

· 论 著 ·

d- δ -三烯生育酚对人鼻咽癌 CNE2 细胞株增殖和凋亡的影响*范才文¹, 王建红¹, 雷 迅², 易世江², 肖胜军¹, 曾 攀¹, Huanbiao Mo³, 向 秋^{2 Δ}

(1. 桂林医学院科学实验中心, 广西桂林 541004; 2. 桂林医学院附属医院, 广西桂林 541001;

3. Texas Woman's University, Denton 77285, 美国)

摘要:目的 探讨 d- δ -三烯生育酚对人鼻咽癌细胞增殖与凋亡的影响。方法 实验设对照组和不同 d- δ -三烯生育酚浓度(40、50、60 $\mu\text{mol/L}$)处理的实验组,采用 Hoechst 荧光染料染色和显微镜观察细胞的形态。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴蓝(MTT)实验、流式细胞术分析 d- δ -三烯生育酚对 CNE2 细胞的增殖、周期和凋亡的影响。结果 d- δ -三烯生育酚处理 CNE2 细胞 48 h 后,随 d- δ -三烯生育酚的浓度升高,细胞生长抑制率明显增加,分别为(27.71 \pm 1.01)%、(57.09 \pm 0.56)%和(95.04 \pm 0.17)%,与对照组相比,差异具有统计学意义($P<0.01$);细胞核或细胞浆内出现致密浓染的颗粒状或条块状荧光的凋亡细胞明显增多,实验组细胞凋亡率分别为(9.18 \pm 1.86)%、(34.97 \pm 1.01)%和(52.97 \pm 2.77)%,与对照组(1.58 \pm 0.48)%比较,随浓度升高,凋亡细胞率增加,差异具有统计学意义($P<0.01$);实验组 S 期的细胞百分率分别为(25.40 \pm 1.93)%、(35.83 \pm 3.74)%和(47.13 \pm 2.49)%,与对照组(19.63 \pm 1.46)%比较,细胞呈 S 期阻滞,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 d- δ -三烯生育酚具有抗鼻咽癌 CNE2 细胞的生物学活性。

关键词:生育酚类;鼻咽肿瘤;细胞增殖;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.24.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)24-2393-02

Effect of d- δ -tocotrienols on the proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cell line*Fan Caiwen¹, Wang Jianhong¹, Lei Xun², Yi Shijiang², Xiao Sheng-jun¹, Zeng Pan¹, Huanbiao Mo³, Xiang Qiu^{2 Δ}

(1. Central Laboratory of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541004, China; 2. The Affiliated Hospital of Guilin

Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China; 3. Texas Woman's University, Denton 77285, USA)

Abstract: Objective To investigate effect of d- δ -tocotrienols on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma. **Methods** The experiment was carried out with control group and experimental group which included three different concentration of d- δ -tocotrienols(40,50,60 $\mu\text{mol/L}$). Cytomorphology was analyzed by using Hoechst 33 258 fluorescent staining and microscopy. MTT experiment and flow cytometry were used to analyze the effect of d- δ -tocotrienols on proliferation, apoptosis and cell cycle of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2. **Results** After treated CNE2 cells with d- δ -tocotrienols for 48h, cell growth suppression rate rose obviously with the increase of d- δ -tocotrienols concentration, respectively be (27.71 \pm 1.01)%, (57.09 \pm 0.56)% and (95.04 \pm 0.17)%, the differences were significant when compared with the control group ($P<0.01$). Apoptotic cells with nucleus and cytoplasm compact dyeing or thick strip massive fluorescence increased obviously, the apoptotic cell rates were (9.18 \pm 1.86)%, (34.97 \pm 1.01)% and (52.97 \pm 2.77)% respectively in experimental group, compared with the control group (1.58 \pm 0.48)%, cell apoptosis rate significantly increased, the differences were significantly ($P<0.01$). The percentage of S phase cells were (25.40 \pm 1.93)%, (35.83 \pm 3.74)% and (47.13 \pm 2.49)% respectively in experimental group, cells were stopped at S phase, compared with control group (19.63 \pm 1.46)%, the differences were statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** d- δ -tocotrienols has biological activity of anti-nasopharyngeal carcinoma CNE2 cell line.

Key words: tocopherols; nasopharyngeal neoplasms; cell proliferation; apoptosis

鼻咽癌是中国南方最常见的恶性肿瘤,以广东、广西和福建等省份发病率最高。由于鼻咽癌发病部位隐蔽,且易发生侵袭与转移,恶性程度高,难以早期诊断,导致 5 年生存率低。因此,研究开发有效的鼻咽癌治疗药物尤为重要。三烯生育酚是侧链含有 3 个不饱和和双键的脂肪酸,近来研究发现,三烯生育酚具有抗氧化、抗癌、降低胆固醇和保护神经等生物学作用。郭兵等^[1]研究表明 α -生育酚能增强胰岛细胞抗氧化能力。在抗肿瘤方面,三烯生育酚具有很强的生物学活性^[2]。Wada 等^[3]研究表明, δ -生育酚具有比 α -、 β -和 γ -三烯生育酚更强的抑制肝癌细胞 HepG2 增殖的能力。目前,三烯生育酚抗鼻咽癌的报道甚少。本研究选用具有抗肿瘤潜能的 d- δ -三烯

生育酚进行抗鼻咽癌的生物学活性研究,以期找到鼻咽癌的有效防治方法。

1 材料与方**1.1 材料**

1.1.1 试剂 d- δ -三烯生育酚由美国德克萨斯女子大学食品与营养研究所 Huanbiao Mo 博士提供;RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司;新生牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;胰蛋白酶、噻唑蓝 [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl), 5-diphenylterazolium bromide, MTT]、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自 Sigma 公司;Hoechst33258 购自碧云天生物技术研究所。

1.1.2 细胞株 人鼻咽癌细胞株 CNE2 为本实验室保种。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与实验分组 人鼻咽癌细胞株 CNE2, 在含青、链霉素和 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下传代培养。d-δ-三烯生育酚用无水乙醇配成 100 mmol/L 储备液, 贮存于 -20 °C 备用(乙醇终浓度小于 0.1%)。实验设对照组和实验组, 根据预实验结果, 实验组设 3 个药物浓度, 即 40、50、60 μmol/L d-δ-三烯生育酚。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖活性 取对数生长期细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 调整细胞密度至 3.5×10^4 /mL。接种于 96 孔板, 每孔接种细胞悬液 200 μL。培养 12 h 后更换新鲜培养液, 加入不同浓度的 d-δ-三烯生育酚, 每组设置 4 个平行孔, 继续培养 48 h 后, 去上清, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗 2 次, 每孔加 200 μL 无血清的 RPMI1640 培养液和 20 μL MTT(5 mg/mL), 继续培养 4 h, 然后吸去上清, 每孔加入 200 μL DMSO, 置振荡器振荡 5~10 min 使结晶充分溶解, 在自动酶标仪(490 nm 波长)上测定各孔吸光度值(optical density, OD)。细胞生长抑制率(inhibition rate, IR) = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白对照组 OD 值})] \times 100\%$ 。

1.2.3 细胞形态学观察 d-δ-三烯生育酚处理 CNE2 细胞 48 h 后, 在倒置显微镜下观察对照组与实验组细胞的生长状态。

1.2.4 Hoechst 荧光染料染色观察 CNE2 细胞的凋亡情况 取对数生长期 CNE2 细胞接种于 6 孔板中, 接种密度为 5×10^4 个/孔, 每孔 2.0 mL。培养 12 h 后, 更换培养液。分别加入所设浓度的 d-δ-三烯生育酚, 继续培养 48 h 后, 终止培养, 轻轻吸去培养液, 每孔加入 4% 的多聚甲醛 1 mL, 室温固定 15 min, PBS 洗 2 次, 晾干, 每孔加入适量 Hoechst33258 染料, 染色 10~15 min。PBS 洗 2 次, 然后加 1~2 滴抗荧光淬灭封片液, 封片, 于荧光倒置显微镜下观察与分析。

1.2.5 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞周期与细胞凋亡 取对数生长期 CNE2 细胞接种于 50 mL 的玻璃培养瓶中, 细胞长至 60%~70% 融合时。然后换含 10% 血清的培养基, 按所设浓度分别加入 d-δ-三烯生育酚, 每组设 3 个平行孔, 继续培养 48 h 后, 终止培养, 消化并收集各组细胞, 离心半径 10 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清, PBS 洗 2 次, 加入 70% 预冷的乙醇于 4 °C 固定 24 h。然后用流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期。细胞凋亡指数(apoptosis index, AI) = $\frac{\text{二倍峰细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件分析实验结果, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用完全随机的单因素(One-Way ANOVA)方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 d-δ-三烯生育酚对细胞形态的影响 d-δ-三烯生育酚处理细胞 48 h 后, 在倒置相差显微镜下观察, 发现对照组 CNE2 细胞贴壁生长良好, 细胞呈多边形, 轮廓清楚, 接触紧密, 生长旺盛, 分裂相多; 实验组细胞随着药物浓度的增加, 贴壁细胞明显减少, 漂浮死亡细胞明显增多(封 2 图 1)。

2.2 d-δ-三烯生育酚对 CNE2 细胞增殖的影响 实验组细胞生长抑制率分别为 (27.71 ± 1.01)%、(57.09 ± 0.56)% 和 (95.04 ± 0.17)%, 与对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 d-δ-三烯生育酚对细胞凋亡的作用 Hoechst 荧光染料

染色结果表明, 对照组细胞密度较大, 染色均匀。实验组随着药物浓度增加, 细胞数量明显减少, 核浓缩、荧光密度大和细胞体积缩小的凋亡细胞比例增高(封 2 图 2)。d-δ-三烯生育酚处理细胞 48 h 后, 实验组(40、50、60 μmol/L d-δ-三烯生育酚)细胞凋亡率分别为 (9.18 ± 1.86)%、(34.97 ± 1.01)% 和 (52.97 ± 2.77)%。各实验组与对照组细胞凋亡率 (1.58 ± 0.48)% 比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 d-δ-三烯生育酚对 CNE2 细胞周期的影响 d-δ-三烯生育酚处理细胞 48 h 后, 实验组(40、50、60 μmol/L d-δ-三烯生育酚)S 期细胞的百分率分别为 (25.4 ± 1.93)%、(35.83 ± 3.74)% 和 (47.13 ± 2.49)%。各实验组与对照组 S 期细胞的百分率 [(19.63 ± 1.46)%] 比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 细胞阻滞于 S 期。

3 讨 论

三烯生育酚是维生素 E 的组成成分, 由 α、β、γ 和 δ 4 种三烯生育酚异构体组成。生育酚主要存在于玉米油、豆油和橄榄油中; 三烯生育酚则富含于米糠油、大麦油和棕榈油中, 以棕榈油含三烯生育酚最为丰富。研究发现, 植物性食物中的多不饱和脂肪酸、茶多酚、番茄红素、膳食纤维及脂溶性维生素等具有抗肿瘤的生物学活性, 可以降低肿瘤的发病率及病死率^[4]。McIntyre 等^[5]研究表明, 三烯生育酚和三烯生育酚衍生物对正常细胞的作用远比肿瘤细胞低得多。用不同的肿瘤细胞进行研究, d-δ-三烯生育酚抑制正常细胞生长的浓度是肿瘤细胞的 40~200 倍。Srivastava 等^[6]研究发现富含三烯生育酚的棕榈油对人前列腺癌细胞具有选择性的抑制作用, 而对正常人前列腺细胞作用较少。Husain 等^[7]报道, 口服 δ-三烯生育酚能有效抑制胰腺癌细胞的生长。本研究结果显示, d-δ-三烯生育酚对鼻咽癌细胞具有明显的增殖抑制作用, 且呈剂量-效应关系, 60 μmol/L 时对细胞增殖的抑制率达 (95.04 ± 0.17)%。

细胞的增殖与凋亡的动态平衡在维持机体组织器官正常的形态与功能中起着重要的作用。研究表明, 肿瘤的发生与细胞增殖与死亡的速度平衡失调有关^[8]。三烯生育酚能通过多种途径诱导肿瘤细胞凋亡^[9]。Agarwal 等^[10]报道, 富含 γ-三烯生育酚棕榈油能降低 Bax/Bcl-2 比值, 诱导人结肠癌细胞凋亡。Comitato 等^[11]研究表明, 三烯生育酚通过促进雌激素受体向核定位转移, 激活雌激素作用因子, 诱导 caspase-3 活化和 DNA 断裂, 导致细胞凋亡。本研究结果表明, d-δ-三烯生育酚诱导鼻咽癌 CNE2 细胞凋亡, 随着药物浓度的增加, 细胞凋亡率由 (1.58 ± 0.48)% 上升到 (52.97 ± 2.77)%。d-δ-三烯生育酚作用于 CNE2 细胞后, 细胞阻滞在 S 期, 细胞的增殖受抑制。

本研究的初步结果表明, d-δ-三烯生育酚将鼻咽癌 CNE2 细胞阻滞在 S 期, 导致细胞有丝分裂障碍, 抑制细胞增殖。同时, d-δ-三烯生育酚具有诱导鼻咽癌 CNE2 细胞凋亡的生物学活性, 但其作用的分子机理有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 郭兵, 秦观海, 袁英. α-生育酚对链脲菌素诱导乳鼠胰岛细胞凋亡的影响[J]. 重庆医学, 2010, 39(16): 2190-2193.
- [2] Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family[J]. Mol Aspects Med, 2007, 28(5): 692-728.
- [3] Wada S, Satomi Y, Murakoshi M, et al. Tumor suppressive effects of tocotrienol in vivo and in vitro[J]. Cancer Letters, 2005, 229(2): 181-191. (下转第 2397 页)

在早期还是在后期在子宫内膜癌中表达、是否在子宫膜癌的发生中有意义^[13]。Erkanli 等^[14]研究发现 COX-2 过高的表达与不同病理分级、分期和不同肌层浸润深度的子宫内膜癌组织中有关,因此 COX-2 与子宫内膜癌的预后和存活时间没有明显的关系,而郑燕等^[15]研究显示 COX-2 在正常子宫内膜、不典型增生子宫内膜和子宫癌上皮中阳性表达率呈逐渐增高的趋势,差异有统计学意义,但是在子宫内膜分期、淋巴结转移、组织学类型、肌层浸润、病理分级中差异无统计学意义,该研究认为 COX-2 与子宫内膜发生具有相关性。而本研究显示 COX-2 在子宫内膜癌标本中阳性率为 70.37%,并且与 ER、PR 具有明显的相关性,但是 COX-2 与子宫内膜癌的生存率无明显的相关性。

综上所述,COX-2、ER、PR 在子宫内膜癌标本中高度表达,但是对于子宫内膜癌的分期、肌层浸润、淋巴结转移及预后等未发现有明显的相关性。本组认为应该进一步研究 COX-2、ER、PR 表达在子宫内膜癌发生、发展中的临床意义,以便为子宫内膜癌的基因治疗寻找新的靶点。

参考文献:

- [1] Ferrandina G, Ranelletti FO, Gallotta V, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), receptors for estrogen (ER), and progesterone (PR), p53, ki67, and neu protein in endometrial cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 98(3): 383-389.
- [2] Jeon YT, Kang S, Kang DH, et al. Cyclooxygenase-2 and p53 expressions in endometrial cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(4): 1538-1542.
- [3] Fowler JM, Ramirez N, Cohn DE, et al. Correlation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and aromatase expression in human endometrial cancer: Tissue microarray analysis[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(4): 1262-1273.
- [4] 郑瑞芹, 刘晓芹, 张建英. 子宫内膜息肉组织中雌孕激素受体的表达[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2010, 29(4): 263-264.
- [5] Modugno F, Ness RB, Chen C, et al. Inflammation and endometrial cancer: a hypothesis[J]. *Cancer Epidemiol Bio-*

markers *Prev*, 2005, 14(12): 2840-2847.

- [6] Parker SL, Tong T, Bolden S, et al. Cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 1996, 46(1): 5-27.
- [7] 姜展红, 吴宜勇, 张毅. 雌激素硫酸转移酶与甾体硫酸酯酶在子宫内膜癌中的表达[J]. *中国妇产临床杂志*, 2010, 10(3): 206-209.
- [8] Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis M, et al. Endometrial carcinoma: association of steroid hormone receptor expression with low angiogenesis and bcl-2 expression[J]. *Virchows Arch*, 2001, 438(5): 470-477.
- [9] Kohler MF, Berkholz A, Risinger JI, et al. Mutational analysis of the estrogen receptor gene in endometrial carcinoma[J]. *Obstet Gynecol*, 1995, 86(1): 33-37.
- [10] Jeon YT, Park IA, Kim YB, et al. Steroid receptor expressions in endometrial cancer: clinical significance and epidemiological implication[J]. *Cancer Lett*, 2006, 239(2): 198.
- [11] 张乃英, 郑国华, 崔伟, 等. 环氧酶-2 及其抑制剂在子宫内膜癌中的研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 39(10): 913-914.
- [12] Cao QJ, Einstein MH, Anderson PS, et al. Expression of COX-2, Ki-67, cyclin D1, and p21 in endometrial endometrioid carcinomas[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2002, 21(2): 147-154.
- [13] Ferrandina G, Legge F, Ranelletti FO, et al. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial carcinoma. Correlation with clinicopathologic parameters and clinical outcome[J]. *Cancer*, 2002, 95(4): 801-807.
- [14] Erkanli S, Bolat F, Kayaselcuk F, et al. COX-2 and survivin are overexpressed and positively correlated in endometrial carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 104(2): 320-325.
- [15] 郑燕, 李学慧, 孟亚丽, 等. PINCH 蛋白和 COX-2 蛋白在子宫内膜癌中的表达及临床意义[J]. *疑难病杂志*, 2010, 9(9): 667-670.

(收稿日期: 2011-03-05 修回日期: 2011-06-17)

(上接第 2394 页)

- [4] Holst C M, Staaf J, Nsson G, et al. Molecular mechanisms underlying N1, N11-diethylnorpermine-induced apoptosis in a human breast cancer cellline[J]. *Anticancer Drugs*, 2008, 19(9): 871-883.
- [5] McIntyre BS, Briski KP, Gapor A, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on preneoplastic and neoplastic mouse mammary epithelial cells[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000, 224(4): 292-301.
- [6] Srivastava JK, Gupta S. Tocotrienol-rich fraction of palm oil induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in human prostate cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346(2): 447-453.
- [7] Husain K, Francois RA, Hutchinson SZ, et al. Vitamin E delta-tocotrienol levels in tumor and pancreatic tissue of mice after oral administration[J]. *Pharmacology*, 2009, 83(3): 157-163.

- [8] Garber K. Beyond the Nobel Prize: cell cycle research offers new view on cancer[J]. *Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 1766.
- [9] Constantinou C, Papas A, Constantinou AI. Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(4): 739-752.
- [10] Agarwal MK, Agarwal ML, Athar M, et al. Tocotrienol-rich fraction of palm oil activates p53, modulates Bax, Bcl2 ratio and induces apoptosis independent of cell cycle association[J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(2): 205-211.
- [11] Comitato R, Nesaretnam K, Leoni G, et al. A novel mechanism of natural vitamin E tocotrienol activity: involvement of ERbeta signal transduction[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(2): 427-437.

(收稿日期: 2010-12-10 修回日期: 2011-04-10)