

环吡酮胺抑制人胶质瘤细胞SHG44生长及其机制研究

韩胜男^{1,2} 龚世伟^{1,2} 费明明^{1,2} 上官福根^{1,2} 吕斌^{1,2*}

(¹温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 温州 325035; ²浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 该文初步探讨了环吡酮胺(ciclopirox olamine, CPX)抑制人胶质瘤细胞SHG44生长的作用和机制。该研究用梯度浓度的CPX处理人胶质瘤细胞SHG44后, 通过MTT实验检测药物半抑制浓度IC₅₀和细胞增殖能力; 应用平板克隆实验检测细胞克隆形成能力; Transwell小室和细胞划痕实验检测细胞侵袭和迁移能力; 流式细胞术检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)、线粒体内ROS以及细胞凋亡的变化; Seahorse XF96 Flux analysis分析仪检测细胞耗氧率(oxygen consumption rate, OCR); 实时荧光定量PCR(qPCR)和Western blot技术检测细胞内mRNA和蛋白的变化。结果表明: SHG44对CPX药物敏感; CPX能使STAT3在mRNA转录水平和蛋白表达水平下降, 抑制SHG44的迁移和侵袭, 同时, 促进线粒体ROS的累积, 最终破坏线粒体功能, 抑制细胞生长并促进细胞凋亡。该研究结果提示, CPX具有一定的抗胶质瘤细胞SHG44生长的作用, 有望成为一种治疗胶质瘤的药物。

关键词 环吡酮胺; SHG44; 胶质瘤; STAT3

Study of Ciclopirox Olamine Inhibiting Human Glioma Cell SHG44 Growth and the Underlying Mechanism

Han Shengnan^{1,2}, Gong Shiwei^{1,2}, Fei Mingming^{1,2}, Shangguan Fugen^{1,2}, Lü Bin^{1,2*}

(¹School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China;

²Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou 325035, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effects and molecular mechanism of ciclopirox olamine (CPX) inhibiting the growth of human glioma cell SHG44. In this study, human glioma cell line SHG44 was treated with a gradient concentration of CPX, then the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) and cell proliferation ability of the CPX treated SHG44 cells were determined by MTT assay. In addition, the clone-forming ability was detected to confirm the effect of CPX on SHG44 cell growth. Moreover, the transwell cell migration and invasion assays were performed to study the effects of CPX on the capacity of cell motility and invasiveness. Intracellular reactive oxygen species (ROS), mitochondrial ROS, and apoptosis were detected by flow cytometry. Seahorse XF96 Flux analyzer was used to measure the oxygen consumption rate (OCR), and Real-time PCR (qPCR) as well as Western blot were applied to detect the mRNA and protein levels. Our results showed that SHG44 cells were sensitive to CPX treatment. CPX could reduce both the mRNA and protein expression levels of STAT3, and thus inhibiting the migration and invasion of SHG44 cells. Moreover, CPX treatment significantly enhances the accumulation of mitochondrial ROS, which leads to the impairment of mitochondrial function, and thus inhibiting

收稿日期: 2019-03-31

接受日期: 2019-05-16

国家自然科学基金(批准号: 31771534、31570772)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86699250, E-mail: lubmito@wmu.edu.cn

Received: March 31, 2019

Accepted: May 16, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31771534, 31570772)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699250, E-mail: lubmito@wmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-06-14 14:47:12

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190614.1446.008.html>

cell growth and promoting apoptosis. Collectively, our findings demonstrated that CPX could inhibit the growth of SHG44 cells, which may be developed as a drug for the treatment of glioma.

Keywords ciclopirox olamine; SHG44; glioma; STAT3

环吡酮胺(ciclopirox olamine, CPX)也被称为巴特芬或环吡司霜,是一种合成的羟基吡啶酮类衍生物,目前用于治疗皮肤浅表真菌感染,用药形式有霜剂、乳液、凝胶、指甲油和洗发水等^[1]。CPX对皮肤癣菌、酵母菌、丝状真菌和细菌均具有广泛的作用。从化学本质上讲,CPX已被证实是一种铁螯合剂,能与三价金属阳离子(如 Fe^{3+})结合形成复合物,抑制过氧化物酶等金属依赖性酶的活性。在细胞内,这些酶在降解过氧化物的过程中发挥重要作用^[2]。然而,CPX诱导癌细胞死亡的机制研究仍处于起步阶段。有研究表明,CPX通过其螯合细胞内铁和抑制铁依赖性酶——核糖核苷酸还原酶的能力,可以降低血液系统恶性肿瘤的活性,并诱导细胞死亡。CPX可以抑制人乳腺癌细胞MDA-MB231异种移植物中的肿瘤生长^[3-4],并可以通过半胱天冬酶依赖性和非依赖性机制诱导Rh30细胞死亡^[5]。此外,CPX在治疗恶性血液病中的功效正处于临床I期评估阶段^[6-7]。目前,CPX对胶质瘤细胞的作用鲜有报道。

信号转导和转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)属于转录因子家族,由膜结合受体激活,随后进入细胞核,促进与细胞存活、分化、增殖和迁移相关的多种基因的表达^[8]。STAT家族包括7种蛋白质(STAT1、2、3、4、5a、5b、6),它们在调节细胞存活和增殖方面起到了重要作用,并且具有高度保守的调节信号传导和激活的共同分子结构^[9],STAT已成为调节肿瘤发生的关键介质,特别是STAT3已成为肿瘤治疗的靶点。STAT3是激活某些促癌基因的关键分子,影响细胞生长、细胞凋亡、血管生成、侵袭和免疫系统的稳态等^[10],阻断STAT3后足以抑制某些疾病的恶性转化^[11-12]。线粒体作为细胞ATP的主要来源,对细胞生长和代谢都起着至关重要的作用。有研究证明,当线粒体复合物I的电子泄漏,与细胞质中 O_2 、 H_2O 等结合产生的ROS增多时,STAT3中半胱氨酸的氧化可以作为电子清除剂,使ROS水平降低,从而维持线粒体结构的稳定^[13]。也有文献报道,心脏缺血时线粒体中的STAT3累积增加,这可能会导致ROS积累减少,从而起到抑制细胞凋亡的作用^[14]。本研究旨

在为寻找治疗胶质瘤的有效药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要研究药物

本课题研究所用的主要药物环吡酮胺(ciclopirox olamine, CPX)购自上海笛柏化学品技术有限公司,溶剂为二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),溶解1次药物的量以满足本次课题的所有研究,待药物充分溶解且混匀后,将药物分装在高压灭菌过的1.5 mL去酶离心管中,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱长期保存。避免反复称量或者反复冻融药物带来的误差。在药物称量、溶解、分装、保存以及使用的过程中均采用关灯或者锡箔纸包裹等避光保护措施。

1.2 试剂及抗体

RPMI 1640(1×)培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自Life Technologies公司。BCA蛋白质定量试剂盒、MitoSOXTM检测试剂盒和ECL化学发光试剂盒均购自Thermo Fisher公司。蛋白marker和硝酸纤维素膜均购自Bio-Rad公司。MTT细胞毒性和细胞增殖检测试剂盒、胰蛋白酶消化液、青霉素/链霉素、山羊抗鼠IgG二抗和活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。逆转录试剂盒和qPCR试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司。单克隆抗体 β -Actin购自上海Abmart公司。多克隆抗体STAT3、PARP、Caspase 3和Cleaved Caspase 3购自美国Cell Signaling Technology公司。多克隆抗体p-STAT3(Ser727)购自美国BD Biosciences公司。多克隆抗体MMP9购自中国ABclonal公司。多克隆抗体Snail购自美国Novus公司。

1.3 细胞系和细胞培养

本研究用到的细胞系为人类胶质瘤细胞SHG44(购自中国科学院上海细胞库)。SHG44细胞培养于RPMI 1640(1×)培养基中(内含10% FBS及100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素),置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

1.4 细胞毒性试验

将生长状态良好的SHG44细胞消化、计数后接

种于96孔板中, 每孔铺 5×10^3 个细胞, 置于细胞培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后吸弃原培养基, 加入含有药物的培养基。由于CPX使用DMSO配制, 因此浓度为 $0 \mu\text{mol/L}$ 的孔加入与最大药物浓度等量的DMSO, 每个药物浓度设置6个复孔。细胞加药后继续放置于 37°C 培养箱中培养。48 h后吸去培养基, 每孔按 $100 \mu\text{L}$ 培养基中加入 $10 \mu\text{L}$ MTT(5 mg/mL)溶液配制MTT工作液(0.5 mg/mL), 在细胞培养箱内继续孵育4 h, 而后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ Formazan溶解液, 适当混匀, 在细胞培养箱内再继续孵育4~5 h, 直至普通光学显微镜下观察发现Formazan全部溶解。采用多功能酶标仪测 570 nm 波长下各个孔的吸光度值。用GraphPad Prism 5作图, 并计算CPX的 IC_{50} 。

1.5 细胞增殖实验

SHG44细胞消化后计数, 接种到96孔板中, 密度为 2×10^3 个/孔, 培养基 0.1 mL /孔, 放在细胞培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后加入CPX浓度依次为 $0 \mu\text{mol/L}$ 、 $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 的培养基。每个浓度设置6个复孔, 共测定5个时间点: 0、1、2、3、4天。检测及作图方法同细胞毒性实验。

1.6 克隆形成实验

SHG44细胞消化后计数, 分别接种到6孔板中, 每孔1 000个细胞, 放在细胞培养箱中培养每3天换1次液, 培养7~10天, 直到显微镜下看到明显的细胞集落。吸弃6孔板中原培养基, 换成含有相应药物浓度的培养基, 每个浓度点设置3个复孔, 药物处理48 h后, 吸弃原培养基, 每孔加入 1 mL 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗皿, 重复3次。弃掉PBS后, 每孔加入 1 mL 甲醇固定20 min。弃掉甲醇, 用PBS洗皿, 倒扣6孔板晾干。每孔加入 1 mL 结晶紫染液染色20 min。回收结晶紫染液, 用PBS洗去皿底残留的染料, 室温倒扣晾干后拍照。

1.7 Transwell测定细胞迁移能力试验

在Transwell的小室中接种2万个细胞于 $200 \mu\text{L}$ 无血清培养基中, 下室中加入 $600 \mu\text{L}$ 含10% FBS的培养基。放于 37°C 细胞培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后, 将小室内的培养基换成含有CPX的无血清的培养基, 每个药物浓度设置3个复孔, 继续放置于 37°C 培养箱中培养。48 h后吸弃小室内原培养基, 加入 $500 \mu\text{L}$ 4%多聚甲醛室温固定20 min。弃去固定液, PBS洗1次, 在24孔板内加入结晶紫染色液 $200 \mu\text{L}$ 染色20 min, 染色完成后, 用棉签轻轻拭去小室膜内

侧未穿过的细胞, 然后在倒置显微镜下观察穿过小室膜的细胞, 并拍照。

1.8 Transwell测定细胞侵袭能力试验

将浓度为 9.8 mg/mL 的基质胶用预冷的F-12培养基按1:10的比例进行稀释, 取 $40 \mu\text{L}$ 加入到各Transwell的小室中, 放置于 37°C 细胞培养箱中过夜。再加入 $50 \mu\text{L}$ F-12培养基水化基质胶30 min。每个小室接种6万个细胞于 $200 \mu\text{L}$ 无血清F-12培养基中, 在下室中加入 $600 \mu\text{L}$ 含10% FBS的F-12培养基以下步骤同Transwell测定细胞迁移能力试验。

1.9 细胞划痕愈合实验

将SHG44细胞接种于6孔板上, 每孔 2×10^6 个细胞, 用小号无菌移液器头划痕, PBS将掉落的细胞洗净后加入含1% FBS的RPMI 1640培养基, 在倒置显微镜下观察并记录0 h的划痕宽度, 将细胞放入 37°C 、5% CO_2 培养箱中继续培养, 24 h后用倒置显微镜观察相同位置并记录其愈合程度。

1.10 细胞内活性氧和线粒体内活性氧检测

SHG44细胞消化后计数, 接种到6 cm细胞培养皿中, 细胞密度为 6×10^5 /皿, 在细胞培养箱中培养过夜。细胞贴壁后换成CPX浓度分别为 $0 \mu\text{mol/L}$ 、 $5 \mu\text{mol/L}$ 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 的培养基, 放回细胞培养箱中继续培养。48 h后收集细胞沉淀, 按照1:1 000的比例用无血清的RPMI 1640培养基稀释DCFH-DA试剂, 使其工作浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ (用于检测细胞内ROS); 同样的方法稀释MitoSox试剂, 使其工作浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ (用于检测线粒体内ROS), 沉淀中各加入工作液 $500 \mu\text{L}$, 37°C 细胞培养箱内孵育20 min。孵育结束后 $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心4 min, 弃上清, 收集细胞沉淀, 并且用无血清RPMI 1640培养基洗涤细胞沉淀3次, 用 $500 \mu\text{L}$ 无血清的RPMI 1640培养基重悬细胞沉淀, 立即用流式细胞仪检测荧光, 采用1通道, 检测需在0.5 h内完成。

1.11 细胞凋亡分析

将SHG44细胞接种到6 cm细胞培养皿中, 每皿 6×10^5 个, 培养箱中培养过夜。细胞贴壁后加入含有CPX的培养基放回细胞培养箱中继续培养48 h。用去离子水将 $10 \times$ 结合缓冲液稀释成 $1 \times$ 结合缓冲液。工作液为 $100 \mu\text{L}$ 的 $1 \times$ 结合缓冲液中加入 $5 \mu\text{L}$ FITC和 $5 \mu\text{L}$ PI。另设置空白管即 $100 \mu\text{L}$ 的 $1 \times$ 结合缓冲液, FITC单染管和PI单染管即 $100 \mu\text{L}$ 的 $1 \times$ 结合缓冲液中加入 $5 \mu\text{L}$ FITC或者 $5 \mu\text{L}$ PI。细胞分别收集在 1.5 mL 离心管中, 用 $100 \mu\text{L}$ 的工作液重悬, 室温孵育20 min。每

管加入400 μL 的1 $\times$ 结合缓冲液,混匀后立即用流式细胞仪1通道和2通道检测荧光强度,并在0.5 h内完成。

1.12 海马生物能量测定仪检测经药物处理后细胞的线粒体呼吸氧耗率

SHG44细胞消化后计数,接种于XF96细胞培养板中,每孔细胞数为 1.5×10^4 个,培养基80 μL ,XF96细胞培养板的4个角每孔加入80 μL 培养基作为背景校正孔细胞培养箱中培养过夜使细胞贴壁。细胞贴壁后换成CPX浓度分别为0 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基。放回培养箱内继续培养12 h。具体步骤参照参考文献[15]修改。

1.13 细胞总蛋白的测定和蛋白印迹

细胞用RIPA裂解液(已加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂)在冰上裂解20 min,然后13 000 r/min于4 $^{\circ}\text{C}$ 离心30 min,收集上清液,用BCA蛋白质检测试剂盒检测蛋白质浓度。取20 μg 蛋白质进行13% SDS-PAGE蛋白质电泳,然后将所分离的蛋白质湿转到硝酸纤维素膜上,并用5%的脱脂牛奶封闭1.5 h;于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜。一抗分别为: β -Actin和Snail按1:3 000稀释,STAT3、p-STAT3、MMP9、Snail、PARP和Caspase 3均按1:1 000稀释,Cleaved Caspase 3按1:500稀释。4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜,第2天用1 $\times$ TBST洗膜,室温孵育二抗1 h。用1 $\times$ TBST洗膜3次,每次10 min。加入ECL化学发光试剂,用X-光胶片显影,蛋白质条带用ImageJ软件进行定量统计分析。

1.14 逆转录及实时荧光定量PCR(qPCR)

SHG44细胞经CPX处理48 h后收集细胞沉淀,按照南京诺唯赞生物科技有限公司逆转录和qPCR试剂盒的方法进行操作。本研究所用的引物序列STAT3:5'-CGG AGAAGC ATC GTG AG TGA G-3'(正向引物),3'-GTT GCC GCC TCT TCC AGT CAG-5'(反向引物);GAPDH:5'-GAC TCA TGA CCA CAG TCC ATG C-3'(正向引物),3'-CAG GTC AGG TCC ACC ACT GA-5'(反向引物)。

1.15 统计学方法

所有试验均独立重复3次,所有统计分析均使用SPSS 17.0和GraphPad Prism 5进行统计分析。数据统计以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示,两个样本之间的均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示两样本之间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CPX抑制SHG44细胞的增殖和克隆形成

为了研究CPX对胶质瘤细胞的作用,我们首先

使用MTT细胞毒性及细胞增殖检测试剂盒检测了SHG44细胞经浓度梯度的CPX处理48 h后的 IC_{50} ,结果如图1A所示。CPX对SHG44细胞的 IC_{50} 为27.51 $\mu\text{mol/L}$ 。根据 IC_{50} 检测的数值,我们按CPX浓度分别为0 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 处理SHG44细胞,通过MTT试剂盒检测细胞的吸光度,作图分析细胞的增殖情况。如图1B所示,随着药物浓度的提高与处理时间的延长,CPX能较好地抑制SHG44细胞的增殖。为了研究CPX对SHG44细胞克隆形成的影响,我们将细胞消化后计数,在6孔板中各铺入1 000个细胞进行培养,待细胞形成集落后,分别加入浓度梯度的CPX,48 h后观察克隆形成情况,如图1C所示。结果表明,CPX对SHG44细胞的增殖和克隆形成能力均有显著的抑制作用。

2.2 CPX抑制SHG44细胞中STAT3的表达

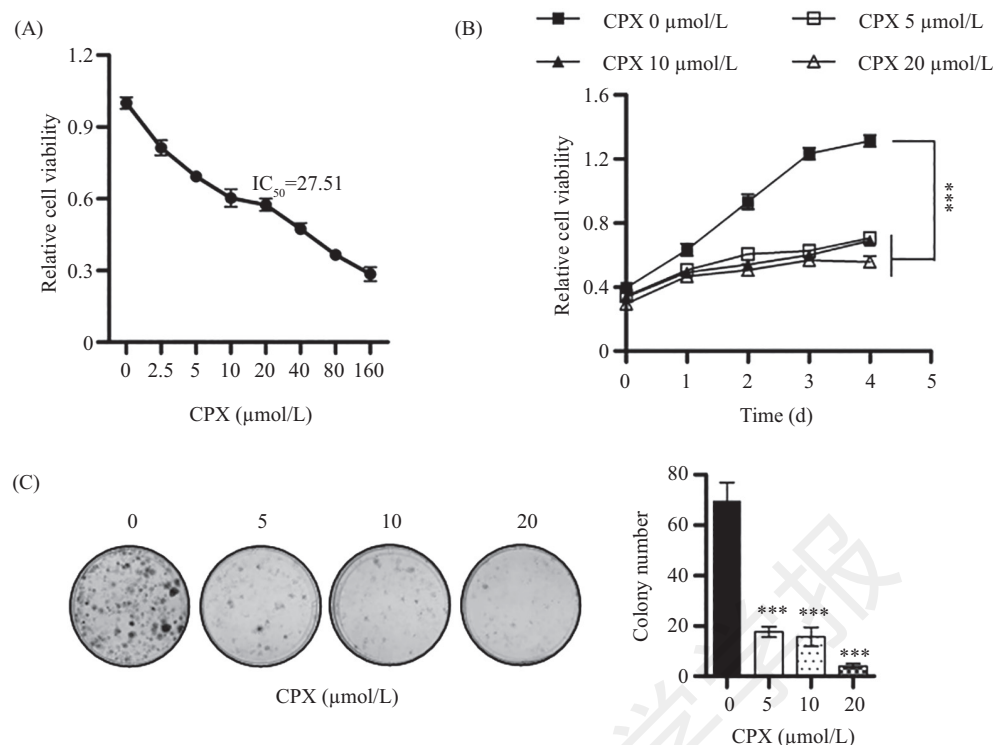
为了进一步探究影响SHG44细胞生物学功能的机制,我们用梯度浓度的CPX处理SHG44细胞48 h,随后分别提取细胞蛋白和RNA,通过Western blot检测后发现,STAT3以及其下游与迁移、侵袭相关的蛋白表达量均下降(图2A)。qPCR检测发现,STAT3在mRNA转录水平也下降(图2B)。

2.3 CPX抑制SHG44细胞的迁移和侵袭

有文献表明,STAT3调控与迁移、侵袭相关的基因表达,如MMP9、Snail、E-Cadherin、N-Cadherin等^[16]。为了探究CPX对SHG44细胞的迁移和侵袭能力是否也有一定的影响,经梯度浓度的CPX处理后,我们利用Transwell小室检测SHG44细胞的迁移和侵袭能力,结果图3所示。无论是SHG44细胞的迁移能力还是侵袭能力(图3A),在CPX的作用下均显著被抑制,且具有统计学意义(图3B)。为了进一步明确CPX对SHG44细胞迁移能力的影响,我们又进行了细胞划痕实验。结果表明,随着CPX浓度的提高,细胞愈合能力下降(图3C),且具有统计学意义(图3D)。因此我们推测,CPX可能通过影响STAT3的表达从而抑制SHG44细胞的迁移和侵袭。

2.4 CPX使SHG44细胞内活性氧累积

已有文献报道,线粒体中的STAT3积累增加,会导致ROS积累减少,从而起到抑制细胞凋亡的作用^[14]。上述结果表明,CPX抑制STAT3的表达,那么,是否会对细胞内ROS的累积产生影响呢?我们检测了经CPX处理48 h后SHG44细胞内ROS的产生量。如图4A所示,随着CPX浓度的提高,ROS在细胞内显著累

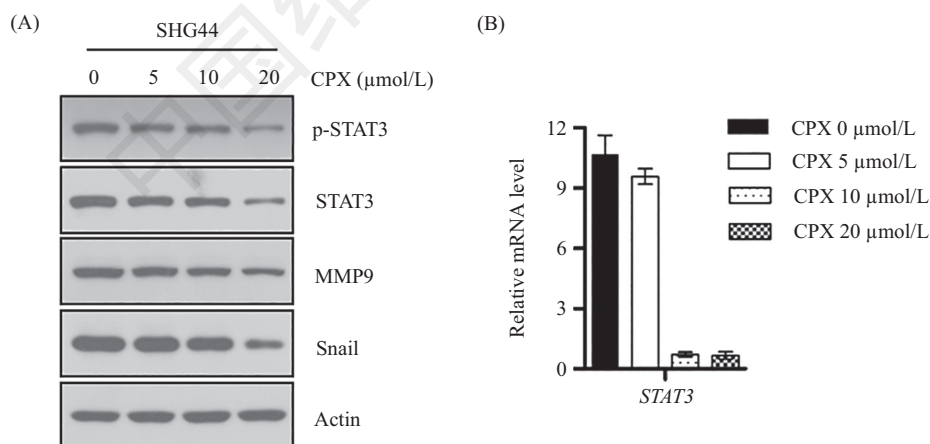


A: MTT细胞毒性和细胞增殖试剂盒检测不同浓度的CPX处理SHG44细胞48 h后的 IC_{50} ; B: SHG44细胞经梯度浓度的CPX处理后, 分别在0、1、2、3、4天运用MTT试剂盒检测细胞增殖能力; C: 用结晶紫将不同浓度CPX处理的SHG44细胞的克隆集落染色后拍的克隆集落照片及数量统计柱状图。*** $P < 0.001$, 与CPX 0 μmol/L处理组比较。

A: the MTT cell proliferation and cytotoxicity assay kit were used to detect IC_{50} of SHG44 cells treated with a gradient dose of CPX for 48 h. B: SHG44 cells were treated with 0, 5, 10, 20 μmol/L CPX for 4 days, and the relative cell proliferation curves were plotted by MTT cell proliferation and cytotoxicity assay kit. C: representative images and quantitative histograms of clonal formation assay of SHG44 cells with CPX for 48 h. *** $P < 0.001$ compared with the CPX 0 μmol/L treatment group.

图1 CPX对SHG44细胞增殖和克隆形成的影响

Fig.1 Effects of CPX on proliferation and clonal formation of SHG44 cells



A: 浓度梯度的CPX处理SHG44细胞48 h后, Western blot检测p-STAT3、STAT3、MMP9和Snail的蛋白表达, Actin作为内参; B: 浓度梯度的CPX处理SHG44细胞48 h后qPCR检测STAT3的mRNA表达水平。

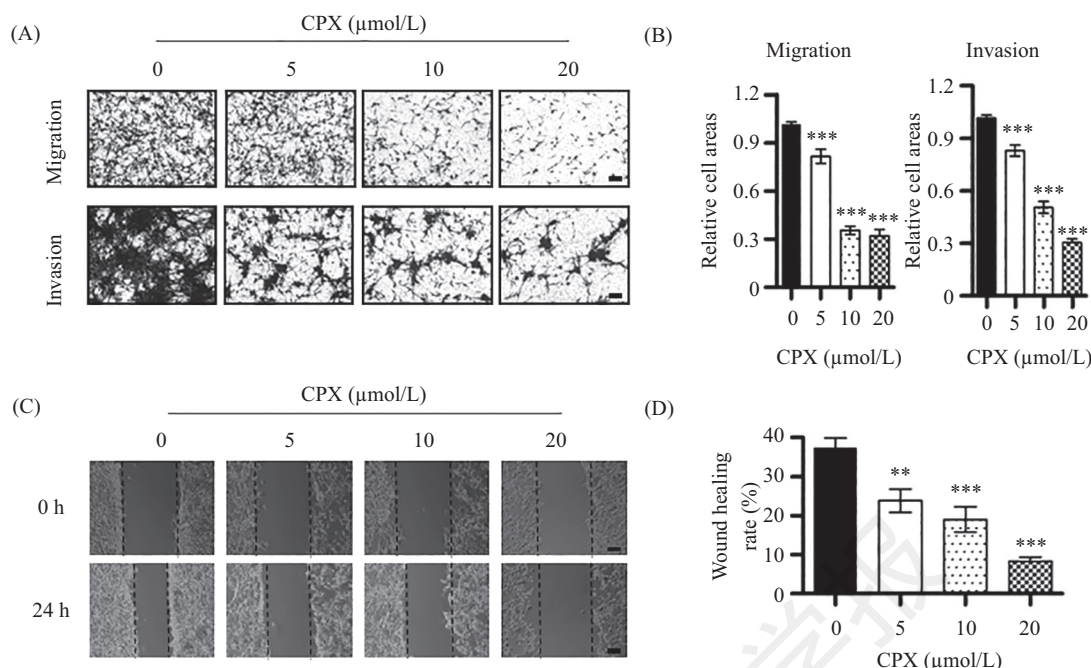
A: immunoblot detecting expression of p-STAT3, STAT3, MMP9 and Snail of SHG44 cells treated with CPX for 48 h; B: mRNA levels of *STAT3* in SHG44 cells upon CPX treatment for 48 h.

图2 SHG44细胞经CPX处理后STAT3的表达情况

Fig.2 Expression of STAT3 in SHG44 cells treated with CPX

积。同时有研究证明, STAT3中半胱氨酸的氧化可以作为电子清除剂, 使线粒体中ROS水平降低, 从而

保护线粒体结构的稳定^[13]。所以, 我们又进一步的检测了经CPX处理后线粒体中的活性氧产生量, 如

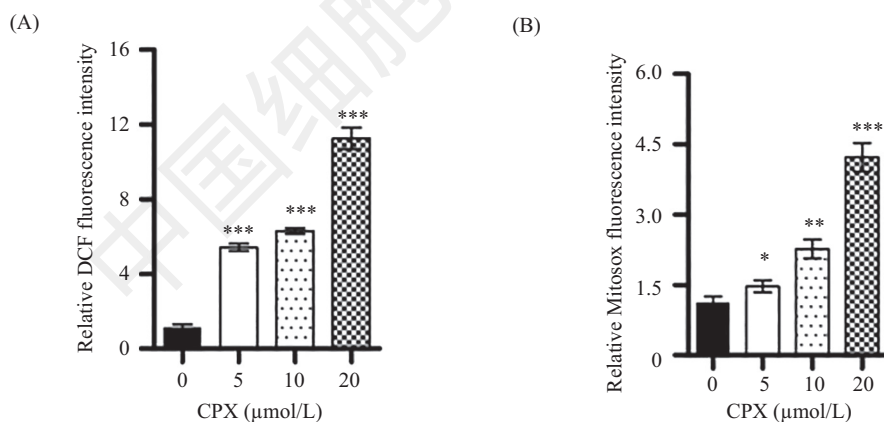


A: Transwell小室检测不同浓度的CPX处理SHG44细胞的迁移和侵袭能力, 标尺=50 μm; B: SHG44细胞经CPX处理48 h后迁徙和侵袭相对细胞数量统计; C: 倒置显微镜下观察划痕愈合实验中CPX处理SHG44细胞24 h的迁移能力, 标尺=100 μm, 此为其中1次实验的图; D: 对C实验进行统计分析。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, 与CPX 0 μmol/L处理组比较。

A: representative images of transwell migration and invasion of SHG44 cells, bar=50 μm; B: the quantitative chart assay of SHG44 cells treated with CPX; C: migration ability in SHG44 cells treated with CPX for 24 h, detected by wound healing assay, bar=100 μm; D: statistical analysis of C. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the CPX 0 μmol/L treatment group.

图3 SHG44细胞经CPX处理后的迁移和侵袭

Fig.3 Migration and invasion of SHG44 cells treated with CPX



A: 流式细胞仪检测SHG44细胞经CPX处理48 h后细胞内ROS水平; B: 流式细胞仪检测SHG44细胞经CPX处理48 h后线粒体内ROS水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与CPX 0 μmol/L处理组比较。

A: CPX increases intracellular ROS production in SHG44 cells measured by ROS Assay Kit (DCFH-DA); B: mitochondrial ROS level of CPX treated with SHG44 cells, as measured by the MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator kit. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the CPX 0 μmol/L treatment group.

图4 CPX对SHG细胞总的ROS和线粒体内ROS的影响

Fig.4 Effects of CPX on total ROS and mitochondrial ROS in SHG44 cells

图4B所示, SHG44细胞线粒体中ROS显著增高。

2.5 CPX抑制SHG44细胞的氧化磷酸化

基于以上结果, 我们又进一步探究了CPX对SHG44细胞耗氧量的影响。在肿瘤细胞生长过程中

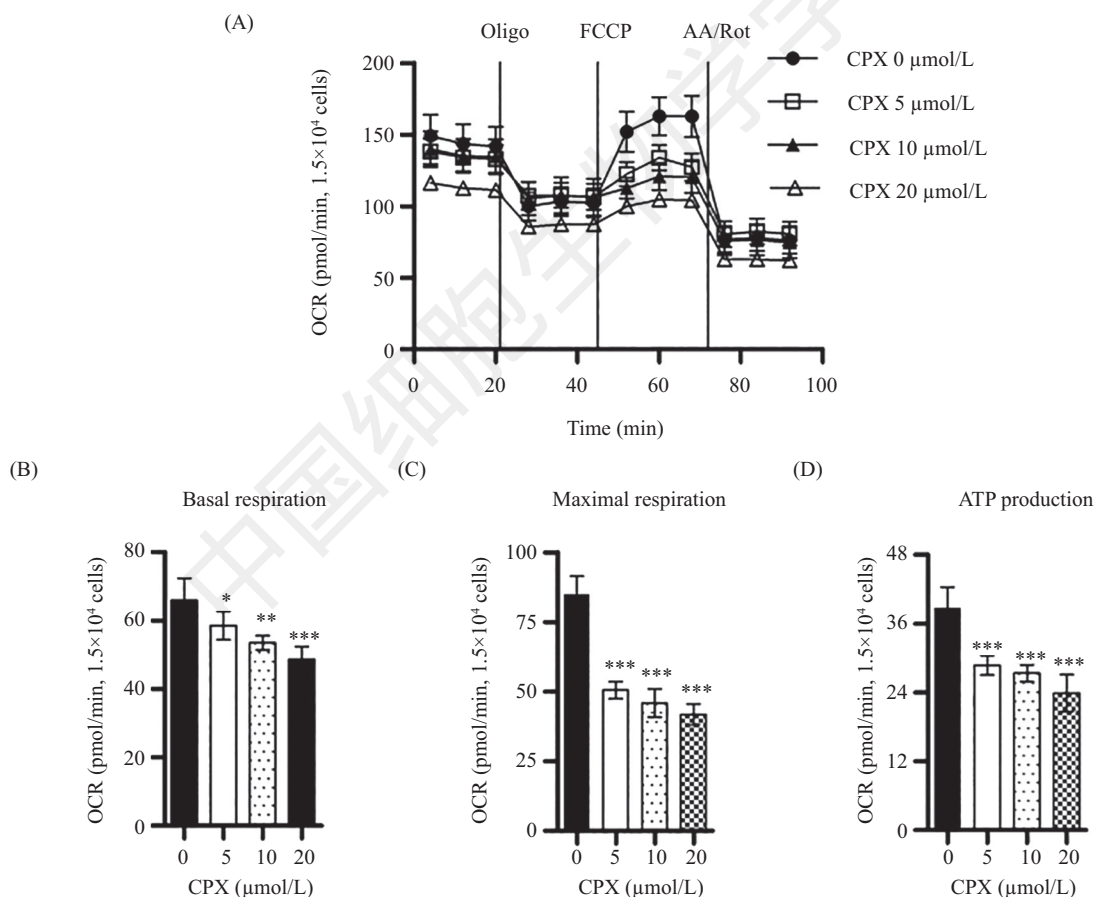
能量代谢发挥着重要的作用, 线粒体是细胞物质代谢与能量供应的中心, 我们应用Seahorse XF96 Flux Analysis分析仪对经梯度浓度CPX处理后的SHG44细胞的耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)进行

了实时监测,如图5A所示,通过依次加入寡霉素(oligomycin, Oligo)、羰基氰-对-三氟甲氧基苯肼(carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, FCCP)、抗霉素A(antimycin A, AA)和鱼藤酮(rotenone, Rot),发现随着CPX浓度的增加,细胞整体OCR水平下降。经统计分析发现,CPX处理细胞后其基础呼吸(basal respiration)、最大呼吸(maximal respiration)和ATP产生量(ATP production)相较于对照组均发生显著的下调(图5B~图5D)。这说明,CPX抑制SHG44细胞的线粒体呼吸,从而破坏线粒体功能的完整性,且ATP产生的降低会影响肿瘤细胞的生物功能,如细胞的增殖、迁移及侵袭等能力。之前的研究表明,ROS水平过高会导致肿瘤细胞的氧化损伤,进而影响线粒体的功能。所以,我们认为,CPX可能通过调控线粒

体的ROS水平损伤线粒体,从而抑制胶质瘤细胞的氧化磷酸化水平。

2.6 CPX引起SHG44细胞凋亡

已有研究证明,ROS的累积会引起线粒体功能受损,ATP产生减少,细胞凋亡增加^[16]。为了进一步探究CPX抑制线粒体氧化磷酸化后对SHG44细胞凋亡的影响,我们运用流式细胞仪检测了SHG44细胞的凋亡水平。如图6A和图6B所示,随着CPX浓度的提高,细胞的凋亡水平显著上升,且基本是晚期凋亡。为了更深入地了解其机制,我们将CPX处理后的SHG44细胞进行蛋白质分离,检测凋亡相关蛋白PARP及Caspase 3的蛋白质水平变化。结果表明,随CPX浓度的提高,PARP和Caspase 3的切割都明显增加(图6C)。这说明,CPX可以促进SHG44细胞凋亡。

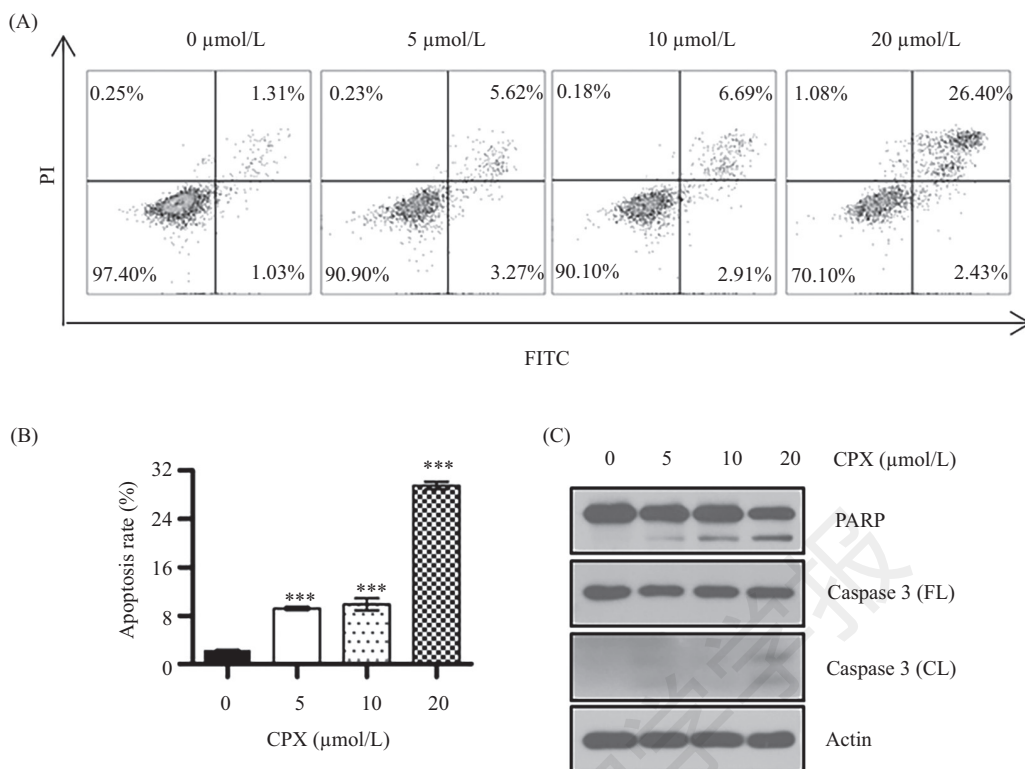


A: 梯度浓度的CPX处理SHG44细胞6 h后,使用Seahorse XF96 Flux analysis分析仪实时监测细胞耗氧率(OCR)。依次加入寡霉素Oligo(1 $\mu\text{mol/L}$)、解偶联剂FCCP(1 $\mu\text{mol/L}$)、复合物III抑制剂抗霉素A(AA)和复合物I抑制剂鱼藤酮(Rot) 1 $\mu\text{mol/L}$; B-D: 统计分析SHG44细胞的基础呼吸(basal respiration)、ATP产生量(ATP production)和最大呼吸(maximal respiration)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,与CPX 0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组比较。

A: cellular OCR was monitored in real time using a Seahorse XF96 Flux analysis analyzer after treatment of SHG44 cells with gradient concentrations of CPX for 6 h. Add Oligo (1 $\mu\text{mol/L}$), FCCP (1 $\mu\text{mol/L}$), complex III inhibitor antimycin A (AA) and complex I inhibitor rotenone (Rot) (1 $\mu\text{mol/L}$); B-D: statistical analysis of basal respiration, ATP production and maximum respiration of SHG44 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the CPX 0 $\mu\text{mol/L}$ treatment group.

图5 CPX对SHG44细胞氧耗率的影响

Fig.5 Effects of CPX on oxygen consumption rate of SHG44 cells



A: SHG44细胞在梯度浓度的CPX处理48 h后, 收集细胞。采用凋亡试剂盒以FITC、PE双染色, 在流式细胞仪上检测细胞死亡情况; B: 细胞凋亡数据采用SPSS 16.0和GraphPad软件进行分析, *** $P < 0.001$, 与CPX 0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组比较; C: Western blot分析CPX处理后的SHG44细胞中PARP和Caspase 3蛋白质表达情况。

A: SHG44 cells were treated with a gradient concentration of CPX. Cell apoptosis was detected by flow cytometry using apoptotic kit with FITC and PE double staining; B: apoptosis data were analyzed using SPSS 16.0 and GraphPad software, *** $P < 0.001$ compared with the CPX 0 $\mu\text{mol/L}$ treatment group; C: Western blot analysis of PARP and Caspase 3 protein expression in SHG44 cells treated with CPX.

图6 CPX对SHG44细胞凋亡的影响

Fig.6 Effects of CPX on apoptosis of SHG44 cells

3 讨论

近年来老药新用在肿瘤治疗研究中日渐增多, CPX是一种广谱的抗真菌药物, 其化学本质是一种铁螯合剂, 在体内过氧化物降解过程中发挥重要作用^[2]。虽然研究表明, CPX可以诱导多种肿瘤细胞的死亡, 但是对胶质瘤细胞的作用鲜有报道, 且对其作用机制的研究仍在起步阶段。通过我们的研究发现, CPX能够抑制胶质瘤细胞SHG44的增殖、克隆形成、迁移、侵袭和线粒体氧化磷酸化, 同时促进SHG44细胞凋亡。

为了探究CPX引起SHG44细胞生物学功能改变的内在原因, 我们查阅相关文献了解到, 在胶质瘤中STAT3异常激活^[17]。并且STAT3已成为肿瘤治疗的靶点^[10], 阻断STAT3后足以抑制某些疾病的恶性转化^[11-12]。STAT3作为转录因子主要定位在细胞核中, 调控下游与细胞迁移和侵袭相关的基因表达。同时STAT3也可定位在线粒体中, 清除过度累积的ROS,

从而保护线粒体功能。CPX是否能以STAT3为分子靶点, 发挥抗胶质瘤细胞SHG44生长的生理作用。我们用梯度浓度的CPX处理SHG44细胞后提取RNA和蛋白发现, STAT3在mRNA和蛋白水平均下降。这说明, CPX可能是以STAT3为分子靶点发挥抗胶质瘤细胞SHG44生长的作用。

STAT3可以介导下游MMP9、Snail、E-Cadherin、N-Cadherin等与迁移、侵袭相关的基因表达^[18]。胶质瘤具有高度侵入性的特点, 经常浸润周围正常脑组织, 从而无法完全手术切除。同时已有研究证明, STAT3抑制剂在体外可以降低胶质母细胞瘤细胞的迁移能力^[19]。我们通过Transwell小室检测细胞的迁移和侵袭能力, 可以清楚地看到CPX处理SHG44细胞后, 其迁移和侵袭能力均下降。结合我们的研究结果, STAT3可能可以成为抑制胶质瘤迁移和侵袭的潜在靶点, CPX有望成为抑制胶质瘤迁移和侵袭的治疗药物。虽然STAT3主要定位在核中发挥转

录和调控作用, 但已有文献报道, STAT3也可以定位在线粒体中, 发挥重要的生物学功能。当线粒体中的STAT3积累增加, 会使ROS产生减少, 从而起到抑制细胞凋亡的作用^[14]。ROS如同一把双刃剑, 在不同状态下发挥着两种截然相反的作用, 缓慢增加的ROS可以通过某些信号通路的激活促进肿瘤生长, 而过量或急性增加的ROS会加快细胞氧化损伤而抑制肿瘤生长, 促进细胞的凋亡和自噬^[19-21]。当线粒体中ROS产生过多时, STAT3中半胱氨酸的氧化可以作为电子清除剂, 使ROS水平降低, 从而保护线粒体结构的稳定^[13]。线粒体作为细胞ATP的主要来源, 对细胞生长和代谢都起着至关重要的作用。结合我们的研究结果, CPX能够引起STAT3表达量下降, 造成ROS累积, 从而使线粒体功能损伤, 氧化磷酸化水平下降, 进而影响细胞的生物学功能, 如增殖、迁移、侵袭等, 同时促进细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞的生长和存活。我们在接下来的实验中会深入探究CPX对STAT3的作用机制, 同时通过裸鼠异种移植瘤模型检测CPX在体内抑制肿瘤的效果。

综上所述, CPX能够以STAT3为分子靶点, 抑制胶质瘤细胞SHG44的生长, 有望成为临床上治疗胶质瘤的药物。

参考文献 (References)

- 1 Gupta AK, Skinner AR. Ciclopirox for the treatment of superficial fungal infections: a review. *Int J Dermatol* 2003; 42: 3-9.
- 2 Bohn M, Kraemer KT. Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: S57-69.
- 3 Zhou H, Shen T, Luo Y, Luo Y, Liu L, Chen W, *et al.* The anti-tumor activity of the fungicide ciclopirox. *Int J Cancer* 2010; 127(10): 2467-77.
- 4 Eberhard Y, McDermott SP, Wang X, Gronda M, Venuopal A, Wood TE, *et al.* Chelation of intracellular iron with the antifungal agent ciclopiroxolamine induces cell death in leukemia and myeloma cells. *Blood* 2009; 114(14): 3064-73.
- 5 Hongyu Zhou, Tao Shen, Chaowei Shang, Luo Y, Liu L, Yan J, *et al.* Ciclopirox induces autophagy through reactive oxygen species-mediated activation of JNK signaling pathway. *Oncotarget* 2014; 5(20): 10140-50.
- 6 Weir SJ, Patton L, Castle K, Rajewski L, Kasper J, Schimmer AD, *et al.* The repositioning of the anti-fungal agent ciclopirox olamine as a novel therapeutic agent for the treatment of haematologic malignancy. *J Clin Pharm Ther* 2011; 36(2): 128-34.
- 7 Minden MD, Hogge DE, Weir SJ, Kasper J, Wester DA, Patton L, *et al.* Oral ciclopirox olamine displays biological activity in a phase I study in patients with advanced hematologic malignancies. *Am J Hematol* 2014; 89(4): 363-8.
- 8 Ni Z, Wang B, Dai X, Ding W, Yang T, Li X, *et al.* HCC cells with high levels of Bcl-2 are resistant to ABT-737 via activation of the ROS-JNK-autophagy pathway. *Free Radic Biol Med* 2014; 70: 194-203.
- 9 Silva CM. Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 2004; 23(48): 8017-23.
- 10 Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285(1/2): 1-24.
- 11 Johnston PA, Grandis JR. STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Mol Interv* 2011; 11(1): 18-26.
- 12 Turkson J, Bowman T, Garcia R, Caldenhoven E, De Groot RP, Jove R. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* 1998; 18(5): 2545-52.
- 13 Szczepanek K, Lesniewski EJ, Larner AC. Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends Cell Biol* 2012; 22(8): 429-37.
- 14 Szczepanek, Chen Q, Derecka M, Salloum FN, Zhang Q, Szelaq M, *et al.* Mitochondrial-targeted signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protects against ischemia-induced changes in the electron transport chain and the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2011; 286(34): 29610-20.
- 15 Liu Y, Lan L, Huang K, Wang R, Xu C, Shi Y, *et al.* Inhibition of Lon blocks cell proliferation, enhances chemosensitivity by promoting apoptosis and decreases cellular bioenergetics of bladder cancer: potential roles of Lon as a prognostic marker and therapeutic target in bladder cancer. *Oncotarget* 2014; 5(22): 11209-24.
- 16 Xie D, Wu X, Lan L, Shanguan F, Lin X, Chen F, *et al.* Down-regulation of TFAM inhibits the tumorigenesis of non-small cell lung cancer by activating ROS-mediated JNK/p38MAPK signaling and reducing cellular bioenergetics. *Oncotarget* 2016; 7(10): 11609-24.
- 17 Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, Lathem WW, Darnell JE Jr. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 1998; 18(5): 2553-8.
- 18 Jackson C, Ruzevick J, Amin AG, Lim M. Potential role for STAT3 inhibitors in glioblastoma. *Neurosurg Clin N Am* 2012; 23(3): 379-89.
- 19 Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol* 2015; 4(5): 184-92.
- 20 Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aqarwal BB. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid Redox Signal* 2012; 16(11): 1295-322.
- 21 Senft C, Priester M, Polacin M, Schroder K, Seifert V, Koegl D, *et al.* Inhibition of the JAK-2/STAT3 signaling pathway impedes the migratory and invasive potential of human glioblastoma cells. *J Neurooncol* 2011; 101(3): 393-403.