

· 药理与临床 ·

白藜芦醇对鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 增殖和凋亡的影响

唐旭东¹, 周克元¹, 赵 南^{2*}

(1. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023; 2. 湛江市职业病防治所, 广东 湛江 524018)

摘要:目的 探讨白藜芦醇 (resveratrol, Res) 对鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 增殖和凋亡的影响。方法 采用 MTT 法检测 IC_{50} 值, 流式细胞术, Hoechst 33258/PI 荧光染色和 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析细胞凋亡。结果 不同浓度 Res 分别处理细胞 24, 48 和 72 h, 其 IC_{50} 值分别为 (109.2 ± 7.5) , (83.6 ± 6.0) , $(54.3 \pm 2.8) \mu\text{mol/L}$, 各 IC_{50} 值间比较差异显著 ($P < 0.01$)。25, 50, 100 和 $200 \mu\text{mol/L}$ Res 分别处理细胞 24 h 后, 50, 100, $200 \mu\text{mol/L}$ Res 处理组经流式细胞术和荧光染色检测出的细胞凋亡率均明显高于对照组 ($P < 0.01$), 荧光染色可见典型的凋亡形态学改变, 100, $200 \mu\text{mol/L}$ Res 处理组可见明显的 DNA 梯带。结论 Res 可通过诱导 CNE-2Z 细胞株凋亡而抑制其增殖。

关键词: 白藜芦醇; 鼻咽癌; 增殖; 凋亡

中图分类号: R979.1; R739.63; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)03-0287-04

Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2Z

TANG Xu-dong¹, ZHOU Ke-yuan¹, ZHAO Nan²

(1. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;

2. Zhanjiang Institute of Occupational Diseases Prevention, Zhanjiang 524018, China)

Abstract: **Object** To investigate the effects of resveratrol (Res) on the proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2Z. **Methods** IC_{50} values were detected by MTT assay. The apoptosis was analyzed by flow cytometry (FCM), Hoechst 33258/PI fluorescence staining, and DNA agarose gel electrophoresis. **Results** After CNE-2Z cells were treated with different concentrations of Res for 24, 48, and 72 h, their IC_{50} values were (109.2 ± 7.5) , (83.6 ± 6.0) , and $(54.3 \pm 2.8) \mu\text{mol/L}$ respectively ($P < 0.01$). After CNE-2Z cells were treated with 25, 50, 100, and $200 \mu\text{mol/L}$ Res for 24 h, the apoptotic rates by both flow cytometry and fluorescence staining at 50, 100 and $200 \mu\text{mol/L}$ Res-treated groups were significantly higher than those in control groups ($P < 0.01$). The typical morphological changes in apoptosis were found by fluorescence staining. The results of DNA agarose gel electrophoresis showed that DNA ladder appeared obviously at 100 and $200 \mu\text{mol/L}$ Res-treated groups. **Conclusion** Res can inhibit the proliferation of cell line CNE-2Z through the induction of apoptosis.

Key words: resveratrol (Res); nasopharyngeal carcinoma; proliferation; apoptosis

白藜芦醇 (resveratrol, Res) 化学名为 3,4,5-三羟基芪三酚 (3,4,5-trihydroxystibene), 是一种天然活性成分, 目前已在葡萄、决明、藜芦、虎杖等 21 个科、31 个属的 72 种植物中发现, 较早证实其有抗菌、抗炎、抗血栓、抗脂质过氧化等功效, 近年还发现其有抗癌活性。在对其抗癌机制研究中, 已发现 Res 可通过诱导多种肿瘤细胞株凋亡而抑制其增殖^[1-6], 但 Res 对人鼻咽癌低分化上皮细胞株 CNE-2Z 增殖和凋亡的影响尚未见报道。本实验对此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂和仪器: 白藜芦醇 (Res, 反式) 购自南京学子医化研发中心, 纯度 > 98%, 用 DM SO 溶解, 配成 200 mmol/L 贮存液, 煮沸 30 min 消毒后, 分装, -20°C 冻存储用。处理细胞时, DM SO 浓度 $\leq 0.1\%$ (实验证实该浓度对细胞生长无影响)。Hoechst 33258 由 CN I 公司生产, PI 由 Sigma 公司生产; MTT 和 DM SO 均为 Amresco 公司产品。流式细胞仪 (美国 Couter 生产, Epics-XL 型), 酶标

* 收稿日期: 2003-06-13

基金项目: 广东省中医药局重点资助项目 (200002); 湛江市科委资助项目 (200106)

作者简介: 唐旭东 (1968—), 女, 四川省富顺人, 硕士, 副教授, 主要从事肿瘤药理学研究。

Tel: (0759) 2388581-2 E-mail: tangxudong2599@sina.com

免疫测定仪 (Bio-Tek 公司生产, ELx800 型)。

1.2 细胞培养: CNE-2Z 细胞株本所保存, 在 5% CO_2 , 37 °C 条件下, 用含 10% 小牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g/mL}$ 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。

1.3 细胞增殖抑制实验 (MTT 法): 取对数生长期细胞, 按每孔 5×10^3 于 180 μL 培养液中接种于 96 孔板, 37 °C, 5% CO_2 过夜, 加入不同浓度的 Res (0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$), 每组设 8 个平行孔。用药后分别培养 24, 48, 72 h, 每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h。倾去培养液, 每孔加 100 μL DM SO 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 IC_{50} 值, 绘制浓度-抑制率曲线。

细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{处理组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$

1.4 流式细胞术检测: 分别收集对照, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理 24 h 的细胞, D-hanks 液洗涤, 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 (192 份 0.2 mol/L Na_2HPO_4 , 8 份 0.1 mol/L 枸橼酸, pH 7.8) 中, 用 50 $\mu\text{g/mL}$ PI (含 100 $\mu\text{g/mL}$ RNase A, 无 DNase) 0.5 mL 4 °C 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。

1.5 Hoechst 33258/PI 荧光染色: 收集对照, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理 24 h 的细胞, 分别加入 Hoechst 33258 和 PI, 使其终浓度分别为 10, 20 $\mu\text{g/mL}$, 37 °C 避光染色 30 min 后, 在荧光显微镜下随机计数 200 个细胞, 区分出坏死、凋亡和活细胞, 并计算细胞凋亡率、坏死率。每组均设 3 个复管, 并重复 3 次。

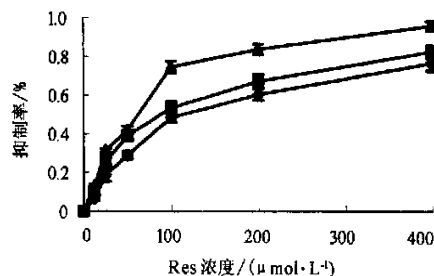
1.6 DNA 琼脂糖凝胶电泳: 收集对照, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理 24 h 的细胞, 参照文献^[7]进行实验, 结果经紫外透射仪观察并拍照。

1.7 统计学处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件包 One-way ANOVA 与 Bonferroni (方差齐) 或 Tamhane's T_2 (方差不齐) 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 生长增殖抑制实验结果: 不同浓度的 Res 处理 CNE-2Z 细胞 24, 48, 72 h 的浓度-抑制率曲线见图 1。用不同浓度的 Res 处理 CNE-2Z 细胞 24, 48, 72 h 后, 抑制率均随浓度的增加而增加, 具有剂量

依赖性 ($P < 0.01$), 处理 24, 48, 72 h 的 IC_{50} 值分别为 (109.2 $\pm$ 7.5), (83.6 $\pm$ 6.0), (54.3 $\pm$ 2.8) $\mu\text{mol/L}$, 各 IC_{50} 值间比较差异显著 ($P < 0.01$)。

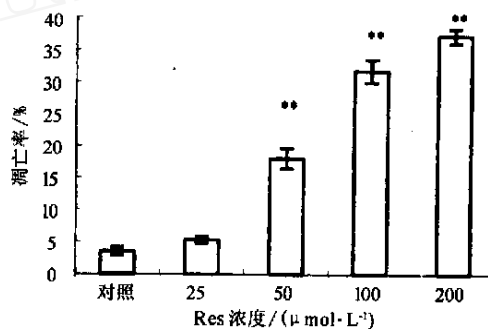


1-72 h 2-48 h 3-24 h

图1 Res 对 CNE-2Z 的浓度-抑制率曲线 ($n=3$)

Fig 1 Concentration-inhibitory rate curves of Res on CNE-2Z ($n=3$)

2.2 流式细胞术检测结果: 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理 CNE-2Z 细胞 24 h, 流式细胞术检测结果见图 2。用 50 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理 CNE-2Z 细胞 24 h 后即可诱导其凋亡, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.01$)。



与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

图2 流式细胞术检测 CNE-2Z 凋亡率 ($n=3$)

Fig 2 Apoptotic rate of CNE-2Z detected by flow cytometry ($n=3$)

2.3 Hoechst 33258/PI 荧光染色结果: 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理细胞 24 h 后, 出现典型的凋亡形态学改变, 可见胞体缩小、胞浆浓缩、核染色质聚集、核固缩、核碎裂, 还可见膜包裹的凋亡小体。各处理组的凋亡率和坏死率结果见表 1。50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ Res 各处理组的凋亡率均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理组的坏死率也显著高于对照组 ($P < 0.01$)。

2.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果: 用 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理 CNE-2Z 细胞 24 h, 可见明显的 DNA 梯带, 见图 3。

3 讨论

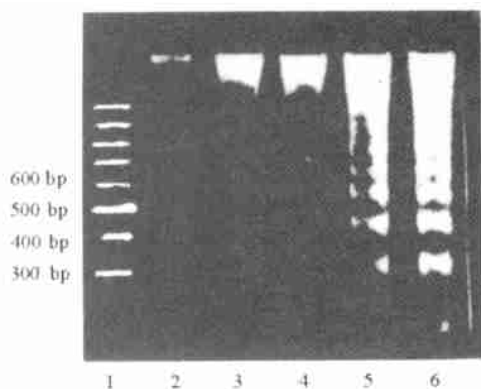
表 1 CNE-2Z 凋亡率和坏死率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Apoptotic rate and necrotic rate of CNE-2Z ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组 别	Res 浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率/%	坏死率/%
对照	-	3.2 ± 0.6	2.3 ± 0.4
Res	25	5.6 ± 0.7	2.6 ± 0.3
	50	$15.5 \pm 2.4^{**}$	3.0 ± 0.7
	100	$29.8 \pm 1.2^{**}$	$4.3 \pm 0.6^{**}$
	200	$35.7 \pm 1.3^{**}$	$6.3 \pm 0.7^{**}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group



1-100 bp DNA marker 2-control 3-25 $\mu\text{mol/L}$ Res
4-50 $\mu\text{mol/L}$ Res 5-100 $\mu\text{mol/L}$ Res 6-200 $\mu\text{mol/L}$ Res

图 3 Res 处理 24 h 后 CNE-2Z 的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of DNA in CNE-2Z treated with Res for 24 h

肿瘤一直被认为是由于细胞分裂、增殖失控所致。因此,人们不断探索这种生长失控的原因,寻找治疗方法,但仍未能取得理想结果。近年来通过对细胞凋亡及其机制的深入研究发现,一些化疗药物可通过诱导肿瘤细胞凋亡而达到治疗肿瘤的目的。Res 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 Res 有抗癌活性,对癌的起始、促进、发展 3 个阶段均起作用。在对其抗癌机制的研究中发现,Res 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。Sun 等^[1]发现 Res 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 IC_{50} 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 Res 可经凋亡途径抑制 H22 细胞生长增殖。Lin 等^[2]用 Res 处理人前列腺癌细胞株 DU 145,通过核小体含量检测证实有凋亡发生。Gao 等^[3]用 $25 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ Res 在体外处理鼠髓细胞样白血病细胞株 32Dp210,发现 Res 不可逆地抑制 32Dp210 细胞克隆生长,这种由 Res 引起的克隆生长抑制同大量细胞死亡有关;通过亚二倍体(亚- G_1)细胞的增多、

DNA 碎片的产生,可推测凋亡是 32Dp210 细胞的死亡方式。Joe 等^[4]用 Res 处理 6 种人癌细胞株(MCF-7, SW 480, HCM 7, Seg-1, Bic-1 和 HL-60),发现除 Bic-1 细胞外,Res 对其余 5 种癌细胞株均有明显增殖抑制作用, IC_{50} 值在 $70 \sim 150 \mu\text{mol/L}$,且根据亚 G_1 峰及 annexin V 分析证实有凋亡发生。Roman 等^[5]报道 Res 对来源于慢性 B-细胞恶性瘤(W SV-CU 和 ESKOL)的人 B-细胞株显示抗增殖活性,且经 annexin V 结合、caspase 活性、DNA 碎片的增加和线粒体跨膜电位的减少,证实 Res 可诱导这两株细胞凋亡。Nakagawa 等^[6]报道高于 $44 \mu\text{mol/L}$ 的 Res 可抑制 3 种人乳腺癌细胞株(雌激素受体 ER 阳性细胞株 KPL-1, MCF-7 和 ER 阴性细胞株 M KL-F)增殖,且由于亚 G_1 峰的出现,证实此增殖抑制与诱导细胞凋亡有关。

以上研究证实 Res 可通过诱导细胞凋亡来抑制一些肿瘤细胞的增殖。但也有报道^[8], Res 能抑制人肝癌细胞株 HepG2 增殖,并未有证据显示凋亡的发生。Manna 等^[9]报道 Res 可阻止 TNF 对 U-937 细胞的毒性作用,并抑制 caspase-2, caspase-3, caspase-7 的活化,因而抑制 TNF 诱导的凋亡。Nicolini 等^[10]还发现反式 Res 通过抑制 caspase-7 的活化和 PARP 的裂解,来抑制一种抗癌药 Paclitaxel 诱导人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 凋亡。因而 Res 除可诱导肿瘤细胞凋亡外,可能还有抑制凋亡作用。为探讨 Res 对鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 凋亡的影响,本实验用不同浓度的 Res 分别处理 CNE-2Z 细胞 24, 48 和 72 h 后,用 MTT 法检测增殖抑制率,发现各时间点的抑制率随浓度的升高而增加 ($P < 0.01$),不同时间 IC_{50} 值间的差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。这说明 Res 剂量与时间依赖性地抑制 CNE-2Z 细胞的增殖。用流式细胞术、Hoechst 33258/PI 荧光染色及 DNA 琼脂糖凝胶电泳均证实有凋亡的发生,随浓度增加,凋亡率也增加(但同时也有少部分以坏死的形式死亡)。因此推测 Res 可通过诱导凋亡的途径抑制 CNE-2Z 细胞增殖,因而 Res 可望发展成为一种抗鼻咽癌的药物。

References

- [1] Sun Z J, Pan C E, Liu H S, *et al* Antihepatoma activity of resveratrol in vitro [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(1): 79-81.
- [2] Lin H Y, Shih A, Davis F B, *et al* Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line [J]. *J Urol*, 2002, 168(2): 748-755.
- [3] Gao X, Xu Y X, Divine G, *et al* Disparate in vitro and in vi-

- vo antileukemic effects of resveratrol, a natural polyphenolic compound found in grapes [J]. *J Nutr*, 2002, 132 (7): 2076-2081.
- [4] Joe A K, Liu H, Suzui M, *et al* Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3): 893-903.
- [5] Roman V, Billard C, Kern C, *et al* Analysis of resveratrol-induced apoptosis in human B-cell chronic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2002, 117(4): 842-851.
- [6] Nakagawa H, Kiyozuka Y, Vemura Y, *et al* Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127(4): 258-264.
- [7] Peng L M, Wang Z L. *Basics and Clinics of Apoptosis* (细胞凋亡的基础与临床) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
- [8] Deledinghen V, Monvoisin A, Neaud V, *et al* Trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol, blocks hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(1): 83-88.
- [9] Manna S K, Mukhopadhyay A, Aggarwal B B. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation [J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6509-6519.
- [10] Nicolini G, Rigoli R, Miloso M, *et al* Antiapoptotic effect of trans-resveratrol on paclitaxel-induced apoptosis in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 302(1): 41-44.

阿魏酸钠诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的初步研究

汪 洪¹, 邓志锋², 赖贤良², 王共先¹, 李 明², 宋书欣^{2*}

(1. 江西医学院第一附属医院泌尿外科研究所, 江西 南昌 330006;

2. 江西医学院第二附属医院 神经外科, 江西 南昌 330006)

摘要: 目的 探讨阿魏酸钠诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的可能作用。方法 分离培养大鼠骨髓间充质干细胞, 采用阿魏酸钠对其进行诱导培养, 倒置显微镜下观察诱导培养不同时间后细胞的形态变化, 并应用免疫细胞化学方法鉴定诱导培养后细胞表面神经细胞特异性标志物神经丝蛋白(NF)及神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达。结果 阿魏酸钠诱导培养6h后即可见细胞形态发生明显变化, 24h后表现为典型的神经细胞样形态, NF和NSE神经细胞特异性标志物呈阳性表达。结论 初步证实阿魏酸钠具有诱导体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的作用。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 阿魏酸钠; 神经细胞

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)03-0290-03

Differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into neurons induced by sodium ferulate

WANG Yang¹, DENG Zhi-feng², LAI Xian-liang², WANG Gong-xian¹, LI Ming², SONG Shu-xin²

(1. Institute of Urology, First Affiliated Hospital; 2. Department of Neurosurgery,

Second Affiliated Hospital, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China)

Abstract: **Object** To study the possibility that sodium ferulate induced differentiation of adult rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) into neurons. **Methods** BMSC from adult rat were isolated and cultured. Then BMSC were induced by sodium ferulate in serum-free medium for different period. The morphological changes of the cells were observed under phase contrast microscope. The neuronal specific markers, neurofilament (NF), and neuron specific enolase (NSE) were evaluated by indirect immunocytochemistry staining. **Results** After induction for 6 h, some BMSC showed morphological changes obviously. Twenty-four hours later, the differentiated cells showed typical neuronal morphology, and expressed neuron-specific markers, such as NF and NSE. **Conclusion** Sodium ferulate has inductive effect on differentiation of BMSC into neurons of adult rat *in vitro*.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cell; sodium ferulate; neurons

收稿日期: 2003-08-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30160084); 江西省自然科学基金项目(0240047)

作者简介: 汪 洪(1963—), 女, 江西省南昌市人, 博士, 研究员, 主要从事细胞免疫及组织工程的基础研究。

Tel: (0791) 8872366 E-mail: wangy63@yahoo.com