

Anticancer Activity of Salvidorol against the Human Oral Cancer Cells is Mediated via Cell Cycle Arrest, ROS Mediated Necrosis Like Cell Death, and Inhibition of MEK/ERK Signalling Pathway

Minhua HUANG¹ #, Ting DU² # & Fang YANG³ *

¹ Department of Stomatology, Huang Gang Central Hospital, Huanggang 438000, China.

² Department of Stomatology, Xianning Central Hospital, The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science And Technology, Xianning 437000, China.

³ Department of Stomatology, Hanchuan People's Hospital of Hubei, Hanchuan 431600, China

SUMMARY. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) has limited chemotherapeutic options underscoring the great need for development of new anticancer agents for more effective disease management. In the present study, our main objective was to investigate the anticancer effects of salvidorol in HSC-4 oral cancer cells along with evaluating its effects on cell cycle phase distribution, reactive oxygen species (ROS) generation, cell necrosis and MEK/ERK signalling pathway. MTT assay was used to evaluate cell viability of HSC-4 cells while as clonogenic assay was used to examine its effects on cell colony formation tendency. Flow cytometry was performed to examine effects on cell cycle while as effects on ROS were performed by fluorescence microscopy. Western blot assay was involved in studying its effects on MEK/ERK signalling pathway. Results indicated that salvidorol led to dose-dependent as well as time dependent growth inhibition of HSC-4 human oral cancer cells. It also dose-dependently decreased colony formation tendency of these cells. Phase contrast microscopy revealed that salvidorol induced morphological changes including cell shrinkage, membrane blebbing which are characteristic of necrosis. Western blot assay indicated that salvidorol -induced cell death is not apoptosis mediated as the expression levels of caspase-3 and caspase-9 remained almost unchanged. Flow cytometry indicated that salvidorol led to G2/M cell cycle arrest in HSC-4 human oral cancer cells. ROS calculations indicate that salvidorol led to necrosis mediated cell death as the ROS levels increased after drug treatment. Salvidorol treatment also led to significant inhibition of MEK/ERK signalling pathway. In conclusion, current study clearly indicates that salvidorol induces cytotoxic effects in HSC-4 human oral cancer cells mediated via cell cycle arrest, ROS-mediated necrosis and through inhibition of MEK/ERK signalling pathway.

RESUMEN. El carcinoma oral de células escamosas (OSCC) tiene opciones quimioterapéuticas limitadas, lo que subraya la gran necesidad de desarrollar nuevos agentes anticancerígenos para un manejo más eficaz de la enfermedad. En el presente estudio nuestro objetivo principal fue investigar los efectos anticancerígenos del salvidorol en las células de cáncer oral HSC-4 junto con evaluar sus efectos sobre la distribución de fases del ciclo celular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la necrosis celular y la vía de señalización MEK/ERK. El ensayo MTT se usó para evaluar la viabilidad celular de las células HSC-4, mientras que el ensayo clonogénico se usó para examinar sus efectos sobre la tendencia de formación de colonias celulares. La citometría de flujo se realizó para examinar los efectos sobre el ciclo celular mientras que los efectos sobre ROS se realizaron mediante microscopía de fluorescencia. Western blot estuvo involucrado en el estudio de sus efectos sobre la vía de señalización MEK/ERK. Los resultados indicaron que el salvidorol condujo a una inhibición del crecimiento dependiente de la dosis y del tiempo de las células de cáncer oral humano HSC-4. También disminuyó de forma dependiente de la dosis la tendencia a la formación de colonias de estas células. La microscopía de contraste de fase reveló que el salvidorol indujo cambios morfológicos, incluida la contracción celular y la formación de ampollas en la membrana, que son características de la necrosis. El ensayo de transferencia Western indicó que la muerte celular inducida por salvidorol no está mediada por la apoptosis ya que los niveles de expresión de caspasa-3 y caspasa-9 permanecieron casi sin cambios. La citometría de flujo indicó que el salvidorol condujo a la detención del ciclo celular G2/M en células de cáncer oral humano HSC-4. Los cálculos de ROS indican que el salvidorol condujo a la muerte celular mediada por necrosis a medida que los niveles de ROS aumentaron después del tratamiento farmacológico. El tratamiento con salvidorol también condujo a una inhibición significativa de la vía de señalización de MEK/ERK. En conclusión, el estudio actual indica claramente que el salvidorol induce efectos citotóxicos en las células de cáncer oral humano HSC-4 mediadas por la detención del ciclo celular, la necrosis mediada por ROS y por la inhibición de la vía de señalización MEK/ERK.

KEY WORDS: cell cycle, flow cytometry, necrosis, ROS, salvidorol.

These two authors contribute equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: FrankRiveraitu@yahoo.com