

白杨素对人鼻咽癌细胞 CNE-2 增殖的抑制作用

王铮华^{1,2}, 梁 统^{1,3*}, 李 涛¹, 周克元¹

(¹广东医学院广东省医学分子诊断重点实验室, 东莞 523808; ²洛阳中心医院, 洛阳 471009;

³广东医学院检验医学研究所, 东莞 523808)

摘 要 探讨白杨素对人鼻咽癌细胞 CNE-2 增殖的抑制作用及机制。采用 CCK-8 法检测细胞存活率, Hoechst 33258 染色检测细胞形态变化, 流式细胞仪检测细胞凋亡率及细胞周期的变化, caspase-3 活性检测试剂盒检测 caspase-3 的活性。结果表明白杨素对 CNE-2 细胞的生长具有较强的抑制作用, 并具有明显的量-效关系; 白杨素可诱导 CNE-2 细胞凋亡, 使 G₀/G₁ 期细胞明显增多, S 期明显减少, 使细胞周期被阻滞于 G₀/G₁ 期; 白杨素可升高 CNE-2 细胞 caspase-3 的活性。白杨素对 CNE-2 细胞生长有明显的抑制作用, 其机制可能与白杨素诱导的细胞周期阻滞和细胞凋亡有关。

关键词 白杨素; 鼻咽癌; 细胞凋亡; 细胞增殖

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)01-0093-04

Effect of chrysin in inhibiting proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2

WANG Zhenghua^{1,2}, LIANG Tong^{1,3*}, LI Tao¹, ZHOU Keyuan¹

¹Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnosis, Guangdong Medical College, Dongguan 523808; ²Luoyang Central Hospital, Luoyang 471009; ³Research Institute of Laboratory Medicine, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China

Abstract The aim of the study was to investigate the inhibition effect of chrysin on the growth of human nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells. The cell proliferation was determined by CCK-8; the apoptosis bodies were observed by Hoechst 33258 staining; the apoptosis was detected by flow cytometry; and the activity of caspase-3 was analyzed by caspase-3 activity assay kit. The proliferation of CNE-2 cells was inhibited by chrysin in the concentration and time-dependent manners. Chrysin induced the apoptosis of CNE-2 cells. Furthermore, chrysin dramatically induced G₀/G₁ phase cell increase and S phase cell decrease. Cell cycle was arrested at G₀/G₁ phase. Chrysin could elevate the caspase-3 activity observably. Chrysin markedly inhibited the proliferation of CNE-2 cells. The inhibition effect may be related to inducing the apoptosis and cell cycle arrest on CNE-2 cells.

Key words chrysin; nasopharyngeal carcinoma; apoptosis; proliferation

This study was supported by the Provincial Social Development Project of Science and Technology of Guangdong (No. 53025); and the Multiple Program of Science and Technology of Dongguan (No. 201010815212)

白杨素(chrysin)又名白杨黄素,化学名为5,7-二羟基黄酮,是从紫葳科植物木蝴蝶中提取的一种具有广泛药理活性的黄酮类化合物,其在蜂胶中的含量较高,是蜂胶的主要有效成分之一。作为一种常见食源黄酮,白杨素具有低毒或无毒的优点。近年来,白杨素的抗肿瘤作用引起了国内外学者的

广泛关注。有研究表明,白杨素具抗肿瘤作用,可抑制人前列腺癌细胞 pc-3、人单核白血病细胞 U937 等的增殖^[1-2]。但白杨素对鼻咽癌细胞的作用如何,尚未见文献报道。鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)高发于中国南部省份和东南亚地区,是最常见的恶性肿瘤之一,每年发病率在

* 收稿日期 2012-09-11 * 通信作者 Tel: 0769-22896372 E-mail: liangt@gdmc.edu.cn

基金项目 广东省社会发展领域科技计划资助项目(No. 53025); 东莞市科技计划资助项目(No. 201010815212)

0.025%~0.05%^[3]。由于NPC原发部位隐蔽,不易被早期发现,因此确诊的患者60%以上都是中晚期,常伴转移^[4]。对这类患者除了采用常规的放疗外,化疗是必不可少的一种辅助治疗方法。本文拟研究白杨素对鼻咽癌细胞增殖的影响,探讨其作用机制,为鼻咽癌的防治提供实验依据。

1 材料

1.1 试剂

白杨素(纯度98%,南京替斯艾么中药研究所);人鼻咽癌细胞株CNE-2(低分化)(本课题组保存);DMEM液体培养基(美国HyClone公司);胎牛血清(美国Gibco/Invitrogen公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒,Hoechst 33258染色液(上海碧云天生物技术研究);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒,Caspase-3活性检测试剂盒(南京凯基生物公司)。

1.2 仪器

Syngy2多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司);FACSCanto II流式细胞仪(美国BD公司)。

1.3 细胞培养

CNE-2细胞培养于含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基中,37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱孵育,显微镜下观察细胞生长情况。当细胞生长汇合至80%~90%时,弃掉培养液,PBS冲洗两次,用0.25%胰酶(含0.02%的EDTA)消化5 min,镜下观察胞质回缩、细胞间隙增大后,立即加入培养液终止消化,吸管反复吹打成单细胞悬液,分瓶传代培养,2~3 d传代1次,取对数生长期细胞用于实验。

2 方法和结果

2.1 CCK-8法检测白杨素对鼻咽癌CNE-2细胞生长的抑制作用

将对数生长期CNE-2细胞,接种于96孔板中,每孔接种 2×10^4 个细胞,待细胞长到60%~70%汇合时,更换培养基。实验分组为0.1% DMSO溶剂对照组、药物组,顺铂阳性对照组,每组5个复孔。药物作用时间24,48,72 h后吸出孔内的液体,每孔加入新鲜的培养基100 μL及CCK-8液体10 μL,置37℃、5%CO₂培养箱内培养,在酶标仪上检测各组细胞不同时间段吸收度(A),检测

波长为450 nm,参照波长650 nm。

结果表明,药物组与DMSO溶剂对照组比较,差异均具有统计学意义($P < 0.01$);随着白杨素浓度的升高,对CNE-2细胞的增殖抑制作用也随之增强,具有明显的剂量依赖性和时间依赖性。结果见表1。

2.2 Hoechst 33258染色检测白杨素对CNE-2细胞形态变化的影响

消化对数生长期的CNE-2细胞,接种入6孔板,每孔约 8×10^4 个细胞,6孔板内每孔放置盖玻片一片。试验分为0.1% DMSO溶剂对照组、顺铂阳性对照组,药物(白杨素125 μmol/L)组;待细胞生长汇合至50%~60%时,各组分别更换新配制的含0.1% DMSO,顺铂8 μmol/L,白杨素125 μmol/L的培养基,药物分别作用24,48,72 h后,弃含药培养基。每孔加入固定液500 μL固定10 min,弃掉固定液,用PBS冲洗(3 min×2)。每孔加Hoechst 33258染色液500 μL,染色5 min,弃掉染色液,用PBS冲洗(3 min×2)。滴抗荧光淬灭液至载玻片上,将盖玻片盖至载玻片上。

Table 1 Effect of chrysin on CNE-2 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Group	c/ (μmol/L)	Absorbance (A)		
		24	48	72 h
Control	0	2.35 ± 0.14	2.61 ± 0.09	2.84 ± 0.10
Chrysin	25	2.09 ± 0.07 **	2.22 ± 0.04 **	2.30 ± 0.04 **
	50	2.01 ± 0.08 **	1.94 ± 0.05 **	2.03 ± 0.05 **
	75	1.83 ± 0.11 **	1.80 ± 0.05 **	1.87 ± 0.05 **
	100	1.74 ± 0.03 **	1.71 ± 0.05 **	1.73 ± 0.06 **
	125	1.59 ± 0.06 **	1.56 ± 0.03 **	1.52 ± 0.03 **
cis-Platinum	8	1.36 ± 0.06 **	1.30 ± 0.04 **	1.11 ± 0.07 **

** $P < 0.01$ vs control group

荧光显微镜下,0.1% DMSO溶剂对照组细胞的染色质密度均匀一致,呈弥散均匀的荧光;白杨素处理组细胞,均出现与顺铂处理组(阳性对照)细胞相似的凋亡表现:荧光增强,胞核缩小碎裂,呈大小不等的不规则块状、圆形或花瓣状的细胞碎片。且随着药物作用时间的延长,凋亡的细胞数目也增多。结果见图1。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

细胞经药物分别作用24,48,72 h后,弃掉含药物的培养基,用不含EDTA的胰酶消化细胞,离心(1 000 r/min,5 min)后弃掉胰酶。用PBS洗涤细胞2次(2 000 r/min,5 min),收集并调整细胞浓度为每毫升 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞,加入结合缓

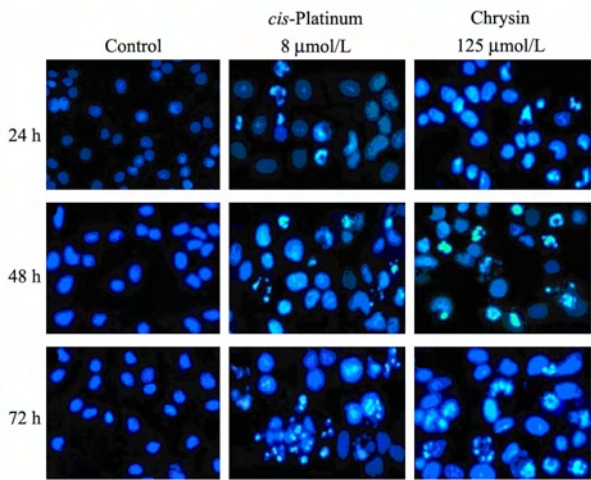


Figure 1 Cell morphological changes of CNE-2 cell after treatment with chrysin

冲液 500 μL 悬浮细胞,加入 Annexin V-FITC 5 μL 混匀后,加入碘化丙啶 (PI) 5 μL 混匀。PI 单染组只加 PI 5 μL 混匀,Annexin V-FITC 单染组只加 Annexin V-FITC 5 μL 混匀,阴性对照组不加任何染液。室温避光反应 5 ~ 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

结果(图 2)显示,白杨素以及阳性对照组各时间的细胞凋亡率均高于 0.1% DMSO 溶剂对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

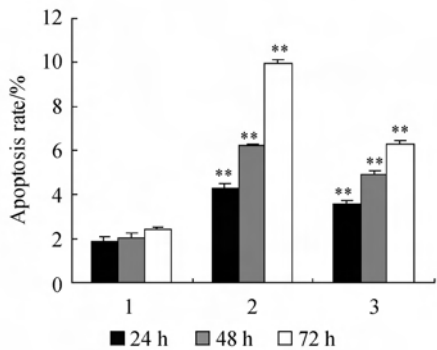


Figure 2 Effect of chrysin on CNE-2 cell apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
1:Control;2:cis-Platinum (8 $\mu\text{mol/L}$);3:Chrysin(125 $\mu\text{mol/L}$)
** $P < 0.01$ vs control group

2.4 流式细胞仪检测白杨素对 CNE-2 细胞周期的影响

细胞经药物作用 48 h 后,弃掉含药物的培养基,消化细胞,用 PBS 洗涤细胞、收集并调整细胞浓度为每毫升 1×10^6 个,取单细胞悬液 1 mL,离心去除上清液,在细胞中加入体积分数为 70% 的冷乙醇 500 μL 固定(2 h 至过夜均可),用 PBS 洗

涤取出固定液。加入 RNaseA 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,再加入 PI 400 μL 染色混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min,流式细胞仪检测。

结果(表 2)显示,CNE-2 细胞经 125 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素及 8 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂作用 48 h 后, G_0/G_1 期细胞明显增多,S 期明显减少,与 0.1% DMSO 溶剂对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

Table 2 Effect of cell cycle of chrysin on CNE-2 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Cell growth period	
	G_0/G_1	S
Control	50.22 \pm 1.40	47.83 \pm 1.44
cis-Platinum	63.81 \pm 1.57 **	32.13 \pm 1.28 **
Chrysin	62.93 \pm 1.41 **	31.14 \pm 1.46 **

** $P < 0.01$ vs control group

2.5 Caspase-3 活性试剂盒检测白杨素对 CNE-2 细胞 caspase-3 活性的影响

细胞经药物作用 48 h 后,用 PBS 洗涤细胞两次,离心(2 000 r/min,5 min)后,收集 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞。在收集的沉淀细胞中加入冰冷裂解缓冲液 50 μL (每毫升冷裂解缓冲液中加入 100 mmol/L PMSF 5 μL 和 DTT 10 μL),吹打混匀;置冰上裂解 20 ~ 60 min,其间涡旋振荡 3 ~ 4 次,或冻融 2 ~ 3 次。4 $^{\circ}\text{C}$,离心 10 000 r/min,1 min。小心吸取上清液(含裂解的蛋白质)转移至新的管中,并放置冰上待用,取少量上清液(约 1 ~ 2 μL),BCA 法测定其中的蛋白浓度。吸取含 100 ~ 200 μg 蛋白的细胞裂解上清液 50 μL (体积不足 50 μL 用裂解缓冲液补足至总体积 50 μL),加入 2 \times 反应缓冲液 50 μL (每 50 μL 中加入 DTT 0.5 μL);加入 caspase-3 底物 5 μL 并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 h。用酶标仪在 405 nm 测定其吸收度。

结果(图 3)显示,白杨素和阳性对照顺铂作用于 CNE-2 细胞 48 h 后,caspase-3 活性明显增加,与 0.1% DMSO 溶剂对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

肿瘤的发生是由于细胞增殖与细胞凋亡平衡失调的结果,细胞凋亡在肿瘤生长过程中起负调控作用,诱导肿瘤细胞凋亡可以阻碍肿瘤迅速增长^[5]。多数抗肿瘤治疗,包括化疗、放疗、免疫疗法或细胞因子疗法主要通过诱导肿瘤细胞凋亡起作用^[6-7]。

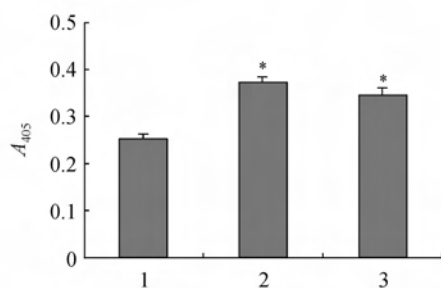


Figure 3 Effect of caspase-3 activity of chrysin on CNE-2 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

1: Control; 2: cis-Platinum (8 $\mu\text{mol/L}$); 3: Chrysin (125 $\mu\text{mol/L}$)

* $P < 0.05$ vs control group

Caspases 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, caspase-3 为关键的执行分子, 与 DNA 断裂、染色质凝聚和凋亡小体的形成等有关。caspases-3 在正常状态下以酶原的形式存在于胞浆中, 没有活性; 在细胞发生凋亡阶段, 它被激活, 活化的 caspases-3 裂解相应的胞浆胞核底物, 最终导致细胞凋亡。

本实验结果显示, 白杨素可诱导鼻咽癌 CNE-2 细胞凋亡, 阻滞细胞于 G_0/G_1 期, 明显升高 CNE-2 细胞 caspase-3 活性; 提示白杨素对鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖的抑制作用可能与升高细胞 caspase-3 的活性、诱导细胞凋亡有关。最近报道, 白杨素对结肠癌、肝癌、胃癌、白血病、黑色素瘤细胞系抑制作用亦与其诱导细胞凋亡有关^[8-9]。然而药物抗肿瘤机制较复杂。本研究首次报道了白杨素抗鼻咽癌作用, 该结果将有待体内试验的验证, 其机制

还需进一步探讨。

参考文献

- [1] Samarghandian S, Afshari JT, Davoodi S. Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3 [J]. *Clinics*, 2011, **66**(6): 1 073 - 1 079.
- [2] Woo KJ, Jeong YJ, Park JW, et al. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **325**(4): 1 215 - 1 222.
- [3] Cao JY, Liu L, Chen SP, et al. Prognostic significance and therapeutic implications of centromere protein F expression in human nasopharyngeal carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2010, **9**(9): 237 - 249.
- [4] Farias TP, Dias FL, Lima RA, et al. Prognostic factors and outcome for nasopharyngeal carcinoma [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003, **129**(7): 794 - 799.
- [5] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, **267**(5 203): 1 456 - 1 462.
- [6] Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2000, **21**: 485 - 495.
- [7] Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy [J]. *Cell*, 2002, **108**(2): 153 - 164.
- [8] Khoo BY, Chua SL, Balaram P. Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, **11**(5): 2 188 - 2 199.
- [9] Li X, Huang Q, Ong CN, et al. Chrysin sensitizes tumor necrosis factor alpha induced apoptosis in human tumor cells via suppression of nuclear factor-kappaB [J]. *Cancer Lett*, 2010, **293**(1): 109 - 116.

· 本刊讯 ·

《中国药科大学学报》被评为 2013 ~ 2014 年 RCCSE 中国权威学术期刊

《中国药科大学学报》被评为 2013 ~ 2014 年 RCCSE 中国权威学术期刊在中国学术期刊评价委员会、武汉大学中国科学评价研究中心联合发布的第三届《中国学术期刊评价研究报告——RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》(2013-2014)中,《中国药科大学学报》入选“RCCSE 中国权威学术期刊”(评分 A+)。本次评选全国药学科共 4 家期刊入选(Top5%),《中国药科大学学报》是其中之一,进一步彰显了《中国药科大学学报》的学术权威性。

(本刊编辑部)