

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201605011

· 论 著 ·

汉黄芩苷对鼻咽癌裸鼠移植瘤模型的放疗增敏作用及其机制研究

向元俤¹, 刘卫红¹, 吴娟², 李春丽¹, 代伟林¹

(武汉市第一医院 1. 耳鼻咽喉科; 2. 皮肤科, 湖北 武汉 430022)

摘 要: **目的** 观察汉黄芩苷对鼻咽癌裸鼠移植瘤放疗的增敏效应, 并探讨其与核转录因子 NF- κ B 的关系。**方法** 取低分化鼻咽癌 5-8F 细胞接种于雌性裸鼠皮下(共接种 24 只), 待肿瘤结节约 4~6 mm 时, 将裸鼠随机分为 4 组, 每组 6 只。分别为对照组、汉黄芩苷组[20 mg/(kg·w)]、放疗组、汉黄芩苷[20 mg/(kg·w)]联合放疗组。依照各组不同治疗措施处理, 定期测量瘤体体积, 3 周后处死裸鼠, 剥离瘤体称重, 分别计算各组抑瘤率; 并采用 Real time PCR 检测瘤体组织中 NF- κ B mRNA 的表达水平。**结果** 汉黄芩苷联合放疗组移植瘤的体积和重量显著下降, 相比对照组、汉黄芩苷组及放疗组差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05); 汉黄芩苷联合放疗组 NF- κ B mRNA 表达水平明显下降, 与其他各组相比, 差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05)。**结论** 汉黄芩苷能增强鼻咽癌裸鼠移植瘤对放疗的敏感性, 其作用机制可能与抑制核转录因子 NF- κ B 的作用相关。

关 键 词: 汉黄芩苷; 鼻咽癌; 放疗; NF- κ B
中图分类号: R739. 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2016)05-0383-05

Radiosensitization and mechanism of wogonin on transplanted nasopharyngeal carcinoma cell line of 5 – 8F in nude mice

XIANG Yuan-di, LIU Wei-hong, WU Juan, LI Chun-li, DAI Wei-lin
(Department of Otolaryngology, the First Hospital of Wuhan City, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To detect in vivo radiosensitization of wogonin on transplanted nasopharyngeal carcinoma (NPC) in nude mouse, and to explore the relationship between the radiosensitization and expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B). **Methods** 5 – 8F cells were inoculated subcutaneously in the right axillas of 24 female BALB/c nude mice. When tumor nodes reached certain size (range 4 – 6 mm), the mice were randomly divided into four groups (6 mice for each group): control group, wogonin group (20 mg/kg, intraperitoneal injection), radiotherapy group (20 Gy), and combination group (wogonin plus radiotherapy). The tumor volume was measured once every three days. Three weeks after treatment, all mice were executed and tumors were removed and weighed. Their tumor inhibitory rates were calculated. Real-time PCR was applied to detect the expression of NF- κ B in tumor tissues. **Results** Both tumor volume and weight of the combination group were less than those of the other three groups respectively (all $P < 0.05$). Real-time PCR showed that the expression of NF- κ B mRNA in the combination group was decreased as compared with those of the other three groups, and the differences were all statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Wogonin may increase radiosensitization of transplanted NPC in nude mice with possible mechanism of down-regulated expression of nuclear factor- κ B.

Key words: Wogonin; Nasopharyngeal neoplasms; Radiosensitivity; Nuclear factor- κ B

鼻咽癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率在近年来呈现出明显的上升趋势。随着调强放

疗和放化疗综合治疗模式的应用, 早期鼻咽癌患者(I、II期)的 5 年总生存率超过 80%, 尽管如此, 晚期(III、IV期)鼻咽癌的 5 年总生存率仍然不容乐观, 仅达 30%~40%^[1-2]。导致晚期鼻咽癌复发和转移、影响肿瘤治疗的主要因素为肿瘤抗性细胞的存在, 因

作者简介: 向元俤, 男, 硕士, 主治医师。
通信作者: 向元俤, Email: doctorxiangwuhan@163.com

此,针对肿瘤抗性细胞,寻找新的药物以提高放疗敏感性,对改善鼻咽癌的治疗现状显得尤为重要。

汉黄芩苷是从唇形科植物黄芩根部提取的一种单体成分,属于黄酮类化合物。既往研究报道汉黄芩苷具有显著的抗肿瘤、免疫增强、抗氧化作用^[3-4],其抗肿瘤的机制主要包括抑制细胞核内基因转录、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制新生血管生成等多方面的作用,同时对正常细胞无毒性作用^[5-6]。而关于汉黄芩苷对肿瘤放疗敏感性的研究,国内外尚不多见。同时,既往研究表明核转录因子 NF- κ B 的持续活化能引起肿瘤细胞的放疗耐受,Voboril 等^[7]研究发现发现放射治疗可导致鼻咽癌细胞的 NF- κ B 的活性继发性升高,并且其升高程度与鼻咽癌细胞中 NF- κ B 的基础活性呈正相关。因此,本研究旨在探讨汉黄芩苷是否对人鼻咽癌裸鼠移植瘤模型存在放疗增敏作用,并进一步探讨其与 NF- κ B 的关系,以期汉黄芩苷在鼻咽癌治疗的临床应用提供实验室数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

汉黄芩苷购自上海融禾公司,纯度为 99%;人低分化鼻咽癌 5-8F 细胞株来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;RPIM 1640 培养基和胎牛血清购自 GIBCO 公司;逆转录试剂盒及 Real-time PCR kit 购自 TAKARA 公司;引物由上海生工合成, NF- κ B 引物序列:上游 5'-CCAGACCAACAACAAC-CCCT-3' 和下游 5'-CACTGTACCTGGAAGCAGA-3';GADPH 引物序列:上游 5'-AAAGCCTGCCGGT-GACTAA-3' 和下游 5'-AGGAAAAG CATCACCCG-GAG-3'。BALB/c 裸鼠(雌性,4~6 周龄,体重 16~20 g),购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.2 细胞及动物培养

人鼻咽癌 5-8F 细胞常规培养于 RPMI 1640 + 10% FBS 的培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度环境条件下进行培养。当 5-8F 细胞处于对数生长期时,取出进行实验。汉黄芩苷用生理盐水溶解,调至浓度为 10 g/L,用 0.22 μ m 微孔过滤器过滤,4℃ 保存备用。裸鼠饲养于恒温(22~25℃)、恒定湿度的 SPF 层流罩中,经高压灭菌的标准饲料和水供动物自由饮食。

1.3 裸鼠移植瘤模型建立

取对数生长期 5-8F 细胞,消化后加入 5~10 ml

培养基并吹打成单细胞悬液,离心,使用 Biomed 细胞计数仪进行细胞计数,计数完毕后离心,加入 PBS 重悬,使细胞终浓度为 1.0×10^7 个/ml。1 ml 一次性注射器吸取按上述方法调整的 5-8F 细胞悬液 0.2 ml(含细胞 2×10^6 个),络合碘消毒裸鼠皮肤接种部位,接种于裸鼠右侧腋窝皮下,共接种裸鼠 24 只。整个操作过程在 SPF 环境内进行。接种后定期观察裸鼠注射点附近皮肤有无肿瘤形成,每隔 3 d 测量裸鼠体重,游标卡尺测量肿瘤体积大小,成瘤标准为肿瘤直径 5 mm $\times$ 5 mm。

1.4 实验动物的分组和处理方法

皮下注射 1 周后,测得所有裸鼠均已成瘤(瘤体长径为 4~6 mm)。按照随机分组表法,将裸鼠随机分为 4 组:对照组、汉黄芩苷组、放疗组、放疗 + 汉黄芩苷组,每组 6 只。各组处理措施如下:①对照组:每 2 d 一次给予生理盐水腹腔注射,注射量为 200 μ L;②汉黄芩苷组:每 2 d 一次给予汉黄芩苷腹腔注射,给药量为 25 mg/(kg $\cdot$ w);③放疗组:每 5 d 一次给予电子直线加速器照射,每只局部 5 Gy,共计 20 Gy;④放疗 + 汉黄芩苷组:同时给予②组和③组处理。给药第 1 天开始测量肿瘤的长径和短径,每 3 d 测量 1 次,肿瘤体积 $[V = 1/2(a \times b)^2]$;在给药处死裸鼠,剥离瘤体,称重记录瘤体重量。计算各组的肿瘤抑瘤率。抑瘤率(%) = (1 - 实验组瘤体重量的均数/对照组瘤体重量的均数)。

1.5 Real time PCR 检测不同组别瘤体中 NF- κ B mRNA 的表达

提取裸鼠移植瘤标本组织中的总 RNA,紫外分光光度计测 RNA 纯度及浓度。RT-PCR 采用 TAKARA 逆转录试剂盒 20 μ l 体系,其中 RNA 模板为 1 μ g, Oligo dT 引物和随机引物各 1 μ l, PCR buffer 为 4 μ l(包含镁离子、dNTPs、甘油等),逆转录酶为 1 μ l,其余用 DEPC 水补足,RT-PCR 反应条件为:37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃ ∞ ;Real time PCR:本实验采用 20 μ l 反应体系,其中模板为 100 ng, NF- κ B 上下游引物各使用 1 μ l, TAKARA SYBR GREEN 为 10 μ l,其余用 DEPC 水补足;Real time PCR 反应条件为:95℃ 预变性 3 min, 95℃ 30 s + 57℃ 30 s + 72℃ 30 s 共计 40 个循环,72℃ 3 min,4℃ ∞ ,并在退火时采集荧光值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计学软件进行统计,计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$,多个样本均数之间的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多个样本均数两两

比较,方差齐者采用 SNK 检验,方差不齐者进行 Tamhane's T2 检验。组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 时为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后各组瘤体的体积

治疗前,各组裸鼠移植瘤体积组间进行两两比较,均无统计学意义(P 均 > 0.05)。经过不同的处理措施治疗 3 周后,如表 1 所示,汉黄芩苷组、放疗组和放疗 + 汉黄芩苷组与对照组相比,瘤体体积差异均具有统计学意义(χ^2 值分别为 3.06、5.73、6.28, P 均 < 0.05),其中放疗 + 汉黄芩苷组处理组瘤体体积最小,与单独放疗组相比,差异同样具有统计学意义($P < 0.05$),根据各组瘤体体积绘制移植瘤生长曲线,如图 1 所示,可见放疗 + 汉黄芩苷组移植瘤增长速率最低,说明汉黄芩苷治疗联合放疗,可有效增加裸鼠鼻咽癌移植瘤模型对放疗的敏感性。

表 1 治疗前与治疗 3 周后各组移植瘤的体积比较 (mm³, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

治疗时间	对照组	汉黄芩苷组	放疗组	放疗 + 汉黄芩苷组
治疗前	75.3 ± 13.1	82.4 ± 11.2	79.3 ± 6.6	80.7 ± 8.2
治疗 3 周后	979.3 ± 105.1	805.2 ± 68.2	435.4 ± 81.3	302.2 ± 77.8

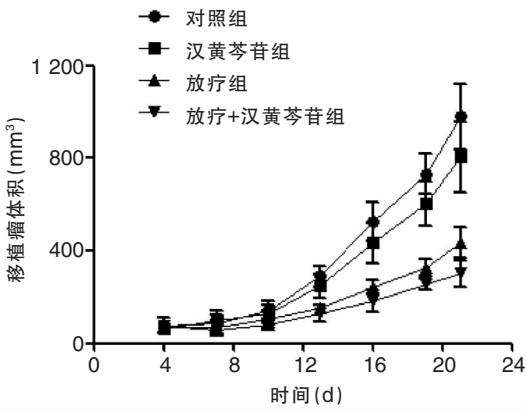


图 1 各组移植瘤生长曲线

2.2 治疗前后各组瘤体的质量

经过上述处理措施分别治疗 3 周后,各实验组移植瘤质量与对照组相比均显著下降,其中放疗 + 汉黄芩苷组移植瘤质量最小,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$),与放疗组相比,差异同样具有统计学意义($P < 0.05$)。根据公式计算各实验组抑瘤率,可知汉黄芩苷组、放疗组和放疗 + 汉黄芩

苷组的抑瘤率分别为 19.8%、64.7%、80.6%,放疗 + 汉黄芩苷组与汉黄芩苷组及放疗组比较差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05),见图 2。

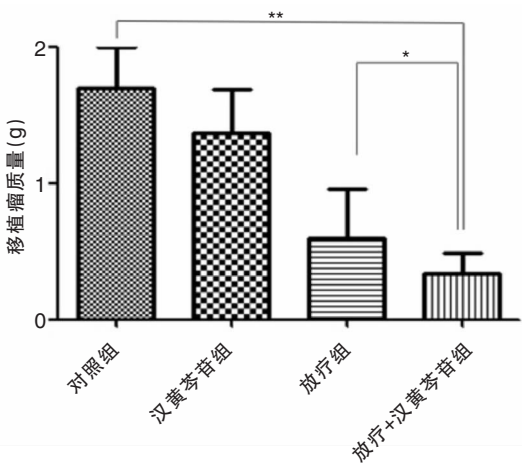


图 2 治疗 3 周后各组移植瘤的质量

2.3 Real time PCR 检测 NF- κ B mRNA 在各组瘤体中的表达差异

TRIZOL 法提取鼻咽癌瘤体组织标本的 RNA,经 RT PCR 之后,Real time PCR 检测核转录因 NF- κ B 在 4 组裸鼠中的表达情况(图 3)。结果提示对照组、单纯放疗组、汉黄芩苷组以及放疗 + 汉黄芩苷组的 NF- κ B mRNA 相对表达量依次为:0.38 ± 0.11、0.45 ± 0.09、0.26 ± 0.03、0.13 ± 0.09。与对照组相比,放疗组 NF- κ B mRNA 表达水平上升,而放疗 + 汉黄芩苷组 NF- κ B mRNA 表达水平显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明汉黄芩苷治疗联合放疗对鼻咽癌裸鼠移植瘤模型的放疗增敏作用,可能是通过对核转录因 NF- κ B 的调控来实现的。

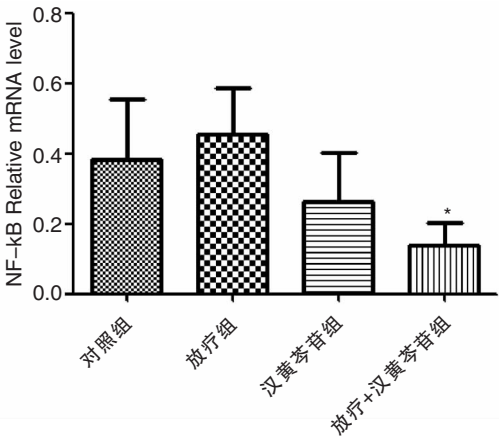


图 3 Real time PCR 检测各组移植瘤 NF- κ B mRNA 表达变化

3 讨论

鼻咽癌是我国常见的恶性肿瘤之一,主要多发于我国南方的广东、广西等省份,据统计每年 10 万人中发病例数为 15 ~ 50 例^[8-9]。鼻咽癌对放射线的高敏感性以及其特殊的解剖结构和生物学行为,决定了放射治疗一直是非转移鼻咽癌治疗的基本方法^[10]。随着调强放疗技术和化疗的联合应用,近年来鼻咽癌的治疗现状有了明显的改善。对于早期鼻咽癌患者,单纯的放射治疗即可获得良好的疗效。但是对于大部分晚期鼻咽癌患者而言,由于转移的发生和鼻咽部解剖结构的限制,单纯放疗难以取得良好的疗效^[11]。因此,寻找新的方法提高鼻咽癌对放射治疗的敏感性,成为改善鼻咽癌患者生存质量以及远期疗效的重要环节之一,同时也是鼻咽癌治疗的重点和难点^[12-13]。

近年来,中药复方及单体有效成分的抗肿瘤潜力越来越受到国内外学者们的重视。黄芩属唇形科植物,是自古代以来治温热病、抗炎及抗氧化的药物之一。多项研究表明,黄芩的主要活性成分汉黄芩苷可发挥显著的抗肿瘤作用^[14]。大量的流行病学调查及体内外的实验已证实,汉黄芩苷可在血液系统肿瘤、肝癌、胃癌及小细胞肺癌等肿瘤中发挥显著的抗肿瘤作用,主要表现在抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,以及抑制血管生成等^[15-16]。本研究结果发现,给予鼻咽癌裸鼠移植瘤模型定期腹腔注射一定浓度的汉黄芩苷,能有效增加鼻咽癌裸鼠移植瘤模型对放疗的敏感性。与对照组相比较,汉黄芩苷组、放疗组、放疗 + 汉黄芩苷组鼻咽癌移植瘤的增长均受到了不同程度的抑制,抑瘤率分别为 19.8%、64.7%、80.6%,其中以放疗 + 汉黄芩苷组抑制最明显,与单纯放疗组和单纯汉黄芩苷组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明汉黄芩苷能有效提高鼻咽癌对放疗的敏感性。

为对汉黄芩苷放疗增敏作用的机制进行进一步研究,我们采用 Real time PCR 检测各组瘤体组织中 NF- κ B mRNA 的表达变化。结果发现,放疗组裸鼠瘤体中 NF- κ B mRNA 表达水平相比对照组升高,而汉黄芩苷组及放疗 + 汉黄芩苷组裸鼠瘤体中 NF- κ B mRNA 表达水平相比对照组降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。NF- κ B 是由一组 Rel/NF- κ B 家族的多肽成员组成的,在不同的生理过程中调节基因表达的转录因子。哺乳动物 NF- κ B 家族包括 5 种

亚基,分别为 p65、RelB、C-Rel、p50/p105 (NF- κ B1) 和 p52 (NF- κ B2)^[17]。NF- κ B 在多种肿瘤细胞中过表达,其活性可受到肿瘤内外环境中多种因素的调节,例如微生物和其他的促炎性细胞因子等刺激。近年来大量研究报道,NF- κ B 的持续活化能引起肿瘤细胞对放化疗的耐受^[18]。我们的研究发现,放疗组裸鼠瘤体中 NF- κ B mRNA 表达水平相比对照组升高,进一步证明了在鼻咽癌中放射治疗可导致 NF- κ B 的活性继发性升高,通过检测鼻咽癌中 NF- κ B 基础活性水平可以预测其对放疗的敏感程度。国外学者进行进一步的机制研究发现,其作用机制可能与肿瘤细胞和肿瘤间质细胞 DNA 损伤有关^[19]。Sun 等^[20]研究发现在乳腺癌中,肿瘤组织来源于成纤维细胞的 NF- κ B 的激活,可进一步激活 Wnt 信号通路,从而促进肿瘤细胞的存活,抵制化学放疗造成的肿瘤杀伤作用。Didelot 等^[21]研究发现,在头颈肿瘤放疗不敏感 κ B 细胞株中, NF- κ B 与 DNA 的结合活性明显低于其放疗敏感亚系 κ B3 细胞株,在 κ B3 细胞株中过表达 NF- κ B,可引起该细胞凋亡率的下降以及对放疗的耐受。与以上实验结果相符,我们的研究发现,汉黄芩苷可通过抑制放疗时 NF- κ B 的激活来增强肿瘤对放疗的敏感性。

综上所述,本研究发现汉黄芩苷对人鼻咽癌裸鼠移植瘤模型存在显著的放疗增敏作用,进一步机制研究发现其作用可能是通过抑制放疗时 NF- κ B 信号通路的激活来实现的。放疗耐受是影响鼻咽癌患者治疗和预后的主要因素之一。汉黄芩苷在体内动物模型中,可有效的增加鼻咽癌的化疗敏感性,具有相当可观的抗肿瘤潜能。关于汉黄芩苷在鼻咽癌中的研究,还需更深入的动物在体实验和 I 期临床试验,以期为进一步提高鼻咽癌患者的放、化疗效果,以及在鼻咽癌中进行 NF- κ B 靶向治疗奠定理论基础。

参考文献:

- [1] 尹述成,周绪红,彭涛,等.胰岛素样生长因子-1 受体蛋白在鼻咽癌细胞中的表达及其临床意义[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2008,22(19):874-877.
- [2] 程金建,杨华,陈甲信,等.调强放疗及化疗对鼻咽癌患者营养状况的影响[J].广东医学,2011,32(17):2336-2338.
- [3] Parajuli P, Joshee N, Rimando AM, et al. In vitro antitumor mechanisms of various Scutellaria extracts and constituent flavonoids[J]. Planta Med, 2009, 75(1): 41-48.
- [4] Chen LG, Hung LY, Tsai KW, et al. Wogonin, a bioactive flavonoid in herbal tea, inhibits inflammatory cyclooxygenase-2 gene

- expression in human lung epithelial cancer cells [J]. Mol Nutr Food Res, 2008, 52(11): 1349–1357.
- [5] Lee DH, Kim C, Zhang L, et al. Role of p53, PUMA and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(10): 2020–2033.
- [6] Wang W, Guo Q, You Q, et al. Involvement of bax /bcl-2 in wogonin-induced apoptosis of human hepatoma cell line SMMC-7721 [J]. Anticancer Drugs, 2006, 17(7): 797–805.
- [7] Voboril R, Weberova-Voborilova J. Constitutive NF-kappaB activity in colorectal cancer cells: impact on radiation-induced NF-kappaB activity, radiosensitivity, and apoptosis [J]. Neoplasma, 2006, 53(6): 518–523.
- [8] Pow EH, Kwong DL, McMillan AS, et al. Xerostomia and quality of life after intensity-modulated radiotherapy vs. conventional radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: initial report on a randomized controlled clinical trial [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 66(4): 981–991.
- [9] Kam MK, Leung SF, Zee B, et al. Prospective randomized study of intensity-modulated radiotherapy on salivary gland function in early-stage nasopharyngeal carcinoma patients [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(31): 4873–4879.
- [10] Chua DT, Sham JS, Kwong DL, et al. Treatment outcome after radiotherapy alone for patients with Stage I – II nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer, 2003, 98(6): 74–80.
- [11] Cheng SH, Tsai SYC, Yen KL, et al. Concomitant radiotherapy and chemotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma [J]. J Clin Oncol, 2000, 18(4): 2040–2045.
- [12] 王林, 李仕晟, 杨新明, 等. 鼻咽癌细胞 LMP1 的表达与其对 TRAIL 敏感性的关系 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015, 21(4): 275–279.
- [13] 刘曼, 余远林, 高雪, 等. 反义角蛋白 13 慢性病毒质粒对鼻咽癌细胞放射敏感性的影响 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2014, 20(2): 101–106.
- [14] 李美德, 黎金浓, 曹治云, 等. 应用基因芯片研究汉黄芩素对肝癌细胞的生长抑制作用机制 [J]. 肿瘤学杂志, 2013, 19(3): 193–198.
- [15] 杨莉, 尤启东, 杨勇, 等. 汉黄芩素抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 中国医科大学学报, 2009, 40(6): 576–579.
- [16] Lan Y, Xue LZ, Hong S, et al. Catalase suppression-mediated H₂O₂ accumulation in cancer cells by wogonin effectively blocks tumor necrosis factor-induced NF-κB activation and sensitizes apoptosis [J]. Cancer Sci, 2011, 4(102): 870–876.
- [17] Pomerantz JL, Baltimore D. Two pathways to NF-kappaB [J]. Mol Cell, 2002, 10(4): 693–695.
- [18] 江雷迅, 凌月福. 核转绿因子 NF-κB 与头颈肿瘤 [J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 33(5): 292–295.
- [19] Schimmer AD, Welsh K, Pinilla C, et al. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad anti-tumor activity [J]. Cancer Cell, 2004, 5(1): 25–35.
- [20] Sun Y, Campisi J, Higano C, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through Wnt16B [J]. Nat Med, 2012, 18(9): 1359–1368.
- [21] Didelot C, Barberi—Heyob M, Bianchi A, et al. Constitutive NF-κB activity influences basal apoptosis and radiosensitivity of head-and-neck carcinoma cell lines [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, 51(5): 1354–1360.

(收稿日期: 2015–12–10)

· 消息 ·

远程投稿、查稿系统启事

本刊采用远程稿件采编系统进行投稿、查稿等,现就有关问题说明如下。

1. 作者投稿:登陆在线投稿系统(中文版),按操作提示投稿。第一次需先注册,原则上不再受理邮寄稿件和 Email 稿件。

2. 稿件查询:使用作者注册用户名和密码,可查询作者稿件审理进程和费用信息等。

有关投稿要求,请登陆本刊网站浏览。

网站登陆: <http://www.xyosbs.com/index.htm>