

双亚苄基哌啶与蛋白酶体抑制剂对舌鳞癌细胞存活率和周期的影响*

陈静坤¹, 叶展超¹, 郑晓辉^{2,3**}

(1. 厦门大学附属中山医院口腔科 福建 厦门 361000;

2. 厦门医学院基础医学部生理学教研室 福建 厦门 361023;

3. 厦门医学院基础医学部机能与临床转化福建省高校重点实验室 福建 厦门 361023)

[摘要] 目的: 探讨双亚苄基哌啶(Bis-Benzylidene Piperidon, RA190)与蛋白酶体抑制剂 MG132 对舌鳞癌细胞存活率和周期的影响。方法: 分别培养舌鳞癌细胞 CAL27、TCA8113。设无细胞空白组、无加药对照组和不同终浓度(0.1 μ, 0.2 μ, 0.4 μ, 0.5 μ, 0.8 μ, 1.6 μ, 3.2 μ, 6.4 μg/mL) RA190 或 MG132 实验组。培养 24 h 后, CCK8 法酶标仪检测各组细胞存活率, 流式细胞仪分析各组细胞周期分布情况。结果: 相同浓度下, MG132 组舌鳞癌细胞存活率低于 RA190 组($P < 0.05$); MG132 与 RA190 组 CAL27 细胞存活率均低于 TCA8113 细胞($P < 0.05$); MG132 组的 CAL27 细胞 G2/M 期数量占比高于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 舌鳞癌细胞对 MG132 作用的敏感性高于 RA190; CAL27 细胞对 MG132、RA190 的敏感性高于 TCA8113; MG132 阻滞 CAL27 细胞于 G2/M 期, 可能提高了 CAL27 细胞对 MG132 敏感性。

[关键词] 双亚苄基哌啶; 蛋白酶体抑制剂; 舌鳞癌; 存活率; 细胞周期

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A **doi:** 10.3969/j.issn.1003-1634.2019.08.004

Effect of Bis-Benzylidene Piperidon and proteasome inhibitor on the viability and cycle process of tongue squamous cancer cells. CHEN Jing-kun¹, YE Zhan-chao¹, ZHENG Xiao-hui^{2,3**}. 1. Department of stomatology, Zhongshan Hospital affiliated to Xiamen University, Fujian Xiamen 361000, China; 2. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Xiamen Medical College, Fujian Xiamen 361023, China; 3. Fujian Provincial Key Laboratory of Functional and Clinical Translational Medicine, Xiamen Medical College, Fujian Xiamen 361023, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Bis-Benzylidene Piperidon (RA190) and proteasome inhibitor

*基金项目: 福建省中青年教育科研项目(JAT160584);

厦门医学院校级博士启动基金(K2016-03)

**通信作者: 郑晓辉 E-mail: zhengxiaohui1983@163.com

[4] Shen Y, Cheung GS, Bian Z, et al. Comparison of defects in ProFile and ProTaper systems after clinical use [J]. J Endod, 2006, 32(1): 61-65.

[5] Generali L, Righi E, Todesca MV, et al. Canal shaping with WaveOne reciprocating files: influence of operator experience on instrument breakage and canal preparation time [J]. Odontology, 2014, 102(2): 217-222.

[6] Ye J, Gao Y. Metallurgical characterization of M-Wire nickel-titanium shape memory alloy used for endodontic rotary instruments during low-cycle fatigue [J]. J Endod, 2012, 38(1): 105-107.

[7] Yang Y, Shen Y, Ma JZ, et al. A micro-computed tomographic assessment of the influence of operator's experience on the quality of Wave-One instrumentation [J]. J Endod, 2016, 42(8): 1258-1262.

[8] Schneider SW. A comparison of canal preparations in straight and curved root canals [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1971, 32(2): 271-275.

[9] Abou-Rass M, Frank AL, Glick DH. The anticurvature filing method to prepare the curved root canal [J]. J Am Dent Assoc, 1980, 101(5): 792-794.

[10] 陶小玲, 彭彬, 边专, 等. 400 颗上颌前牙根管弯曲情况的研究 [J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(2): 135-138.

[11] 张文, 彭彬, 陈智, 等. 487 颗下颌前牙根管的弯曲情况研究 [J]. 口腔医学研究, 2005, 21(1): 47-49.

[12] 李逸舒, 顾永春. 上颌前磨牙根管弯曲度的测量 [J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(10): 60-62.

[13] 衡士超, 程勇, 李波, 等. 锥形束 CT 在牙体牙髓病诊治中的临床应用 [J/CD]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2012, 6(1): 85-92.

[14] Soleymani A, Namaryan N, Moudi E, et al. Root canal morphology of mandibular canine in an Iranian population: A CBCT assessment [J]. Iran Endod J, 2017, 12(1): 78-82.

[15] Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability [J]. NeuroImage, 2006, 31(3): 1116-1128.

[16] Penaloza TYM, Karkhanis S, Kvaal SI, et al. Reliability and repeatability of pulp volume reconstruction through three different volume calculations [J]. J Forensic Odontostomatol, 2016, 34(2): 35-46.

收稿日期: 2019-04-27

MG132 on the viability and cycle of tongue cancer cells. **Methods:** The cultured tongue cancer cells CAL27 and TCA8113, were divided into Blank and control group (no drug addition) and experimental group, respectively. The experimental group was treated with different concentrations (0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of RA190 or MG132 for 24 hours. The cell survival rate of each group was measured by CCK8 through enzyme labeling instrument and the cell cycle distribution of each group was analyzed by flow cytometry. **Results:** The survival rate of CAL27 cells treated with MG132 or RA190 was lower than that of TCA8113 cells. The survival of CAL27 and TCA8113 cells treated with MG132 was lower than that with RA190. The proportion of CAL27 cells in G2/M phase treated with MG132 was higher than that in control group. All of the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The sensitivity of tongue cancer cells to MG132 is higher than that of RA190. The sensitivity of CAL27 cells to MG132 or RA190 is higher than that of TCA8113 cells. MG132 blocks CAL27 cells in G2/M phase and it may increase the sensitivity of CAL27 cells to MG132.

[Key words] Bis-Benzylidene Piperidon; Proteasome inhibitor; Tongue squamous carcinoma; Viability; Cycle

泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 广泛存在于多细胞真核生物内。该系统通过蛋白酶体泛素化底物蛋白, 调节翻译后蛋白表达, 以维持细胞内蛋白稳定, 参与包括免疫反应、心血管疾病、肿瘤发生发展等多种生物过程和病理机制, 已成为肿瘤治疗新靶点。黏附调节分子 1 (adhesion regulating molecule 1, ADRM1) 是哺乳动物 26 S 蛋白酶体上的一个受体^[1,2], 通过募集泛素羧基末端水解酶 37 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 37, UCH37)^[3-6] 到蛋白酶体上, 形成 ADRM1/Uch37 复合物, 进入蛋白酶体-泛素化路径, 参与底物核转录因子 (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和诱导型一氧化氮合酶 (Inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的活性和降解^[7,8]; ADRM1 在多种肿瘤细胞处于过表达状态, 下调其表达促进肿瘤细胞凋亡^[8-10]。

传统的蛋白酶体抑制剂 MG132 可抑制泛素蛋白酶体活性, 抵消 17 β -雌激素对原代神经元内 L 型钙通道 α 亚单位 (Cav1.2) 蛋白降低作用^[11], 抑制病毒复制^[12], 诱导 Burkitt 淋巴瘤、急性髓系白血病、肺癌、肝癌等癌细胞凋亡^[13-16], 协同促进全反式维甲酸诱导急性早幼粒白血病致病基因 GTF2I-RARA 融合基因阳性的舌鳞癌细胞分化^[17]; 还可通过果蝇母亲抗失弛缓性蛋白 (drosophila mothers against decapentaplegic protein, Smad) 信号通路抑制转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 诱导的炎症反应, 抑制肾间质纤维化^[18]。而近几年发现的靶向 ADRM1 药物双亚苄基哌啶 (Bis-Benzylidene Piperidon, RA190) 可快速触发多泛素蛋白累积, 诱导对硼替佐米耐药的多发性骨髓瘤细胞凋亡, 也抑制卵巢癌、肝癌、肝胆管癌等多种癌细胞增殖^[19-24]。那么, RA190 与 MG132 在舌鳞癌中作用效果如何; 本实验拟通过观察舌鳞癌细胞株 CAL27 与 TCA8113 在 RA190 或 MG132 药物作用下存

活率及各周期细胞分布情况, 比较两药对舌鳞癌细胞作用效果。

材料和方法

1 实验材料

细胞株: 舌鳞癌细胞株 CAL27、TCA8113 为本实验室保存。主要试剂与仪器: MG132、RA190、CCK8 (MCE, 中国); DMEM、HBSS (Corning, 美国); 胰酶 (Gibco, 美国); 胎牛血清 (Gemini, 南美); FxCycle™ PI/RNase Staining Solution (Invitrogen, 美国); 流式细胞仪 EPICSXL (贝克曼库尔特公司, 美国)。

2 方法

2.1 细胞培养与传代

CAL27、TCA8113 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱培养。每 2 d 换液, 待细胞汇合至 70%~80% 时, 胰酶消化, 以 1:4 的比例传代。

2.2 实验分组与处理

设 3 个复孔, 将 CAL27、TCA8113 细胞以 5×10^5 /孔的密度种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 待细胞生长至 50%~70% 的对数生长期时换新鲜培养液, 进行如下分组: 空白组为无细胞完全培养基, 对照组不加任何药物, 实验组加入不同终浓度 RA190 或 MG132 (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 24 h 后, 加入 10 μL CCK8, 孵育 3 h, 酶标仪测 OD_{450/630}。实验重复 3 次; RA190 或 MG132 用无菌的 PBS 溶解分装。

细胞存活率 = (实验组 - 空白组) OD_{450/630} 值 / (对照组 - 空白组) OD_{450/630} 值 $\times 100\%$

2.3 流式细胞术分析各组细胞周期

设 2 复孔, 在 6 孔板中接种 2 mL 细胞悬液, 终浓度 1×10^6 /mL, 分别以 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MG132 和 RA190 作用舌鳞癌细胞 24 h。收集细胞, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 预冷的 PBS 洗 2 次, 之后按 FxCycle™ PI/RNase Staining Solution 试剂盒说明书操作, 实验重复 3 次。

3 统计学分析

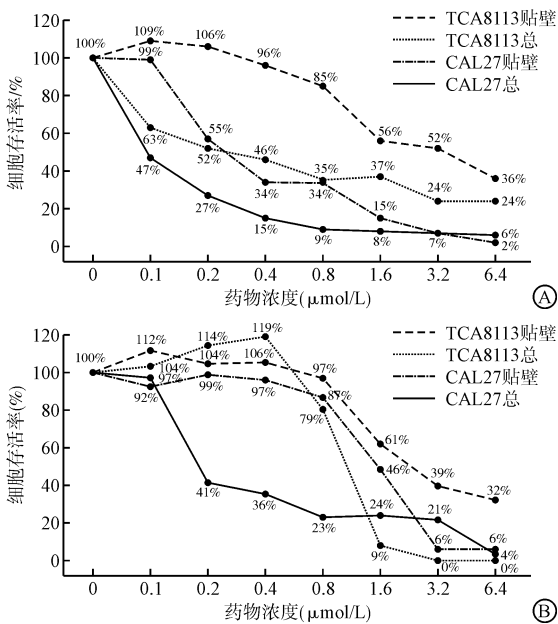
数据采用 GraphPad Prism 5 软件处理, 正态分布的计量资料的描述采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 舌鳞癌细胞在不同浓度 RA190、MG132 作用下存活率的比较

MG132 组中, CAL27、TCA8113(贴壁+总细胞)存活率下调, 分析 MG132 半抑制浓度(IC50), CAL27 总(约 0.1 μmol/L) < CAL27 贴壁(约 0.28 μmol/L) < TCA8113 总(约 0.3 μmol/L) < TCA8113 贴壁(约 4.8 μmol/L) 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

RA190 组中, RA190 对各细胞 IC50 为: CAL27 总(约 0.18 μmol/L) < CAL27 贴壁(约 1.2 μmol/L) < TCA8113 总(约 1.6 μmol/L) < TCA8113 贴壁(约 2.8 μmol/L) 差异有统计学意义($P < 0.05$); 0.1 μmol/L 后 CAL27 总的存活率开始下降, 随着 RA190 浓度提高, 其存活率下调显著; CAL27 贴壁细胞存活率在 RA190 浓度为 0.4 μmol/L 开始下调, TCA8113 细胞存活率在 RA190 浓度 0.8 μmol/L 后下调, CAL27 细胞在各浓度 MG132 或 RA190 作用下存活率下调最显著, TCA8113 贴壁的存活率下调最小, 差异有统计学意义($P < 0.05$) (图 1)。CAL27 对 RA190、MG132 药物敏感性高于 TCA8113; MG132 在 CAL27、TCA8113 细胞的作用效果优于 RA190。



A: MG132 组; B: RA190 组。TCA8113 总、CAL27 总: TCA8113、CAL27 细胞加药培养 24 h 后直接加入 10 μL CCK8, 轻轻振荡混匀; TCA8113 贴壁、CAL27 贴壁: 即细胞加药培养 24 h 后, 更换含 10% CCK8 的完全培养基 100 μL; 孵育 3 h。

图 1 舌鳞癌细胞在不同浓度 RA190、MG132 作用下存活率

2 舌鳞癌细胞在 0.5 μmol/L RA190 或 MG132 作用下周期的比较

为了解 MG132、RA190 下调舌鳞癌细胞 CAL27、TCA8113 存活率是否通过改变舌鳞癌细胞周期进程, 结合图 1 药物存活率曲线, 以药物浓度为 0.5 μmol/L 进行实验。流式细胞仪分析细胞周期结果显示, RA190 组舌鳞癌细胞与 MG132 组 TCA8113 细

胞各周期分布无显著变化; MG132 组 CAL27 细胞 G2/M 期细胞占比 [(23.15 ± 2.24) %] 高于对照组 [(16.44 ± 0.49) %] ($t = 6.108, P < 0.001$), G0/G1 期细胞占比 [(65.67 ± 3.09) %] 低于对照组 [(71.35 ± 0.26) %] ($t = 5.179, P < 0.001$), 差异有统计学意义, 即 MG132 阻滞 CAL27 细胞于 G2/M 期(图 2)。

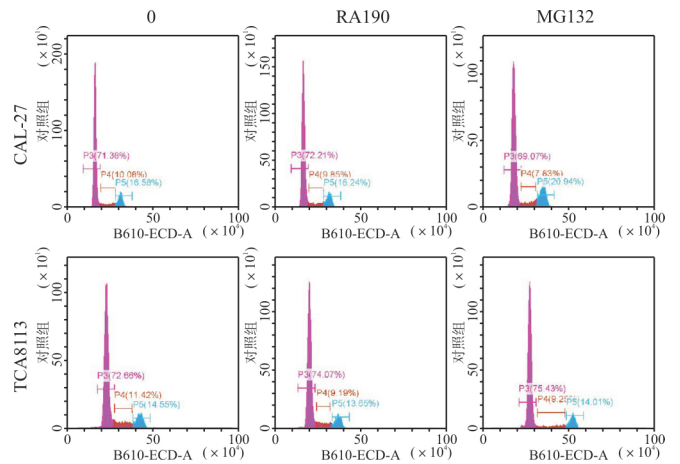


图 2 0.5 μmol/L RA190 或 MG132 作用下 CAL27、TCA8113 细胞周期情况

讨 论

异常基因出现或正常基因异常表达是肿瘤发生发展原因^[25-26]。肿瘤发病率在不断提高, 化疗仍是主要的治疗手段。面对化疗时的骨髓抑制、消化道反应、免疫功能降低和皮肤、黏膜损害等多种毒副作用, 精准治疗成为当今研究热点, 合理的联合用药仍是研究重点。MG132 与 RA190 虽在多种肿瘤中有研究, 然而尚未有其在舌鳞癌中的相关报道。本实验观察并比较 MG132 与 RA190 对舌鳞癌细胞抑制作用, 以期为后续动物与临床实验奠定基础。

细胞传代培养过程中, 本课题组发现舌鳞癌细胞存在贴壁和悬浮现象, 台盼蓝染色显示, 该悬浮细胞存活率 75% 左右。因此, 本研究中, 细胞加药培养 24 h 后, CCK8 孵育前吸弃悬浮细胞液组(即余贴壁细胞)和无弃液组(即总细胞)。从图 1 可以看出两实验组结果差异显著 ($P < 0.05$)。MG132 可引起舌鳞癌细胞 G2/M 期停滞, 与国内外相关研究结果一致, 即 MG132 可引起肿瘤细胞 G2/M 停滞。已知 MG132 与 RA190 的作用靶分子是 ADRM1, 两药均可诱导 CAL27 存活率下调, 说明 CAL27 细胞内可能高表达 ADRM1 蛋白, CAL27、TCA8113 细胞内 ADRM1 蛋白水平可能存在较大差异。众所周知 ADRM1 底物 NF-κB 可直接或间接影响肿瘤细胞内周期蛋白 Cyclin D、Cyclin E 和 c-myc 等的表达, 所以, MG132 与 RA190 可能通过靶向

ADRM1 影响细胞周期进程。另外, CCK8 实验结果结合上述 MG132 与 RA190 对不同舌鳞癌细胞周期影响, 提示 MG132 存在多个靶分子。

在相同浓度 MG132 或 RA190 作用下, 同一株舌鳞癌细胞的贴壁细胞存活率高于总体细胞, 可能是由于: ①贴壁细胞活性较好或恶性度较高导致对药物具有较强的耐药性; ②细胞处在不同周期时相, 对化疗药的敏感性不同。然根本原因可能是由于不同株舌鳞癌细胞或同一株舌鳞癌细胞在不同周期时相时, 细胞内耐药基因或该药靶分子 ADRM1 表达水平不同。MG132 与 RA190 在舌鳞癌细胞中作用机制, 将在后续研究继续探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, et al. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor [J]. *Nature*, 2008, 453(7194): 481-488.
- [2] Qiu XB, Ouyang SY, Li CJ, et al. hRpn13/ADRM1/GP110 is a novel proteasome subunit that binds the deubiquitinating enzyme [J]. *EMBO J*, 2006, 25(24): 5742-5753.
- [3] Stone M, Hartmann-Petersen R, Seeger M, et al. Uch2/Uch37 is the major deubiquitinating enzyme associated with the 26 S proteasome in fission yeast [J]. *J Mol Biol*, 2004, 344(3): 697-706.
- [4] Koulich E, Li X, DeMartino GN. Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26 S proteasome [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(3): 1072-1082.
- [5] Hamazaki J, Lemura S, Natsume T, et al. A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme Uch37 to 26 S proteasomes [J]. *EMBO J*, 2006, 25(19): 4524-4536.
- [6] Yao T, Song L, Xu W, et al. Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(9): 994-1002.
- [7] Mazumdar T, Gorgun FM, Sha Y, et al. Regulation of NF- κ B activity and inducible nitric oxide synthase by regulatory particle non-ATPase subunit 13 (Rpn13) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(31): 13854-13859.
- [8] Yang X, Miao X, Wen Y, et al. A possible connection between adhesion regulating molecule 1 overexpression and nuclear factor kappa B activity in hepatocarcinogenesis [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(1): 283-290.
- [9] Jiang RT, Yemelyanova A, Xing D, et al. Early and consistent overexpression of ADRM1 in ovarian high-grade serous carcinoma [J]. *J Ovarian Res*, 2017, 10(1): 53.
- [10] Zheng X, Guo Y, Chen Y, et al. Knockdown of adhesion-regulating molecule 1 inhibits proliferation in HL60 cells [J]. *Acta Haematol*, 2015, 134(2): 88-100.
- [11] Lai YJ, Zhu BL, Sun F, et al. Estrogen receptor α promotes Cav1.2 ubiquitination and degradation in neuronal cells and in APP/PS1 mice [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(4): e12961.
- [12] Llamas-González YY, Campos D, Pascale JM, et al. A Functional Ubiquitin-Proteasome System is Required for Efficient Replication of New World Mayaro and Una Alphaviruses [J]. *Viruses*, 2019, 11(4): pii: E370.
- [13] 郑晓辉, 黄家福, 徐淑娟, 等. 蛋白酶体抑制剂 MG132 对急性髓系白血病细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(3): 327-334.
- [14] Lee KH, Lee J, Woo J, et al. Proteasome Inhibitor-Induced I κ B/NF- κ B Activation is Mediated by Nrf2-Dependent Light Chain 3 B Induction in Lung Cancer Cells [J]. *Mol Cells*, 2018, 41(12): 1008-1015.
- [15] Wang L, Howell MEA, Sparks-Wallace A, et al. p62-mediated Selective autophagy endows virus-transformed cells with insusceptibility to DNA damage under oxidative stress [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(4): e1007541.
- [16] Kim HN, Park GH, Park SB, et al. Extracts from *Sageretia thea* reduce cell viability through inducing cyclin D1 proteasomal degradation and HO-1 expression in human colorectal cancer cells [J]. *J Proteomics*, 2019, 10(192): 334-345.
- [17] Yan W, Li J, Zhang Y, et al. RNF8 is responsible for ATRA resistance in variant acute promyelocytic leukemia with GTF2 I/RARA fusion, and inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway contributes to the reversion of ATRA resistance [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 84.
- [18] Han L, Zhu B, Chen H, et al. Proteasome inhibitor MG132 inhibits the process of renal interstitial fibrosis [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4): 2953-2962.
- [19] Anchoori RK, Karanam B, Peng S, et al. A bis-benzylidene piperidone targeting proteasome ubiquitin receptor RPN13/ADRM1 as a therapy for cancer [J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(6): 791-805.
- [20] Lu X, Zhou C, Li R, et al. Long Noncoding RNA AFAP1-AS1 Promoted Tumor Growth and Invasion in Cholangiocarcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(1): 222-230.
- [21] Song Y, Park PMC, Wu L, et al. Development and preclinical validation of a novel covalent ubiquitin receptor Rpn13 degrader in multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2019, doi: 10.1038/s41375-019-0467-z. [Epub ahead of print]
- [22] Anchoori RK, Jiang R, Peng S, et al. Covalent Rpn13-Binding Inhibitors for the Treatment of Ovarian Cancer [J]. *ACS Omega*, 2018, 3(9): 11917-11929.
- [23] Yu GY, Wang X, Zheng SS, et al. RA190, a Proteasome Subunit ADRM1 Inhibitor, Suppresses Intrahepatic Cholangiocarcinoma by Inducing NF- κ B-Mediated Cell Apoptosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(3): 1152-1166.
- [24] Lu X, Nowicka U, Sridharan V, et al. Structure of the Rpn13-Rpn2 complex provides insights for Rpn13 and Uch37 as anticancer targets [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15540.
- [25] 何海波, 王喆, 孔锐. RKIP 在舌鳞癌组织及转移淋巴结中的表达及意义 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2013, 29(9): 535-537.
- [26] 周元, 宋玉波, 盛善桂, 等. Rce1 基因在舌鳞状细胞癌中的表达及临床意义 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2018, 34(2): 71-74.

收稿日期: 2019-06-12