·实验研究·

西达本胺对小鼠三阴性乳腺癌 4T-1 细胞增殖及上皮间质转化的影响

任　雪[1],陈倩影[1],张　浩[1],李银芳[1],杨盛力[2],杜志勇[3],曹春雨[1]
(1 三峡大学医学院,肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室,宜昌 443002;2 华中科技大学同济医学院附属协和医院,武汉 430022;3 三峡大学人民医院,乳腺甲状腺小儿外科,宜昌 443002)

[**摘要**] **目的**:探索组蛋白去乙酰化酶抑制剂西达本胺(chidamide)对三阴性小鼠乳腺癌 4T-1 细胞增殖、侵袭、迁移及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响。**方法**:CCK-8 法分析西达本胺对 4T-1 细胞增殖的影响;流式细胞术检测西达本胺对 4T-1 细胞的细胞周期和细胞凋亡的影响;Western Blot 检测细胞内组蛋白去乙酰化酶 5(histone deacetylase 5, HDAC5)、赖氨酸特异性去甲基化酶 1(lysine-specifc demethylase 1,LSD1)以及 EMT 相关蛋白 E-cadherin、波形蛋白(vimentin)、MMP-9 和 MMP-2 的表达;Transwell 法结合结晶紫染色分析西达本胺对 4T-1 细胞迁移、侵袭的影响;HE 染色法观察肿瘤组织的肺部转移情况及西达本胺对小鼠的毒性作用;ELISA 法分析西达本胺对小鼠免疫系统的影响。**结果**:CCK-8 法检测结果显示西达本胺具有显著抑制 4T-1 细胞增殖的能力,其 24 h 的 IC_{50} 值为 43.42 μmol·L^{-1}。西达本胺可诱导 4T-1 细胞发生 G_2/M 期阻滞以及细胞凋亡。同时发现,西达本胺显著下调 4T-1 细胞中 HDAC5 的 mRNA 和蛋白表达,但只下调 LSD1 的蛋白表达;此外,4T-1 细胞内 EMT 相关因子 E-cadherin, vimentin, MMP-9 和 MMP-2 的表达显著下调。Transwell 实验发现,西达本胺显著抑制 4T-1 细胞的迁移和侵袭。体内实验表明,10 mg·kg^{-1}西达本胺抑制了 4T-1 细胞在荷瘤小鼠体内的增殖和肺转移,未对小鼠体重及心脏、肝脏、肾脏组织形态产生显著影响。**结论**:西达本胺能够下调 HDAC5,LSD1 和 EMT 相关蛋白 E-cadherin, vimentin, MMP-9 和 MMP-2 的表达,并抑制 4T-1 细胞体内、体外的增殖与迁移,提示西达本胺具有用于临床抗三阴性乳腺癌治疗的潜在价值。

[**关键词**] 西达本胺;组蛋白去乙酰化酶 5;三阴性乳腺癌;上皮间质转化;肿瘤转移
[**中图分类号**] R96　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003－3734(2021)23－2215－10

Effect of chidamide on proliferation and epithelial mesenchymal transformation of murine triple negative breast cancer 4T-1 cells

REN Xue[1], CHEN Qian-ying[1], ZHANG Hao[1], LI Yin-fang[1], YANG Sheng-li[2], DU Zhi-yong[3], CAO Chun-yu[1]
(1 *Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang* 443002, *China*; 2 *Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan* 430022, *China*; 3 *Renmin Hospital of China Three Gorges University, Breast Thyroid Pediatric Surgery, Yichang* 443002, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the effects of histone deacetylase inhibitor chidamide on the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of murine triple-negative breast cancer 4T-1 cells. **Methods**: CCK-8 method was performed to analyze the effects of chidamide on the proliferation of 4T-1

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81772833)
[**作者简介**] 任雪,女,硕士研究生,主要从事分子生物学与肿瘤免疫学研究。联系电话:(0717)6397179,E-mail:1250129932@qq.com。
[**通讯作者**] 曹春雨,男,副教授,主要从事肿瘤表观遗传学研究。联系电话:(0717)6397179,E-mail:caocy@ctgu.edu.cn。

cells; flow cytometry to detect the effects of chidamide on the cell cycle and apoptosis of 4T-1 cells; Western Blot to detect intracellular histone deacetylase 5, lysine-specifc demethylase 1 and EMT-related proteins E-cadherin, Vimentin, MMP-9, MMP-2 expression; Transwell method to analyze the effect of chidamide on the migration and invasion of 4T-1 cells; HE staining method to observe the pulmonary metastasis of tumor tissues and the toxicity of chidamide on mice; ELISA method to analyze the effect of chidamide on the immune system in mice. **Results**: The results of CCK-8 method showed that chidaniline had the ability to prominently inhibit the proliferation of 4T-1 cells, and its 24 h IC_{50} value was 43.42 $\mu mol \cdot L^{-1}$. Chidamide could induce G_2/M phase arrest and apoptosis of 4T-1 cells. At the same time, it was found that chidamide distinctly down-regulated the mRNA and protein expression of HDAC5 in 4T-1 cells, but only down-regulated the protein expression of LSD1; in addition, the expressions of EMT-related factors E-cadherin, vimentin, MMP-9, MMP-2 were notably down-regulated. Transwell experiments found that chidamide obviously inhibited the migration and invasion of 4T-1 cells. *In vivo*, chidamide of 10 $mg \cdot kg^{-1}$ showed an outstanding suppression effect on the proliferation and pulmonary metastasis of 4T-1 cells in tumor-bearing mice, but did not affect the body weight and the morphology of heart, liver, and kidney tissues. **Conclusion**: Chidamide can depress the expression of HDAC5, LSD1 and EMT-related proteins E-cadherin, Vimentin, MMP-9, MMP-2, and inhibit the proliferation and migration of 4T-1 cells both *in vivo* and *in vitro*, indicating that chidamide has a great potential for clinical anti-triple-negative breast cancer treatment.

[**Key words**] chidamide; histone deacetylase 5; triple-negative breast cancer; epithelial-mesenchymal transition; tumor metastasis

表观遗传调控的异常改变如组蛋白修饰紊乱、DNA 的高甲基化以及 microRNA 的抑制性修饰在包括三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer,TNBC)在内的乳腺癌发生发展中发挥重要作用[1-3]。其中,组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶 1(lysine-specific demethylase 1, LSD1)可与 Snail 以及 CoREST 形成蛋白复合物,使 E-cadherin 启动子区组蛋白 H3K4 二甲基化和波形蛋白(vimentin)启动子区组蛋白 H3K9 二甲基化发生去甲基反应,分别导致 *E-cadherin* 基因表达抑制和 *vimentin* 基因表达激活,从而促进乳腺癌上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)的发生[4-5];表明 LSD1 与乳腺癌 EMT 之间存在十分密切的联系。本实验室进一步研究发现,三阴性乳腺癌组织中 LSD1 和 HDAC5 高表达,且二者之间存在交叉对话,并具有协同促进三阴性乳腺癌细胞增殖、迁移的作用[6]。西达本胺(chidamide)是我国自主研发的一类苯甲酰胺类组蛋白去乙酰化酶抑制剂,目前被国家药品监督管理局批准用于治疗复发或难治性外周血 T 细胞淋巴瘤(PTCL)[7]。尽管目前已有部分研究表明西达苯胺抑制三阴性乳腺癌细胞增殖与迁移,但西达本胺对三阴性乳腺癌细胞上皮间质转化的影响及其潜在机制尚不清楚。此外,已有研究表明低浓度的西达苯胺对 HDAC1,2,3 以及 10 均有抑制作用[8],而其对 HDAC5 的抑制作用目前尚未报道。鉴于 HDAC5 和 LSD1 在三阴性乳腺癌发生及其 EMT 进展中的作用,探讨西达本胺对 HDAC5 和 LSD1 协同作用的影响具有重要意义。本实验以小鼠三阴性乳腺癌 4T-1 细胞为研究模型,分析了西达本胺在对三阴性乳腺癌细胞侵袭迁移的影响,并对其可能的作用机制进行了探索。通过构建小鼠荷瘤模型,研究了西达本胺在体内对三阴性乳腺癌 4T-1 细胞增殖、侵袭及转移的影响,为西达本胺用于三阴性乳腺癌的临床治疗提供基础研究参考。

材　料

1　药物与试剂

西达本胺(批号:HY-109015,14292);西达本胺储存液配制:分析天平称取西达本胺干粉 0.021 g,溶解于 5.38 mL 细胞级 DMSO 中,将所得浓度为 10 $mmol \cdot L^{-1}$ 的储存液分装至 1.5 mL EP 管中(每管 1 mL),于 -20 ℃冰箱保存备用;1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清、青霉素/链霉素双抗,购自天津灏洋生物;凋亡检测试剂盒(AnnexinV FITC、PI

Staing Solution,20180625);结晶紫、RIPA 细胞裂解液等化学试剂,购自北京索莱宝(Solarbio)科技有限公司;HDAC5 抗体(Proteintech 公司);E-cadherin,MMP9 和 MMP2 抗体,购自 Cell Signaling Technology 公司;vimentin 抗体(Santa Cruz 公司);β-actin 抗体(北京科美博瑞公司);ECL 超敏显影液(美国 Thermo Scientific 公司);Trizol、逆转录试剂盒,购自日本 Takara 宝生物公司;m-GAPDH,m-HDAC5,m-LSD1 等引物合成于苏州金唯智科技有限公司;小鼠 TNF-α,IFN-γ 检测试剂盒(批号:241141281226;97141051226)。

2 仪器

全波长酶标仪(美国 Thermo 公司);BDFACS-Verse 流式细胞仪(美国 BD 公司);TE2000S 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);Western Blot 电泳系统、PowerPac HC 电泳仪、电转膜系统(美国 Bio-Rad 公司);化学发光成像系统(BIOSHine 公司);实时荧光定量 PCR 仪(德国耶拿分析仪器股份公司);HE 染色组织脱水机(德国 Leica 公司);HE 染色切片机(德国 Microm 公司);HE 染色机(达科为生物技术有限公司)。

3 动物

雌性 BALB/c 小鼠 14 只,6 周龄,体重 18 ~ 22 g,购自三峡大学医学部实验动物中心,许可证号:SYXK(鄂)2017-0061。在恒温(21 ℃ ~ 23 ℃)、恒湿(45% ~ 65%)、各 12 h 明暗周期的饲养室,每笼饲养 3 ~ 5 只小鼠,用全价颗粒饲料喂养,自由进食和饮水。

方 法

1 CCK-8 法分析细胞增殖

传代 4T-1 细胞至 96 孔细胞培养板中(约 1×10^4 个细胞·孔$^{-1}$),常规培养 16 h 后,换用含终浓度为 0,9.375,18.75,37.5,75,150 和 300 μmol·L^{-1}西达本胺的 1640 完全培养基继续培养 24 h,每个浓度设置 4 个复孔。然后加入 CCK-8 检测试剂,于细胞培养箱中孵育 4 h 后,使用酶标仪于 450 nm 波长处检测吸光度(A)。细胞抑制率计算公式:细胞抑制率 = $(A_{实验组} - A_{空白组})/(A_{阴性对照组} - A_{空白组}) \times 100\%$;Graphpad Prism 8.0 软件计算得出西达本胺的半抑制浓度(IC_{50})值。

2 流式细胞术检测 4T-1 细胞周期

西达本胺处理 4T-1 细胞 24 h 后,收集细胞至 1.5 mL EP 管内,使用 1 mL 预冷 75% 乙醇(PBS 配制)轻柔重悬细胞沉淀。4 ℃ 固定过夜后,以 1 000 r·min^{-1}离心 3 min 弃上清、以 1 mL 的 PBS 重悬细胞。再以 1 000 r·min^{-1}离心 3 min 弃上清后,每管内加入 0.5 mL 的 1 × Binding buffer 重悬混匀,然后加入 20 μL 0.5 g·L^{-1} PI,混匀后 37 ℃ 避光孵育 15 min。使用流式细胞仪分析细胞周期。

3 流式细胞术检测 4T-1 细胞凋亡比例

传代 5×10^5 个 4T-1 细胞于 6 孔细胞培养板中,待 16 h 后细胞生长至 60% 融合,换用含终浓度为 0,37.5,75 μmol·L^{-1}西达本胺的 1640 完全培养基继续培养 24 h。收集培养基上清中的细胞及相应的贴壁细胞,以 PBS 轻柔重悬洗涤细胞(防止细胞破损引起实验误差),1 000 r·min^{-1}、4 ℃ 离心 3 min,弃上清,重复 2 次。按试剂盒说明书分别进行不加任何染料、5 μL FITC-AnnexinV 单染、5 μL PI 单染以及(5 μL FITC-Annexin V + 5 μL PI)双染处理,以流式细胞术检测细胞凋亡、坏死。

4 Western Blot 法检测 HDAC5,LSD1 以及 EMT 相关蛋白的水平

RIPA 裂解液提取各组 4T-1 细胞中的总蛋白并制备蛋白样品后,以 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳,然后以电泳转移蛋白至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,以 TBST 洗膜后加入 1% BSA 稀释的一抗,4 ℃ 孵育过夜。然后以 TBST 洗膜,重复 3 次;再加入相应二抗于摇床上室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次后加入 ECL 显影液,使用化学发光成像显影仪显影。最后用 Image J 分析目的蛋白条带的灰度值,目的蛋白相对表达量 = 目的条带灰度值/对应内参条带灰度值。

5 Transwell 法检测肿瘤细胞迁移

向 24 孔细胞培养板中加入含 20% FBS 的 1640 完全培养基(每孔 800 μL),小心将 Transwell 小室放入加有上述培养基的培养孔中。同时收集西达本胺处理前后的 4T-1 细胞并用无血清 1640 培养基重悬;将细胞悬液按照每孔 300 μL(1.5×10^5 个细胞)接种于 Transwell 小室中,常规培养 8 h。取出 Transwell 小室,吸弃其内的培养基并以棉签擦拭后以 1 × PBS 溶液润洗小室 3 次。最后,用 5 mg·mL^{-1}结晶紫-甲醇溶液将小室染色 15 min 后,以去离子水洗去残液,放于倒置显微镜下,每个小室随机选取 3 个视野,分别以 100 × 和 200 × 的放大倍数取图。最后将小室置于避光处自然风干,以 600 μL 结晶紫溶

剂(0.1 mol·L^{-1}枸橼酸钠溶解于50%乙醇)溶解后,使用酶标仪于540 nm处检测其OD值。

6 Transwell-Matrigel结合结晶紫染色法分析肿瘤细胞的侵袭能力

取Transwell小室于24孔细胞培养板内,将基质胶以1∶8比例用无血清培养基稀释后,按每小室50 μL加入并于37 ℃细胞培养箱中孵育过夜(约12 h)使其充分凝固。然后按前述方法加入西达本胺处理前后的4T-1细胞,常规细胞培养24 h。最后,按前述方法以结晶紫染色、倒置荧光显微镜拍照取图;再加入结晶紫溶剂溶解后,用酶标仪于540 nm处检测其OD值。

7 实时荧光定量PCR检测mRNA的表达

西达本胺处理前后的4T-1细胞吸弃培养基、PBS洗去残液。每孔加入800 μL Trizol裂解六孔板中的细胞,转移细胞裂解液至1.5 mL EP管内。每管加入300 μL氯仿、充分震荡后放于室温静置使其分层。然后于4 ℃、13 000 r·min^{-1}离心10 min。转移上清至新的EP管后,每管加入300 μL异丙醇,充分混匀后于冰上放置10 min。4 ℃、13 000 r·min^{-1}离心10 min。弃上清,每管加入1 mL 75%乙醇(DEPC水配置)洗涤沉淀,4 ℃、13 000 r·min^{-1},离心10 min。重复此操作1次。弃上清后将EP管置于无菌台内静置5 min挥发残余乙醇,每管加入30 μL DEPC水充分溶解RNA沉淀,紫外分光光度法检测总RNA浓度。最后取5 μg总RNA,以逆转录试剂盒说明书进行反转录得到cDNA第一链,以鼠源GAPDH为内参基因检测目的基因mRNA的相对表达水平。引物序列如表1所示。

表1 实时荧光定量PCR相关引物序列

基因	引物序列(5'→3')
m-GAPDH-F	TGACCTCAACTACATGGTCTACA
m-GAPDH-R	CTTCCCATTCTCGGCCTTG
m-HDAC5-F	GCGTACAGCAAGACCTTTCAAA
m-HDAC5-R	AGATGTTGTCTGGGAAGAAGGC
m-LSD1-F	GTGGTGTTATGCTTTGACCGT
m-LSD1-R	GCTGCCAAAAATCCCTTTGAGA

8 体内实验检测4T-1细胞增殖与转移

2×10^5个4T-1细胞,接种于14只7周龄BALB/c小鼠左上肢侧乳腺脂肪垫。4 d后,将成瘤小鼠以随机数字法分为模型组($n=6$)和西达本胺处理组($n=8$)。分别以100 μL溶剂(50% DMSO)和西达本胺(10 mg·kg^{-1})[9]腹腔注射小鼠,每连续注射5 d停止给药2 d,持续3周。其中,每隔2 d记录小鼠体重及肿瘤体积($V=D\times d^2/2$,D为肿瘤长径,d为肿瘤短径)。在d 24时以CO_2法处死小鼠、收集血清并剥离肿瘤组织称重,用以评价西达本胺在体内对肿瘤增殖的影响;打开胸腔并取出肺组织,观察肿瘤的胸腔浸润及肺转移。

9 HE染色评价西达本胺对乳腺癌体内肺转移及脏器的毒性影响

将小鼠肺脏、心脏、肝脏、肾脏等组织浸泡于4%多聚甲醛中固定24 h,流水冲洗4 h洗去固定液及结晶沉淀。然后进行组织修理后放入包埋盒,以脱水机进行脱水透明(约20 h)。以石蜡包埋后,完成切片、摊片、烤片等步骤,然后进行HE染色,封片后使用显微镜观察取图。

10 ELISA检测西达本胺对TNF-α和IFN-γ分泌的影响

首先系列稀释标准品蛋白,同时将前述所取小鼠血清分别加入96孔酶标板中,每孔50 μL,每个样品设置3个复孔。按照说明书操作后,以酶标仪于450 nm处测定吸光度值。根据标准曲线计算血清中TNF-α,IFN-γ浓度。

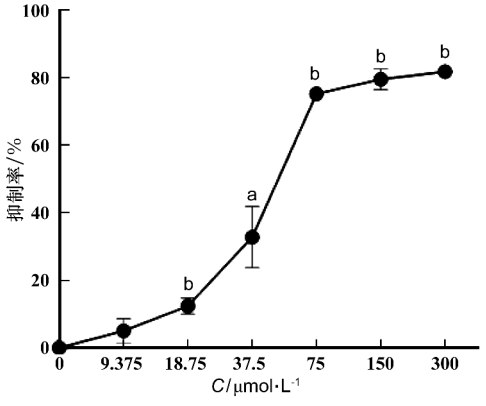
11 数据分析

Image J,Graphpad Prism 8.0等软件扫描灰度、分析数据、绘制图表,并做相关统计学分析。本研究所涉及计量资料用$\bar{x}\pm s$表示。采用独立样本t检验作两组间计量资料的比较,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

结 果

1 西达本胺抑制乳腺癌4T-1细胞增殖

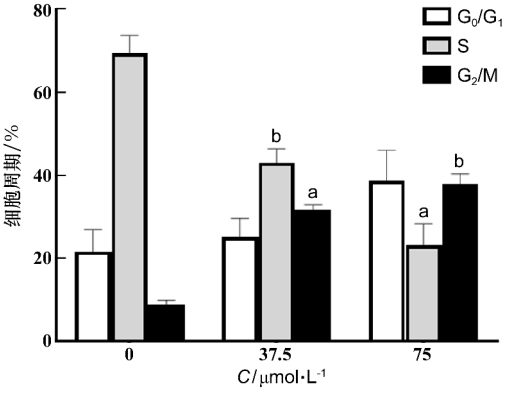
CCK-8法检测结果显示,西达本胺可显著抑制乳腺癌4T-1细胞增殖,且呈现出浓度依赖性(图1)。经Graph Pad Prism 8.0软件计算,西达本胺对乳腺癌4T-1细胞作用的IC_{50}的95%可信区间值为(43.42±4.57) μmol·L^{-1}。后续实验设置37.5,75 μmol·L^{-1}西达本胺作用24 h的4T-1细胞为实验组,以未加药物处理的4T-1细胞为对照组。



与对照组相比，a：$P<0.001$，b：$P<0.000\ 1$

图 1 CCK-8 分析西达本胺对 4T-1 细胞增殖能力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

度升高而作用强度增加的趋势。



与对照组相比，a：$P<0.05$，b：$P<0.01$

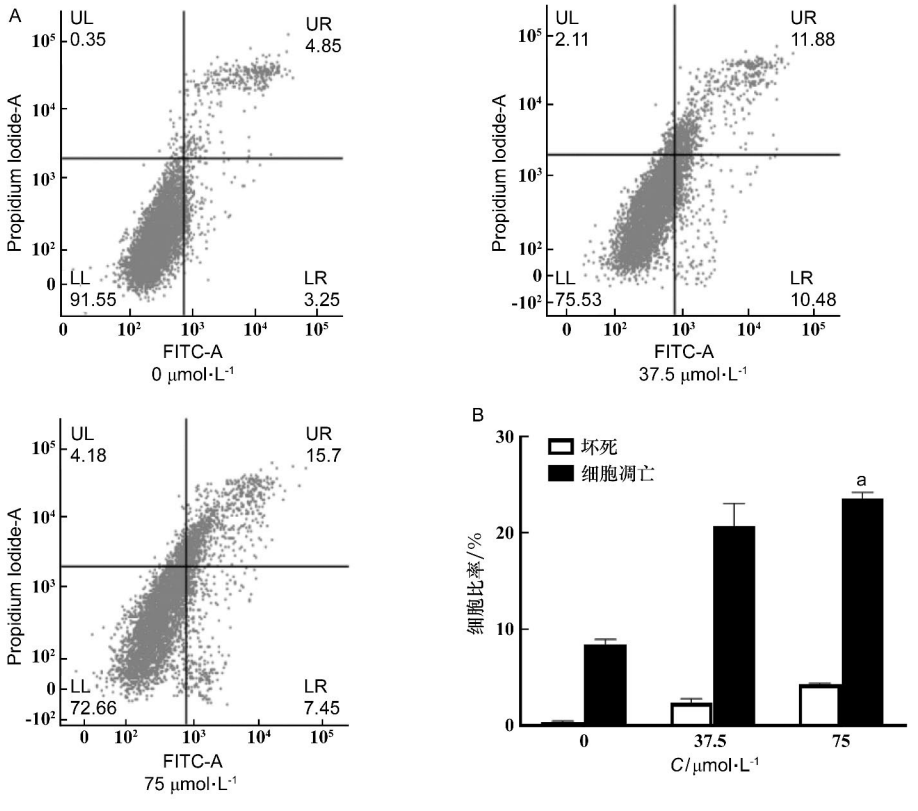
图 2 流式细胞术分析西达本胺对 4T-1 细胞周期的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

2 西达本胺诱导乳腺癌 4T-1 细胞发生 G_2/M 期阻滞

流式细胞术行细胞周期检测结果（见图 2）表明，与对照组相比，西达本胺处理导致 4T-1 细胞 G_2/M 期占比增加，S 期减少，表明西达本胺可以使 4T-1 细胞周期发生 G_2/M 期阻滞，且这一改变呈浓

3 西达本胺诱导乳腺癌 4T-1 细胞凋亡

流式细胞分析结果显示，与对照组相比，经西达本胺处理 24 h 后，4T-1 细胞发生凋亡的比例显著增高，并呈现出药物浓度升高而作用强度增加的趋势，见图 3。

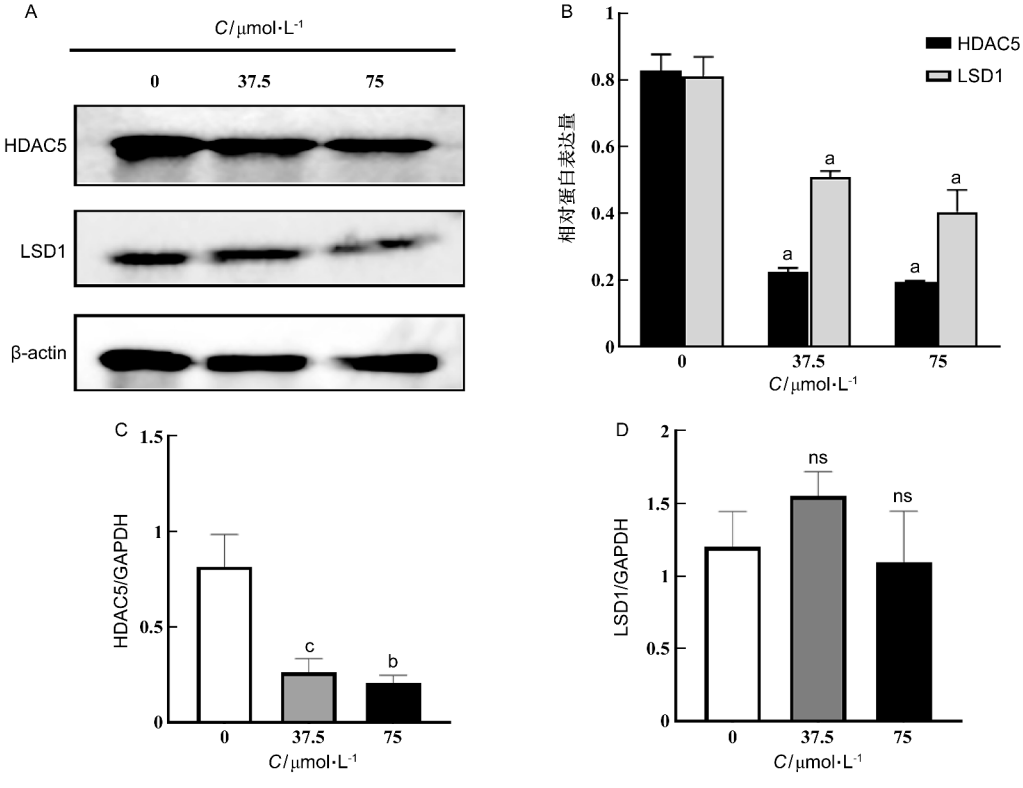


与对照组相比，a：$P<0.01$

图 3 流式细胞术检测西达本胺对 4T-1 细胞凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

4 西达本胺下调乳腺癌 4T-1 细胞中 HDAC5 和 LSD1 蛋白表达

Western Blot 结果显示,与对照组相比,西达本胺处理后的 4T-1 细胞内 HDAC5,LSD1 蛋白表达水平降低,且呈药物浓度升高而作用强度增加的趋势(图 4A 和 B)。同时实时荧光定量 PCR 检测结果表明西达本胺可抑制 HDAC5 的 mRNA 表达水平,但对 LSD1 的 mRNA 表达水平无影响(图 4C 和 D)。

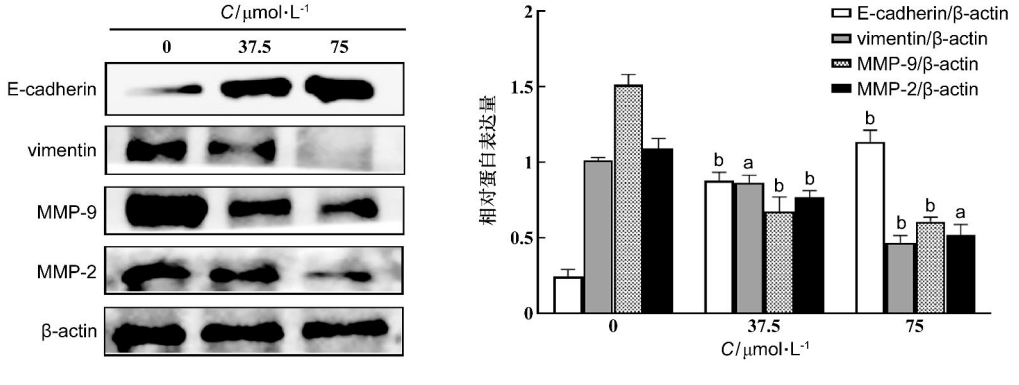


A,B:西达本胺对 4T-1 细胞内 HDAC5,LSD1 蛋白表达的影响及灰度分析图;C:西达本胺对 HDAC5 mRNA 表达水平的影响;D:西达本胺对 LSD1 mRNA 表达水平的影响;与对照组相比,a:$P<0.01$,b:$P<0.001$,c:$P<0.0001$

图 4 西达本胺对 4T-1 细胞内 HDAC5 和 LSD1 表达情况的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

5 西达本胺改变乳腺癌 4T-1 细胞中 EMT 相关因子表达

EMT 相关因子检测结果表明,相较于对照组,西达本胺处理可引起 4T-1 细胞内 E-cadherin 蛋白水平增高, vimentin 蛋白表达下降;MMP-9 和 MMP-2 随西达本胺作用浓度升高在 4T-1 细胞内的蛋白水平逐渐下降(见图 5)。

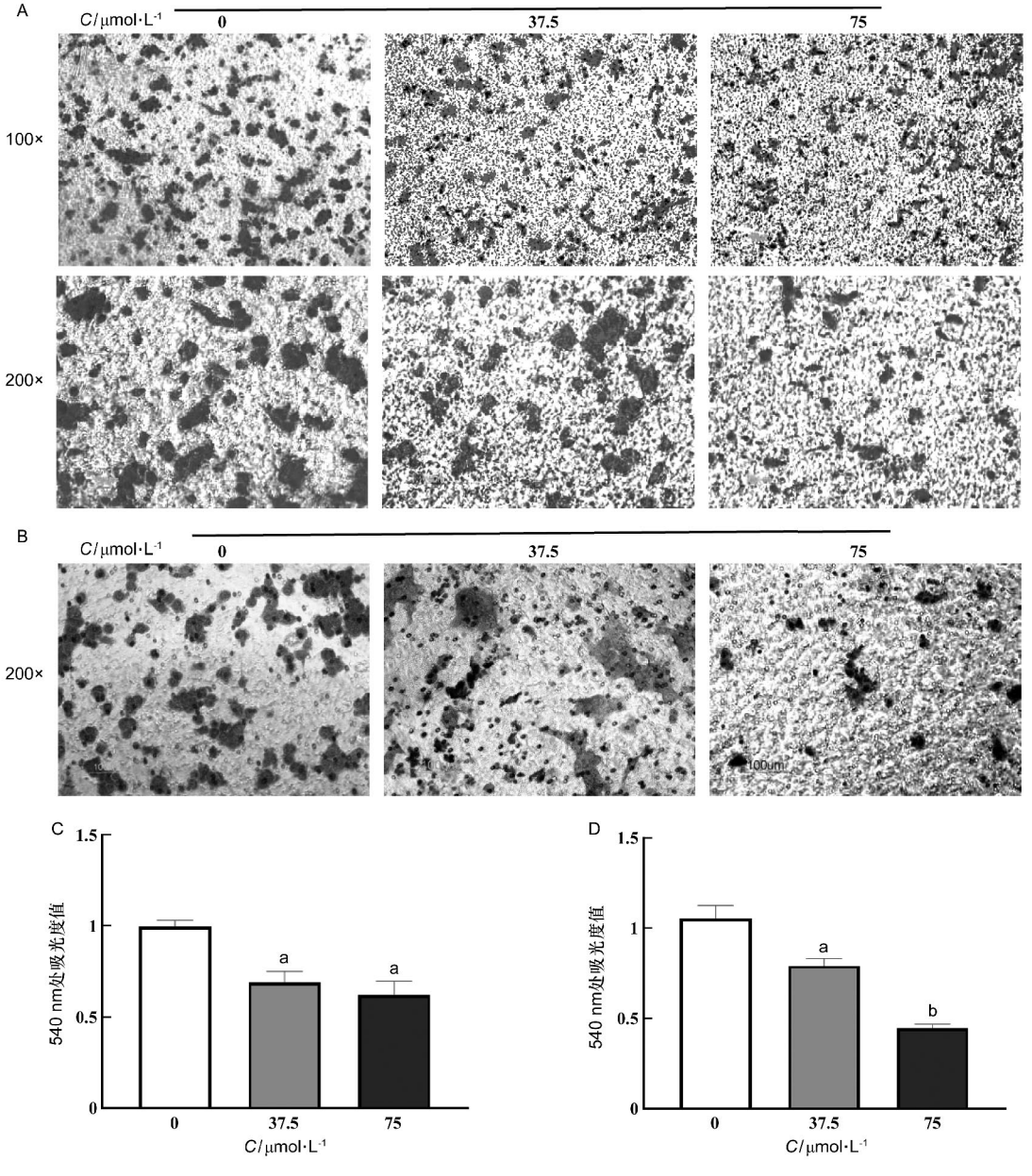


与对照组相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

图 5 蛋白免疫印迹法检测西达本胺对 4T-1 细胞内 EMT 相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

6 西达本胺抑制乳腺癌 4T-1 细胞体外迁移和侵袭

Transwell 实验结果表明,与对照组相比,药物处理组穿过 Transwell 小室聚碳酸酯膜微孔并迁移到小室外的 4T-1 细胞数量明显减少(图 6A 和 C),提示西达本胺能够有效抑制 4T-1 细胞迁移;侵袭实验结果表明,西达本胺处理后,穿透基质胶钻出小室的细胞数目明显减少,且呈药物浓度升高而作用强度增加的特点(图 6B 和 D)。

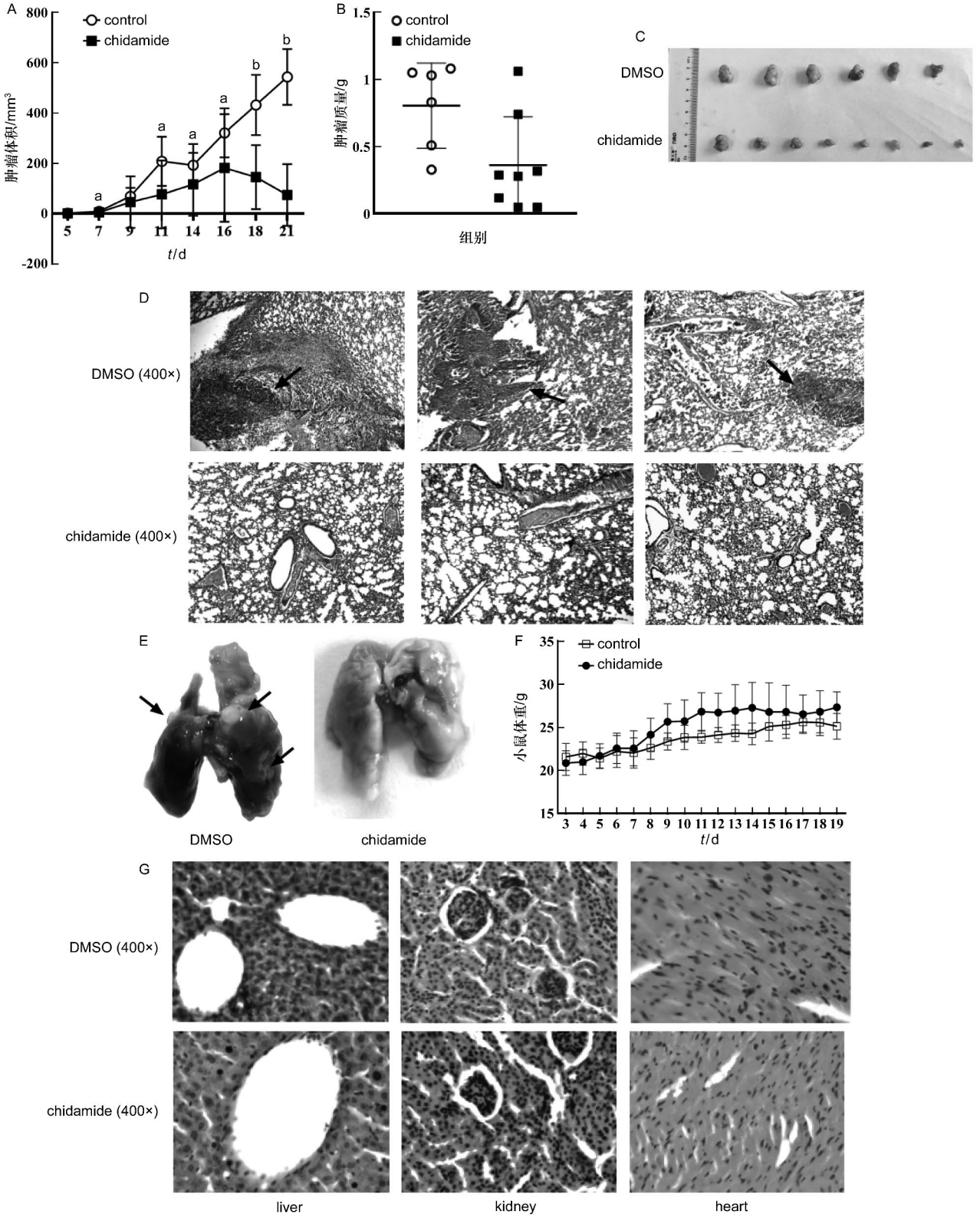


A,C:西达本胺对 4T-1 细胞迁移能力的影响及量化图;B,D:西达本胺对 4T-1 细胞侵袭能力的影响及量化图;与对照组相比,a:$P<0.01$,b:$P<0.001$

图 6 Transwell 法分析 西达本胺对 4T-1 细胞侵袭、迁移能力的影响($\bar{x}\pm s$,$n=3$)

7 西达本胺抑制乳腺癌 4T-1 细胞的体内增殖和迁移

荷瘤小鼠体内实验结果显示,西达本胺治疗组小鼠肿瘤增殖速度及肿瘤重量均明显小于 DMSO 模型组;模型组小鼠胸腔及肺部可见肿瘤组织浸润,而西达本胺治疗组小鼠胸腔及肺部组织未见肿瘤,表明西达本胺可有效抑制肿瘤的体内增殖和转移。小鼠体重变化曲线和 HE 染色结果显示,西达本胺处理对小鼠体重和心脏、肝脏、肾脏等脏器的组织形态没有显著影响,各器官组织结构完整,细胞核质均一,无可见病变,表明该药对小鼠的毒性作用较小。

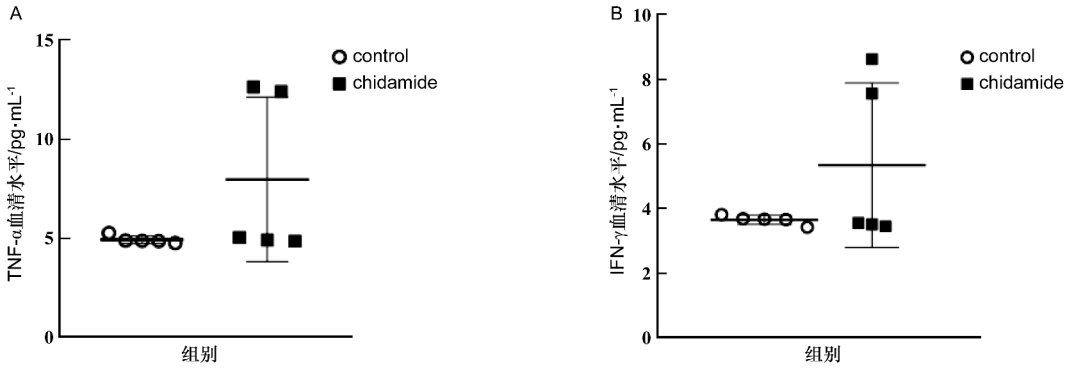


A:肿瘤体积;B:肿瘤质量;C:肿瘤实体观;D:DMSO,chidamide 处理组小鼠肺组织的 HE 染色,$n=3$,箭头所示为肿瘤组织;E:DMSO,chidamide 处理组小鼠肺部实体观;F:DMSO,chidamide 处理组小鼠体重曲线;G:DMSO,chidamide 处理组小鼠心脏、肝脏、肾脏的 HE 染色,$n=3$;chidamide 处理组($n=8$);与模型组($n=6$)相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

图 7 西达本胺体内抑制乳腺癌的增殖和转移($\bar{x}\pm s$)

8 西达本胺不改变小鼠血清 TNF-α,IFN-γ 水平

通过取模型组和西达本胺处理组小鼠血清进行 ELISA 分析发现,西达本胺治疗对小鼠血清中 TNF-α,IFN-γ 的水平无显著影响(见图 8)。



A:西达本胺对小鼠血清 TNF-α 水平的影响;B:达本胺对小鼠血清 IFN-γ 水平的影响

图 8 西达本胺对小鼠血清 TNF-α,IFN-γ 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

讨 论

据最新统计数据表明,至 2019 年乳腺癌已成为全球女性发病率最高的恶性肿瘤,其病死率占所有恶性肿瘤的 15%[10]。目前针对乳腺癌的治疗主要以放化疗结合雌激素阻断和芳香化酶抑制剂等内分泌治疗为主,手术切除已不作为首选[11]。但乳腺癌中高达 15% ~20% 为不表达人表皮生长因子受体(HR)、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)的三阴性乳腺癌。其不仅对内分泌治疗不敏感,且具有易转移、复发率高的特点,目前仍缺乏有效的临床治疗手段。近年来随着人们对表观遗传调控在乳腺癌发生、发展过程中的认识逐步加深,TNBC 中表观遗传治疗靶点的研究已成为热点。

本研究证实西达本胺能够抑制小鼠三阴性乳腺癌 4T-1 细胞的增殖,处理 24 h 时的 IC_{50} 值为 43.42 μmol·L^{-1}。已有研究表明,西达本胺在肺癌 A549 细胞中通过抑制 CD36 的表达,从而使细胞周期发生 G_0/G_1 期阻断并抑制细胞迁移[12];并且西达本胺主要通过增加染色质组蛋白的乙酰化水平诱导肿瘤细胞的凋亡[13-14]。本研究发现,西达本胺不仅诱导 4T-1 细胞发生 G_2/S 期阻断,同时也能够诱导细胞凋亡发生,并在荷瘤小鼠体内显示出抑制肿瘤增殖、转移的作用。此外,有研究发现西达本胺在骨髓瘤细胞中通过增强 LC3B 启动子区 H3K27me3 水平的上调而抑制其转录,从而抑制自噬的发生[9],而西达本胺对乳腺癌 4T-1 细胞的自噬是否有影响仍有待进一步的实验验证。据一项急性淋巴瘤细胞模型的相关研究证实,西达本胺可升高基因启动子区组蛋白 H3K9 的三甲基化水平[15];而本实验室前期研究发现,组蛋白去乙酰化酶 HDAC5 与赖氨酸去甲基化酶 LSD1 之间存在交叉对话,HDAC5 的抑制剂萝卜硫素(sulforaphane)可特异性在乳腺癌细胞中通过阻断转录因子 USF1 的活性下调 HDAC5 的转录水平,从而降低 LSD1 蛋白的稳定性[16];提示西达本胺可能通过 HDAC5-LSD1 调控轴在肿瘤细胞中发挥作用。在本研究中,西达本胺对 4T-1 细胞内 HDAC5 的 mRNA 水平及蛋白水平的表达均有抑制作用,并下调了 LSD1 以及 E-cadherin, vimentin 等 EMT 相关因子的蛋白表达,显著抑制 4T-1 细胞在体内、体外的侵袭和迁移。鉴于 LSD1 在乳腺癌 EMT 发生中的重要作用,上述结果提示西达本胺可能通过抑制 HDAC5 表达来破坏 HDAC5-LSD1 轴,由此干预 4T-1 细胞中 EMT 相关因子的表达,抑制 EMT 发生。这一推测与其他研究[17]结论一致,但西达本胺影响 HDAC5-LSD1 调控轴的确切调节机制还需进一步实验研究。

综上所述,西达本胺可抑制高侵袭性小鼠三阴性乳腺癌 4T-1 细胞的体内外增殖、侵袭和迁移,其作用机制可能是通过靶向 HDCA5-LSD1 调控轴来阻遏细胞周期、诱导细胞凋亡和抑制 EMT 相关因子表达。上述研究结果提示,西达本胺具有用于抗三阴性乳腺癌临床治疗的潜在应用前景。

[参 考 文 献]

[1] JOVANOVIC J, RONNEBERG JA, TOST J, *et al*. The epige-

netics of breast cancer[J]. *Mol Oncol*, 2010, 4(3): 242 – 254.
[2] GAO Y, ZHANG WZ, LIU CW, *et al*. MiR-200 affects tamoxifen resistance in breast cancer cells through regulation of MYB [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 18844.
[3] ZENG X, QU XJ, ZHAO CY, *et al*. FEN1 mediates miR-200a methylation and promotes breast cancer cell growth via MET and EGFR signaling[J]. *FASEB J*,2019,33(10):10717 – 10730.
[4] AMBROSIO S, SACCÀ CD, MAJELLO B. Epigenetic regulation of epithelial to mesenchymal transition by the Lysine-specific demethylase LSD1/KDM1A[J]. *Biochim Et Biophys Acta BBA-Gene Regul Mech*, 2017, 1860(9): 905 – 910.
[5] LUO HC, SHENOY AK, LI XH, *et al*. MOF acetylates the histone demethylase LSD1 to suppress epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Cell Rep*, 2016, 15(12): 2665 – 2678.
[6] CAO C, VASILATOS SN, BHARGAVA R, *et al*. Functional interaction of histone deacetylase 5 (HDAC5) and lysine-specific demethylase 1 (LSD1) promotes breast cancer progression[J]. *Oncogene*, 2017, 36(1): 133 – 145.
[7] SHI YK, JIA B, XU W, *et al*. Chidamide in relapsed or refractory peripheral T cell lymphoma: a multicenter real-world study in China[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 69.
[8] NING ZQ, LI ZB, NEWMAN MJ, *et al*. Chidamide (CS055/HBI-8000): a new histone deacetylase inhibitor of the benzamide class with antitumor activity and the ability to enhance immune cell-mediated tumor cell cytotoxicity[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(4): 901 – 909.
[9] XU L, FENG J, TANG HL, *et al*. Chidamide epigenetically represses autophagy and exerts cooperative antimyeloma activity with bortezomib[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 297.
[10] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A, *et al*. Cancer Statistics [J]. *CA Cancer J Clin*,2019,69(1):7 – 34.
[11] SINI V, CINIERI S, CONTE P, *et al*. Endocrine therapy in post-menopausal women with metastatic breast cancer: From literature and guidelines to clinical practice[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 100: 57 – 68.
[12] SUN Q, ZHANG W, WANG L, *et al*. Hypermethylated CD36 gene affected the progression of lung cancer[J]. *Gene*, 2018, 678: 395 – 406.
[13] 迟丽娜, 原悦, 周付科, 等. HDAC 抑制剂西达本胺的专利分析[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(1): 15 – 21.
[14] ZHAO SD, GUO J, ZHAO YS, *et al*. Chidamide, a novel histone deacetylase inhibitor, inhibits the viability of MDS and AML cells by suppressing JAK2/STAT3 signaling[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(7): 3169 – 3178.
[15] HUANG H, WENBING Y, DONG AS, *et al*. Chidamide enhances the cytotoxicity of cytarabine and sorafenib in acute myeloid leukemia cells by modulating H3K9me3 and autophagy levels [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1276.
[16] CAO CY, WU H, VASILATOS SN, *et al*. HDAC5-LSD1 Axis regulates antineoplastic effect of natural HDAC inhibitor sulforaphane in human breast cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(6): 1388 – 1401.
[17] LIU JW, FENG JX, LI LL, *et al*. Arginine methylation-dependent LSD1 stability promotes invasion and metastasis of breast cancer[J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(2): e48597.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 – 09 – 17