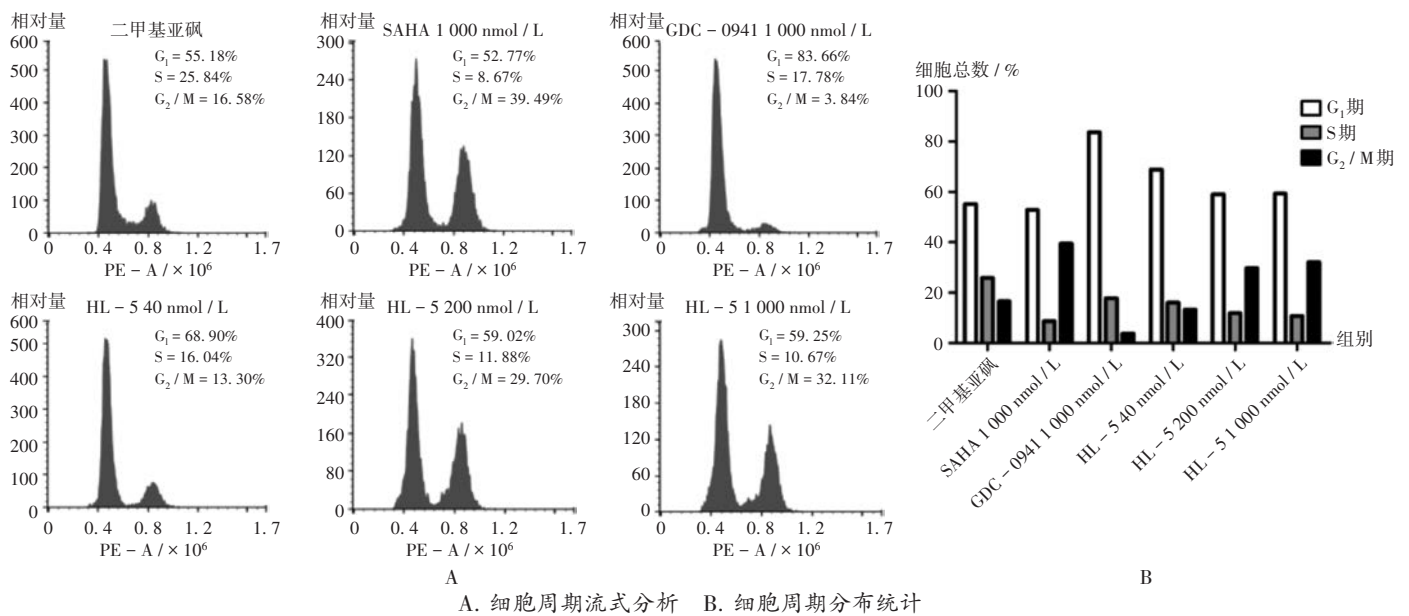


图3 HL-5对细胞周期的影响

A. Cell cycle analyzed by the flow cytometry B. Statistics of cell cycle distribution

Fig.3 Effect of HL-5 on the cell cycle

瘤,对实体瘤疾病的治疗作用不佳。同时,单靶点药物更易出现耐药性。多靶点药物有效剂量更低,疗效更好,相比单靶点药物不易产生耐药性,能对多种不同肿瘤细胞产生抑制作用,给药物开发设计及临床患者带来诸多益处^[10-12]。由表1可知,作为HDAC/PI3K双靶点抑制剂,HL-5在非小细胞肺癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、黑色素瘤、卵巢癌等细胞株中均显示出良好的肿瘤抑制效果,且均优于对应的单靶点药物SAHA和GDC-0941,表明双靶点药物起效剂量更低,同时单一HDAC或PI3K靶点抑制剂的适用范围更大。与以往的单靶点药物联用增敏剂的研究^[13]相仿,如在头颈鳞状细胞癌(HNSCC)模型中,HDAC的泛抑制剂LBH589与PI3K泛

抑制剂BKM120联合使用,在体外和体内均有协同抗肿瘤作用。作为首个报道的HDAC和PI3K的双靶点抑制剂^[14],CUDC-907已有5个项目处于临床评价阶段。在后期研究中,将选择CUDC-907作为阳性对照,对比HL-5与其体内外抗肿瘤疗效的差异。

细胞克隆形成实验可考察化合物对肿瘤细胞的持久、不可逆的影响,检测经过化合物处理后的细胞在移除药物后能否继续保持增殖活性的能力。由图2可知,HL-5对HCT116细胞克隆形成有很好的抑制效果,且呈现一定的剂量依赖关系。由图3可知,上述结果可能与HL-5能将细胞周期阻滞在G₂/M期有关。PI3K信号通路激活导致c-Myc和细胞周期蛋白D₁的表达增

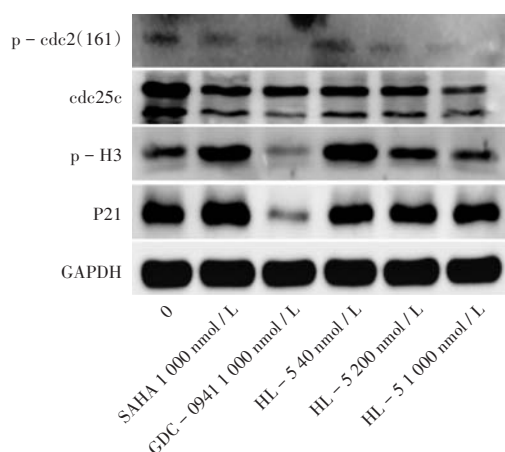


图4 HL-5对细胞周期相关蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Effect of HL-5 on the expression level of cell cycle-associated proteins

加,细胞周期检查点蛋白质P21和P27的活性降低,促进细胞周期进程和存活^[15];HDAC是细胞周期进程的关键调节剂,能促使肿瘤抑制基因P21和P27的表达增加。因此,同时抑制PI3K和HDAC可协同降低细胞周期蛋白D₁的转录,并增加c-Myc的降解。针对CUDC-907的研究发现,其对c-Myc有很强的抑制作用,用于Myc依赖的弥漫大B细胞淋巴瘤和BRD-NUT融合阳性NUT中线癌均有很好的效果^[16]。周期分析结果提示,双靶点抑制剂HL-5对细胞周期阻滞标志分子p-H3,cdc25c,P21,p-cdc2(161)的表达均有影响,其对细胞周期的抑制作用更倾向于HDAC抑制剂SAHA,且有一定的量效关系,而非同时具备2个靶点对周期阻滞的特点,与已有单靶点抑制剂作用机制类似^[17]。后期研究将进一步考察HL-5对p27,c-Myc,caspase等相关信号通路靶标的影响。

综上所述,与HDAC或PI3K抑制剂相比,双靶点抑制剂HL-5可较好地扩展药物的适用范围,起效剂量更低,值得进一步开发利用。后期研究将选择HCT116,H1975,COCO205,MCF-7细胞株建立荷瘤小鼠模型,以考察HL-5在体内的抗肿瘤作用和作用机制,以及可能的毒性靶器官^[18-20]。

参考文献

[1] WU Y, DAI W, CHEN X, et al. Synthesis and Biological Evaluation of 2,3-Dihydroimidazo-[1,2-C]Quinazoline Derivatives as Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase and Histone Deacetylase Dual Inhibitors [J]. RSC Adv, 2017, 7(6): 52180-52186.

[2] ASHISH T, GREGORY J, MARK H, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Quinazolin-4-one-Based Hydroxamic Acids as Dual PI3K/HDAC Inhibitors [J]. J Med Chem, 2020, 63(8): 4256-4292.

[3] 李雁铭,赵志刚. 肿瘤靶向药物研究进展[J]. 中国药业, 2021, 30(21): 128-134.

[4] 张强,李绍青,刘薇,等. 基于糖基化修饰的铂类抗肿瘤化合物研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(17): 1409-1414.

[5] 唐加峰,张滔,黄世莹,等. 高三尖杉酯碱对人黑色素瘤A375细胞增殖的影响及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(8): 1100-1105.

[6] 王敏. 人参皂苷Rh2促进人子宫内膜癌细胞凋亡及其机制研究[J]. 西南国防医药, 2018, 18(8): 720-723.

[7] 方奕巍,朱文涛,陈金明. 蒜氨酸微乳-蒜酶肠溶双层片制备工艺优选及体外抗肿瘤作用评价[J]. 中国药业, 2022, 31(3): 59-64.

[8] 王文斌,任飞桦,胡少洋,等. 二甲双胍与二氯乙酸盐对MYCN扩增神经母细胞瘤BE-2C细胞的协同抗肿瘤作用[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(9): 1256-1261.

[9] 龙奕霄,蒙永,蒋霞. 花椒根总生物碱抗肿瘤活性研究[J]. 中国药业, 2022, 31(4): 63-66.

[10] 周敏军,代晓明,杨鹏飞. HDAC2在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2021, 26(9): 845-850.

[11] 王月莉,董曼. 磷脂酰肌醇-3激酶和组蛋白去乙酰化酶双靶点抑制剂CUDC-907对急性髓系白血病细胞体内、体外活性的影响[J]. 陕西医学杂志, 2021, 50(8): 929-933.

[12] 洪小兰,吴海丽,谢彩丽,等. NRP-1在皮肤黑色素瘤中的表达及对细胞增殖、凋亡的影响[J]. 西南国防医药, 2021, 31(4): 310-314.

[13] KIM J, GUAN J, CHANG I, et al. PS-341 and histone deacetylase inhibitors synergistically induce apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(7): 1977-1984.

[14] CHENG H, HONG YX, SHAN SB, et al. CUDC-907, a novel dual PI3K and HDAC inhibitor, in prostate cancer: Antitumor activity and molecular mechanism of action [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(13): 7239-7253.

[15] ZAPPASODI R, CAVANÈ A, IORIO MV, et al. Pleiotropic antitumor effects of the pan-HDAC inhibitor ITF2357 against c-Myc-overexpressing human B-cell non-Hodgkin lymphomas [J]. Int J Cancer, 2014, 135(9): 2034-2045.

[16] LUCAS DM, ALINARI L, WEST DA, et al. The novel deacetylase inhibitor AR-42 demonstrates pre-clinical activity in B-cell malignancies *in vitro* and *in vivo* [J]. PLoS One, 2010, 5(6): e10941.

[17] HUANG WJ, TANG YA, CHEN MY, et al. A histone deacetylase inhibitor YCW1 with antitumor and antimetastasis properties enhances cisplatin activity against non-small cell lung cancer in preclinical studies [J]. Cancer Lett, 2014, 346(1): 84-93.

[18] 谭学东,黎淑芳,朱晓莹,等. 五倍子联合黄芩提取物复合液对牙周膜细胞增殖和周期的影响[J]. 中国药业, 2018, 27(8): 9-11.

[19] 姚楠,顾晓洁,李友宾. 白首乌中3个C₂₁甾体皂苷类成分对人肺癌A549细胞生长及周期的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 34(11): 1418-1421.

[20] 杨培,周琥,王丽韫. 胆碱能M受体调控细胞周期蛋白依赖性激酶5及其在敌敌畏诱导SH-SY5Y细胞毒性损伤中的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(3): 179-187.

(收稿日期:2022-03-15;修回日期:2022-04-08)