

• 药理与临床 •

蛇床子素对低分化鼻咽癌 CNE2 干细胞增殖、放疗敏感性的影响

陈炯玉, 张 凡, 庄轶轩, 陈 鑑, 洪超群*

汕头大学医学院附属肿瘤医院 肿瘤研究中心实验室, 广东 汕头 515041

摘要: **目的** 探讨蛇床子素对低分化鼻咽癌 CNE2 干细胞增殖、放疗敏感性的影响及其机制。**方法** 采用无血清培养基分离培养低分化鼻咽癌 CNE2 细胞的干细胞; 流式细胞仪检测干细胞表面标记物 CD44⁺/CD24^{low} 的表达和乙醛脱氢酶(ALDH)活性; MTT 检测不同质量浓度(0、20、40、80 μg/mL)蛇床子素处理后, CNE2 干细胞增殖能力的差异; 克隆形成实验检测蛇床子素(40 μg/mL)联合放疗后(0、2、5 Gy), CNE2 干细胞克隆形成能力的差异; Western blotting 法检测不同质量浓度蛇床子素处理、蛇床子素联合不同放射剂量放疗后, 鼻咽癌 CNE2 干细胞中 p-GSK-3β、β-catenin、Cyclin D1 蛋白的表达水平。**结果** 在无血清培养基中可分离培养稳定传代的低分化鼻咽癌 CNE2 干性细胞。细胞 CD44⁺/CD24^{low}、ALDH⁺的表达高于亲本细胞($P < 0.05$); MTT 结果显示, 与对照组相比, 不同质量浓度的蛇床子素作用不同时间后, 干细胞增殖抑制率明显增加($P < 0.05$), 且随着蛇床子素质量浓度的增加及作用时间的延长, 其抑制作用增强($P < 0.05$); 克隆形成实验结果显示, 与对照组相比, 各给药组干细胞克隆形成率均明显降低, 蛇床子素+放疗组显著低于蛇床子素组及放疗组($P < 0.05$); Western blotting 检测结果显示, 随着蛇床子素质量浓度的增加, 放射剂量的增加, 与对照组相比, 干细胞 p-GSK-3β、β-catenin、Cyclin D1 的蛋白表达水平均明显降低, 蛇床子素+放疗组显著低于蛇床子素组及放疗组($P < 0.05$); **结论** 蛇床子素能有效抑制低分化鼻咽癌 CNE2 干细胞的增殖并促进其放疗敏感性, 其机制可能是蛇床子素抑制肿瘤干细胞 p-GSK-3、β-catenin、Cyclin D1 蛋白的表达, 从而抑制了干细胞增殖, 促进了放疗敏感性。

关键词: 蛇床子素; 鼻咽癌; 干细胞; 细胞增殖; 放疗敏感性**中图分类号:** R285.5**文献标志码:** A**文章编号:** 0253-2670(2018)16-3854-07**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.019**Effect of osthole on proliferation and radiosensitivity of poorly differentiated CNE2 stem cells from nasopharyngeal carcinoma**

CHEN Jiong-yu, ZHANG Fan, ZHUANG Yi-xuan, CHEN Jian, HONG Chao-qun

Cancer Research Laboratory, Cancer Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect and the underlying mechanism of osthole on the proliferation and radiosensitivity of CNE2 stem cells, one of the poorly differentiated cell lines from nasopharyngeal carcinoma. **Methods** Poorly differentiated CNE2 stem cells were isolated and cultured in serum-free medium (SFM). Flow cytometry was used to detect biomarkers (CD44⁺/CD24^{low}) of stem cells and the activity of ALDH. CNE2 stem cells was treated with different concentrations of osthole (0, 20, 40, 80 μg/mL), and then subject to MTT assay. Additionally, CNE2 stem cell was treated with 40 μg/mL osthole plus different dose of radiation (0, 2, 5 Gy) followed by colony formation assay. Consequently, Western blotting was used to detect the difference of pGSK-3β, β-catenin, and Cyclin D1 protein expression in CNE2 stem cells after the treatment of osthole with or without radiation. **Results** Poorly differentiated CNE2 stem cells isolated and cultured in serum-free medium (SFM) could be passaged stably. The ratio of CD44⁺/CD24^{low} and the activity of ALDH were significantly higher in CNE2 stem cells than that in the parental cells ($P < 0.05$). Compared to the control group, osthole could obviously suppress the proliferation of CNE2 stem cells in a dose and time dependent manner ($P < 0.05$). Moreover, colony formation assay revealed that inhibition rate of CNE2 stem cell colony formation was highest after the treatment of osthole plus radiation, followed by the treatment of osthole or radiation alone ($P < 0.05$).

收稿日期: 2017-12-22

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81602886); 广东省自然科学基金项目(2016A030313062); 汕头市科技计划项目(汕府科[2017]166号)

作者简介: 陈炯玉(1979—), 女, 主管技师, 研究方向为肿瘤干细胞耐药机制研究。

*通信作者 洪超群(1980—), 男, 副主任技师, 硕士生导师, 研究方向为肿瘤干细胞耐药机制研究。

Tel: (0754)88555844-1061 E-mail: chaoqunhong@163.com

Western blotting indicated that in contrast to the controls, the expression of pGSK-3 β , β -catenin, and Cyclin D1 protein was mostly down-regulated in the CNE2 stem cells treated with osthole plus radiation, followed by that treated with osthole or radiation alone ($P < 0.05$). **Conclusion** Osthole effectively inhibited the proliferation and increased the radiosensitivity of CNE2 stem cells, probably due to the down-regulation of pGSK-3, β -catenin, and Cyclin D1 in tumor stem cells by osthole.

Key words: osthole; nasopharyngeal carcinoma; stem cells; cell proliferation; radiosensitivity

鼻咽癌是一种起源于鼻咽黏膜上皮的恶性肿瘤,放射治疗是鼻咽癌的主要治疗手段^[1-2]。按照肿瘤干细胞(CSC)理论,鼻咽癌干细胞(NPCSCs)对放疗具有抵抗性,是导致鼻咽癌原位复发和远处转移的根源^[3-5]。蛇床子素($C_{15}H_{16}O_3$)又名7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素,是一种从蛇床子等多种中药中提取分离的纯天然香豆素类化合物。研究表明,蛇床子素是一种低毒且在体内外均有明显抗肿瘤活性的天然化合物^[6-7]。目前蛇床子素抗鼻咽癌的作用研究未见报道。本研究利用离体的低分化鼻咽癌CNE-2细胞株探讨蛇床子素对鼻咽癌干细胞放射增敏的可能性,为鼻咽癌治疗药物的研发提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人低分化鼻咽癌细胞CNE2为本实验室瘤株。

1.2 药品与主要试剂

蛇床子素(质量分数 $\geq 98\%$, Sigma公司); MDEM/F12培养基、胎牛血清、RPIM 1640培养基(Gibco公司); B27、表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF, Invitrogen公司); Anti-CD44-FITC、Anti-CD24-PE抗体(BD公司); 乙醛脱氢酶(ALDH)的细胞检测试剂盒(STEMCELL公司); GSK-3 β 、p-GSK-3 β (Ser9)、 β -catenin、Cyclin D1(CST公司); 青链霉素混合液(Solarbio公司)。

2 方法

2.1 培养基及药品的配制

完全培养液(SSM):含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的RPIM 1640培养基;无血清培养液(SFM):MDEM/F12培养基中加入双抗、20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF、2% B27;蛇床子素用无菌注射用水配制成150 mg/L,用0.22 μ m一次性微孔过滤器滤过,4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

2.2 鼻咽癌CNE2细胞常规贴壁培养

将人鼻咽癌CNE2细胞置于SSM培养液中,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度下培养,细胞每2天更换培养液1次,每3天用0.25%胰蛋白酶消化、离心、重悬后传代。

2.3 鼻咽癌CNE2干细胞系微球体培养

将贴壁生长的鼻咽癌CNE2细胞,用0.25%胰蛋白酶消化后吹打成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,接种于含新鲜SFM的低黏附6孔板中于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度下培养,观察微球形成情况,每2天半量换液,每6天传代。传代时离心收集微球体,后弃去半量陈旧培养基,加入等量新鲜SFM,吹打成单细胞悬液传代培养;仍以 1×10^4 个/mL密度接种至新鲜SFM中,继续培养,观察细胞微球体生长情况。

2.4 干细胞表面标记物CD44⁺/CD24^{low}、ALDH检测

收集传代培养5代以上的CNE2干细胞和亲本细胞,消化为单细胞悬液,1 000 r/min,离心5 min,弃上清,用冷PBS洗涤细胞2次,PBS重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。

2.4.1 CD44⁺/CD24^{low}检测 两组细胞分别各加5 μ L CD44-FITC和CD24-PE,以不加抗体为空白组,每组细胞设3个平行样本,轻轻混匀后于2~8 $^{\circ}$ C避光孵育,30 min后,用预冷PBS洗涤2次,加入1 mL PBS重悬细胞,流式细胞仪检测,实验重复3次。

2.4.2 ALDH检测 两组细胞分别以1 000 r/min离心5 min后,用1 mL ALDEFLUORTM Assay Buffer重悬细胞。向阴性对照组中加入ALDEFLUORTM DEAB Reagent 5 μ L;实验组中分别加入5 μ L已激活的ALDEFLUORTM Reagent试剂。37 $^{\circ}$ C水浴锅避光孵育45 min后。1 000 r/min,离心5 min,弃上清,再用0.5 mL ALDEFLUORTM Assay Buffer重悬各组细胞,流式细胞仪检测。实验步骤均为ALDEFLUO试剂盒标准步骤执行。实验重复3次。

2.5 MTT法检测蛇床子素对CNE2干细胞增殖能力的影响

收集培养5代以上的CNE2干细胞球,消化后配成单细胞悬液,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,按每孔100 μ L接种于96孔板中,完全贴壁后换液,并用蛇床子素0、20、40、80 μ g/mL处理,每组设4个复孔,培养24、48、72 h,每孔加入5 mg/mL的MTT 20 μ L,继续培养4 h,弃上清液,加入DMSO(150 μ L),振荡器上轻轻振荡10 min使结晶完全溶

解, 用酶标仪以波长 490 nm 检测吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率。重复实验 3 次。

增殖抑制率 = $1 - \text{蛇床子素组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}$

2.6 平板克隆形成实验检测蛇床子素联合放疗对 CNE2 干细胞克隆形成率的影响

收集培养 5 代以上的 CNE2 干细胞, 消化后调整细胞悬液浓度, 按每孔 200 个细胞, 接种于 6 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 实验分组: 对照组、放疗组 (剂量 2、5 Gy)、蛇床子素组 (40 μg/mL)、联合组 (蛇床子素 40 μg/mL + 2 Gy、蛇床子素 40 μg/mL + 5 Gy), 每组 3 个平行样孔。蛇床子素作用 24 h 后, 电子直线加速器照射, 继续培养 24 h 后更换培养基, 以后每隔 3 d 更换培养基。10 d 后用 4% 甲醛固定 15 min 后, 结晶紫染色 20 min, 冲洗干燥后显微镜下计数 >50 个细胞的克隆数, 计算克隆形成率。重复实验 3 次。

克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数

2.7 Western blotting 法检测蛇床子素联合放疗后 CNE2 干细胞内 GSK-3β、p-GSK-3β、β-catenin 和 Cyclin D1 蛋白的表达水平

收集培养 5 代以上的 CNE2 干细胞球, 消化后调整细胞悬液浓度, 分别接种于 9 个细胞培养瓶中, 实验分组: 对照组、放疗组 (剂量 2、5 Gy)、蛇床子素组 (20、40、80 μg/mL)、联合组 (蛇床子素 40 μg/mL + 2 Gy、蛇床子素 40 μg/mL + 5 Gy)。蛇床子素作用 24 h 后, 电子直线加速器照射, 继续培养 24 h 后, 收集细胞, 以预冷的 PBS 充分洗涤细胞 2 次, 加入 200 μL 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 置冰上裂解 30 min, 用细胞刮刀将细胞刮至一侧, 转移至 EP 管中, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 采用 BCA 法检测蛋白浓度, 分装标记后置于 -80 °C 保存备用。制胶: 配制浓缩胶为 10% 的 SDS-PAGE。上样: 把蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内, 另外加入蛋白 Marker, 上样量 50 ng。电泳: 采用 100 V 恒压电泳。转膜: 100

V 恒压电泳, 转膜时间 180 min。封闭: 5% BSA 封闭液, 常温封闭 1 h。孵育一抗, 抗体 (1:1 000) 稀释后加入, 4 °C 摇床孵育过夜。洗膜: TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。孵育二抗, 抗体 (1:3 000) 稀释后加入, 常温摇床孵育 1 h。洗膜: TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。采用化学发光法显色曝光。采用 Image J 图像分析系统对图像扫描, 各组 CNE2 干细胞中目的蛋白的表达水平以目的蛋白条带的灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值表示。实验重复 3 次。

2.8 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计学软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间计量资料比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD- t 检验, 即最小有意义差异 (least significant difference) t 检验。

3 结果

3.1 鼻咽癌 CNE2 干细胞系微球体形成

将 CNE2 细胞初次接种于含 SFM 的低黏附 6 孔板中, 不同时间点在显微镜下观察发现相似的规律: 细胞悬浮培养 48 h 呈悬浮状态出现小细胞团块, 3 d 后见大部分呈碎渣样死亡的细胞, 少量细胞成团长大, 形态变得规则; 6~8 d 可见由数十个至数百个细胞组成的较大的圆形或卵圆形细胞微球体, 较第 5 天时数量显著增多、细胞间的连接愈加紧密, 形态大小各异, 折光性增强, 悬浮生长。按相同细胞密度传代培养至第 15 天后可见微球体形成增多且细胞球形态结构更圆而致密, 状态更好, 可以稳定传代。取培养 3 代以上的细胞微球进行后续“干性”鉴定和实验。结果见图 1。

3.2 CNE2 干细胞表面标记物 CD44⁺/CD24^{low} 的表达和 ALDH 的活性

亲本细胞 CD44⁺/CD24^{low} 的表达为 (10.50 ± 0.05) %、ALDH⁺ 为 (4.13 ± 0.01) %, 干细胞微球 CD44⁺/CD24^{low} 的表达为 (78.17 ± 0.05) %, ALDH⁺ 为 (30.50 ± 0.10) %, 干细胞微球 CD44⁺/CD24^{low}、ALDH⁺ 表达高于亲本细胞, 差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 2 和 3。

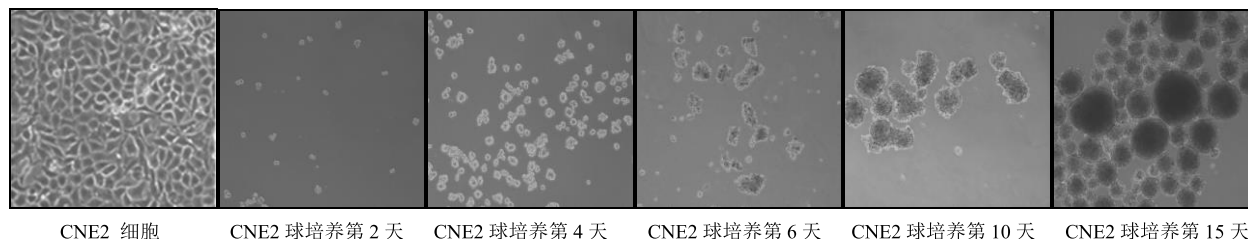
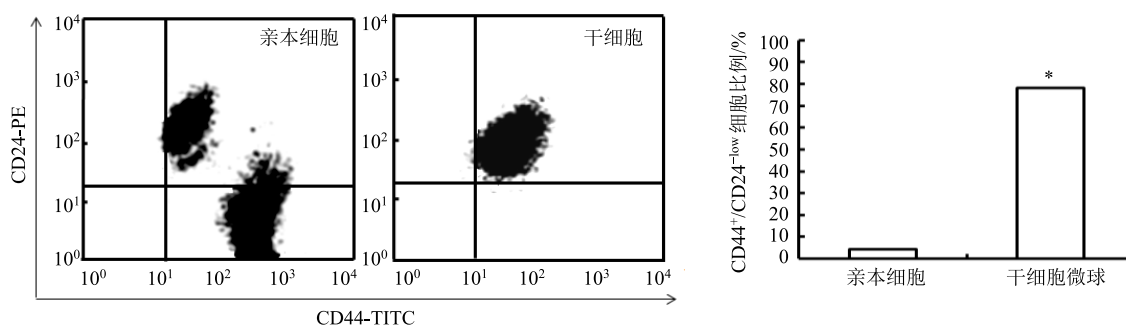


图 1 无血清培养法富集鼻咽癌 CNE2 细胞球生长情况

Fig. 1 Sphere-forming of NPC cells CNE2 in serum-free medium

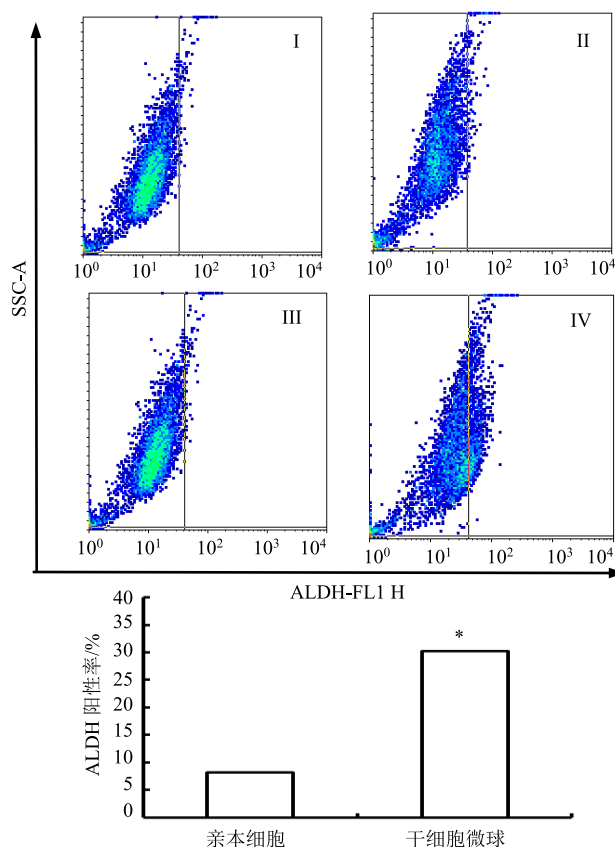


与亲本细胞比较: * $P < 0.05$, 图 3 同

* $P < 0.05$ vs parental cells, same as fig. 3

图 2 流式细胞检测 CD44 和 CD24 在 CNE2 亲本细胞和干细胞球中的表达

Fig. 2 CD44 and CD24 expression in CNE2-parent cells and CNE2 stem cells detected by flow cytometry



I、II-亲本细胞 III、IV-干细胞 I、III-加抑制剂 DEAB II、IV-不加抑制剂

I and II-CNE2-parental cells III and IV-CNE2 stem cells cells I and III-treated with DEAB, the specific ALDH inhibitor II and IV-treated without DEAB

图 3 流式细胞检测 ALDH 在鼻咽癌 CNE2 细胞及干细胞球中的阳性表达

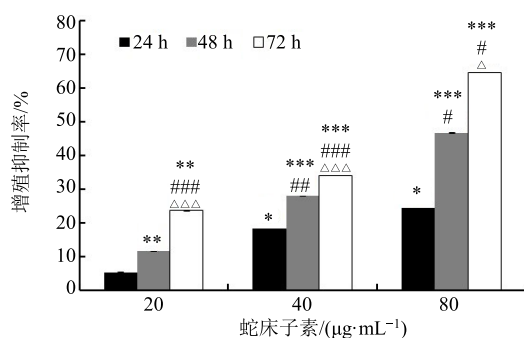
Fig. 3 ALDH expression in CNE2-parent cells and CNE2 stem cells detected by flow cytometry

3.3 蛇床子素对 CNE2 干细胞增殖能力影响

MTT 比色法检测结果显示, 与对照组 (0 $\mu\text{g/mL}$) 比较, 不同质量浓度 (20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 蛇床子素分别作用 24、48、72 h 后, CNE2 干细胞增殖抑制率均明显增加, 其中, 除了蛇床子素 20 $\mu\text{g/mL}$ 作用 24 h 与对照组比较差异不显著外, 蛇床子素其余各质量浓度 (40、80 $\mu\text{g/mL}$) 作用 24 h 分别与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 不同质量浓度蛇床子素 (20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 分别作用 48 h 后, CNE2 细胞增殖抑制率均增加, 差异显著 ($P < 0.01$ 、0.001)。同一质量浓度不同时间比较, 蛇床子素作用 48 h 与作用 24 h 相比, CNE2 细胞增殖抑制率均增加, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。与对照组比较, 不同质量浓度蛇床子素 (20、40、80 $\mu\text{g/mL}$) 分别作用 72 h 后, CNE2 细胞增殖抑制率均增加, 差异显著 ($P < 0.01$ 、0.001)。同一质量浓度间比较, 蛇床子素作用 72 h 与作用 48 h 相比, CNE2 细胞增殖抑制率均增加, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.001)。结果表明蛇床子素对 CNE2 干细胞的增殖抑制作用呈明显的浓度及时间依赖性, 说明蛇床子素可有效抑制鼻咽癌干细胞的增殖。结果见图 4。

3.4 蛇床子素联合放疗对 CNE2 干细胞克隆形成的影响

平板克隆形成实验结果显示, 各组克隆形成率分别为: 对照组 ($56.30 \pm 5.51\%$)、蛇床子素 40 $\mu\text{g/mL}$ 组 ($45.33 \pm 7.02\%$)、2 Gy 组 ($59.00 \pm 2.00\%$)、5 Gy 组 ($43.12 \pm 7.77\%$)、蛇床子素 40 $\mu\text{g/mL}$ + 2 Gy 组 ($22.83 \pm 7.37\%$)、蛇床子素 40 $\mu\text{g/mL}$ + 5 Gy 组 ($12.17 \pm 5.51\%$)。与对照组比较, 其他各组 CNE2



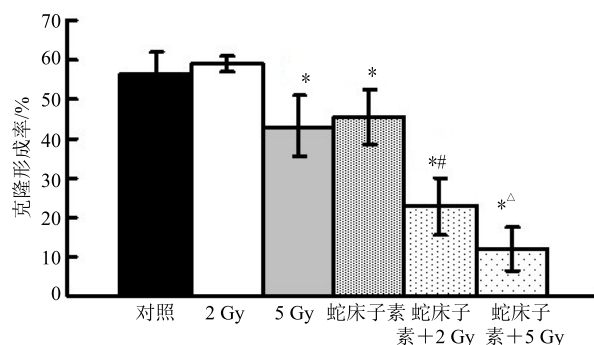
与对照组同一作用时间比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;
与同一质量浓度作用 24 h 比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$;
与同一质量浓度作用 48 h 比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.001$;
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group at the same time;
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs the same concentration of osthole at 24 h;
△ $P < 0.05$ △△ $P < 0.001$ vs the same concentration of osthole at 48 h

图 4 蛇床子素对 CNE2 干细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of osthole on proliferation of CNE2 stem cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

干细胞克隆形成率明显降低,除了放射 2 Gy 组与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$) 外,其余各组与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$);蛇床子素+放疗组的克隆形成率显著低于对照组及其余 3 组,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),说明蛇床子素可有效促进鼻咽癌干细胞对放疗的敏感性。结果见图 5。

3.5 蛇床子素及蛇床子素联合放疗对 CNE2 干细胞内 GSK-3β、p-GSK-3β、β-catenin、Cyclin D1 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示,单用蛇床子素时,随着蛇床子素质量浓度的增加,CNE2 干细胞

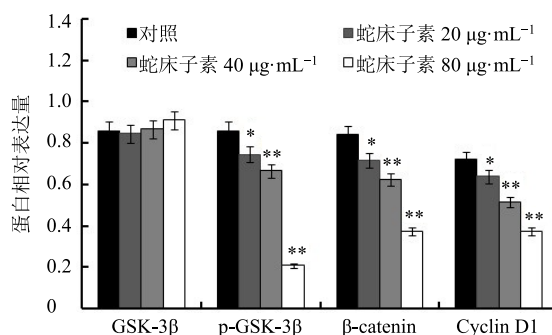
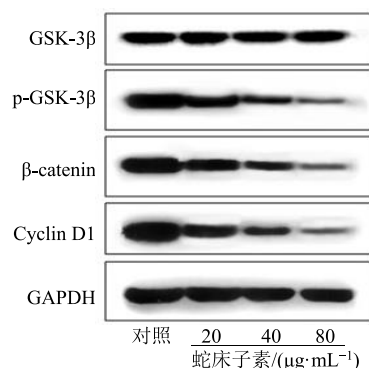


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 2 Gy 组比较: # $P < 0.05$; 与 5 Gy 组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 2 Gy group; △ $P < 0.05$ vs 5 Gy group

图 5 蛇床子素联合放疗对 CNE2 干细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effect of osthole combined with radiotherapy on colony forming of CNE2 stem cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

中 p-GSK-3β、β-catenin、Cyclin D1 蛋白表达水平逐渐下降,与对照组比较,差异均显著 ($P < 0.05$)。蛇床子素联合放疗时,与对照组相比,照射组(剂量 2、5 Gy)、蛇床子素组(40 μg/mL)、联合组(蛇床子素 40 μg/mL+2Gy、蛇床子素 40 μg/mL+5 Gy) CNE2 干细胞中 p-GSK-3β、β-catenin、Cyclin D1 蛋白表达水平逐渐下降。除了 2 Gy 组与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外,其余各组与对照组比较差异均显著 ($P < 0.05$);说明蛇床子素抑制鼻咽癌 CNE2 干细胞的增殖并增加其放疗敏感性,其机制可能与下调 p-GSK-3β、β-catenin、Cyclin D1 蛋白的表达有关,结果见图 6、7。

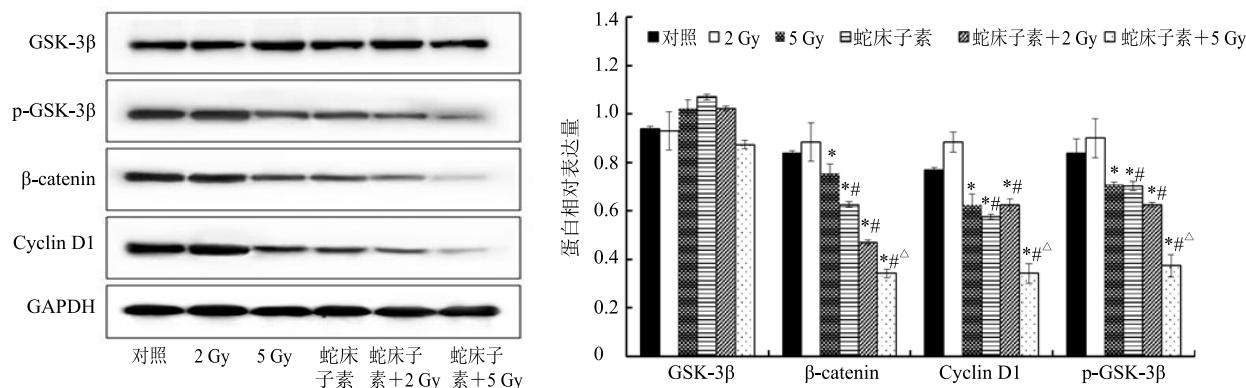


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 6 蛇床子素对鼻咽癌干细胞 GSK-3β、p-GSK-3β、β-catenin、Cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of osthole on expression of GSK-3β, p-GSK-3β, β-catenin, and Cyclin D1 in CNE2 stem cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 2 Gy 组比较: # $P < 0.05$; 与 5 Gy 组比较: △ $P < 0.05$
 * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 2 Gy group; △ $P < 0.05$ vs 5 Gy group

图 7 蛇床子素联合放疗对鼻咽癌干细胞 GSK-3β、p-GSK-3β、β-catenin、Cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 7 Effect of osthole combined with radiotherapy on expression of GSK-3β, p-GSK-3β, β-catenin, and Cyclin D1 in CNE2 stem cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

肿瘤干细胞 (CSCs) 是肿瘤细胞中具有与胚胎干细胞相似的生物学功能的特殊亚群, 具有自我更新能力和多向分化功能, 是肿瘤的起始细胞^[8]。CSCs 存在于多种实体肿瘤中, 实体性肿瘤干细胞具有通过悬浮非贴壁培养方式形成细胞微球的特性, 以及 CD44⁺、CD24^{low}、ALDH⁺等是已知的 CSCs 的标记物; 在多种肿瘤中如乳腺癌、结直肠癌、肝细胞癌、鼻咽癌^[9-10]等被确认。CSCs 是导致肿瘤复发及放化疗抵抗的主要原因^[11]。

蛇床子素可以通过诱导凋亡或细胞周期抑制来抑制各种癌细胞的生长和增殖, 其抗肿瘤的活性研究在国内外均有报道^[6-7], 但对鼻咽癌的抑制活性研究未见文献报道。利用不同质量浓度的蛇床子素对培养 3 代以上的 CNE2 干细胞球进行 MTT 实验, 结果表明, 蛇床子素对鼻咽癌 CNE2 干细胞具有明显的抑制增殖作用。其抑制作用具有明显的浓度及时间依赖性 ($P < 0.05$)。利用单纯 2 Gy 和 5 Gy 放疗和联合 40 μg/mL 的蛇床子素+2 Gy/5 Gy 放疗对 CNE2 干细胞进行实验发现, 蛇床子素+放疗组的克隆形成率显著低于对照组、单纯放疗组和单纯蛇床子素组, 说明蛇床子素可有效促进鼻咽癌干细胞对放疗敏感性。

Wnt/β-catenin 信号通路是调控细胞生长、运动和分化的关键途径, 在胚胎和器官发育以及维持干细胞的自我更新方面起重要作用。且 Wnt/β-catenin 通路在鼻咽癌肿瘤干细胞中起着调节作用^[10]。研究

发现 Wnt/β-catenin 信号通路导致鼻咽癌的发生主要是因为 β-catenin 参与了正常的干细胞增殖与分化过程, 同时在 CSCs 自我更新的能力方面具有关键性作用^[5,12-15]。当 Wnt 与其受体卷曲蛋白 (Frz) 结合后, Frz 作用于胞质内蓬乱蛋白 (Dsh), 该蛋白能够抑制 GSK-3β 的活性, 阻断 β-catenin 的降解途径, 使 β-catenin 在细胞中蓄积, 并进入细胞核, 与 T 细胞因子 (TCF/LEF) 相互作用, 激活下游 CyclinD1 等靶基因的转录, 从而影响细胞周期^[16], 促进肿瘤生长和转移程序。本实验结果表明, 蛇床子素能够下调鼻咽癌 CNE2 干细胞中的 β-catenin 的表达水平, 减少 β-catenin 的蓄积, 其抑制作用与药物质量浓度呈正相关。

正常情况下, β-catenin 在细胞质内保持低表达水平。GSK-3β 能够促使 β-catenin 磷酸化, 加速 β-catenin 降解。当 GSK-3β 被磷酸化而失活后、不能促使 β-catenin 磷酸化降解, 从而导致 β-catenin 在胞质中蓄积并进入细胞核, 促进细胞增殖^[17-18]。本实验结果表明, 蛇床子素对 CNE2 干细胞中的 GSK-3β 的表达无明显的影响作用, 对磷酸化 GSK-3β 却具有浓度依赖性下调作用, 说明蛇床子素可以抑制 CNE2 干细胞中 GSK-3β 磷酸化, 促使 β-catenin 的降解, 阻断 β-catenin 的入核启动下游 cyclinD1 的转录, 从而抑制 CNE2 干细胞的增殖。

综上所述, 蛇床子素能抑制鼻咽癌 CNE2 干细胞的增殖并增加其放疗敏感性, 机制可能为蛇床子素抑制肿瘤干细胞 GSK-3β-wnt/β-catenin-cyclinD1

信号通路,从而抑制了干细胞增殖,导致细胞凋亡。蛇床子素有希望成为鼻咽癌的治疗药物或放疗增敏剂,但仍需要进一步的深入研究与论证。

参考文献

- [1] Peng G, Wang T, Yang K Y, *et al.* A prospective, randomized study comparing outcomes and toxicities of intensity-modulated radiotherapy vs. Conventional two-dimensional radiotherapy for the treatment of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Radiother Oncol*, 2012, 104(3): 286-293.
- [2] Wang R, Wu F, Lu H, *et al.* Definitive intensity-modulated radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma: Long-term outcome of a multicenter prospective study [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013, 139(1): 139-145.
- [3] Wang W J, Wu S P, Liu J B, *et al.* MYC regulation of CHK1 and CHK2 promotes radioresistance in a stem cell-like population of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(3): 1219-1231.
- [4] Wei P, Niu M, Pan S, *et al.* Cancer stem-like cell: A novel target for nasopharyngeal carcinoma therapy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(2): 44.
- [5] Yang C F, Peng L X, Huang T J, *et al.* Cancer stem-like cell characteristics induced by EB virus-encoded LMP1 contribute to radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by suppressing the p53-mediated apoptosis pathway [J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(2): 260-271.
- [6] Wang L, Yang L, Lu Y, *et al.* Osthole induces cell cycle arrest and inhibits migration and invasion via PTEN/Akt pathways in osteosarcoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(6): 2173-2182.
- [7] Zhang L, Jiang G, Yao F, *et al.* Growth inhibition and apoptosis induced by osthole, a natural coumarin, in hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0037865.
- [8] Maccalli C, Volonte A, Cimminiello C, *et al.* Immunology of cancer stem cells in solid tumours. A review [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(3): 649-655.
- [9] 陈卓, 许新华. 鼻咽癌干细胞分子标记的研究进展 [J]. *广东医学*, 2014, 35(17): 2782-2784.
- [10] Cheng Y, Cheung A K, Ko J M, *et al.* Physiological beta-catenin signaling controls self-renewal networks and generation of stemlike cells from nasopharyngeal carcinoma [J]. *BMC Cell Biol*, 2013, 14(1): 44.
- [11] Milas L, Hittelman W N. Cancer stem cells and tumor response to therapy: Current problems and future prospects [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2009, 19(2): 96-105.
- [12] Yi X J, Zhao Y H, Qiao L X, *et al.* Aberrant Wnt/ β -catenin signaling and elevated expression of stem cell proteins are associated with osteosarcoma side population cells of high tumorigenicity [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5042-5048.
- [13] Cui J J, Jiang W H, Wang S Y, *et al.* Role of Wnt/ β -catenin signaling in drug resistance of pancreatic cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(17): 2464-2471.
- [14] Ma L, Zhang G, Miao X B, *et al.* Cancer stem-like cell properties are regulated by EGFR/AKT/ β -catenin signaling and preferentially inhibited by gefitinib in nasopharyngeal carcinoma [J]. *FEBS J*, 2013, 280(9): 2027-2041.
- [15] Wang W, Yi M, Chen S N, *et al.* NOR1 suppresses cancer stem-like cells properties of tumor cells via the inhibition of the AKT-GSK-3 β -Wnt/ β -catenin-ALDH1A1 signal circuit [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(10): 2829-2840.
- [16] Benham-Pyle B W, Sim J Y, Hart K C, *et al.* Increasing β -catenin/Wnt3A activity levels drive mechanical strain-induced cell cycle progression through mitosis [J]. *Elife*, 2016, doi: 10.7554/eLife.19799.
- [17] Li S J, Cheng D D, Zhu B, *et al.* The overexpression of CARM1 promotes human osteosarcoma cell Proliferation through the pGSK3 β / β -Catenin/cyclinD1 signaling pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(8): 976-984.
- [18] Yu L, Li X, Li H B, *et al.* Rab11a sustains GSK3 β /Wnt/ β -catenin signaling to enhance cancer progression in pancreatic cancer [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(10): 13821-13829.