

• 实验研究 •

鼻咽清毒颗粒通过调节铜离子转运蛋白 CTR1 逆转鼻咽癌细胞顺铂耐药的作用效应及机制研究

石子叶¹, 林娟², 杨冰^{3,4}, 徐科一², 张铁军^{3,4}, 李鹏^{2*}, 徐旭^{3,4*}

1. 天津中医药大学 研究生院, 天津 301617

2. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

3. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300301

4. 天津药物研究院 现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300301

摘要: 目的 观察鼻咽清毒颗粒逆转鼻咽癌细胞顺铂耐药的作用效应, 并探讨其作用机制。方法 采用 MTS 法检测系列质量浓度鼻咽清毒颗粒对人鼻咽癌 CNE-2、人鼻咽癌顺铂耐药 CNE2/DDP 细胞增殖的抑制作用; 计算鼻咽清毒颗粒对 CNE-2、CNE2/DDP 细胞的耐顺铂半数抑制浓度 (IC₅₀) 的影响; 流式细胞技术测定 CNE2/DDP 的细胞凋亡情况; 采用 Western blotting 法检测 CNE2/DDP 细胞中铜转运蛋白和抗凋亡蛋白的表达。结果 CNE2/DDP 细胞的顺铂耐药指数为 RI 值为 3.03; 与顺铂组比较, 鼻咽清毒颗粒 0.1、1、10 mg/mL 组分别与系列质量浓度的顺铂联用, 对 CNE-2 细胞顺铂 IC₅₀ 分别降低 12.19%、46.37%、63.81%; CNE2/DDP 细胞顺铂 IC₅₀ 分别降低 61.75%、70.42%、83.82%。流式细胞技术检测结果表明, 与顺铂组比, 顺铂+鼻咽清毒颗粒 0.1、1、10 mg/mL 组 CNE2/DDP 晚期凋亡或坏死细胞增加 ($P < 0.01$); Western blotting 法检测结果表明, 与顺铂组比较, 顺铂+鼻咽清毒颗粒 0.1、1、10 mg/mL 组铜特异性转运蛋白 (CTR1) 蛋白的表达均显著升高, B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、骨髓细胞白血病序列 1 (Mcl-1) 的表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 鼻咽清毒颗粒具有增强鼻咽癌细胞顺铂敏感性、逆转 CNE2/DDP 细胞顺铂耐药作用, 其作用机制可能与增加 CTR1 蛋白表达, 降低 Bcl-2、Mcl-1 蛋白表达有关。

关键词: 鼻咽清毒颗粒; 鼻咽癌; 顺铂; 耐药; 铜特异性转运蛋白; B 细胞淋巴瘤 2; 骨髓细胞白血病序列 1

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)08-1937-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.08.001

Effect and mechanism of Biyan Qingdu Granules on reversing cisplatin resistance in nasopharyngeal carcinoma cells by regulating copper ion transporter CTR1

SHI Ziyel, LIN Juan², YANG Bing^{3,4}, XU Keyi², ZHANG Tiejun^{3,4}, LI Peng², XU Xu^{3,4}

1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Guangzhou Baiyunshan Hutchison Whampoa Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

3. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

4. National and Local Joint Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology, Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To observe the effect of Biyan Qingdu Granules on reversing cisplatin resistance in nasopharyngeal carcinoma cells, and to explore its mechanism. **Methods** To detect the inhibitory effect of Biyan Qingdu Granules on the proliferation of CNE-2 and CNE2/DDP cells by MTS method. To calculate the effect of Biyan Qingdu Granules on cisplatin inhibiting IC₅₀ in CNE-2 and

收稿日期: 2024-05-13

基金项目: 广州市科技计划项目 (20212210006)

作者简介: 石子叶, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: 2873107923@qq.com

*通信作者: 李鹏, 男, 博士, 研究员。E-mail: 1554148518@qq.com

徐旭, 男, 硕士, 研究员。E-mail: xux@tipr.com.cn

CNE2/DDP cells. The apoptosis of CNE2/DDP cells was determined by flow cytometry. The expressions of copper transporter and anti-apoptotic protein in CNE2/DDP cells were detected by Western Blotting. **Results** The cisplatin resistance index of CNE2/DDP cells was 3.03. Compared with cisplatin, the IC₅₀ of cisplatin in CNE-2 cells of 0.1, 1 and 10 mg/mL of Biyan Qingdu Granules was decreased by 12.19%, 46.37% and 63.81%, respectively. Cisplatin IC₅₀ in CNE2/DDP cells decreased by 61.75%, 70.42% and 83.82%, respectively. The results of flow cytometry showed that compared with cisplatin group, CNE2/DDP in Biyan Qingdu Granules 0.1, 1, 10 mg/mL groups increased late apoptosis or necrosis cells ($P < 0.01$). Western Blotting test results showed that compared with cisplatin group, the expression of copper specific transport protein (CTR1) in cisplatin + Biyan Qingdu Granules 0.1, 1 and 10 mg/mL groups was significantly increased. The expressions of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and myeloid leukemia sequence 1 (Mcl-1) were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Biyan Qingdu Granules can enhance the cisplatin sensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells and reverse the cisplatin resistance of CNE2/DDP cells, and its mechanism may be related to increasing the expression of CTR1 protein and decreasing the expression of Bcl-2 and Mcl-1 protein.

Key words: Biyan Qingdu Granules; nasopharyngeal carcinoma; cisplatin; drug resistance; CTR1; Bcl-2; Mcl-1

鼻咽癌是一种起源于鼻咽部黏膜的恶性上皮细胞癌。全球每年约有 10 万例鼻咽癌确诊病例，其中大部分病例发生在我国，以及南亚、北非和北极地区^[1]。早期鼻咽癌以放疗为主，局部区域晚期的鼻咽癌患者多采用诱导化疗方案，通常选择以铂类为基础的联合化疗。尽管大多数鼻咽癌患者通常对化疗有较好的初始反应，但长期使用引起的化疗药物耐药的现象^[2-3]，对癌症化疗提出重大挑战，造成化疗失败，肿瘤转移，患者的总体生存率降低^[4-5]。

鼻咽清毒颗粒由野菊花、苍耳子、重楼、茅莓根、两面针、夏枯草、龙胆、党参 8 味中药组成。具有清热解毒、化痰散结的功效，用于痰热毒瘀蕴结所致的鼻咽部慢性炎症、鼻咽癌放射治疗后分泌物增多等。研究显示，鼻咽清毒颗粒含药血清可诱导鼻咽癌细胞凋亡，改变细胞周期分布，从而抑制细胞增殖，鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤的生长^[6-7]。研究还发现鼻咽清毒颗粒加用鼻渊舒口服液对鼻咽癌高危人群 EB 病毒 VCA/IgA 滴度水平有明显的抑制作用，有助于降低鼻咽癌的发病率^[8]。因此，本研究以人鼻咽癌细胞株 (CNE-2)、人鼻咽癌顺铂耐药细胞 (CNE2/DDP) 进一步观察鼻咽清毒颗粒逆转鼻咽癌顺铂耐药的作用效应，并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物和试剂

鼻咽清毒颗粒 (规格 20 g/袋，广州白云山和记黄埔中药有限公司，批号 C22A004)。顺铂注射液 (齐鲁制药有限公司，规格 50 mL : 50 mg，批号 1E0166B02)。

DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司，货号 8122678)；胎牛血清 (FBS，美国 Gibco 公司，货号 2366517CP)；细胞增殖检测试剂盒 (MTS，美国

Promega 公司，货号 0000536377)；Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司，货号 120722230421)；BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司，货号 20210922)；Western 快速转膜液 (北京索莱宝科技有限公司，货号 110222230628)；SDS-PAGE 快速电泳液 (上海碧云天生物技术有限公司，货号 120622230526)；B 细胞淋巴瘤 2 蛋白 (Bcl-2) 单克隆抗体 (Immunoway 公司，货号 B4101)；骨髓细胞白血病序列 1 蛋白 (Mcl-1) 抗体 (Abcam 公司，货号 1002679-9)；铜死亡相关基因 (SLC31A1) /铜特异性转运蛋白 (CTR1) 抗体 (Abcam 公司，货号 1007813-10)。

1.2 细胞株

CNE-2、CNE2/DDP 均由上海奥陆生物科技有限公司提供，置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱内培养。

1.3 仪器

WYS-41XDY 生物显微镜 (天津微仪光学仪器公司)，HFsafe-1200LC 超净工作台 (Heal Force 公司)，1300 series A2 生物安全柜 1379 [赛默飞世尔 (苏州) 仪器有限公司]，SN510C 立式压力蒸汽灭菌器 (重庆雅马拓科技公司)，CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific 公司)，M5 多功能酶标仪 (德国 Berthold 公司)，Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机 [赛默飞世尔科技 (中国) 公司]，FACSCelesta 流式细胞仪 (美国 BD 公司)，PowerPac Basic 电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司)，Tanon-5200 多功能成像仪 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 药物的配制

称取 1 g 鼻咽清毒颗粒，采用 DMEM 完全培养

基溶解至 50 mg/mL, 用孔径 0.22 μm 滤膜过滤后进行后续实验, 使用时按比例稀释, 现用现配。顺铂注射液采用 DMEM 完全培养基溶解, 并用孔径 0.22 μm 滤膜过滤后进行后续实验, 使用时现用现配。

2.2 CNE-2、CNE2/DDP 细胞准备

2.2.1 CNE-2、CNE2/DDP 细胞培养 CNE-2、CNE2/DDP 细胞从液氮中取出并迅速放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中, 待完全融化后, 吸出细胞冻存液, 移至含有 10 mL 含 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素高糖 DMEM 培养基的 15 mL 离心管中。室温 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入适量完全培养基重悬细胞。CNE-2 细胞贴壁生长, 隔天更换培养基, 当细胞达 90% 汇合时, 用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶消化, 按 1:3 传代, 继续培养。CNE2/DDP 细胞复苏后采用含梯度顺铂培养基培养, 培养基中顺铂质量浓度依次递增至 0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、1.75、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最终培养在含 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂培养基中, 细胞按 1:2 传代。

2.2.2 CNE-2、CNE2/DDP 的耐药性检测 分别收集对数生长期的 CNE-2、CNE2/DDP 细胞, 待细胞融合至 80%~90%, 采用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入适量完全培养基重悬细胞, 制成单细胞悬液。以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 置于培养箱中, 培养 24 h, 弃培养液, 将细胞随机分为 9 个质量浓度顺铂组, 鉴于 CNE2/DDP 为顺铂耐药细胞, 各组分别加入较高质量浓度的顺铂, 终质量浓度分别为 0、20、30、40、50、60、70、80、90、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每组设 5 个平行复孔, 置于培养箱中培养 24 h 后, 弃培养液, 每孔加入 MTS 溶液 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 弃去孔内培养上清液。再加入二甲基亚砜 (DMSO) 150 μL 振荡混匀, 在 490 nm 波长处用酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值 (A), 计算细胞增殖抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50}), 根据细胞 IC_{50} 值计算细胞的耐药指数。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}$$

$$\text{耐药指数 (RI)} = \text{耐药细胞 } \text{IC}_{50} / \text{亲本细胞 } \text{IC}_{50}$$

2.3 鼻咽清毒颗粒剂量探索

取对数生长期的 CNE-2、CNE2/DDP 细胞, 按照 2.2.2 项下的方法制备单细胞悬液, 细胞密度按照 5×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板, 至细胞贴壁生长, 24 h 后弃培养液, 将细胞随机分为 10 个质量浓度的鼻咽清毒颗粒组, 向孔中分别加入质量浓度为

0 (对照)、5、10、15、20、25、30、35、40、50 mg/mL 的鼻咽清毒颗粒培养液 100 μL 。每组设 5 个平行复孔, 放入孵箱继续培养 24 h 后, 采用 MTS 法检测细胞存活率, 检测方法同 2.2.2 项下。

2.4 鼻咽清毒颗粒对顺铂抑制 CNE-2、CNE2/DDP 细胞 IC_{50} 的影响

按照 2.2.2 项下方法制备单细胞悬液, 取对数生长期的 CNE-2、CNE2/DDP 2 种细胞, 每种细胞分为 4 个组, 即顺铂 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组及鼻咽清毒颗粒 0.1、1、10 mg/mL 组。鼻咽清毒颗粒各剂量组在给予鼻咽清毒颗粒的基础上, 每个剂量组再分为 10 个小组, 给予终质量浓度为 0、10、20、30、40、50、60、70、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂。每组设 5 个平行复孔, 置于培养箱继续培养 24 h 后, 采用 MTS 法检测细胞存活率, 方法同 2.2.2 项下, 计算顺铂组及不同浓度鼻咽清毒颗粒对 2 种细胞耐顺铂 IC_{50} 的影响。

2.5 流式细胞仪检测 CNE2/DDP 细胞凋亡情况

取对数生长期的 CNE2/DDP 细胞, 按照 2.2.2 项下方法制备单细胞悬液, 以 6×10^4 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h, 至细胞贴壁生长后, 吸出培养液, 将细胞随机分为 5 个组, 对照组给予空白 HBSS, 单用顺铂组给予顺铂 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 鼻咽清毒颗粒组在顺铂处理组基础上分别给予鼻咽清毒颗粒 0.1、1、10 mg/mL。经药物处理后置于培养箱中孵育 24 h。离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 随后加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色液, 室温避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.6 Western blotting 法检测 CNE2/DDP 细胞 CTR1、Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白表达

取对数生长期的 CNE2/DDP 细胞, 按照 2.2.2 项下方法制备单细胞悬液, 加入含有药物的新鲜培养液。将细胞分为对照组, 鼻咽清毒颗粒 0.1、1.0、10 mg/mL 组, 顺铂 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组, 鼻咽清毒颗粒 (0.1、1.0、10 mg/mL) + 顺铂 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组。经药物处理后置于培养箱中孵育 24 h, 采用刮板法提蛋白, 放入冰上裂解 40 min, 12 000 r/min 离心分离 10 min, 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热, 加入上样缓冲液得到蛋白上样液。进行蛋白上样, 依次进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭后分别加入一抗 CTR1、Bcl-2、Mcl-1, 内参为 β -tubulin, 用一抗稀释液将抗体按规定比例稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, 用 TBST 洗涤, 加入相应的二抗 (1:3 000) 孵育, ECL 发光显影。并利用 Image J 分析软件对蛋白条

带的灰度值进行测量,计算目的蛋白的相对表达量。

2.7 数据处理及分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计分析,多组间差异性比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 CNE-2 和 CNE2/DDP 的耐药性测定

如图 1 所示,顺铂可浓度相关性抑制 CNE-2 和 CNE2/DDP 的增殖。顺铂抑制 CNE-2 细胞增殖的 IC_{50} 值为 $79.971 \mu\text{g/mL}$,抑制 CNE2/DDP 细胞增殖的 IC_{50} 值为 $241.994 \mu\text{g/mL}$ 。通过二者的 IC_{50} 值计算,CNE2/DDP 的耐药指数 (RI) 值为 3.03,说明 CNE2/DDP 细胞具有顺铂耐药特性。

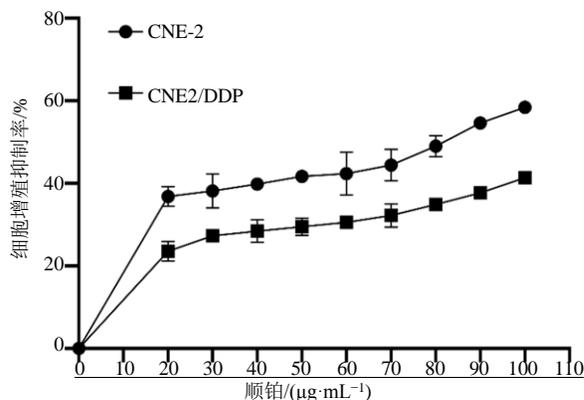


图 1 顺铂对 CNE-2、CNE-2/DDP 细胞增殖抑制率的影响作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

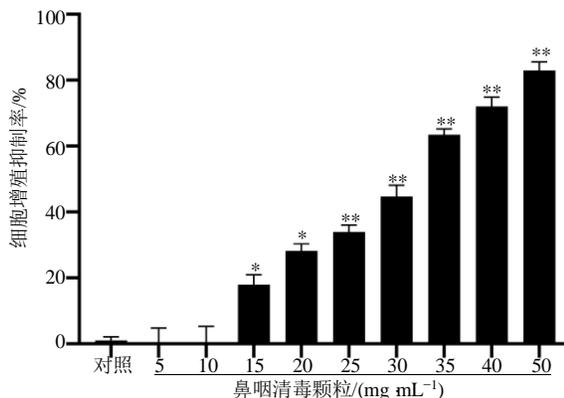
Fig. 1 Effect of cisplatin on proliferation inhibition rate of CNE-2 and CNE-2/DDP cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 鼻咽清毒颗粒不同剂量对 CNE-2 和 CNE2/DDP 增殖的影响

如图 2 所示,鼻咽清毒颗粒单独作用 CNE-2 细胞,当药物质量浓度高于 10 mg/mL 时,与对照组比较,细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$),且呈浓度相关性;当药物质量浓度在 $0 \sim 10 \text{ mg/mL}$ 时,细胞存活率无显著差异。如图 3 所示,鼻咽清毒颗粒单独作用 CNE2/DDP 细胞,当药物浓度高于 10 mg/mL 时,与对照组比较,细胞存活率均显著降低 ($P < 0.01$),且呈浓度相关性;当药物质量浓度在 $0 \sim 10 \text{ mg/mL}$ 时,细胞存活率无显著差异。故后续实验选择鼻咽清毒颗粒 $0.1、1、10 \text{ mg/mL}$ 的质量浓度作为药物干预浓度,探讨其是否会增强顺铂的抗肿瘤作用,起到协同增效作用。

3.3 鼻咽清毒颗粒与顺铂联用对 CNE-2、CNE2/DDP 细胞增殖的影响

单用顺铂、鼻咽清毒颗粒联用顺铂在 CNE2、

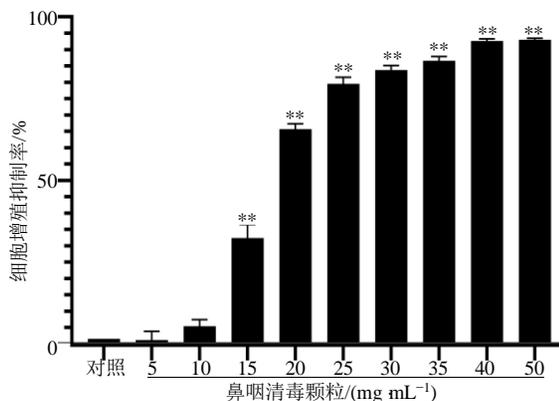


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 2 鼻咽清毒颗粒对 CNE-2 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of Biyan Qingdu Granules on proliferation inhibition rate of CNE-2 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图 3 鼻咽清毒颗粒对 CNE2/DDP 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of Biyan Qingdu Granules on proliferation inhibition rate of CNE2/DDP ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

CNE2/DDP 2 种细胞中的顺铂 IC_{50} 见表 1。CNE2、CNE2/DDP 细胞实验显示,与单用顺铂比较,鼻咽清毒颗粒 $0.1、1.0、10 \text{ mg/mL}$ 组分别与系列质量浓度顺铂联用后顺铂 IC_{50} 明显降低,说明鼻咽清毒颗粒能增强顺铂对 CNE-2、CNE2/DDP 细胞的增殖抑制作用。比较 2 种细胞实验结果,发现 CNE-2/DDP 细胞中顺铂 IC_{50} 降低率远大于 CNE-2 细胞中顺铂 IC_{50} ,提示 CNE-2/DDP 细胞对鼻咽清毒颗粒与顺铂联用更敏感。

3.4 流式细胞技术检测 CNE2/DDP 细胞凋亡

实验结果显示,与对照组比较,单用 $10 \mu\text{g/mL}$

表 1 鼻咽清毒颗粒与顺铂联用对 CNE-2、CNE2/DDP IC₅₀ 的影响 (n = 5)Table 1 Effects of Biyan Qingdu Granules combined with cisplatin on CNE-2 and CNE2/DDP IC₅₀ (n = 5)

药物	质量浓度/(mg mL ⁻¹)	CNE2		CNE2/DDP	
		IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	降低率/%	IC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	降低率/%
顺铂	—	79.97	—	241.99	—
鼻咽清毒颗粒	0.1	70.22	12.19	92.56	61.75
	1	42.89	46.37	71.57	70.42
	10	28.95	63.81	39.14	83.82

顺铂, CNE2/DDP 正常细胞减少, 细胞碎片、晚期凋亡或坏死细胞增加 ($P < 0.01$)。与顺铂组比较, 联用鼻咽清毒颗粒 0.1、1、10 mg/mL 组能增加 CNE2/DDP 晚期凋亡或坏死细胞 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。结果见图 4、表 2。

3.5 Western blotting 法检测 CNE2/DDP 细胞 CTR1、Bcl-2 和 Mcl-1 蛋白表达

如图 5 所示, 与对照组相比, 鼻咽清毒颗粒 0.1、1、10 mg/mL 组 CNE2/DDP 细胞 CTR1 蛋白的表达有所升高、Mcl-1 蛋白的表达有所降低, 但均无显

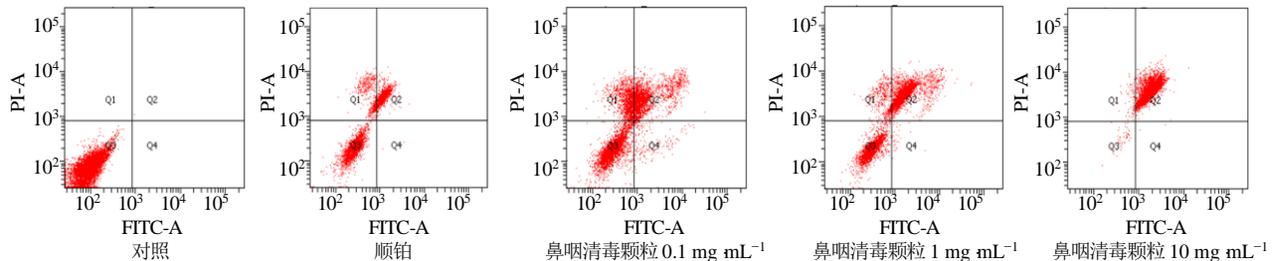


图 4 CNE2/DDP 细胞凋亡情况

Fig. 4 Apoptosis of CNE2/DDP

表 2 CNE2/DDP 细胞周期比例 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)Table 2 Cell cycle ratio of CNE2/DDP ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

组别	质量浓度	细胞周期比例/%			
		正常细胞	细胞碎片	早期凋亡细胞	晚期凋亡或坏死细胞
对照	—	99.40 ± 0.01	0.00	0.00	0.00
顺铂	10 μg·mL ⁻¹	61.12 ± 0.02**	12.83 ± 0.06**	0.07 ± 0.87	25.70 ± 0.02**
鼻咽清毒颗粒	0.1 mg mL ⁻¹	51.53 ± 0.02##	18.70 ± 0.02	0.40 ± 0.00	29.90 ± 0.08##
	1 mg mL ⁻¹	54.61 ± 0.01##	4.30 ± 0.05	0.93 ± 0.43	40.30 ± 0.11##
	10 mg mL ⁻¹	0.73 ± 0.42##	4.63 ± 1.01	0.00 ± 0.00	94.57 ± 0.05##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与顺铂组比较: ## $P < 0.01$ 。

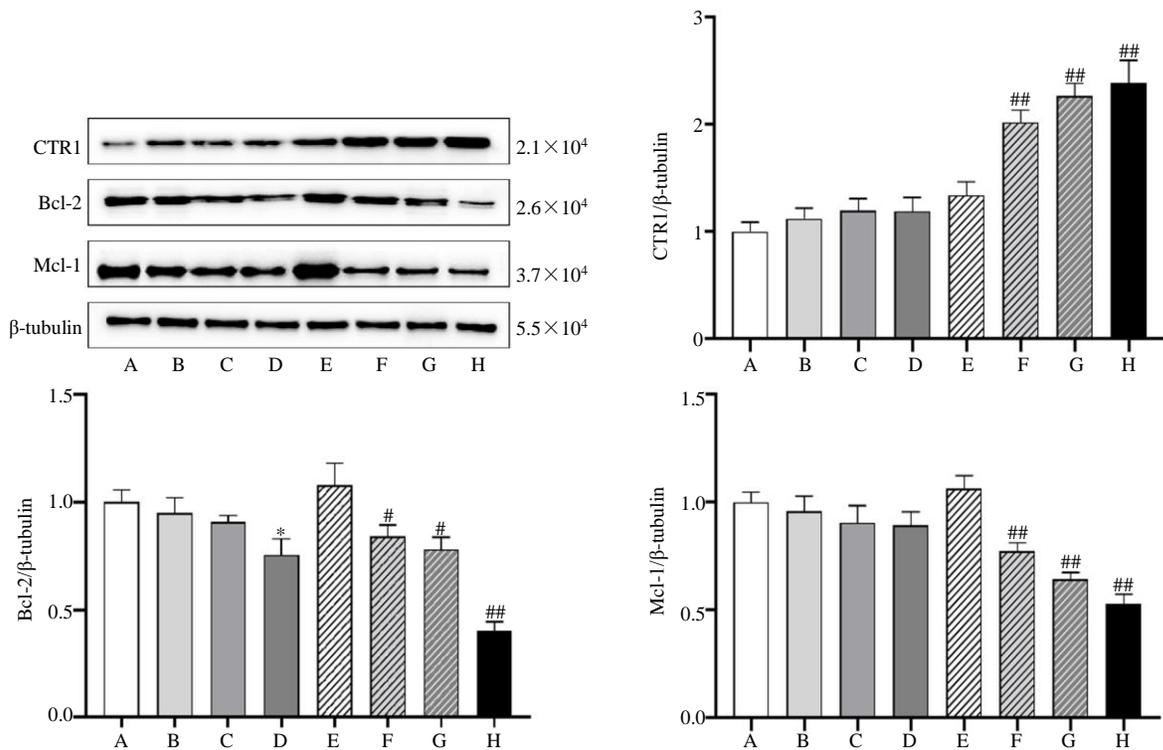
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs cisplatin group.

著差异; 鼻咽清毒颗粒 10 mg/mL 组 Bcl-2 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.05$); 与顺铂组相比, 顺铂+鼻咽清毒颗粒 0.1、1、10 mg/mL 组 CTR1 蛋白的表达显著升高, Bcl-2、Mcl-1 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

4 讨论

鼻咽癌的治疗主要采用化疗加同期放疗的方

式, 必要时联合分子靶向治疗。顺铂作为化疗药物中的一线经典药物, 在提高鼻咽癌患者生存率、减少远端转移方面起着重要作用^[9]。但耐药性的产生导致了药物敏感性大大降低, 从而影响了疗效。鼻咽清毒颗粒是具有清热解毒、化痰散结的复方中成药^[10]。本实验研究了逆转鼻咽癌细胞顺铂耐药的作用效应。首先对 CNE2、CNE2/DDP 2 种细胞进行了



A-对照, B-鼻咽清毒颗粒 0.1 mg mL⁻¹, C-鼻咽清毒颗粒 1 mg mL⁻¹, D-鼻咽清毒颗粒 10 mg mL⁻¹, E-顺铂, F-顺铂+鼻咽清毒颗粒 0.1 mg mL⁻¹, G-顺铂+鼻咽清毒颗粒 1 mg mL⁻¹, H-顺铂+鼻咽清毒颗粒 10 mg mL⁻¹; 与对照组比较: *P<0.05; 与顺铂组比较: #P<0.05 ##P<0.01。
A- control, B-Biyan Qingdu Granules 0.1 mg mL⁻¹, C-Biyan Qingdu Granules 1 mg mL⁻¹, D-Biyan Qingdu Granules 10 mg mL⁻¹, E-cisplatin, F-cisplatin + Biyan Qingdu Granules 0.1 mg mL⁻¹, G-cisplatin + Biyan Qingdu Granules 1 mg mL⁻¹, H-cisplatin + Biyan Qingdu Granules 10 mg mL⁻¹; *P < 0.05 vs control group; #P < 0.05 ##P < 0.01 vs cisplatin group.

图 5 鼻咽清毒颗粒联合顺铂对 CNE2/DDP 细胞 CTR1、Bcl-2、Mcl-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of Biyan Qingdu Granules combined with cisplatin on the expression of CTR1, Bcl-2 and Mcl-1 proteins in CNE2/DDP cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

培养方法的建立, 确保了细胞可稳定培养。然后采用 MTS 法研究顺铂对 CNE2、CNE2/DDP 的增殖抑制作用, 通过对比 2 种细胞的 IC₅₀, 得出 CNE2/DDP 细胞的 RI 值为 3.03, 表明 CNE2/DDP 细胞具有耐顺铂特性。对鼻咽清毒颗粒抑制 CNE2、CNE2/DDP 细胞增殖的浓度进行了探索, 显示鼻咽清毒颗粒质量浓度 ≤ 10 mg/mL 时对 2 种细胞的增殖均无明显抑制作用, 因此, 本实验选用鼻咽清毒颗粒 0.1、1、10 mg/mL 分别与系列质量浓度的顺铂联用, 通过对比 CNE2、CNE2/DDP 2 种细胞的顺铂 IC₅₀, 发现鼻咽清毒颗粒与顺铂联用能增强顺铂对 CNE-2、CNE2-DDP 细胞的增殖抑制作用。其中 CNE/DDP 细胞中顺铂 IC₅₀ 降低率远大于 CNE-2 细胞中顺铂 IC₅₀, 提示鼻咽清毒颗粒除具有协同抗肿瘤作用外, 可能还具有增强增强鼻咽癌细胞顺铂敏感性, 逆转 CNE2/DDP 细胞顺铂耐药的作用。

细胞对顺铂的摄取主要包括被动扩散和主动转

运, 铜转运蛋白 CTR1 是细胞膜上参与铜稳态调控的跨膜蛋白, 其不仅能调控胞内铜离子的水平, 而且能够介导铂类药物的跨膜运输, 促进细胞对铂类药物的摄取^[11-12]。顺铂通过 CTR1 进入细胞后与 DNA 鸟嘌呤的 N7 位点结合, 与 DNA 结合形成链内或链间交联加合物, 即铂-DNA 加合物 (Pt-DNA 加合物), Pt-DNA 加合物的形成会改变 DNA 结构, 造成 DNA 损伤^[13], DNA 损伤后启动细胞凋亡程序, Bcl-2 蛋白家族的促凋亡蛋白被激活, 发生构象改变并整合到了线粒体膜上, 与机体在正常生理条件下主要分布于线粒体膜、内质网膜和细胞核被膜上的抗凋亡蛋白如 Bcl-2 和 Mcl-1 相互作用导致抗凋亡蛋白减少, 降低其抗凋亡能力, 这一变化导致线粒体膜通透性转运孔开放, 发生线粒体膜透化现象, 引起细胞色素 C 和其他膜间隙蛋白进入细胞质, 促发细胞的凋亡。

本实验采用流式细胞技术检测 CNE2/DDP 细

胞的凋亡情况,结果显示,与顺铂组相比,鼻咽清毒颗粒与顺铂联用后,能增大CNE2/DDP细胞的凋亡率,显著增加晚期凋亡和坏死。进一步采用Western blotting法检测CNE2/DDP细胞CTR1、Bcl-2和Mcl-1的蛋白表达,实验结果显示鼻咽清毒颗粒联用顺铂可显著增加CTR1蛋白的表达,显著抑制Bcl-2和Mcl-1的蛋白的表达。表明鼻咽清毒颗粒能够通过增加细胞膜上CTR1蛋白表达,增加顺铂转运进入细胞内,抑制抗凋亡蛋白Bcl-2和Mcl-1蛋白的表达,启动细胞凋亡通路,产生细胞杀伤作用,最终使肿瘤细胞发生凋亡。

综上,鼻咽清毒颗粒具有增强鼻咽癌细胞顺铂敏感性、逆转鼻咽癌细胞顺铂耐药的作用,其机制可能与上调顺铂耐药细胞CTR1的蛋白表达,增加顺铂转运进入细胞,进而下调Bcl-2、Mcl-1的蛋白表达有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Chen Y P, Ismaila N, Chua M, *et al.* Chemotherapy in combination with radiotherapy for definitive-intent treatment of stage II-IVA nasopharyngeal carcinoma: CSCO and ASCO guideline [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(7): 840-859.
- [3] Shen M J, Xu Z H, Xu W H, *et al.* Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 149.
- [4] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley D B, *et al.* Cancer drug resistance: an evolving paradigm [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(10): 714-726.
- [5] Guo Q, Cao H Y, Qi X H, *et al.* Research progress in reversal of tumor multi-drug resistance via natural products [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(11): 1466-1476.
- [6] 康敏,王仁生,刘文其,等.鼻咽清毒颗粒药物血清体外对鼻咽癌细胞增殖的影响 [J]. *中药材*, 2013, 36(1): 89-92.
- [7] 韩虹,盛晓丽,崔勇,等.鼻咽清毒颗粒对鼻咽癌的体内抑制作用 [J]. *广东医学*, 2009, 30(9): 1244-1245.
- [8] 郭长凯,孔维佳,余青松,等.鼻咽清毒颗粒加鼻渊舒口服液抑制鼻咽癌高危人群EB病毒VCA/IgA的临床观察 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006(10): 729-732.
- [9] 韩蜜,伍梦玲,龙远雄,等.顺铂治疗鼻咽癌耐药机制与逆转策略研究进展 [J]. *医药导报*, 2023, 42(10): 1529-1533.
- [10] 王晓菲,王萌萌,徐旭,等.鼻咽清毒颗粒对鼻咽癌放射性口腔黏膜炎症损伤的保护作用及机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(5): 1063-1070.
- [11] Pan H B, Kim E, Rankin G O, *et al.* Theaflavin-3,3'-digallate enhances the inhibitory effect of cisplatin by regulating the copper transporter 1 and glutathione in human ovarian cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): 117.
- [12] Lasorsa A, Natile G, Rosato A, *et al.* Monitoring interactions inside cells by advanced spectroscopies: Overview of copper transporters and cisplatin [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(4): 462-477.
- [13] Zhang C Y, Xu C, Gao X Y, *et al.* Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies [J]. *Theranostics*, 2022, 12(5): 2115-2132.

[责任编辑 高源]