

• 药理与临床 •

厚朴酚与和厚朴酚抗鼻咽癌作用机制研究

秦洁¹, 李晓庆^{2,3#}, 赵春娟^{2,3}, 漆正宇¹, 陈静¹, 余振东¹, 聂国辉^{4*}

1. 北京大学深圳医院 广东省男性生殖与遗传重点实验室, 广东 深圳 518036

2. 北京大学深圳医院 检验科, 广东 深圳 518036

3. 汕头大学医学院, 广东 汕头 515000

4. 北京大学深圳医院 耳鼻咽喉头颈外科, 广东 深圳 518036

摘要: **目的** 探讨厚朴中小分子化合物厚朴酚与和厚朴酚对鼻咽癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响。**方法** 分别采用 MTT 比色法、细胞划痕实验、Transwell 实验, 观察厚朴酚与和厚朴酚对鼻咽癌细胞 HONE1 增殖、迁移、侵袭的影响。**结果** 厚朴酚与和厚朴酚对鼻咽癌细胞 HONE1 有较显著的抑制增殖、迁移和侵袭效应, 而且这种效应呈显著的剂量依赖性。**结论** 厚朴酚与和厚朴酚能够抑制鼻咽癌肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 厚朴酚与和厚朴酚是具有开发潜力的抗癌小分子化合物。

关键词: 厚朴酚; 和厚朴酚; 鼻咽癌; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R739.63 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)02-0226-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.02.014

Mechanism of anti-nasopharyngeal carcinoma effect of magnolol and honokiol

QIN Jie¹, LI Xiao-qing^{2,3}, ZHAO Chun-juan^{2,3}, QI Zheng-yu¹, CHEN Jing¹, YU Zhen-dong¹, NIE Guo-hui⁴

1. Key Laboratory of Male Reproductive and Genetic of Guangdong Province, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China

2. Department of Clinical Laboratory, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China

3. ShanTou University Medical College, Shantou 515000, China

4. Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of small molecules (magnolol and honokiol) in *Magnolia officinalis* in the proliferation, migration, and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** The effects of magnolol and honokiol on proliferation, migration, and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells HONE1 were observed using MTT assay, cell scratch assay, and Transwell assay. **Results** The proliferation, migration, and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell HONE1 were significantly restrained by magnolol and honokiol and this effect was prominently dose-dependent. **Conclusion** Magnolol and honokiol could inhibit the proliferation, migration, and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells, and are small molecules with development potential of anticancer. **Key words:** magnolol; honokiol; nasopharyngeal carcinoma; proliferation; migration; invasion

近年来,从中药中和已有的化合物库中寻找活性成分作为小分子靶向性药物,已成为抗肿瘤药物的研究方向。肿瘤细胞中普遍存在信号转导通路的失调,研发抑制这些通路中关键基因“Driver”的分子靶向药物或者多靶点的药物,将是肿瘤靶向治疗的重要发展方向。

研究表明,和厚朴酚能够以时间及剂量依赖性

方式诱导乳腺癌、恶性黑色素瘤、肺癌、结肠癌、胃癌等肿瘤细胞的凋亡以及抑制肿瘤细胞增殖^[1-4]。另外,和厚朴酚在抗肿瘤治疗中毒副作用低,在有效的治疗浓度下,正常细胞如成纤维细胞、淋巴细胞对其有很好的耐受性^[5],表明和厚朴酚是一种具有开发潜力的抗癌小分子。在鼻咽癌的早期诊断、早期治疗及相关研究中,有关厚朴酚与和厚朴酚抑

收稿日期: 2014-06-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81100471, 81270748); 深圳市科技计划项目(201302042, 201302043); 深圳市科技研发资金基础研究计划资助项目(JCYJ20130402114702127, JCYJ20120827150357364)

*通信作者 聂国辉,男,博士,教授,硕士生导师。Tel: (0755)8392333-6666 E-mail: nghui@21cn.com
#共同第一作者

制鼻咽癌肿瘤细胞增殖、促进凋亡、抑制新生血管生成的研究等鲜有报道。本研究拟探讨厚朴中小分子化合物厚朴酚与和厚朴酚对鼻咽癌细胞增殖、侵袭、迁移及凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制,以期为厚朴酚与和厚朴酚抗肿瘤活性开发提供实验依据和理论基础。

1 材料

鼻咽癌细胞株 HONE1、HK1、CNE1、CNE2、5-8F 均购自中国科学院细胞库,对照细胞人鼻咽上皮细胞 NP460 由北京大学香港科技大学医学中心万峻博士惠赠。基础培养基 H-DMEM、胎牛血清(FBS)、左旋谷氨酰胺、青霉素和链霉素(Gibco-BRL),0.25%胰酶(Gibco)。厚朴酚、和厚朴酚(质量分数均为99%)由广州中医药大学李康博士惠赠。MTT (Sigma-Aldrich),Matrigel 基质胶(BD Bioscience),Transwell 小室(聚碳脂膜微孔直径8 μm , Costar)。

2 方法

2.1 鼻咽癌细胞株 HONE1、HK1、CNE1、CNE2、5-8F 及对照细胞人鼻咽上皮细胞 NP460 培养

肿瘤细胞于培养皿中培养,完全培养基包括90%基础培养基 H-DMEM、10% FBS、1 mmol/L 左旋谷氨酰胺、1%双抗(100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素)。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱内培养,取对数生长期细胞用于实验。

2.2 细胞增殖实验^[6]

将 1×10^3 个肿瘤细胞 HONE1 接种于 96 孔板中,每孔 200 μL ,24 h 后分别加入不同质量浓度(2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 $\mu\text{g/mL}$)的厚朴酚与和厚朴酚,同时设对照组(正常细胞加培养基),每组设6个复孔,于加药后48 h采用MTT法测定490 nm 波长处吸光度(A)值。

2.3 细胞迁移实验^[7]

接种约 8.0×10^5 个肿瘤细胞 HONE1 于 6 孔板中,细胞汇合度至90%时,用200 μL 枪头在单细胞层上划痕,分别加入不同质量浓度(5、10、15 $\mu\text{g/mL}$)的厚朴酚与和厚朴酚,同时设置对照组(正常细胞加培养基),分别于划痕后0、24、48、72 h 观察细胞迁移情况,并拍照。

2.4 细胞侵袭实验^[8]

按照说明书将 Matrigel 基质胶与无血清培养基以1:3稀释混匀预铺在 Transwell 小室(上室)内至凝固后,分别将 5×10^4 个 HONE1 或 NP460 的无

血清细胞悬液(参照 Transwell 小室说明书)接种至 Transwell 小室内,并放置于24孔板小室(下室)内含有7.5 $\mu\text{g/mL}$ 厚朴酚的10%胎牛血清完全培养基中。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养18 h后,用棉签擦去基质胶和上室内细胞,结晶紫染色固定后,在显微镜下($\times 100$)拍照计数。

3 结果

3.1 鼻咽癌细胞株培养体系的建立

本实验建立了人鼻咽癌细胞株 HONE1、HK1、CNE1、CNE2、5-8F 及对照细胞人鼻咽上皮细胞 NP460 细胞稳定的培养、扩增体系,各细胞形态见图1。

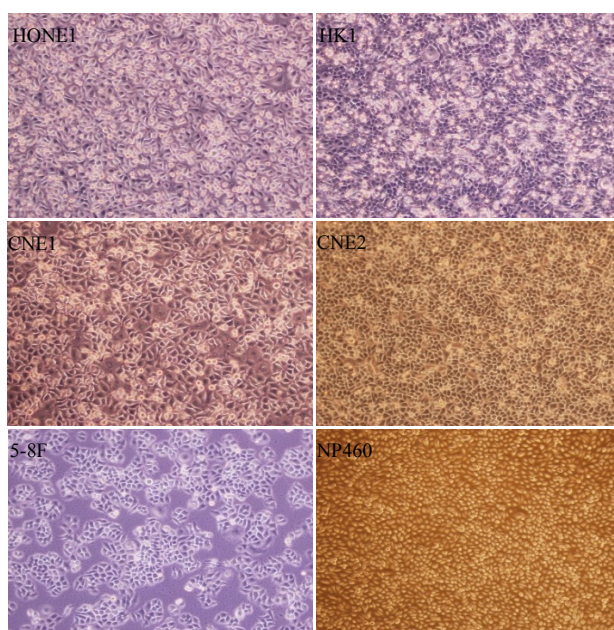


图1 5株鼻咽癌细胞系及对照细胞系 NP460 的形态学特征
Fig. 1 Morphologic characters of five nasopharyngeal carcinoma cell lines and control NP460 cell line

3.2 对鼻咽癌细胞系 HONE1 细胞增殖抑制作用

采用 MTT 法测定不同质量浓度的厚朴酚、和厚朴酚对 HONE1 细胞的增殖抑制率。结果表明,厚朴酚、和厚朴酚均对 HONE1 的增殖有抑制作用,并且这种抑制作用呈明显的量效关系,厚朴酚、和厚朴酚作用 HONE1 细胞48 h 的 IC_{50} 值分别为4.56、7.98 $\mu\text{g/mL}$,具体抑制率见表1。

3.3 对鼻咽癌细胞形态及迁移的影响

分别采用不同质量浓度的厚朴酚、和厚朴酚对鼻咽癌细胞系 HONE1 进行处理,通过倒置相差显微镜观察到,未经药物处理的细胞贴壁良好,细胞轮廓清晰,细胞连接紧密,处理细胞48 h后,肿瘤

细胞显示出不同程度变小、变圆，至培养 72 h 后，细胞折光率减弱，细胞崩解，细胞质浓缩，凝固等，细胞凋亡显著较对照组明显。进一步进行细胞划痕

实验，可观察到添加厚朴酚或和厚朴酚 24 h 后，处理组 HONE1 细胞迁移受到明显抑制，并呈剂量依赖性，结果见图 2。

表 1 厚朴酚与和厚朴酚对 HONE1 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibition of magnolol and honokiol on proliferation of nasopharyngeal carcinoma cell line HONE1 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率/%	组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率/%
对照	—	0.28 ± 0.03	—	对照	—	0.24 ± 0.01	—
厚朴酚	2.5	0.22 ± 0.04	2.89	和厚朴酚	2.5	0.19 ± 0.02	20.92
	5.0	0.18 ± 0.03	20.12		5.0	0.13 ± 0.02	78.81
	7.5	0.12 ± 0.01	43.17		7.5	0.09 ± 0.01	90.22
	10.0	0.07 ± 0.05	75.66		10.0	0.07 ± 0.01	98.06
	12.5	0.02 ± 0.01	88.09		12.5	0.01 ± 0.01	100.00
	15.0	0.00 ± 0.03	99.02		15.0	0.00 ± 0.03	100.00

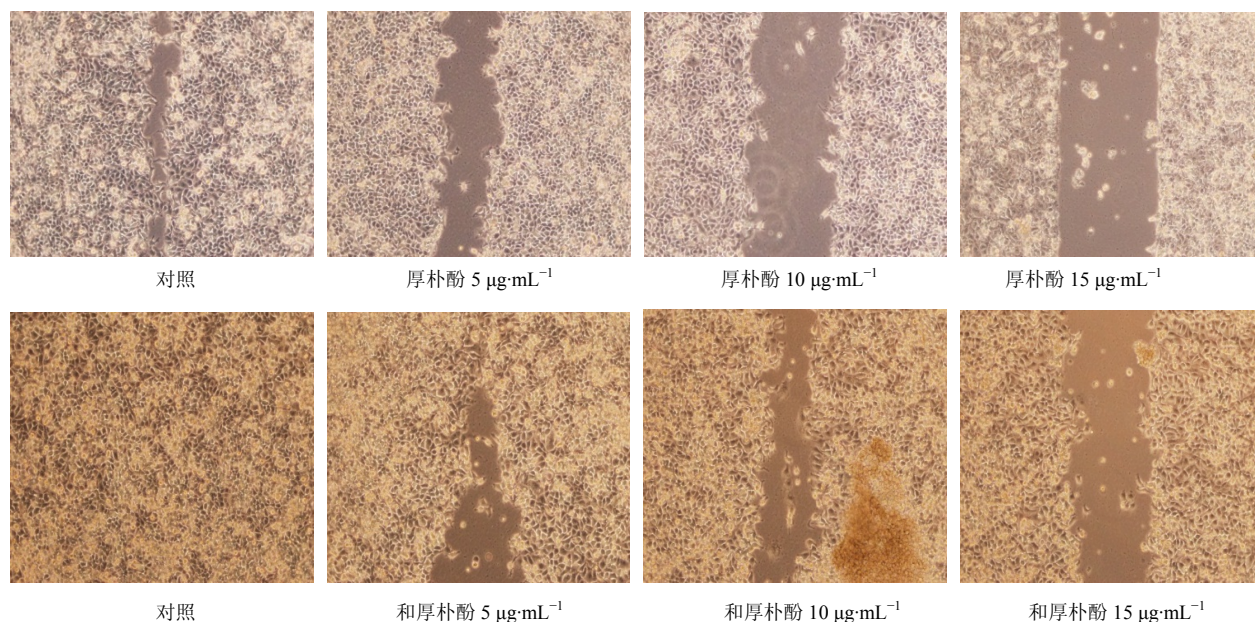


图 2 厚朴酚与和厚朴酚对鼻咽癌细胞系 HONE1 迁移的影响 (24 h)

Fig. 2 Effect of magnolol and honokiol on migration of nasopharyngeal carcinoma cell line HONE1 (24 h)

3.4 对鼻咽癌细胞侵袭的影响

进一步采用铺有 Matrigel 基质胶的 COSTAR Transwell 小室检测了厚朴酚对鼻咽癌细胞 HONE1 和人鼻咽上皮细胞 NP460 侵袭能力的影响。实验结果表明，厚朴酚能显著抑制鼻咽癌细胞 HONE1 的侵袭，而对 NP460 细胞的抑制作用不显著（图 3）。

4 讨论

鼻咽癌是我国南方及东南亚地区一种常见的恶性肿瘤，尤以广东省珠江三角洲一带多见，发病率较欧美等其他国家高 25~30 倍^[9-10]，故有“广东瘤”之称^[11-13]。目前研究发现，鼻咽癌的发病与爱波斯坦-巴尔病毒 (Epstein. Barr virus, EBV) 感染、

遗传因素以及环境因素密切相关。尽管以调强放射治疗技术为主的放化疗综合治疗使得鼻咽癌的局控率有明显提高，但鼻咽癌起病隐匿、转移早、易复发，5 年生存率仍维持在 70% 左右^[14-20]，鼻咽癌的发病人群以 40~50 岁的青壮年多见，一旦发病对社会、经济和家庭造成较大影响。因此，全面解析鼻咽癌的病因及其癌变的分子机制对于鼻咽癌的早期发现和患者生存率的提高具有重要意义。

厚朴为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.、凹叶厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils. 的干燥树皮、根皮以及枝皮。厚朴是一味具有广泛药效作用的中药，在

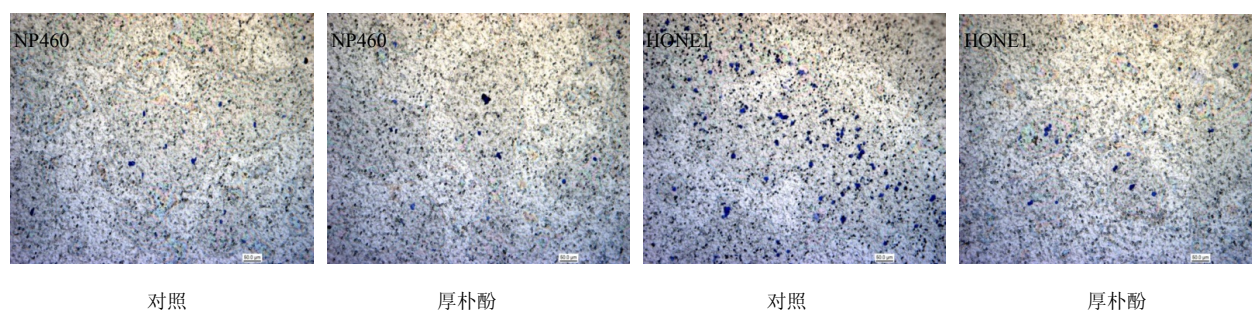


图 3 厚朴酚对鼻咽癌细胞 HONE1 侵袭的影响

Fig. 3 Effect of magnolol on invasion of nasopharyngeal carcinoma cell line HONE1

国内外用于多种疾病的治疗。和厚朴酚是从厚朴的根、茎、叶中提取的一种小分子的天然产物，属于带有烯丙基的联苯酚类化合物，是厚朴的主要活性成分，其具有多种药理作用，其中抗肿瘤作用是其重要作用之一，可以通过诱导肿瘤细胞凋亡，促进肿瘤细胞分化，抑制肿瘤新生血管生长，抑制肿瘤转移，抑制细胞增殖等效应发挥抗肿瘤作用，其抗肿瘤效应具有多靶点、多效应、毒副作用低的特点^[21-22]，在抗肿瘤治疗中受到越来越多的关注^[23]。

近年来，分子肿瘤学、分子药理学的发展使肿瘤本质正在逐步阐明^[24]。恶性肿瘤的侵袭和转移是其治疗失败的原因之一，抑制肿瘤的侵袭与转移是目前肿瘤治疗研究的热点^[25]。目前，中医药配合现代医学技术在预防和治疗肿瘤的许多方面能取长补短。本研究考察厚朴中 2 种酚类小分子化合物对鼻咽癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响，结果表明厚朴酚与和厚朴酚能明显抑制鼻咽癌细胞系增殖、迁移和侵袭，而且这种作用效应呈显著的剂量依赖性，提示这类小分子化合物可能对鼻咽癌发生、发展具有重要调控作用。厚朴酚与和厚朴酚属同分异构体，本实验中，将 2 种化合物以相同质量浓度分别作用于鼻咽癌细胞系，从实验结果分析，它们对鼻咽癌细胞系细胞形态及迁移、细胞生长抑制以及细胞侵袭均有显著效应，初步说明它们抗癌效价和抗癌作用是相似的。2 种化合物在鼻咽癌中的信号通路以及小鼠模型血清中内源性代谢物的变化，需要进一步的鉴定和筛选。

参考文献

[1] Kaushik G, Ramalingam S, Subramaniam D, *et al.* Honokiol induces cytotoxic and cytostatic effects in malignant melanoma cancer cells [J]. *Am J Surg*, 2012, 204(6): 868-873.

[2] Singh T, Prasad R, Katiyar S K. Inhibition of class I histone deacetylases in non-small cell lung cancer by honokiol leads to suppression of cancer cell growth and induction of cell death *in vitro* and *in vivo* [J]. *Epigenetics*, 2013, 8(1): 54-65.

[3] Cheng N, Xia T, Han Y, *et al.* Synergistic antitumor effects of liposomal honokiol combined with cisplatin in colon cancer models [J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(5): 957-962.

[4] Liu S H, Wang K B, Lan K H, *et al.* Calpain/SHP-1 interaction by honokiol dampening peritoneal dissemination of gastric cancer in nu/nu mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43711.

[5] Chen X R, Lu R, Dan H X, *et al.* Honokiol: a promising small molecular weight natural agent for the growth inhibition of oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Int J Oral Sci*, 2011, 3(1): 34-42.

[6] 谭怡忻, 李文娟, 易梅, 等. 稳定干扰 NOR1 基因对 HeLa 细胞的影响 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2014, 39(8): 757-763.

[7] Li L P, Wu W J, Sun D Y, *et al.* miR-449a and CDK6 in gastric carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4):1533-1538.

[8] Wu Y Y, Ma T L, Ge Z J, *et al.* JWA gene regulates PANC-1 pancreatic cancer cell behaviors through MEK-ERK1/2 of the MAPK signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4):1859-1863.

[9] Wei W I, Sham J S. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2005, 365(9476): 2041-2054.

[10] Chan A T, Teo P M, Johnson P J. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2002, 13(7): 1007-1015.

[11] Hirayama T. Descriptive and analytical epidemiology of nasopharyngeal cancer [J]. *Iarc Sci Publ*, 1978, 20: 167-189.

[12] Li C C, Yu M C, Henderson B E. Some epidemiologic observations of nasopharyngeal carcinoma in Guangdong, People's Republic of China [J]. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1985, 69: 49-52.

- [13] Yu M C, Yuan J M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(6): 421-429.
- [14] Lo K W, Huang D P. Genetic and epigenetic changes in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(6): 451-462.
- [15] Manavis J, Sivridis L, Koukourakis M I. Nasopharyngeal carcinoma: the impact of CT-scan and of MRI on staging, radiotherapy treatment planning, and outcome of the disease [J]. *Clin Imaging*, 2005, 29(2): 128-133.
- [16] Faivre S, Janot F, Armand J P. Optimal management of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Curr Opin Oncol*, 2004, 16(3): 231-235.
- [17] Ruan H L, Xu F H, Liu W S, *et al.* Alcohol and tea consumption in relation to the risk of nasopharyngeal carcinoma in Guangdong, China [J]. *Front Med China*, 2010, 4(4): 448-456.
- [18] Jia W H, Luo X Y, Feng B J, *et al.* Traditional Cantonese diet and nasopharyngeal carcinoma risk: a large-scale case-control study in Guangdong, China [J]. *BMC Cancer*, 2010, 20(10): 446-452.
- [19] Zhang L, Chen Q Y, Liu H, *et al.* Emerging treatment options for nasopharyngeal carcinoma [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2013, 2013(7): 37-52.
- [20] Tian W, Xu D, Deng Y C. Honokiol, a multifunctional tumor cell death inducer [J]. *Pharmazie*, 2012, 67(10): 811-816.
- [21] Xu H L, Tang W, Du G H, *et al.* Targeting apoptosis pathways in cancer with magnolol and honokiol, bioactive constituents of the bark of *Magnolia officinalis* [J]. *Drug Discov Ther*, 2011, 5(5): 202-210.
- [22] Hou X, Yuan X, Zhang B, *et al.* Screening active anti-breast cancer compounds from *Cortex Magnolia officinalis* by 2D LC-MS [J]. *Sep Sci*, 2013, 36(4): 706-712.
- [23] Arora S, Singh S, Piazza G A, *et al.* Honokiol: a novel natural agent for cancer prevention and therapy [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(10): 1244-1252.
- [24] Deshmukh B D, Kulkarni M P, Momin Y A, *et al.* Malignant proliferating trichilemmal tumor: A case report and review of literature [J]. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10(3):767-769.
- [25] Dang Q, Liu J, Li J, *et al.* Podoplanin: a novel regulator of tumor invasion and metastasis [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(9):1-6.