

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201506002

· 论著 ·

卡铂诱导的氧化压力对 HN-3 人喉鳞癌 细胞迁徙的影响

毛雯静¹, 张焕康¹, 沈波², 何培杰^{1,3}

(1. 复旦大学附属耳鼻喉科医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200031; 2. 复旦大学放射医学研究所, 上海 200032; 3. 复旦大学公共卫生临床中心, 上海 201508)

摘要: **目的** 观察卡铂(carboplatin)对 HN-3 人喉鳞癌细胞迁徙的影响, 探讨活性氧生成在其中的作用。**方法** 用卡铂以不同孵育浓度、不同孵育时间处理 HN-3 细胞, MTT 法测定细胞活力, H2DCFDA 染色测定活性氧生成, 细胞划痕(Wound healing)评价细胞迁徙, 蛋白印迹法(Western blotting)测定表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)表达。**结果** 卡铂诱导 HN-3 细胞活性氧生成, 对外培养的 HN-3 细胞增殖活力和迁徙有抑制作用, 呈剂量依赖性和时间依赖性; 卡铂诱导氧化压力下 EGFR 表达下调。**结论** 卡铂可抑制人喉鳞癌 HN-3 细胞增殖与迁徙, 其机制可能与卡铂诱导 HN-3 细胞活性氧生成及氧化压力下 EGFR 表达下调有关。

关键词: 喉肿瘤; 鳞状细胞癌; 卡铂; 氧化压力; 迁徙

中图分类号: R739.65 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2015)06-0439-05

The role Played in carboplatin-induced oxidative stress in migration suppression of HN-3 human laryngeal carcinoma cells

MAO Wen-jing, ZHANG Huan-kang, SHEN Bo, HE Pei-jie

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Affiliated Eye, Ear, Nose and Throat Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role played in carboplatin-induced oxidative stress in suppressing cell viability and migration of HN-3 human laryngeal squamous carcinoma cells. **Methods** The attached HN-3 carcinoma cells were treated with carboplatin of different concentration and 0.08 mg/ml carboplatin at indicated time points. MTT assay was used for detecting the cellular viability. H2DCFDA staining was performed to monitor reactive oxygen series (ROS) generation. Wound healing assay was used to for assessing the cell migration; and the Western blot technique for detecting the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR). **Results** Remarkable ROS generation of HN-3 cells were initiated by carboplatin in dose-related manner. Carboplatin-induced suppression of cellular viability and migration on HN-3 cells was exhibited in a dose and time related pattern. Down-regulated expression of EGFR under oxidative stress was induced by carboplatin. **Conclusion** Generation of ROS and down-regulated EGFR expression under oxidative stress may play an important role in the suppression of cellular viability and migration of HN-3 cells exerted by carboplatin.

Key words: Laryngeal neoplasms; Squamous cell carcinoma; Carboplatin; Oxidative stress; Migration

细胞在其氧化代谢过程中会产生活性氧(reactive oxygen series, ROS)等副产品, 在病理情况下(如某些外源化合物、电离辐射刺激等)ROS水平明显增高, 氧化与抗氧化失衡, 导致氧化压力损伤, 引

起肿瘤、糖尿病、神经退行性病变等多种疾病。在肿瘤的发生发展过程中, 亚致死水平的轻度氧化压力可激发细胞增殖、突变等有关的细胞信号通路, 而高度的氧化压力又可促进细胞早衰、凋亡或坏死^[1]。

作为第二代铂类抗癌药卡铂, 是细胞周期非特异性药物, 可抑制癌细胞的 DNA 复制过程, 并损伤其细胞膜上结构, 因较其第一代同类化合物顺铂具有更低的毒副作用而广泛用于非小细胞肺癌、卵巢

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81172557); 教育部留学回国人员科研启动基金(第45批)。
作者简介: 毛雯静, 女, 硕士研究生。
通信作者: 何培杰, Email: hepj2002@sina.com

癌、头颈部鳞癌等的化疗。研究表明,卡铂可通过增加 ROS 生成及诱导内质网氧化压力杀伤肿瘤细胞,并诱导其凋亡^[2]。本实验以体外培养的 HN-3 人喉鳞癌细胞为研究对象,观察卡铂对 HN-3 细胞增殖和迁徙的影响,探讨卡铂诱导的氧化压力在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养方法

AMC-HN-3 细胞(韩国 Asan Medical Center 赠送)由 1 例先前未经任何治疗的 63 岁男性喉鳞状细胞癌患者标本分离纯化而来^[3],培养在含有 10% 胎牛血清混合 100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基。恒温箱培养条件为饱和湿度,5% CO₂,95% 空气,37 $^{\circ}$ C。0.25% 胰酶 - 0.01% EDTA 消化传代细胞。在直径 10 cm 培养皿培养的 HN-3 细胞融合达到 80% ~ 90% 可进行实验。将标本分为 ① 对照组;② 0.04 mg/ml 卡铂;③ 0.08 mg/ml 卡铂;④ 0.08 mg/ml 卡铂 + 5 mM GSH;⑤ 5 mM GSH 共 5 组。

1.2 主要试剂与抗体

细胞培养相关试剂购于美国 Hyclone 公司。H2DCFDA (D399) 购于美国 Molecular Probes 公司。GAPDH 购于 Abcam 公司。EGFR 购于美国 Santa-Cruz 公司。

1.3 抗氧化治疗

谷胱甘肽(GSH)为一类非酶抗氧化物质,以 5 mM GSH 与 0.08 mg/ml 卡铂共同孵育细胞,观察各组的细胞活力、迁徙及 EGFR 表达的异同。

1.4 MTT(四甲基偶氮唑盐)实验

细胞增殖活力由 MTT 实验进行评价。按规定的时间^[4]处理标本后,50 μ l MTT 液体(2 mg/ml)加入 96 孔板培养孔孵育 2 h 后,将 MTT 液更换为 100 μ l DMSO。经 20 s 振荡后,测量 540 nm 波长吸光率,细胞活力百分比按下述公式进行计算:细胞活力(%) = 治疗组平均吸光率/对照组平均吸光率 * 100%。每组 3 个复孔,重复 3 次。

1.5 激光共聚焦显微镜

活性氧生成通过 H2DCFDA 染色进行评价。简要步骤包括:标本经卡铂处理达到要求的时间点后,以 2 μ M H2DCFDA 37 $^{\circ}$ C 下孵育细胞 30 min;之后以 DPBS 轻柔冲洗细胞,激光共聚焦显微镜采集荧光图片。

1.6 细胞划痕实验

标本孵育 24 h 后,立即以 1.2 mm 头宽细胞刷在培养皿底部划痕,用 PBS 清洗 3 次,然后加入 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,并拍照,记为 0 h。划痕后 12、24、36 和 48 h 后在原位置分别拍照,通过 0 与 12、24、36 和 48 h 痕宽相减计算细胞迁徙距离,以反应划痕愈合能力。实验重复 3 次。

1.7 蛋白印迹实验

细胞划痕后 48 h 拍照完毕后,收集细胞,抽提细胞总蛋白,-20 $^{\circ}$ C 保存。调整各组总蛋白浓度使每孔上样量一致(100 μ g),10% 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离后将蛋白转到硝酸纤维素膜。经过脱脂奶粉封闭和洗膜的步骤后,分别加入目的抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜。然后按照 1:2000 稀释浓度加入抗兔或小鼠的过氧化物酶偶联的二抗室温标记 1 h,最后进行显影、水洗、定影后观察结果。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ (SD) 表示,应用 SPSS 11.0 软件处理数据,组间率的比较用方差分析检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 卡铂对 HN-3 细胞增殖的影响

通过 MTT 实验来评价卡铂对 HN-3 细胞增殖的影响。随着卡铂浓度的增加,细胞活力相应下降,增殖活力降低(图 1),呈剂量与时间相关性。图 2 显示 0.08 mg/ml 卡铂较对照组细胞活力显著降低($P < 0.01$)。以 5 mM GSH 与 0.08 mg/ml 卡铂共同孵育 HN-3 细胞,较 0.08 mg/ml 卡铂单独孵育组细胞增殖活力明显提高($P < 0.01$)。5 mM GSH 单独孵育组与对照组细胞增殖活力比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

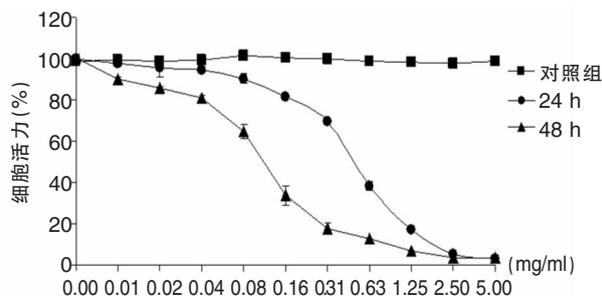


图 1 不同剂量卡铂对 HN-3 细胞增殖活力的影响

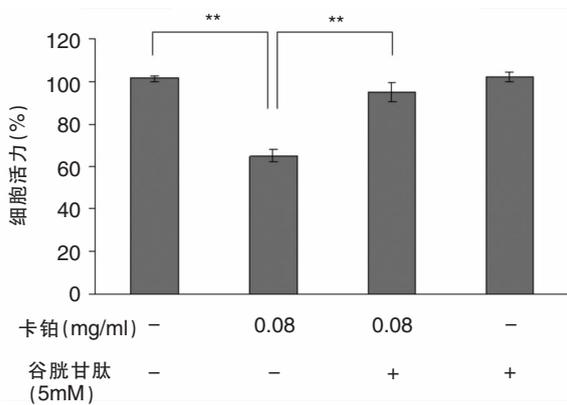


图2 0.08 mg/ml 卡铂与谷胱甘肽(GSH)对 HN-3 增殖的影响

2.2 卡铂诱导 HN-3 细胞活性氧生成

荧光标记染料 H2DCFDA 本身不发荧光,经过

ROS 氧化可转换成有绿色荧光的 DCFDA^[5]。因此, H2DCFDA 染色可间接体现 ROS 生成及氧化压力的强弱。经过 24 h 孵育,从 0.02 mg/ml 至 0.63 mg/ml 卡铂处理的 HN-3 细胞生成的活性氧逐渐增多, DCFDA 荧光逐渐增强,诱导的氧化压力呈卡铂剂量相关性(图 3)。

2.3 卡铂诱导 HN-3 细胞迁徙抑制

与对照组相比,卡铂组 HN-3 细胞在孵育 12、24、36、48 h 后迁徙距离均明显减少 ($P < 0.01$), 0.08 mg/ml 卡铂组较 0.04 mg/ml 卡铂组迁徙距离减少 ($P < 0.01$)。与 0.08 mg/ml 卡铂组相比, 0.08 mg/ml 卡铂 + 5 mM GSH 组的细胞迁徙距离显著增加(12、24、36、48 h 组 $P < 0.01$); 5 mM GSH 单独处理组与对照组的细胞迁徙距离差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4A、B)。

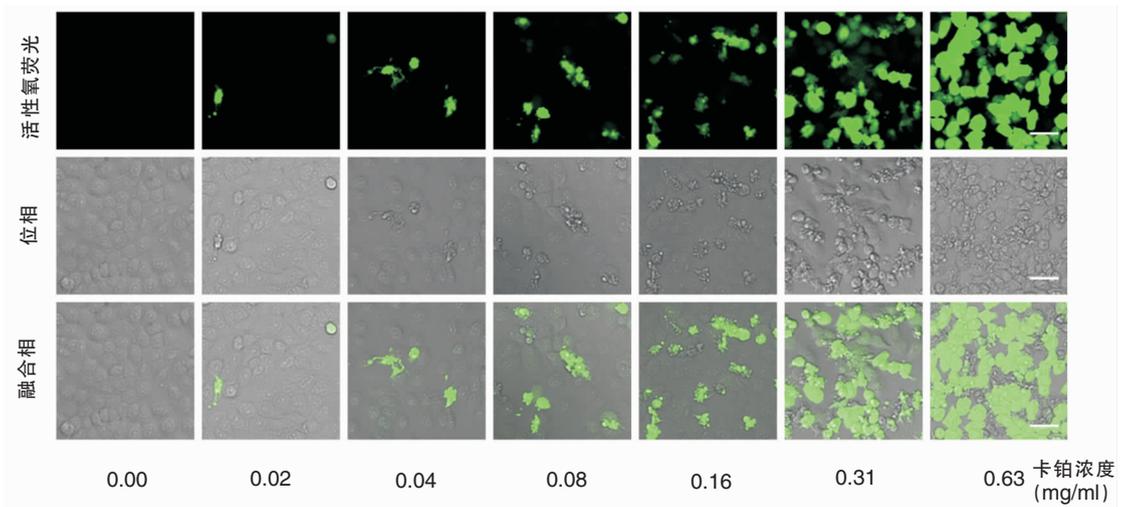


图3 不同剂量卡铂诱导 HN-3 细胞活性氧生成

2.4 卡铂诱导氧化压力下的 HN-3 细胞表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)表达下降

蛋白印迹实验显示,卡铂组 EGFR 表达量较对照组明显减少,0.08 mg/ml 卡铂组较 0.04 mg/ml 卡铂组 EGFR 表达下降。与 0.08 mg/ml 卡铂组相比,0.08 mg/ml 卡铂 + 5 mM GSH 组的 EGFR 表达量增加,显示出活性氧生成在卡铂诱导 EGFR 表达中的作用。5 mM GSH 单独处理组与对照组的 EGFR 表达量相近(图 5)。

3 讨论

研究发现,几乎所有肿瘤细胞均有一个共同点,

即细胞内抗氧化酶活性较正常细胞低,对 ROS 的清除效率低。因此提高肿瘤细胞内的 ROS 含量,无疑有利于对肿瘤细胞的损伤和抑制^[6-7]。卡铂是一种类烷化剂的抗肿瘤药物,其作用的分子机制为引起 DNA 链间及链内交联,破坏 DNA 而抑制肿瘤的生长^[8]。我们先前的研究显示,卡铂能够诱导 HN-3 细胞凋亡,呈剂量与时间依赖性。随着卡铂孵育时间延长,及孵育浓度的增加,HN-3 细胞生成的 ROS 逐渐增多,凋亡的细胞数也逐渐增多(结果未给出)。表明卡铂诱导的 ROS 生成可能在其诱导 HN-3 细胞凋亡过程中发挥重要作用。本研究结果显示,卡铂能够显著抑制 HN-3 细胞增殖(图 1、2)与迁徙(图 4、5),呈剂量与时间依赖性。同时卡铂诱导 HN-3 细胞 ROS 生成,呈剂量依赖性(图 3)。

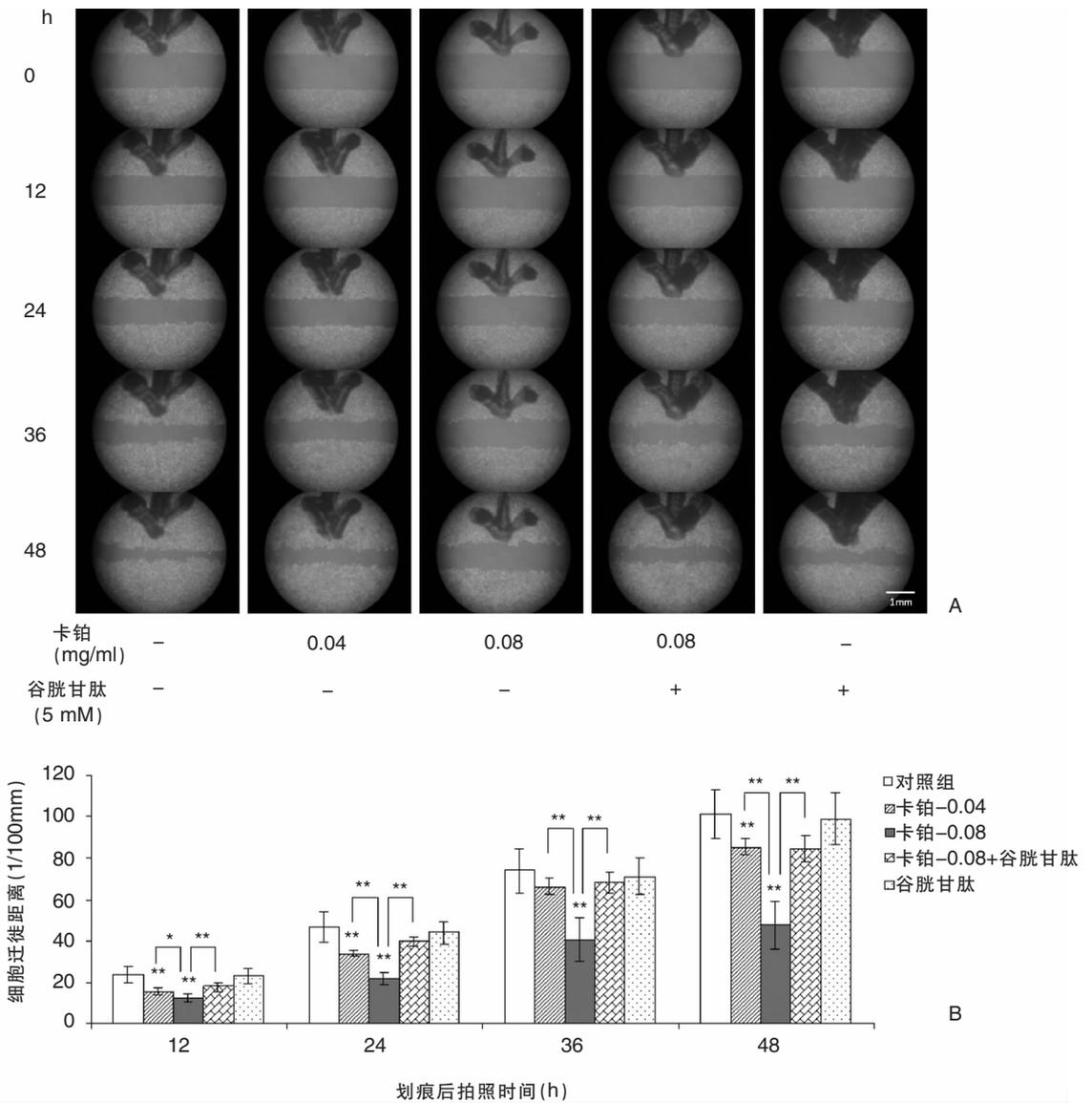


图 4 0.04 mg/ml、0.08 mg/ml 卡铂与 GSH 孵育对 HN-3 细胞迁徙的影响 (* P < 0.05, ** P < 0.01)

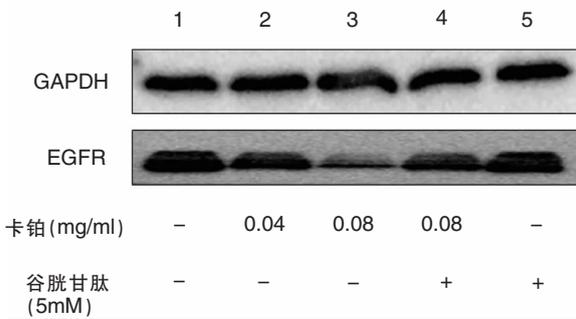


图 5 GSH 对卡铂诱导 HN-3 细胞 EGFR 表达的影响

为了验证 ROS 生成在卡铂抑制 HN-3 细胞增殖与迁徙中的作用,我们使用抗氧化剂 GSH 与卡铂同时孵育 HN-3 细胞。结果显示 GSH + 卡铂组较单独

卡铂组 ROS 生成明显受抑制(未给出)。同时,GSH + 卡铂组较单独卡铂组细胞活力增强(图 2),细胞迁徙抑制受到明显阻滞(图 4),表明卡铂诱导的氧化压力在其抑制 HN-3 细胞增殖及迁徙过程中发挥决定性作用。

EGFR 是一种具有酪氨酸激酶活性糖蛋白,能通过多条信号转导通路发挥作用,其主要有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡并促进其侵袭和转移,促进血管生成等作用^[9]。正因为这些 EGFR 信号通路相关的肿瘤生物学行为特性,针对 EGFR 阻滞的靶向治疗逐渐被考虑作为头颈部恶性肿瘤的候选治疗措施^[10]。本实验结果显示(图 5),与对照组相比,卡铂组 EGFR 表达明显下调,呈剂量相关性;GSH + 卡铂组较单独卡铂组 EGFR 表达量增多,GSH 单独孵

育组 EGFR 表达量与对照组相当。这些结果表明氧化压力下超氧阴离子、过氧化氢等 ROS 组份在卡铂诱导 HN-3 细胞 EGFR 的表达下调与迁徙抑制方面发挥重要作用。EGFR 也因此有可能成为卡铂治疗喉癌的新的靶点。

我们曾尝试卡铂联合光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)治疗 HN-3 细胞,结果表明,联合治疗组较单一治疗组有协同的细胞毒性杀伤效果和凋亡诱导^[11]。诱导大量的 ROS 产生是 PDT 的主要机制之一^[12]。进而我们提出卡铂可能是通过增加 PDT 的 ROS 生成途径增强其光化学毒性,本实验结果进一步支持了这一假说。联合治疗后能否协同产生 ROS,调控 ROS 生成后细胞毒性杀伤效果和凋亡诱导能否随之改变,具体参与的凋亡信号传导通路均需进一步实验证实。

参考文献:

[1] Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003,15(2):247-254.

[2] Brozovic A, Vukovic L, Polancac DS, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in the response of human laryngeal carcinoma cells to Carboplatin but is absent in Carboplatin-resistant cells[J]. *PLoS One*, 2013,8(9):e76397.

[3] Kim SY, Chu KC, Lee HR, et al. Establishment and characterization of nine new head and neck cancer cell lines[J]. *Acta Otolaryngol*, 1997,117(5):775-784.

[4] Hwang H, Biswas R, Chung P, et al. Modulation of EGFR and ROS induced cytochrome c release by combination of photodynamic therapy and carboplatin in human cultured head and neck cancer

cells and tumor xenograft in nude mice[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2013,128(1):70-77.

[5] Afri M, Frimer AA, Cohen Y. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer[J]. *Chem Phys Lipids*, 2004,131(1):123-133.

[6] Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2014,14(11):709-721.

[7] Zhang Z, Zhang H, Hu Z, et al. Synergy of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and carboplatin in growth suppression of SKOV-3 cells [J]. *Oncol Lett*, 2014,8(3):1348-1354.

[8] Hato SV, Khong A, de Vries IJ, et al. Molecular pathways: the immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics [J]. *Clin Cancer Res*, 2014,20(11):2831-2837.

[9] Hirsch FR, Herbst RS. EGFR expression and the flexibility of FLEX[J]. *Lancet Oncol*, 2012,13(1):3-5.

[10] Martinez-Carpio PA, Trelles MA. The role of epidermal growth factor receptor in photodynamic therapy: a review of the literature and proposal for future investigation[J]. *Lasers Med Sci*, 2010,25(6):767-771.

[11] He P, Ahn JC, Shin JI, et al. Enhanced apoptotic effect of combined modality of 9-hydroxypheophorbide alpha-mediated photodynamic therapy and carboplatin on AMC-HN-3 human head and neck cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2009,21(2):329-334.

[12] He P, Ahn JC, Shin JI, et al. Photoactivation of 9-hydroxypheophorbide alpha triggers apoptosis through the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway and endoplasmic reticulum stress in AMC-HN-3 laryngeal cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2010,36(4):801-808.

(修回日期:2015-08-20)