

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.09.007

文章编号: 1005-8982 (2018) 09-0040-05

白藜芦醇阻断信号通路对鼻咽癌细胞生长的影响

熊赅¹, 易阳艳²

(1. 江西省南昌市第一医院 耳鼻喉科, 江西 南昌 330000; 2. 南昌大学
第二附属医院 整形美容科, 江西 南昌 330000)

摘要: **目的** 通过体内和体外研究探讨白藜芦醇在人核孔复合物细胞 (NPC) 中的抗癌活性。**方法** 用 MTT 实验检测白藜芦醇对 CNE-1 细胞和 CNE-2Z 细胞 (两种具有不同分化程度的 NPC 细胞株) 生长增殖的影响。用流式细胞仪检测白藜芦醇诱导 NPC 细胞凋亡情况和 NPC 细胞周期分布变化。Western blot 检测涉及细胞凋亡调控的数个重要基因和与细胞周期调控有关的数种 Cyclins 的蛋白表达水平。在裸鼠体内进行 CNE-2Z 细胞移植瘤实验。**结果** 用白藜芦醇处理 NPC 细胞后, 白藜芦醇不仅以时间和剂量依赖的方式降低 NPC 细胞的增殖能力, 还可以剂量依赖的方式诱导 NPC 细胞的凋亡。流式细胞仪分析结果表明, 白藜芦醇处理可将 NPC 细胞生长阻滞于 S⁻ 期和 G₂/M⁻ 期。白藜芦醇处理可下调 Bcl-2 和低氧诱导因子 1 (HIF-1) 蛋白的表达, 上调 Caspase-3 蛋白表达。此外, 白藜芦醇处理不仅可以降低蛋白激酶 B (Akt)、p70 核糖体 S6 蛋白激酶 (p70S6K) 和真核翻译起始因子 4E- 结合蛋白 1 (4E-BP-1) 的磷酸化水平, 也可降低参与细胞周期调控的数个细胞周期蛋白 (Cyclins) 的表达水平。白藜芦醇可抑制裸鼠体内 NPC 移植瘤的生长, 进一步确认白藜芦醇对 NPC 生长的治疗效果。**结论** 在人 NPC 细胞株中, 白藜芦醇可能是通过干扰 Akt/p70S6K 信号通路而发挥有效的抗增殖和促凋亡作用。

关键词: 白藜芦醇; 鼻咽癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R979.19

文献标识码: A

Effect of Resveratrol on blocking growth of nasopharyngeal carcinoma cells

Cheng Xiong¹, Yang-yan Yi²

(1. Department of Otorhinolaryngology, Nanchang First Hospital, Nanchang, Jiangxi 330000, China;
2. Department of Plastic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University,
Nanchang, Jiangxi 330000, China)

Abstract: Objective To explore anticancer activity of Resveratrol in human nuclear pore complex cells (NPC). **Methods** MTT test was utilized to measure cellular growth of CNE-1 and CNE-2Z. Flow cytometry was performed to examine apoptosis and cell cycle status. Expression of several apoptosis associated proteins and cyclins was measured by Western blot. CNE-2Z xenografts on nude mice were performed to further validate anticancer capability of Resveratrol *in vivo*. **Results** Cell proliferation of NPC cells was inhibited by Resveratrol in time-dependent and dose-dependent manners, while apoptosis was significantly induced after being exposed to Resveratrol in dose-dependent manner. Flow cytometry results showed that Resveratrol arrested NPC cells at the S-phases and G₂/M phases. Expression of Bcl-2 and hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1 α) were downregulated while caspase-3 as well as several cyclins involved in cell cycle regulation were upregulated with treatment of Resveratrol. Moreover, Resveratrol significantly decreased the phosphorylation levels of Akt, p70S6K and eukaryotic translation initiation

收稿日期: 2017-01-11

factor 4E-binding protein-1 (4E-BP-1). *In vivo* study showed that Resveratrol dramatically inhibited the growth of NPC tumor xenografts. **Conclusions** Collectively, our findings suggest that Resveratrol exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects on human NPC cells through interfering with the Akt/p70S6K signaling pathways.

Keywords: Resveratrol; nasopharyngeal carcinoma (NPC); proliferation; apoptosis

核孔复合物细胞 (human nuclear pore complex cells, NPC) 是一种恶性上皮性肿瘤, 具有独特的种族和地域分布特性^[1]。东南亚、中国南部地区、中东和北非为 NPC 的高发区, 年发病率 20.0 ~ 50.0 例/100 000 人; 在欧洲和美国, NPC 的年发病率大约为 0.5 ~ 2.0 例/100 000 人, 男性的发病率高于女性。全世界每年有大约 80 000 例新确诊的 NPC 患者, 大约 50 000 例患者因其死亡^[2]。白藜芦醇所具有的多种生理特性对人体有益, 而且白藜芦醇对某些类型的肿瘤细胞具有抗肿瘤作用, 但是白藜芦醇对 NPC 生长的影响及其相关的分子机制仍不太明了^[3]。探讨天然产物中的有效成分——白藜芦醇在 NPC 中的作用, 不仅有助于了解白藜芦醇在预防恶性肿瘤中的作用, 而且还可用于治疗 NPC。

1 材料与方法

1.1 细胞株

高分化的人 NPC 细胞株 CNE-1 (湖北民族学院附属民大医院保存); 低分化的人 NPC 细胞株 CNE-2Z (湖北民族学院附属民大医院保存)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 CNE-1 和 CNE-2 细胞株保存在 5% 二氧化碳 CO₂, 37℃ 条件下, 用含 10% 小牛血清、100 u/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液传代培养, 实验用细胞均处于对数生长期。在细胞培养过程中分别用 0、10、25、50、100 及 200 μmol/L 的白藜芦醇磷酸盐缓冲液处理 CNE-1 细胞和 CNE-2 细胞, 分别于 24 和 48 h 收集细胞。

1.2.2 细胞增殖抑制实验 (MTT 实验) 取上述培养的对数生长期细胞按每孔 5×10^3 于 180 μl 培养液中接种于 96 孔板过夜, 加入不同浓度的白藜芦醇, 每组设 8 个平行孔。用药后分别培养 24、48 及 72 h, 每孔加入 20 μl 噻唑蓝 (MTT) (5 mg/ml), 继续培养 4 h。移去培养液, 每孔加 100 μl DMSO 溶解, 待完全溶解后于酶标免疫测定仪测定其吸光度 (A) 值, 测定波长为 570 nm, 参考波长为 450 nm。重复 3 次。计算细胞增殖抑制率及 IC₅₀ 值, 绘制浓度 - 抑制率曲线。

1.2.3 流式细胞仪检测 用流式细胞仪检测白藜芦醇

诱导 NPC 细胞凋亡情况和 NPC 细胞周期分布变化。分别收集对照以及各种浓度白藜芦醇处理 24 h 的细胞, 加预冷 70% 乙醇固定过夜。次日完全去除乙醇后, 将细胞重悬于 40 μl 磷酸 - 枸橼酸缓冲液中, 用 50 μg/ml PI (含 100 μg/ml RNaseA, 无 DNase) 0.5 ml, 4℃ 避光染色 30 min, 于流式细胞仪检测凋亡率。每组均设 3 个复管, 并重复 3 次。

1.2.4 白藜芦醇对人 NPC 细胞生长的影响 为了进一步验证白藜芦醇对 NPC 的抗肿瘤作用, 在裸鼠体内做 CN2Z 细胞异体移植瘤实验, 并检测对照组 (10% DMSO 处理组) 和白藜芦醇 (20 mg/kg, 注射 1 次) 处理组裸鼠体内的异种移植瘤体积大小。

用递增浓度 (0、10、25、50 及 100 μmol/L) 的白藜芦醇作用 CNE-2Z 细胞 24 h 后, 再用 Western blot 技术检测与细胞周期调控有关的数种 cyclins (cyclin A、B、D 及 E 和 CDK/p34 蛋白) 的蛋白表达水平。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 预先行方差齐性检验, 如方差齐时采用 LSD-*t* 检验, 如方差不齐时采用 Tamhane's T2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对人 NPC 细胞凋亡、增殖的影响

以 0 μmol/L 白藜芦醇组为阴性对照, 浓度为 200 μmol/L 白藜芦醇组为阳性对照组。实验结果显示, CNE-1 细胞增殖中不同浓度白藜芦醇比较差异有统计学意义 ($F = 13.872, P = 0.000$), 与阴性对照比较, 当白藜芦醇浓度为 50、100 及 200 μmol/L 时, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CNE-2Z 细胞增殖中不同浓度白藜芦醇相比较差异有统计学意义 ($F = 23.547, P = 0.000$), 当白藜芦醇浓度为 25、50、100 及 200 μmol/L 时, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。当用白藜芦醇处理 24 或 48 h 后, 两种具有不同分化程度 NPC 细胞株的增殖能力均具有随着白藜芦醇浓度的增加而降低的趋势。用相同浓度的白藜芦醇处理两种具有不同分化程度的 NPC 细胞, 随着白藜芦醇作用时间

的延长 (从 24~48 h), 对 NPC 细胞增殖的抑制作用均越加明显 (见图 1)。

与同型对照组及空白对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组) 比较, 随着白藜芦醇剂量的增加, 白藜芦醇处理组 CNE-2Z 细胞的 Annexin V-FITC 单阳性百分率也随之增高 (见图 2)。各组间比较差异有统计学意义 ($F=21.092, P=0.000$)。其中 0 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组中 Annexin V-FITC 单阳性 CNE-2Z 细胞的百分率为 (0.2 \pm 0.1) % ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组中 Annexin V-FITC 单阳性 CNE-2Z 细胞的百分率为 (6.4 \pm 0.3) % ; 25 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组中 Annexin V-FITC 单阳性 CNE-2Z 细胞的百分率为 (11.3 \pm 0.9) % ; 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组中 Annexin V-FITC 单阳性 CNE-2Z 细胞的百分率为 (16.7 \pm 2.1) % ; 100 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组中 Annexin V-FITC 单阳性 CNE-2Z 细胞的百分率为 (41.3 \pm 5.6) %。同时也观察

0 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组中 PI 单阳性 CNE-2Z 细胞的百分率为 (0.5 \pm 0.1) % ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组中 PI 单阳性 CNE-2Z 细胞的百分率为 (3.4 \pm 0.2) % ; 25 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组中 PI 单阳性 CNE-2Z 细胞的百分率为 (4.3 \pm 0.5) % ; 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组中 PI 单阳性 CNE-2Z 细胞的百分率为 (4.7 \pm 0.9) % ; 100 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理组中 PI 单阳性 CNE-2Z 细胞的百分率为 (1.2 \pm 0.3) %。

2.2 白藜芦醇对人 NPC 细胞细胞周期的影响

3 组细胞周期比较差异有统计学意义 ($F=15.936, P=0.000$), 且 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与对照组比较, 用 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理后, CNE-1 细胞组的细胞周期分布未显示变化; 然而用 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理后, CNE-1 细胞组 G₁ 期细胞的百分率有降低, 从 (72.5 \pm 9.4) % 降到 (39.1 \pm 8.6) % ($P<0.01$), S 期

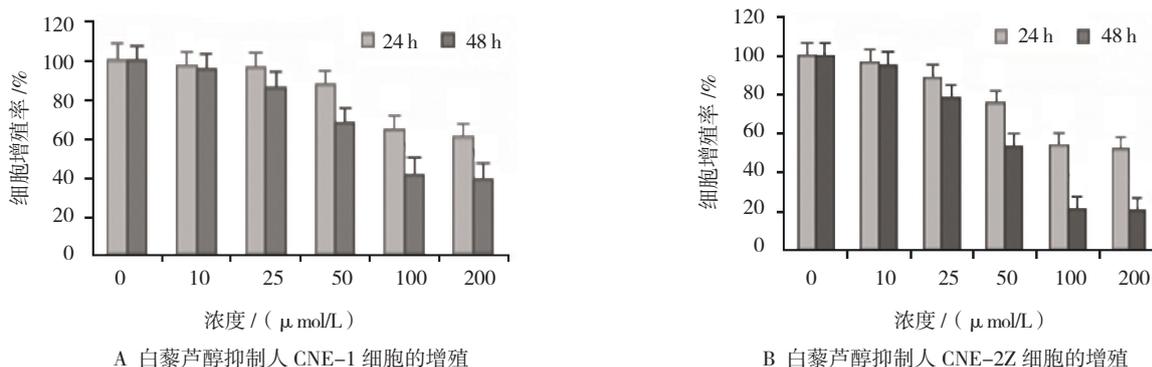


图 1 白藜芦醇抑制 NPC 细胞的增殖

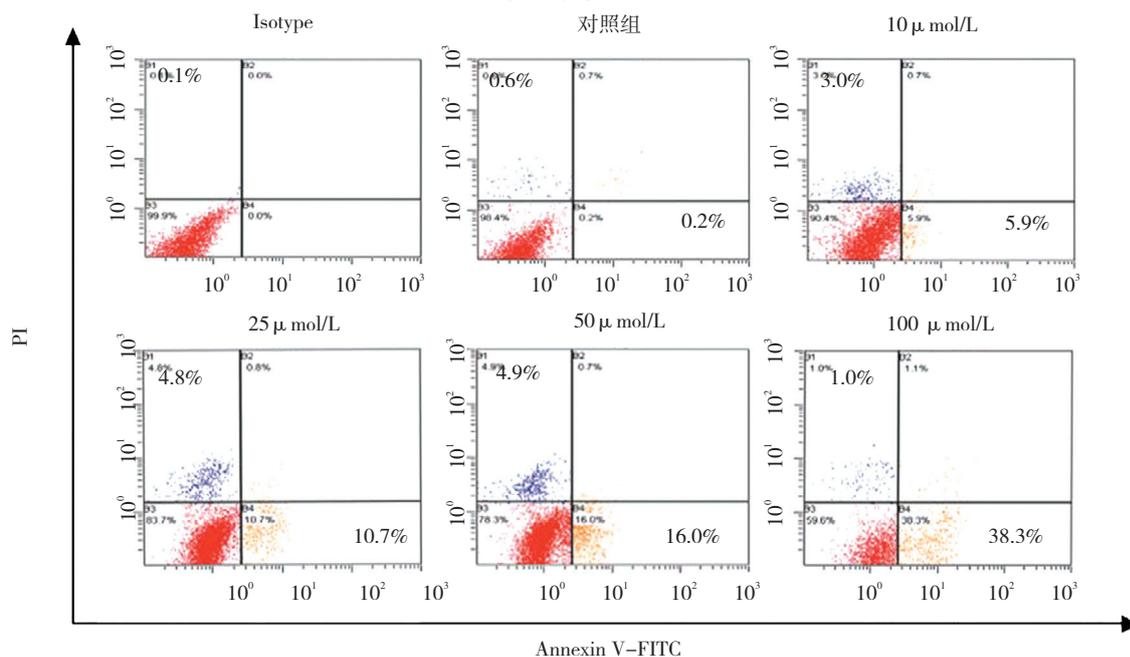


图 2 流式细胞仪分析的代表性直方图

细胞的百分率有升高,从(10.1 ± 3.3)% 升高到(39.8 ± 7.2)%, ($P < 0.01$), 但G₂/M期细胞的百分率无改变。见图3。

研究发现,不同浓度的白藜芦醇均能抑制CNE-2Z细胞中的Cyclin A、B、D、E以及CDK/p34蛋白的表达水平,白藜芦醇对其抑制能力具有较强的浓度依赖性。与对照组比较,50和100 μmol/L白藜芦醇处理可抑制该蛋白的表达。见图4。

2.3 白藜芦醇对人NPC细胞生长的影响

在使用白藜芦醇处理的第12和15天,白藜芦醇处理组裸鼠体内的异种移植瘤体积与对照组比较,有减小,异种移植瘤大小分别从(570.9 ± 43.6) mm³ 降到(326.3 ± 41.6)mm³,从(682.5 ± 38.4)mm³ 降到(418.6 ± 53.1) mm³,各組间比较差异有统计学意义($F = 32.964$, $P = 0.000$)。随着白藜芦醇处理时间的延长,白藜芦醇

对裸鼠体内异种移植瘤体积大小的抑制作用愈加明显,通过与对照组比较,发现在白藜芦醇处理的第18和21天,异种移植瘤大小持续降低,异种移植瘤体积分别从(785.9 ± 59.2) mm³ 降到(443.5 ± 58.9) mm³,从(824.4 ± 59.5) mm³ 降到(496.6 ± 62.4) mm³,各組间比较差异有统计学意义($F = 41.218$, $P = 0.000$)。该数据表明,白藜芦醇可降低裸鼠体内异种移植瘤体积的大小,且白藜芦醇对裸鼠体内异种移植瘤体积大小的影响具有时间依赖性。见图5、6。

裸鼠体内取出的异种移植瘤的分析。HE染色结果显示,在对照组的切片中,可以看到较多的细胞成分,且细胞核较大、细胞大小较不均一、细胞排列比较紊乱。与对照组相比较,白藜芦醇治疗后的肿瘤组织内细胞成分减少,而具有更多的胶原结构,细胞大小比较均一且细胞排列比较整齐有序。见图7。

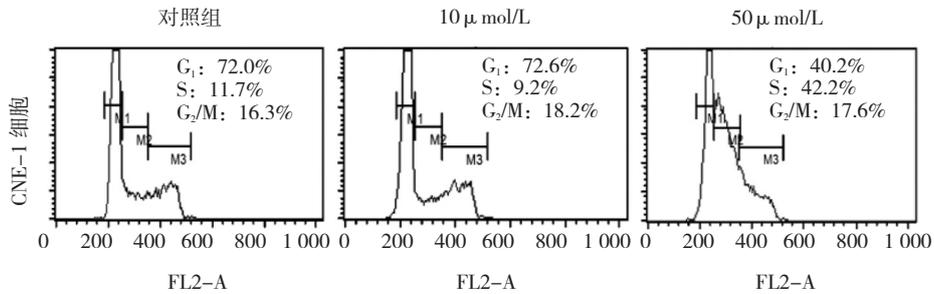
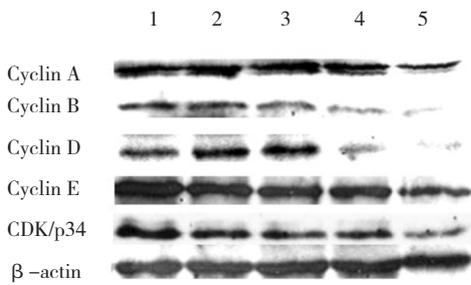


图3 白藜芦醇对人CNE-1细胞的细胞周期进程的影响



1: 对照组; 2: 10 μmol/L; 3: 25 μmol/L; 4: 50 μmol/L; 5: 100 μmol/L

图4 白藜芦醇对CNE-2Z细胞中与细胞周期进程相关基因的蛋白表达水平的影响

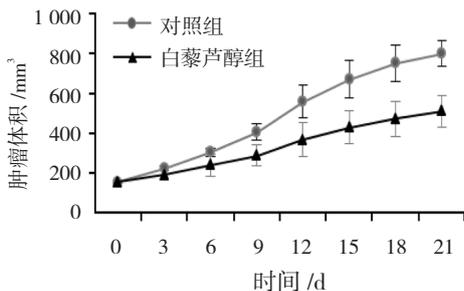


图6 白藜芦醇对裸鼠中NPC移植瘤的影响



图5 白藜芦处理3周后,肿瘤生长具有代表性的图片

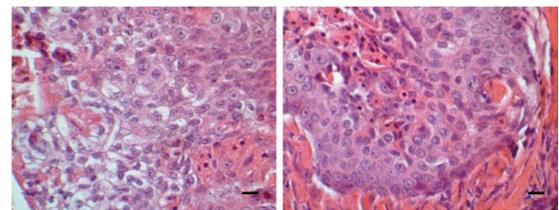


图7 裸鼠体内异体移植瘤切片 (HE × 400)

3 讨论

白藜芦醇是存在于多种食用、药用植物中的一种多酚类化合物,近年发现白藜芦醇有抗癌活性,对

癌的起始、促进和发展 3 个阶段均起作用^[4]。在对其抗癌机制的研究中发现,白藜芦醇可通过诱导肿瘤细胞凋亡来抑制其增殖,从而达到抗癌目的,目前对白藜芦醇的抗癌作用研究也有大量的报道^[5]。高倩等^[6]发现,白藜芦醇可剂量和时间依赖性地抑制肝细胞瘤细胞株 H22 生长增殖,其 IC₅₀ 值为 6.75 mg/L,用普通显微镜和电子显微镜观察均发现药物处理组出现典型凋亡小体,因而白藜芦醇可经凋亡途径抑制 H22 细胞生长增殖。WITTE 等用白藜芦醇处理人前列腺癌细胞株 DU145 通过核小体含量检测证实有凋亡发生^[7]。

本研究中通过对白藜芦醇阻断信号通路对鼻咽癌细胞生长的影响,结果与文献报道基本一致,显示白藜芦醇对鼻咽癌细胞的生长有抑制作用^[8-9]。在对白藜芦醇对人 NPC 细胞凋亡、增殖影响的体外研究时,当用白藜芦醇处理 24 或 48 h 后,两种具有不同分化程度的 NPC 细胞株的增殖能力均具有随着白藜芦醇浓度的增加而降低。用相同浓度的白藜芦醇处理两种具有不同分化程度的 NPC 细胞后,随着白藜芦醇作用时间的延长(从 24~48 h),其对两种 NPC 细胞增殖的抑制作用越加明显^[10-11]。在白藜芦醇对人 NPC 细胞细胞周期影响的体外研究中显示,白藜芦醇对人 NPC 细胞的细胞周期进程的影响,并揭示出可能通过下调各种 Cyclins 和 CDKs 的表达而影响 NPC 细胞周期进程^[12]。本研究还证实,白藜芦醇可降低裸鼠体内异种移植瘤体积的大小,且白藜芦醇对裸鼠体内异种移植瘤体积大小的影响具有时间依赖性^[13]。

综上所述:①白藜芦醇不仅以时间和剂量依赖的方式降低 NPC 细胞的增殖,还可的方式增加 NPC 细胞的凋亡;②体外研究结果表明,白藜芦醇可能是通过干扰 Akt/p70S6K 信号通路而发挥有效的抗增殖和促凋亡作用;③裸鼠 CNE-2Z 细胞异种移植瘤模型的研究结果表明,白藜芦醇可抑制 NPC 移植瘤的生长;④白藜芦醇有望成为防治人 NPC 的有效药物。

参 考 文 献:

[1] 雷军荣,涂献坤,张华斌,等.白藜芦醇通过激活 PI3K/Akt 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J].中国临床神经外科杂志,2016,21(7):425-428.

- [2] 孙龙和,夏建国,钱春华,等.白藜芦醇通过 Pi3K/AKT 通路抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖和迁移[J].现代生物医学进展,2016,16(17):3237-3240.
- [3] SOUSA H, BASTOS M J, RIBEIRO J, et al. 5'UTR+24T>C CR2 is not associated with nasopharyngeal carcinoma development in the North Region of Portugal[J]. Oral Diseases, 2016, 22(4): 280-284.
- [4] PENG X, ZHANG Q, ZENG Y, et al. Evodiamine inhibits the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells in vitro via repressing MMP-2 expression[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2015, 76(6): 1173-1184.
- [5] A M, MOHAMMED HADI S H, JEBOR M A. Molecular localization of Epstein-Barr virus and BCL-2 expression in tissues from patients infected with nasopharyngeal tumors[J]. Research Journal of Pharmaceutical Biological & Chemical Sciences, 2015, 6(5): 1050-1063.
- [6] 高倩,刘卫,唐郡.白藜芦醇抗肿瘤作用机制研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2016,30(9):845-847.
- [7] WITTE A V, KERTI L, MARGULIES D S, et al. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults[J]. Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience, 2014, 34(23): 7862-7870.
- [8] HAN G, XIA J, GAO J, et al. Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol[J]. Drug Discoveries & Therapeutics, 2015, 9(1): 1-12.
- [9] MOORE J, PICKERING G, GAUDETTE N, et al. Resveratrol-fortification of red wine does not provide greater inhibition of human lung cancer cell survival compared to non-fortified wine[J]. Experimental Cell Biology, 2015, 51(2): 77-82.
- [10] LARRUE C, SALAND E, VERGEZ F, et al. Antileukemic Activity of 2-Deoxy-d-Glucose through Inhibition of N-Linked Glycosylation in Acute Myeloid Leukemia with FLT3-ITD or c-KIT Mutations[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2015, 14(10): 365-371.
- [11] 吴长会,沈敏,李龙,等.PI3K/Akt/mTOR/p70S6K 信号通路在肝纤维化发生发展中的作用[J].临床肝胆病杂志,2015,31(11):1928-1932.
- [12] 杨甫文,伍娟英,黄慧芳,等.亚砷酸联合 LY294002 对人鼻咽癌 CNE 细胞的抑制作用[J].中国耳鼻咽喉头颈外科,2014,21(10):515-519.
- [13] WANG Y, BHUIYA M W, ZHOU R, et al. Pterostilbene production by microorganisms expressing resveratrol O-methyltransferase[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(2): 1-10.

(王荣兵 编辑)