

SAHA与顺铂联合用药对骨肉瘤细胞增殖、 凋亡和迁移的影响

侯梦一 姚娟 王豪 张章 严树涓 左国伟*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文研究了组蛋白去乙酰化酶抑制剂SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid)联合顺铂(cisplatin, DDP)对骨肉瘤细胞的作用。骨肉瘤143B细胞分别经不同浓度的SAHA、DDP、SAHA+DDP作用48 h。利用倒置显微镜观察细胞形态学变化; 分别采用MTT法、流式细胞术、细胞划痕实验、克隆形成实验检测SAHA、DDP及二者联用对143B细胞活力、细胞凋亡、细胞迁移和集落形成能力的影响。利用Western blot检测143B细胞中cleaved-Caspase-8、cleaved-PARP蛋白表达水平。结果显示, SAHA+DDP组143B细胞大量坏死, 抑制细胞增殖的现象明显高于单药组; 中低剂量SAHA与DDP联用表现为协同作用, 而较高剂量的联用表现为单纯相加作用; SAHA+DDP组较单药组细胞早期凋亡率增加、迁移率明显降低, 且SAHA+DDP组的细胞集落形成能力明显降低; SAHA+DDP组能够促进cleaved-Caspase-8、cleaved-PARP的蛋白表达。以上结果表明, SAHA联合顺铂对骨肉瘤细胞143B细胞有协同增敏作用, 能够明显抑制其增殖和迁移并促进其凋亡。

关键词 SAHA; 顺铂; 骨肉瘤; 联合用药; 协同作用

Effects of Suberoylanilide Hydroxamic Acid Combined with Cisplatin on the Growth, Apoptosis and Migration of Osteosarcoma Cells

Hou Mengyi, Yao Juan, Wang Hao, Zhang Zhang, Yan Shujuan, Zuo Guowei*

(Key Laboratory of Medical Diagnostics Founded by Ministry of Education,
College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This work was aimed to investigate the effects of histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) combined with DDP on osteosarcoma cells. The osteosarcoma 143B cells were treated with different concentrations of SAHA or cisplatin, either alone or combined for 48 h. The morphological characteristics of treated cells were observed by inverted microscope. The cytotoxicity effects in single drug group and combination drugs group were observed by MTT assay. The cell apoptosis was quantified by flow cytometry. SAHA or DDP was used either alone or in combination to compare the migration ability with wound healing assay. The colony-forming ability was analyzed by colony formation assay. The expressions of cleaved-Caspase-8, cleaved-PARP were detected by Western blot. The results showed that the necrosis of 143B cells was obvious in SAHA+DDP group. The inhibition of cell proliferation in SAHA+DDP group was significantly higher than those in single drug group. SAHA combined with DDP of middle or low doses showed a synergistic effect, however, SAHA

收稿日期: 2016-03-16 接受日期: 2016-05-19

国家自然科学基金(批准号: 81102035)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485240, E-mail: gwzuo@qq.com

Received: March 16, 2016 Accepted: May 19, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81102035)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485240, E-mail: gwzuo@qq.com

网络出版时间: 2016-07-25 15:32:12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160725.1532.010.html>

combined with DDP of high dose showed a simple additive effect. The early apoptosis rate of SAHA+DDP group was significantly higher than those of single drug group, and the cell migration rate and the colony-forming ability in SAHA+DDP group were significantly lower than single drug group. The expressions of cleaved-Caspase-8, cleaved-PARP were up-regulated significantly in 143B cells after SAHA+DDP treatment. The results suggested that SAHA+DDP could inhibit the proliferation and migration, and promote the apoptosis of osteosarcoma 143B cells. In addition, the combination of SAHA and DDP has a synergistic effect.

Keywords SAHA; cisplatin; osteosarcoma; drug combination; synergistic effect

骨肉瘤是较常见的发生在青少年或儿童的一种恶性骨肿瘤, 并且具有高度的转移潜能^[1-4]。目前临床上除手术治疗外, 化疗仍以多柔比星、大剂量甲氨蝶呤、顺铂和异环磷酰胺为主^[5-6]。顺铂(cisplatin, DDP)是一种细胞周期非特异性药物, 其抗癌机制是通过抑制癌细胞DNA复制^[7], 损伤其细胞膜结构, 具有广谱抗癌作用, 是骨肉瘤化疗过程中最常用的药物之一。近年来, 为了克服临床上逐年增多的患者对顺铂产生的耐药性及减轻由用药剂量大所导致的各种不良反应, 以顺铂为核心的联合用药方案成为骨肉瘤防治领域的研究热点。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACI)具有广泛的抗肿瘤作用, 主要作用机制是抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、阻滞细胞周期、抑制血管生成。SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid)是美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的第一个用于治疗经两个全身治疗方案后仍进展、耐药或复发的具有明显皮肤侵犯的皮肤T细胞淋巴瘤(cutaneous T cell lymphoma, CTCL)的HDACI。SAHA作为一类新兴的抗肿瘤药物^[8], 具有低毒高效的特点, 已经进入到II期临床研究中, 取得了较为理想的结果^[9]。同时, 大量研究发现, SAHA除自身具有抗癌性外, 与其他抗肿瘤药物联合使用也表现出良好的协同作用, 这些结果表明, SAHA具有广阔的临床前景。本文将针对SAHA与顺铂联合用药对骨肉瘤143B细胞的效果进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人骨肉瘤细胞株143B购自于美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基和胎牛血清

均购自于Gibco公司。SAHA和顺铂均购自Sigma公司。噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)和二甲基亚砷(DMSO)购自北京索莱宝科技有限公司。细胞凋亡检测试剂盒由重庆医科大学生命科学院流式细胞实验室提供。兔抗人cleaved-Caspase-8、cleaved-PARP单克隆抗体购自ImmunoWay公司。小鼠抗人 β -Actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG和抗鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人骨肉瘤细胞株143B用含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖培养基, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。当细胞达75%~85%汇合率时, 用0.25%胰蛋白酶消化并传代。

1.2.2 细胞形态学观察 将骨肉瘤143B细胞接种于细胞6孔培养板, 设空白对照组、SAHA(2~16 μ mol/L)组、DDP(50~800 ng/mL)组及SAHA+DDP联合用药组。待细胞贴壁后分别加药处理48 h, 利用倒置显微镜观察各组培养孔内细胞贴壁生长及形态的变化情况。

1.2.3 MTT法检测143B细胞活力 取对数增殖期细胞悬液, 调整密度为 2×10^4 /mL, 接种于96孔板中, 每孔200 μ L, 约4 000细胞。12 h后更换无血清培养基, 并加入不同处理因素。单药组为2~16 μ mol/L的不同浓度SAHA和50~800 ng/mL的不同浓度的DDP, 联合用药组为2~8 μ mol/L的不同浓度的SAHA和100、400 ng/mL DDP联合使用。同时, 设加入最大剂量为1 mL/L的DMSO的空白对照组, 每组设4个复孔, 此时记为0 h。37 $^{\circ}$ C培养48 h或72 h后, 每孔加入5 mg/mL MTT试剂15 μ L, 继续培养4 h。小心吸尽上清液, 加入150 μ L/孔DMSO, 避光振荡混匀10 min至结晶完全溶解, 空白对照组调零, 酶标仪上测定波长490 nm各孔的D值。细胞增殖抑制率(%)=(对照

组 D 值-实验组 D 值)/对照组 D 值 $\times 100\%$ 。利用金氏公式判断DDP和SAHA联用的效果。金氏公式: $Q = E(AB) / (EA + EB - EA \times EB)$ 。式中, EA 和 EB 为各单药抑制率, $E(AB)$ 为两药联用抑制率。 $Q > 1.15$ 为协同作用(++), $0.85 \leq Q \leq 1.15$ 为相加作用(+), $Q < 0.85$ 为拮抗作用(-)。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 接种143B细胞于细胞6孔培养板中, 待细胞密度为60%~70%时, 分别加入SAHA、DDP和SAHA+DDP, 并设DMSO的空白对照组, 更换无血清培养基继续培养。48 h后收集各组细胞, 1 000 r/min离心3 min后, 弃掉上清液, 1 mL PBS重悬后1 000 r/min离心3 min, 再次重悬离心后收集细胞, 采用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒进行染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.5 细胞划痕实验 采用细胞划痕实验分别测量对照组、SAHA组、DDP组及SAHA+DDP联合用药组48 h后细胞迁移的距离, 并与对照组作比较, 进而研究不同处理组对细胞迁移能力的影响。

1.2.6 克隆形成实验 收集生长良好的143B细胞, 制成单细胞悬液后调节细胞密度, 以 4×10^2 /孔的密度接种于细胞6孔培养板内。待细胞生长稳定后, 加入药物处理48 h。药物处理结束后, 换用含10% FBS的DMEM高糖培养基继续培养细胞4~7 d后, 小心吸取上清, 加入4%多聚甲醛固定细胞15~20 min, 以结晶紫染色计数细胞集落。

1.2.7 Western blot法检测cleaved-Caspase-8、cleaved-PARP蛋白质水平 SAHA、DDP、SAHA+DDP处理细胞48 h后, 收集细胞提取总蛋白, BCA法检测蛋白质浓度。经10% SDS-PAGE电泳, 转膜, 5% BSA封闭, 加入一抗(1:500稀释), 4 °C孵育过夜。次日预冷TBST洗膜3次, 每次10 min, 加入二抗(1:5 000稀释), 37 °C孵育1 h, TBST洗膜3次, 每次10 min, ECL发光液显色成像。采用Quantity One 4.6.2软件分析灰度值, 以 β -Actin为内参, 计算蛋白相对表达量。

1.2.8 数据分析 各实验均独立重复3次, 采用SPSS 16.0统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学改变

应用倒置显微镜(100 \times)观察48 h后空白对照组、单药组、SAHA+DDP组的细胞生长情况。空白对

照组细胞生长密集、贴壁良好、胞体大、增殖旺盛。各加药组细胞密度均较对照组低, 细胞贴壁不良, 细胞皱缩变形, 漂浮细胞增多。随药物浓度增高, 细胞形态的改变越来越明显。SAHA+DDP组细胞数与单药组相比明显减少, 一部分细胞皱缩为圆形, 细胞贴壁极差, 可见大量漂浮细胞(图1)。

2.2 SAHA和DDP单用对143B细胞增殖的影响

经倒置显微镜观察发现, SAHA与DDP联合作用对骨肉瘤143B细胞具有更强的杀伤作用。进一步采用MTT法筛选药物的最佳浓度, 结果显示, SAHA单独作用于143B细胞72 h后, 在2~16 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内具有明显的增殖抑制作用, 且具有一定的剂量依赖性($P < 0.05$); DDP单独作用于143B细胞72 h后, 在50~800 ng/mL浓度范围内具有明显的增殖抑制作用, 且具有一定的剂量依赖性($P < 0.05$)(图2)。

2.3 SAHA和DDP联用对143B细胞增殖的影响

MTT法检测结果显示, SAHA与DDP联合作用143B细胞48 h后, 与单药组对比, SAHA+DDP组对细胞的增殖抑制作用增强。经金氏公式法判断, 中低剂量的SAHA和DDP联合用药表现为协同作用, 而相对较高剂量的SAHA和DDP联合用药表现为单纯相加作用(图3)。

2.4 SAHA和DDP单用及联用对143B细胞早期凋亡的影响

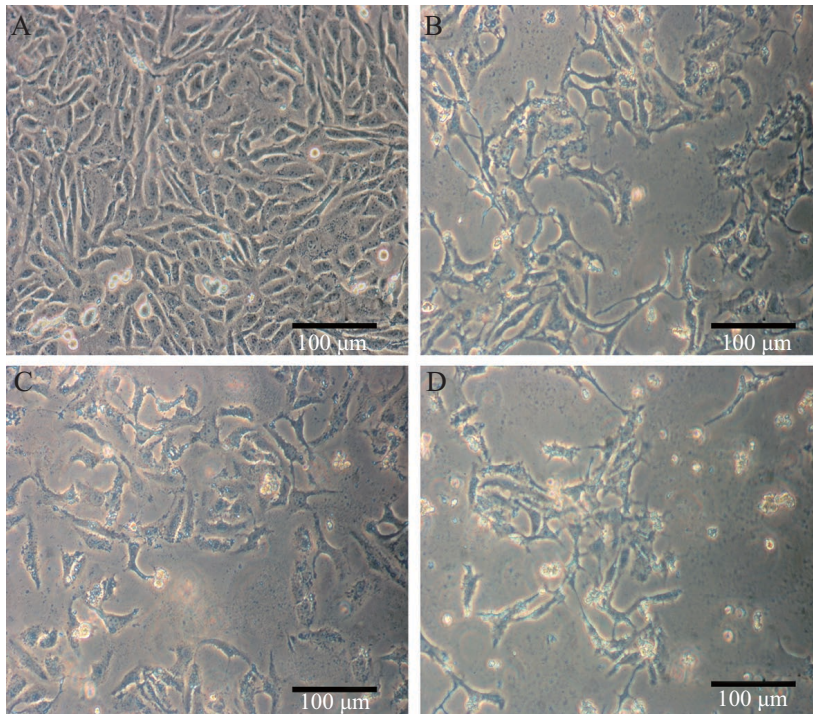
在进一步有关联合用药的研究中, 我们选择了低剂量SAHA(2 $\mu\text{mol/L}$)及DDP(100 ng/mL)联用处理细胞48 h。图4结果显示, SAHA+DDP组与各单药组比较, 143B细胞的早期凋亡率明显升高, 差异均具有显著的统计学意义($P < 0.001$)。

2.5 SAHA和DDP单用及联用对143B细胞的迁移能力的影响

通过细胞划痕实验观察SAHA和DDP联用对143B细胞迁移能力的影响。我们依旧选择低剂量SAHA(2 $\mu\text{mol/L}$)、DDP(100 ng/mL)联用处理细胞48 h。如图5所示, 与SAHA组、DDP组相比, SAHA+DDP组在48 h的划痕距离更大, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.6 SAHA和DDP单用及联用对143B细胞集落形成能力的影响

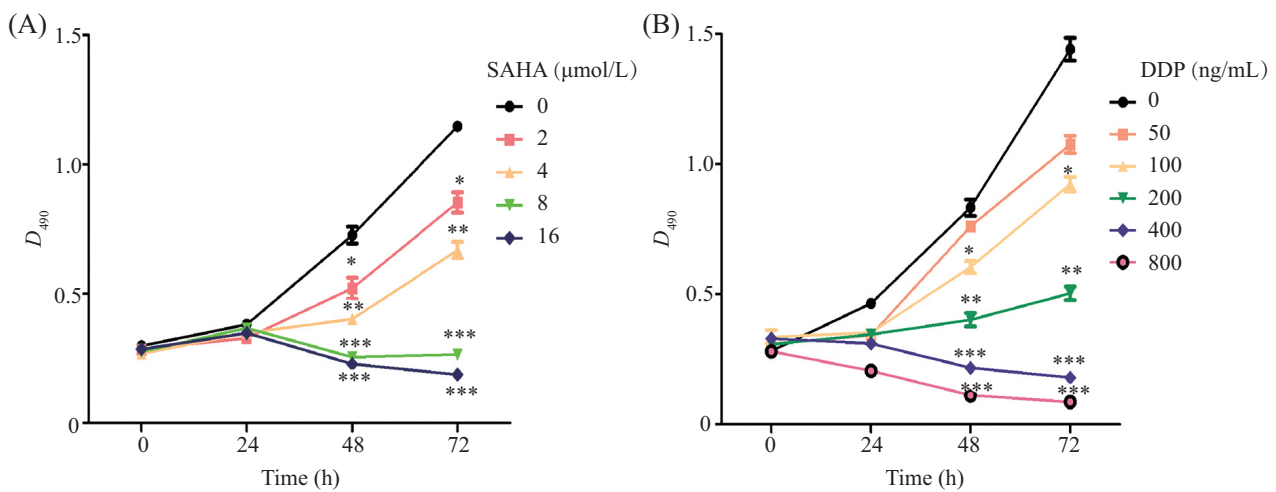
细胞克隆形成率即细胞接种的存活率, 表示接种后贴壁的细胞存活并形成集落的数量。克隆形成率能够反映细胞群体依赖性和增殖能力两个重要性



A: 空白对照组; B: SAHA (2 $\mu\text{mol/L}$)组; C: DDP(100 ng/mL)组; D: SAHA+DDP(2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA+100 ng/mL DDP)组。
A: control group; B: SAHA (2 $\mu\text{mol/L}$) group; C: DDP (100 ng/mL) group; D: SAHA+DDP (2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA+100 ng/mL DDP) group.

图1 SAHA、DDP、SAHA+DDP对143B细胞形态的影响

Fig.1 Morphological changes of 143B cells treated with SAHA, DDP or SAHA+DDP



A: SAHA(2~16 $\mu\text{mol/L}$)作用于143B细胞72 h; B: DDP(50~800 ng/mL)作用于143B细胞72 h。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, 与空白对照组比较。
A: 143B cells treated with SAHA (2-16 $\mu\text{mol/L}$) for 72 h; B: 143B cells treated with DDP (50-800 ng/mL) for 72 h. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 vs control group.

图2 MTT法检测SAHA、DPP单独应用对143B细胞活力的影响

Fig.2 Cell viability of 143B cells with SAHA or DDP treatment detected by MTT assay

状。如图6所示, SAHA+DDP组所形成的克隆数明显少于SAHA组和DDP组, 差异均具有显著统计学意义(P <0.001)。

2.7 SAHA和DDP单用及联用对143B细胞中的cleaved-Caspase-8、cleaved-PARP蛋白表达的影响

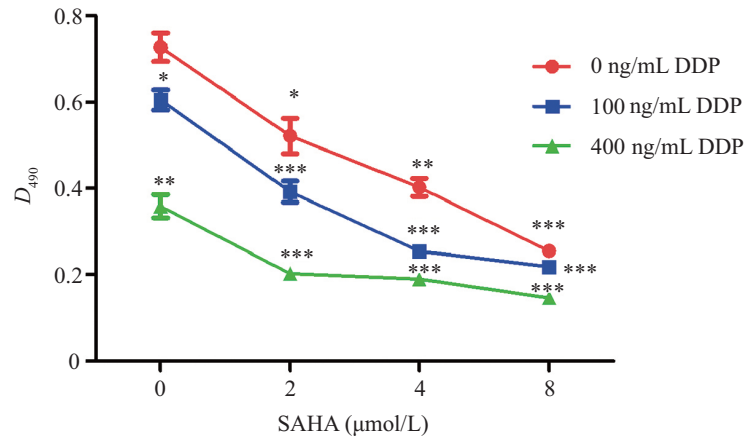
Western blot检测结果显示, 经SAHA和DDP

表1 DDP和SAHA联用的效果Q值
Table 1 The Q value of SAHA combined with DDP

DDP	SAHA		
	2 $\mu\text{mol/L}$	4 $\mu\text{mol/L}$	8 $\mu\text{mol/L}$
100 ng/mL	1.17 [*]	1.24 [*]	0.99 ⁺⁺
400 ng/mL	1.09 ⁺⁺	1.02 ⁺⁺	0.97 ⁺⁺

^{*}: 协同作用; ⁺⁺: 相加作用。

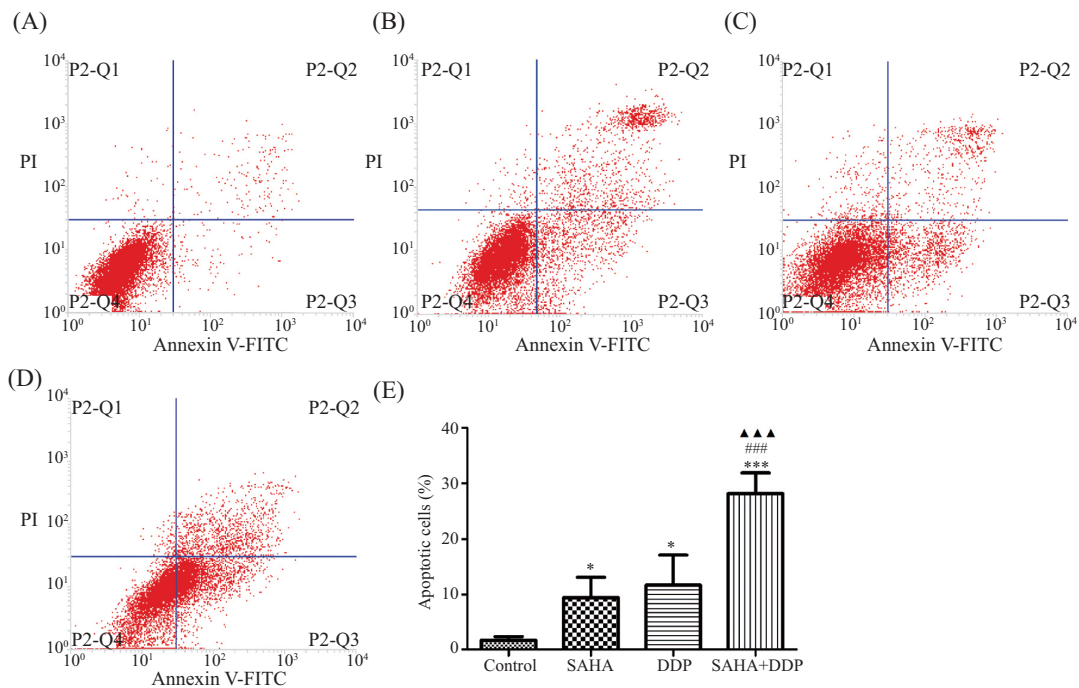
^{*}: synergistic effect; ⁺⁺: simple additive effect.



SAHA(2~8 $\mu\text{mol/L}$)与DDP(100、400 ng/mL)联合作用于143B细胞48 h。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与空白对照组比较。
143B cells treated with SAHA (2-8 $\mu\text{mol/L}$)+DDP (100, 400 ng/mL) for 48 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs control group.

图3 MTT法检测SAHA、DPP联合使用对143B细胞活力的影响

Fig.3 Cell viability of 143B cells with SAHA+DDP treatment detected by MTT assay

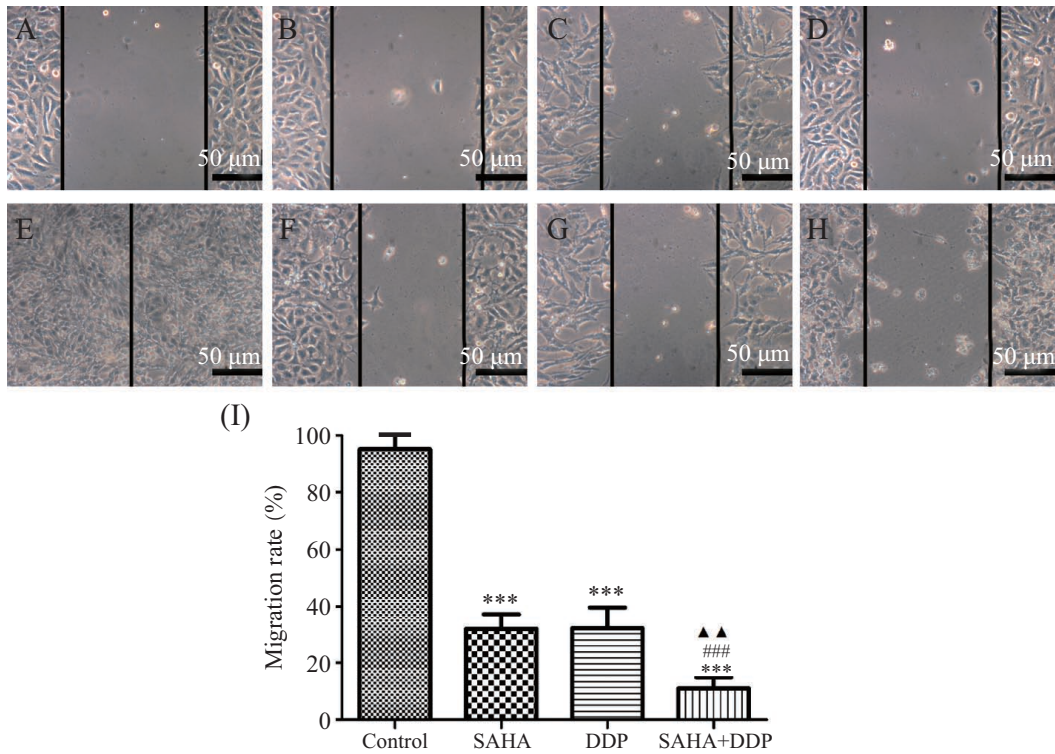


A~D: 空白对照组及SAHA(2 $\mu\text{mol/L}$)、DDP(100 ng/mL)、SAHA+DDP(2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA+100 ng/mL DDP)作用143B细胞48 h后的细胞凋亡情况; E: 各组早期凋亡率。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与空白对照组比较; ### $P<0.001$, 与SAHA组比较; ▲▲▲ $P<0.001$, 与DDP组比较。

A-D: apoptosis of 143B cells after the treatment of DMSO, SAHA (2 $\mu\text{mol/L}$), DPP (100 ng/mL), SAHA+DDP (2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA+100 ng/mL DDP) for 48 h; E: the apoptosis rate of each group. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs control group, ### $P<0.001$ vs SAHA group; ▲▲▲ $P<0.001$ vs DDP group.

图4 流式细胞术检测143B细胞早期凋亡率

Fig.4 The apoptosis rate of 143B cells detected by flow cytometry analysis

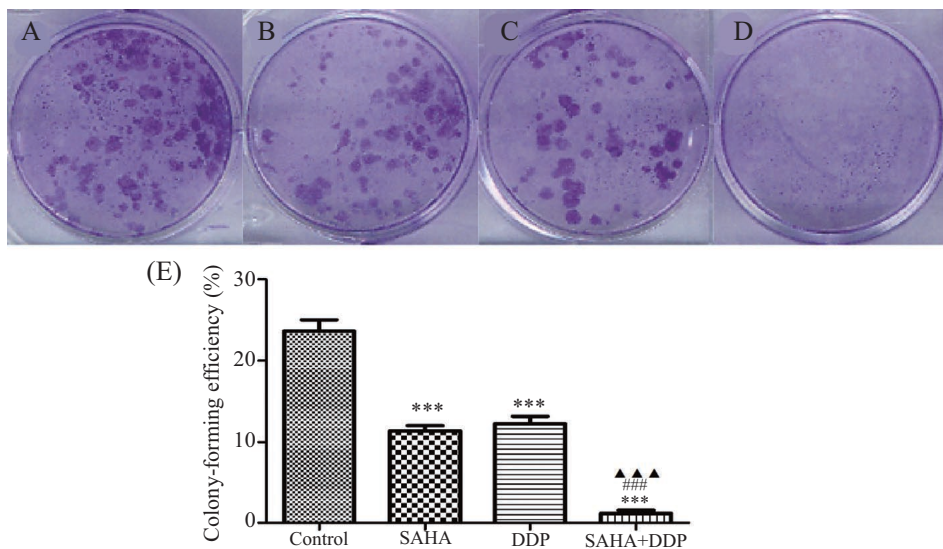


A, E: 空白对照组0、48 h细胞迁移; B, F: 2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA作用143B细胞0、48 h细胞迁移; C, G: 100 ng/mL DDP作用143B细胞0、48 h细胞迁移; D, H: 2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA与100 ng/mL DDP联合作用143B细胞0、48 h细胞迁移; I: 各组细胞迁移率。*** $P < 0.001$, 与空白对照组比较; ### $P < 0.001$, 与SAHA组比较; ▲▲ $P < 0.01$, 与DDP组比较。

A,E: migration of 143B cells in control group for 0, 48 h; B,F: effects of 2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA on migration of 143B cells for 0, 48 h; C,G: effects of 100 ng/mL DDP on migration of 143B cells for 0, 48 h; D,H: effects of 2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA combined with 100 ng/mL DDP on migration of 143B cells for 0, 48 h; I: the migration rate of each group. *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs SAHA group; ▲▲ $P < 0.01$ vs DDP group.

图5 划痕实验检测SAHA与DDP联用对143B细胞的迁移能力的影响

Fig.5 Effects of SAHA combined with DDP on migration of 143B cells detected by wound-healing assay

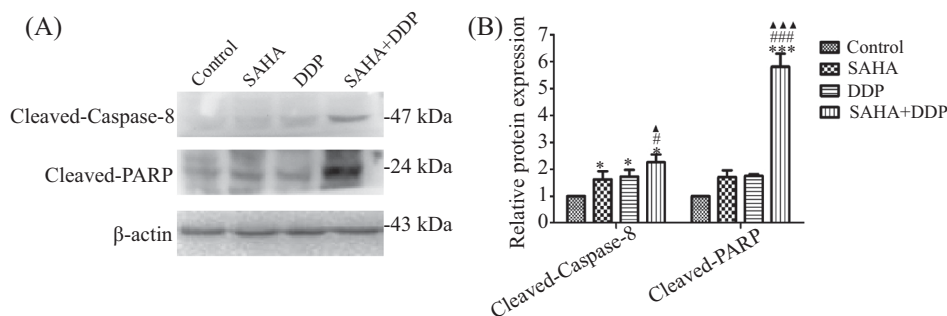


A: 空白对照组; B: SAHA(2 $\mu\text{mol/L}$)组; C: DDP(100 ng/mL)组; D: SAHA+DDP(2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA+100 ng/mL DDP)组; E: 各组的克隆形成率。*** $P < 0.001$, 与空白对照组比较; ### $P < 0.001$, 与SAHA组比较; ▲▲▲ $P < 0.001$, 与DDP组比较。

A: control group; B: SAHA (2 $\mu\text{mol/L}$) group; C: DDP (100 ng/mL) group; D: SAHA+DDP (2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA+100 ng/mL DDP) group; E: the colony-forming efficiency of each group. *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs SAHA group; ▲▲▲ $P < 0.001$ vs DDP group.

图6 克隆形成实验检测SAHA与DDP联用对143B细胞克隆形成能力的影响

Fig.6 Effects of SAHA combined with DDP on colony-forming ability of 143B cells detected by colony formation assay



A: 空白对照组及SAHA(2 $\mu\text{mol/L}$)、DDP(100 ng/mL)、SAHA+DDP(2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA+100 ng/mL DDP)作用于143B细胞48 h后的蛋白表达情况; B: 各组的蛋白质相对水平。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与空白对照组比较; # $P<0.05$, ### $P<0.001$, 与SAHA组比较; ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.001$, 与DDP组比较。A: protein levels of 143B cells after the treatment of DMSO, SAHA (2 $\mu\text{mol/L}$), DDP (100 ng/mL), SAHA+DDP (2 $\mu\text{mol/L}$ SAHA+100 ng/mL DDP) for 48 h; B: the relative protein level of each group. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs control group, # $P<0.05$, ### $P<0.001$ vs SAHA group, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.001$ vs DDP group.

图7 Western blot检测143B细胞cleaved-Caspase-8、cleaved-PARP蛋白质水平

Fig.7 Protein levels of cleaved-Caspase-8, cleaved-PARP in 143B cells detected by Western blot

单用及联用作用于143B细胞后, 与单药组相比较, 143B细胞cleaved-Caspase-8、cleaved-PARP蛋白质水平均明显升高($P<0.05$), 差异有统计学意义。

3 讨论

骨肉瘤常见于青少年或儿童, 是一种原发恶性骨肿瘤并且转移潜能很高, 年发病率约为3/100万^[10]。实施化疗以前, 临床上一般采取的是手术治疗, 5年生存率不足20%。实施新辅助化疗以来, 骨肉瘤的5年生存率从20%提高到70%^[11], 但仍有30%左右的病例会发生复发或转移。近20年来, 虽然大量研究者进行了很多努力, 骨肉瘤的5年生存率仍旧无法进一步提高^[12]。在化疗的过程中, 抗癌药物本身的毒性和副作用没有办法避免, 且抗癌药物产生的耐药性也影响着化疗的效果。因此, 如何提高骨肉瘤患者的化疗效果成为了急需解决的问题, 即在具有相同治疗效果的前提下, 能够减少传统抗癌药物的用量, 抑或不增加传统化疗药物剂量的同时, 提高药物的治疗效果。

顺铂作为一种铂类化疗药物, 其主要机制是通过抑制癌细胞的DNA复制并损伤其细胞膜结构而发挥细胞毒性作用和抗肿瘤作用^[7], 有较强的广谱抗癌作用^[13], 属细胞周期非特异性药物。临床上用于治疗卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肺癌、食道癌、头颈部鳞癌、甲状腺癌及骨肉瘤等多种实体肿瘤^[14]。顺铂虽然具有良好的治疗效果, 但其产生的耐药性及肾毒性、耳毒性、神经毒性等毒副作用都限制着顺铂的临床应用。HDACI是一种新型的抗

瘤药物, 能够诱导组蛋白发生乙酰化修饰, 使染色质处在一种开放的构象上并重新激活已经沉默的抗癌基因^[15], 目前已经有多种HDACI进入到临床II期实验中, 包括TSA、SAHA等。SAHA是目前研究较多的一种HDACI, 它能够明显抑制组蛋白去乙酰化酶(HDAC), 提高组蛋白乙酰化水平, 使DNA解凝进而使得染色质松散, 重新激活沉默的抗癌基因^[15]。鉴于SAHA和DDP的抗肿瘤机制, SAHA能够使染色体开放, 以DNA为靶点的DDP则更易接近核小体之间的DNA连接区, 从而增强DDP的抗肿瘤作用。已有报道, 发现SAHA联合顺铂等一些其他化疗药物表现出良好的协同作用^[16-17], 能够提高治疗效果。所以, 我们推断治疗骨肉瘤的过程中两药联用能够起到改善治疗效果的作用, 产生协同增效的效果, 从而更易发挥药物的抗肿瘤作用, 而不是单纯相加的效果。

本研究首先通过倒置显微镜观察药物处理后143B细胞形态学上的变化, 发现联合用药组肿瘤细胞明显的大量坏死, 漂浮细胞增多, 对细胞增殖的抑制明显高于相应单药组, 直观地反映了SAHA与DDP联用对143B细胞具有更强有力的作用。之后采用MTT法检测SAHA和DDP单独使用时对骨肉瘤143B细胞的影响。结果发现, 143B细胞经药物单独处理后, 细胞生长均得到抑制, 且随着药物浓度的增加和时间的延长, 抑制作用更加明显, 说明SAHA、DDP对143B细胞的生长抑制具有剂量依赖性和时间依赖性。本研究目的是为了观察SAHA是否能够增强DDP的抑制增殖、诱导凋亡和抑制迁移的作用, 因此, 之后的MTT实验选用具有生长抑制作用但单

独作用凋亡效果不明显的低浓度(2、4 $\mu\text{mol/L}$)、单独作用凋亡效果明显的高浓度(8 $\mu\text{mol/L}$)的SAHA与低浓度(100 ng/mL)、高浓度(400 ng/mL)的DDP联合作用48 h。结果发现,中低浓度的SAHA(2、4 $\mu\text{mol/L}$)与低浓度的DDP(100 ng/mL)联用表现为协同作用,而高浓度的SAHA(8 $\mu\text{mol/L}$)不论与低浓度还是高浓度的DDP(100、400 ng/mL)联用,均表现为单纯相加作用。得到此结果主要是因为此时DDP单独使用已经能够造成足够高的抑制率,所以两药联合表现为单纯相加作用。而高浓度的DDP(400 ng/mL)与中低浓度的SAHA(2、4 $\mu\text{mol/L}$)联用,虽然表现为单纯相加作用,但Q值接近于1.15,故能够近似于协同作用。

本研究在联合用药选择药物剂量方面,选择了低浓度的SAHA(2 $\mu\text{mol/L}$)和低浓度的DDP(100 ng/mL)进行联用,是基于以下两个方面的考虑:一方面,DDP作为一种铂类化疗药物,随着其剂量的增加,骨髓抑制、肾功能损害等毒副作用会随之增强,且剂量接近于亚致死剂量时易产生耐药性;另一方面,SAHA作为一种新兴的抗肿瘤药物,与传统化疗药物比较,价格相对昂贵,且在保证低毒高效的前提下,我们希望能尽量减少SAHA的剂量来发挥更好的作用。且临床上使用顺铂的一般剂量为20~30 mg/m^2 ,高剂量为80~120 mg/m^2 ,相对比之下,研究所采用的顺铂浓度在临床也属于低浓度范围。

细胞凋亡(apoptosis)指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序的死亡,涉及一系列基因的激活、表达和调控作用^[18]。大量研究表明,无论药物的作用机制为何和靶点何在,各种化疗药物最终都是通过促进细胞凋亡或肿瘤坏死而达到抗肿瘤作用。本研究结果显示,将SAHA与DDP联用后AnnexinV⁺/PI⁺细胞比例升高,143B细胞早期凋亡率增加,表现出明显的协同作用,说明药物的联用能够提高单药诱导肿瘤细胞凋亡的作用。肿瘤细胞的迁移运动是肿瘤的发生发展过程中的一个重要步骤和关键环节,肿瘤细胞能够通过迁移在体内各器官、组织中转移和浸润,所以抑制肿瘤细胞的迁移是治疗肿瘤的一个关键问题。在本研究中,SAHA和DDP联用与相应单药组相比对143B细胞迁移能力具有显著的抑制作用,这说明两药联用能够有力地控制骨肉瘤细胞在治疗过程中的转移。克隆形成实验能够直接反应肿瘤细胞的远期增殖能力,是评价药物抗肿瘤作用的可靠指标^[19]。虽然实验花费时间

较长,但是能够弥补MTT等短期实验的不足,所以我们选择克隆形成实验与MTT实验互为补充,使我们实验的结果更具有说服力。本实验结果也表明,两药联用与单药组相比集落形成能力明显降低,且差异具有显著的统计学意义。为了进一步证实SAHA与DDP联用的促凋亡作用,通过Western blot检测了与凋亡相关细胞因子的变化情况,发现细胞凋亡相关蛋白cleaved-Caspase-8、cleaved-PARP蛋白质水平上调,与上述现象相互佐证。

HDACI类药物和传统化疗药物的联用成为近年肿瘤治疗界的研究热点。本研究结果显示,SAHA能增加骨肉瘤143B细胞对传统化疗药物顺铂的敏感性并改变细胞的生物学行为。本研究结果提示,在不久的将来,两药联合有望成为治疗骨肉瘤的新辅助化疗方案,成为治疗骨肉瘤新的更有效的手段。

参考文献 (References)

- 1 Hossain MS, Begum M, Mian MM, Ferdous S, Kabir S, Sarker HK, *et al.* Epidemiology of childhood and adolescent cancer in Bangladesh, 2001-2014. *BMC Cancer* 2016; 16(1): 104.
- 2 Zhang Y, Zhang L, Zhang G, Li S, Duan J, Cheng J, *et al.* Osteosarcoma metastasis: Prospective role of ezrin. *Tumour Biol* 2014; 35(6): 5055-9.
- 3 Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 2009; 152: 3-13.
- 4 Sakamoto A, Iwamoto Y. Current status and perspectives regarding the treatment of osteo-sarcoma: Chemotherapy. *Rev Recent Clin Trials* 2008; 3(3): 228-31.
- 5 Bacci G, Longhi A, Versari M, Mercuri M, Briccoli A, Picci P. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer* 2006; 106(5): 1154-61.
- 6 Ferrari S, Smeland S, Mercuri M, Bertoni F, Longhi A, Ruggieri P, *et al.* Neoadjuvant chemotherapy with high-dose Ifosfamide, high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for patients with localized osteosarcoma of the extremity: A joint study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. *J Clin Oncol* 2005; 23(34): 8845-52.
- 7 Fennell DA, Summers Y, Cadranell J, Benepal T, Christoph DC, Lal R, *et al.* Cisplatin in the modern era: the backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev* 2016; 44: 42-50.
- 8 Tang YA, Wen WL, Chang JW, Wei TT, Tan YH, Salunke S, *et al.* A novel histone deacetylase inhibitor exhibits antitumor activity via apoptosis induction, F-actin disruption and gene acetylation in lung cancer. *PLoS One* 2010; 5(9): e12417.
- 9 Richon VM. Targeting histone deacetylases: Development of vorinostat for the treatment of cancer. *Epigenomics* 2010; 2(3): 457-65.
- 10 Picci P. Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2: 6.

- 11 Jaffe N. Osteosarcoma: Review of the past, impact on the future. The American experience. *Cancer Treat Res* 2009; 152: 239-62.
- 12 Chou AJ, Geller DS, Gorlick R. Therapy for osteosarcoma: Where do we go from here. *Paediatr Drugs* 2008; 10(5): 315-27.
- 13 Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222(5191): 385-6.
- 14 Galanski M. Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006; 1(2): 285-95.
- 15 Lee YJ, Won AJ, Lee J, Jung JH, Yoon S, Lee BM, *et al.* Molecular mechanism of SAHA on regulation of autophagic cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Int J Med Sci* 2012; 9(10): 881-93.
- 16 Asgar MA, Senawong G, Sripa B, Senawong T. Synergistic anticancer effects of cisplatin and histone deacetylase inhibitors (SAHA and TSA) on cholangiocarcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2016; 48(1): 409-20.
- 17 叶君, 成雁, 陈亚萍. iNOS抑制剂1400W通过p53途径增强顺铂对宫颈癌SiHa细胞的化疗效果. *中国细胞生物学学报*(Ye Jun, Cheng Yan, Chen Yaping. iNOS inhibitor 1400W enhanced chemotherapeutic effect of cisplatin by p53 signal in SiHa cervical cancer cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(4): 522-8.
- 18 Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: Mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 2005; 84(10): 627-39.
- 19 Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc* 2006; 1(5): 2315-9.