

紫草萘醌衍生物联合放射线照射抑制人鼻咽癌细胞增殖和诱导凋亡

苏 怡,谢景华,孟庆翔,何 龙,曾国庆,张改霞

(广州市第一人民医院耳鼻咽喉头颈外科,广东 广州 510180)

摘 要: **目的** 探讨紫草萘醌衍生物(SYUNZ-4)[3,11-bis(2-hydroxyethansulfanyl)-6-isohehexeny lnaphthazarin]联合放射治疗对鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)细胞生长的协同抑制作用及放疗增敏机制。**方法** 人 NPC 高分化鳞状细胞癌细胞株 CNE1 和低分化鳞状细胞癌细胞株 CNE2 随机分为空白对照组、单纯 SYUNZ-4 组、单纯放射治疗组及 SYUNZ-4 联合放射线照射组共 4 组。单纯放射治疗组仅给予剂量 4 Gy 放射线照射,单纯 SYUNZ-4 组仅给予最大非细胞毒性剂量的 SYUNZ-4 液培养,SYUNZ-4 联合放射线照射组在给予 4 Gy 的放射线照射后,立即给予最大非细胞毒性剂量的 SYUNZ-4 液培养;然后应用流式细胞术检测 SYUNZ-4 诱导 CNE1 和 CNE2 细胞凋亡的作用及其对细胞周期的影响。**结果** SYUNZ-4 对 CNE1 和 CNE2 细胞均具有增殖抑制作用,且其作用呈浓度依赖性。与空白对照组相比,单纯放射线照射组及联合治疗组细胞增殖均受到抑制($P<0.05$),且前者 G2/M 期细胞比例明显增加($P<0.05$),后者 S 期及 G2/M 期细胞比例均显著增加($P<0.05$)。与单纯放疗组相比,联合干预使 CNE1 和 CNE2 细胞增殖受到更明显地抑制($P<0.01$)。与对照组相比,放射线照射导致细胞凋亡率明显增加($P<0.05$);而联合治疗组与单纯放疗组和空白对照组相比,联合干预使 CNE1 和 CNE2 细胞凋亡率明显增加,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 紫草萘醌衍生物 SYUNZ-4 联合放射线照射能显著抑制人 NPC 细胞的增殖,并导致 NPC 细胞周期阻滞和诱导凋亡。

关 键 词:紫草萘醌衍生物;鼻咽癌;放疗增敏;细胞周期阻滞;细胞凋亡
中图分类号:R739. 63 **文献标识码:**A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2017,23(3):207-211,216]

Sensibilization and apoptosis induction of radix arnebiae naphthoquinone derivative combined with radiotherapy on human nasopharyngeal carcinoma cell lines

SU Yi,XIE Jing-hua,MENG Qing-xiang, HE Long, ZENG Guo-qing,ZHANG Gai-xia
(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the First People's Hospital of Guangzhou City, Guangzhou 510180, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of synergistic repression and sensibilization of radix arnebiae naphthoquinone derivative [3,11-bis(2-hydroxyethansulfanyl)-6-isohehexenyl naphthazarin, SYUNZ-4] combined with radiotherapy on human nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell lines. **Methods** Human NPC well-differentiated squamous cell carcinoma cell line CNE1 and poorly differentiated squamous cell carcinoma cell line CNE2 were randomly divided into four groups: blank control group, SYUNZ-4 group, radiotherapy group, combination of SYUNZ-4 with radiotherapy group. The radiation dose was 4Gy and cell lines of the combined group were cultured with the maximal non-toxic dose of SYUNZ-4 right after finishing radiotherapy. After that, apoptosis induction and effect on cell cycle distribution were studied by flow cytometry. **Results** The proliferations of CNE1 and CNE2 were significantly inhibited by SYUNZ-4 in a concentration-dependent manner. Compared with the blank control group, the cell proliferations were remarkably inhibited in both the radiotherapy group and the combined group (both $P<0.05$), the proportion of G2/M cells was increased significantly ($P<0.05$) in the radiotherapy group and that of S and G2/M cells was increased significantly in the combined group

基金项目:广州市医药卫生科技项目(20151A010015)。
作者简介:苏 怡,女,硕士,主治医师。
通信作者:苏 怡,Email:107549819@qq.com

($P < 0.05$). Compared with the radiotherapy group, cell proliferations of CNE1 and CNE2 were more significantly inhibited by combined intervention (both $P < 0.01$). Compared with the control group, radiation exposure led to a significant increase in apoptosis ($P < 0.05$). Moreover, the apoptotic rates of CNE1 and CNE2 cells in the combined group were significantly increased compared with the radiotherapy group ($P < 0.05$). **Conclusion** SYUNZ-4 combined with radiotherapy can significantly inhibit the proliferation of human NPC cells, which results in cell cycle arrest and apoptosis induction.

Key words: Radix arnebiae naphthoquinone derivative; Nasopharyngeal neoplasma; Radiotherapy sensibilization; Cell cycle arrest; Apoptosis

[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(3): 207-211, 216]

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是我国南方地区高发、恶性程度较高的肿瘤, 治疗上首选放射治疗。临床工作中, 增强鼻咽癌放疗敏感性、减少放疗毒性反应是目前研究的主要方向。目前, 喜多碱类、长春新碱类、茶多碱类、紫杉醇类等植物来源的药物已证明对治疗肿瘤很有成效^[1-2], 并广泛用于临床, 从植物中寻找抗肿瘤药已成为抗肿瘤药物研究的重要课题。尽管目前研究已发现紫草的抗肿瘤生物学效应, 但其是否能增强鼻咽癌的放疗敏感性并不清楚。在本项目中, 我们将探讨紫草萘醌衍生物联合放射治疗对 NPC 细胞生长的协同抑制作用, 并探讨其放疗增敏机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人 NPC 高分化鳞状细胞癌细胞株 CNE1 和低分化鳞状细胞癌细胞株 CNE2 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。CNE1、CNE2 随机分为空白对照组、单纯 SYUNZ-4 组、单纯放射线照射组及 SYUNZ-4 联合放射线照射组共 4 组。

1.2 主要试剂

紫草萘醌衍生物 SYUNZ-4 [3, 11-bis (2-hydroxyethansulfany 1)-6-isohepteny lnaphthazarin] 是由新疆紫草根分离的有效成分 β , β 二甲基丙烯酰阿卡宁半合成的衍生物。由中山大学药学院提供, 用 DMSO 溶解后贮存, 临用时用注射用水稀释成所需浓度。RPM I-1640 培养基和新生牛血清购于美国 Gibco BRL 公司, 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和四甲基偶氮唑盐 [3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT] 均购于碧云天生物技术研究所, 细胞周期和凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司。

1.3 细胞培养

CNE1 和 CNE2 细胞均培养于含 10% 新生牛血清、PH 为 7.2 的 RPM I-1640 培养基中, 同时加入浓

度为 100 μ /ml 青链霉素, 在 100% 湿度、37.0 $^{\circ}$ C 恒温、5% CO₂ 培养箱中常规培养。

1.4 细胞照射

采用 SIEMENZ 直线加速器产生的 6 MV-X 线照射细胞, 剂量率为 250 cGy/min。照射时在细胞培养板加垫 0.5 cm 厚的有机玻璃板及硅胶补偿膜, 放射源至细胞的距离为 100 cm, 照射野为 25 cm $\times$ 25 cm。

1.5 SYUNZ-4 对 CNE1 和 CNE2 细胞增殖的抑制作用

CNE1 和 CNE2 分别以细胞数 1 000 个/孔均匀接种于 96 孔板, 每组 3 个平行孔, 待细胞贴壁后分别给予 0、2.5、5、10、15 和 20 μ g/ml 的 SYUNZ-4 溶液继续培养 72 h 后, 终止培养。每孔加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 液 20 μ l, 继续孵育 4 h, 吸去孔内上清液并加入 DMSO 150 μ l, 振荡 10 min 后于 570 nm 波长测定吸光度值, 计算 SYUNZ-4 半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC₅₀)。分别以两株细胞 IC₅₀ 值为参考, 给予低浓度 SYUNZ-4 液干预细胞, 培养 72h 后按上述 MTT 法测定吸光度值, 计算 SYUNZ-4 最大非毒性剂量。

1.6 SYUNZ-4 联合放射线照射对 CNE1 和 CNE2 细胞的增殖抑制实验

CNE1 和 CNE2 分别以细胞数 1 000 个/孔均匀接种于 96 孔板, 每组 3 个平行孔, 待细胞贴壁后单纯放射线照射组给予剂量为 4 Gy 的放射线照射, 单纯 SYUNZ-4 组给予最大非细胞毒性剂量的 SYUNZ-4 液培养, SYUNZ-4 联合放射线照射组在给予 4 Gy 的放射线照射后, 立即给予最大非细胞毒性剂量的 SYUNZ-4 液培养, MTT 法测定吸光度值, 连续检测 3 d, 绘制各组的细胞生长曲线。

1.7 流式细胞仪检测各组细胞周期

分组同上, 取对数生长期细胞, 以密度 1×10^6 个/ml 均匀接种于 6 孔板, 每孔 2 ml, 各组分别干预后, 培养 48 h 后制成单细胞悬液, 1 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 预冷的 PBS 液洗涤细胞两次, 4 $^{\circ}$ C 乙醇固定过夜; 离心收集细胞, 加入含 100 μ g/ml RNase A、50 μ g/ml 溴化乙锭 (PI) 和 0.2% Triton X-100 的

500 μl PBS 4℃ 避光孵育 30 min;流式细胞仪检测细胞周期,细胞周期拟和软件 ModFit 分析实验结果。

1.8 细胞凋亡检测

分组同上,取对数生长期细胞,以密度 1×10^6 个/ml 均匀接种于 6 孔板,每孔 2 ml,各组分别干预后,培养 48h 后制成单细胞悬液。取 10 万重悬的细胞,加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,摇匀后,室温下避光孵育 10 min;离心弃上清,再次加入 190 μl Annexin V-FITC 结合和 10 μl PI 染色液,轻轻摇匀,冰浴避光放置;流式细胞仪检测,CellQuest 软件分析实验结果。

1.9 统计学分析

所有数据统计分析采用 SPSS 16.0 统计软件,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较采用单因素方差分析(one way ANOVA)及最小显著性差异法(least singnificant difference, LSD 法), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SYUNZ-4 对 CNE1 和 CNE2 细胞的增殖抑制作用

SYUNZ-4 对 CNE1 和 CNE2 细胞均具有增殖抑制作用,且其作用呈浓度依赖性;SYUNZ-4 对 CNE1 和 CNE2 的 IC_{50} 分别为 $(5.78 \pm 0.13) \mu\text{g/ml}$ 和 $(6.46 \pm 0.09) \mu\text{g/ml}$ (图 1)。

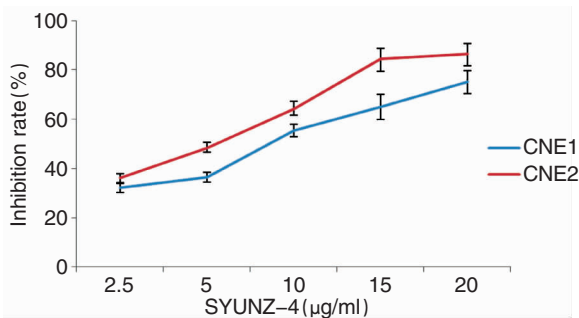


图 1 SYUNZ-4 对 CNE1 和 CNE2 细胞的增殖抑制作用

进一步采用小剂量、低浓度的 SYUNZ-4 干预细胞,发现当给予最大浓度分别为 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 时,CNE1 和 CNE2 的生长曲线与空白对照组生长曲线相比差异无统计学意义(图 2, $P > 0.05$),提示该剂量的 SYUNZ-4 为最大非细胞毒性剂量。

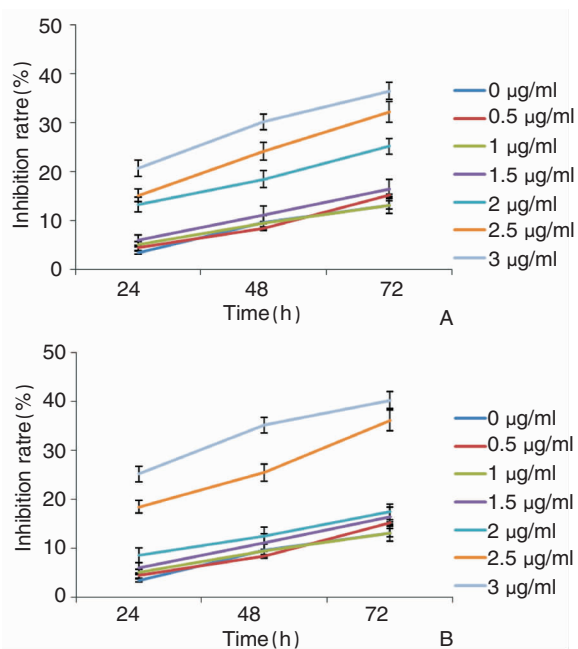


图 2 SYUNZ-4 干预 CNE1 和 CNE2 细胞的最大非毒性剂量 A: CNE1; B: CNE2

2.2 SYUNZ-4 联合放射线照射对 CNE1 和 CNE2 细胞的放射增敏作用

与空白对照组相比,单纯放射线照射组细胞增殖受到抑制,差异具有统计学意义(图 3, $P < 0.05$)。而与单纯放射线照射相比,SYUNZ-4 联合放射线照射对 CNE1 和 CNE2 细胞的增殖抑制作用更明显,两组间差异均有统计学意义(图 3, $P < 0.01$)。

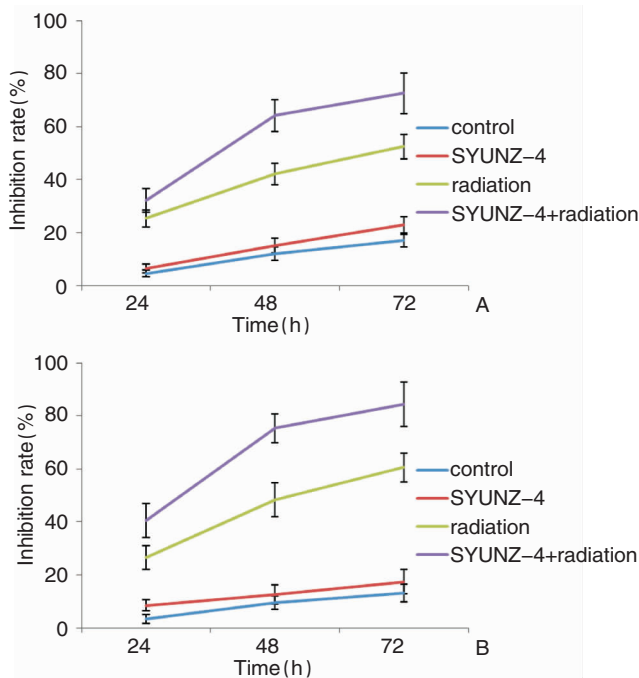


图 3 SYUNZ-4 对 CNE1 和 CNE2 细胞的放射增敏作用 A: CNE1; B: CNE2

2.3 SYUNZ-4 联合放疗对 CNE1 和 CNE2 细胞周期阻滞的作用

对照组中,绝大多数 CNE1 和 CNE2 细胞处于 G0/G1 期,S 期次之,G2/M 期最少,最大非毒性剂量 SYUNZ-4 组细胞周期分布与对照组无明显差别(表 1, $P>0.05$)。单纯放射线照射组与对照组相比,G2/M 期细胞比例明显增加($P<0.05$);而 SYUNZ-4 联合放射线照射组除了 G2/M 期细胞比例明显增加,与单纯放射线照射组相比,与对照组相比,S 期细胞比例均显著增加($P<0.01$)。

2.4 SYUNZ-4 联合放疗对 CNE1 和 CNE2 细胞凋亡

单纯放射线照射组与空白对照组相比,放射线照射导致细胞凋亡率明显增加,差异具有统计学意义(图 4, $P<0.05$);而 SYUNZ-4 联合放射线照射与单纯放射线照射和对照组相比,其 CNE1 和 CNE2 细胞凋亡率明显增加,组间差异均具有统计学意义(图 4, $P<0.01$)。

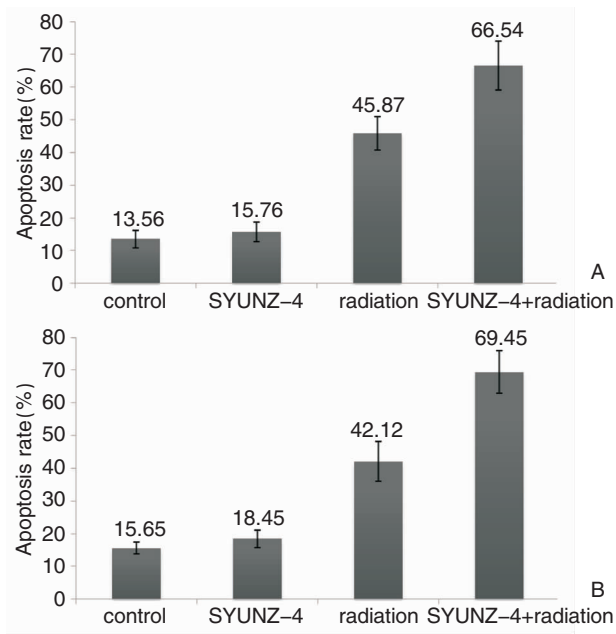


图 4 SYUNZ-4 对 CNE1 和 CNE2 细胞凋亡的影响
A: CNE1; B: CNE2

3 讨论

放射治疗是 NPC 的首选治疗方案,早期 NPC 患者 5 年生存率可达到 85.8% 以上^[3-4],然而临床上初诊患者,多处于晚期,5 年生存率不足 60%^[5]。与传统放疗相比,新近开展的调强放疗(intensity modulated radiotherapy, IMRT)和三维适形放疗(three dimensional conformal radiotherapy, 3D-CRT),虽然改善了靶区照射,并在一定程度上减少了周围敏感器官的受累风险,但对于在临床上占绝大多数的晚期 NPC 患者,疾病的总体生存率并无提高^[6],放疗的远期毒性反应仍然未能得到有效控制^[6-7]。此外,虽然调强放疗技术使得患者放疗后无局部复发,生存率得到很大提高,然而 83% 的肿瘤复发发生在高照射剂量靶区范围内,说明 NPC 的复发除了与肿瘤的 T 分级相关外,还与肿瘤细胞本身的放射敏感性密切相关^[8]。同步放化疗(concurrent chemoradiotherapy, CCRT)虽然提高了疾病的总体生存率^[9],但也显著增加了化疗的风险与并发症^[10],部分患者更因为不能耐受而终止治疗。因此,如何在现有技术的基础上通过增加 NPC 放射敏感性,减少放射线剂量,减轻对正常组织的放射损伤、提高放疗效率并减少放疗后毒性反应是当前 NPC 治疗中迫切需要解决的问题。

紫草为紫草科多年生草本植物,药用部分为其干燥的根,具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、免疫调节等作用^[11-12]。近年来越来越多的研究发现,紫草主要成分萘醌类化合物具有抗肿瘤作用^[13],临床上已有用紫草水煎液单方或组方治疗绒毛膜上皮癌、肺癌、白血病等的零星报道,有研究表明紫草萘醌衍生物能抑制体外培养恶性肿瘤细胞的增殖,导致其细胞周期阻滞并诱导凋亡^[14-15],也有研究表明紫草素通过降低自噬抑制基因 Beclin1 表达水平,诱导甲状腺髓样癌 TT 细胞自噬^[16]。然而,紫草对 NPC 细胞的生物学作用目前并未明确,且 NPC 作为一种以放疗为主要治疗手段的恶性肿瘤,紫草是否能增强人 NPC 细胞的放射敏感性并不清楚。

表 1 SYUNZ-4 对 CNE1 和 CNE2 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	CNE1			CNE2		
	G0/G1 期	S 期	G2/M 期	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
空白对照组	67.28 ± 8.31	23.56 ± 4.23	9.16 ± 3.05	64.13 ± 7.09	25.43 ± 2.98	10.44 ± 2.15
单纯 SYUNZ-4 组	62.36 ± 9.12	24.68 ± 5.08	12.96 ± 2.86	59.21 ± 5.87	24.32 ± 4.15	16.47 ± 2.73
单纯放射线照射组	45.13 ± 5.27	20.84 ± 3.18	34.03 ± 7.29	42.30 ± 6.39	19.15 ± 3.26	38.55 ± 5.16
SYUNZ-4 联合放射线照射组	26.64 ± 3.25	44.84 ± 5.78	28.52 ± 4.53	23.45 ± 4.17	46.54 ± 7.07	30.01 ± 5.18

本研究发现,紫草萘醌衍生物 SYUNZ-4 能抑制体外培养鼻咽癌细胞 CNE1 和 CNE2 细胞的增殖,具有明显的体外抗癌活性,这一结果与文献报道其对白血病细胞 K562^[17]、大肠癌细胞 HL-60^[18]、大肠癌细胞 CCL229^[19]、组织细胞淋巴瘤细胞 U937^[20]、直肠癌细胞 COLO205^[21] 的生长抑制作用相似,经紫草素处理的肿瘤细胞出现典型的凋亡特征,包括形态学改变,细胞膜通透性增高并出现外翻,核内 DNA 发生断裂,形成“DNA Ladder”现象及细胞周期的亚二倍体峰等^[17,20]。与单纯放射线照射相比,最大非毒性剂量的紫草萘醌衍生物 SYUNZ-4 联合放射线照射,对 NPC 细胞增殖的抑制作用更明显,此机制可能与 SYUNZ-4 导致 NPC 细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡有关。已有文献证实放射线照射可导致细胞 DNA 双链断裂、细胞周期阻滞于 G2 期,并启动一系列 DNA 损伤修复机制防止在细胞 M 期进行异常分裂,以对抗放射线损伤^[22-23]。本研究中,SYUNZ-4 联合放射线照射与单纯放射线照射相比,除了能显著增加两株细胞的 G2/M 期细胞比例,其 S 期和 G2/M 期细胞比例也明显增加,说明 SYUNZ-4 联合放射线对 NPC 细胞的作用,破坏了细胞周期进程的修复,并可能导致细胞 DNA 合成障碍而死亡,从而达到放射增敏作用。

综上所述,本研究初步揭示了紫草萘醌衍生物 SYUNZ-4 联合放射线照射能显著抑制人 NPC 细胞的增殖,并导致 NPC 细胞周期阻滞和诱导凋亡。在将来的临床工作中,可以考虑加入这种天然植物来源、低浓度的药物来增加 NPC 的放疗增敏作用,减少放疗副反应。

参考文献:

- [1] 刘晓,温瑞兴. 中药抗肿瘤作用的研究进展[J]. 现代生物学进展,2011,24(11):4978-4983.
- [2] 王承龙,邓雪娥,肖健云,等. 紫杉醇对鼻咽癌上皮细胞株 HNE-1 生长抑制和凋亡的影响[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2014,10(5):263-265.
- [3] Su SF, Han F, Zhao C, et al. Long-term outcomes of early-stage nasopharyngeal carcinoma patients treated with intensity-modulated radiotherapy alone[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 82(1): 327-333.
- [4] Xiao WW, Han F, Lu TX, et al. Treatment outcomes after radiotherapy alone for patients with early-stage nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 74(4): 1070-1076.
- [5] Leung TW, Tung SY, Sze WK, et al. Treatment results of 1070 patients with nasopharyngeal carcinoma: an analysis of survival and failure patterns[J]. *Head Neck*, 2005, 27(7): 555-565.
- [6] Zhang Y, Lin ZA, Pan JJ, et al. Concurrent control study of different radiotherapy for primary nasopharyngeal carcinoma: intensity-modulated radiotherapy versus conventional radiotherapy[J]. *Ai Zheng*, 2009, 28(11): 1143-1148.
- [7] Lee AW, Ng WT, Hung WM, et al. Major late toxicities after conformal radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma-patient- and treatment-related risk factors[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 73(4): 1121-1128.
- [8] 潘建基. 鼻咽癌临床诊治现状和进展[C]. 中国肿瘤内科进展, 第八届中国肿瘤内科大会、第三届中国肿瘤医师大会、中国抗癌协会肿瘤临床化疗专业委员会 2014 年学术年会, 2014: 北京.
- [9] Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG, et al. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099[J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(4): 1310-1317.
- [10] Zhang L, Zhao C, Ghimire B, et al. The role of concurrent chemoradiotherapy in the treatment of locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma among endemic population: a meta-analysis of the phase III randomized trials[J]. *BMC Cancer*, 2010, 15(10): 558.
- [11] 葛峰, 王晓东, 王玉春. 药用紫草的研究进展[J]. 中草药, 2004, 34(9): 6-10.
- [12] 孙培杰. 紫草的药理作用与临床应用研究进展[J]. 中医药信息, 2002, 19(4): 19.
- [13] 杨宏, 伊淑莹, 翟静, 等. 紫草提取物抗肿瘤的作用机制[J]. 生命的化学, 2013, 33(2): 49-53.
- [14] Xiong W, Luo G, Zhou L, et al. In vitro and in vivo antitumor effects of acetylshikonin isolated from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston (Ruanzicao) cell suspension cultures[J]. *Chin Med*, 2009, 4: 14.
- [15] Hsu PC, Huang YT, Tsai ML, et al. Induction of apoptosis by shikonin through coordinative modulation of the bcl-2 family, p27, and p53, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(23): 6330-6337.
- [16] 唐旭霞, 叶再元. 紫草素诱导甲状腺髓样癌 TT 细胞自噬的实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2016, 26(5): 418-421.
- [17] 李运曼, 祝浩杰, 刘国卿. 紫草素对 DNA 拓扑异构酶 I 活性的抑制作用和诱导人白血病 K562 细胞的凋亡[J]. 中国天然药物, 2003, 3(2): 165-168.
- [18] Masuda Y, Shima G, Aiuchi T, et al. Involvement of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) in apoptosis induced by beta-hydroxyisovalerylshikonin[J]. *J Biol Chem*. 2004, 279(41): 42503-42515.
- [19] Hashimoto S, Xu M, Masuda Y, et al. Beta-hydroxyisovalerylshikonin inhibits the cell growth of various cancer cell lines and induces apoptosis in leukemia HL-60 cells through a mechanism different from those of Fas and etoposide[J]. *J Biochem*, 1999, 125(1): 17-23.

(下转第 216 页)