

细梗香草皂甙对鼻咽癌 CNE-2 细胞的体外抗瘤作用

花永虹¹, 胡巧英¹, 朴永锋¹, 唐 秋¹, 马胜林²

(1.浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 2.杭州市第一人民医院, 浙江 杭州 310006)

摘要: [目的] 观察细梗香草皂甙抗人鼻咽癌 CNE-2 细胞的效应。[方法] 细梗香草皂甙与 CNE-2 细胞共培养, 采用 MTT 法检测细胞增殖, 软琼脂实验检测细胞集落形成情况, 流式细胞仪检测细胞凋亡。[结果] 不同浓度细梗香草皂甙作用于 CNE-2 细胞后, 细胞存活率显著性降低, 48h 细梗香草皂甙 IC₅₀ 为 7.4 μg/ml。CNE-2 细胞经 8 μg/ml 细梗香草皂甙处理后, 软琼脂集落形成能力下降, 集落形成数为 119±11 个, 比对照组 (297±24 个) 低; 细梗香草皂甙组的凋亡率达 16.43%±3.1%, 而对照组为 9.34%±2.3%。[结论] 细梗香草皂甙对鼻咽癌 CNE-2 细胞株有抑制增殖和诱导凋亡的作用。

关键词: 鼻咽肿瘤; 细梗香草皂甙; 细胞增殖; 凋亡

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2014)07-0597-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.07.A013

The Antitumor Effect of Capilliposide on Nasopharyngeal Cancer Cell Line CNE-2 in vitro

HUA Yong-hong, HU Qiao-ying, PIAO Yong-feng, et al.

(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To observe the antitumor activity of capilliposide on human nasopharyngeal cancer cell lines CNE-2. [Methods] CNE-2 cells were cultured with different concentrations with capilliposide. Cell proliferation were measured by MTT assay, colony formation by a soft agar assay and apoptosis by flow cytometry. [Results] The survival rate of CNE-2 cells was significantly decreased after incubation with capilliposide, and the IC₅₀ in 48 hours was 7.4 μg/ml. After 8 μg/ml concentrations treatment, the number of colony-formation in soft agar of the CNE-2 cells was 297±24, which was lower than that in control group (119±11). Apoptosis rate was 16.43%±3.1% in capilliposide group and 9.34%±2.3% in control group. [Conclusion] Capilliposide plays a role in growth inhibition and inducing apoptosis in human nasopharyngeal cancer cell line CNE-2.

Key words: nasopharyngeal neoplasm; capilliposide; cell proliferation; apoptosis

细梗香草 (*lysimachia capillipes hemsl*), 又名排草、香排草、香草、毛柄珍珠菜, 系报春花科 (Primulaceae) 珍珠菜属植物, 主要分布在江西、福建、广东、贵州等地。细梗香草性甘、味平, 全草入药, 主治感冒咳嗽、风湿痛、月经不调、神经衰弱、肿瘤等^[1]。笔者所在的研究组从古方、验方着手, 发现细梗香草具有抗肿瘤活性, 而细梗香草皂甙发挥主要作用。鼻咽癌是我国常见恶性肿瘤之一, 目前采用综合治疗的策

略, 5 年总生存率控制在 60%~70% 左右, 远处转移是治疗失败的主要方式。本研究探讨细梗香草皂甙体外抗鼻咽癌 CNE-2 细胞的活性。

1 材料与方法

1.1 药物和主要试剂

细梗香草皂甙由浙江大学田炳奎教授实验室赠送, 使用流动相 (乙腈: 0.3% HAc=42:58) 进行溶解至总浓度为 10 mg/ml, 使用时用基础培养基 10 倍逐级

收稿日期: 2014-01-22; 修回日期: 2014-03-22

E-mail: yonghonghua@163.com

稀释至 1mg/ml, 100 μ g/ml 备用。RPMI-1640 购自杭州四季青生物有限公司, DMSO、MTT 以及小牛血清均购自 Sigma 公司, Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自 Beyotime 公司。

1.2 细胞和细胞培养

鼻咽癌 CNE-2 细胞株由浙江省肿瘤医院肿瘤研究所提供。复苏后的 CNE-2 细胞采用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养, 2~3d 传代 1 次, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 MTT 法检测细胞增殖

CNE-2 细胞经胰酶消化, 接种于 96 孔板, 每孔细胞数 1×10^4 个, 培养 12h 后换无血清培养液继续培养 12h, 使细胞同步生长; 之后, 换含不同浓度细梗香草皂甙的 RPMI-1640 培养液 100 μ l, 根据预实验结果, 设置浓度梯度为: 2, 4, 8, 20, 40 μ g/ml, 每个浓度设 4 个复孔, 并设空白对照组。各组 CNE-2 细胞加药 0h, 24h, 48h, 72h 后, 每孔加入 MTT 10 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 4h, 弃去上清, 每孔加入 DMSO 150 μ l, 充分震荡混匀 10min, 吹打混匀后取 120 μ l 于另一干净 96 孔板中, 并取 120 μ l DMSO 作为空白对照调零, 酶标仪上测 OD, 波长为 570nm。实验重复 3 次, 取平均值, 绘制细胞生长曲线, 计算 IC₅₀ 值。采用同样方法计算化疗药物顺铂 (cisplatin, DDP) 的 IC₅₀ 值。

1.4 软琼脂集落形成实验检测细胞克隆率

CNE-2 细胞按要求设 3 组, 分别为空白对照组、细梗香草皂甙组 (IC₅₀ 浓度) 和 DDP 组 (IC₅₀ 浓度), 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 48h, 再经胰酶消化形成单细胞悬液。分别制备 1.2% 和 0.7% 的软琼脂糖, 按 1:1 混合 1.2% 琼脂糖和 2 倍培养基后注入 6 孔板中, 制成底层凝胶, 冷却凝固后, 0.7% 琼脂和 2 倍培养基在无菌试管中 1:1 混合, 再向管中加入 CNE-2 细胞悬液, 使每孔细胞数为 500 个, 充分混匀倒入已铺有底层凝胶的孔中, 形成双琼脂层。待凝固后, 置入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 10~14d, 计数含 50 个细胞以上

得克隆, 计算细胞集落形成率。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡情况

CNE-2 细胞经胰酶消化、计数后以 1.5×10^5 /孔的浓度接种于 6 孔板, 每孔 2ml, 共设 3 组, 为空白对照组、细梗香草皂甙组 (IC₅₀ 浓度) 和 DDP 组 (IC₅₀ 浓度)。于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内培养 24、48h 后消化离心、收集细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 /L, 按照 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒提供的说明书操作, 流式细胞仪检测并分析细胞凋亡。

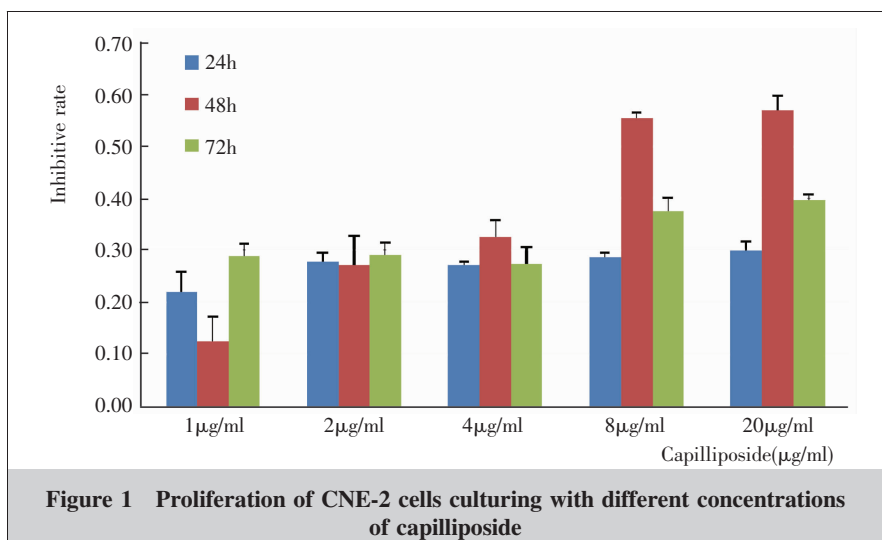
1.6 统计学处理

数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行分析, 对于两组数据比较选用成组 *t* 检验, 两组以上数据选用方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度细梗香草皂甙对 CNE-2 细胞增殖的影响

从 MTT 结果 (Figure 1) 来看, 不同浓度的细梗香草皂甙在前 24h 未显示明显的抑制率差别, 而 48h 后, 细梗香草总皂苷 8 μ g/ml 抑制率达到最高, 抑制率可达 55%, 随浓度继续增高, 抑制率差异无统计学意义 (Figure 1)。细梗香草浓度在 40 μ g/ml, 在 24h 即对 CNE-2 细胞呈现过大毒性, 以至于 48h 时该浓度处理细胞全部死亡。根据细胞抑制率, 计算 48h 细梗香草皂甙 IC₅₀ 为 7.4 μ g/ml; DDP IC₅₀ 则为 4.1 μ g/ml。



2.2 细梗香草皂甙对 CNE-2 软琼脂集落形成能力的影响

CNE-2 细胞经 8 μ g/ml 细梗香草皂甙处理 48h 后,软琼脂集落形成能力明显降低。与空白对照组相比,软琼脂集落形成数量少且面积小,差异具有统计学意义($P=0.03$);即使与 DDP 组比较,形成的集落数也少,但差异未见统计学意义($P=0.21$)(Table 1)。

Table 1 The number of colony-forming in soft agar of CNE-2 cells

Group	Colony-forming(n)	P value*
Negative control group	297 $\pm$ 24	$P=0.03$
DDP control group	167 $\pm$ 10	$P=0.21$
Capilliposide group	119 $\pm$ 11	

*:Comparisons between capilliposide group and control group

2.3 细梗香草皂甙诱导 CNE-2 凋亡的作用

细梗香草皂甙处理 CNE-2 细胞 48h,Annexin V-FITC 法测定细胞凋亡率,可见 CNE-2 细胞经药物处理后凋亡率明显增高。空白对照组 CNE-2 细胞 48h 时凋亡率为 9.34% $\pm$ 2.3%,而经细梗香草处理后,凋亡率达 16.43% $\pm$ 3.1%,经 DDP 处理后 CNE-2 细胞的凋亡率为 19.38% $\pm$ 3.3%(Figure 2)。

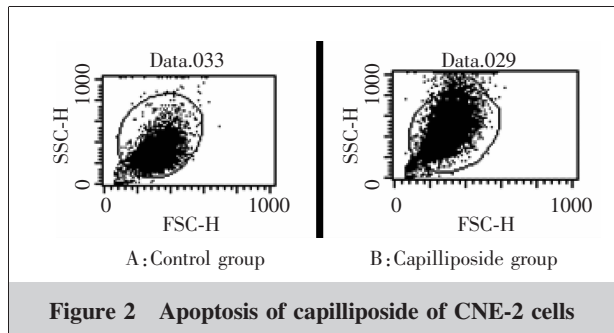


Figure 2 Apoptosis of capilliposide of CNE-2 cells

3 讨论

鼻咽癌是我国常见恶性肿瘤之一,目前治疗以放射治疗为基础的综合治疗,总体 5 年生存率在 70%左右^[2],远处转移成为影响鼻咽癌预后的重要因素^[3]。

我们采用乙醇提取,大孔径树脂纯化,反相硅胶结合 ELSD 在线检测精制得到细梗香草皂苷,其中以细梗香草皂甙 B 为主^[4,5]。细梗香草皂甙 B 是一个新的含半缩醛羟基的五环三萜皂苷,分子式 C₅₈H₉₆O₂₄,分子量 1176.7。本研究旨在探讨细梗香

草皂甙体外抗鼻咽癌的活性,将细梗香草皂甙与低分化人鼻咽癌 CNE-2 细胞株共孵育,发现细梗香草皂甙具有抑制 CNE-2 细胞增殖的作用,这可能与细梗香草皂甙逆转 CNE-2 细胞恶性表型有关。CNE-2 细胞经 8 μ g/ml 细梗香草皂甙处理后,软琼脂集落形成率显著性下降,显示细胞的恶性表型受到抑制。一般认为,肿瘤细胞在半固体琼脂上形成集落的数量与其恶性程度呈正相关;另一方面,研究发现细梗香草皂甙能显著性诱导 CNE-2 细胞凋亡,经细梗香草皂甙处理 48h 后,CNE-2 细胞的凋亡率由 9.34% 升高到 16.43%。

为进一步确定细梗香草皂甙对 CNE-2 细胞的抗癌活性,研究中除设空白对照组外,还利用 DDP IC₅₀ 浓度作为阳性对照组。与 DDP 相比,细梗香草皂甙抑制 CNE-2 细胞增殖活性可能更多依赖于抑制肿瘤细胞的侵袭行为。在软琼脂集落形成研究中,与 DDP 处理后 CNE-2 细胞相比,经细梗香草皂甙处理的 CNE-2 细胞在软琼脂上形成细胞集落的能力更差,而在凋亡研究中,DDP 处理过的 CNE-2 细胞凋亡率高于细梗香草皂甙处理过的 CNE-2 细胞,反映细梗香草皂甙可能更倾向于抑制 CNE-2 细胞的恶性生物学行为,在控制肿瘤远处转移方面可能有其优势,有进一步探索的价值。

以上研究结果与我们以往对中药提取类药物的认识是相符合的,一般认为,中医中药可能更多从提高免疫系统功能、逆转肿瘤恶性程度、改善放化疗抵抗等方面发挥抗肿瘤作用,而对肿瘤细胞的直接杀伤效应相对较弱^[6-10]。

综上,细梗香草皂甙在较低的浓度即显示较强的 CNE-2 抑制作用,抑制率与药物浓度和作用时间都有关;与 DDP 相比,细梗香草皂甙更倾向于抑制肿瘤细胞的恶性生物学行为,而不是直接的细胞杀灭作用。

参考文献:

- [1] Shi KH,Guo DW,Chen BL,et al. Capilliposide domestication and cultivation [J]. Chinese Wild Plant Resources, 1997,16(3):47-48. [施开鸿,郭达伟,陈碧玲,等. 细梗香草驯化栽培技术 [J]. 中国野生植物资源,1997,16(3):47-48.]
- [2] Yi JL,Gao L,Huang XD,et al. Nasopharyngeal carcinoma treated by radical radiotherapy alone:ten-year experience

- of a single institution[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006,65(1):161-168.
- [3] Han L,Lin SJ,Pan JJ,et al. Prognostic factors of 305 nasopharyngeal carcinoma patients treated with intensity-modulated radiotherapy[J]. *Chinese Journal of Cancer*,2010,29(2):153-158. [韩露,林少俊,潘建基,等. 305例鼻咽癌调强放疗预后因素分析[J]. *癌症*,2010,29(2):153-158.]
- [4] Xu Y,Rong YM,Liu XB,et al. Experimental studies on anti-tumor effects of Capilliposide[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*,2012,28(4):545-548. [徐燕,荣语媚,刘小保,等. 细梗香草总皂苷的抗肿瘤活性研究[J]. *中国药理学通报*,2012,28(4):545-548.]
- [5] Ying HM,Qi ZJ,Guo DW,et al. Quantitative determination of capilliposide B and capilliposide C in lysimachia capillipes by HPLC-ELSD assay[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*,2011,46(9):704-706. [应弘梅,戚中杰,郭达伟,等. HPLC-ELSD测定细梗香草皂苷B与皂苷C的含量[J]. *中国药理学杂志*,2011,46(9):704-706.]
- [6] Long D,Wang J,Li D,et al. Research of luyuan capsule leachate on the in vitro maturation of dendritic cells of adult peripheral blood[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*,2012,32(11):1558-1561. [龙丹,王佳,李典,等. 绿原胶囊浸出液促成成人外周血树突状细胞体外成熟的研究[J]. *中国中西医结合杂志*,2012,32(11):1558-1561.]
- [7] Tian YZ,Miao QW,Zhao HL,et al. Reversal effect of astragaloside on multidrug resistance of drug-resistant hepatocellular carcinoma cell line HepG2/GCS [J]. *Chinese Journal of General Surgery*,2011,11(7):778-779. [田彦璋,苗青旺,赵浩亮,等. 黄芪甲苷逆转耐药肝癌细胞株HepG2/GCS多药耐药的研究[J]. *中国药物与临床*,2011,11(7):778-779.]
- [8] Du R,Zheng H,Wang YP,et al. Reversal of the malignant phenotypes by tanshinone II A in human breast cancer MCF-7 cell lines and its molecular mechanism [J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*,2009,24(1):35-38. [杜睿,郑鸿,王艳萍,等. 丹参酮II A逆转人ER阳性乳腺癌细胞的恶性表型及其机理 [J]. *华西药理学杂志*,2009,24(1):35-38.]
- [9] Peng A,Shen DL,Xu SZ. Reverse effects of Zilongjin on the malignant phenotype of bel-7402 human hepatocarcinoma cells[J]. *The Practical Journal of Cancer*,2012,27(2):111-113. [彭安,申东兰,徐颂周. 紫龙金诱导Bel-7402人肝癌细胞分化的实验研究[J]. *实用癌症杂志*,2012,27(2):111-113.]
- [10] Gu X,Yang DD,Wang L,et al. Icariin induces the differentiation and reverses the malignant phenotype of SW579 cells [J]. *Chinese Journal of Current Advances in General Surgery*,2012,15(7):505-509. [顾欣,杨丹丹,王丽,等. 淫羊藿甙诱导甲状腺癌细胞系SW579的分化及恶性表型逆转的实验研究[J]. *中国现代普通外科进展*,2012,15(7):505-509.]