

白杨素联合喜树碱促进鼻咽癌细胞 CNE2 凋亡作用研究

李欣¹, 黄俊明¹, 陈美芬¹, 易资梅², 王凤岩¹, 李庆¹, 梁扬盛¹, 王剑宁^{3*}

1. 广东省疾病预防控制中心 卫生毒理所, 广东 广州 511430

2. 广东省生物制品与药物研究所, 广东 广州 510440

3. 中山大学光华口腔医学院附属口腔医院 口腔颌面外科 广东省口腔医学重点实验室, 广东 广州 510055

摘要: **目的** 研究白杨素联合喜树碱对鼻咽癌细胞 CNE2 凋亡的影响, 并对其分子机制做初步探讨。**方法** 白杨素以不同浓度 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 单独/联合喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 处理 CNE2 细胞后, 于普通及荧光倒置显微镜下观察细胞形态变化, 获得细胞死亡的定性资料; MTT 法分析细胞活性, 获得细胞死亡的定量资料; 并以 Western blotting 方法检测凋亡标志蛋白 caspase-3 和 PARP 的变化情况及凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 随时间的变化规律。**结果** 形态学观察发现, 与对照组比较, 白杨素联合喜树碱处理 CNE2 细胞后, 细胞出现明显的死亡量增加, 而单独白杨素、喜树碱和未处理的对照组则未观察到细胞的明显减少; MTT 法分析的定量资料也支持这一结果, 联合处理组细胞存活率随着白杨素剂量增加而下降, 与未处理的对照组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而且与单独白杨素及单独喜树碱组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$); Hoechst 33342 荧光染色在联合处理组可观察到明显的核固缩细胞增加; Western blotting 检测到凋亡标志蛋白 caspase-3 和 PARP 原蛋白减少、相应的活化裂解片段出现; 全 caspase 酶抑制剂 z-VAD-fmk 可有效抑制联合处理引起的 CNE2 细胞凋亡, 阻止凋亡标志蛋白 caspase-3 和 PARP 的活化降解; 喜树碱引起的凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 表达量增加, 随联合处理时间延长而明显下调。**结论** 白杨素联合喜树碱具有促进 CNE2 细胞凋亡的能力, 凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 表达下调是其重要的分子机制。

关键词: 白杨素; 喜树碱; 凋亡; 鼻咽癌细胞; CNE2 细胞; Bcl-xL

中图分类号: R286.91 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)12-2130-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.12.019

Promotion of combination of chrysin and camptothecin on apoptosis of CNE2 cells

LI Xin¹, HUANG Jun-ming¹, CHEN Mei-fen¹, YI Zi-mei², WANG Feng-yan¹, LI Qing¹, LIANG Yang-sheng¹, WANG Jian-ning³

1. Institute of Toxicology, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, China

2. Guangdong Institute of Biological Products and Drug, Guangzhou 510440, China

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China

Abstract: objective To research whether the combination of chrysin and camptothecin can promote the apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2 and to explore the molecular mechanism of the combinative effect. **Methods** CNE2 cells were pretreated with designed dose of chrysin (10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h, then treated with camptothecin (1 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. The morphologic changes were observed under inversed microscope and the cell viability was measured using MTT. The activity of caspase-3 and PARP, which was regarded as the protein marks of apoptosis, was determined by Western blotting. Then the cells were treated with chrysin for different time and the time course of apoptosis inhibitory protein, Bcl-xL was also detected using Western blotting. **Results** Increases of cell death were observed in the group with combined chrysin and camptothecin, but no obvious cell death could be found in chrysin, camptothecin alone, and control groups; The data of cell viability supported this results; With the enhance of pretreatment dose of chrysin, the cell viability decreased. There were the significant differences between the combined groups and the control one ($P < 0.05$), and between the combined groups and both the chrysin and camptothecin groups separately ($P < 0.05$). Chromatin condensation, which

收稿日期: 2015-11-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202199); 广东省科技计划项目资助 (2013B021800044, 2014A020212437); 广州市科技计划项目 (2014J4100090)

作者简介: 李欣 (1973—), 主任医师, 医学博士, 研究方向为天然产物的生物学活性。Tel: (020)31051108 E-mail: 2577328310@qq.com

*通信作者 王剑宁 (1973—), 副主任医师, 研究方向为口腔颌面肿瘤治疗。Tel: (020)83871483 E-mail: arhning@sina.com

was the indication of apoptosis, could be observed when the cells were stained with Hoechst 33342; The proprotein of caspase-3 and PARP degraded and there were the dose-dependent and time-dependent effect. The pan-caspase inhibitor Z-VAD-fmk could inhibit the apoptosis of CNE2 cells which were treated with the combination of chrysin and camptothecin, according to the cell viability and the activation of caspase-3 and PARP; The time-dependent down-regulation in the apoptosis inhibitory protein Bcl-xL could be observed.

Conclusion The cotreatment of chrysin and camptothecin could promote the apoptosis of CNE2 and the down-regulation of apoptosis inhibitory protein Bcl-xL played an important role in the combinative effect.

Key words: chrysin; camptothecin; apoptosis; human nasopharyngeal carcinoma cell; CNE2 cell; Bcl-xL

恶性肿瘤是目前中国面临的严重公共卫生问题之一。第 3 次全国死因抽样调查显示：恶性肿瘤已跃居我国城乡居民的第二大死因、城市居民的第一大死因，而且恶性肿瘤的死亡率呈持续攀升趋势，比 20 世纪 70 年代中期增加了 83.1%，比 20 世纪 90 年代初期增加了 22.5%。鼻咽癌是区域性高发的恶性肿瘤，尤以广东、广西、福建等地区多发。鼻咽癌的治疗以放疗为主，但对化疗的敏感性也很高，化疗在鼻咽癌治疗过程中以诱导化疗、同步放化疗、辅助化疗和姑息化疗等多种形式与放疗联合应用，对于局部晚期鼻咽癌已形成了放疗联合化疗的标准治疗模式^[1]。喜树碱类抗肿瘤药物也逐渐进入鼻咽癌化疗方案中^[1-3]。喜树碱 (camptothecin) 是一种植物来源的化疗药物，通过抑制拓扑异构酶 I (Topo I) 干扰 DNA 复制，影响细胞周期，进而促进肿瘤细胞凋亡^[4-5]。然而喜树碱固有和/或获得性耐药性经常导致临床治疗失败，应用时出现的严重毒副作用也妨碍了喜树碱疗效的发挥。如何降低毒副作用、逆转耐药性是进一步提高喜树碱对鼻咽癌疗效的关键问题。

白杨素 (chrysin) 是黄芩、南酸枣等中药以及蜂蜜、蜂胶中量丰富的一种黄酮类物质，化学名 5,7-二羟黄酮 (5,7-dihydroxyflavone)。近年在动物实验和体外研究中均观察到白杨素及其衍生物具有一定的肿瘤预防和抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[6-9]。本课题组前期研究发现，白杨素具有通过多种途径提高抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞凋亡作用的能力^[10-13]。如果将白杨素以小剂量甚至食物用量与喜树碱联合应用，发挥白杨素协同抗肿瘤作用，提高喜树碱促进凋亡作用，则既能保持白杨素天然优势，又可有效增强喜树碱抗肿瘤活性，为中西医结合防治肿瘤开拓新的思路。

本研究选择鼻咽癌细胞 CNE2，从细胞水平入手，探讨白杨素联合喜树碱对 CNE2 细胞凋亡的促进作用，观察白杨素是否有辅助提高喜树碱抗肿瘤作用的能力，并在分子水平初步分析其作用机制，

为鼻咽癌的联合化疗提供新理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

白杨素 (批号 STBB9943V, 质量分数 97%)、喜树碱 (批号 1242620 23308086, 质量分数 >90%)、二甲基亚砜 (DMSO) 购于 Sigma 公司；全半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 抑制剂 z-VAD-fmk 购于 Bio Mol 公司；Hoechst 33342 购于 GENMED Scientifics 公司，抗 caspase-3、Bcl-xL、tubulin、GAPDH 抗体购于 Cell Signaling Technology 公司；抗 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 抗体购于 BD 公司 (San Diego, CA)；SDS-PAGE、PVDF 膜、化学显色试剂均购于 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞

人鼻咽癌 CNE2 细胞来源于中山大学肿瘤医院，细胞培养基 DMEM 购自 Gibco 公司，10% 新生小牛血清 (FBS, Gibco)，青霉素、链霉素各 100 U/mL (Gibco)，37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下进行单层培养、传代，取指数生长期细胞进行实验。

1.3 主要仪器

奥林巴斯荧光倒置相差显微镜；法国 VILBER-LOURMAT CHEMI-SMART 3000 成像系统、Thermo 高内涵筛选系统 (Cellomics Toxinsight Reader)；Thermo 酶标仪。

2 方法

2.1 样品制备及细胞处理

白杨素以 DMSO 配制为 20 mmol/L 储存液，使用时再以 DMEM 培养基稀释为应用液，使 DMSO 的终体积分数 <0.5%。各实验均按白杨素单独或提前 2 h 预处理后联合喜树碱 (1 μg/mL) 程序处理 CNE2 细胞，根据检测需要收获细胞。

2.2 细胞形态学观察

设白杨素 (10、20、40 μmol/L) 3 个剂量组，喜树碱 (1 μg/mL) 组，白杨素 (10、20、40 μmol/L) 分别联合喜树碱 (1 μg/mL) 组及未处理对照组，共 8 组，在 24 孔培养板上接种 CNE2 细胞，每孔

500 μL , 接种密度约 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 培养 24 h 后, 白杨素单独或提前 2 h 预处理后联合喜树碱处理细胞 24 h, 于普通倒置显微镜下进行观察, 根据形态改变筛选: 白杨素和喜树碱单独作用不出现明显的细胞死亡, 而联合使用后细胞数量明显减少、死亡细胞明显增加的联合剂量组。

2.3 MTT 法检测细胞活性

分组同“2.2”项, 在 96 孔培养板上接种 CNE2 细胞, 每孔 100 μL , 接种密度约 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 培养 24 h 后按设计剂量处理细胞, 每个剂量组设定 4 个平行孔。白杨素单独或提前 2 h 预处理后联合喜树碱处理细胞 24 h 后以 D-Hanks 液冲洗 3 次, 加入含 10% MTT (5 mg/mL) 的无血清培养液, 继续培养 4 h 后, 弃去 MTT 溶液, 每孔加 DMSO 100 μL , 震荡 10 min 充分混合以溶解结晶物后, 用酶标仪测定各孔在 570、630 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 则样品 A 值 = $A_{630} - A_{570}$, 并计算细胞存活率。

细胞存活率 = 药物组 A 值 / 对照组 A 值

2.4 细胞凋亡检测

设白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 组、喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 组、白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 联合喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 组及未处理对照组共 4 组, 在 24 孔培养板上接种 CNE2 细胞, 每孔 500 μL , 接种密度约 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 培养 24 h 后根据设计剂量白杨素单独或提前 2 h 预处理后联合喜树碱处理细胞 24 h 后以 Hoechst 33342 荧光染料 (50 $\mu\text{g/mL}$) 对细胞染色, Thermo 高内涵筛选系统分析, 扫描记录 49 个视野后, 计数凋亡细胞数, 计算凋亡细胞比例。

2.5 Western blotting 蛋白表达分析

细胞分组及处理同“2.2”项, 在 6 孔培养板上接种 CNE2 细胞, 每孔 2 mL, 接种密度约 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 收集经不同处理的药物组和未做任何处理对照组 CNE2 细胞, 以蛋白裂解液 [50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L NaF 和 protease inhibitor cocktail (Roche)] 提取蛋白质, 定量后 SDS-PAGE 分离。转膜后先后与 5% 脱脂奶粉封闭, PARP、caspase-3、Bcl-xL、tubulin、GAPDH 一抗、过氧化物酶偶联的二抗孵育, 化学发光试剂曝光, 用 VILBER-LOURMAT CHEMI-SMART 3000 图像分析系统对目的蛋白进行比较分析, 每个实验重复 3 次。

2.6 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 对白杨素联合喜树碱诱导 CNE2 细胞凋亡的影响

z-VAD-fmk 能阻止所有 caspase 酶家族的活化裂解, 从而阻断凋亡信号途径, 抑制凋亡。设 z-VAD-fmk (20 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 30 min 后白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 联合喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 组、白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 联合喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 组、z-VAD-fmk 组 (20 $\mu\text{mol/L}$) 及未处理对照组, 共 4 组, 在 24 孔培养板上接种 CNE2 细胞, 每孔 500 μL , 接种密度约 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 培养 24 h 后根据设计剂量处理细胞 24 h 后进行 Hoechst 33342 染色, Thermo 高内涵筛选系统分析, 扫描记录 49 个视野后, 计数凋亡细胞数, 计算凋亡细胞比例。另设 z-VAD-fmk (20 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 30 min 后白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 联合喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 组、白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 联合喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 组、白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 组、喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 组、z-VAD-fmk (20 $\mu\text{mol/L}$) 组及未处理对照组, 共 6 组, 在 6 孔培养板上接种 CNE2 细胞, 每孔 2 mL, 接种密度约 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 培养 24 h, 根据设计剂量处理细胞 24 h 后收集蛋白 Western blotting 检测细胞中 PARP 和 caspase 3 蛋白变化情况, 每个实验重复 3 次。

2.7 统计学处理

数据采用 SPSS 13.0 统计软件分析处理, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间样本均数比较以 t 检验进行统计学分析, 包括两独立样本 t 检验和单样本 t 检验。多组间均数比较满足方差齐性以单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行比较, 方差组间两两比较采用 LSD's 法。

3 结果

3.1 白杨素对喜树碱诱导 CNE2 细胞死亡的影响

3.1.1 形态学观察结果 以白杨素单独/联合喜树碱及喜树碱单独处理 CNE2 细胞, 在普通倒置显微镜下观察细胞形状、大小、数量和死亡情况, 初步筛选得到单独喜树碱作用后不出现明显细胞死亡的剂量作为以下各实验中喜树碱的使用剂量, 即为 1 $\mu\text{g/mL}$ 。白杨素预处理 2 h 后联合喜树碱共同处理 24 h 后, 倒置显微镜 ($\times 100$) 下观察到白杨素 40 $\mu\text{mol/L}$ 联合 1 $\mu\text{g/mL}$ 喜树碱组 CNE2 细胞与对照组、单独白杨素和单独喜树碱组细胞对比, 细胞死亡数量明显增加。见图 1。

3.1.2 MTT 法检测 CNE2 细胞存活率 以不同浓度白杨素 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 单独/联合喜树碱

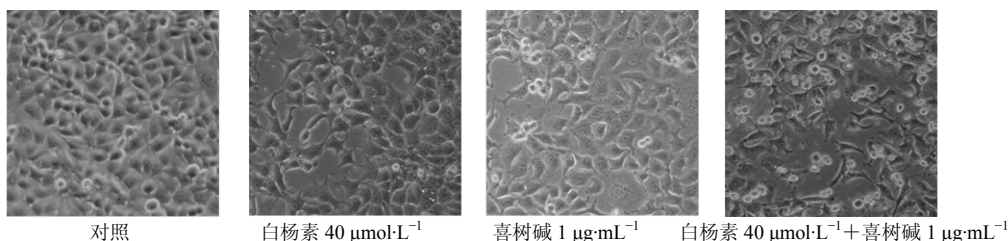


图 1 形态学观察白杨素预处理对喜树碱诱导的 CNE2 细胞死亡的影响

Fig. 1 Morphological observation on effect of pretreatment with chrysin on apoptosis of CNE2 cells induced by camptothecin

(1 μg/mL) 及单独喜树碱 (1 μg/mL) 处理 CNE2 细胞, 于 24 h 收获细胞, 以 MTT 法检测分析肿瘤细胞存活率的变化情况。白杨素 (10、20、40 μmol/L) 联合喜树碱 (1 μg/mL) 处理组, 随着白杨素浓度增加, 对细胞活性的抑制作用明显增强; 不仅与未处理对照组比较差异显著 ($P < 0.05$), 而且与单独白杨素组和单独喜树碱组比较差异均显著 ($P < 0.05$)。单独白杨素 40 μmol/L、单独喜树碱 1 μg/mL 组与未处理对照组比较, 细胞存活率也显著降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

3.2 白杨素联合喜树碱对 CNE2 细胞凋亡的影响

凋亡中晚期细胞中染色质在局部区域凝集, 固缩, 继而核碎裂出现凋亡小体。在 Hoechst 染色下, 细胞核或者凋亡小体内的 DNA 会呈现蓝色的致密浓染或者碎块状致密浓染, 白杨素 (40 μmol/L) 预处理 2 h 后联合喜树碱 (1 μg/mL) 共同处理 24 h 后, 细胞以 Hoechst 33342 (50 μg/mL) 染色 30 min 后于荧光倒置显微镜下观察, 可见联合处理组浓染的凋亡细胞明显增加, 而未处理对照组、单独的白

杨素组和单独喜树碱组未见浓染的凋亡细胞改变, 见图 3。Thermo 高内涵筛选系统分析, 联合处理组的凋亡细胞率达 (37.82 ± 2.05)%, 对照组为 (1.51 ± 0.57)%, 差异显著 ($P < 0.05$), 见图 3。

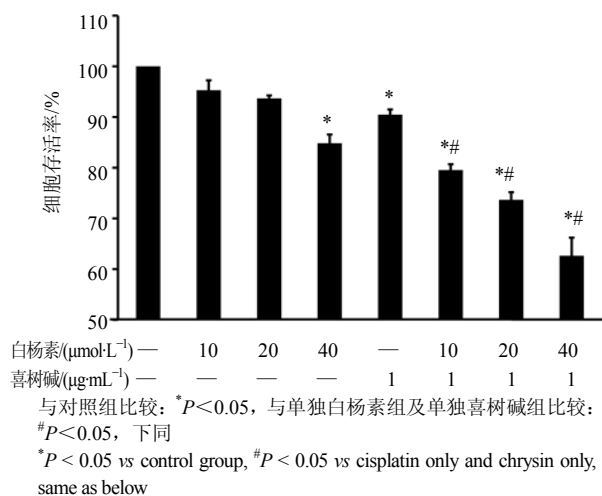


图 2 MTT 法检测各组 CNE2 细胞存活率结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Cell viability rates of CNE2 cells detected by MTT in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

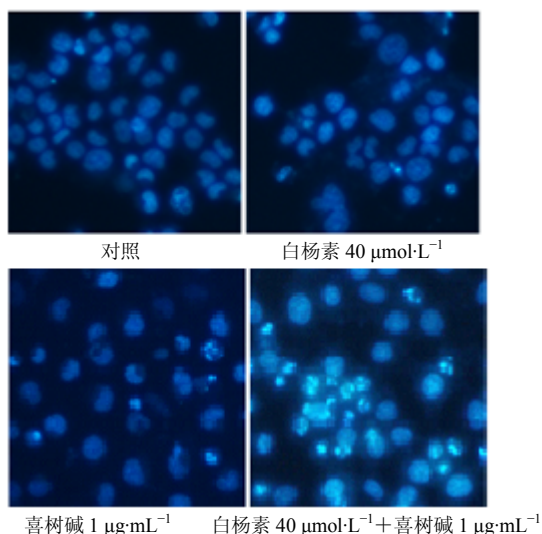
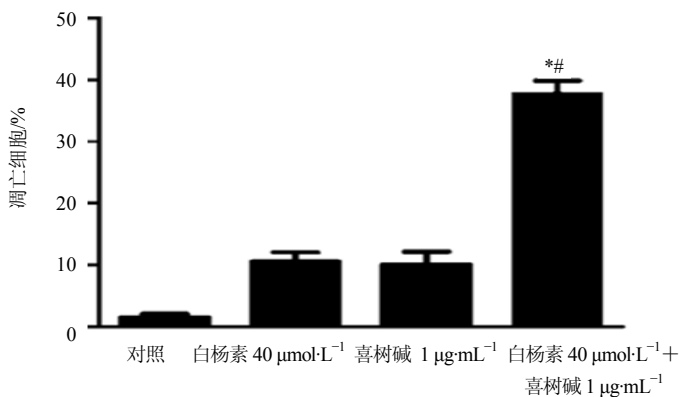


图 3 白杨素单独/联合喜树碱对 CNE2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

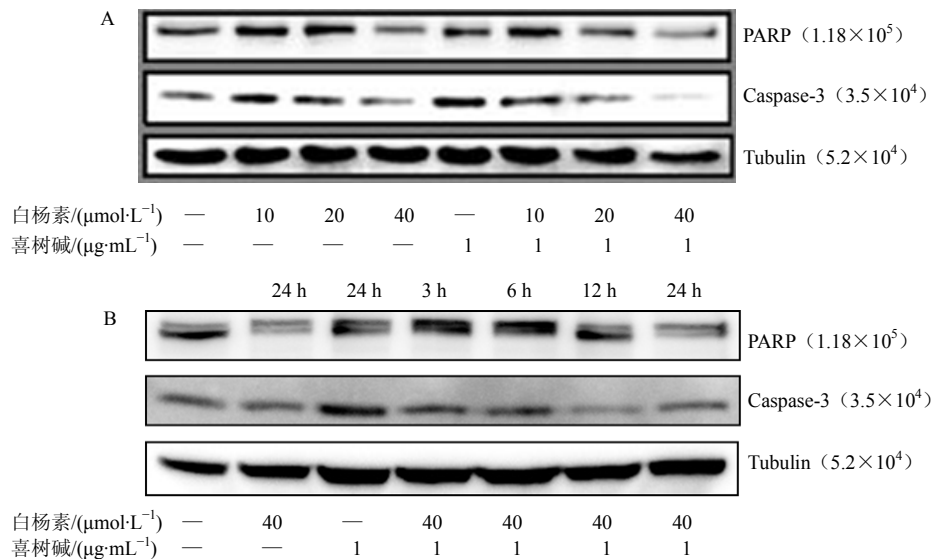
Fig. 3 Effect of chrysin or/and camptothecin on aoptosis of CNE2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



3.3 白杨素联合喜树碱对 CNE2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

3.3.1 白杨素联合喜树碱处理 CNE2 细胞对凋亡标志蛋白的影响 药物作用 24 h 后对各组 CNE2 细胞 caspase-3 和 PARP 蛋白进行 Western blotting 检测分析, 可观察到随着预处理白杨素 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 浓度的增加, PARP (1.18×10^5) 和 caspase-3 (3.5×10^4) 原蛋白逐渐减少, 见图 4-A; 未处理对照组、白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 组、喜树碱 (1

$\mu\text{g/mL}$) 组、白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 联合喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 组处理 CNE2 细胞 3、6、12、24 h 共 7 组, 随着处理时间的延长 (3、6、12、24 h), 联合组细胞中 PARP 和 caspase-3 原蛋白逐渐减少, 单独的白杨素组也可见 PARP 和 caspase-3 原蛋白减少, 见图 4-B; Tubulin 作为内参, 结果重复 3 次, 白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$)、喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$)、白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 联合喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 处理 CNE2 细胞 24 h, caspase-3 蛋白灰度分析结果见图 5。



A-不同浓度白杨素单独或联合喜树碱作用细胞 24 h B-同一浓度白杨素单独或联合喜树碱作用细胞不同时间

A-CNE2 cells were treated with different concentration of chrysin and/or camptothecin (1 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h B-CNE2 cells were treated with chrysin (40 $\mu\text{mol/L}$) and/or camptothecin (1 $\mu\text{g/mL}$) for different time

图 4 白杨素联合喜树碱对 CNE2 细胞凋亡标志蛋白的影响

Fig. 4 Effect of combination of chrysin and camptothecin on protein marks of apoptosis in CNE2 cells

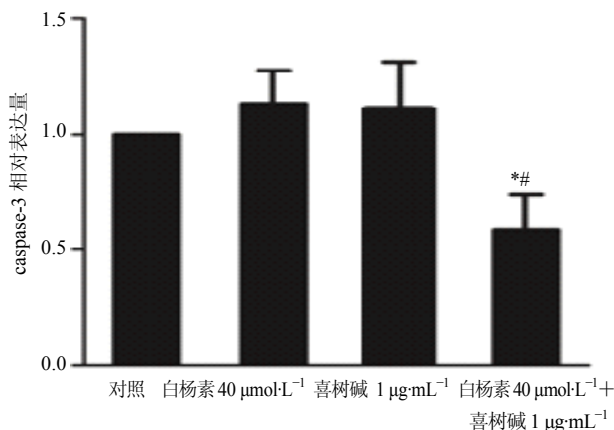


图 5 白杨素联合喜树碱对 CNE2 细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响 (灰度分析, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of combination of chrysin and camptothecin on protein expression of caspase-3 in CNE2 cells (gray intensity, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3.2 白杨素联合喜树碱处理 CNE2 细胞对凋亡抑制蛋白表达的影响 以白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 2 h 后, 白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 组、喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 组、白杨素 (40 $\mu\text{mol/L}$) 联合喜树碱 (1 $\mu\text{g/mL}$) 组再处理 CNE2 细胞 6、12、24 h 及未处理对照组共 10 组细胞, 分别收集细胞, 提取蛋白, 以 Western blotting 检测核转录因子- κB (NF- κB) 调节的系列凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 的表达变化情况, Tubulin 作为内参。在喜树碱单独处理组, 凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 表达量在各个时间点均增加; 而白杨素预处理后, 喜树碱引起的凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 的高表达明显受到抑制, 联合处理时间越长下调作用越明显, 并有可重复性, 见图 6。

3.4 caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 对白杨素联合喜树碱诱导的 CNE2 细胞凋亡的影响

z-VAD-fmk (20 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 30 min, 白杨素

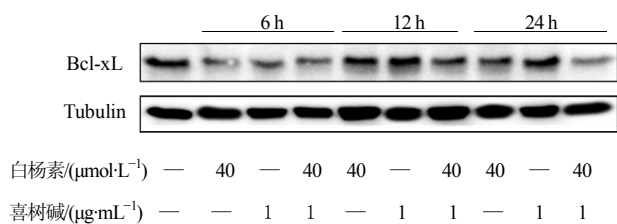
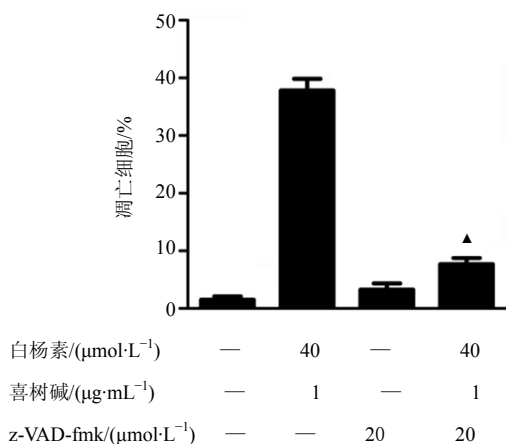


图 6 白杨素联合喜树碱对 Bcl-xL 蛋白表达的影响
Fig. 6 Effect of chrysin combined with camptothecin on expression of Bcl-xL protein



与白杨素联合喜树碱组比较: $\blacktriangle P < 0.05$
 $\blacktriangle P < 0.05$ vs combination of chrysin and camptothecin group

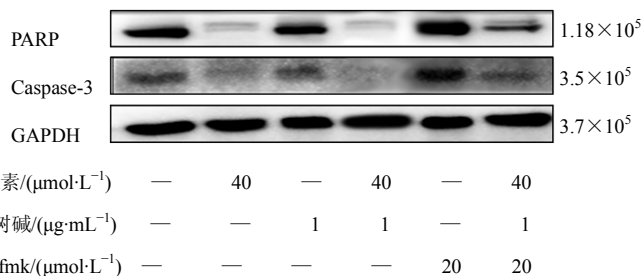
图 7 z-VAD-fmk 对白杨素联合喜树碱诱导 CNE2 细胞凋亡的影响

Fig. 7 Effect of z-VAD-fmk on apoptosis induced by cotreatment of chrysin and camptothecin in CNE2 cells

4 讨论

黄酮是一种天然多酚类物质,广泛分布于水果、蔬菜及中药中。近年研究已发现槲皮素、茶多酚、木犀草素^[14-15]等多种黄酮类物质具有化疗增敏作用。黄酮类物质白杨素是中药中的一种重要活性成分,具有促进多种抗肿瘤物质诱导肿瘤细胞死亡的能力^[10-12]。本研究中观察到白杨素联合喜树碱能够有效促进鼻咽癌 CNE2 细胞死亡,并随着白杨素剂量增加联合处理引起的细胞死亡量明显增加;白杨素联合喜树碱引起的细胞死亡增加,不仅与未处理对照组有统计学差异 ($P < 0.05$),与单独的白杨素和单独的喜树碱引起的 CNE2 细胞死亡量间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。在进一步的机制研究中发现,白杨素联合喜树碱对鼻咽癌细胞死亡促进作用是 caspase 依赖的细胞凋亡,首先以荧光染色识别凋亡细胞标志性的核固缩浓染;随后 Western blotting 检测到随白杨素剂量增加和联合处理时间延长,凋亡标志蛋白 PARP 和 caspase-3 原蛋白逐渐活化降解增

($40 \mu\text{mol/L}$) 联合喜树碱 ($1 \mu\text{g/mL}$) 处理 CNE2 细胞 24 h, Hoechst 33342 染色后, Thermo 高内涵筛选系统分析结果显示:使用 z-VAD-fmk ($20 \mu\text{mol/L}$) 前后联合处理组的凋亡细胞率有显著性差异 ($P < 0.05$),见图 7; z-VAD-fmk ($20 \mu\text{mol/L}$)、白杨素 ($40 \mu\text{mol/L}$) 联合喜树碱 ($1 \mu\text{g/mL}$) 处理 CNE2 细胞 24 h, Western blotting 检测凋亡标志蛋白 PARP 和 caspase-3 的变化。GAPDH 作为内参,结果重复 3 次。结果表明 PARP 和 caspase-3 原蛋白不再活化降解,见图 7。



多; caspase 酶抑制剂能有效逆转白杨素联合喜树碱引起的 CNE2 细胞凋亡和凋亡标志蛋白 PARP、caspase-3 的活化降解。本研究在细胞和分子水平证明白杨素具有提高喜树碱诱导鼻咽癌细胞凋亡的能力,证实白杨素与喜树碱联合的增效价值。研究中观察到单独的白杨素也有一定的诱导肿瘤细胞凋亡作用,但其引起的凋亡要远远少于白杨素联合喜树碱引起的细胞凋亡量,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

研究发现,白杨素可降低 NF- κ B 活性而发挥抗炎作用^[16]和促进肿瘤细胞凋亡作用^[11],笔者还观察到白杨素活化 p53 促进肿瘤细胞凋亡^[12]。NF- κ B 和 p53 均可作为转录因子调节凋亡相关基因的表达,影响肿瘤细胞凋亡。NF- κ B 可以调节系列凋亡抑制基因,如 Bcl-2、Bcl-xL、cIAPs、xIAP、FLIP^[17]的表达。体内研究和体外研究也观察到白杨素具有下调凋亡抑制蛋白 Bcl-xL、FLIP 表达的能力^[18-19]。NF- κ B 活性与喜树碱的化疗耐药性同样有密切关系,喜树碱可以活化 NF- κ B,而抑制 NF- κ B 活性可

明显促进喜树碱对肿瘤细胞活性的抑制^[20-21]。白杨素是否可以通过抑制喜树碱活化的 NF- κ B 活性而下调其下游的凋亡抑制蛋白的表达,从而达到白杨素与喜树碱的联合促凋亡作用尚不明确。凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 主要通过改变线粒体膜的通透性而影响内源凋亡途径^[22],本研究观察到白杨素联合喜树碱可抑制由单独喜树碱上调的凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 的表达,内源凋亡更为活跃。但白杨素联合喜树碱具体以什么方式影响 Bcl-xL 表达还需要深入的探讨。

通过本研究证实白杨素联合喜树碱可以有效促进鼻咽癌 CNE2 细胞凋亡,抑制 NF- κ B 活性、下调凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 的表达是其重要的分子机制。通过本研究希望能为开发传统中药活性成分、传承中医食疗理念、解决鼻咽癌对喜树碱耐药性的问题做出有意义的探索,为白杨素的进一步开发利用提供理论基础。

参考文献

- [1] 洗献清, 谢民强, 江 刚. 鼻咽癌化疗现状及进展 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2013, 27(3): 164-168.
- [2] 韦军葆. 放疗联合羟基喜树碱治疗早期鼻咽癌的疗效分析 [J]. 重庆医学, 2015, 44(1): 94-96.
- [3] 何丽佳, 吴敬波, 文庆莲. 拓扑替康不同时间给药对人鼻咽癌细胞放射增敏作用的实验研究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(6): 511-513.
- [4] Grivicich I, Mans D R, Peters G J, et al. Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2001, 34(9): 1087-1103.
- [5] Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(1): 82-95.
- [6] Zeng W, Yan Y, Zhang F, et al. Chrysin promotes osteogenic differentiation via ERK/MAPK activation [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(7): 539-547.
- [7] Yang F, Jin H, Pi J, et al. Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin-organogermanium (IV) complex in MCF-7 cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(20): 5544-5551.
- [8] Pichichero E, Cicconi R, Mattei M, et al. Chrysin-induced apoptosis is mediated through p38 and Bax activation in B16-F1 and A375 melanoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(2): 473-483.
- [9] Ren J, Cheng H, Xin W Q, et al. Induction of apoptosis by 7-piperazinethylchrysin in HCT-116 human colon cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(5): 1719-1726.
- [10] Li X, Wang J N, Huang J M, et al. Chrysin promotes tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis in human cancer cell lines [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(3): 630-635.
- [11] Li X, Huang Q, Ong C N, et al. Chrysin sensitizes tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human tumor cells via suppression of nuclear factor-kappa B [J]. *Cancer Lett*, 2010, 293(1): 109-116.
- [12] Li X, Huang J M, Wang J N, et al. Combination of chrysin and cisplatin promotes the apoptosis of Hep G2 cells by up-regulating p53 [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 232: 12-20.
- [13] Gao A M, Ke Z P, Shi F, et al. Chrysin enhances sensitivity of BEL-7402/ADM cells to doxorubicin by suppressing PI3K/Akt/Nrf2 and ERK/Nrf2 pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 206(1): 100-108.
- [14] Jung Y H, Heo J, Lee Y J, et al. Quercetin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells via increased protein stability of death receptor 5 [J]. *Life Sci*, 2010, 86(9/10): 351-357.
- [15] 李小林, 徐玉英, 孙向珏, 等. 木犀草素增强顺铂诱导的人肺癌细胞 A549 凋亡作用 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 431-433.
- [16] Ali N, Rashid S, Nafees S, et al. Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 385(1/2): 215-223.
- [17] Lee C H, Jeon Y T, Kim S H, et al. NF- κ B as a potential molecular target for cancer therapy [J]. *Biofactors*, 2007, 29(1): 19-35.
- [18] Pal-Bhadra M, Ramaiah M J, Reddy T L, et al. Plant HDAC inhibitor chrysin arrest cell growth and induce p21WAF1 by altering chromatin of STAT response element in A375 cells [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 180.
- [19] Khan M S, Devaraj H, Devaraj N. Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 251(1): 85-94.
- [20] Chen M C, Lee N H, Ho T J, et al. Resistance to irinotecan (CPT-11) activates epidermal growth factor receptor/nuclear factor kappa B and increases cellular metastasis and autophagy in LoVo colon cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2014, 349(1): 51-60.
- [21] Jayasooriya R G, Park S R, Choi Y H, et al. Camptothecin suppresses expression of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in DU145 cells through PI3K/Akt-mediated inhibition of NF-kappaB activity and Nrf2-dependent induction of HO-1 expression [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015, 39(3): 1189-1198.
- [22] Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(12): 1001-1012.