

LBH589 对人上皮性卵巢癌 OVCAR-3 细胞增殖的抑制作用及机制探讨

晁宏图 邓君丽 马一鸣 王莉

摘要 目的:探讨新型组蛋白去乙酰化酶抑制剂 LBH589 对人上皮性卵巢癌 OVCAR-3 细胞增殖抑制和促进凋亡作用及其机制。**方法:**不同浓度 LBH589 处理细胞后,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测对细胞增殖的影响;AO/EB(台盼蓝、吖啶橙溴化乙啶双染色法)检测细胞凋亡;Western blot 检测聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白水平。**结果:**LBH589 明显抑制 OVCAR-3 细胞增殖,48 h 半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.12 μM。Western blot 检测发现 Caspase-3、PARP-85kD 剪切蛋白增加,Bax 表达增加,Bcl-2 表达减少。**结论:**LBH589 在体外条件下能明显抑制卵巢癌细胞 OVCAR-3 细胞增殖,诱导细胞凋亡。

关键词 LBH589 卵巢癌 细胞增殖 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.03.003

Inhibitory function of LBH589 on the *in vitro* proliferation of human ovarian cancer cell lines and its mechanism

Hongtu CHAO, Junli DENG, Yiming MA, Li WANG

Correspondence to: Li Wang; E-mail:13837196622@163.com

Department of Gynecologic Oncology, Henan Cancer Hospital and the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

Abstract Objective: This study was designed to investigate the mechanism and effect of LBH589, a novel histone deacetylase inhibitor, on the growth and apoptosis of the human ovarian cancer cell line OVCAR-3. **Methods:** The cells were treated with LBH589 at different concentrations. Cell proliferation was determined using the methyl thiazol tetrazolium assay. The apoptotic rate of the cells was detected by AO/EB double-staining. Protein expressions of polyADP-ribose polymerase (PARP), caspase-3, bcl-2, and bax were analyzed by western blot assay. **Results:** LBH589 significantly inhibited the proliferation of OVCAR-3 cells at a concentration of 0.12 μM/L based on a 48 h half-inhibitory concentration (IC₅₀). Western blot assay showed that the expressions of cleaved PARP-85KD, caspase-3, and bax were increased, but bcl-2 expression was downregulated. **Conclusion:** LBH589 *in vitro* can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of the human ovarian cancer cell line OVCAR-3.

Keywords: LBH589, ovarian cancer, cell proliferation

上皮性卵巢癌是妇科恶性程度最高的肿瘤,大多数患者发现时已是晚期,多烯紫杉醇与铂类联合是治疗卵巢癌的金标准,但容易产生耐药。5年生存率并无明显提高,为30%左右。LBH589是一种新型的HDAC(组蛋白去乙酰化酶)抑制剂,本研究探讨LBH589对上皮性卵巢癌OVCAR-3细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

LBH589 购自美国 Selleck 公司,用 DMSO 配成 10 mmol/L 备用。RPMI 1640、新生小牛血清为 Gibco 公司产品,MTT 为 Sigma 产品。β-tubulin 购自美国 Abcam 公司,Caspase-3、PARP、Bax、Bcl-2 购自美国

Epitomics Inc 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 OVCAR-3 购自美国菌种保藏中心(ATCC)(Rockville, MD, USA)。用含 10% 新生小牛血清、青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 μg/mL 的 RPMI1640 培养液,在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度条件下培养,每 2~3 天换液传代 1 次。

1.2.2 细胞抑制率的测定 用 MTT 法检测细胞增殖抑制率,取对数生长期细胞制成单细胞悬液,将 2×10³ 个细胞接种于 96 孔培养板,试验分为阴性对照组和药物试验组,并设未加细胞、只加培养液的空白对照组,每个组设 3 个复孔,培养 24 h 后分别加入不同浓度的 LBH589 继续培养 48 h,加入 20 μL/孔 MTT(5 mg/mL),

37°C 孵育 4 h 后,离心 1 000 r/min, 10 min,弃上清加入 DMSO 150 μ L,震荡 10 min,至紫色结晶完全溶解,选择 560 nm 波长,酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 OD 值(A 值),以空白对照 OD 值调零,试验重复 3 次,计算抑制率(%)=1-(试验组 A 值-空白对照组 A 值)/(阴性对照组 A 值-空白对照组 A 值) \times 100%。

1.2.3 AO/EB 荧光染色 取对数生长期细胞制成单细胞悬液,用 5×10^4 个细胞接种于 6 孔培养板,试验分为阴性对照组和药物试验组,培养 24h 后加入 $0.01\times$ nM LBH589 继续培养 48 h,用 2.5 g/L 胰酶消化后离心,用 PBS 洗后离心弃上清,加入 100 μ L 吖啶橙(AO 100 μ g/mL)、溴化乙啶(EB 100 μ g/mL)混合后滴片,立即用荧光显微镜观察。

1.2.4 Western blot 检测 细胞接种和药物浓度与上述相同。处理细胞 48 h 后提取蛋白质,BCA 方法进行蛋白定量,行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶于 37°C 温箱内封闭纤维素膜 30 min,加入一抗处理 4°C 过夜,第二天与二抗杂交 1 h 后 TBST 洗涤 3 次,用 WB 成像系统及分析图像软件(ImageQuant LAS4000)发光显像。检测蛋白表达水平。

1.3 统计学方法

应用 GraphPad Prism 4.00 软件进行 one-way ANOVA。

2 结果

2.1 LBH589 对 OVCAR-3 细胞增殖的影响

不同浓度(0~10 μ M)LBH589 处理 OVCAR-3 细胞 24、48、72 h 可明显抑制 OVCAR-3 细胞增殖,并呈剂量及时间依赖性(图 1)。LBH589 作用于 OVCAR-3 细胞 48 h 半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.12 μ M。同时,倒置显微镜下发现,细胞形态发生改变,发生固缩、碎裂,失去贴壁能力,呈现明显的凋亡特征。

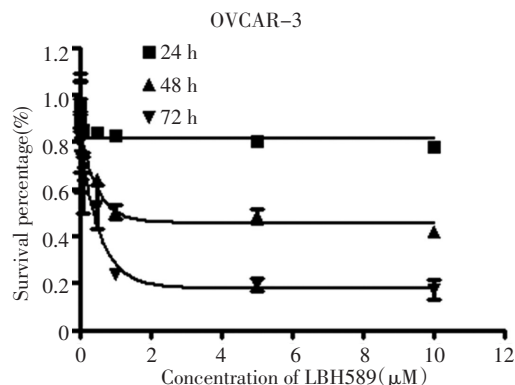
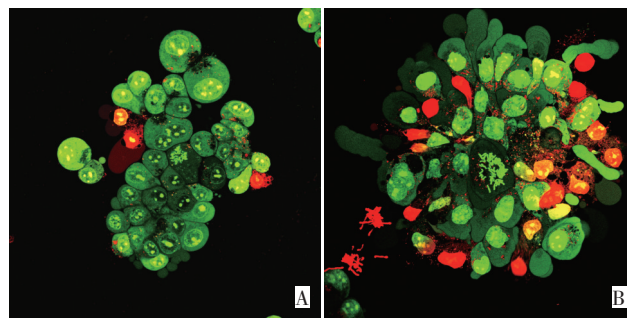


图1 LBH589对OVCAR-3细胞的增殖抑制作用

Figure 1 Inhibitory effect of LBH589 on the proliferation of the human ovarian cancer cell line OVCAR-3

2.2 AO/EB 染色

正常对照细胞主要呈细胞核绿色淡染,胞浆桔黄或桔红色,早期凋亡细胞的细胞膜尚完整,胞浆发生固缩,细胞核固缩或碎裂,呈致密浓染的黄绿色,有的还可见碎块状。晚期凋亡细胞的胞膜通透性增加,EB能够通过,呈鲜红色固缩体或碎块,坏死细胞为鲜红色的膨大细胞(图 2)。



A: OVCAR-3 cells; B: OVCAR-3 cells after treatment with LBH589

图2 AO/EB染色法观察OVCAR-3细胞凋亡的形态学变化

Figure 2 Morphological changes in apoptotic OVCAR-3 cell observed via AO/EB assay

2.3 LBH589 对 OVCAR-3 细胞相关凋亡蛋白的影响

LBH589 作用 OVCAR-3 细胞 48 h 后, Caspase-3、PARP-85kD 蛋白表达增加, pro-Caspase-3、PARP-115kD 蛋白无明显变化, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少, 促凋亡指标 Bax 蛋白表达增多。

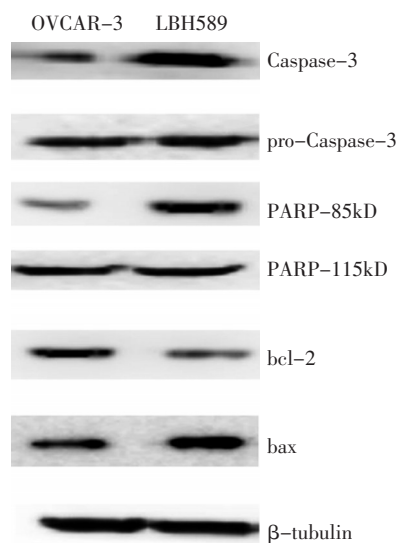


图3 LBH589处理OVCAR-3细胞对凋亡蛋白的影响

Figure 3 Effect of LBH589 treatments on apoptosis-related proteins of the human ovarian cancer cell line OVCAR-3

3 讨论

LBH589 是新一代广谱的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂,在多项体外研究证明 LBH589 能诱

导多发性骨髓瘤、甲状腺癌、乳腺癌细胞的凋亡^[1-3]。有的已经进入临床试验^[4-5],为了明确LBH589对卵巢癌细胞的抗肿瘤作用,本研究从抑制细胞增殖和促进细胞凋亡两方面观察其对卵巢癌细胞OVCAR-3细胞株的影响。

细胞增殖与细胞周期的运转有密切的关系,调控细胞周期可以影响细胞增殖。细胞周期的调控异常是肿瘤发生的重要机制。本研究用MTT法检测细胞增殖抑制率,发现LBH589抑制了OVCAR-3细胞的增殖,并随着剂量和时间的增加,抑制率增加。LBH589可使细胞周期阻滞于G₂/M期^[6-7],LBH589影响细胞周期进程可能涉及多个细胞周期调控相关蛋白,说明LBH589有较广的抗癌靶点。

AO/EB染色法从形态上观察LBH589作用OVCAR-3细胞后凋亡的变化。AO可以透过细胞膜,将细胞核内的DNA染成绿色,胞浆内的RNA呈桔红色。坏死细胞不仅细胞膜不完整,而且线粒体肿胀,为鲜红色的膨大细胞^[8]。LBH589处理OVCAR-3细胞后可以观察到此变化,说明LBH589作用OVCAR-3细胞后可以诱导细胞凋亡,且和药物浓度及作用时间呈正相关。

凋亡信号通路缺陷是许多肿瘤组织的特性,也和肿瘤抗药性相关。促进肿瘤细胞凋亡是治疗肿瘤的有效手段。Bcl-2家族是一类调控细胞凋亡的关键蛋白,研究表明,HDAC抑制剂可以通过调控Bcl-2家族蛋白的表达,活化凋亡信号转导通路,进而诱导细胞凋亡^[9]。PARP的剪切通常认为是Caspase-3途径激活的标志^[10]。通过Western blot检测凋亡通路的关键分子发现,LBH589作用OVCAR-3细胞48 h后底物PARP-85 kD增加,抗凋亡指标Bcl-2蛋白表达减少,促凋亡指标Bax蛋白表达增加。因此,LBH589诱导卵巢癌细胞OVCAR-3发生凋亡的机制主要是通过调控Bcl-2家族蛋白Bax和Bcl-2的表达,激活Caspase-3凋亡通路,进而诱导肿瘤细胞凋亡。

本研究结果表明,LBH589可以明显抑制卵巢癌细胞OVCAR-3的增殖,与剂量及作用时间呈正相关,通过调节Bcl-2家族蛋白的表达,诱导细胞凋亡,具有抗肿瘤作用,为将来的临床试验和应用提供了实验依据。

参考文献

- 1 Zhang L, Ma YP, Jia G, et al. Inhibitory Effect of Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 on Multiple Myeloma MM1R Cells In Vitro [J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Za Zhi, 2012, 20(5):1122-1126.
- 2 Catalano MG, Fortunati N, Puqlesse M, et al. Histone deacetylase inhibition modulates E-cadherin expression and suppresses migration and invasion of anaplastic thyroid cancer cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(7):E1150-1159.

- 3 Kubo M, Kanaya N, Petrossian k, et al. Inhibition of the proliferation of acquired aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells by histone deacetylase inhibitor LBH589 (panobinostat)[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 137(1):93-107.
- 4 Atadja P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat(LBH589):successes and challenges[M]. Cancer Lett, 2009, 280: 233.
- 5 Strickler JH, St arodub AN, Jia J, et al. Phase I study of bevacizumab, everolimus, and panobinostat (LBH-589) in advanced solid tumors[J]. Cacer Chemother Pharmacol, 2012, 70(2):251-258.
- 6 Prystowsky MB, Adomako A, Smith RV, et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 inhibits expression of mitotic genes causing G2/M arrest and cell death in head and neck squamous cell carcinoma cell lines[J]. J Pathol,2009,218(4):467-477.
- 7 Qian DZ, Kato Y, Shabbeer S, et al. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(2):634-642.
- 8 杨连军,司晓辉,王文亮,等.六种染色后光镜观察法检测肝癌细胞凋亡[J],实用医技杂志,2006,13(1):8-9.
- 9 Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(17):7834-7838.
- 10 冀保卫,陈谦学,田道锋,等.MS-275 阻断STAT3 信号通路诱导U251 细胞凋亡[J].中华实验外科杂志,2011,28(2):252-254.

(2012-12-02收稿)

(2013-01-15修回)

(本文编辑:郑莉)