

白花蛇舌草注射液对鼻咽癌 CNE-2 细胞体外增殖抑制及凋亡作用的研究

方 鹏, 邹 甜, 江晓肖

(解放军 117 医院, 浙江 杭州 310013)

摘 要: [目的] 探讨白花蛇舌草注射液对鼻咽癌 CNE-2 细胞体外增殖抑制作用及凋亡机制。[方法] MTT 法检测白花蛇舌草注射液对鼻咽癌 CNE-2 细胞的抑制率, Annexin-V-FITC/PI 双染法和 Hoechst 法检测细胞凋亡, Western blot 法检测 Bcl-2、Survivin、Bax、Caspase-3 蛋白表达。[结果] 不同浓度白花蛇舌草注射液对鼻咽癌 CNE-2 细胞具有抑制增殖作用, 呈时间浓度依赖性 ($P < 0.05$)。8ml/L 白花蛇舌草注射液能明显诱导 CNE-2 细胞凋亡, 与对照组相比, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。8ml/L 白花蛇舌草注射液能诱导 CNE-2 细胞 Bcl-2、Survivin 蛋白表达降低、Bax 及 Caspase-3 蛋白表达增加。[结论] 白花蛇舌草注射液对鼻咽癌 CNE-2 细胞具有明显的体外增殖抑制作用, 且呈时间浓度依赖性, 其机制可能与诱导细胞凋亡, 降低 Bcl-2、Survivin 蛋白表达, 增加 Bax 及 Caspase-3 蛋白表达有关。

关键词: 白花蛇舌草; 鼻咽肿瘤; 细胞凋亡

中图分类号: R739.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)09-0737-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.09.B008

Effect of Hedyotis Diffusa on Proliferation and Apoptosis of Nasopharyngeal Carcinoma CNE-2 Cells *in vitro*

FANG Peng, ZOU Tian, JIANG Xiao-xiao

(The PLA 117 Hospital, Hangzhou 310013, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the anti-proliferation and apoptosis effects of Hedyotis diffusa in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells *in vitro* and the mechanisms. [Methods] The inhibition effect was detected by MTT method. Apoptosis was detected by Annexin-V-FITC/PI and Hoechst. Bcl-2, Survivin, Bax and Caspase-3 expressions were detected by Western blot assay. [Results] The growth of CNE-2 cells was inhibited by Hedyotis diffusa in a time and dose manner ($P < 0.05$). Cell apoptosis was induced significantly by 8ml/L Hedyotis diffusa compare to the controls ($P < 0.05$). The Bcl-2 and Survivin proteins' expressions were decreased, and the Bax and Caspase-3 proteins' expressions were increased by 8ml/L Hedyotis diffusa. [Conclusion] Hedyotis diffusa might inhibit proliferation and induce apoptosis of CNE-2 cells in a time and dose manner, and the mechanism may be related to decreasing the levels of Bcl-2 and Survivin proteins and increasing the levels of Bax and caspase-3 proteins.

Subject words: Hedyotis diffusa; nasopharyngeal neoplasms; cell apoptosis

鼻咽癌放化疗引起的严重的不良反应如口腔黏膜反应、味觉改变等, 影响患者生活质量。因此, 在天然药物中挑选具有抗肿瘤作用的药物来联合放疗增效减毒, 对治疗鼻咽癌具有重要的意义。白花蛇舌草具有清热解毒、利尿消肿、活血止痛、抗菌消炎和抗肿瘤等功效, 在临床上一一直用于腹部肿瘤治疗及放化疗后的辅助治疗。本研究应用白花蛇舌草注射液

作用鼻咽癌 CNE-2 细胞, 探讨其对鼻咽癌 CNE-2 细胞的体外抑制作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材 料

实验细胞株及试剂: 鼻咽癌 CNE-2 细胞购自中国科学院上海细胞所, 传代培养于加 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 5% CO₂, 37℃ 条件下培养。

通讯作者: 江晓肖, 主任医师, 硕士; 解放军 117 医院消化肿瘤科, 浙江省杭州市灵隐路 14 号 (310013); E-mail: 522237197@qq.com
收稿日期: 2015-03-16 **修回日期:** 2015-04-08

RPMI1640 培养液, 美国GIBCO 公司产品。胎牛血清, Hyclone NTE0100, Thermo 公司产品。四甲基偶氮唑蓝(MTT), Solarbio 公司产品。FITC Annexin V 凋亡试剂盒, BD 公司产品。Bax (D2E11) Rabbit mAb, Bcl-2 Antibody, Caspase-3 (8G10) Rabbit mAb, Survivin (71G4B7) Rabbit mAb, Cell Signaling 公司产品。白花蛇舌草注射液为吉林省通化振国药业有限公司产品(批号: 041010)。

1.2 方 法

1.2.1 MTT 法检测白花蛇舌草注射液对 CNE-2 细胞的抑制率

取对数生长期细胞, 细胞浓度为 5×10^4 个/ml, 接种于 96 孔板, 培养 24h 后吸去原培养液, 加入含白花蛇舌草注射液浓度分别是 0、1、2、4、8、16ml/L 的培养液, 培养 48h 后每孔加入 5mg/ml MTT $15 \mu\text{l}$, 继续培养 4h, 去上清, 加入酸化异丙醇 $100 \mu\text{l}$, 静置 30min, 待孔底褐色结晶完全溶解, 酶标仪检测 570nm 处各孔吸光度值 A_{570} , 计算各组抑制率。细胞抑制率 = (对照组 A_{570} - 试验组 A_{570}) / 对照组 $A_{570} \times 100\%$ 。

1.2.2 Annexin-V-FITC/PI 双染法及 Hoechst 染色法检测白花蛇舌草注射液对 CNE-2 细胞凋亡的作用

细胞浓度为 10×10^5 个/瓶接种于培养瓶, 分对照组及 8 ml/L 白花蛇舌草注射液组, 作用 24、48、72h 后收集细胞, 加入 $5 \mu\text{l}$ FITC Annexin V 和 $5 \mu\text{l}$ PI, 轻微振荡, 室温下避光孵育 15min, 流式细胞仪检测。收集细胞, 加入 0.5ml 固定液, 固定 10min。加入 0.5ml Hoechst 33258 染色液, 染色 5min。调整荧光显微镜激发波长 350nm, 发射波长 460nm, 检测呈蓝色的细胞核。

1.2.3 Western blot 法检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Survivin 蛋白表达

细胞浓度为 10×10^5 个/瓶接种于培养瓶, 分对照组及 8ml/L 白花蛇舌草注射液组, 作用 48h, 收集细胞, 用组织裂解液裂解并匀浆, $12\,000\text{r/min}$ 离心 15min, 取上清, 用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, -80°C 保存。取各组等量蛋白样品 $50 \mu\text{g}$, 以 10% 的十二烷基磷酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白, 湿转法使蛋白转移至 PVDF 膜上, 再用 5% 的脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2h, 后加入封闭液稀释的一抗, 4°C 过夜, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记

的二抗, 室温轻摇 2h, 洗膜后用 ECL 显影曝光, 应用光密度扫描仪扫描各条带密度。用凝胶图像处理系统分析。以靶蛋白与相应 GAPDH 的密度积分比值表示靶蛋白表达水平高低, 结果以实验组/对照组密度表示。

1.3 统计学处理

数据使用 SPSS 14.0 统计软件进行统计分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行配对资料方差分析。

2 结 果

2.1 白花蛇舌草注射液对 CNE-2 细胞增殖的抑制作用

不同浓度白花蛇舌草注射液对鼻咽癌 CNE-2 细胞均具有不同程度的抑制增殖作用, 呈时间浓度依赖性 (Table 1, Figure 1), 差异有统计学意义, 其中浓度梯度 F 值为 4.87, $P=0.015$, 时间梯度 F 值为 52.96, $P=0.008$ 。白花蛇舌草注射液对 CNE-2 细胞作用 24、48、72h IC_{50} 分别为 9.48、6.95、5.63ml/L。从结果中可以看出, 随着白花蛇舌草注射液浓度的增加, CNE-2 细胞的抑制率明显增加, 而随着白花蛇舌草注射液作用时间的增加, CNE-2 细胞的抑制率也随之增加。

Table 1 Cell inhibition rates of CNE-2 inhibited by Hedyotis diffusa (%)

Hedyotis diffusa (ml/L)	Cell inhibition rates (%)		
	24h	48h	72h
0	0	0	0
1	16.43 ± 1.79	18.17 ± 1.33	22.35 ± 1.71
2	20.75 ± 1.43	26.57 ± 1.28	31.92 ± 2.55
4	36.15 ± 2.44	41.74 ± 1.25	45.92 ± 2.34
8	47.68 ± 2.17	54.52 ± 3.81	59.43 ± 2.43
16	67.23 ± 3.12	72.47 ± 3.17	78.58 ± 2.55

2.2 白花蛇舌草注射液对 CNE-2 细胞凋亡的作用

Annexin-V-FITC/PI 双染法检测白花蛇舌草注射液作用 CNE-2 细胞 24h 即可引起凋亡, 48h 凋亡率继续增加, 持续到 72h 具有明显的凋亡作用。与对照组相比, 具有统计学意义 ($F=0.012$, $P=0.017$) (Table 2; Figure 2, 3)。

Hoechst 荧光染色法检测结果显示对照组细胞核染色呈正常的蓝色, 而白花蛇舌草注射液组各时间段的细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染, 颜色发白。提示白花蛇舌草作用 CNE-2 细胞可明显诱

Table 2 Apoptosis rates of CNE-2 induced by *Hedyotis diffusa* (%)

Groups	24h	48h	72h
Control	3.44 ± 1.58	5.02 ± 0.13	5.88 ± 2.44
<i>Hedyotis diffusa</i>	16.25 ± 2.77	26.15 ± 2.38	34.27 ± 3.62

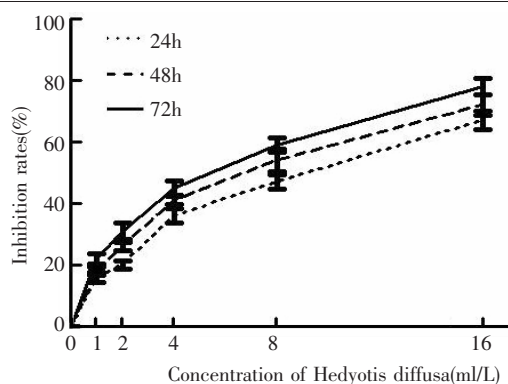


Figure 1 Cell inhibition rates of CNE-2 inhibited by *Hedyotis diffusa*

导细胞凋亡 (Figure 4)。

2.3 白花蛇舌草注射液对 CNE-2 细胞 Bcl-2、Survivin、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响

Western blot 检测白花蛇舌草注射液作用 CNE-2 细胞 48h, Bcl-2、Survivin、Bax、Caspase-3 蛋白表达

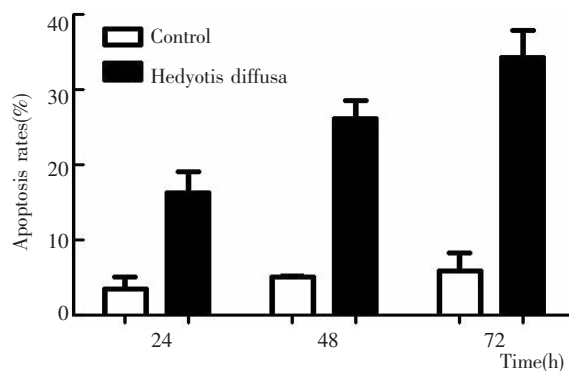


Figure 2 Apoptosis rates of CNE-2 induced by *Hedyotis diffusa*

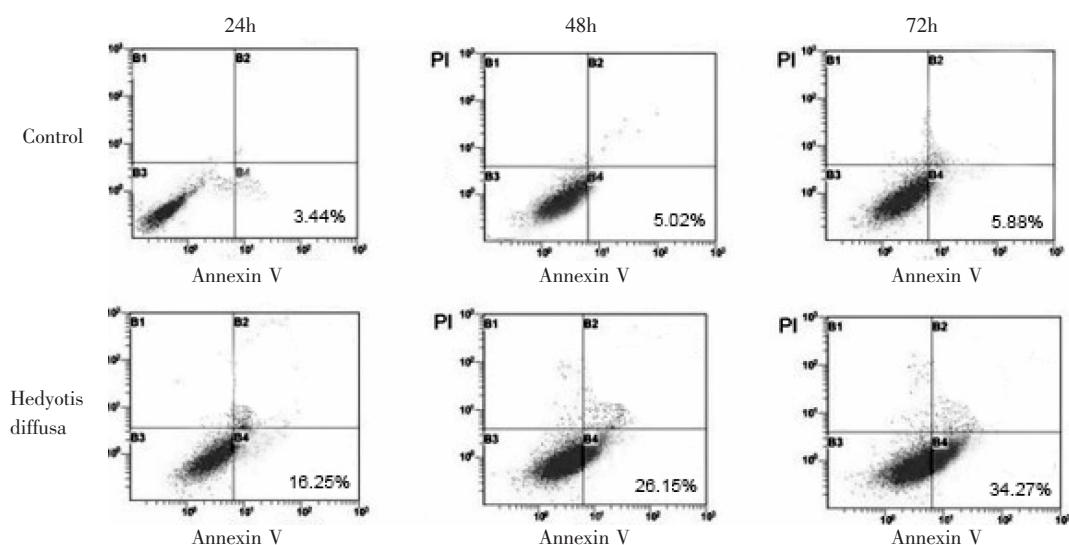
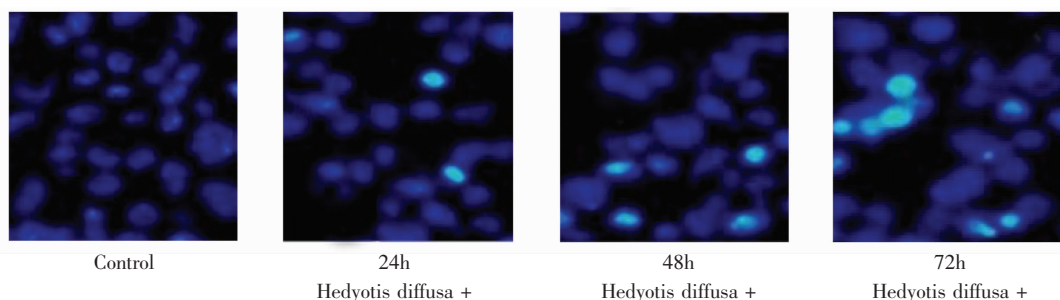
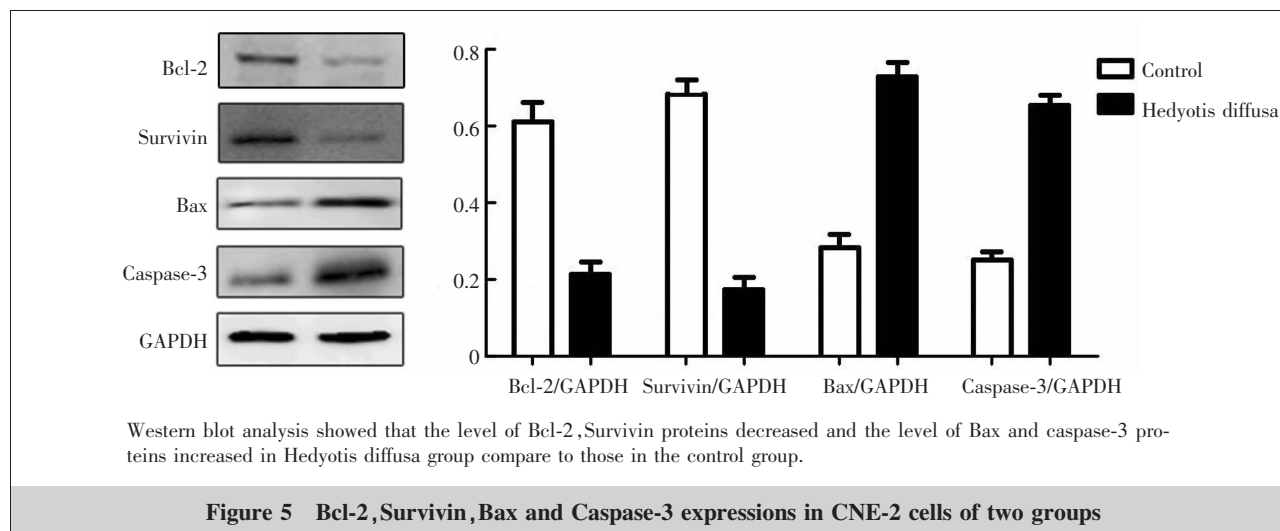


Figure 3 Apoptosis rates of CNE-2 induced by *Hedyotis diffusa*



The cells in control group were morphologically normal, and the nuclei were regularly shaped and evenly stained. The cells in *Hedyotis diffusa* group showed typical morphological changes of apoptosis, including nuclear shrinkage, DNA condensation and chromatin fragmentation.

Figure 4 Apoptosis of CNE-2 induced by *Hedyotis diffusa*



水平, 结果发现, Bcl-2、Survivin 蛋白表达降低, Bax 及 Caspase-3 蛋白表达增加。灰度值分析 Bcl-2/GAPDH 对照组 0.61, 白花蛇舌草组 0.22; Survivin/GAPDH 对照组 0.67, 白花蛇舌草组 0.18; Bax/GAPDH 对照组 0.26, 白花蛇舌草组 0.74; Caspase-3/GAPDH 对照组 0.24, 白花蛇舌草组 0.63, 白花蛇舌草组 Bcl-2、Survivin、Bax 和 Caspase-3 表达水平与对照组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

中药提取物作为抗肿瘤药物是目前研究的热点, 很多中药提取物或单体具有明确的抗肿瘤作用及复杂的作用机制^[1-4], 是当前肿瘤研究的又一大方向。白花蛇舌草系茜草科耳草属, 其性寒, 味苦、甘, 归胃、大肠、小肠经, 具有清热解毒、消炎止痛、利尿消肿的功效。白花蛇舌草含有蒽醌类、黄酮类、萜类等多种化学成分, 对炎症、肿瘤等疾病具有显著的效果^[5]。目前已有许多文献报道不同浓度白花蛇舌草制剂对多种不同肿瘤细胞具有明确的体外抑制增殖作用, 并通过调节细胞周期、诱导凋亡、作用相关信号通路的蛋白表达等发挥抗肿瘤效应或逆转耐药等。车杭盈等^[6]报道白花蛇舌草注射液能通过减少 Bcl-2 和 Survivin 基因表达, 促进凋亡, 从而抑制 A549 肺癌细胞生长。苏延旭等^[7]报道白花蛇舌草多糖诱导人胃癌细胞凋亡, 降低细胞 Bcl-2 和增加 p53 基因表达。王春涛等^[8]报道白花蛇舌草对 HepG2 人

肝癌细胞具有抑制增殖和诱导凋亡作用, 能降低 Bcl-2 和增加 Caspase-3 表达。林久茂等^[9]报道白花蛇舌草提取物具有逆转结肠癌细胞 5-Fu 耐药的作用, 下调耐药基因 ABCG2 的 mRNA 表达。

本研究显示不同浓度白花蛇舌草注射液能抑制鼻咽癌细胞 CNE-2 增殖, 具有剂量浓度依赖性, 随着药物剂量和作用时间的增加, 细胞抑制率明显增加, 并能明显诱导 CNE-2 细胞凋亡。进一步研究发现, 白花蛇舌草注射液能抑制鼻咽癌细胞 CNE-2 增殖, 通过诱导 Bcl-2 及 Survivin 蛋白表达降低、Bax 及 Caspase-3 蛋白表达增加, 促进细胞凋亡。

诱导肿瘤细胞凋亡在肿瘤治疗中具有重要作用。如何调控凋亡相关基因或其相应产物, 提高肿瘤细胞对药物的敏感性, 诱导细胞进入凋亡是肿瘤治疗取得成功的关键。其中 Bcl-2 家族及 Caspase-3 是了解较为深入的与凋亡调控有关的基因^[10]。研究表明, Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡中发挥重要作用, Bcl-2 蛋白可抑制细胞凋亡, Bax 蛋白可促进细胞凋亡。Bax 能促进细胞色素 C 的释放, 激活 Caspase, 抑制 Bcl-2 的作用等而导致细胞凋亡。而 Caspase-3 被认为是介导细胞凋亡的核心酶。因而调节 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达在诱导细胞凋亡中具有重要作用。而 Survivin 也是细胞凋亡通路中非常重要的一个蛋白, 它可直接抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性, 有效阻断细胞凋亡过程, 也可以通过与细胞周期调控因子 CDK4 形成 Survivin-CDK4 复合体, 使 p21 从 CDK 的复合体中释放出来并异位到线粒体

而间接抑制 Caspase-3 的活性,从而发挥抑制凋亡的作用^[11]。Survivin 还有可能通过抑制 Caspase-9 活性发挥抗凋亡作用,有研究发现 Survivin 可与辅助性线粒体源性 Caspase 激活因子 SMAC 结合,使 IAP 家族其他成员免受 SMAC 的抑制,从而抑制 Caspase-9 的活性^[12]。Survivin 还可以通过诱导肿瘤坏死因子受体介导的 NF- κ B 的活化抑制细胞凋亡^[13],以及抑制 IL-3、Fas、bax、TNF- α 、抗肿瘤药物及 X 线辐射诱导引起的细胞凋亡。白花蛇舌草注射液能明显诱导细胞凋亡增加,机制可能与诱导 Bcl-2 及 Survivin 蛋白表达降低、Bax 及 caspase-3 蛋白表达增加有关。

白花蛇舌草在抗肿瘤领域的应用具有极大潜力,但其具体机制、体内效应尚待进一步阐明。

参考文献:

- [1] Chen L, Tu Y, Zhang LY. Effect of Ginsenoside Rg3 and cisplatin on immunity and tumor related proteins in nude mice bearing ovarian cancer[J]. Journal of Chinese Oncology, 2014, 20(11): 914-919. [陈鲁, 屠珏, 张英丽. 人参皂苷 Rg3 与顺铂对荷卵巢癌裸鼠免疫功能及肿瘤相关蛋白的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(11): 914-919]
- [2] He C, Chen QY, Wang J, et al. Curcumin inducing autophagy in lung cancer A549 cells through down-regulation of mTOR [J]. Journal of Chinese Oncology, 2014, 20(5): 363-368. [何聪, 陈清勇, 王剑, 等. 姜黄素下调 mTOR 诱导人肺癌 A549 细胞自噬的研究 [J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(5): 363-368.]
- [3] Tang HB, Cai JW, Liu WG, et al. Effects of Paeonol on growth inhibition of human breast cancer cells[J]. Journal of Chinese Oncology, 2014, 20(4): 276-281. [汤海标, 蔡锦威, 刘卫国, 等. 丹皮酚对乳腺癌细胞的生长抑制作用[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(4): 276-281.]
- [4] Yin B, Li ZW, Zhang N, et al. Anti-tumor efficacy of Oridonin to rat C6 glioma in nude mouse xenograft model[J]. Journal of Chinese Oncology, 2014, 20(1): 34-39. [尹波, 李志伟, 张弩, 等. 冬凌草甲素对 C6 大鼠脑胶质瘤裸鼠异种移植模型的抗肿瘤疗效研究[J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(1): 34-39.]
- [5] Ji BY, Fan CQ, Pei LX, et al. Advance on the chemical and pharmacological effects studies of Hedyotis diffusa[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(19): 235-240. [纪宝玉, 范崇庆, 裴莉昕, 等. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 235-240.]
- [6] Che HY. The effect and mechanism of Hedyotis Diffusa Willd Injection on the apoptosis of A549 cell[J]. Research of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2014, 6(1): 20-22. [车杭盈. 白花蛇舌草注射液诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的机制研究[J]. 中西医结合研究, 2014, 6(1): 20-22.]
- [7] Su YX, Xia AJ, Su ZH, et al. Effect on apoptosis of human gastric cancer cells induced by Hedyotis Diffusae Polysaccharide [J]. pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2014, 30(6): 493-496. [苏延旭, 夏爱军, 苏志恒, 等. 白花蛇舌草多糖诱导人胃癌细胞凋亡作用的研究[J]. 解放军药理学学报, 2014, 30(6): 493-496.]
- [8] Wang CT, Wang XD, Han YL, et al. Effects of Hedyotis diffusa on the expression of Bcl-2 and Caspase-3 in human hepatoma HepG2 cell [J]. Food and Nutrition in China, 2012, 18(7): 63-65. [王春涛, 王晓东, 韩彦龙, 等. 白花蛇舌草对 HepG2 人肝癌细胞 Bcl-2 和 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(7): 63-65.]
- [9] Lin JM, Zhan YZ, Wei LH, et al. Hedyotis diffusa reverse the 5-Fu resistance in colon cells [J]. Fujian Journal of TCM, 2013, 44(1): 53-55. [林久茂, 詹友知, 魏丽慧, 等. 白花蛇舌草提取物逆转结肠癌细胞 5-Fu 耐药的作用[J]. 福建中医药, 2013, 44(1): 53-55.]
- [10] Anjum R, Khar A. Differential regulation of apoptosis in AK-5 tumor cells by the protooncogene Bcl-2: presence of Bcl-2 dependent and independent pathways[J]. FEBS Lett, 2001, 499(1-2): 166-170.
- [11] Uren A G, Wong L, Pakusch M, et al. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype [J]. Curr Biol, 2000, 10(21): 501319-501328.
- [12] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M. Identification of DLABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins [J]. Cell, 2000, 102(1): 43-45.
- [13] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis[J]. Genes, 1999, 13(3): 239-252.