

· 论 著 ·

口虾蛄提取物对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞增殖及凋亡的影响*

李明勇, 黄培春[△]

(广东医学院病理生理学教研室, 湛江 524023)

摘要:目的 探讨口虾蛄乙酸乙酯提取物对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞的增殖及凋亡相关蛋白表达的影响。方法 用 MTT 比色法检测药物对细胞增殖的作用, 流式细胞术和 PI/Hoechst33258 荧光双染法检测细胞凋亡, Western Blot 法检测用药前后凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 蛋白表达的改变。结果 口虾蛄乙酸乙酯提取物对 CNE-2Z 细胞的增殖有显著抑制作用, 且可诱导细胞凋亡; 随着口虾蛄乙酸乙酯提取物浓度升高, Bax 蛋白的表达逐渐增多, 而 Bcl-2 蛋白表达改变不明显。结论 口虾蛄乙酸乙酯提取物对 CNE-2Z 细胞有显著抗增殖及诱导凋亡作用, 其诱导肿瘤细胞凋亡的可能机制与凋亡相关基因 Bcl-2/Bax 蛋白比值下降有关, 但诱导凋亡不是主要机制。

关键词:口虾蛄; 鼻咽癌; 凋亡; CNE-2Z 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.005

中图分类号: R739.63; R282.74

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)20-2710-03

Effect of squilla oratoria extract on proliferation and apoptosis of CNE-2Z cells*

LI Ming-yong, HUANG Pei-chun[△]

(Department of Pathophysiology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To explore the effect of Ethylacetate Extract from Squilla Oratoria on cell proliferation and apoptosis relative protein of nasopharyngeal cell line CNE-2Z. Methods The inhibitory rate of the proliferation was detected by MTT assay. Apoptosis was detected by PI/Hoechst3358 fluorescent staining and flow cytometry assay. The expression changes of relating-apoptosis gene proteins (Bcl-2, Bax) were detected by Western Blot assay. Results Ethylacetate extract of Squilla Oratoria can remarkably inhibit the proliferation of CNE-2Z cells. It was showed by using PI/Hoechst3358 fluorescent staining and flow cytometry assay that CNE-2Z cells were not only necrosis but also apoptosis after treated by Ethylacetate extract. The result of western blot showed that with the rising of ethylacetate extract concentration, the expression of bax increased gradually, but the Bcl-2 expression was unchanged. Conclusion Ethylacetate Extract from Squilla Oratoria can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of CNE-2Z and its possible mechanism of inducing apoptosis might be related with the decline in Bcl-2/Bax, but not the dominant way.

Key words: squilla oratoria; nasopharyngeal carcinoma; apoptosis; CNE-2Z cells

海洋生物活性物质抗肿瘤研究是海洋生物活性物质开发与抗癌药物研究的一个重要领域^[1-3]。然而, 利用海洋生物抗癌药物的研究国内外报道极少。近年来, 本室对一批海洋生物进行抗鼻咽癌和抗 EB 病毒筛选, 发现了一些既能抑制鼻咽癌细胞生长也能抑制 EB 病毒繁殖的海洋生物, 其中口虾蛄乙醇粗提物抑制作用最为显著^[4-6]。本研究进一步用乙酸乙酯萃取口虾蛄乙醇粗提物, 观察口虾蛄乙酸乙酯提取物对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞的增殖及凋亡相关基因的影响, 为口虾蛄提取物抗鼻咽癌作用及其机制的研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞培养 人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞由广东医学院肿瘤研究所提供。在 5%CO₂、37℃ 条件下, 用含 10% 小牛血清、青霉素(100 μg/mL)、链霉素(100 μg/mL) RPMI-1640 培养液传代培养, 实验用细胞均处于对数生长期。

1.1.2 主要药品与试剂 口虾蛄(经广东海洋大学鉴定)购于湛江港口, RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, 小牛血清为四季青公司产品, MTT 和二甲亚砜(DMSO)均为 AMRES-CO 公司产品, 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)购于上海旭东

海普药业有限公司(批号: 011012), PI/Hoechst33258 为 Sigma 公司产品, Bcl-2 小鼠 IgG 单抗、Bax 兔 IgG 多抗、辣根过氧化物酶标记兔抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 均为 SANGTA CRUZ 公司产品, 其余试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 口虾蛄有效成分提取与配制 新鲜口虾蛄购于湛江港口, 用组织搅拌机搅碎后用 500 目尼龙膜过滤去水, 剩下的渣用 95% 食用乙醇浸泡数次, 使乙醇颜色变为无色澄清。每次泡 2 d, 将每次浸泡液混匀, 然后用旋转蒸发器在 56℃ 下蒸发提纯。提取物呈褐色膏状, 难溶于水。将提取物再用少量 95% 乙醇溶解后加入硅藻土适量拌匀, 水浴挥干溶剂, 制成硅藻土混合物。然后用乙酸乙酯反复多次浸泡。每次加入溶剂 500 mL, 搅拌均匀, 然后负压抽滤, 至提取液颜色近无色时停止, 溶剂用量大约为样品的 10~20 倍。将提取液于旋转蒸发器上浓缩并回收溶剂, 浓缩液挥干溶剂后称重, 计算得率。所得的提取物用 DMSO 配成 1 g/mL, 分装于 4℃ 保存, 临用时用培养液稀释成所需浓度, 并使各组所含 DMSO 相同(终浓度小于或等于 0.1%)。

1.2.2 口虾蛄乙酸乙酯提取物对鼻咽癌细胞增殖的影响 取

* 基金项目: 广东省重点学科资助项目(GX9402); 东莞市高校科研科技计划资助项目(G200965)。△ 通讯作者, E-mail: huangpc@gdmc.edu.cn。

对数生长期 CNE-2Z 细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液配成 5×10^4 个/mL 单细胞悬液,接种至 96 孔板中,每孔 180 μ L,每组设 4 个平行孔,然后分别加入实验药物,终体积为 200 μ L。实验分为 5 组,实验组:加入终质量浓度(生药)为 200、400、600 μ g/mL 口虾蛄乙酸乙酯提取物;阳性对照组:5-Fu 终质量浓度为 20 μ g/mL^[3-4];空白对照组加等量生长液。置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 饱和湿度的温箱中培养 48 h 后取出,分别加入 50 μ L MTT 温育 4 h,弃去培养基,加入 150 μ L DMSO,在平板摇床上摇匀,在酶标仪 495 nm 读板,根据测得的吸光度值计算抑制率。抑制率=(1-实验组吸光度值/对照组吸光度值)×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期情况 取处于对数生长期细胞接种于 25 mL 细胞培养瓶中,4.5 mL/瓶,使得每瓶为 3×10^5 个细胞;置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的温箱中培养,待细胞贴壁后分别加入不同浓度的药物 0.5 mL,使其终浓度分别 200、400、600 μ g/mL,空白对照组加等量生长液。培养 48 h 后取出,胰酶消化脱壁后弃去培养液,离心后弃去上清液,冷 PBS 洗 2 次,-20 $^{\circ}$ C 预冷的 70% 乙醇固定,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。取出细胞,离心除去乙醇,冷 PBS 洗 2 次,将细胞重悬于 0.2 mL 冷 PBS,再加入 0.6 mL PI 染液,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中染色 30 min。尼龙网过滤后用流式细胞仪测定各组细胞的细胞周期分布和凋亡率,每组均重复 3 次。

1.2.4 荧光双染法检测细胞凋亡情况 对照组及各药物组细胞培养 48 h 后取出,胰酶消化脱壁后弃去培养液,离心后弃去上清液,冷 PBS 洗 1 次,加入荧光染料 Hoechst33258 及 PI 至终浓度分别为 10、20 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 避光 30 min,取 1 滴细胞悬液滴于载波片上,盖上盖玻片,紫外光激发,荧光显微镜下观察细胞形态及颜色改变以区分出活的、凋亡及坏死细胞并照相。在荧光显微镜下,活细胞呈弥漫均匀的蓝色荧光,出现细胞凋亡时,细胞核或细胞质内可见多个浓染致密的颗粒块状强蓝色荧光,如细胞核为均匀的红色荧光则为死亡细胞。

1.2.5 Western Blot 法检测细胞凋亡相关蛋白的表达 收集对数生长期细胞,调整细胞浓度至 1.5×10^5 个/mL,分装于

100 mL 培养瓶中,每瓶 9 mL,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 温箱中培养,待细胞贴壁后分别加入不同浓度的药物 1 mL,空白对照组加入等量的生长液,药物作用细胞 48 h 后,用冷 PBS 洗 2 次,加入预冷的细胞裂解液 100 μ L,用细胞刮将细胞刮下,并转移至经过冷却的 1.5 mL 离心管中,置于碎冰上冰浴 20 min 后,于 4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 15 min。将上清液转移至另一 1.5 mL EP 管中,参照考马斯亮蓝法进行蛋白定量,蛋白样品和上样缓冲液按 3:1 的比例混合,100 $^{\circ}$ C 水中煮沸 5 min 使蛋白质变性。Western Blot 实验方法参考《分子克隆实验指南》,SDS-PAGE 电泳后电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭后加入第一抗体于室温孵育 2 h,用 TBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min,加入第二抗体于室温孵育 2 h,再用 TBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min,加入发光试剂(ECL)显色,以 β -actin 作内参照,用图像分析软件 Glyko BandScan 进行光密度积分值分析。

1.3 统计学方法 用 SPSS11.5 统计软件中的方差分析对所得数据进行统计学处理。

2 结 果

2.1 对鼻咽癌细胞增殖的影响 不同浓度的口虾蛄乙酸乙酯提取物对 CNE-2Z 细胞作用 48 h 后,可以显著抑制 CNE-2Z 细胞的生长,其抑制率分别为(45.03 \pm 3.52)%、(57.89 \pm 2.66)%、(84.21 \pm 1.37)%、与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),且增殖抑制率呈明显的量-效关系,见表 1。

表 1 口虾蛄乙酸乙酯提取物作用 CNE-2Z 细胞 48 h 后对细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | OD | 抑制率(%) |
|------------------|--------------------|--------------------|
| 空白对照组 | 0.57 \pm 0.03 | 0 |
| 实验组(μ g/mL) | | |
| 200 | 0.31 \pm 0.05* | 45.03 \pm 3.52* |
| 400 | 0.24 \pm 0.03** | 57.89 \pm 2.66** |
| 600 | 0.09 \pm 0.015** | 84.21 \pm 1.37** |
| 阳性对照组 | 0.25 \pm 0.03** | 56.02 \pm 3.46** |

与空白对照组比较,*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ 。

表 2 口虾蛄乙酸乙酯提取物作用 CNE-2Z 细胞 48 h 后细胞周期分布和凋亡的改变(% , $\bar{x} \pm s, n=3$)

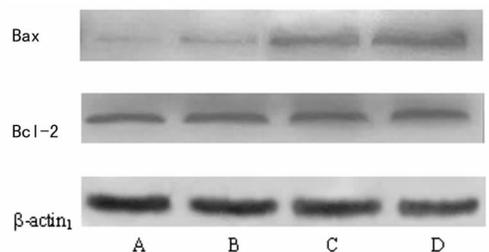
| 组别 | G ₁ (%) | S(%) | G ₂ /M(%) | 凋亡率(%) |
|------------------|--------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 空白对照组 | 57.90 \pm 1.83 | 32.85 \pm 2.21 | 9.03 \pm 2.16 | 0 |
| 实验组(μ g/mL) | | | | |
| 200 | 54.43 \pm 0.69* | 37.78 \pm 1.35* | 7.83 \pm 0.79 | 0 |
| 400 | 48.48 \pm 2.12** | 46.15 \pm 3.04** | 5.40 \pm 1.23** | 5.65 \pm 0.29* |
| 600 | 44.03 \pm 2.63** | 53.40 \pm 1.72** | 2.45 \pm 0.69** | 10.41 \pm 0.53** |

与空白对照组比较,*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ 。

2.2 细胞凋亡率 随着口虾蛄乙酸乙酯提取物的浓度升高,CNE-2Z 细胞的 G₁ 期和 G₂/M 期细胞比例依次下降,而 S 期细胞比例依次增加,与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。口虾蛄乙酸乙酯提取物浓度为 400 μ g/mL 时,流式细胞术检测结果显示有凋亡峰的出现,并且随着提取物浓度的升高,凋亡率也增高,与空白对照组比较,凋亡率差异有统计学意义($P < 0.05$),表明高浓度的口虾蛄乙酸乙酯提取物可诱导 CNE-2Z 细胞凋亡(表 2)。

2.3 荧光双染法检测结果 浓度为 400 μ g/mL 的口虾蛄乙酸乙酯提取物作用 CNE-2Z 细胞 48 h,经 PI/Hoechst33258 双重染色后,在荧光显微镜下,可见染成强蓝色,核呈固缩状或圆珠状的凋亡细胞和染成红色的坏死细胞(彩插 I 图 1B),而空

白对照组以活细胞(细胞核染色质呈均匀分布的蓝色,见彩插 I 图 1A)为主,未见凋亡细胞。



A:0 μ g/mL;B:200 μ g/mL;C:400 μ g/mL;D:600 μ g/mL。

图 2 口虾蛄乙酸乙酯提取物对 CNE-2Z 细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

2.4 对 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 不同浓度口虾蛄乙酸乙酯提取物作用 CNE-2Z 细胞 48 h 后,用 Western Blot 法检测细胞的 Bcl-2、Bax 蛋白表达情况。所得条带的图像经 BandScan 进行灰度积分分析,所得灰度值与 actin 灰度值相比较。结果显示,随着口虾蛄乙酸乙酯提取物浓度升高,Bax 蛋白的表达逐渐增多,而 Bcl-2 蛋白表达改变不明显(图 2~4)。

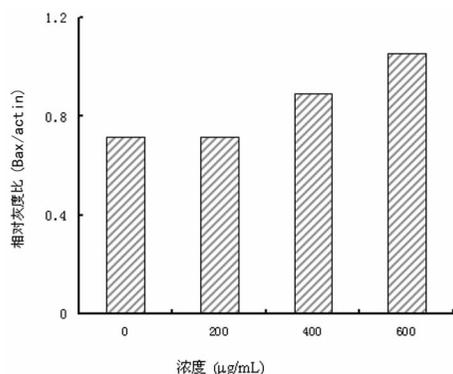


图 3 口虾蛄乙酸乙酯提取物作用 48 h 后 CNE-2Z 细胞 Bax 蛋白变化的灰度扫描分析

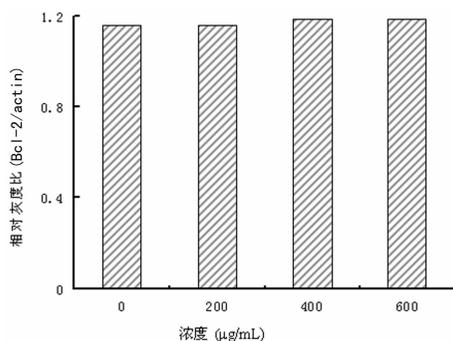


图 4 口虾蛄乙酸乙酯提取物作用 48 h 后 CNE-2Z 细胞 Bcl-2 蛋白变化的灰度扫描分析

3 讨论

作者在前期研究中发现,口虾蛄乙醇提取物能抑制 CNE-2Z 细胞裸鼠移植瘤的生长,并能降低 CNE-2Z 细胞体外侵袭能力^[7-8]。在此基础上,作者采用系统溶剂法对口虾蛄乙醇粗提物分别进行石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取,发现口虾蛄抗鼻咽癌的有效成分在乙酸乙酯提取物中^[9-10]。近年来,许多研究发现,传统的放射疗法、化学药物疗法和细胞因子疗法等除了直接杀伤肿瘤细胞外,同时也可诱导肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤的生长。因此,诱导肿瘤细胞凋亡已成为肿瘤治疗的研究热点^[11-12]。本实验结果显示,口虾蛄乙酸乙酯提取物在浓度为 400 μg/mL 时,流式细胞仪检测出细胞凋亡,并且随提取物浓度升高,凋亡率也增加;PI/Hoechst33258 荧光双染结果也显示,在此浓度时有典型的凋亡小体出现,提示诱导细胞凋亡是口虾蛄乙酸乙酯提取物抑制 CNE-2Z 细胞生长的机制之一。

Bcl-2 基因家族在细胞凋亡过程中起着重要作用,其基因家族蛋白之间的比例影响着细胞对各种凋亡刺激分子的敏感性,决定 Caspases 活化与否,从而决定细胞是否发生凋亡^[13]。以 Bcl-2 与 Bax 为例,Bcl-2/Bax 比值决定了接受凋亡刺激后,细胞发生凋亡的易感性。Bcl-2 过剩,细胞存活;而当 Bax 过剩,形成 Bax 同源二聚体,细胞将易发生凋亡^[14-15]。本实验结果显示,在各浓度实验组中,Bcl-2 蛋白表达没有发生明显的改

变,而 Bax 蛋白表达与空白对照组相比明显升高,导致 Bcl-2/Bax 比值下降,这可能是口虾蛄乙酸乙酯提取物引起 CNE-2Z 细胞发生凋亡的原因。

比较口虾蛄乙酸乙酯提取物对 CNE-2Z 细胞生长与凋亡的影响时发现,尽管口虾蛄乙酸乙酯提取物在 400 μg/mL 时可以诱导细胞凋亡,并且随着提取物浓度增高凋亡率也上升,但提取物浓度在 600 μg/mL 时,细胞凋亡的百分率仅为 10.41%,而在这个浓度时的口虾蛄乙酸乙酯提取物对 CNE-2Z 细胞的生长抑制率是 84.21%。可见,诱导凋亡不是口虾蛄乙酸乙酯提取物抑制 CNE-2Z 细胞生长的主要机制。

参考文献:

- [1] d' Ayala GG, Malinconico M, Laurienzo P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications; chemical modification approaches[J]. *Molecules*, 2008, 13(9):2069.
- [2] Ghosh T, Chattopadhyay K, Marschall M, et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides; From structure-activity analysis to clinical evaluation[J]. *Glycobiology*, 2009, 19:2.
- [3] 蒋庆峰, 周有骏, 王金政. 海洋抗肿瘤药物研究进展[J]. *中国海洋药物杂志*, 2004, 23(6):58.
- [4] 赵明伦, 罗晨美, 龙发, 等. 人低分化鼻咽癌上皮细胞系生长能力检测和对中草药及海洋药物的反应[J]. *中华肿瘤杂志*, 1988, 10(2):93.
- [5] 赵明伦, 龙发, 陈锦. 人低分化鼻咽癌上皮细胞系对某些海洋生物的反应[J]. *湛江医学院学报*, 1988, 6(1):5.
- [6] 顾帝水, 孔霞, 黄培春. 口虾蛄提取物对体外人鼻咽癌细胞转移潜能的影响[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(2):360.
- [7] 顾帝水, 孔霞, 黄培春. 口虾蛄提取物对人鼻咽癌细胞基质金属蛋白酶-9 的抑制作用[J]. *现代中西医结合杂志*, 2004, 13(21):2816.
- [8] 顾帝水, 黄培春, 孔霞. 口虾蛄提取物对人鼻咽癌裸鼠移植瘤生长的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2005, 14(14):1825.
- [9] 李明勇, 黄培春, 孔霞. MTT 法测定口虾蛄提取物的体外抗肿瘤活性[J]. *现代肿瘤医学*, 2005, 13(3):336.
- [10] 李明勇, 黄培春. 口虾蛄提取物对人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞的抑制作用[J]. *实用癌症*, 2006, 21(3):241.
- [11] Andrei L, Gartel. Novel anticancer compounds induce apoptosis in human tumor cells[J]. *Chinese J Cancer*, 2008, 27(7):675.
- [12] 华子春. 靶向性诱导肿瘤细胞凋亡药物研发[J]. *中国药理通讯*, 2009, 29(2):2.
- [13] Antonsson B, Martinal JC. The Bcl-2 protein family[J]. *Exp Cell Res*, 2000, 56(1):7.
- [14] 李兵, 李少林. Bcl-2 与鼻咽癌基因治疗研究进展[J]. *重庆医学*, 2007, 36(3):220.
- [15] Cheng Q, Huang X, Wang J. The expression of proliferating cell nuclear antigen and Bcl-2 oncoprotein in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 2003, 17(4):217.