

· 药理实验与临床观察 ·

菊花倍半萜烯内酯诱导人鼻咽癌细胞毒性和凋亡的研究

林忠宁¹, 林育纯¹, SHEN Han-ming², YANG Cheng-feng², ONG Choon-nam^{2*}

(1. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510089; 2. Department of Community, Occupational and Family Medicine, Faculty of Medicine, MD3, National University of Singapore, Singapore 117597)

摘要: 目的 评价菊花倍半萜烯内酯类化合物 (SLs) 对鼻咽癌的抗肿瘤作用。方法 采用 SLs 的活性成分 parthenolide (PN) 为受试物作用于人鼻咽癌高分化细胞株 CNE1, 检测细胞毒性和诱导性凋亡指标, 进行时间效应和剂量效应作用观察。结果 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 的 PN 作用 6~36 h 后与阴性对照组比较, CNE1 细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率明显增加, 细胞计数减少, 细胞增殖抑制率升高 ($P < 0.05$); 细胞出现凋亡特征形态学改变, TUNEL 阳性细胞、Sub G1 亚群细胞百分数增加, 细胞失贴壁率明显增高 ($P < 0.05$); 上述指标与 PN 剂量存在明显相关 ($P < 0.05$) 和时间循序变化。结论 PN 可通过对人鼻咽癌细胞毒性作用和诱导细胞凋亡发挥其抗肿瘤作用, 提示 PN 具有化学预防意义。

关键词: 倍半萜烯内酯; 鼻咽肿瘤; 抗肿瘤作用; 细胞凋亡

中图分类号: R979.1; R739.63

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)10-0909-04

Study of sesquiterpene lactones in plants of chrysanthemum on inducible cytotoxicity and apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma

LIN Zhong-ning¹, LIN Yu-chun¹, SHEN Han-ming², YANG Cheng-feng², ONG Choon-nam²

(1. School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China; 2. Department of Community, Occupational and Family Medicine, Faculty of Medicine, MD3, National University of Singapore, Singapore 117597)

Abstract **Object** To investigate the potential antitumor effects of sesquiterpene lactones (SLs) in the plants of chrysanthemum on human nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** Parthenolide (PN), the active component of SLs, was used as tested substance and exposed to NPC cell line CNE1. Cell toxicity and apoptosis indexes were determined at time-effect and dose-effect study. **Results** Compared with negative control, there were significantly increasing of lactate dehydrogenase LDH leakage and cell proliferation inhibition ratio as well as remarkable decrease in cell number, respectively in PN groups treated with 10~100 $\mu\text{mol/L}$ PN for 6~36 h ($P < 0.05$). There were high levels of TUNEL positive cell and Sub G1 of cell cycle percentage, and significant increase in cell detachment ratio ($P < 0.05$), while coupled with the characteristic apoptotic morphology changes in PN treated groups. The above indexes showed evident relative PN dose ($P < 0.05$) and circulatory changes in time order. **Conclusion** It indicates that PN could induce cytotoxicity and apoptosis in exposed CNE1 cell, which correlated with its anticancer and chemoprevention effects on NPC.

Key words sesquiterpene lactones; nasopharyngeal carcinoma (NPC); antitumor effects; apoptosis

一些芳香类草本植物如菊花等含有倍半萜烯内酯类化合物 (sesquiterpene lactones, SLs), 长期以来被传统中医药学用于发热、关节炎和偏头痛等的治疗^[1]。现代研究证实 SLs 的主要生物活性成分是 parthenolide (PN), 从欧洲艾菊 (feverfew) 等提取的 PN 可抑制血小板释放 5-羟色胺, 抑制白三烯 B₄ 和血栓恶烷 B₂ 的生成; 近来已有关于 PN 应用的

文献报道和二项美国专利局登记^[2]; 最近的研究还证实 PN 能提高人乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性^[3]。鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 在广东地区的发病率之高尤为突出, 是广东省重点防治的恶性肿瘤之一, 因此筛选具有抗肿瘤作用的天然药物用于开展 NPC 的化学预防具有重要的意义。本研究采用 PN 作为 SLs 的受试物作用于人鼻

* 收稿日期: 2002-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 30070649); 广东省自然科学基金资助 (No. 001369); 中华医学基金会 (CMB) 基金资助项目
作者简介: 林忠宁 (1968-), 男, 福建惠安人, 讲师, 硕士, 研究方向环境毒理学, 2000年前往新加坡国立大学开展肿瘤病因和化学预防研究 Tel (020) 87331596; E-mail linzi@gzsums.edu.cn

咽癌细胞株,探讨其对 NPC 的抗肿瘤作用。

1 材料

1.1 细胞株:人鼻咽癌高分化细胞株 CNE1由中山大学肿瘤研究所提供。传代培养后取第 10~40代细胞用于本研究。

1.2 受试物:倍半萜内酯类化合物 parthenolide (PN), $C_{15}H_{20}O_3$, 相对分子质量 248.3, 分子结构见图 1, Sigma 公司产品,从欧洲艾菊 (feverfew) 等提取,纯度 $\geq 90\%$ 。溶于二甲基亚砜 (DMSO, Sigma) 配制成 100 mmol/L 贮存液, -30°C 保存,临用时现加入培养体系中达到所需终浓度,其中 DMSO 终浓度均低于 0.025%。

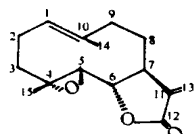


图 1 parthenolide 分子结构图

1.3 试剂: RPMI1640 培养基青链霉素 (R/S), 0.25% 胰酶: Gibco BRL 公司产品;胎牛血清 (FBS): HyClond 公司产品; DM-SQ 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 放线菌素 D (ActD)、噻唑蓝 (MTT)、碘化丙啶 (PI): Sigma

公司产品 TUNEL 分析 (荧光标记) 试剂盒: Roche 公司产品;特异性乳酸脱氢酶 (LDH) 诊断试剂盒: Abbott Laboratories 产品。

1.4 仪器: 流式细胞仪: Coulter Epics Elite ESP; 紫外可见分光光度计: UV 1600, SHIMADZU, 日本; 自动生化测定仪: Abbott VP, 法国; 超声细胞破碎仪: MicrosonTM, 美国; 全自动酶标仪: Model 3550, BIO-RAD; 激光扫描共聚焦荧光显微镜系统: SM 410, Zeiss; 低温离心机: Eppendorf; 低温高速离心机: Sigma; 层流超净工作台; 恒温 CO₂ 培养箱: SANYO, 日本; 显微镜: Olympus, 日本。

2 方法

2.1 细胞培养和处理: 在含 10% FBS 1 000 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 完全培养基 (CM) 中传代培养; 胰酶消化后, 取细胞 (活性 $>95\%$) 置于 37°C 、5% CO₂ 饱和湿度培养过夜至 80% 细胞融合。分组给予如下受试物处理: 阴性对照组加等量培养基; 阳性对照组为 ActD (终浓度 5 mg/L) 预处理 30 min 后加入 TNF- α (终浓度 15 $\mu\text{g/L}$); PN 作用组加入 PN 贮存液至终浓度为 10~100 $\mu\text{mol/L}$ 进行剂量-效应关系观察。各组按设计分别作用不同时间后检测如下指标进行时间-效应关系观察。

2.2 细胞毒性指标检测

2.2.1 LDH 漏出率 [LDH leakage(%)] 测定: 按

Shen HM 等报道方法用试剂盒在自动生化测定仪上测定^[4]。具体操作: 2×10^5 细胞置 24 孔培养板 (NUNC 公司) 处理 1~24 h 后, 取培养基 100 μL 用于测定漏出细胞外 LDH (eLDH), 然后超声裂解细胞, 4 000 r/min 离心 (4°C) 后取上清测定细胞总 LDH (tLDH)。结果计算 LDH 漏出率。

$$\text{LDH 漏出率}(\%) = \text{eLDH} / \text{tLDH} \times 100\%$$

2.2.2 细胞增殖功能测定: 采用噻唑蓝颜色反应法 (MTT 法) 略为改进^[5]。 10^5 细胞置 96 孔培养板 (NUNC 公司) 处理, 终止前 4 h 加 MTT (5 g/L) 继续培养, 至加入细胞裂解缓冲液 (5% DMF, 20% SDS, pH 4.6) 终止反应。用全自动酶标仪读取 $\lambda 595 \text{ nm}$ 吸光度值 (A), 计算肿瘤细胞增殖抑制率。抑制率 (%) = $100 - \text{处理组 } A / \text{阴性对照组 } A \times 100\%$ 。根据 Bloiss 法计算剂量效应作用的半数抑制浓度 (IC₅₀)。

2.2.3 细胞计数: 上述细胞毒性检测的同时, 平行进行细胞计数, 进行细胞生长情况观察。

2.3 细胞凋亡指标检测

2.3.1 TUNEL 分析: 10^6 细胞置 25 cm² 培养瓶 (NUNC 公司) 处理 12, 24, 36 h 后, 刮取细胞, 用 TUNEL 试剂盒荧光标记细胞, 流式细胞仪检测 10 000 个细胞, 用 WinMDT2.3 软件分析, 记录阳性细胞频数和分布直方图, 测得 TUNEL 阳性细胞百分数 (%)。每份样本均用共聚焦显微镜同时平行检测确定阳性细胞, 观察细胞标记状态和形态, 并拍摄成像。

2.3.2 细胞失贴壁率 (%) 测定: 基于本研究中 TUNEL 分析和共聚焦分析结果发现失贴壁细胞几乎均为 TUNEL 阳性细胞, 参照文献测定处理 24 h 后失贴壁细胞百分率。失贴壁细胞百分率 (%) = $\text{失贴壁细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$, 作为凋亡测定的定量参数之一。

2.3.3 Sub G1 亚群细胞 (%) 测定: 10^6 细胞置 25 cm² 培养瓶处理 36 h 后, 刮取细胞, 用 PI 标记细胞, 流式细胞仪检测和进行细胞周期分析, 记录细胞周期各亚群细胞的频数和分布直方图, 测得其中 Sub G1 亚群细胞百分数 (%)。

2.3.4 细胞形态学观察: 细胞处理后, 进行上述指标检测的同时, 平行进行细胞形态学观察。

2.4 统计分析: 结果用 SPSS 10.0 软件进行 ANOVA 的组间比较和相关分析。

3 实验结果

3.1 PN 诱导 CNE1 细胞毒性作用研究

3.1.1 LDH漏出率(%)的时间-效应关系观察:见表1细胞LDH漏出率随PN作用时间的增加在6h后明显升高(各时点与阴性对照组比较均 $P < 0.05$),存在明显的时间-效应关系($r = 0.965\ 0$, $P < 0.01$)

表1 PN诱导CNE1细胞LDH漏出率的时间效应关系

组别	作用时间(h)	LDH漏出率(%)
对照	12	2.34±0.23
ActD	12	44.30±4.30*
	24	51.16±1.46*
PN作用组 (75μmol/L)	1	2.27±0.26
	3	2.70±0.25
	6	4.45±0.86
	9	6.85±1.57*
	12	25.46±4.02*
	24	46.07±0.85*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3.1.2 PN诱导CNE1细胞毒性的剂量效应关系观察:见表2PN作用后各剂量组(10~100μmol/L)细胞增殖抑制率在12和24h均显著增加($P <$

表2 PN诱导CNE1细胞毒性的剂量效应关系

组别	剂量 (μmol/L)	LDH漏出率 (%)	MTT增殖抑制率(%)		细胞计数 (×10 ⁵ /mL)
			12h	24h	
对照组	-	3.73±0.12	0.00±0.55	0.00±0.33	4.13±0.55
ActD	-	51.16±1.47	43.52±2.70	84.31±0.24	1.11±0.03
PN	10	5.70±0.29	0.64±1.99	2.83±2.30	2.90±0.13
	25	6.47±0.37	10.11±1.38	21.03±3.01	1.95±0.07
	50	22.93±0.38	46.38±3.04	98.01±1.53	0.83±0.03
	75	46.07±0.85	82.65±2.94	97.59±1.16	0.86±0.05
	100	61.51±1.47	94.19±0.36	99.76±1.47	0.69±0.04
PN剂量相关性(r)		0.9861 ^{##}	0.9494 ^{##}	0.9409 ^{##}	-0.8818 ^{##}

ANOVA分析的SNK检验与对照组比较: * $P < 0.05$

表3 PN诱导CNE1细胞凋亡指标检测

组别	剂量 (μmol/L)	TUNEL阳性率(%)			SubG1 (%)	细胞失贴率 (%)
		12h	24h	36h		
对照组	-	3.05	5.55	6.45	13.50	0.49±0.07
ActD	-	25.66	51.53	86.73	12.66	100.00±0.00
PN	10	3.12	5.86	8.56	13.62	3.46±0.64*
	25	3.05	12.39	14.94	16.84	24.25±0.80*
	50	5.84	20.04	48.23	22.62	83.33±0.50*
	75	13.82	58.02	86.03	27.98	91.29±0.54*
	100	18.79	72.08	94.75	55.24	98.18±0.10*
r		0.9658 ^{##}	0.9690 ^{##}	0.9820 ^{##}	0.9183 ^{##}	0.9273 ^{##}

ANOVA分析的SNK检验与对照组比较: ** $P < 0.01$

与PN剂量相关性的Pearson χ^2 检验: ** $P < 0.01$

草本植物菊花和茼蒿在民间用于治疗发热等多种疾病已有一个多世纪的历史^[1]。进一步研究表明,这些植物的提取物——SLs具有抗炎和抗微生物的特性,通过对5羟色胺释放抑制作用分析提示PN是SLs中最活跃而且能独立发挥主要成分之一。已知SLs结构标志是一个类异戊二烯

0.05), IC₅₀分别为42.35和29.56μmol/L;24h细胞LDH漏出率明显升高;24h细胞计数则明显减少;上述指标均存在明显的剂量-效应关系($P < 0.01$)。

3.2 PN诱导CNE1细胞凋亡研究:细胞形态学观察结果表明,阴性对照组CNE1细胞呈贴壁生长;阳性对照组和受试物作用组可见不同程度的细胞数减少、形态变圆、细胞膜皱缩有折光、细胞失贴壁而悬浮。

细胞凋亡指标检测结果见表3,PN作用后各剂量组细胞TUNEL阳性率随暴露时间和作用剂量增加而增高,在24h后中、高剂量组(>25μmol/L)均高于阴性对照组;SubG1亚群在>50μmol/L的PN暴露36h后升高。与阴性对照组比较,24h细胞失贴壁率明显升高(各剂量组均 $P < 0.05$);上述指标均存在明显的剂量-反应关系($P < 0.01$)。

4 讨论

表2 PN诱导CNE1细胞毒性的剂量效应关系

组别	剂量 (μmol/L)	LDH漏出率 (%)	MTT增殖抑制率(%)		细胞计数 (×10 ⁵ /mL)
			12h	24h	
对照组	-	3.73±0.12	0.00±0.55	0.00±0.33	4.13±0.55
ActD	-	51.16±1.47	43.52±2.70	84.31±0.24	1.11±0.03
PN	10	5.70±0.29	0.64±1.99	2.83±2.30	2.90±0.13
	25	6.47±0.37	10.11±1.38	21.03±3.01	1.95±0.07
	50	22.93±0.38	46.38±3.04	98.01±1.53	0.83±0.03
	75	46.07±0.85	82.65±2.94	97.59±1.16	0.86±0.05
	100	61.51±1.47	94.19±0.36	99.76±1.47	0.69±0.04
PN剂量相关性(r)		0.9861 ^{##}	0.9494 ^{##}	0.9409 ^{##}	-0.8818 ^{##}

与PN剂量相关性的Pearson χ^2 检验: ** $P < 0.01$

(isoprenoid)环系统和一个内酯环,这二个结构共同形成一个反应性Michael系统,成为亲核底物的靶位点;其中PN含有一个 α -甲叉- γ -内酯(MGL)和一个环氧化物(见图1),这些部位可与生物分子亲核基团(如巯基)交互作用。

目前SLs在医疗上的应用日益受到关注,欧洲药物学家已广泛采用欧洲艾菊(又名小白菊或雏菊)和使用含PN的植物药物治疗偏头痛,临床试验证实能有效地降低发生的频率和严重程度。美国专利局也已有二项PN应用的专利,包括Brucker D等^[2]使用含PN的FeverfewTM制成鼻咽喷剂,用于缓解偏头痛和抗痉挛作用,例如缓解月经期痛性痉挛或助消化作用;Hwang DH等^[6]使用SLs用于治疗严重感染性疾病,其依据是SLs可用于抑制早期的炎症后细胞因子,改善败血症休克和其他严重的感染性疾病。

已有报道含SLs植物提取物也有抗肿瘤作用,

其中 PN 能抑制多种肿瘤细胞 DNA 合成和细胞增殖,提示 PN 可能具有抗癌作用^[7]。研究表明 PN 对多种恶性细胞的抗肿瘤效应与其细胞毒作用和细胞增殖抑制效应有关。报道 FeverfewTM 提取物和纯 PN 对体外小鼠纤维肉瘤细胞株 (MN-11) 和人淋巴瘤细胞株 (TK6) 有细胞生长抑制作用。然而,有关 SLs 对人鼻咽癌细胞的作用国内外尚未见报道。本研究通过系统地检测 PN 诱导的 CNE1 细胞毒性和细胞凋亡:首先,阐明了 PN 具有有效的细胞毒效应,表现在 PN 暴露的早期 (6 h) 即出现 LDH 漏出率显著增加,呈时间效应和剂量效应关系,在作用的后期 (24 h) 甚至低浓度 PN ($10\mu\text{mol/L}$) 也可导致 LDH 漏出增高;其次,细胞增殖功能检测显示在 PN 作用的中期 (12 h),较低浓度 ($25\mu\text{mol/L}$) 作用已显著抑制肿瘤细胞的增殖,并随时间和剂量呈明显增加,12 和 24 h 的 IC_{50} 分别为 42.35 和 29.56 $\mu\text{mol/L}$;第三,凋亡指标和特征性凋亡细胞形态学改变等检测,证实 PN 作用可明显诱导 CNE1 细胞凋亡并存在时间和剂量效应关系,在 PN 作用的后期 (24 h) 和晚期 (36 h),中、高剂量组 ($> 50\mu\text{mol/L}$) TUNEL 阳性细胞、失贴壁细胞百分比和细胞周期 Sub G1 亚群均显著增加,结果表明凋亡是 PN 作用引起肿瘤细胞死亡的主要形式。

综上所述,一方面,人鼻咽癌细胞株 CNE1 对

草本植物菊花等的倍半萜烯内酯类化合物的主要活性成分 PN 的细胞毒效应敏感,并发现 PN 诱导 CNE1 细胞凋亡;另一方面,上述结果存在时间循序性改变和剂量效应关系,PN 在一定剂量范围内 ($10\sim 100\mu\text{mol/L}$) 诱导的细胞膜完整性的破坏以及由此引发的细胞增殖抑制出现早,提示 PN 诱导的细胞凋亡与介导细胞毒效应有关。对临床应用倍半萜烯内酯衍生物和开发中草药植物新药进行鼻咽癌的化学预防提供有用的信息。

参考文献:

- [1] Berry M I. Feverfew faces the future [J]. J Pharmaceutical, 1984, 19: 611-614.
- [2] Brucker D, Lorenzen L H. Therapeutic nasal spray administered composition containing feverfew [P]. United States Patent No. 6,103,218, Date Aug. 15, 2000.
- [3] Patel N M, Nozaki S, Shortle N H. *et al.* Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappa B is enhanced by Ikappa Balpha superrepressor and parthenolide [J]. Oncogene, 2000, 19(36): 4159-4169.
- [4] Shen H M, Yang C F, Ong C N. Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells [J]. Int J Cancer, 1999, 81: 820-828.
- [5] 林忠宁,董胜璋,董书芸,等. MTT 法检测 T 淋巴细胞增殖功能的方法学探讨与应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(1): 8-10.
- [6] Hwang D H, Fischer N H. Use of sesquiterpene lactones for treatment of severe inflammatory disorders [P]. United States Patent No. 5,905,089, Date May. 18, 1999.
- [7] Ross J J, Arnason J T, Birnboim H C. Low concentrations of the feverfew component parthenolide inhibit *in vitro* growth of tumor lines in a cytostatic fashion [J]. Planta Med, 1999, 65(2): 126-129.

黄芪注射液和白术提取部位对小肠上皮细胞移行的影响

张子理¹,陈蔚文^{2*}

(1. 深圳市第二人民医院,广东 深圳 518035; 2. 广州中医药大学脾胃研究所,广东 广州 510405)

摘要:目的 观察黄芪注射液 (H) 及白术提取部位 (B1 B4 B9 B13) 对小肠上皮细胞 (IEC-6) 移行的影响,探讨其粘膜修复的机制。方法 IEC-6 接种于 6 孔培养板,72 h 后损伤细胞,并加入不同剂量的 H、B1 B4 B9 和 B13 溶液 $100\mu\text{L}$,空白组加等量 D-PBS,阳性对照组加表皮生长因子 (EGF),加药后 24、48 和 72 h 观察细胞移行。结果 B4 B9 B13 和 EGF 均明显促进细胞移行,与对照组比较 24、48 和 72 h 均具有显著性差异 ($P < 0.01$),但 B4 B9 B13 作用不如 EGF 强。B1 和 H 对细胞移行无明显促进作用,与 EGF 比较 24、48 和 72 h 均具有显著性差异 ($P < 0.01$)。B13 和 H 配伍应用后,对 IEC-6 细胞移行具有协同促进作用,与对照组、H 和 B13 组比较 24、48 和 72 h 均具有明显差异 ($P < 0.05\sim 0.01$)。结论 B4 B9 B13 通过促进细胞移行在小肠粘膜损伤修复过程中发挥作用,可能是白术粘膜保护和修复作用的物质基础。B13 和 H 配伍应用对细胞移行具有协同促进作用。

关键词: IEC-6 细胞株;移行;黄芪注射液;白术提取物

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2002)10-0912-04

* 收稿日期: 2002-04-22

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 39970906); 国家重大基础研究计划 (973) (NO. G 19990544); 广东省自然科学基金 (No. 990354) 及广东省千百十人才工程基金项目 (No. 9953)

作者简介: 张子理 (1963-),男,甘肃人,教授,主任医师,1986 年 7 月毕业于兰州医学院医疗专业,2002 年 7 月获广州中医药大学中西医结合临床专业博士学位,主要从事中西医结合临床、教学及科研工作,出版学术著作 3 部,发表论文 40 余篇

* 通讯作者: E-mail: pwzh@gzht.cm.edu.cn.