

HDAC 抑制剂对脉络膜黑色素瘤细胞系 C918 细胞增殖的影响及相关机制

张益萌^{1,2}, 杨瀚毅^{1,2}, 宁佳怡^{1,2}, 闫小龙³, 韩静²

引用: 张益萌, 杨瀚毅, 宁佳怡, 等. HDAC 抑制剂对脉络膜黑色素瘤细胞系 C918 细胞增殖的影响及相关机制. 国际眼科杂志 2023;23(2):193-197

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 8217111370); 陕西省科技攻关重点研发计划项目 (No. 2021SF-158); 唐都医院临床重点研究项目 (No. 2021LCYJ019, 2018LCYJ008)

作者单位: ¹(710068) 中国陕西省西安市, 西安医学院; (710038)

中国陕西省西安市, 空军军医大学第二附属医院²眼科; ³胸外科

作者简介: 张益萌, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼部肿瘤的基础研究。

通讯作者: 韩静, 毕业于空军军医大学, 博士研究生, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病的临床和基础研究. hanjing.cn@163.com

收稿日期: 2022-06-06 修回日期: 2023-01-16

摘要

目的: 阐明组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂辛二酰苯胺异羟肟酸 (SAHA) 对脉络膜黑色素瘤 (CM) 细胞系 C918 细胞增殖的影响并探讨相关机制。

方法: 使用倒置荧光显微镜观察不同浓度 SAHA (0.625、1.25、2.5 μmol/L) 对 C918 细胞形态的影响; CCK-8 法观察 C918 细胞活力的变化; 细胞平板克隆形成实验和 EdU 染色法观察 SAHA 对 C918 细胞增殖的影响; 同时, Western blot 检测细胞增殖相关蛋白 c-Myc、细胞周期蛋白 CyclinA2 和 CDK2 以及 HDAC7 和成纤维细胞生长因子 18 (FGF18) 的表达。

结果: 与空白对照组比较, 光镜下见 SAHA 可减小 C918 的细胞密度, 促进细胞皱缩, 且随着 SAHA 浓度的增加对细胞的抑制作用也增强; CCK-8 法检测结果显示 SAHA 浓度依赖性抑制 C918 细胞活力, 2.5 μmol/L 浓度时抑制率达 80%; Western blot 结果表明 SAHA 可呈浓度依赖地降低 C918 细胞中的增殖蛋白 c-Myc、细胞周期蛋白 CyclinA2 和 CDK2 的表达; 另外, 1.25 μmol/L SAHA 显著降低 EdU 染色阳性细胞数和细胞克隆数。更为重要的是, 与空白对照组相比, SAHA 能浓度依赖地降低 HDAC7 和 FGF18 的表达。

结论: SAHA 能够通过抑制 HDAC7/FGF18 信号通路抑制 CM 细胞系 C918 细胞的增殖。

关键词: 辛二酰苯胺异羟肟酸; 组蛋白去乙酰化酶 (HDAC); 成纤维细胞生长因子 18; 细胞增殖; 细胞周期

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.2.02

Effects and related mechanisms of histone deacetylase inhibitors on the proliferation of choroidal melanoma C918 cell line

Yi-Meng Zhang^{1,2}, Han-Yi Yang^{1,2}, Jia-Yi Ning^{1,2}, Xiao-Long Yan³, Jing Han²

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 8217111370); Key Research and Development Program of Shaanxi Province for Science and Technology Research (No. 2021SF-158); Key Clinical Research Project of Tangdu Hospital (No. 2021LCYJ019, 2018LCYJ008)

¹Xi'an Medical University, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China;

²Department of Ophthalmology; ³Department of Thoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of the Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jing Han. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of the Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. hanjing.cn@163.com

Received: 2022-06-06 Accepted: 2023-01-16

Abstract

• **AIM:** To elucidate the effect of histone deacetylase (HDAC) inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on the proliferation of choroidal melanoma (CM) cell line C918 and to explore the related mechanism.

• **METHODS:** Inverted fluorescence microscope was used to observe the effect of different concentrations of SAHA (0.625, 1.25 or 2.5 μmol/L) on the morphology of C918 cell. The cell viability was detected by cholecystokinin octapeptide (CCK-8) assay. Plate clone formation assay and EdU staining were carried out to measure the effect of SAHA on the cell proliferation. Meanwhile, the expressions of cell proliferation-related proteins including c-Myc, CyclinA2 and CDK2, and histone deacetylase 7 (HDAC7) and fibroblast growth factor 18 (FGF18) were detected by Western blot.

• **RESULTS:** Compared with the control group, the cell density was reduced in SAHA. SAHA could also promote cell shrinkage, and the inhibition on cell was in a concentration-dependent manner. CCK-8 assay showed that SAHA treatment decreased cell viability in a dose-dependent manner and the inhibition rate was 80% when SAHA at 2.5 μmol/L. Compared with the control group, Western blot showed that SAHA could suppress the expression of cell proliferation proteins including c-Myc,

CyclinA2 and CDK2 in a dose - dependent manner. In addition, 1.25 $\mu\text{mol/L}$ SAHA significantly decreased the numbers of EdU staining positive cells and cell clones. More importantly, SAHA could dose - dependently decrease the expression of HDAC7 and FGF18 compared with control group.

• CONCLUSION: SAHA could inhibit the proliferation of CM cell line C918 by inhibiting the HDAC7/FGF18 signaling pathway.

• KEYWORDS: suberoylanilide hydroxamic acid; histone deacetylase (HDAC); fibroblast growth factor 18; cell proliferation; cell cycle

Citation: Zhang YM, Yang HY, Ning JY, *et al.* Effects and related mechanisms of histone deacetylase inhibitors on the proliferation of choroidal melanoma C918 cell line. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2023;23(2):193-197

0 引言

作为成人最常见的眼内肿瘤,脉络膜黑色素瘤(choroidal melanoma, CM)的发病率仅低于视网膜母细胞瘤,是位居眼内肿瘤发病率第二位的恶性肿瘤^[1]。CM病情复杂,恶性程度高,预后极差,易通过血行转移累及肝脏,由于缺乏特异的治疗手段,导致患者的长期生存率较低^[2-4]。目前临床上针对CM患者的主要治疗手段包括激光疗法、放射治疗、眼球摘除术等^[4-5]。值得指出的是,出于降低肿瘤细胞转移率和提高患者生存率等方面的考虑,过去对CM的治疗常采用眼球摘除术,但并未明显降低CM转移率以及患者生存率^[6-8],并且其作为一种破坏性手术,给患者带来了极大的身心影响。因此,在保留眼球和视力的前提下,探寻有效提高CM患者生存率,且无创伤的治疗方法成为了目前亟需解决的问题。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)是一种酰胺水解酶,通过调控组蛋白赖氨酸位点的乙酰化和去乙酰化动态平衡参与染色质结构修饰和基因表达。研究发现多种肿瘤细胞中HDAC过度激活,使组蛋白去乙酰化增强,在肿瘤细胞凋亡、增殖和分化等过程中发挥重要作用^[9-10]。因此,HDAC成为了研究抗癌药物的重要靶点。HDAC抑制剂(histone deacetylase inhibitors, HDACi)通过改变组蛋白和非组蛋白的乙酰化状态,诱导肿瘤细胞的凋亡、分化、抑制细胞增殖,从而表现出抗癌活性^[11-15]。作为HDACi的重要代表之一,辛二酰苯胺异羟肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)已经在临床用于治疗皮肤T细胞淋巴瘤^[10]。同时,研究表明SAHA在多种肿瘤模型中都能够通过单一或联合用药发挥有效的抗肿瘤作用^[11]。成纤维细胞生长因子18(fibroblast growth factor 18, FGF18)参与了细胞分化,血管形成,关节软骨的修复,同时已有证据表明,FGF18在肿瘤细胞增殖以及促迁移和侵袭能力方面发挥重要作用^[16]。本研究旨在探讨SAHA对CM细胞系C918细胞增殖的影响以及对FGF18的调控作用,进一步阐明CM的发病机制,并为SAHA治疗CM提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 C918细胞培养于含10%胎牛血清、

10U/mL青、链霉素双抗的DMEM高糖(Corning, USA)培养基,并置于37℃、5% CO₂恒温培养箱中进行贴壁培养。取对数生长期细胞(细胞增殖至85%左右),弃旧培养基, PBS 涮洗3遍,加入胰蛋白酶进行消化传代。

1.1.2 主要试剂 脉络膜黑色素瘤细胞系C918购自湖南丰晖生物科技有限公司;青链霉素购自上海格来赛生命科技有限公司;胎牛血清购自以色列Biond Biologics公司; β -actin单克隆抗体、c-Myc抗体、CDK2抗体、CyclinA2抗体和FGF18抗体购自CST公司;SAHA购自MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA); BeyoClick™ EdU-594试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;增强型细胞活力检测试剂盒(CCK-8)购自上海七星复泰生物科技有限公司;DMSO购自天津市富宇精细化工有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞形态学观察 将C918细胞接种于培养皿中,随机分为空白对照组、SAHA 0.625、1.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组。观察细胞的贴壁率及细胞形态,当细胞贴壁后按照药物梯度分别处理48h,利用倒置荧光显微镜观察各培养皿内细胞形态的变化。

1.2.2 CCK-8实验检测细胞活力 重悬C918细胞,制成密度为 $6 \times 10^3/\text{L}$ 的细胞悬液,96孔板中每孔加入细胞悬液100 μL (留2个空白组不加细胞,加入同体积的培养基)。细胞置于5% CO₂恒温细胞培养箱中培养24h。各孔分别加入100 μL 含有不同浓度SAHA的工作液(0.625、1.25、2.5 $\mu\text{mol/L}$),每组设5个复孔,于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养48h。每孔加入10 μL CCK-8溶液,37℃、5% CO₂培养箱中孵育1h,将酶标仪波长设定为450nm,读取各组OD值。细胞存活率:将测试孔的OD值减去本底的OD值(空白组),各重复孔的OD值取 $\bar{x} \pm s$ 。细胞存活率(%)=(加药细胞OD/对照细胞OD) $\times 100\%$ 。

1.2.3 细胞平板克隆形成实验检测细胞集落形成能力 用胰蛋白酶消化C918细胞,低速常温离心收集细胞沉淀,加入培养基吹打混匀,进行细胞计数,调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,倍比稀释至 $1 \times 10^3/\text{mL}$,将混匀的细胞悬液接种于培养板中。待细胞生长稳定后,加入SAHA 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 处理48h,空白对照组加入同等量的DMSO。48h后,换用新培养基继续培养细胞14d。每孔加入4%多聚甲醛1mL,固定细胞15min,去除固定液,加入适量结晶紫染液30min,然后用水冲洗,放置常温干燥。用Image J计克隆数,计算克隆形成率。

1.2.4 EdU染色法检测细胞增殖 取对数生长周期的C918细胞,常规操作,消化细胞,制成单细胞悬液,以 8×10^4 个/皿接种于共聚焦皿中。细胞培养过夜或状态稳定后,加入SAHA 1.25 $\mu\text{mol/L}$ 处理48h,空白对照组加入同等量的DMSO。稀释EdU原液,每孔加100 μL 50 $\mu\text{mol/L}$ EdU培养基,培养箱中孵育2h,弃旧培养基, PBS 洗细胞3次。加入4%多聚甲醛固定,30min后弃固定液。每孔加入0.3% Triton X-100 100 μL ,室温处理15min。配制Click反应液,室温避光孵育35min。弃反应液,1mL的PBS洗3次。制备适量1000 \times Hoechst 33342反应液,避光保存。每孔加入100 μL 1 \times Hoechst 33342反应液,避光、室温、孵育35min后,弃结晶紫染色反应液,每孔加入1mL的PBS洗3次。

1.2.5 细胞蛋白质提取和定量 收集培养 48h 的各 C918 细胞,冰板上操作,倒干培养基,预冷的 PBS 洗 3 遍,用负压吸引器将 PBS 吸净。每皿加入约 200 μ L 裂解液,收集细胞裂解液于 1.5mL 离心管中,4 $^{\circ}$ C 裂解 20min,在低温高速离心机中 4 $^{\circ}$ C 12 000r/min 离心 20min,取上清液用 BCA 法行蛋白定量,加入 5 \times loading buffer 煮沸 8min。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达 每孔上样相同蛋白量,置于电泳缓冲液中电泳,电泳结束后,采用恒压 90V 湿转 90min,将蛋白转至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉室温下摇床慢速封闭 2h,将目的条带切下,置于相应一抗中并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。第 2d 用 TBS 缓冲液 (TBST) 漂洗 PVDF 膜 3 次,每次 10min。室温下摇床孵育二抗 120min,采用 Bio-Rad ChemiDocXRS+ 化学发光仪进行灰度值检测,用 Image Lab 软件统计各目的蛋白的相对表达。以 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参。

统计学分析:采用统计软件 SPSS25.0 进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用 LSD-*t* 检验;两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SAHA 呈浓度依赖性降低 C918 细胞活力 空白对照组 C918 细胞形态呈梭形,48h 后细胞密度达到 90% (图 1A)。给予不同浓度 SAHA 药物处理 48h 后,C918 细胞表现出不同程度的形态学改变,表现为细胞皱缩变形,且细胞贴壁不良、生长显著受到抑制,细胞密度逐渐减小,该作用随药物浓度的升高更为明显 (图 1B~D)。当药物浓度增加到 2.5 μ mol/L 时,细胞出现明显死亡 (图 1D)。CCK-8 检测结果显示,空白对照组、SAHA 0.625 μ mol/L 组、SAHA 1.25 μ mol/L 组、SAHA 2.5 μ mol/L 组 C918 细胞存活率分别为 (100 \pm 7)%、(77 \pm 10)%、(58 \pm 12)%、(22 \pm 14)%。与空白对照组相比,SAHA 呈浓度依赖性地抑制 C918 细胞活力 (均 $P<0.05$),药物浓度为 2.5 μ mol/L 时抑制率达 80%。

2.2 SAHA 呈浓度依赖性降低 C918 细胞增殖相关蛋白的表达 SAHA 可呈浓度依赖性地降低 C918 细胞中增殖相关蛋白 c-Myc 以及细胞周期蛋白 CyclinA2 和 CDK2 的表达 (图 2),与空白对照组 (100.00 \pm 0.00)% 相比,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。当 SAHA 浓度为 0.625 μ mol/L 时,将 c-Myc、CyclinA2 和 CDK2 的蛋白相对表达量分别降低到 (67.33 \pm 2.08)%、(71.66 \pm 1.52)% 和 (75.00 \pm 5.00)%;当 SAHA 浓度为 1.25 μ mol/L 时,c-Myc、CyclinA2 和 CDK2 的蛋白相对表达量分别降低到 (45.67 \pm 1.52)%、(42.67 \pm 4.04)% 和 (52.33 \pm 2.52)%;而当 SAHA 浓度为 2.5 μ mol/L 时,其抑制作用最明显,c-Myc、CyclinA2 和 CDK2 的蛋白相对表达量分别降低到 (29.00 \pm 2.53)%、(28.00 \pm 6.69)% 和 (35.00 \pm 5.00)%。

2.3 SAHA 可降低 C918 细胞 EdU 染色和细胞集落形成能力 SAHA 浓度为 1.25 μ mol/L 时,可将 EdU 染色阳性细胞数比例降低到 (13.80 \pm 4.50)%,与空白对照组的阳性比例 (34.80 \pm 1.64)% 相比,差异具有统计学意义 ($P<0.01$),见图 3A。同时,细胞克隆实验显示,与空白对照组 (142.67 \pm 8.74)% 相比,1.25 μ mol/L SAHA 组 (49.33 \pm 14.76)% 细胞克隆数显著减少,差异具有统计学意义 ($P<0.01$),见图 3B。

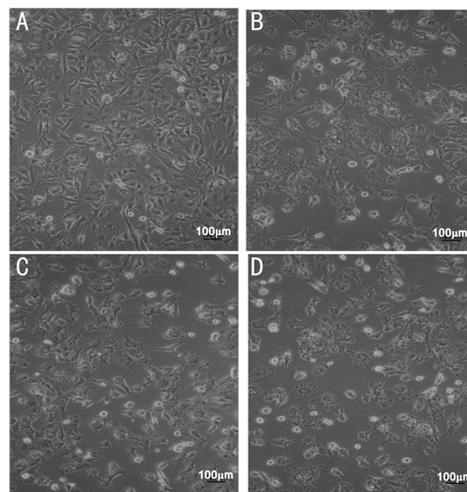


图 1 不同浓度 SAHA 对 C918 细胞形态和活力的影响 A:空白对照组;B:SAHA 0.625 μ mol/L 组;C:SAHA 1.25 μ mol/L 组;D:SAHA 2.5 μ mol/L 组。

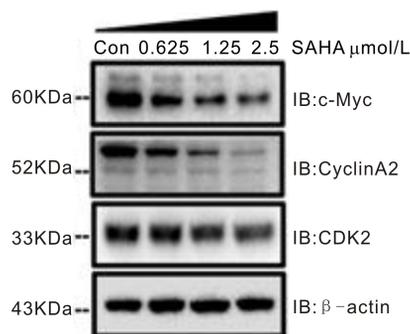


图 2 SAHA 作用下 C918 中细胞增殖相关蛋白的表达 c-Myc、CyclinA2 和 CDK2 的蛋白表达检测条带。

2.4 SAHA 呈浓度依赖性抑制 C918 细胞中 HDAC7 和 FGF18 表达 Western blot 结果显示,与空白对照组相比,随着 SAHA 处理浓度的增加,C918 细胞中 HDAC7 和 FGF18 蛋白相对表达量显著降低,见图 4。当 SAHA 浓度为 0.625 μ mol/L 时,HDAC7 和 FGF18 蛋白相对表达量分别下降到 (75.67 \pm 1.53)% 和 (75.00 \pm 4.36)%,与空白对照组 (100.00 \pm 0.00)% 比较差异均具有统计学意义 ($P<0.05$);当 SAHA 浓度为 1.25 μ mol/L 时,HDAC7 和 FGF18 蛋白相对表达量分别下降到 (46.67 \pm 3.61)% 和 (55.67 \pm 6.44)%,与空白对照组比较差异均具有统计学意义 ($P<0.01$);当 SAHA 浓度为 2.5 μ mol/L 时,HDAC7 和 FGF18 蛋白相对表达量分别下降到 (30.33 \pm 5.14)% 和 (41.67 \pm 7.97)%,与空白对照组比较差异均具有统计学意义 ($P<0.01$)。

3 讨论

作为成人发病率最高的眼内肿瘤,大多数的 CM 患者被诊断时已经发生远处转移,其中以肝转移最为常见^[17-18]。目前 CM 治疗缺乏特异性强的化疗策略^[19],临床治疗采用的肿瘤手术切除常需联合眼球摘除,创伤大,但却很难有效降低其复发率和转移率,同时对患者的心理和远期生存质量均会产生极大负面影响。因此,对肿瘤的早期发现并对其生长进行阻断是降低肿瘤复发率、转移率,以及提高患者生存率的重要因素。

SAHA 作为经典的 HDACi 之一,能够在对正常细胞几乎没有毒性作用的浓度下发挥有效的抗肿瘤效应。同时,

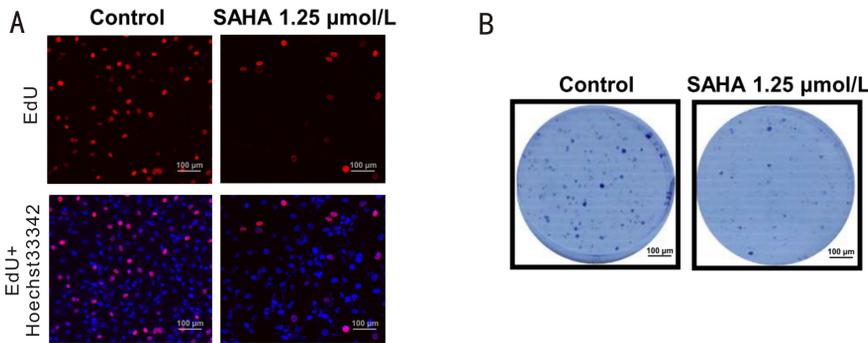


图3 SAHA对C918细胞EdU染色和细胞克隆的影响 A:EdU染色图;B:细胞克隆实验图。

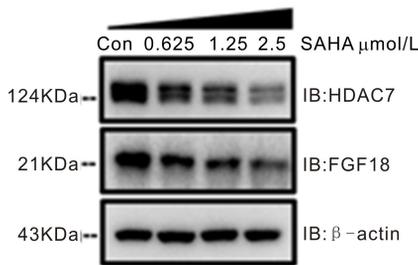


图4 不同浓度SAHA对HDAC7和FGF18蛋白表达量的影响 HDAC7和FGF18的蛋白表达检测条带。

研究证明SAHA能抑制耐药性黑色素瘤生长^[20-21]。另外,已有研究指出HDACi能抑制非小细胞肺癌A549、H1299细胞系的增殖。恶性肿瘤细胞最主要的危害是具有无限增殖的潜能。而SAHA在多种恶性肿瘤中都表现出了较强的抑制肿瘤生长的作用^[22-24],然而其在CM细胞中是否具有抑制细胞生长的作用并不清楚。本研究发现,SAHA对C918细胞增殖具有明显的抑制作用,且SAHA浓度介于0.625~2.5 $\mu\text{mol/L}$,该药物随着浓度的增加抑制作用也增强,这与其在肺癌肿瘤中的作用相一致。以上结果表明,SAHA在CM细胞系C918细胞中发挥明显的抑制细胞增殖的作用。

研究发现,HDAC7在多种肿瘤中均能起到促进肿瘤细胞增殖的作用^[25-28],且该作用与上调FGF18信号通路相关。而FGF18在细胞分化和生长,炎症反应,组织修复,血管新生,骨骼生长以及肿瘤细胞增殖中扮演了重要角色^[29-34]。作为HDAC家族抑制剂,SAHA抑制C918细胞增殖的作用是否与调节HDAC7/FGF18信号有关还不清楚。此外,以往研究表明,在肺癌中SAHA能够通过抑制HDAC降低c-Myc和CyclinA2的表达,发挥抑制细胞增殖的作用。本实验结果也显示,SAHA处理的C918细胞中c-Myc和CyclinA2的表达显著降低;同时,细胞周期蛋白CDK2的表达也随之降低。更为重要的是,SAHA还能够浓度依赖性抑制HDAC7和FGF18在C918细胞中的表达。以上实验结果表明,SAHA能够通过抑制HDAC7/FGF18信号,降低增殖相关蛋白c-Myc、细胞周期蛋白CyclinA2、CDK2的表达。

综上所述,本实验探讨了SAHA对C918细胞增殖影响的相关机制,证明SAHA能够通过调控HDAC7/FGF18信号抑制C918细胞增殖,这为SAHA应用于CM患者临床治疗提供了一定的理论依据。需要指出的是本次研究仍有一定的局限性,由于本研究只采用了一种CM细胞

系,故此次研究结论对其他CM细胞系是否可以推广暂不能确定。因此SAHA对其他CM细胞系的增殖、代谢、转移等相关生物学功能的影响及机制研究将是我们要进一步探讨的问题。

参考文献

- 1 裴超,刘静霞. 脉络膜黑色素瘤的研究进展. 国际眼科杂志 2017; 17(12):2256-2259
- 2 明媚,张劲,罗钢,等. HMG1在葡萄膜黑色素瘤中的表达及对细胞增殖和侵袭的影响. 国际眼科杂志 2021;21(8):1351-1355
- 3 Pal BP, Garge S, Khetan V. Choroidal melanoma: a short review with an Indian perspective. *Oman J Ophthalmol* 2017;10(3):135-144
- 4 Elder DE, Bastian BC, Cree IA, et al. The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Arch Pathol Lab Med* 2020;144(4):500-522
- 5 Chattopadhyay C, Kim DW, Gombos DS, et al. Uveal melanoma: from diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer* 2016; 122(15):2299-2312
- 6 Smit KN, Jager MJ, de Klein A, et al. Uveal melanoma: towards a molecular understanding. *Prog Retin Eye Res* 2020;75:100800
- 7 Bustamante P, Piquet L, Landreville S, et al. Uveal melanoma pathobiology: metastasis to the liver. *Semin Cancer Biol* 2021;71:65-85
- 8 Shields JA, Shields CL. Management of posterior uveal melanoma: past, present, and future: the 2014 Charles L. Schepens lecture. *Ophthalmology* 2015;122(2):414-428
- 9 Fan FS, Liu P, Bao RD, et al. A dual PI3K/HDAC inhibitor induces immunogenic ferroptosis to potentiate cancer immune checkpoint therapy. *Cancer Res* 2021;81(24):6233-6245
- 10 Li Y, Wang F, Chen XX, et al. Zinc-dependent deacetylase (HDAC) inhibitors with different zinc binding groups. *Curr Top Med Chem* 2019;19(3):223-241
- 11 Wang Y, Liu F, Fang C, et al. Combination of rapamycin and SAHA enhanced radiosensitization by inducing autophagy and acetylation in NSCLC. *Aging* 2021;13(14):18223-18237
- 12 Shen J, Zhang BM, Chen JJ, et al. SAHA alleviates diarrhea-predominant irritable bowel syndrome through regulation of the p-STAT3/SERT/5-HT signaling pathway. *J Inflamm Res* 2022;15:1745-1756
- 13 Hurwitz JL, Stasik I, Kerr EM, et al. Vorinostat/SAHA-induced apoptosis in malignant mesothelioma is FLIP/caspase 8-dependent and HR23B-independent. *Eur J Cancer* 2012;48(7):1096-1107
- 14 Manal M, Chandrasekar MJN, Gomathi Priya J, et al. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: a critical review. *Bioorg Chem* 2016;67:18-42
- 15 Yang FF, Zhao N, Hu YJ, et al. The development process: from SAHA to hydroxamate HDAC inhibitors with branched CAP region and linear linker. *Chem Biodivers* 2020;17(1):e1900427

- 16 Hayes AJ, Whitelock J, Melrose J. Regulation of FGF-2, FGF-18 and transcription factor activity by perlecan in the maturational development of transitional rudiment and growth plate cartilages and in the maintenance of permanent cartilage homeostasis. *Int J Mol Sci* 2022; 23(4):1934
- 17 Reichstein DA, Brock AL. Radiation therapy for uveal melanoma; a review of treatment methods available in 2021. *Curr Opin Ophthalmol* 2021;32(3):183-190
- 18 Carvajal RD, Schwartz GK, Tezel T, et al. Metastatic disease from uveal melanoma; treatment options and future prospects. *Br J Ophthalmol* 2017;101(1):38-44
- 19 明媚, 罗文, 高峰. 蛋白酶活化受体 2 在葡萄膜黑色素瘤中的表达及对细胞增殖和侵袭的影响. *国际眼科杂志* 2018; 18(12): 2137-2141
- 20 Wu RY, Wang CQ, Li ZM, et al. SOX2 promotes resistance of melanoma with PD-L1 high expression to T-cell-mediated cytotoxicity that can be reversed by SAHA. *J Immunother Cancer* 2020; 8(2):e001037
- 21 Wang LQ, Leite de Oliveira R, Huijberts S, et al. An acquired vulnerability of drug-resistant melanoma with therapeutic potential. *Cell* 2018;173(6):1413-1425. e14
- 22 Goehringer N, Peng YY, Nitzsche B, et al. Improved anticancer activities of a new pentafluorothio-substituted vorinostat-type histone deacetylase inhibitor. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021;14(12):1319
- 23 Yeh SHH, Lin MH, Leo Garcia Flores II, et al. In vivo evaluation of the combined anticancer effects of cisplatin and SAHA in nonsmall cell lung carcinoma using [¹⁸F]FAHA and [¹⁸F]FDG PET/CT imaging. *Mol Imaging* 2021;2021:6660358
- 24 Zhao YX, Yu DD, Wu HG, et al. Anticancer activity of SAHA, a potent histone deacetylase inhibitor, in NCI-H460 human large-cell lung carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol* 2014;44(2):451-458
- 25 Caslini C, Hong S, Ban YJ, et al. HDAC7 regulates histone 3 lysine 27 acetylation and transcriptional activity at super-enhancer-associated genes in breast cancer stem cells. *Oncogene* 2019;38(39):6599-6614
- 26 Ahn MY, Yoon JH. Histone deacetylase 7 silencing induces apoptosis and autophagy in salivary mucoepidermoid carcinoma cells. *J Oral Pathol Med* 2017;46(4):276-283
- 27 Barneda-Zahonero B, Collazo O, Azagra A, et al. The transcriptional repressor HDAC7 promotes apoptosis and c-Myc downregulation in particular types of leukemia and lymphoma. *Cell Death Dis* 2015; 6(2):e1635
- 28 Zhu CH, Chen Q, Xie ZQ, et al. The role of histone deacetylase 7 (HDAC7) in cancer cell proliferation: regulation on c-Myc. *J Mol Med* 2011;89(3):279-289
- 29 Yang C, Zhang ZY, Ye FD, et al. FGF18 inhibits clear cell renal cell carcinoma proliferation and invasion via regulating epithelial-mesenchymal transition. *Front Oncol* 2020;10:1685
- 30 Zhang JL, Zhou YH, Huang TT, et al. FGF18, a prominent player in FGF signaling, promotes gastric tumorigenesis through autocrine manner and is negatively regulated by miR-590-5p. *Oncogene* 2019; 38(1): 33-46
- 31 Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, et al. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev* 2002;16(7):870-879
- 32 Song N, Zhong JT, Hu Q, et al. FGF18 enhances migration and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by regulating Akt/GSK3β/B-catenin signaling. *Cell Physiol Biochem* 2018; 49(3): 1019-1032
- 33 Sonvilla G, Allerstorfer S, Stättner S, et al. FGF18 in colorectal tumour cells; autocrine and paracrine effects. *Carcinogenesis* 2008; 29(1):15-24
- 34 Wei W, Mok SC, Oliva E, et al. FGF18 as a prognostic and therapeutic biomarker in ovarian cancer. *J Clin Invest* 2013;123(10): 4435-4448