

1,9-二取代 β-咔啉在头颈部鳞状细胞癌中抗肿瘤机制的研究

谢章弘¹, 张晓东², 曹日晖³, 华清泉¹

(1. 武汉大学人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖北 武汉 430000; 2. 武汉大学生命科学学院, 湖北 武汉 430000; 3. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510070)

摘 要: **目的** 初步探索 1,9-二取代 β-咔啉(CZY1-4)在头颈部鳞状细胞癌中抗肿瘤机制的研究。**方法** CZY1-4 是一种新合成的 1,9-二取代 β-咔啉,具有抗肿瘤潜力。采用 CCK-8 实验经过 CZY1-4 浓度梯度(0、2、4、6、10、15、20、25、30、40 μmol/L)处理 24 h 后检测细胞活力,筛选出两种对药物较为敏感的头颈部鳞状细胞癌细胞系:喉癌细胞系 Tu177 与舌癌细胞系 Cal-27 为主要研究对象。以浓度梯度(0、2、4、6、8 μmol/L)进行克隆形成实验检测细胞集落形成能力;随后分别以 2 μmol/L 与 4 μmol/L 的 CZY1-4 处理 Tu177 与 Cal-27 24 h 后进行划痕实验和 Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移能力,流式细胞术分析细胞凋亡情况,Western blotting 检测细胞相关蛋白表达量变化,免疫荧光实验检测细胞内自噬小体形成情况等。**结果** 经过上述浓度的 CZY1-4 处理 24 h 后,各头颈部鳞状细胞癌细胞系的生长增殖均受到不同程度的抑制,且呈剂量依赖性,其中 Tu177 与 Cal-27 抑制效果更为显著,两者的克隆形成能力也被显著抑制($P<0.05$);Tu177 与 Cal-27 的迁移能力被显著抑制($P<0.01$); Tu177 与 Cal-27 的侵袭能力被显著抑制($P<0.001$);Tu177 与 Cal-27 凋亡率变化无显著差异($P>0.05$);自噬相关蛋白 ATG5 与 LC3B,Beclin1 蛋白表达量增加,呈剂量依赖性;自噬小体形成显著增加($P<0.01$);药物对被敲除 ATG5 后的 Cal-27 生长、增殖的抑制作用显著减弱($P<0.01$)。**结论** CZY1-4 能显著抑制头颈部鳞状细胞癌相关细胞系的生长、增殖作用,并抑制细胞克隆形成、侵袭和迁移,具有一定的抗肿瘤活性,通过实验初步验证该药物主要通过调控 ATG5 促进细胞自噬的发生进而发挥抗肿瘤效果。

关 键 词: 头颈部鳞状细胞癌;β-咔啉;自噬;肿瘤治疗
中图分类号: R739.91

Antitumor mechanism of 1, 9-disubstituted β-carboline in head and neck squamous cell carcinoma

XIE Zhanghong¹, ZHANG Xiaodong², CAO Rihui³, HUA Qingquan¹

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430000, China; 2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430000, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510070, China)

Abstract: **Objective** To preliminarily explore the antitumor mechanism of 1,9-disubstituted β-carbolines (CZY1-4) in the head and neck squamous cell carcinoma. **Methods** CZY1-4 is a newly synthesized 1,9-disubstituted β-carboline with anti-tumor potential. In the experiment, the CCK-8 experiment was used to detect cell viability after CZY1-4 concentration gradient (0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 40 μmol/L) treatment for 24 hours. Two sensitive head and neck squamous cell carcinoma cell lines (laryngeal carcinoma cell line Tu177 and tongue cancer cell line Cal-27) were selected as the main research objects. Colony formation experiments under the concentration gradient (0,2,4,6,8μmol/L) were used to detect the cell colony-forming ability. After treatment of Tu177 and Cal-27 with 4 μmol/L and 2 μmol/L CZY1-4 for 24 h, wound healing test and Transwell test were conducted to detect cell invasion and migration ability, flow

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81541001)。
第一作者简介:谢章弘,男,在读硕士研究生,住院医师。
通信作者:华清泉,Email:hqqr@sina.com

cytometry to analyze cell apoptosis, Western blotting to detect changes in the expression of cell-related proteins, and immunofluorescence experiments to detect the formation of autophagosomes in cells. **Results** After 24 h treatment with the above-mentioned concentrations of CZY1-4, the growth and proliferation of squamous cell carcinoma lines of head and neck were inhibited to varying degrees in a dose-dependent way, among which Tu177 and Cal-27 had more significant inhibition effect, and their colony forming abilities were also significantly inhibited ($P < 0.05$). The migration abilities and invasive abilities of Tu177 and Cal-27 were significantly inhibited ($P < 0.01$) ($P < 0.001$). There was no significant difference in apoptosis rate between Tu177 and CAL-27 ($P > 0.05$). The expression levels of autophagy related proteins ATG5, LC3B and Benclin1 increased in a dose-dependent manner. The formation of autophagosome was significantly increased ($P < 0.01$). The inhibitory effect of the drug on the growth and proliferation of CAL-27 after ATG5 knockout was significantly weakened ($P < 0.01$). **Conclusions** CZY1-4 can significantly inhibit the growth and proliferation of squamous cell carcinoma related cell lines, and inhibit the formation, invasion and migration of cell clones. It has certain anti-tumor activity by mainly promoting the occurrence of autophagy through regulating ATG5.

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma; β-carbolines; Autophagy; Oncotherapy

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)主要包括喉癌、下咽癌、唇癌、口腔癌、唾液腺癌等,是全世界发病率最高的癌症之一,每年有超过50万例患者患此癌症,其5年内的生存率只有50%^[1-2]。据最新数据统计,2020年HNSCC发病率与死亡率已位列年全球恶性肿瘤前五,全球HNSCC的发病率总计约为5%~6%,全球新发确诊病例已超百万例,其中2009年到2018年HNSCC的死亡率以每年约2%递增,且发病群体逐渐年轻化^[3-7]。HNSCC局部侵入骨质,转移至区域淋巴结,并向远处转移扩散时,常常导致HNSCC患者预后不良、生活质量下降和存活时间大幅度缩短^[2]。据报道,约25%的患者在诊断后5年内HNSCC复发。一旦疾病复发或转移,患者的中位生存时间仅有10个月^[8]。目前HNSCC的治疗手段主要是手术切除、诱导化疗、同步放化疗综合治疗、靶向治疗、免疫治疗等,其中化疗占有不可或缺的地位,晚期HNSCC患者可选用以顺铂为基础的同步放化疗和靶向药物诱导化疗,但由于顺铂耐药性的存在,使得以顺铂为基础的化疗方案对部分存在顺铂耐药性的肿瘤患者疗效欠佳,部分患者预后情况并不乐观^[1,9-10]。因此,提高化学药物的治疗HNSCC的效率,改善HNSCC患者预后成为亟需解决的问题。

β-咔啉生物碱是一大组与生化效应和药理学性质相关的吡啶生物碱的化合物,有大量研究指出β-咔啉是一类新的潜在抗肿瘤药物,这些药物被发现通过多种作用机制发挥其抗肿瘤作用^[11]。其中N1,N1-二甲基-N3-[9-(3-苯丙基)-β-咔啉-1-甲基]丙烷-1,3-二胺是一种新合成的1,9-二取代β-咔啉,本研究中代号为CZY1-4,该化合物合成、结构表征和DNA结合研究已有相关研究报道^[12]。然而目前

CZY1-4在HNSCC中尚未有相关抗肿瘤机制的研究报道,因此,本研究拟通过一系列实验研究初步探索CZY1-4对HNSCC细胞系的抗肿瘤作用及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系与试剂

人舌癌细胞系:Cal-27,人喉癌细胞系:TU686、SNU899、TU177,人下咽癌细胞系:Fadu, pHAGE-mCherry-EGFP-LC3B Cal-27稳定表达细胞系,Cal-27 ATG5 KO细胞系以上细胞系均由本实验室保存或构建。CZY1-4由中山大学化学化工学院曹日晖教授提供。RPMI 1640培养基、胎牛血清、含EDTA的胰酶、青霉素和链霉素均购于美国Gibco公司;CCK-8试剂盒购于美国MedChemEx-press公司;Transwell小室购于美国Corning公司;细胞周期检测试剂盒和细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;BCA蛋白定量试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;β-actin(货号4967)、PARP(货号9532)、LC3B、ATG5、ATG7、CASPASE3、p62、Benclin1等抗体均购于美国CST公司。

1.2 细胞培养

细胞培养于含10%胎牛血清和1%青霉素或链霉素的DMEM或RPMI1640培养基中,培养条件为:5% CO₂、37℃。待细胞融合度为80%~90%时,用胰酶消化、离心并传代。

1.3 CCK-8

检测细胞活力将对数生长期的细胞消化、离心后,按10 000个/孔的密度均匀接种于96孔板,置于孵箱中培养过夜,待细胞贴壁后,按照按照浓度梯

度(0、2、4、6、10、15、20、25、30、40 $\mu\text{mol/L}$) 加入含 CZY1-4 的新鲜培养基,每个浓度设置 6 个重复孔,置于孵箱中培养 24 h 后,除去上清,每孔加入 100 mL 浓度为 10% 的 CCK-8 试剂继续孵育 1 h,采用酶标仪检测细胞在 450 nm 波长处的吸光度,统计数据。

1.4 克隆形成实验

将对数生长期的细胞按 400 个/孔的密度均匀接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,弃去上清液,加入一定浓度梯度(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$) 的 CZY1-4 的新鲜培养基,置于孵箱中培养,每日更换新鲜培养基,至 10 d 后,待形成明显的集落后,弃去上清液,用 4% 多聚甲醛固定,0.05% 结晶紫染色。Image J 计数分析数据。

1.5 Transwell 实验

将处于生长对数期的消化,离心,无血清培养基悬浮细胞,按 100 μL 1×10^6 个/孔的浓度接种于小室中,空白对照组于小室中加入不含 CZY1-4 的新鲜培养基,实验组分别给予 Tu177、Cal-27 两种细胞系 CZY1-4 浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 与 4 $\mu\text{mol/L}$ 的新鲜培养基,下室加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的培养基,置于恒温孵箱中培养 24 h 后,4% 多聚甲醛室温固定 15 min,0.05% 结晶紫染色 15 min,轻轻拭去小室中未穿膜的细胞,PBS 清洗,独立重复 3 次实验。显微镜下拍照。

1.6 划痕实验

首先在 6 孔板背面均匀画 3 条横线,间隔约为 0.5 ~ 1.0 cm。每孔加入 5×10^5 个细胞。将细胞培养过夜贴壁,待融合度约为 90% ~ 100% 时,用移液枪头垂直于背面的横线划痕,PBS 清洗 2 次,空白对照组于小室中加入不含 CZY1-4 的新鲜培养基,实验组分别给予 Tu177、Cal-27 两种细胞系 CZY1-4 浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 与 4 $\mu\text{mol/L}$ 的新鲜培养基,置于恒温孵箱培养 24 h 后,取样、拍照。

1.7 流式细胞术

取对数生长期的细胞接种至 6 孔板,将细胞培养过夜贴壁后,Tu177 和 Cal-27 分别在浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$ 和 8 $\mu\text{mol/L}$ 的含 CZY1-4 新鲜培养基中分别处理 24 h 后,消化并收集细胞,PBS 清洗 2 次,加入 Annexin V-FITC 和 PI,室温避光孵育 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.8 Western blotting

按照浓度梯度(0、2、4、6、8 $\mu\text{mol/L}$) 加入含 CZY1-4 的新鲜培养基处理细胞 24 h,消化并收集细胞,提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度, $5 \times$

loading buffer 将样品稀释至同一浓度。将等量的细胞蛋白通过 SDS-PAGE 凝胶分离并湿转至 PVDF 膜,脱脂牛奶或 BSA 封闭 1 h,加入一抗(1:1 000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗涤,加入二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤,最后在 PVDF 膜上滴加 ECL 显影液进行发光检测。

1.9 免疫荧光实验

将盖玻片处理后于 6 孔板进行细胞爬片,将密度大约为 30% 的 pHAGE-mCherry-EGFP-LC3B Cal-27 稳定表达细胞系种于盖玻片。细胞贴壁后,加入浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$ 的含 CZY1-4 新鲜培养基处理 24 h 后,去除上清,加入一定量 4% PFA,固定细胞 15 min,吸走固定液,使用 PBS 清洗 3 遍,再加入 0.5% Triton-X100,同样浸没细胞爬片,透化,弃去透化液体,PBS 清洗 3 遍,使用 DAPI (稀释比例 1:1 000)孵育盖玻片于 37 $^{\circ}\text{C}$ 约 20 min,最后在共聚焦显微镜下观察。

1.10 统计学分析

使用 Graphpad prism 8.0 及 SPSS 进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CZY1-4 对 HNSCC 细胞系生长和增殖的抑制作用

CCK-8 实验结果表明,CZY1-4 对人舌癌细胞系 Cal-27,人喉癌细胞系 TU686、SNU899、Tu177,人下咽癌细胞系 Fadu 的生长和增殖均具有明显的抑制作用,且呈剂量依赖性,其中 Cal-27 与 Tu177 更为敏感,药物浓度分别为 2 $\mu\text{mol/L}$ 与 4 $\mu\text{mol/L}$ 时,对 Cal-27 和 Tu177 抑制效果达到 50% (图 1A)。因 CZY1-4 对其他 HNSCC 细胞敏感度不如以上两种细胞系,故主要使用 Cal-27 和 Tu177 进行后续实验。加入一定药物浓度梯度的 CZY1-4 后,Tu177 与 Cal-27 细胞集落形成能力显著下降,且随着浓度的升高,抑制作用越为明显,当药物浓度分别为 2 $\mu\text{mol/L}$ 与 4 $\mu\text{mol/L}$ 时,对 Tu177 和 Cal-27 的克隆形成抑制率达到 50% (图 1B)。

2.2 CZY1-4 抑制 HNSCC 细胞系的迁移和侵袭

划痕实验结果显示,实验组细胞的迁移率显著低于对照组,TU177 对照组与实验组比较差异具有统计学意义[(64.25 $\pm$ 3.51)% vs (29.56 $\pm$ 2.13)%, $P = 0.0026$];Cal-27 对照组与实验组比较差异具有统计

学意义 $[(61.70 \pm 2.26)\% \text{ vs } (29.40 \pm 2.67)\%, P = 0.0002]$;实验组发生侵袭的细胞数显著低于对照组,Tu177 对照组与实验组比较差异具有统计学意义 $[(318.73 \pm 37.12) \text{ vs } (86.33 \pm 25.13), P = 0.0005]$;Cal-27 对照组与实验组比较差异具有统计学意义 $[(314.33 \pm 40.43) \text{ vs } (63.67 \pm 14.64), P = 0.0005]$ 。见图2。

2.3 CZY1-4 未显著促进 HNSCC 细胞系的凋亡

为了验证 CZY1-4 是否通过促进 HNSCC 细胞系的凋亡抑制生长和增殖,在流式细胞术分析中发现,Tu177 对照组与实验组比较差异具有统计学意

义 $[(5.27 \pm 0.68)\% \text{ vs } (10.33 \pm 3.18)\%, P = 0.0541]$;Cal-27 对照组与实验组比较差异具有统计学意义 $[(10.30 \pm 1.53)\% \text{ vs } (12.37 \pm 2.16)\%, P = 0.0695]$ 实验组 Tu177 与 Cal-27 细胞凋亡率无显著差异(图3)。

2.4 CZY1-4 促进 HNSCC 细胞系的自噬

Western blotting 分析结果显示,Tu177 与 Cal-27 在经一定浓度梯度的 CZY1-4 处理 24 h 后,凋亡相关蛋白(PARP,P53,CASPASE3)的表达无显著的改变,与流式细胞术分析结果可相互验证(图4A)。

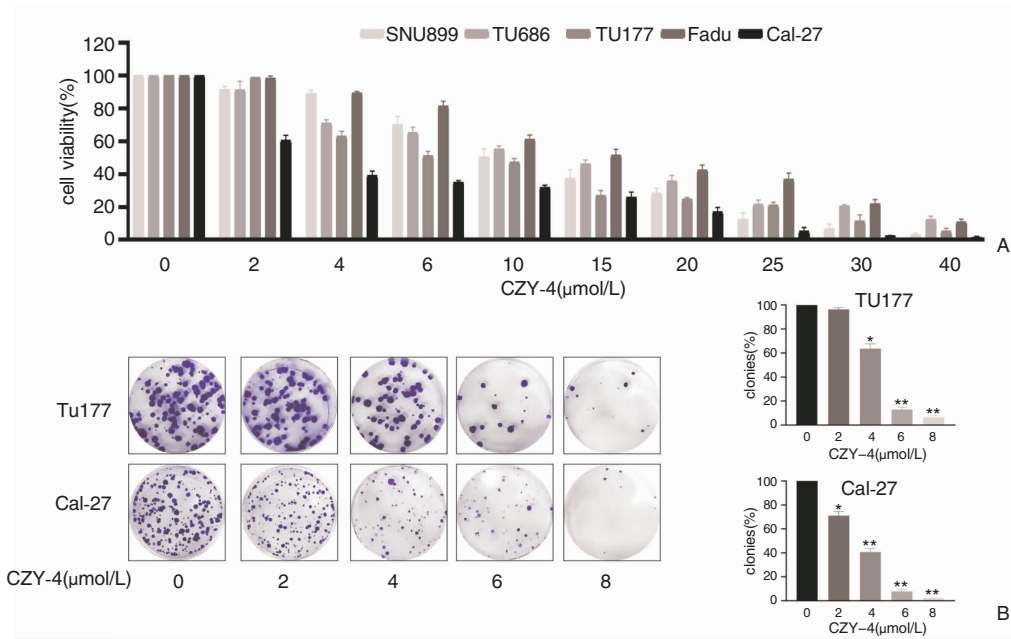


图1 CCK-8 实验与克隆形成实验 A: CZY1-4 对各 HNSCC 细胞的生长与增殖具有显著抑制作用,且呈剂量依赖性; B: CZY1-4 对 Tu177 与 Cal-27 的克隆形成具有显著抑制效果且呈剂量依赖性(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

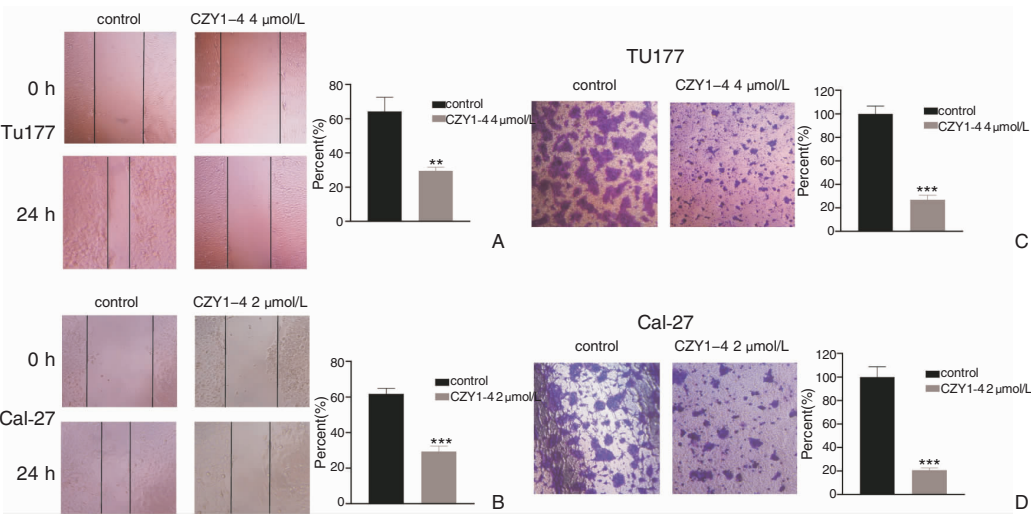


图2 划痕实验与 Transwell 实验 A、B: CZY1-4 对 Tu177 与 Cal-27 的迁移能力具有显著的抑制作用(** $P < 0.01$); C、D: CZY1-4 对 Tu177 与 Cal-27 的侵袭能力具有显著的抑制作用(*** $P < 0.001$)

同时发现,自噬相关蛋白的表达有明显的趋势变化,随着药物处理浓度递增,ATG5 与 LC3B,Beclin1 蛋白表达量也随之递增(图 4A),这提示药物处理可能通过促进细胞自噬抑制细胞生长与增殖。随后构建了 Cal-27 pHAGE-mCherry-EGFP-LC3B 稳定表达细胞系,进行免疫荧光实验。以过表达 LC3B 的 Cal-27 细胞加入 $4\text{ }\mu\text{mol/L}$ CZY1-4 处理 24 h 为实验组,以不加入 CZY1-4 的空白处理组为对照组,免疫荧光实验结果显示:实验组相对于对照组,细胞内自噬小体数量及荧光强度皆显著升高[平均每个细胞内自噬小体数量对照组 vs 实验组: $(1.27 \pm 0.73)\%$ vs $(72.33 \pm 10.63)\%$, $P = 0.0003$](图 4B)。

2.5 CZY1-4 对 Cal-27 ATG5^{-/-}细胞系的生长、增殖抑制作用减弱

构建 ATG5 敲除 Cal-27 细胞系后,以一定浓度梯度处理 Cal-27 野生型(WT)和 Cal-27 ATG5^{-/-}细胞系 24 h 后,Western blotting 检测相关蛋白的表达量,实验结果显示:敲除 ATG5 后,LC3B-II 无表达, P62 表达量随药物处理浓度增加略微升高, Beclin1 表达量随药物处理浓度增加略微下降(图 5A)。CCK8 实验结果显示:同等药物浓度处理下,与野生型 Cal-27 相比,CZY1-4 对 ATG5^{-/-}Cal-27 细胞系的生长、增殖的抑制作用减弱,即 ATG5^{-/-}Cal-27 对 CZY1-4 的敏感性显著降低(图 5B)。

2.6 CZY1-4 通过促进自噬小体的形成促进细胞自噬

最后,为了排除 CZY1-4 并非通过酸化溶酶体阻断自噬小体的降解途径(氯喹 CQ 的作用原理)促进细胞自噬,在野生型 Cal-27 细胞系中分别用 CZY1-4 和氯喹处理后,进行 Western blotting 检测 LC3B 表达量的变化,结果提示相比于氯喹单独处理组,CZY1-4 单独处理组和 CZY1-4、氯喹联合处理组的 LC3B-II 表达量均显著增高(图 5C),故可初步验证 CZY1-4 是通过促进自噬小体的形成而非阻断自噬小体的降解促进细胞自噬。

3 讨论

HNSCC 作为全球最常见的恶性肿瘤之一,目前主要治疗手段主要是手术切除、诱导化疗、同步放化疗综合治疗等,对于晚期 HNSCC 患者仍然以顺铂为基础的同步放化疗和靶向药物诱导化疗为主,但由于顺铂耐药性的存在,使得以顺铂为基础的化疗方案对部分存在顺铂耐药性的肿瘤患者疗效欠

佳^[2,9-11]。因此,迫切需要开发新的治疗策略来解决晚期 HNSCC 复发及转移的治疗难题。

β 咔啉生物碱是一种具有多种生物学和药理学特性的化合物,作为一种新型抗肿瘤药物,近年研究者们设计并制备了大量 β 咔啉衍生物。研究发现部分 β 咔啉单体衍生物能通过抑制磷酸化 AKT、激活 ROS、激活 caspase 信号通路、阻滞 G2/M 期细胞周期等机制引起凋亡进而表现出更显著的抗肿瘤活性;二价 β 咔啉则能通过增加与 DNA 的结合亲和力、抑制血管形成、诱导线粒体介导和靶向溶酶体介导 PUMA 依赖性的细胞凋亡等机制进而发挥其抗肿瘤活性^[12]。大量研究证明, β 咔啉及其衍生物通过多种且复杂的机制实现其抗肿瘤活性。其中,曹日晖教授通过构造分析发现,1,9-二取代 β -咔啉即(1 号位以柔性烷基氨基侧链取代,9 号位以烷基或芳基化的烷基取代)可改善药物的水溶性并使氨基烷基侧链的柔韧性增加,预计这类衍生物可更强烈地嵌入 DNA 并结合表现更显著的抗肿瘤活性,并通过实验验证 1,9-二取代 β -咔啉能与 DNA 结合并在肾癌、鼻咽表皮样癌、胃癌、肝癌、黑色素瘤、结肠癌、前列腺癌和乳腺癌中均表现出一定的抗肿瘤活性^[13]。然而 1,9-二取代 β -咔啉在 HNSCC 中尚未有相关抗肿瘤及机制研究,故本研究拟选取 1,9-二取代 β -咔啉中的 CZY1-4 为研究对象,通过一系列实验初步探索其对 HNSCC 的抗肿瘤机制及其潜在机制。

本研究结果表明,CZY1-4 处理后对人舌癌细胞系 Cal-27,人喉癌细胞系 Tu686、SNU899、Tu177,人下咽癌细胞系 Fadu 的生长和增殖均具有显著抑制作用,其中人喉癌细胞系 Tu177 与人舌癌细胞系 Cal-27 更为敏感。相应地,Tu177 与 Cal-27 细胞集落形成能力也显著下降,当药物浓度分别为 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 与 $4\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,对 Tu177 和 Cal-27 抑制效果达到 50%,显示了 CZY1-4 对 HNSCC 的高度抗肿瘤活性。在 Tu177 与 Cal-27 分别加入相应浓度 CZY1-4 处理 24h 后,细胞迁移和侵袭能力显著下降,显示了 CZY1-4 在抑制癌细胞转移方面发挥着一定的作用。

为了进一步探究 CZY1-4 的抗肿瘤机制,本研究进行流式细胞术分析,结果显示,CZY1-4 处理后的癌细胞并未发生显著细胞凋亡,故初步推测其抗肿瘤机制并不是通过细胞凋亡介导。随后分析细胞内蛋白表达量的变化,结果显示,凋亡相关蛋白(PARP、P53、CASPASE3)的表达无显著的改变,进一步验证 CZY1-4 并未引起显著细胞凋亡。同时,

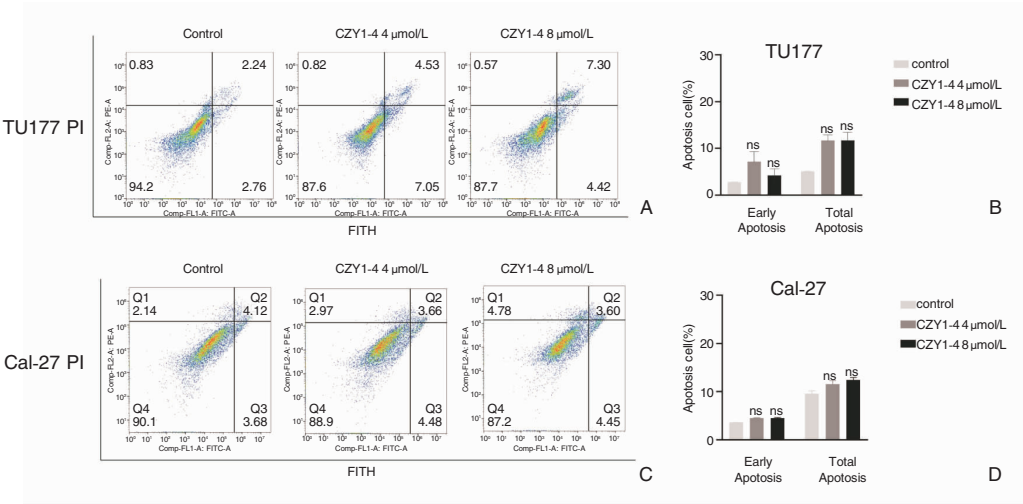


图3 流式细胞术分析检测细胞凋亡情况 TU177(A,B)和Cal-27(C,D)在4 μmol/L和8 μmol/L浓度的CZY1-4培养基中处理24 h后进行流式细胞术检测凋亡

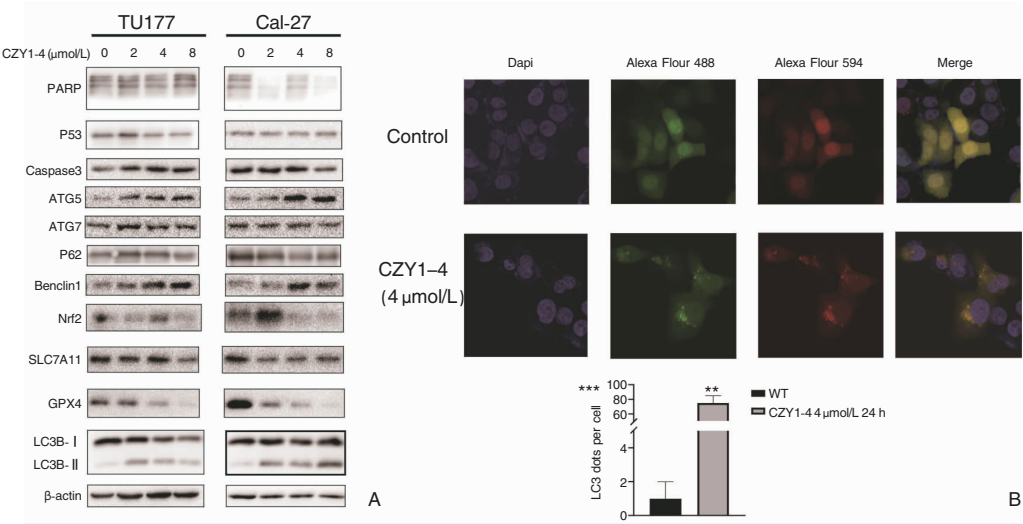


图4 Western blotting(A)及免疫荧光实验(B)观察自噬小体的形成 (免疫荧光 ×180)

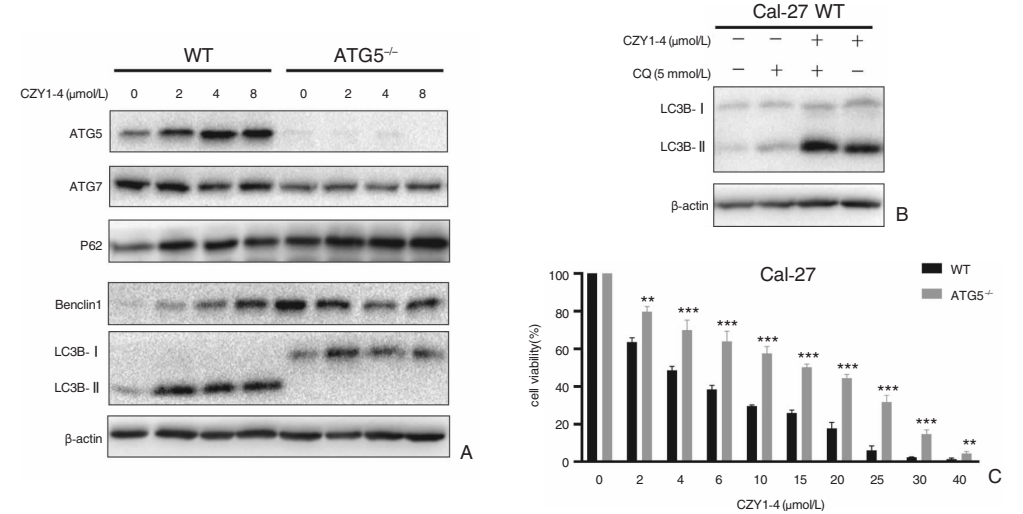


图5 Western blotting(A,B)与CCK-8(C)初步验证CZY1-4促进细胞自噬抑制细胞生长和增殖 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

自噬相关蛋白(ATG5 与 LC3B, Benclin1 等)的表达有明显的趋势变化,提示 CZY1-4 可能促进细胞自噬。细胞发生自噬时,细胞质内能产生丰富的双层膜结构的自噬小体,这是判断细胞是否发生自噬的一个重要依据^[13]。随后构建 pHAGE-mCherry-EGFP-LC3B Cal-27 稳定表达细胞系,通过免疫荧光实验观察自噬小体的形成来验证这一结果。荧光结果显示:加入 CZY1-4 处理 24 h 后,细胞内自噬小体数量及荧光强度皆显著升高。

细胞发生自噬的相关信号通路的调控作用是极其繁杂的,其中 ATG12-ATG5 自噬蛋白结合系统在自噬形成过程中发挥着极为关键的作用^[13]。结合本研究中加入 CZY1-4 后 ATG5 表达量增加的结果,首先构建 ATG5 敲除 Cal-27 细胞系,进行一系列实验初步验证 CZY1-4 促进细胞自噬抑制细胞生长和增殖的机制,结果显示,ATG5 敲除后,LC3B-II 无表达, CZY1-4 对 ATG5^{-/-} Cal-27 的抗肿瘤效果显著降低, CZY1-4,提示 CZY1-4 是通过调控 ATG5 促进细胞发生自噬发挥抗肿瘤活性。

细胞内形成的自噬小体会进一步与溶酶体相互融合为一体,形成的结构被称为自噬溶酶体。溶酶体内特有的酸性水解酶会将自噬小体及其所包裹的待降解底物进行有效的降解^[14]。最后,为了排除 CZY1-4 并非通过酸化溶酶体阻断自噬小体的降解途径(氯喹 CQ 的作用原理)使自噬小体堆积而促进自噬,通过将 CZY1-4 和氯喹分别单独或联合处理后,检测 LC3B 表达量的变化,结果验证 CZY1-4 是通过促进自噬小体的形成而非阻断自噬小体的降解促进细胞自噬。

综上,1,9-二取代 β -咔啉, CZY1-4 能显著抑制头颈部鳞状细胞癌相关细胞系的生长、增殖作用,并抑制细胞克隆形成、侵袭和迁移,具有显著的抗肿瘤活性,通过实验初步验证该药物主要通过调控 ATG5 介导自噬小体的形成促进细胞自噬的发生进而发挥抗肿瘤效果。除此之外,药物处理后,发现铁死亡相关标志蛋白如 GPX4、SLC7A11 表达量下降,抗氧化相关蛋白 Nrf2 表达量下降,由此推测 CZY1-4 是否还可能与细胞铁死亡及细胞内氧化应激相关,这部分是本实验未完全验证并解决的问题,尚有待后续实验进一步验证。

参考文献:

[1] Deshpande AM, Wong DT. Molecular mechanisms of head and

- neck cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008, 8(5): 799 – 809.
- [2] Marur S, Forastiere AA. Head and neck squamous cell carcinoma: Update on epidemiology, diagnosis, and treatment[J]. *Mayo Clin Proc*, 2016, 91(3): 386 – 396.
- [3] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview[J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(4): 778 – 789.
- [4] Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209 – 249.
- [5] Kim YJ, Kim JH. Increasing incidence and improving survival of oral tongue squamous cell carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 7877.
- [6] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer Statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7 – 33.
- [7] Lenze NR, Farquhar DR, Dorismond C, et al. Age and risk of recurrence in oral tongue squamous cell carcinoma: Systematic review[J]. *Head Neck*, 2020, 42(12): 3755 – 3768.
- [8] Economopoulou P, Kotsantis I, Kyrodimos E, et al. Liquid biopsy: An emerging prognostic and predictive tool in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). Focus on Circulating Tumor Cells (CTCs) [J]. *Oral Oncol*, 2017, 74: 83 – 89.
- [9] Hajek M, Sewell A, Kaeck S, et al. TRAF3/CYLD mutations identify a distinct subset of human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2017, 123(10): 1778 – 1790.
- [10] Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 106: 27 – 36.
- [11] 周洁, 潘芳名, 廖华, 等. Zwint-1 蛋白在头颈部鳞状细胞癌中表达上调及其与临床特征的相关性[J]. *耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2019, 25(5): 508 – 512.
- [12] Luo B, Song X. A comprehensive overview of β -carboline and its derivatives as anticancer agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 224: 113688.
- [13] Chen Z, Cao R, Shi B, et al. Synthesis and biological evaluation of 1,9-disubstituted β -carboline as potent DNA intercalating and cytotoxic agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(10): 5127 – 5137.
- [14] Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation[J]. *Microb Cell*, 2016, 3(12): 588 – 596.

(收稿日期: 2021-10-06)

本文引用格式: 谢章弘, 张晓东, 曹日晖, 等. 1,9-二取代 β -咔啉在头颈部鳞状细胞癌中抗肿瘤机制的研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2021, 27(6): 684 – 690. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202121371

Cite this article as: XIE Zhanghong, ZHANG Xiaodong, CAO Rihui, et al. Antitumor mechanism of 1,9-disubstituted β -carboline in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2021, 27(6): 684 – 690. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202121371