

本文引文格式:周莹,刘中,余定玥,等. HDAC抑制剂 SAHA 联合放疗抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞进展[J]. 右江民族医学院学报, 2025, 47(2): 237-241.

【论著与临床报道】

HDAC 抑制剂 SAHA 联合放疗抑制 雌激素受体阳性乳腺癌细胞进展

周莹, 刘中, 余定玥, 于佳琪, 张梓萌, 李多杰

(蚌埠医科大学第一附属医院肿瘤放疗科, 安徽 蚌埠 233000)

摘要:目的 探索组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂亚酰苯胺羟酸(SAHA)联合放疗抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞进展。方法 CCK-8 实验检测在雌激素受体阳性乳腺癌细胞(MCF-7)中 HDAC 抑制剂 SAHA 和最佳放疗剂量。随后细胞克隆实验检测各组的细胞活性情况。Western Blot 实验检测各组中蛋白 γ H2AX、Rad51 和 DNA-PK 的表达情况。彗星实验和 ER 标签检测各组是否发生 DNA 损伤修复。免疫荧光实验检测各组 γ H2AX 蛋白表达情况。结果 在加入不同剂量的 SAHA 后,其中 IC_{50} 为 $4.173 \mu\text{mol/mL}$,而最佳放疗剂量为 8 GY。CCK-8 和细胞克隆实验结果显示,相较于 NC 组,SAHA、IR 和 SAHA+IR 组中的细胞增殖率均下降($P < 0.05$);相较于 SAHA 和 IR 组,SAHA+IR 组中的细胞增殖率最低($P < 0.05$)。WB 结果提示,相较于 NC 组,SAHA 和 SAHA+IR 组中的 γ H2AX 表达上升,而 DNA-PK 和 Rad51 表达下降($P < 0.05$)。IR 组与 NC 组无差异($P > 0.05$)。随后彗星实验和 ER 标记实验显示,相较于 NC 组,SAHA、IR 和 SAHA+IR 组中的 DNA 损伤上升,而 SAHA+IR 组最明显($P < 0.05$)。免疫荧光实验进一步验证了 SAHA+IR 组中 γ H2AX 的表达最高($P < 0.05$)。结论 HDAC 抑制剂 SAHA 联合放疗加强了抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞恶性生物学进展。

关键词:亚酰苯胺羟酸;乳腺肿瘤;放疗;DNA 损伤修复

中图分类号:R737.9

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0237-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.007

HDAC inhibitor SAHA combined with radiotherapy inhibits the progression of estrogen receptor-positive breast cancer cells

ZHOU Ying, LIU Zhong, YU Dingyue, YU Jiaqi, ZHANG Zimeng, LI DuoJie

(Department of Radiation Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu
Medical University, Bengbu 233000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory effect of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) combined with radiotherapy on the progression of estrogen receptor-positive breast cancer cells. **Methods** The CCK-8 assay was used to detect the HDAC inhibitor SAHA and the optimal radiotherapy dose in estrogen receptor-positive breast cancer cells (MCF-7). Subsequently, a colony formation assay was performed to assess cell viability in each group. The Western Blot assay was used to detect the expression levels of proteins γ H2AX, Rad51, and DNA-PK in each group. The comet assay and ER labeling were used to detect whether DNA damage repair occurred in each group. The immunofluorescence assay was used to detect the expression of γ H2AX protein in each group. **Results** After the addition of different doses of SAHA, the IC_{50} was found to be $4.173 \mu\text{mol/mL}$, and the optimal radiotherapy dose was 8 GY. The results of the CCK-8 and cell cloning experiments indicated that, compared to the NC group, the cell proliferation

基金项目:蚌埠医学院科技项目自然科学类(2020byzd094)

第一作者:周莹,住院医师,研究方向:肿瘤放疗,E-mail:15395272182@163.com

通讯作者:李多杰,博士,主任医师,研究方向:颈部肿瘤、食管癌、肺癌、乳腺癌等疾病的治疗,E-mail:liduojie@163.com

tion rates in the SAHA, IR, and SAHA+IR groups decreased ($P < 0.05$); compared to the SAHA and IR groups, the cell proliferation rate in the SAHA+IR group was the lowest ($P < 0.05$). Western Blot results suggested that, compared to the NC group, the expression of γ H2AX increased in the SAHA and SAHA+IR groups, while the expression of DNA-PK and Rad51 decreased ($P < 0.05$). There was no difference between the IR group and the NC group ($P > 0.05$). Subsequently, the comet assay and ER labeling experiment showed that, compared to the NC group, DNA damage increased in the SAHA, IR, and SAHA+IR groups, with the most significant increase observed in the SAHA+IR group ($P < 0.05$). Immunofluorescence experiments further confirmed that the expression of γ H2AX was the highest in the SAHA+IR group ($P < 0.05$).

Conclusion The combination of the HDAC inhibitor SAHA with radiotherapy enhances the inhibition of malignant biological progression in estrogen receptor-positive breast cancer cells.

Key words: suberoylanilide hydroxamic acid; breast neoplasms; radiotherapy; DNA damage repair

乳腺癌是危害女性健康的杀手之一。有研究表明,乙酰化修饰参与乳腺癌进展^[1],而组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)在结肠癌、乳腺癌、前列腺癌等癌症中过度表达,使 HDAC 成为一个有吸引力的抗癌靶点^[2-4]。先前的研究已经证明 HDAC 抑制剂逆转异常表观遗传变化与各种癌症^[5],其中之一 HDAC 抑制剂亚酰苯胺羟肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid,SAHA)已被美国食品和药物管理局批准用于既往治疗失败的皮肤 T 细胞淋巴瘤患者^[6]。临床试验数据表明,SAHA 具有良好的耐受性和有限的毒性,停药后可迅速逆转药物导致的不良反应。SAHA 已被证明能抑制 HDAC 活性并增强多种细胞系的放射敏感性^[6]。最近,有报道称 SAHA 抑制三阴性乳腺模型的脑转移定植诱导 DNA 双链断裂(DS-Bs)^[7]。然而,SAHA 联合放疗对抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞进展的作用尚不明确,因此本研究拟探索 SAHA 通过抑制 DNA 损伤修复过程从而增强了雌激素受体阳性乳腺癌细胞对放疗敏感性,基于此,为乳腺癌治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 胎牛血清(货号:80230-6412,杭州四季青生物工程材料有限公司)、青一链霉素(货号:15140148,Gibco 公司,美国)、Cell Counting Kit-8(货号:C0038,上海碧云天生物技术股份有限公司)、RIPA 裂解缓冲液(货号:20-188,默克公司,德国)、BCA 蛋白检测试剂盒(货号:P0010,上海碧云天生物技术股份有限公司)、化学发光液 ECL 试剂(货号:SQ101,Epizyme 公司,美国)、 γ H2AX 一抗(货号:10856-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、Rad51 一抗(货号:14961-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、DNA-PK 一抗(货号:19983-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、GAPDH(货号:60004-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司,1:1000)、CometSlide™(货号:4250-004-03,Trevigen 公司,美

国)、低熔点琼脂糖 CometAssay® LMAgarose(货号:4250-050-02,Trevigen 公司,美国)、CometAssay® Electrophoresis System(货号:4250-050-ES,Trevigen 公司,美国)、彗星实验试剂盒(货号:4250-050-k,Trevigen 公司,美国)、ER Tracker Blue-White DPX(货号:40761ES50,上海翊圣生物科技有限公司)、免疫荧光染色试剂盒(货号:P0186,上海碧云天生物技术股份有限公司)。

1.2 实验分组及细胞培养 根据实验需要,分为 NC 组(无任何处理的 MCF7 细胞)、SAHA 组(加入 4.173 μ mol/mL 浓度的 SAHA)、IR 组(以放疗剂量 8 GY 辐照)和 SAHA+IR 组(加入 4.173 μ mol/mL 浓度的 SAHA+放疗剂量 8 GY 辐照)。细胞 MCF7 细胞购自上海中科院细胞所,利用 DMEM 培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素培养。辐照方式为待细胞培养至 70%~80%时,放入到 X 射线放射仪上,以不同剂量(2 GY、4 GY、6 GY、8 GY、10 GY)辐照细胞,所有细胞辐照后,继续培养 48 h 后进行细胞活性培养。同时,各组添加 0 μ mol/mL、1 μ mol/mL、3 μ mol/mL、5 μ mol/mL、7 μ mol/mL、9 μ mol/mL、11 μ mol/mL、13 μ mol/mL 的 SAHA,进行 IC₅₀ 验证。

1.3 CCK-8 实验及细胞克隆实验 将处理好的各组细胞接种于 96 孔板,细胞密度为 5 000 个细胞/孔,培养过夜。分别培养 24 h、48 h 和 72 h 后,取出后避光每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,放入 37.5 $^{\circ}$ C 的培养箱中培养 2 h 后,在吸光度值 OD450 波段的酶标仪检测 OD 值。细胞存活率计算:存活率(%)=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) \times 100%。取各组细胞离心后,以 1 000 个/孔的密度种植于 6 孔板中,加入含 10%的培养基,随后培养 14 d。去上清后,加入 4%的多聚甲醛固定 30 min 后,加入 1:8 稀释后的结晶紫染液,染色 30 min 后 PBS 冲洗 3~4 遍,拍照计数。

1.4 彗星实验 细胞处理后收集用 0.2 mL 含 0.5%

低熔点 PBS 重悬琼脂糖。随后将混合物加入冷裂解液,按彗星实验试剂盒说明书操作,随后在电泳条件 300 mA, 25 V 下电泳 20 min。随后用 Tris-HCl 缓冲液清洗 2 遍,然后用溴化乙啶染色。用荧光显微镜观察。在 100 个细胞中评估了 DNA 损伤尾力矩(尾长乘以 DNA 的比例),使用 Image-Pro Plus 进行量化。

1.5 ER Tracker Blue-White DPX 染色 细胞用不同的处理方法处理 24 h。ERTracker Blue-White DPX (Molecular Probes, Eugene, OR) 探针加入细胞中,在相同的生长条件下孵育 30 min。除去上样液,用 PBS 洗涤细胞。采用荧光显微镜采集显微图像。

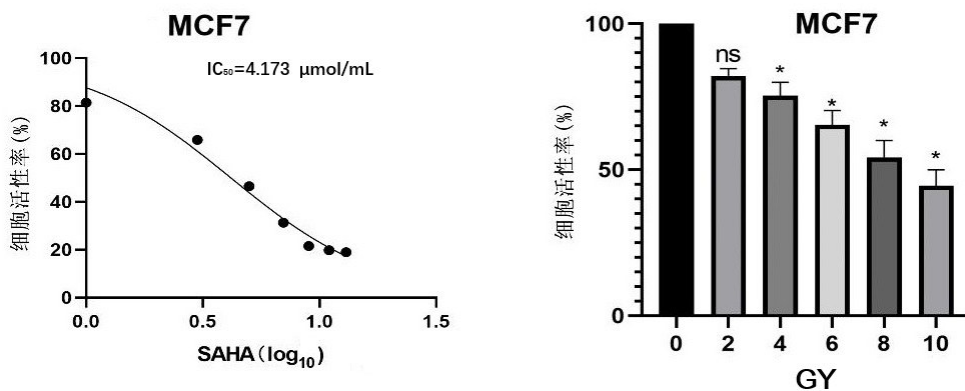
1.6 Western Blot 实验 用含 EDTA 的 RIPA 裂解液裂解细胞,随后于 4 °C 低温离心机,以 12 000 r/min 转速离心 30 min 上清部分。BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。待定量后,高温煮沸 5 min,并在 -20 °C 冰箱里冰冻 30 min。制作分离胶和浓缩胶,随后每个样品以 30 μ g 的浓度加入到浓缩胶泳道内,以电压 200 V 电泳 30 min 左右,然后取出分离胶,并以“三明治”结构将分离胶和聚偏二氯乙烯膜(PDVF)膜夹入到转膜槽中。以 400 mA 电流强度转膜 1 h,然后用 5% 脱脂牛奶包常温孵育 1 h, PVDF 膜与一抗 4 °C 孵育过夜。然后与二抗在室温下孵育 1 h,然后用增强型化学发光试剂进行检测。

1.7 免疫荧光 在细胞培养板中加入圆形载玻片,随后将细胞种植于细胞培养板中,用 4% 多聚甲醛固定,随后用 0.5% TritonX-100 通透 20 min,随后 PBS 冲洗 3 遍,用吸水纸吸干 PBS 后,在载玻片上滴上 5% 的牛血清白蛋白(BSA),室温封闭 30 min。然后进行一抗孵育在 4 °C 冰箱过夜。PBST 洗涤 3 次后,应用荧光二抗孵育 2 h 后,荧光显微镜下拍照。

1.8 统计学方法 实验数据使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析。计量资料符合正态分布的,采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异用独立 t 检验进行分析。多组间比较采用单因素方差分析,组间比较利用 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 验证 SAHA 的最适效率和最佳放疗剂量 为选择最佳的药物浓度,本研究通过 CCK-8 实验寻找 SAHA 的最适 IC_{50} ,以不同剂量(2 GY, 4 GY, 6 GY, 8 GY, 10 GY)辐照细胞,结果显示,最佳辐照剂量为 8 GY,见图 1。同时,各组添加 0 μ mol/mL、1 μ mol/mL、3 μ mol/mL、5 μ mol/mL、7 μ mol/mL、9 μ mol/mL、11 μ mol/mL、13 μ mol/mL 的 SAHA,进行 IC_{50} 验证,实验结果显示,SAHA 的最适 IC_{50} 为 4.173 μ mol/mL,见图 1。



注: ns: $P > 0.05$; 与 0 GY 比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 SAHA 的最适 IC_{50} 和 GY 的最适疗程

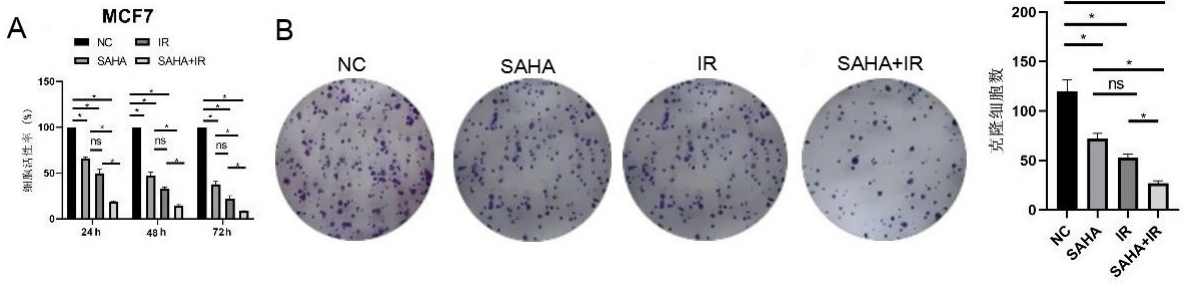
2.2 SAHA 可以增加放疗(IR)对于 MCF7 细胞增殖抑制效率 CCK-8 实验显示,相较于 NC 组,SAHA 组、IR 组和 SAHA+IR 组中 24 h、48 h 和 72 h 的增殖效率均下降 ($P < 0.05$),见图 2A。且相较于 SAHA 组和 IR 组,SAHA+IR 组中 24 h、48 h 和 72 h 的增殖效率下降较明显 ($P < 0.05$),见图 2A,而 SAHA 组和 IR 组无统计学差异 ($P > 0.05$)。通过细胞克隆实验检测发现,相较于 NC 组,SAHA 组、IR 组和 SAHA+IR 组中的细胞克隆数目均下降 ($P < 0.05$),见图 2B。且相较于 SAHA 组和 IR 组,SAHA+IR 组中细胞克

隆数目下降 ($P < 0.05$),见图 2B,而 SAHA 组和 IR 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 SAHA 和 IR 联合可以促进乳腺癌细胞中 DNA 损伤 结果显示,相较于 NC 组,SAHA 组和 SAHA+IR 组中 DNA 损伤标志物 γ H2AX 表达升高,而 DNA 修复标志物 Rad51 和 DNA-PK 的表达降低 ($P < 0.05$),见图 3A。彗星实验结果表明,与 NC 组相比,SAHA 组、IR 组和 SAHA+IR 组的拖尾长度均增加 ($P < 0.05$),而相较于 SAHA 和 IR 组,SAHA+IR 组的拖尾长度增加最明显 ($P < 0.05$),见图 3B。最后

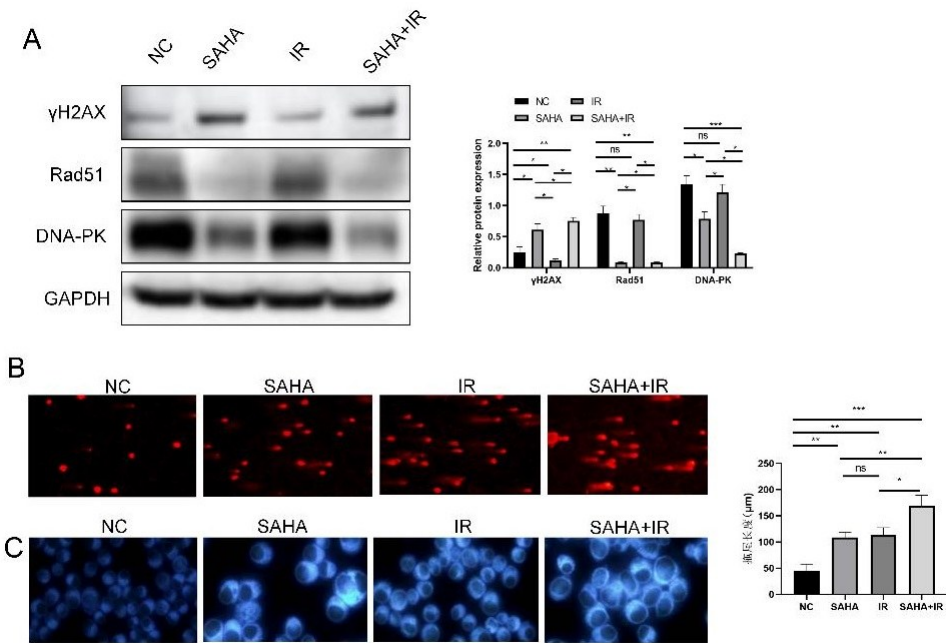
通过免疫荧光检测 ER 标签对应的免疫荧光强度,与 NC 组相比,SAHA 组的免疫荧光强度较高,DNA 损

伤程度较高。与 IR 组相比,SAHA+IR 组的免疫荧光强度较高,DNA 损伤程度较高,见图 3C。



注:A为CCK-8实验计算各组的细胞增殖率;B为细胞克隆实验验证各组的克隆细胞数。ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$ 。

图2 SAHA可以增加IR对于MCF7细胞增殖抑制效率

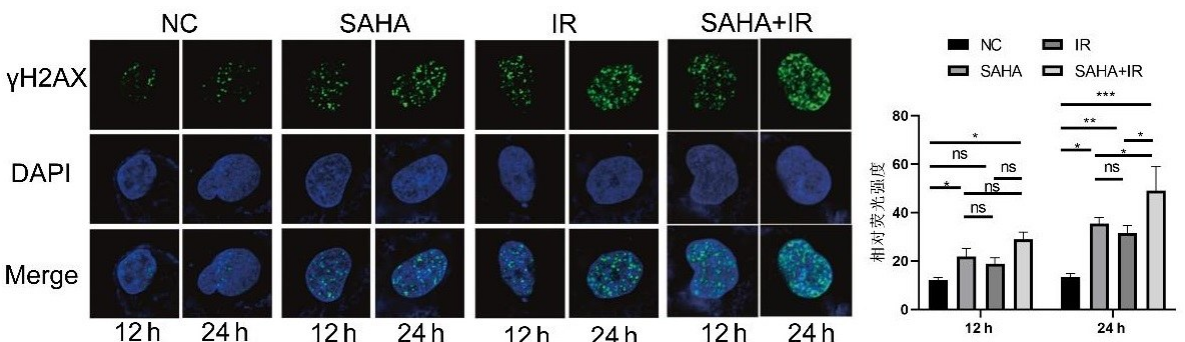


注:A为WB检测各组中DNA损伤相关蛋白表达;B为彗星实验验证各组中拖尾现象;C为ER标签显示各组中的内质网标记情况。ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图3 SAHA和IR联合可以促进DNA损伤过程

2.4 SAHA和IR联合可以促进γH2AX的表达 结果显示,相较于NC组,SAHA组、IR组和SAHA+IR

组中γH2AX表达均上升,而SAHA+IR组上升最明显($P < 0.05$),见图4。



注: ns: $P > 0.05$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图4 免疫荧光检测各组中γH2AX的表达

3 讨论

组蛋白乙酰化作为一种常见的组蛋白翻译后修饰,通过调节染色质构象来刺激基因转录,与癌症的发生和发展密切相关^[8]。研究表明,HDAC 抑制剂能够显著地抑制 TNBC 细胞株的增殖并促进细胞凋亡^[9]。HDAC 抑制剂在 TNBC 中的抗肿瘤作用机制包括:诱导细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、调节免疫反应、抑制肿瘤细胞侵袭和转移以及诱导 DNA 损伤^[10-11]。本研究通过 HDAC 抑制剂 SAHA 可以阻断 DNA 双链断裂修复,去提升雌激素受体阳性乳腺癌的放疗敏感性,进而抑制肿瘤的增殖。

本研究通过寻找 SAHA 药物的最佳实验浓度和最佳放疗剂量,为后续的细胞实验奠定了实验基础。放疗是乳腺癌综合治疗方案中不可或缺的一部分,它在术前和术后都发挥着重要作用^[12]。因此,如何提高放疗的治疗效果和预防肿瘤复发都是重中之重。HDAC 抑制剂可以通过增加组蛋白乙酰化水平,影响染色质结构,从而调节 DNA 损伤,增加放疗的敏感性^[13]。在本研究中,SAHA 可以抑制乳腺癌细胞的增殖效率,同时,在放疗中,加入 SAHA 后,放疗抑制乳腺癌细胞的增殖效率明显升高,说明 SAHA 可以增加乳腺癌细胞对放疗的敏感性。为进一步证明 SAHA 增加乳腺癌细胞对放疗的敏感性的分子机制,WB 实验证明,加入 SAHA 后,修复相关的蛋白 γ H2AX、Rad51 和 DNA-PK,与 NC 组相比具有差异性表达,且 DNA 双链损伤标志 γ H2AX 的表达量增加,与修复相关蛋白 Rad51 和 DNA-PK 的表达降低。同时检测在放疗情况下,加入 SAHA 后,DNA 双链损伤标志 γ H2AX 的表达量增加,与修复相关蛋白 Rad51 和 DNA-PK 的表达降低。因此,本研究推测 SAHA 可以诱导乳腺癌细胞 DNA 损伤,并增加乳腺癌细胞对放疗的敏感性。此外,本研究还通过彗星实验和免疫荧光实验对上述结果进行验证,实验结果与上述结果一致,更加证明了本研究的推测 HDAC 抑制剂 SAHA 通过阻断 DNA 双链断裂修复提升雌激素受体阳性乳腺癌的放疗敏感性。

本研究通过体外细胞实验证明,HDAC 抑制剂 SAHA 可以抑制雌激素受体阳性乳腺癌细胞的增殖,同时证明了 SAHA 可以诱导 DNA 的损伤,阻断 DNA 双链断裂修复提升雌激素受体阳性乳腺癌细胞的放疗敏感性。为临床上增加放射治疗三阴性乳腺癌敏感性的药物治疗,提供了理论基础。

参考文献:

[1] CHENG B B, PAN W, XIAO Y, et al. HDAC-targeting epigenetic modulators for cancer immunotherapy[J]. Eur

J Med Chem, 2024, 265: 116129.

- [2] KARATI D, MUKHERJEE S, ROY S. Emerging therapeutic strategies in cancer therapy by HDAC inhibition as the chemotherapeutic potent and epigenetic regulator[J]. Med Oncol, 2024, 41(4): 84.
- [3] GUADAGNI A, BARONE S, ALFANO A I, et al. Tackling triple negative breast cancer with HDAC inhibitors: 6 is the isoform! [J]. Eur J Med Chem, 2024, 279: 116884.
- [4] TANG C, DU Y, LIANG Q, et al. Development of a novel histone deacetylase-targeted near-infrared probe for hepatocellular carcinoma imaging and fluorescence image-guided surgery[J]. Mol Imaging Biol, 2020, 22(3): 476-485.
- [5] PANG Y H, SHI R Z, CHAN L J, et al. The combination of the HDAC1 inhibitor SAHA and doxorubicin has synergic efficacy in triple negative breast cancer in vivo[J]. Pharmacol Res, 2023, 196: 106926.
- [6] MANN B S, JOHNSON J R, HE K, et al. Vorinostat for treatment of cutaneous manifestations of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(8): 2318-2322.
- [7] ZHU Z H, WU M R, SUN J, et al. Redox-sensitive iodinated polymersomes carrying histone deacetylase inhibitor as a dual-functional nano-radiosensitizer for enhanced radiotherapy of breast cancer[J]. Drug Deliv, 2021, 28(1): 2301-2309.
- [8] XIAO Y F, HALE S, AWASTHEE N, et al. HDAC3 and HDAC8 PROTAC dual degrader reveals roles of histone acetylation in gene regulation[J]. Cell Chem Biol, 2023, 30(11): 1421-1435. e12.
- [9] ZHAO C, ZHANG Y, ZHANG J, et al. Discovery of novel fedratinib-based HDAC/JAK/BRD4 triple inhibitors with remarkable antitumor activity against triple negative breast cancer[J]. J Med Chem, 2023, 66(20): 14150-14174.
- [10] LU D H, QU L L, WANG C, et al. Harmine-based dual inhibitors targeting histone deacetylase (HDAC) and DNA as a promising strategy for cancer therapy[J]. Bioorg Chem, 2022, 120: 105604.
- [11] DENG Y, CHENG Q, HE J. HDAC inhibitors: Promising agents for leukemia treatment[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 680: 61-72.
- [12] ZHANG Z, LU M L, CHEN C L, et al. Holo-lactoferrin: the link between ferroptosis and radiotherapy in triple-negative breast cancer[J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3167-3182.
- [13] CARLSSON M J, FAHRER J. Analyzing the effects of HDAC inhibitors on DNA damage and associated cytotoxicity in primary hepatocytes[J]. Methods Mol Biol, 2023, 2589: 241-252.

收稿日期: 2024-12-02; 修回日期: 2025-02-03

(本文编辑 覃洪含)