

黄芩素对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖和凋亡的影响

余展鹏¹, 宋方茗³, 蔡琰¹, 孟盈¹, 黄夏宁², 黄元姣^{2*}

1. 广西医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 广西 南宁 530021

2. 广西医科大学生命科学研究院, 广西 南宁 530021

3. 广西医科大学 再生医学研究中心, 广西 南宁 530021

摘要: **目的** 研究黄芩素对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨其阻滞细胞周期和诱导凋亡的机制。 **方法** 通过 CCK-8 法和克隆形成实验检测黄芩素对 CNE2 细胞增殖的影响, 流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞周期变化, 荧光显微镜观察细胞形态改变, 试剂盒检测 Caspase-3 蛋白活性变化, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 P53、P21、CDK2、Caspase-3 mRNA 表达情况。 **结果** 黄芩素对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖具有显著的抑制作用, 且呈剂量和时间依赖性, 与对照组比较, 不同浓度的黄芩素作用于 CNE2 细胞 48 h 后, 细胞出现典型的凋亡特征, 并出现周期阻滞, Caspase-3 活性增强, P53 及其下游基因 P21、Caspase-3 mRNA 表达水平增高, CDK2 mRNA 表达水平下降。 **结论** 黄芩素可抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖, 可能是通过上调 P53 表达诱导细胞凋亡并阻滞细胞周期于 S 期。

关键词: 黄芩素; 鼻咽癌; 凋亡; 细胞周期; P53

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)04-0879-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.021

Effects of baicalein on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells

YU Zhan-peng¹, SONG Fang-ming³, CAI Yan¹, MENG Ying¹, HUANG Xia-ning², HUANG Yuan-jiao²

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Life Sciences Institute, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. Research Centre for Regenerative Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: Objective To investigate the anti-proliferation effect of baicalein in nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells and to clarify its mechanisms of cell cycle arrest and apoptosis. **Methods** The proliferative activity was detected by CCK-8 assay, and the changes of cell morphology was observed under fluorescence microscope. The rate of apoptosis and the cycle arrest were detected by flow cytometry, and caspase-3 activity was detected by caspase-3 activity kit. Expression of related genes (P53, P21, CDK2, and Caspase-3) at the RNA level were detected by using qRT-PCR. **Results** Baicalein had a significant inhibitory proliferation effect on CNE2 cells, which was the dose and time-dependent. After 48 h treatment with different concentrations of baicalein, the cells showed obvious apoptotic characteristics, with the increase of apoptotic cells, the activity of caspase-3 was increased, and S phase cells increase. Compared with the control group, the mRNA expression of P53, P21 and Caspase-3 increased, and mRNA expression of CDK2 decreased. **Conclusion** Baicalein could inhibit the proliferation of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells, and may induce apoptosis and cell cycle arrest in S phase by up regulating the expression of P53.

Key words: baicalein; nasopharyngeal carcinoma; apoptosis; cell cycle; P53

鼻咽癌是我国中南部地区常见的颈部恶性肿瘤, 要治疗手段, 但治疗副作用大^[1], 因此, 寻找疗效好其恶性程度高、进展快。放疗辅以化疗是鼻咽癌的主 且副作用小的抗肿瘤药物是临床上亟待解决的问题。

收稿日期: 2017-07-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260405); 广西自然科学基金项目 (2015GXNSFAA139215); 广西生物靶向诊治研究重点实验室开放课题 (GXSWBX201502)

作者简介: 余展鹏 (1991—), 男, 硕士研究生。Tel: 15920898897 E-mail: zhapey@gmail.com

*通信作者 黄元姣 (1964—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师。Tel: 15007717936 E-mail: hyjxmu@126.com

黄芩是唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 研究显示其具有抗炎、抗氧化、抗病原微生物及抗肿瘤等作用^[2], 而黄芩素 (baicalein) 是其主要活性成分之一, 也是其发挥药理作用的物质基础。近年来国内外研究显示, 黄芩素可抑制乳腺癌、舌鳞癌、胰腺癌、皮肤鳞癌等多种肿瘤细胞增殖, 并诱导其凋亡, 是一种理想的抗肿瘤药物^[3], 但目前尚无关于黄芩素对鼻咽癌的作用及其机制的研究。本实验以低分化鼻咽癌 CNE2 细胞作为研究对象, 探讨黄芩素对 CNE2 细胞增殖和凋亡的影响, 为黄芩素成为廉价有效的抗鼻咽癌药物提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞及药物

CNE2 细胞系购自中南大学湘雅中心实验室细胞库, 在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 每 1~2 天换液 1 次。

对照品黄芩素购自成都普瑞法科技开发有限公司, 用 DMSO 配制成 100 mmol/L 储存液储存, 使用前以 PBS 稀释成 10 mmol/L 母液。

1.2 试剂及仪器

二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司); CCK8 试剂盒 (日本同仁化学研究所); Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit、Cell Cycle Assay Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; Hoechst 33258 染色液、Caspase-3 活性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 逆转录试剂盒 (日本 Takara 公司); Fast Start Universal SYBR Green Master (德国 Roche 公司); 低温生化培养箱 (上海精宏实验设备公司); SW-CJ-1F 单人双面超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); TProfessional standard 96 Gradient PCR 仪 (德国 Biometra 公司); C6 Flow Cytometer 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Realplex4 荧光定量 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 细胞生长抑制曲线绘制

取对数生长期的 CNE2 细胞, 制成单细胞悬液, 以 5 000 个/孔接种在 96 孔培养板中, 待细胞贴壁 12 h 后, 将培养基分别替换为含黄芩素 100.0、50.0、25.0、12.5、10.0、7.5、5.0、2.5、1.0 μmol/L (最高浓度组 DMSO 为 0.1%) 的完全培养基 100 μL, 对

照组加入等体积含 0.1% DMSO 的完全培养基, 每组设 3 个复孔。置于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度下培养 24、48、72 h 后, 吸出含药培养基, PBS 冲洗后, 按 CCK8 使用说明加入 100 μL RPMI 1640 培养基与 10 μL CCK8 孵育 90 min, 于 450 nm 测定其吸光度 (A) 值, 根据公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{加药}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 平板克隆形成实验

取对数生长期的 CNE2 细胞, 以 700 个/孔接种于 6 孔培养板, 待细胞贴壁 12 h 后, 将培养基替换为含黄芩素 12.5、10.0、7.5、5.0 μmol/L 的完全培养基 1.5 mL, 对照组加入等体积含 0.1% DMSO 的完全培养基, 置于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度下培养 13 d, 吸出含药培养基, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫染色。低倍镜下计数克隆数并计算克隆形成率。

$$\text{克隆形成率} = \text{克隆数} / \text{接种细胞数}$$

2.3 Annexin V 和 PI 双染色检测细胞凋亡

CNE2 细胞以 5×10⁴ 个/孔接种在 6 孔培养板中, 待细胞贴壁 12 h 后, 替换为含黄芩素 100、75、50 μmol/L 的完全培养基 1.5 mL, 对照组加入等体积含 0.1% DMSO 的完全培养基, 置于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度下培养 48 h 后, 收集细胞, 离心后用预冷 PBS 洗涤 2 次, 按试剂盒说明书要求加入 100 μL 1×Binding buffer 重悬细胞, 并加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染色液, 混匀后, 置于室温避光反应 10 min, 最后加入 400 μL 1×Binding buffer, 混匀后使用流式细胞仪检测。

2.4 Hoechst 33258 荧光染色检测细胞凋亡

CNE2 细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔培养板, 待细胞贴壁 12 h 后, 替换为含黄芩素 100、75、50 μmol/L 的完全培养基 100 μL, 对照组加入等体积含 0.1% DMSO 的完全培养基, 每组 3 个复孔, 置于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度下培养 48 h 后, 加入 Hoechst 33258 染色液 100 μL, 继续孵育 30 min, 置于荧光显微镜下观察。

2.5 PI 染色检测细胞周期

细胞前期处理同“2.3”项下, 收集细胞, 离心后用预冷 PBS 洗涤 2 次, 按试剂盒说明书要求加入 -20 °C 乙醇, -20 °C 固定过夜, 检测前洗去乙醇, 以 PBS 重悬细胞, 以 RNase 处理 30 min 后, 加入 PI 于 4 °C 避光染色 60 min, 使用流式细胞仪检测。

2.6 Caspase-3 蛋白活性检测

细胞前期处理同“2.3”项下，收集细胞，离心后用预冷 PBS 洗涤 1 次，冰浴裂解 1 h 后，离心收集上清，测定蛋白浓度，调整蛋白浓度至各组一致，按试剂说明书要求操作，于 405 nm 测定其 A 值，计算 Caspase-3 活性。

2.7 qRT-PCR 定量分析细胞周期及凋亡相关基因

细胞前期处理同“2.3”项下，收集细胞，提取细胞总 RNA 并逆转录为 cDNA。利用表 1 所示引物进行荧光定量分析，反应程序为 95 °C 预变性 10 min；95 °C、15 s；60 °C、1 min；循环 40 次。每组设 3 个复孔，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因 mRNA 相对水平。

表 1 引物序列信息

Table 1 Information of primer

引物名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')	产物大小/bp
GAPDH	GAGTCCACTGGCGTCTTCA	GGGGTGCTAAGCAGTTGGT	190
P53	TCAACAAGATGTTTTGCCAACTG	ATGTGCTGTGACTGCTTGTAGATG	118
P21	CCTCATCCCGTGTTCCTTT	GTACCACCCAGCGACAAGT	97
CDK2	CCAGGAGTTACTTCTATGCCTGA	TTCATCCAGGGGAGGTACAAC	90
Caspase-3	AGAAGTGGACTGTGGCATTGAG	GCTTGTCCGCATACTGTTTCAG	191

2.8 统计学分析

使用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析，两组间分析使用 *t* 检验，组间分析使用单因素方差分析。

3 结果与分析

3.1 黄芩素对 CNE2 细胞生长的影响

以不同浓度的黄芩素作用于 CNE2 细胞，分别检测 24、48、72 h 的细胞增殖抑制率，如图 1 所示，随着时间的延长及黄芩素浓度的升高，细胞增殖抑制率逐渐上升，显示其抑制增殖作用具有一定的时间依赖性和剂量依赖性。

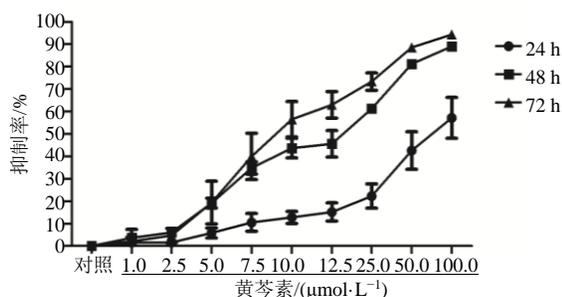


图 1 黄芩素对 CNE2 细胞的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effect of baicalein on proliferation of CNE2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 黄芩素对 CNE2 细胞克隆形成的影响

不同浓度的黄芩素作用于 CNE2 细胞 13 d，结果如图 2 和表 2 所示，与对照组比较，CNE2 细胞的克隆形成率随黄芩素浓度升高而下降，当浓度达到 10.0 μmol/L 时仅见 3~5 个细胞克隆，12.5 μmol/L 时未见细胞克隆形成。

分别为 (8.47 ± 0.93%)、(10.54 ± 3.12)%、(24.71 ± 3.66)%，均较对照组 (6.32 ± 1.22)% 增加，且随药物浓度增加，早、晚期凋亡细胞及坏死细胞比例逐步上升，呈浓度依赖性。

3.3 黄芩素对 CNE2 细胞凋亡的影响

Annexin V 和 PI 双染色实验结果 (图 3) 显示，50、75、100 μmol/L 黄芩素作用于 CNE2 细胞 48 h 后，加药组细胞均出现不同程度的凋亡，凋亡率

黄芩素作用于 CNE2 细胞 48 h，以 Hoechst 33258 染色，于荧光显微镜下观察细胞形态，结果如图 4 所示，对照组细胞可偶见核致密浓染，而加药组细胞均出现大量染色质固缩浓染，或呈边集化、新月状，显示 50 μmol/L 及以上浓度的黄芩素具有较强的诱导 CNE2 细胞凋亡作用。

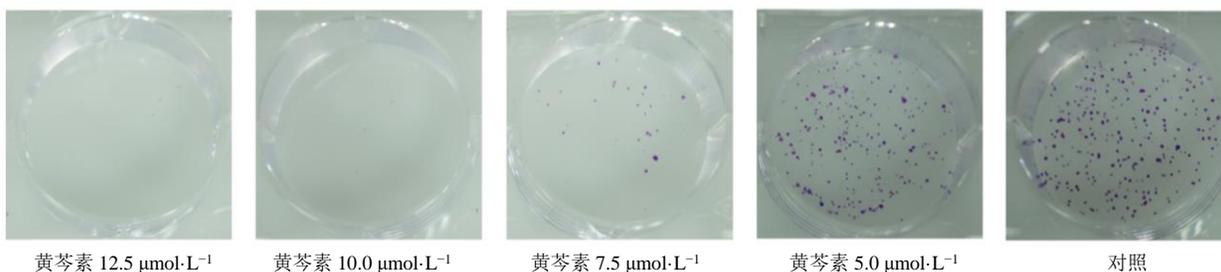


图 2 黄芩素对 CNE2 细胞克隆形成的影响

Fig. 2 Effect of baicalein on colony formation of CNE2 cells

表 2 黄芩素对 CNE2 细胞克隆形成率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of baicalein on cloning efficiency of CNE2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	克隆形成数	克隆形成率/%
对照	0	300 ± 15	60.07 ± 2.93
黄芩素	5.0	226 ± 31	45.10 ± 6.10**
	7.5	23 ± 4	4.53 ± 0.67**
	10.0	3 ± 1	0.51 ± 0.09**
	12.5	0	0

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

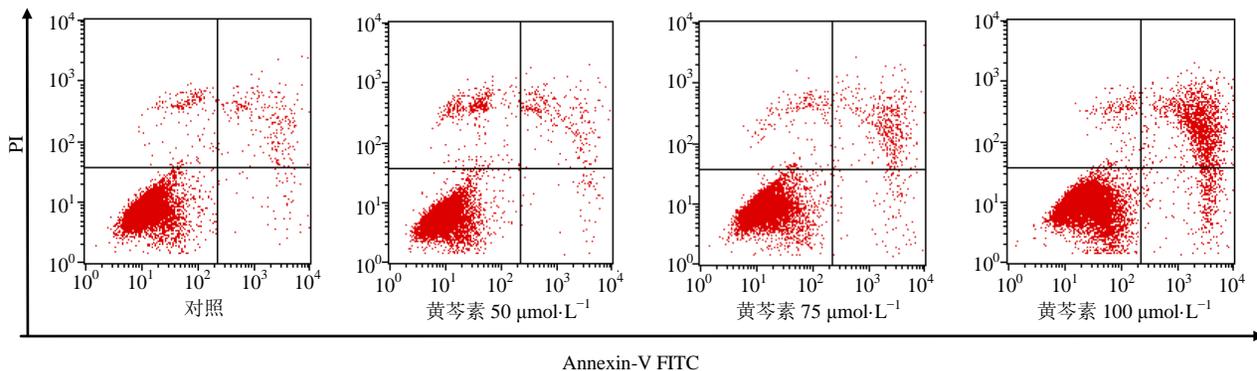


图 3 黄芩素对 CNE2 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of baicalein on apoptosis of CNE2 cells

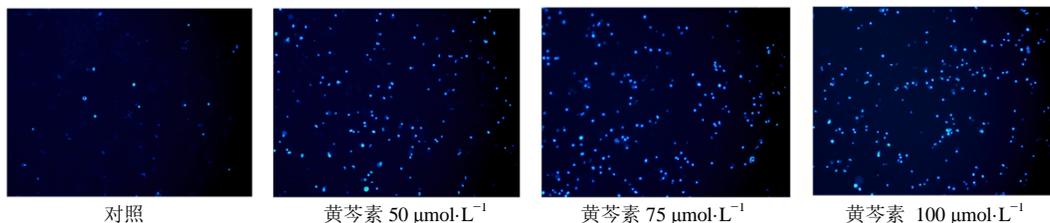
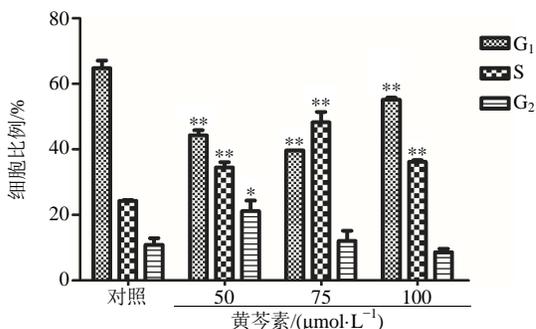


图 4 荧光显微镜下黄芩素作用 CNE2 细胞 48 h 后细胞形态变化 (10 × 40)

Fig. 4 Morphological changes of CNE2 cells affected by baicalein 48 h under fluorescence microscope (10 × 40)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 5 黄芩素对 CNE2 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of baicalein on cell cycle of CNE2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 黄芩素对 CNE2 细胞周期的影响

结果如图 5 所示, 与对照组比较, 50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素分别作用 CNE2 细胞 48 h, 各组细胞均出现不同程度的细胞周期改变, G_1 期细胞减少, S 期细胞增多, 结合其对 CNE2 细胞生长的抑制作用, 表明细胞被阻滞在 S 期。

3.5 黄芩素对 CNE2 细胞 Caspase-3 蛋白活性的影响

结果如图 6 所示, 与对照组相比, 各加药组细胞每单位蛋白浓度的 Caspase-3 活性分别提高 (1.12 ± 0.40)、(1.31 ± 0.70) 及 (1.68 ± 0.90) 倍。

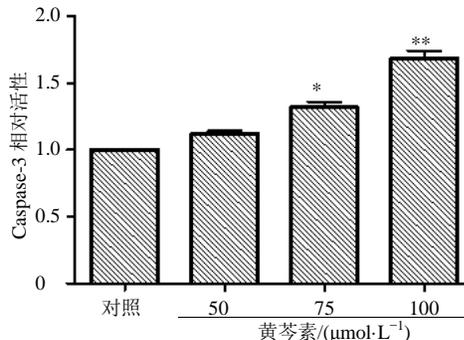


图 6 黄芩素对 CNE2 细胞 Caspase-3 蛋白活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of baicalein on activity of Caspase-3 protein in CNE2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 黄芩素对 CNE2 细胞周期及凋亡相关基因 mRNA 表达的影响

结果如图 7 所示, 与对照组比较, 加药组细胞 P53、P21 及 Caspase-3 mRNA 表达升高, 且 CDK2 mRNA 表达下降。

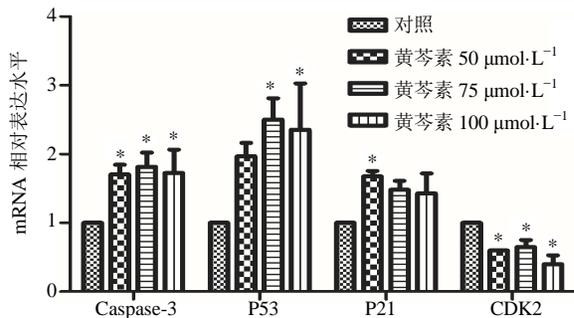


图 7 黄芩素对 CNE2 细胞细胞周期及凋亡相关基因 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of baicalein on expression of cell cycle and apoptosis-associated genes on CNE2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

放疗结合化疗是目前鼻咽癌的主要治疗手段, 但这种常规的治疗手段往往会产生较为严重的不良反应, 且长期治疗后肿瘤细胞容易产生放射抵抗和耐药性。天然抗肿瘤药物是目前国内外的研究热点, 具有能够抑制肿瘤细胞增殖、诱导其凋亡且毒副作用小等优点^[4], 因此筛选天然抗肿瘤中药单体化合物具有重要意义。

Guo 等^[5]和 An 等^[6]报道黄芩素可抑制前列腺癌、乳腺癌细胞增殖。本研究以不同浓度的黄芩素作用 CNE2 细胞, CCK-8 法检测细胞活性, 结果显示黄芩素对 CNE2 细胞亦有抑制增殖作用, 并呈时间-剂量依赖关系。Zhang 等^[7]研究表明, 黄芩素可以减弱食管癌 EC-109 细胞的干性, 抑制其克隆形成, 本研究使用较低浓度的黄芩素作用 CNE2 细胞, 结果显示 5 $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素持续作用 13 d 可以明显抑制 CNE2 细胞克隆形成能力, 当浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 几乎已无克隆形成, 说明低浓度黄芩素即可减弱鼻咽癌细胞 CNE2 的干性, 抑制其增殖。

黄芩素可以通过多种途径抑制肿瘤细胞增殖, 且机制复杂多样, 有研究指出黄芩素可通过阻滞细胞周期抑制淋巴瘤细胞增殖^[8], 也有研究指出黄芩素可以增加细胞内活性氧 (ROS), 从而产生氧化应激损伤诱导膀胱癌细胞凋亡^[9], 还有研究指出黄芩素可以通过激活 Notch 信号通路抑制淋巴瘤细胞增

殖^[10]。本研究为探讨黄芩素抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的方式, 分别进行了细胞凋亡和细胞周期的研究。Annexin-V FITC/PI 双标记流式细胞术检测结果显示, 随着黄芩素的浓度增加, 早期和晚期凋亡细胞比例均高于对照组, 且 Hoechst 33258 染色结果显示细胞出现典型凋亡现象, 说明黄芩素可诱导鼻咽癌细胞凋亡。以相同浓度的黄芩素作用鼻咽癌细胞 CNE2, 细胞内 Caspase-3 mRNA 表达水平随着药物浓度增加而上调, 其蛋白活性随着药物浓度增加而增强, 结果提示黄芩素可通过 Caspase 依赖途径诱导细胞凋亡。

以不同浓度的黄芩素作用 CNE2 细胞并进行细胞周期检测, 结果显示黄芩素可将 CNE2 细胞阻滞于 S 期。且黄芩素作用后的鼻咽癌 CNE2 细胞中 P53、P21 mRNA 上调, 而 CDK2 mRNA 下调。P53 是细胞内关键的肿瘤抑制基因, 对细胞的增殖、分化和凋亡都起着重要的调控作用^[11], 而 P21 基因受 P53 调控, 它的表达产物几乎能和所有 Cyclin-CDK 复合物结合, 从而抑制蛋白激酶活性, 引起细胞周期阻滞^[12]。CDK2 的表达产物则是 CDKs 蛋白家族的重要成员, 与 Cyclin A 形成的复合物是细胞从 S 期过渡到 G₂/M 期所必需的细胞周期正性调节因子^[13]。黄芩素可上调 P53 的表达, 从而上调 P21 的表达, 继而抑制 CDK2 的表达, 使 CNE2 细胞阻滞于 S 期。

综上所述, 黄芩素可以抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖, 其机制可能是通过上调 P53 的表达从而诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞。

参考文献

- [1] Wu F, Wang R, Lu H, et al. Concurrent chemoradiotherapy in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: Treatment outcomes of a prospective, multicentric clinical study [J]. *Radiother Oncol*, 2014, 112(1): 106-111.
- [2] 闫明亮, 周玉枝, 李明花, 等. 基于 1H-NMR 代谢组学的黄芩醇提取物延长果蝇寿命研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(10): 1714-1722.
- [3] Liu H, Dong Y, Gao Y, et al. The fascinating effects of baicalein on cancer: A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, doi: 10.3390/ijms17101681.
- [4] 秦 峥, 郑尚季. 抗肿瘤中药单体研究进展 [J]. *中国药物评价*, 2014, 31(2): 89-91.
- [5] Guo Z, Hu X, Xing Z, et al. Baicalein inhibits prostate cancer cell growth and metastasis via the caveolin-1/Akt/mTOR pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 406(1):

- 111-119.
- [6] An H, Yu X, Xiang C, *et al.* Baicalein and U0126 suppress human breast cancer cell line MCF-7 through regulating MAPK signaling pathway [J]. *Inter J Clin Exp Med*, 2016, 9(10): 10266-10273.
- [7] Zhang H B, Lu P, Guo Q Y, *et al.* Baicalein induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells through modulation of the PI3K/Akt pathway [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(2): 722-728.
- [8] Yu C, Zeng J, Yan Z, *et al.* Baicalein antagonizes acute megakaryoblastic leukemia *in vitro* and *in vivo* by inducing cell cycle arrest [J]. *Cell Biosci*, 2016, 6(1): 1-9.
- [9] Choi E O, Park C, Hwang H J, *et al.* Baicalein induces apoptosis via ROS-dependent activation of caspases in human bladder cancer 5637 cells [J]. *Inter J Oncol*, 2016, 49(3): 1009-1018.
- [10] Wang A M, Ku H H, Liang Y C, *et al.* The autonomous notch signal pathway is activated by baicalin and baicalein but is suppressed by niclosamide in K562 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(4): 682-692.
- [11] Levine A J, Momand J, Finlay C A. The p53 tumour suppressor gene [J]. *Nature*, 1991, 351(6326): 453-456.
- [12] Radhakrishnan S K, Feliciano C S, Najmabadi F, *et al.* Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle [J]. *Oncogene*, 2004, 23(23): 4173-4176.
- [13] Schwartz G K, Shah M A. Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(36): 9408-9421.