

· 基础研究 ·

莪术醇对人鼻咽癌细胞 CNE2 增殖、 凋亡及周期的影响

何金年, 姚东方, 李杰恩

(广西医科大学第一附属医院 耳鼻咽喉-头颈外科, 广西 南宁 530021)

摘要: **目的** 探讨莪术醇 (curcumol) 在体外对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖、凋亡及周期的影响, 为其临床治疗鼻咽癌提供理论依据。**方法** 不同浓度莪术醇作用于人鼻咽癌 CNE2 细胞后, 用 MTT 法和流式细胞仪检测不同时间点鼻咽癌细胞 CNE2 的增殖、凋亡及周期分布。**结果** 莪术醇在体外明显抑制鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖, 且呈浓度和时间依赖性 ($P < 0.05$); 不同浓度作用 48 h 后细胞凋亡率随浓度增加而增大, 并使细胞周期阻滞于 G_2/M 期。**结论** 莪术醇能明显抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖, 诱导其凋亡, 能将细胞阻滞于 G_2/M 期, 具有潜在的抗肿瘤作用。

关键词: 莪术醇; 鼻咽癌; 凋亡; 细胞增殖

中图分类号: R739.63

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2011)03-0171-04

Effect of curcumol on proliferation, apoptosis and cell cycle of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells

HE Jin-nian, YAO Dong-fang, LI Jie-en

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of curcumol on proliferation, apoptosis and cell cycle of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE2 in vitro and to investigate the feasibility of curcumol for the treatment of NPC. **Methods** Nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells were treated with curcumol of different concentrations. The cell proliferation inhibition rates, apoptosis ratios and cell cycle status at different time-points were detected with MTT and flow cytometry. **Results** The CNE2 proliferation was inhibited in dose-dependent and time-dependent manners after treated by curcumol. 48 h after treatment, the apoptosis ratios showed increasing trends with the increased concentration of curcumol and CNE2 cells showed G_2/M phase blockage with a dose-dependent way. **Conclusion** By inhibiting the proliferation of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells in vitro, inducing cell apoptosis and preventing the cell cycle in G_2/M phase, curcumol has an anti-tumor potential.

Key words: Curcumol; Nasopharyngeal neoplasm; Apoptosis; Cell multiplication

鼻咽癌是我国南方常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率均较高, 极大地危害人们的健康。鼻咽癌的发病与遗传因素、环境因素及 EB 病毒等多种因素有关。其治疗主要以放射治疗为主。但最近研究表明, 配合化

疗的放疗能提高患者生存率, 改善生活质量^[1]。基础研究及临床实践表明中医药在抗肿瘤方面有其独特的优势。有研究显示, 莪术醇是莪术油的主要成分, 其对肿瘤有特殊的疗效, 且无明显的不良反应, 具有较好的研究和利用价值, 但尚缺乏对鼻咽癌方面的研究。本实验以人鼻咽癌细胞 CNE2 为研究对象, 分析和探讨莪术醇在体外对人鼻

基金项目: 广西科学基金 (编号: 桂科基 0779029)。

作者简介: 何金年, 男, 硕士研究生。

通讯作者: 李杰恩, Email: jieenli@sina.com.

咽癌 CNE2 细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响,旨在为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

CO₂ 培养箱 (Thermo Forma 公司); Thermo Multiskan MK3 酶标仪; FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。莪术醇 (成都天福堂经济有限公司); RPMI-1640 完全培养基 (美国 GIBCO 公司); 胎牛血清 (杭州四季青); Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (美国 Bipecc 公司); 碘化丙啶 (PI, Sigma 公司); MTT (Sigma 公司); 二甲基亚砷 (DMSO); RNaseA (PBS 配制); 人鼻咽癌 CNE2 细胞株 (广西医科大学耳鼻喉实验室冻存)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 CNE2 细胞置于含 15% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和链霉素的 RPMI1640 完全培养基中,37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。细胞单层贴壁生长,待细胞长至 80% ~ 90% 发生融合时,用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化后收集细胞悬液,进行传代培养。收集对数生长期的细胞,用血细胞计数板计数细胞,后用 RPMI1640 完全培养基调整至 1 × 10⁵/ml 成单细胞悬液,备用。

1.2.2 细胞增殖抑制率测定 采用 MTT 法测定。将 CNE2 细胞接种于 96 孔板中,每孔 5 × 10³ 个细胞,置于培养箱内贴壁培养 24 h 后,分别加入 12.5、25、50、100 μg/ml 浓度的莪术醇,并用 PBS 设置阴性对照组,每组设 5 个复孔。分别培养 24、48、72 h。后加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,继续培养 4 h,弃上清,再加入 DMSO 150 μl,震荡 10 min,充分溶解结晶物后使用酶标仪在 A490 波长下测定吸光度。计算莪术醇对鼻咽癌细胞 CNE2 的抑制率。抑制率 (%) = (对照组吸光度 - 药物组吸光度) / 对照组吸光度 × 100 %。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集经 0、12.5、25、50、100 μg/ml 浓度的莪术醇作用 48 h 后的 CNE2 细胞, PBS 洗涤 2 次,后加 500 μl 的 Binding Buffer 重新悬浮

细胞,加入 5 μl 的 Annexin V-FITC,混匀后避光 5 min,再加入 10 μl PI,避光后在 30 min 内采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期 细胞处理和收集同上,加入 -20℃ 的 75% 乙醇混匀后 4℃ 固定过夜。离心后弃上清, PBS 洗涤 1 次后加入 Rnasa (1 g/L) 200 μl, 37℃ 水浴 30 min,再加入 PI 染料 500 μl, 4℃ 避光染色 30 min,流式细胞仪分析细胞周期,分别计算处于 G₀/G₁ 期、S 期和 G₂/M 期的细胞所占比例。

1.3 统计学方法

实验结果采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行数据处理。计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析 (SNK 法) 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 莪术醇对 CNE2 细胞的生长抑制作用 不同浓度的莪术醇作用于鼻咽癌细胞后, CNE2 细胞均受到不同程度的抑制,表现为在 A₄₉₀ 值的降低,抑制率升高。各组细胞抑制率随着药物浓度的升高和作用时间的延长而升高 ($P < 0.05$), 呈现浓度-时间依赖性 (表 1)。

表 1 不同浓度莪术醇对鼻咽癌 CNE2 细胞抑制率 (% , $\bar{x} \pm s$)

莪术醇浓度 (μg/ml)	例数	作用时间 (h)		
		24	48	72
12.5	6	14.2 ± 2.1	18.6 ± 3.2	21.2 ± 3.3
25	6	24.7 ± 1.9	28.7 ± 6.0 *	34.2 ± 3.7 *
50	6	34.2 ± 3.7	37.0 ± 4.4 *	41.2 ± 4.8 *
100	6	36.8 ± 3.0	39.2 ± 1.9	52.2 ± 3.9 *

注: * 与前一时间点、前一浓度相比 $P < 0.05$

2.2 不同浓度莪术醇对 CNE2 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测 0、12.5、25、50、100 μg/ml 不同浓度的莪术醇作用鼻咽癌细胞 48 h 后细胞均发生凋亡,且随着浓度的增加凋亡率逐渐增高。不同浓度的凋亡率分别为 20.01%、23.18%、32.39%、

37.17%、46.26%，两两相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 莪术醇对 CNE2 细胞生长增殖周期的影响

从细胞周期分布情况来看,经不同浓度莪术醇处理 48 h 后,CNE2 细胞周期各时相的细胞数占细胞总数的百分比有明显的不同。与对照组相比,处于 G_0/G_1 、S 期的细胞比例逐渐降低,而处于 G_2/M 期的细胞比例逐渐增多,且呈现剂量依赖性(表 2)。

表 2 不同浓度莪术醇处理 CNE2 细胞 48 h 后细胞周期分布(%, $\bar{x} \pm s$)

莪术醇浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞周期(%)		
	G_0/G_1	S	G_2/M
0	55.22 \pm 2.17	43.08 \pm 1.13	1.71 \pm 0.33
12.5	54.64 \pm 2.18	42.34 \pm 1.68	3.01 \pm 1.44 *
25	50.02 \pm 1.49 *	40.60 \pm 2.01 *	9.38 \pm 0.99 *
50	46.78 \pm 0.55 *	35.64 \pm 1.16 *	17.57 \pm 2.01 *
100	43.08 \pm 1.86 *	31.01 \pm 0.97 *	25.90 \pm 0.87 *

注: * 与 0 $\mu\text{g/ml}$ 相比 $P < 0.05$

3 讨论

鼻咽癌是我国广东、广西等省常见的恶性肿瘤,发病率较高。因其所在部位较为隐蔽,早期无明显特殊症状,故发现多为晚期,死亡率较高。虽然鼻咽癌治疗是以放疗为主,但其 5 年生存率仍然较低,仅为 50% 左右。最近又有研究发现,放疗时配合同步化疗或者放疗后化疗能显著提高患者的生存率,改善生存质量,故有必要寻求一种对鼻咽癌较为敏感,且副作用较小的化疗药物,以便配合放疗来改善患者预后,降低死亡率^[2]。

莪术醇是中药莪术的主要有效化学成分之一,具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗纤维化、活血化瘀等作用^[3-5]。最近研究表明,莪术醇能在体外对肝癌、结肠癌、胃癌、宫颈癌等有较强抑制作用,并呈现时间-浓度依赖性。研究还证实莪术醇能直接杀伤肿瘤细胞,影响核酸合成与代谢^[6-7]。相关临床研究表明莪术醇对妇科肿瘤有较好的疗效,且无明显不良反应,已受到广泛关注^[8]。

凋亡是细胞的生理性死亡过程,是由相关凋亡基因调控的程序性死亡过程,正常的凋亡过程对维持机体的基础代谢和保持体内平衡有重要意义。细胞凋亡除了受基因调控外,也受到放射线、药物等外界因素的影响^[9]。研究表明,多种抗肿瘤药物的作用机制是减慢增殖速率,诱导细胞发生程序性死亡,而起到治疗肿瘤的作用。本研究结果显示,莪术醇能显著抑制鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖,抑制率随着药物作用时间的延长和浓度的增加而逐步增大,呈现明显的时间-浓度依赖性。肿瘤细胞能够无限制增殖,主要是由于相关基因位点功能的丧失,导致细胞调控发生障碍,使得细胞周期发生紊乱^[10]。抗肿瘤药物能够阻滞肿瘤细胞分裂周期,诱导凋亡,其程度与抗肿瘤作用效果相关。本研究发现,经过不同浓度莪术醇作用后的鼻咽癌 CNE2 细胞处于不同分裂阶段,肿瘤细胞的周期分布发生很大变化,随着浓度的增加,处于 G_0/G_1 期的细胞逐渐减少,而处于 G_2/M 期的细胞比例逐渐增大,表明细胞出现 G_2/M 期的阻滞。 G_2/M 期是 DNA 的合成后期和分裂期,也为下一次的分裂做准备,同时也是放射线对细胞影响的最显著时期^[11]。莪术醇能够将鼻咽癌 CNE2 细胞阻滞在 G_2/M 期,则表明它有可能增加细胞对放射线的敏感性而提高放疗效果。目前还没有体内或体外二者相互联合作用的研究报道,有待进一步证实。

中药在抗肿瘤领域有独特的优势,随着研究的深入和提纯技术的优化其优势必将得到进一步的显现。本研究在体外环境下证实了莪术醇对鼻咽癌 CNE2 细胞有较好的抑制作用,并能够将细胞阻滞于 G_2/M 期,具有成为放疗增敏剂的潜能。但其具体的分子生物学作用机制及体内效果尚不清楚,有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Caponigro F, Longo F, Ionna F, et al. Treatment approaches to nasopharyngeal carcinoma: a review [J]. Anticancer Drugs, 2010, 21(5): 471-477.
[2] 姜国香. 鼻咽癌的治疗进展[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(10): 1798-1799.
[3] 唐泽耀,宗成国,林原. 莪术醇的活血化瘀活性实验

研究[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(5): 15.

- [4] 徐立春, 许祥裕, 陈平, 等. 莪术醇生物修饰构建的瘤苗治疗胃癌的实验研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2007, 22(2): 108-111.
- [5] 林海, 李晓辉. 莪术醇诱导慢性粒细胞白血病 K562 细胞分化的研究[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(11): 1674-1676, 3.
- [6] Johnson JJ, Mukhtar H. Curcumin for chemoprevention of colon cancer[J]. Cancer Lett, 2007, 255(2): 170-181.
- [7] Hou XL, Takahashi K, Tanaka K, et al. Curcuma drugs and curcumin regulate the expression and function of P-gp in Caco-2 cells in completely opposite ways[J]. Int J Pharm, 2008, 358(1-2): 224-229.
- [8] 徐立春, 边可君, 刘志敏, 等. 天然药物莪术醇抑制

肿瘤细胞生长及 RNA 合成影响的初步研究[J]. 肿瘤, 2005, 25(6): 570-572.

- [9] 戴贺桥, 章正, 肖健云, 等. γ 射线诱导人鼻咽癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 1999, 5(2): 100-102.
- [10] Dasi F, Martinez-Rodes P, March JA, et al. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in the plasma of patients with prostate cancer[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1075: 204-210.
- [11] Playle LC, Hicks DJ, Qualtrough D, et al. Abrogation of the radiation-induced G2 checkpoint by the staurosporine derivative UCN-01 is associated with radiosensitisation in a subset of colorectal tumour cell lines[J]. Br J Cancer, 2002, 87(3): 352-358.

(修回日期: 2011-05-02)

(上接第 170 页)

作用增强。ASODN 在联合 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP 作用后, 较单纯用 DDP 治疗组使细胞抑制率明显增加, 这说明 G4 ASODN 在 Hep-2 细胞中能够有效地抑制喉癌 Hep-2 细胞 XIAP 的表达, 并且增加其对化疗药物的敏感性。考虑到在尽量减少药物剂量的同时增加疗效, 笔者结合 MTT 实验结果, 根据 ASODN 的量效和时效关系, 发现 200 nmol/L ASODN 作用 36 h 对细胞的抑制作用效果已经较明显。故选择 200 nmol/L ASODN 用于后续实验。

实验中发现, ASODN 本身可诱导 Hep-2 细胞凋亡, 降低 XIAP 蛋白表达; 联合化疗药物顺铂 (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 作用后 Hep-2 细胞凋亡率明显提高, 同时 XIAP 蛋白表达量明显下降, 进一步证明了转染 XIAP ASODN 能够提高细胞对化疗药物的敏感性。XIAP 蛋白的变化, 主要是因为 XIAP ASODN 能够下调 XIAP mRNA 的表达, 进而下调 XIAP 蛋白表达。结合文献报道可推论 XIAP 蛋白表达减少对 caspase-3 的抑制作用减弱, 也就是加快了凋亡酶依赖途径凋亡的进行, 加速了细胞的凋亡^[3]。

综上所述, 转染 XIAP ASODN 能够降低 XIAP 蛋白的表达, 抑制喉癌 Hep-2 细胞的

增殖及促进其凋亡。联合化疗药物顺铂后, 能够有效提高细胞对化疗药物 (顺铂) 的敏感性, 提高化疗药物的效果。本实验结果为开展以 XIAP 为靶点基因治疗和化疗相结合的临床喉癌治疗新途径提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 马秀茹, 李晓明, 路秀英, 等. X-连锁凋亡抑制蛋白在顺铂诱导的喉癌 Hep-2 细胞凋亡中的作用 [1]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2007, 14(5): 287-290.
- [2] Hu Y, Cherton-Horvat G, Dragowska V, et al. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells in vitro and in vivo[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7): 2826-2836.
- [3] Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, et al. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases[J]. Nature, 1997, 388(6639): 300-304.
- [4] Yang L, Cao Z, Yan H. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cell: implication for cancer specific therapy [J]. Cancer Res, 2003, 63(20): 6815-6824.
- [5] Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, et al. Chemosensitization effects of XIAP downregulation in K562 leukemia cells [J]. J Chemother, 2006, 18(1): 98-102.

(修回日期: 2011-04-20)