

• 论 著 •

REV-ERBs 对头颈鳞状细胞癌的肿瘤调节作用

胡仿玲¹, 桂誉淋^{2△}

(1. 临沂市妇幼保健院耳鼻咽喉头颈外科, 山东 临沂 276000; 2. 九江市第一人民医院耳鼻咽喉头颈外科, 江西 九江 332000)

[摘 要] **目的** 探讨昼夜节律性核受体——REV-ERBs 对头颈鳞状细胞癌(HNSCC)的肿瘤调节作用。**方法** 2020 年 5 月采用 CCK-8 检测法、克隆形成实验、Transwell 检测法、细胞划痕实验等检测 REV-ERBs 特异性受体激动剂——SR9009 对 HNSCC 的细胞增殖、迁移和侵袭作用,通过体外药物敏感性检测 SR9009 对 HNSCC 的肿瘤抑制作用。**结果** SR9009 能明显抑制 HNSCC 的细胞增殖、迁移和侵袭,对 HNSCC 具有肿瘤抑制作用。**结论** REV-ERBs 的特异性受体激动剂——SR9009 对 HNSCC 具有肿瘤抑制作用,通过对 REV-ERBs 的调节可达到抑制 HNSCC 的作用。

[关键词] 头颈鳞状细胞癌; REV-ERBs; SR9009; 肿瘤抑制
DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2025.03.004 **中图法分类号:**R739.91
文章编号:1009-5519(2025)03-0594-05 **文献标识码:**A

Tumor regulatory effect of REV-ERBs on head and neck squamous cell carcinoma

HU Fangling¹, GUI Yulin^{2△}

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Women&Children's Health Care Hospital of Linyi, Linyi, Shandong 276000, China; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Jiujiang NO. 1 People's Hospital, Jiujiang, Jiangxi 332000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the tumor regulatory effect of circadian nuclear receptors, REV-ERBs, on head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Methods** In May 2020, CCK-8 assay, clone formation assay, Transwell assay and cell scratch assay were used to detect the effects of REV-ERBs specific receptor agonist-SR9009 on cell proliferation, migration and invasion of HNSCC. The inhibitory effect of SR9009 on HNSCC was detected by in vitro drug sensitivity. **Results** SR9009 can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of HNSCC cells, and had a tumor suppressive effect on HNSCC. **Conclusion** SR9009, a specific receptor agonist of REV-ERBs, has a tumor suppressive effect on HNSCC, which can be achieved through the regulation of REV-ERBs.

[Key words] Head and neck squamous cell carcinoma; REV-ERBs; SR9009; Tumor suppression

头颈鳞状细胞癌(HNSCC)是指发生于口咽部、喉部、食管上段的鳞状上皮恶性肿瘤,是全球第六大常见的癌症^[1]。HNSCC 恶性程度相对较高,且早期症状不明显,60%以上的 HNSCC 患者就诊时便为Ⅲ期或Ⅳ期,局部复发和远处转移率为 15%~40%,5 年生存率小于 50%^[2]。HNSCC 的病因主要包括吸烟、饮酒,以及人乳头瘤病毒感染^[3-4]。HNSCC 早期治疗以单纯手术治疗或单纯放化疗为主,中晚期则通常以手术与放化疗结合治疗为主,而这些治疗方式往往不能取得令人满意的疗效。目前,针对 HNSCC 的靶向药物匮乏、免疫治疗尚未成熟,患者生存率仍无明显改善^[3,5]。因此,如何提高治疗 HNSCC 的疗效、

预防局部复发和远处转移进而提高患者生存率仍是临床医生亟待解决的关键问题。

在肿瘤的发生、发展过程中肿瘤微环境扮演着至关重要的角色。肿瘤微环境的特点是在肿瘤细胞周围存在不均匀的缺氧和营养缺乏区域。肿瘤微环境的这一特点会引发分子变化,从而导致肿瘤细胞的代谢重塑,其对肿瘤细胞的生存至关重要^[6-7]。昼夜节律性核受体——REV-ERBs 是血红素结合生物钟的部分,参与了生物体的代谢、细胞增殖、炎症反应和肿瘤进展^[8-11]。有研究发现,吡咯衍生物——SR9009 是 REV-ERBs 的特异性受体激动剂,对多种肿瘤均具有抑制作用^[12]。因此,是否可以通过调节 REV-ERBs

作者简介:胡仿玲(1990—),硕士研究生,主治医师,主要从事临床耳鼻咽喉头颈外科专业的研究。 △ 通信作者, E-mail:541633467@qq. com。
网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250225.1128.022\(2025-02-25\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250225.1128.022(2025-02-25))

抑制 HNSCC 的肿瘤进展,目前仍是一个亟待进一步研究的治疗方式。本研究探索了 REV-ERBs 对 HNSCC 的肿瘤发展进程的调控作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 肿瘤样本均为 HNSCC 患者来源的肿瘤异种移植(PDX)模型。PDX 模型肿瘤体积达到 $1\,000\text{ mm}^3$ 时取出,于 50 mL 组织培养液内。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM)均购自 Gibco 公司,CCK-8 试剂盒、二甲亚砜、四甲基偶氮唑盐(MTT)均购自 Sigma 公司,SR9009 购自 MCE 公司,紫杉醇购自北京双鹭药业股份有限公司,顺铂购自齐鲁制药有限公司,2 株 HNSCC 细胞(CAL27、SCC9 细胞)购自 ATCC 公司。

1.2 方法

1.2.1 样本处理 PDX 模型构建及观测方法参照文献[13]。

1.2.2 细胞培养 2020 年 5 月将 SCC9、CAL27 细胞置于 DMEM(含 10% 胎牛血清,1% 青霉素、链霉素)完全培养基,并放于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳(CO_2)的细胞培养箱中培养。

1.2.3 CCK-8 检测法 将 SCC9、CAL27 细胞以 1×10^4 密度接种于 96 孔细胞培养板中,并放于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养过夜。次日分别设置 SR9009 不同剂量组(10、20、30 μm)。将不同剂量组 SR9009 加入 DMEM 完全培养基中,同时设置 DMEM 完全培养基为对照组。不同组别培养基与细胞共同孵育,孵育时间为 24、48、72 h。依据培养时间分别在每个孔中加入 10 μL CCK-8 试剂,继续孵育 2 h。采用酶标仪进行检测分析,在 450 nm 波长下测定细胞活力,将培养对照组的细胞活力设定为 100%。

1.2.4 克隆形成实验 在 4 孔板内每孔加入 500 个 CAL27 细胞,分别加入含 DMEM 完全培养基的对照组和含 20 μm SR9009 的 DMEM 完全培养基的实验组,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养 2 周,每 3 天换培养液 1 次。2 周后去除培养基,用甲醇固定 10 min,在室温下用 0.1% 结晶紫染色 10 min,并记录各组 CAL27 细胞集落数。

1.2.5 细胞划痕实验 将 4×10^6 密度的 CAL27 细胞悬浮液接种至 35 mm 的培养皿中,并在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。待培养皿中细胞密度达 85%~90% 时,用无菌移液器枪头在贴壁的 CAL27 细胞表面上划出 1.5~2.0 mm 的划痕。采用 1×磷酸盐缓冲溶液洗涤细胞 3 次,在细胞培养皿中分别加入 2 mL 含 20 μm SR9009 的无血清 DMEM 培养基和无血清 DMEM 培养基继续培养,0、12、24 h 后于显

微镜下观察细胞迁移情况。在显微镜下 100 倍彩图中应用 ImageJ 软件计算细胞迁移率。

1.2.6 Transwell 检测法 用 Matrigel 包被 Transwell 小室(8 μm 孔径)后置于培养箱内孵育 4 h 使 Matrigel 基底膜形成凝胶。将密度为 5×10^4 的 CAL27 细胞悬浮在 250 μL 无血清 DMEM 培养基中,分别置于包被基质胶及不包被基质胶的 Transwell 小室上室中。下室分别加入 750 μL DMEM 完全培养基和 20 μm SR9009 的 DMEM 完全培养基,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h。取出 Transwell 小室用甲醇固定,0.1% 结晶紫染色,在显微镜下观察。在显微镜下 200 倍任意选取 4 个视野细胞计数并进行数据分析。

1.2.7 体外药物敏感性检测 选取 4 例 HNSCC PDX 模型,取小鼠荷瘤组织分为 $2\text{ mm}\times 2\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ 的小块,置于 96 孔板中(1 块/孔)。水凝胶覆盖组织块,分别加入含 10、20、30 μm SR9009 的完全培养基(10、20、30 μm 组)和完全培养基的对照组共同培养,1~2 d 更换培养基 1 次。第 8 天取出培养基,用磷酸盐缓冲溶液冲洗组织 3 次,加入 MTT 溶液孵育 16 h 后将组织块置于新的 96 孔板中,每个组织块与 200 μL 二甲亚砜孵育共同培养 6 h。使用酶标仪检测 490 nm 波长的吸光度(OD)。药物抑制率(%)=(1-药物组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。依据 MTT 比色法检测药物敏感性,判断标准为药物抑制率的临界值为 30%, $<30\%$ 为药物无效。实验重复 3 次取平均值,具体操作参照文献[14]的方法。

1.3 统计学处理 应用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,应用 Graph Pad Prism7.0 软件绘制图形。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验、单因素方差分析等。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SR9009 抑制 HNSCC 的细胞增殖 SR9009 抑制 CAL27、SCC9 细胞的增殖,并且细胞增殖率随药物浓度的提高及培养时间的延长而下降。见图 1。实验组(20 μm SR9009 组)CAL27、SCC9 细胞形成细胞团的数量较对照组明显减少,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

2.2 SR9009 抑制 HNSCC 的迁移和侵袭 细胞在 20 μm SR9009 组培养液中培养 24 h 后出现迁移抑制,并损伤了其修复能力。20 μm SR9009 组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。SR9009 明显抑制了 CAL27、SCC9 细胞的迁移及侵袭。见图 4。

2.3 SR9009 对 HNSCC 具有肿瘤抑制作用 10、20、30 μm SR9009 组 HNSCC PDX 模型药物抑制率分别为(43.07 $\pm$ 15.69)、(49.46 $\pm$ 11.97)、(46.48 $\pm$ 14.02)%。SR9009 10、20、30 μm 组 HNSCC PDX 模型的肿瘤细

胞活力,见表 1。

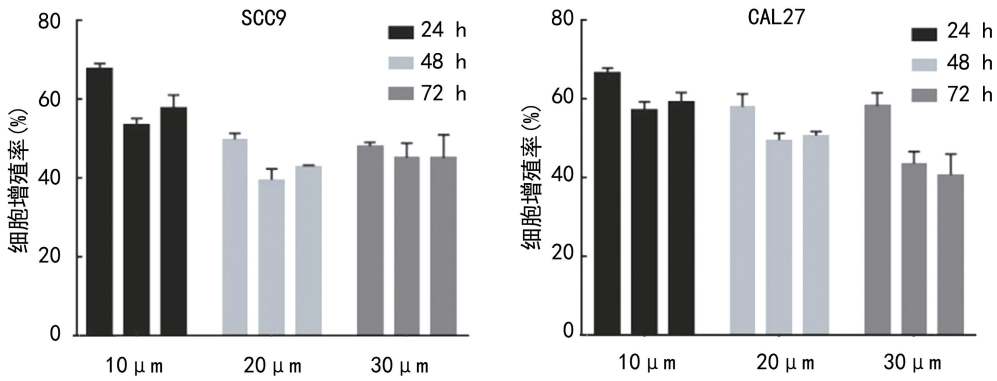
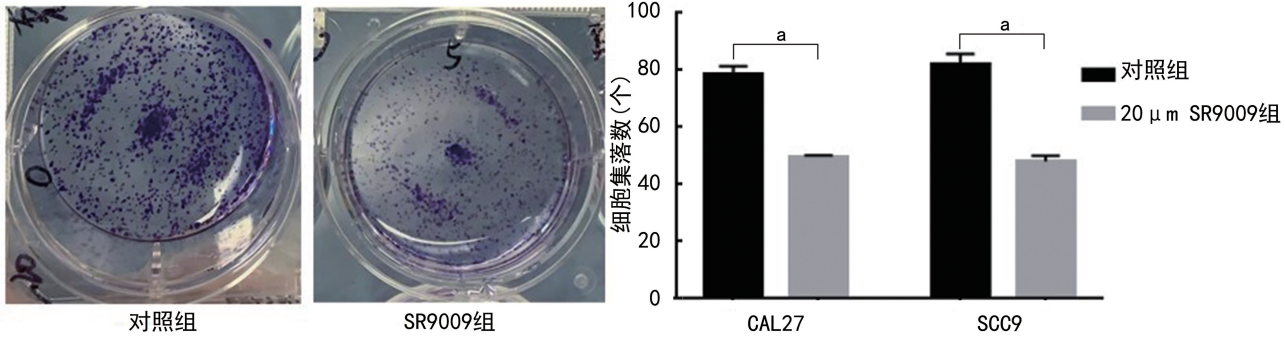
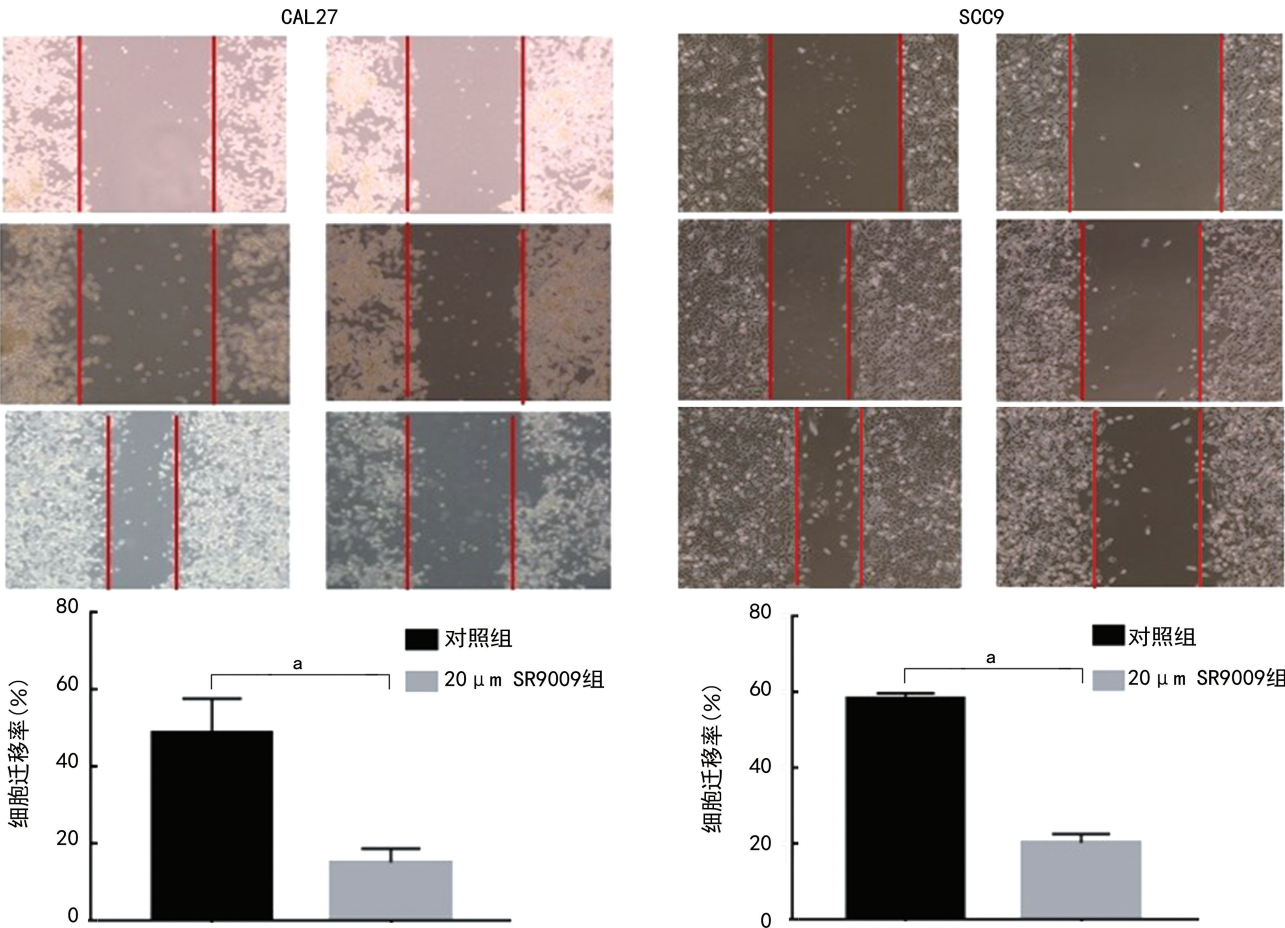


图 1 SR9009 抑制 SCC9、CAL27 细胞的增殖



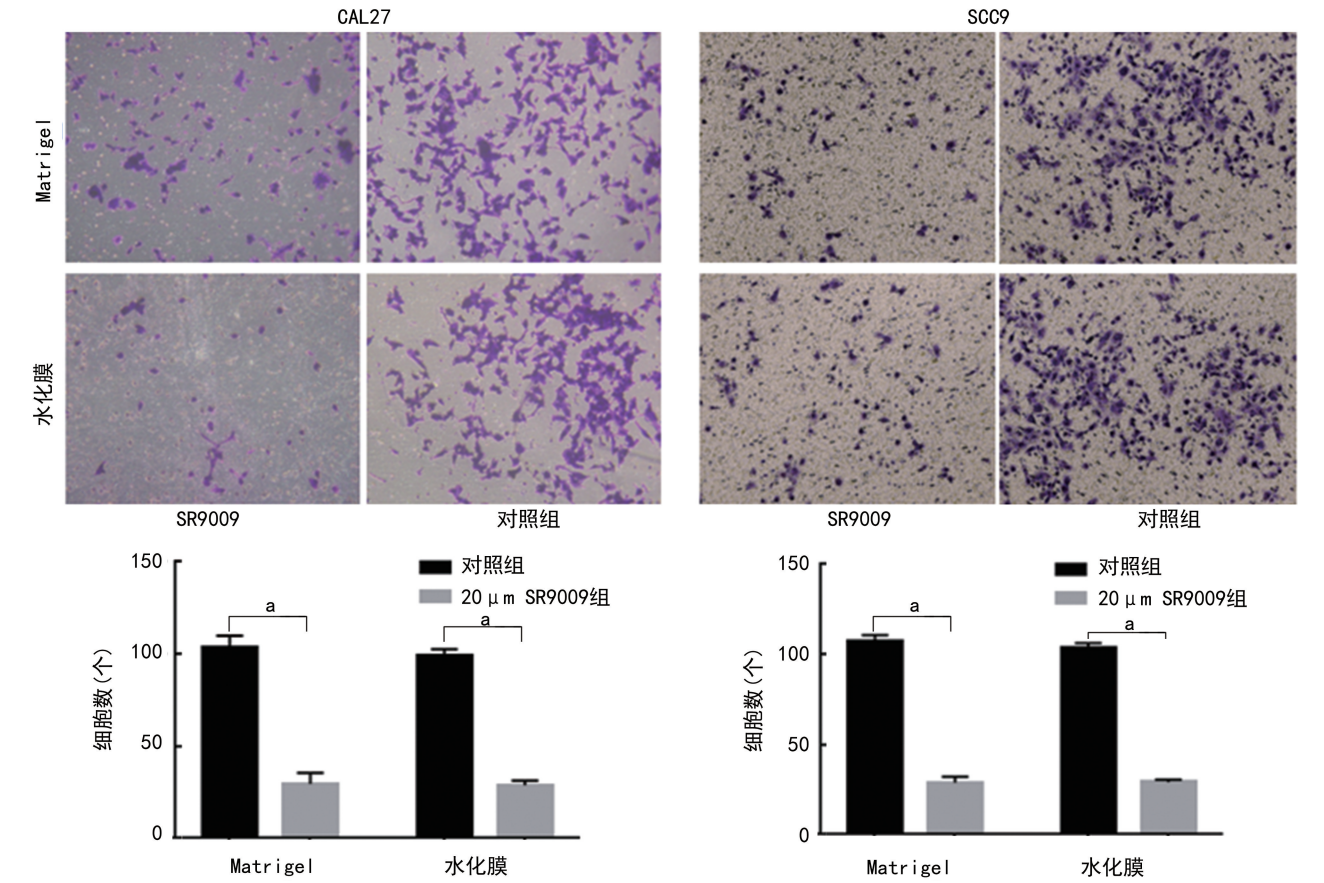
注:与对照组比较,^a $P<0.05$ 。

图 2 SR9009 抑制 CAL27、SCC9 细胞的克隆



注:与对照组比较,^a $P<0.05$ 。

图 3 SR9009 抑制 CAL27、SCC9 细胞的迁移



注:与对照组比较,**P*<0.05。

图 4 SR9009 抑制 CAL27、SCC9 细胞的迁移和侵袭

表 1 肿瘤细胞活力 (%)				
编号	肿瘤部位	10 μm	20 μm	30 μm
		SR9009 组	SR9009 组	SR9009 组
8	喉	56.71	75.16	56.50
10	下咽	28.85	39.25	33.26
17	喉	30.14	39.23	35.63
29	舌	56.60	62.19	60.50

3 讨 论

HNSCC 的发病部位特殊,除危及患者生命安全外,还与患者生活质量、外貌、社交能力密切相关。因此,HNSCC 在威胁患者生命安全的同时也严重影响患者生活的方方面面,导致患者生活质量下降,使患者及家属身心俱疲^[15-16]。细胞生物钟调节复杂的生理及病理过程,昼夜节律的紊乱与多种疾病的发生、发展相关,尤其是肿瘤的发生^[17]。因此,调节生物钟可有效调节肿瘤的发生、发展,通过其药理学作用的调节可能提供有效的抗肿瘤方法。

REV-ERBs 是生物钟的关键成分,作为转录抑制因子参与了肿瘤发生的多个方面,包括代谢和增殖^[18-20]。SR9009 是 REV-ERBs 的激动剂,有研究表明,其在多种疾病的治疗中均具有明显疗效^[21]。同时,也有研究表明,SR9009 在体内外对癌细胞均具有抑制作用^[17,22-23]。本研究结果也显示,SR9009 对 HNSCC 细胞具有肿瘤抑制作用。

SHEN 等^[21]研究表明,REV-ERBs 激动剂——

SR9009 通过调节肿瘤细胞的自噬能抑制 SCLC 细胞的增殖,同时,抑制 SCLC 细胞的迁移和侵袭。本研究结果显示,REV-ERBs 激动剂——SR9009 同样抑制了 CAL27、SCC9 细胞的增殖,与对照组比较,明显抑制了 CAL27 细胞的迁移和侵袭,SR9009 对 HNSCC 肿瘤组织也具有抑制作用。SULLI 等^[17]研究表明,REV-ERBs 的 2 种激动剂——SR9009 和 SR9011 均可通过调节自噬和脂肪合成通路诱发肿瘤细胞凋亡,从而可避开正常组织和细胞只针对肿瘤细胞,具有特异性致死作用。研究结果进一步表明,REV-ERBs 的药理学调节是一种有效的新型抗肿瘤策略。

放疗抵抗和化疗药物耐药的发生是导致 HNSCC 复发和转移的主要因素,也是影响 HNSCC 患者生存率的关键。核苷酸切除修复(NER)和细胞周期进程会影响抗癌药物铂类抑制细胞增殖和诱导细胞死亡的能力。遗传学研究表明,NER 和细胞周期进程均受生物钟的影响。ANABTAWI 等^[24]研究表明,在用顺铂和生物钟调节化合物——KS15 和 SR8278 的联合处理人细胞系中 KS15 和 SR8278 均可保护细胞免受顺铂的抗增殖作用,在 mRNA 和蛋白质水平增加 NER 因子——XPA 和细胞周期调节因子 Wee1、p21 的表达,与这些分子变化相关,KS15 和 SR8278 治疗导致基因组 DNA 中未修复的顺铂 DNA 加合物减少,细胞周期的 G1 期细胞比例增加。因此,使用靶向

生物钟药物可能是一种调节化疗药物耐药,以及正常细胞和癌细胞对顺铂化疗方案反应的新方法。

XU 等^[25]建立 22RV1 PDX 模型评估了 SR9009 对前列腺癌进展的影响,结果显示,荷瘤小鼠经 SR9009 治疗后明显减缓了其肿瘤生长。SULLI 等^[17]建立了患者来源的胶质母细胞瘤的 PDX 模型对荷瘤小鼠进行 SR9009 的药物敏感性试验表明,SR9009 明显减缓了荷瘤小鼠的肿瘤生长,与胶质母细胞瘤的标准药物替莫唑胺组比较,SR9009 明显提高了荷瘤小鼠存活率。结果表明 SR9009 不仅在体外对多种肿瘤细胞具有抑制作用,在体内也同样具有抗肿瘤作用。SR9009 除对多种细胞系具有抗肿瘤作用外,对 PDX 模型也具有肿瘤抑制作用。本研究同样也证实了 SR9009 对 HNSCC PDX 模型具有抗肿瘤作用。总之,吡咯衍生物——SR9009 作为 REV-ERBs 的特异性激动剂,在多种肿瘤中均被证实具有抗肿瘤作用。REV-ERBs 的调节作用有望提高治疗肿瘤的疗效,昼夜节律机制的药理学调节有望成为肿瘤治疗的新策略。

综上所述,REV-ERBs 的特异性激动剂——SR9009 对 HNSCC 具有肿瘤抑制作用。通过对昼夜节律性核受体——REV-ERBs 的调节有望成为治疗 HNSCC 的新策略。

参考文献

[1] CHOW L Q M. Head and neck cancer[J]. N Engl J Med, 2020,382(1):60-72.

[2] HADDAD R I, POSNER M, HITT R, et al. Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: role, controversy, and future directions[J]. Ann Oncol, 2018,29(5):1130-1140.

[3] MODY M D, ROCCO J W, YOM S S, et al. Head and neck cancer[J]. Lancet, 2021,398(10318):2289-2299.

[4] NOGUES J C, FASSAS S, MULCAHY C, et al. Human papillomavirus-associated head and neck cancer[J]. J Am Board Fam Med, 2021,34(4):832-837.

[5] BHATIA A, BURTNES B. Treating head and neck cancer in the age of immunotherapy: a 2023 update[J]. Drugs, 2023,83(3):217-248.

[6] WANG R, LI B, LAM S M, et al. Integration of lipidomics and metabolomics for in-depth understanding of cellular mechanism and disease progression[J]. J Genet Genomics, 2020,47(2):69-83.

[7] FINLEY L W S. What is cancer metabolism? [J]. Cell, 2023,186(8):1670-1688.

[8] ADLANMERINI M, LAZAR M A. The REV-ERB nuclear receptors: timekeepers for the core clock period and metabolism[J]. Endocrinology, 2023,164(6): bqad069.

[9] IKEDA R, TSUCHIYA Y, KOIKE N, et al. REV-ERB α and REV-ERB β function as key factors regulating Mammalian Circadian Output[J]. Sci Rep, 2019,9(1):10171.

[10] SCHEIERMANN C, KUNISAKI Y, FRENETTE P S. Circadian control of the immune system[J]. Nat Rev Im-

munol, 2013,13(3):190-198.

[11] WANG S, LI F, LIN Y, et al. Targeting REV-ERB α for therapeutic purposes: promises and challenges[J]. Theranostics, 2020,10(9):4168-4182.

[12] GHOSHAL S, STEVENS J R, BILLON C, et al. Adropin: an endocrine link between the biological clock and cholesterol homeostasis[J]. Mol Metab, 2018,8:51-64.

[13] HU F, GUO L, YU J, et al. Using patient-derived xenografts to explore the efficacy of treating head-and-neck squamous cell carcinoma with anlotinib[J]. Pathol Oncol Res, 2021,27:1610008.

[14] 胡玲玲, 何远桥, 曹佳星, 等. “果冻”药敏检测法在咽喉肿瘤个性化治疗方案选择中的应用[J]. 中华医学杂志, 2019,99(26):2073-2075.

[15] DE OLIVEIRA FARIA S, SIMOES LIMA G A, LOPES CARVALHO A, et al. Clinically significant changes in health-related quality of life in head and neck cancer patients following intensive nutritional care during radiotherapy[J]. Eur J Oncol Nurs, 2022,56:102065.

[16] MURPHY B A, WULFF-BURCHFIELD E, GHAM M, et al. Chronic systemic symptoms in head and neck cancer patients [J]. J Natl Cancer Inst Monogr, 2019,2019(53):lgz004.

[17] SULLI G, ROMMEL A, WANG X, et al. Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence[J]. Nature, 2018,553(7688):351-355.

[18] ZALBA S, TEN HAGEN T L. Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy[J]. Cancer Treat Rev, 2017,52:48-57.

[19] JEON S M, CHANDEL N S, HAY N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress[J]. Nature, 2012,485(7400):661-665.

[20] RYSMAN E, BRUSSELMANS K, SCHEYS K, et al. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation[J]. Cancer Res, 2010,70(20):8117-8126.

[21] SHEN W, ZHANG W, YE W, et al. SR9009 induces a REV-ERB dependent anti-small-cell lung cancer effect through inhibition of autophagy[J]. Theranostics, 2020,10(10):4466-4480.

[22] ZHANG Y, FANG B, EMMETT M J, et al. Discrete functions of nuclear receptor rev-erb α couple metabolism to the clock[J]. Science, 2015,348(6242):1488-1492.

[23] BU Y, YOSHIDA A, CHITNIS N, et al. A PERK-miR-211 axis suppresses circadian regulators and protein synthesis to promote cancer cell survival[J]. Nat Cell Biol, 2018,20(1):104-115.

[24] ANABTAWI N, CVAMMEN W, KEMP M G. Pharmacological inhibition of cryptochrome and REV-ERB promotes DNA repair and cell cycle arrest in cisplatin-treated human cells[J]. Sci Rep, 2021,11(1):17997.

[25] XU H, ZHANG J, ZHENG X, et al. SR9009 inhibits lethal prostate cancer subtype 1 by regulating the LXR α /FOXO1 pathway independently of REV-ERBs[J]. Cell Death Dis, 2022,13(11):949.