DOI:10.16016/j.1000-5404.201605019

2-甲氧基雌二醇对鼻咽癌 CNE-2 干细胞体外增殖、迁移及放疗敏感性的影响

吴顺龙[1],李少林[2],李亚军[3,4] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肿瘤科[1];400016 重庆,重庆医科大学基础医学院放射医学与肿瘤教研室[2];563000 贵州 遵义,遵义医学院附属医院肿瘤科[3];563000 贵州 遵义,遵义医学院第三附属医院肿瘤科[4])

[摘要] **目的** 探讨 2-甲氧基雌二醇(2-methoxyestradiol,2-MeOE2)对人鼻咽癌 CNE-2 干细胞(nasopharyngeal cancer stem cells,NPCSCs)增殖、迁移及放疗敏感性的影响及其可能机制。**方法** 收集本课题组前期富集并已鉴定的鼻咽癌 CNE-2 干细胞,Western blot 检测亲本 CNE-2 细胞及 NPCSCs 乏氧诱导因子-1α(HIF-1α)和核转录因子(NF-κB p65)的蛋白表达,克隆形成实验检测两组细胞的放射敏感性。按 2-MeOE2 浓度分为 3 组,分别用 0、4、8 μmol/L 2-MeOE2 处理鼻咽癌干细胞,倒置显微镜观察细胞形态变化,CCK-8 及 Transwell 检测细胞增殖及迁移能力,再联合 X 射线(0、2、4、8 Gy)照射,克隆形成实验检测 3 组细胞放疗敏感性;同时用 4 μmol/L 2-MeOE2 处理鼻咽癌干细胞后不同时间(0、24、48 h)提取蛋白,Western blot 检测不同浓度 2-MeOE2 处理以及 4 μmol/L 2-MeOE2 处理后 0、24、48 h 提取的干细胞 HIF-1α 和 NF-κB p65 蛋白表达。**结果** 相对于亲本 CNE-2 细胞,干细胞 HIF-1α 和 NF-κB p65 蛋白表达明显增高(P 均 <0.01),X 射线辐射后干细胞各放射学参数 D0、Dq、N 及 SF2 均高于亲本 CNE-2 细胞。0、4、8 μmol/L 2-MeOE2 处理干细胞后,随浓度增加,致密球状生长的干细胞微球体逐渐变得离散,干细胞增殖活力降低($P<0.01$);迁移能力降低($P<0.01$);放疗敏感性增高,4 μmol/L 2-MeOE2 组放射增敏比(sensitivity enhancement ratio, SER)为 1.19,8 μmol/L 2-MeOE2 组 SER 为 1.39;HIF-1α、NF-κB p65 蛋白表达降低($P<0.01$),呈浓度依赖性。2-MeOE2 (4 μmol/L) 处理干细胞后随时间延长 HIF-1α、NF-κB p65 蛋白表达明显降低($P<0.01$),呈时间依赖性。**结论** 相对于亲本 CNE-2 细胞,干细胞高表达 HIF-1α 和 NF-κB p65,并且对放疗具有较低的敏感性。2-MeOE2 能有效抑制鼻咽癌 CNE-2 干细胞增殖、迁移并增加其放疗敏感性,其机制可能为 2-MeOE2 抑制 HIF-1α 和 NF-κB p65 蛋白表达。

[关键词] 鼻咽癌;癌干细胞;HIF-1α;2-MeOE2;NF-κB p65;放疗敏感性

[中图法分类号] R739.63;R965;R977.12 [文献标志码] A

Effects of 2-methoxyestradiol on proliferation, migration and radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 stem cells

WU Shunlong[1], LI Shaolin[2], LI Yajun[3,4] ([1]Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Radiation Oncology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [3]Department of Oncology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, 563000, Guizhou Province; [4]Department of Oncology, Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, 563000, Guizhou Province, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and conceivable mechanism of 2-methoxyestradiol (2-MeOE2) on the proliferation, migration and radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma (NPC) CNE-2 stem cells *in vitro*. **Methods** Pre-identified and collected NPC CNE-2 stem cells from our group were used for this study. Nasopharyngeal carcinoma stem cells (NPCSCs) were treated by 2-MeOE2 at different concentrations (0, 4 and 8 μmol/L). After the treatment, the cells were further irradiated by X-rays at the

[基金项目] 国家自然科学基金(81560444);贵州省卫计委立项课题(gzwjkj2014-2-167);贵州省科技厅社会发展攻关课题(黔科合 SY 字[2015]3046 号)——子课题

[通信作者] 李亚军,E-mail:714136965@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160713.1620.005.html

doses of 0, 2, 4 and 8 Gy. Total proteins were extracted in 0, 24 and 48 h after the cells treated by 2-MeOE2 (4 μmol/L). Western blotting and colony formation assay were used to detect protein expression of HIF-1α and NF-κB p65 and radiosensitivity of CNE-2 and NPCSC. CCK-8 assay and transwell assay were used to measure the proliferation and migration of NPCSC. **Results** Western blot results showed that HIF-1α and NF-κB p65 were increasingly expressed in the NPCSCs compared with the parental CNE-2 cells ($P<0.01$). Radiation-related parameters D0, Dq, N and SF2 had higher values in, NPCSCs than in CNE-2 cells. After treatment, the proliferation and migration capabilities of NPCSCs were decreased significantly along with increased 2-MeOE2 concentration ($P<0.01$). 2-MeOE2 treatment also increased radiosensitivity in NPCSCs, showing sensitivity enhancment ratio (SER) values of 1.19 and 1.39 at 4 and 8 μmol/L of 2-MeOE2, respectively. Moreover, the protein expression of HIF-1α and NF-κB p65 was decreased significantly along increased concentration and delayed harvested time, suggesting their expression patterns were concentration- and time-dependent ($P<0.01$). **Conclusion** Compared with CNE-2 cells, NPCSCs have higher protein expression of HIF-1α and NF-κB p65, and are resist to radiotherapy. 2-MeOE2 could effectively reduce the proliferation and migration, and sensitize the radioresistance to NPC CNE-2 stem cells, which might mechanistically relate to 2-MeOE2 inhibition of expression of HIF-1α and NF-κB p65.

[**Key words**] nasopharyngeal carcinoma; cancer stem cells; HIF-1α; 2-MeOE2; NF-κB p65; radiosensitivity

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81560444), the Project of Guizhou Provincial Health and Family Planning Commission (gzwjkj2014-2-167); and the Tackling Project of Social Development of Guizhou Provincial Department of Science and Technology (2015-3046).
Corresponding author: Li Yajun, E-mail:714136965@qq.com

鼻咽癌是一类起源于鼻咽黏膜上皮的恶性肿瘤,放射治疗为其主要的治疗手段[1]。98%的鼻咽癌属低分化鳞癌,对射线中度敏感;但肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)理论认为,鼻咽癌干细胞(nasopharyngeal cancer stem cells,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[2-4]。CSCs对放疗抵抗的原因很多,包括在乏氧环境中高度激活的缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1,HIF-1)和核转录因子(nuclear factor-kappa B,NF-κB)等[5-6]。

2-甲氧基雌二醇(2-methoxyestradiol,2-MeOE2)为雌二醇在体内的生理代谢产物,研究发现2-MeOE2能抑制多种肿瘤(包括头颈部肿瘤)的生长及血管形成,并且增加紫杉醇的抗癌效应[7-11]。2-MeOE2也能抑制前列腺癌[12]、髓母细胞瘤[13]及白血病K562细胞[14]的增殖与凋亡。2-MeOE2作为一种新型的抗癌及放化疗增敏药物被研究[15],但2-MeOE2对NPCSC的影响尚不清楚。目前,获得CSCs的方法主要有侧群分选、免疫磁珠分选、自体荧光检测等,其中含生长因子的无血清培养基悬浮富集CSCs是一种快速有效获得CSCs的方法,被广泛用于干细胞研究中[16-17]。本课题组前期利用此方法已成功富集鼻咽癌CNE-2干细胞,并通过体内及体外一系列实验鉴定其干性[18-19]。本研究在此基础之上,探讨目前热点研究的抗癌药物2-MeOE2对NPCSCs增殖、迁移及放疗敏感性的影响及机制,为彻底根除CSCs进而提高鼻咽癌局部控制率提供实验基础和依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

青霉素、链霉素、RMPI 1640培养液、DMEM/F12培养液、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)和细胞消化液Accutase均为美国Gibco公司产品,B27(美国Invitrogen);2-MeOE2(selleckchem,上海蓝木化工有限公司);CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒(日本Dojindo公司),Transwell小室(8 μm)(北京明阳科华生物科技有限公司);细胞裂解液和苯甲基磺酰氟(碧云天生物技术研究所);鼠抗人NF-κB p65单抗(美国Cell Signaling公司),鼠抗人HIF-1α和GAPDH单抗(武汉博士德生物工程有限公司);羊抗小鼠IgG-HR(武汉博士德生物工程有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术研究所)。倒置光学显微镜(日本Nikon公司)、正置荧光显微镜(日本Olympus公司),凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),放疗用直线加速器Varian 21EX(美国Varian公司)。

1.2 细胞培养及传代

无血清培养基悬浮培养鼻咽癌CNE-2干细胞(NPCSCs):DMEM/F12培养液中加入青霉素(100 U/mL)、链

霉素(100 μg/mL)、EGF、bFGF 和2% B27,放于37 ℃、CO_2 体积分数为5%的细胞培养箱中培养。5~7 d 传代,传代时先离心收集微球体,再用上述干细胞培养液重悬细胞,然后转入新培养瓶中,继续置于上述细胞培养箱培养。

1.3 2-MeOE2 处理细胞及分组

根据说明书将购买的2-MeOE2 粉末溶解于 DMSO 中,按 1 mg 加入 3.306 8 mL DMSO 配制获得浓度为 1 mmol/L的储备液。实验时收集 NPCSC 离散为单细胞悬液,倍比稀释为 10^6/mL,以每孔 992 μL 种植于6孔板。实验分为3组:①对照组,以培养液中仅加入 8 μL 溶剂 DMSO 设为对照组;②低浓度组:每孔加入储备液4 μL、DMSO 4 μL 配制为2-MeOE2(4 μmol/L)浓度组;③高浓度组:每孔加入储备液 8 μL 配制为2-MeOE2(8 μmol/L)浓度组。加药后将6孔板置于细胞培养箱培养 24 h 取出,进行后续实验。

1.4 CCK-8 细胞增殖实验

收集各组细胞倒入离心管静置5 min,吸弃上层液体,保留下层细胞浑浊液,离心、消化制备成单细胞悬液,计数,倍比稀释为 1×10^4/mL,以每孔 200 μL 加入96孔板,每组设8个复孔,每孔加入 20 μL CCK-8,于细胞培养箱孵育 3 h 后酶标仪检测波长 630 nm 处各孔光密度值[D(630)]。以 0 μmol/L 处理为对照组,其他组 D(630)值与对照组 D(630)值的比值反映相对增殖活力,实验重复3次。

1.5 Transwell 小室迁移实验

收集各组细胞倒入离心管静置5 min,吸弃上层液体,保留下层细胞浑浊液,离心、消化制备成单细胞悬液。用不含血清的 RMPI 1640 培养液重悬、计数细胞,梯度倍比稀释为 2×10^5 个/mL,100 μL/孔加入至24孔板中的 Transwell 小室上室,于下室加入 500 μL 含10% FBS 的 RMPI 1640 培养液,置于37 ℃、CO_2 体积分为5%的细胞培养箱中进行培养。24 h 后取出小室,用棉签轻轻擦去上室中的细胞,4% 多聚甲醛溶液室温固定30 min,于下室加入2 mL 结晶紫溶液染色后用 PBS 润洗,于光学显微镜下随机选取 5 个视野(200×)照相,并计数穿过膜孔的下室细胞数目,进行统计分析。实验重复3次。

1.6 克隆形成实验

收集各组细胞倒入离心管静置5 min,吸弃上层液体,保留下层细胞浑浊液,离心、消化制备成单细胞悬液,以每孔 200、400、800、1 600 细胞接种于 24 孔板,为排除悬浮细胞再分化对 X 射线效应的影响,接种后立即将不同细胞孔分别采用0、2、4、8 Gy X 射线照射,X 射线能量6 MV,源皮距 100 cm,剂量率为300 U/min。照射后置于细胞培养箱培养,14 d 后取出用 PBS 洗涤,99.5% 甲醇固定 10 min,结晶紫染色 20 min ,显微镜观察计数大于50个细胞克隆的集落数。以 0 Gy 组计算克隆形成率(plating efficiency,PE),PE = 克隆数/接种细胞数×100 % ;细胞存活分数(survival fraction,SF) = 照射后细胞形成的克隆数/(接种细胞数×PE)。采用多靶单击模型由 GraphPad Prism 5.0 拟合生存曲线并计算出相关放射学参数,方程为 $SF = 1-(1-e^{D/D0})^N$,平均致死剂量(D0),存活曲线肩区(Dq),外推数 N,2 Gy 细胞存活分数 SF2,放射增敏比(sensitivity enhancement ratio,SER) = D0(对照组)/D0(实验组),Dq = D0logN。实验重复3次。

1.7 蛋白质印记法检测干细胞 NF-κB p65、HIF-1α 蛋白的表达

收集各组细胞,离心后弃上清,蛋白提取、浓度测定及 Western blot 检测参考文献[18]的方法进行,其中抗体稀释倍数为:GAPDH 、HIF-1α 均为 1∶200,NF-κB p65 1∶1 000 稀释,二抗山羊抗鼠 IgG 为 1∶4 000 稀释,凝胶成像系统采集图像,分析。

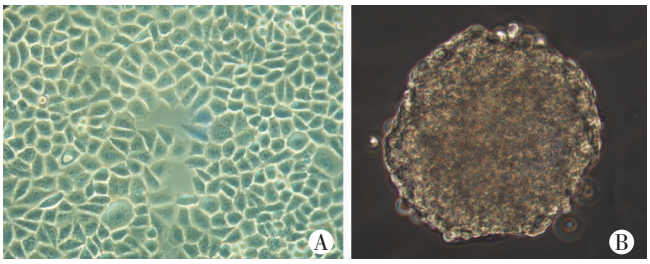
1.8 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;3组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。相关性分析用 pearson 相关分析双侧检验。

2 结果

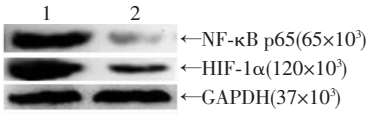
2.1 与亲本 CNE-2 细胞相比,NPCSCs 高表达 HIF-1α 和 NF-κB p65 蛋白,放疗敏感性降低

倒置显微镜观察可见 CNE-2 细胞贴壁生长,呈多边形(图1A),NPCSCs 紧密结合呈微球体状悬浮生长在含生长因子的无血清培养基中(图1B)。Western blot 结果显示,NPCSCs 细胞 HIF-1α 和 NF-κB p65 蛋白表达均明显高于 CNE-2 细胞($P<0.01$,图2)。克隆形成实验检测细胞放疗敏感性,经多靶单击模型拟合生存曲线(图3),可见 NPCSCs 的各放射学参数 D0、Dq、N、SF2 均高于 CNE-2 细胞。CNE-2 细胞 SER 为1.32,放疗敏感性明显强于 NPCSCs(表1)。



A:CNE-2 细胞;B:NPCSC 细胞

图1 倒置显微镜观察 CNE-2、NPCSC 细胞形态 (×200)



1：NPCSC 细胞;2:CNE-2 细胞

图 2　Western blot 检测两组细胞 NF-κB p65 和 HIF-1α 蛋白表达

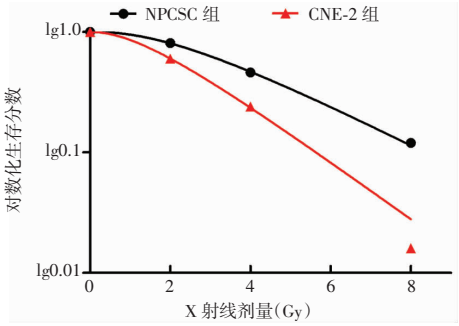


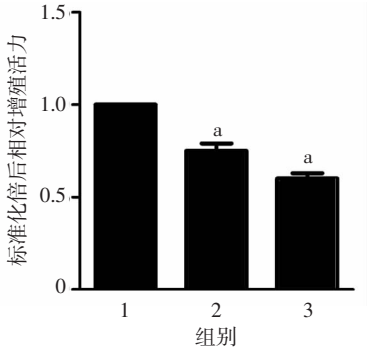
图 3　多靶单击模型拟合两组细胞生存曲线

表 1　亲本 CNE-2 细胞及 NPCSCs 细胞的相关放射学参数

细胞	D0	Dq	N	SF2	SER
NPCSCs	2.574	1.09	2.654	0.809	
CNE-2	1.950	0.65	2.244	0.629	1.32

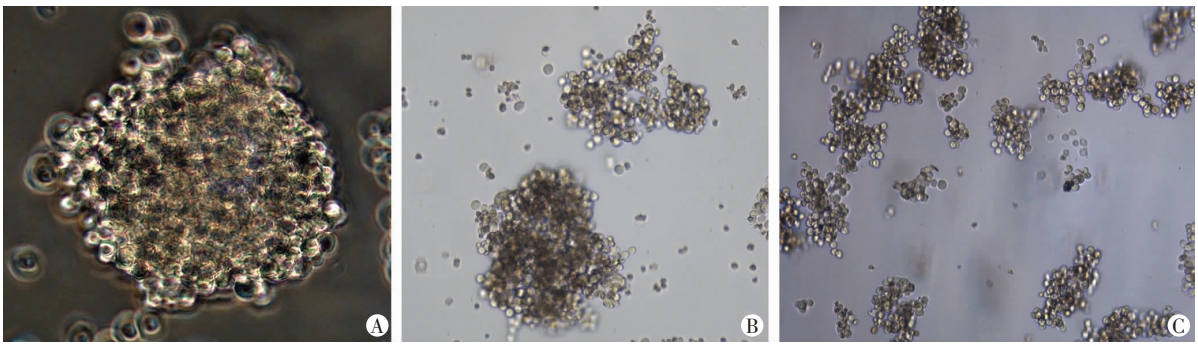
2.2　2-MeOE2 处理能降低 NPCSCs 的增殖、迁移并增强其放疗敏感性

2-MeOE2 处理 NPCSCs 24 h 后,倒置显微镜下可以看到,随浓度增高,致密球状生长的干细胞逐渐变得离散(图 4)。CCK-8 法检测细胞增殖活力可见:随 2-MeOE2 浓度增高,NPCSCs 增殖活力逐渐下降,呈浓度依赖方式($P<0.01$,图 5)。Transwell 迁移实验(图 6)结果显示,0、4、8 μmol/L 2-MeOE2 处理组穿过小室膜孔的细胞数分别为(185 ± 20)、(96 ± 14)、(37 ± 10),4、8 μmol/L 2-MeOE2 处理组显著低于 0 μmol/L 2-MeOE2 组($P<0.01$)。用克隆形成实验检测 NPCSCs 的放疗敏感性,可见随 2-MeOE2 浓度增高,不同 X 射线剂量辐射后 NPCSCs 的克隆形成率明显降低;经 GraphPad Prism 5 软件,按多靶单击模型拟合生存曲线(图 7)可见,经不同剂量照射后,随 2-MeOE2 浓度增高,细胞放射学参数 D0、Dq、N、SF2 均降低,以 0 μmol/L 2-MeOE2 组为对照,4 μmol/L 2-MeOE2 组 SER 为 1.19,8 μmol/L 2-MeOE2 组 SER 为 1.39(表 2)。



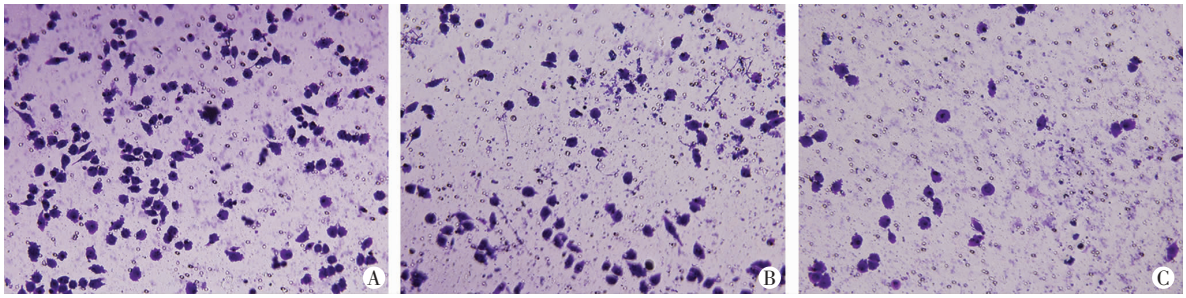
1：0 μmol/L 2-MeOE2 组；2：4 μmol/L 2-MeOE2 组；3:8 μmol/L 2-MeOE2 组；a：$P<0.01$，与 0 μmol/L 组比较

图 5　CCK-8 检测药物作用后细胞增殖能力变化



A:0 μmol/L 2-MeOE2 组;B:4 μmol/L 2-MeOE2 组;C：8 μmol/L 2-MeOE2 组

图 4　倒置显微镜观察药物处理后细胞形态（×200）



A:0 μmol/L 2-MeOE2 组;B:4 μmol/L 2-MeOE2 组;C:8 μmol/L 2-MeOE2 组

图 6　Transwell 检测药物作用后细胞迁移能力的变化（结晶紫 ×200）

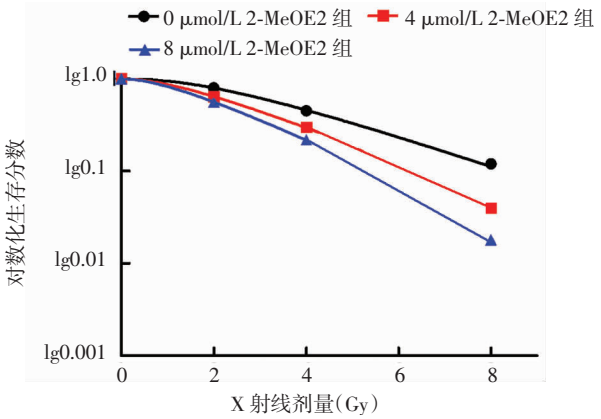


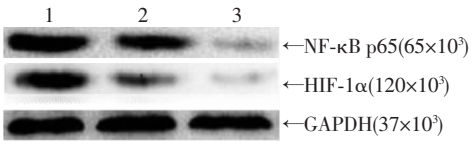
图 7 多靶单击模型拟合 2-MeOE2 处理后干细胞生存曲线

表 2 不同浓度 2-MeOE2 作用 24 h 后 NPCSC 相关放射学参数

2-MeOE2 浓度	D0	Dq	N	SF2	SER
0 μmol/L	2.600	1.048	2.53	0.80	
4 μmol/L	2.160	0.669	2.04	0.64	1.194
8 μmol/L	1.856	0.55	1.98	0.56	1.394

2.3 2-MeOE2 处理能降低 CNE-2 干细胞 HIF-1α 和 NF-κB p65 的蛋白表达

Western blot 检测结果显示,随着 2-MeOE2 浓度增加,HIF-1α 蛋白表达明显降低,NF-κB p65 表达也随之降低,均具有浓度依赖性(图 8)。相关性分析发现,2-MeOE2 浓度与 HIF-1α 和 NF-κB p65 蛋白表达 pearson 相关系数 r 分别为 −0.968 和 −0.983,呈显著负相关(P 均 <0.01)。经回归分析可得回归方程为:浓度 = 9.249 − 0.119 ×(NF-κB p65 蛋白灰度值) − 0.039 ×(HIF-1α 蛋白灰度值),R = 0.984,回归方程有统计学意义(P < 0.01)。用 2-MeOE2(终浓度为 4 μmol/L)处理干细胞后,分别 0、24、48 h 提取蛋白,Western blot 发现随时间延长,NPCSCs 细胞 NF-κB p65、HIF-1α 蛋白表达均明显降低(P < 0.01,表 3)。HIF-1α 和 NF-κB p65 蛋白表达之间也呈明显的正相关(r = 0.999,P = 0.032)。



1:0 μmol/L 2-MeOE2 组;2:4 μmol/L 2-MeOE2 组;3:8 μmol/L 2-MeOE2 组

图 8 Western blot 检测不同浓度 2-MeOE2 处理 NPCSCs 24 h 后 HIF-1α、NF-κB p65 蛋白的表达

表 3 2-MeOE2 处理 CNE-2 干细胞不同时间 NF-κB p65、HIF-1α 蛋白表达(n = 3,$\bar{x} \pm s$)

2-MeOE2 处理后时间	NF-κB p65	HIF-1α
0 h	56.54 ± 5.98	61.39 ± 6.86
24 h	35.41 ± 4.06[a]	28.11 ± 3.97[a]
48 h	8.04 ± 1.46[a]	10.51 ± 2.11[a]

a:P < 0.01,与 0 h 比较

3 讨论

本课题组前期已富集 NPCSCs,经鉴定已明确其比亲本 CNE-2 细胞具有较高的自我更新、迁移能力,高表达 CD133、CD44 以及干性相关基因[18-19]。本研究用 Western blot 以及克隆形成实验检测 NPCSC 和亲本 CNE-2 细胞的 HIF-1α 和 NF-κB p65 蛋白表达以及放疗敏感性,可见相对于亲本 CNE-2 细胞,NPCSCs 具有更高的 HIF-1α 和 NF-κB p65 蛋白表达和较低的放疗敏感性。

2-MeOE2 是雌二醇在体内的代谢产物,目前正作为一种抗癌药物被研究[15]。最近研究发现它具有调节细胞周期阻滞及凋亡[20],抗有丝分裂[15],调节转录因子(包括 HIF-1α[7] 和 NF-κB[12])活性等,对多种肿瘤的发生和进展有重要作用[7-13],但 2-MeOE2 对 NPCSCs 的作用尚不清楚。本实验显示随着 2-MeOE2 浓度增高,NPCSCs 的生长受抑制,细胞增殖活力及迁移能力降低,放疗敏感性增高,说明 2-MeOE2 能抑制干细胞增殖、迁移并增加 NPCSCs 的放疗敏感性。

乏氧微环境作为影响肿瘤放疗敏感性的重要因素,普遍存在于实体肿瘤中[22]。乏氧环境下 HIF-1 高表达,HIF-1α 为 HIF-1 的氧功能调节亚基[23]。HIF-1α 主要是在缺氧条件下促进靶基因转录从而使细胞发生一系列的缺氧反应,参与肿瘤血管的生成、细胞凋亡、炎症及肿瘤治疗抵抗等[24-26]。研究表明,2-MeOE2 能使微管解聚,并抑制 HIF-1α 核积累以及 HIF-1 转录活性[7]。目前在小鼠急性肺损伤、高血压及骨骼肌、肿瘤等研究中证实 2-MeOE2 能抑制 HIF-1α 的表达[8-11]。所以我们提出假设,2-MeOE2 能调节 HIF-1α 的表达,进而影响 NPCSCs 的增殖、迁移及放疗敏感性等重要生物特性。采用 Western blot 检测不同浓度以及不同时间 2-MeOE2 处理后各组细胞 HIF-1α 的表达,结合 SPSS 统计分析 2-MeOE2 与 HIF-1α 蛋白表达的量效关系及时效关系,结果显示 HIF-1α 蛋白表达随 2-MeOE2 浓度增高而降低,并且随 2-MeOE2 作用时间延长而降低,具有明显的浓度、时间依赖性。因此,

我们推测 2-MeOE2 抑制 HIF-1α 的表达很可能是2-MeOE2抑制 NPCSC 增殖、迁移及增加其放疗敏感性的重要机制。

NF-κB 是一类核转录因子,在肿瘤(包括鼻咽癌)的发生发展中起着至关重要的作用[27],p65 是 NF-κB 的关键功能活性亚基[28]。研究表明,2-MeOE2 能调节 NF-κB p65 的表达及活性影响多种肿瘤的生长与凋亡[12]。然而 NF-κB 在 2-MeOE2 抑制肿瘤生长中的角色是复杂的,而且不同 NF-κB 活性的肿瘤细胞中 2-MeOE2 产生的效应不同。例如,在前列腺 LNCaP 细胞中,2-MeOE2 能增加 NF-κB 活性,但在 PC3 细胞中 2-MeOE2 能降低 NF-κB 活性。并且 2-MeOE2 增加 NF-κB 活性是诱导还是拮抗细胞凋亡取决于细胞的病理类型。同时本课题组先前的研究发现 NF-κB 能调节细胞 EMT 进而介导 NPCSC 对化疗的抵抗[18]。我们推测:NF-κB 在 2-MeOE2 抑制 NPCSC 增殖、迁移及放疗抵抗中有重要作用。为进一步探讨 2-MeOE2 对 NPCSC 作用的机制,采用 Western blot 检测了 2-MeOE2 不同浓度和时间作用后干细胞 NF-κB p65 蛋白的改变。结合 SPSS 分析发现 NF-κB p65 蛋白表达对 2-MeOE2 具有明显的浓度、时间依赖性,表明 2-MeOE2 能有效抑制鼻咽癌 CNE-2 干细胞 NF-κB p65 表达,并且很可能与 2-MeOE2 抑制 NPCSC 增殖、迁移及增加其放疗敏感性有关。

本研究显示,随着 2-MeOE2 浓度增高,NF-κB p65 与 HIF-1α 蛋白的降低有相关趋势。有研究表明,HIF-1α 可通过 NF-κB 独立或依赖途径影响癌细胞的增殖与凋亡[29],我们推测 2-MeOE2 对 NPCSC 的抗癌效应机制可能为 2-MeOE2 抑制了 HIF-1α/NF-κB 信号通路。但也有研究表明,NF-κB 能在基因水平调节 HIF-1α 转录[30-31]。所以在 NPCSC 中,NF-κB 与 HIF-1α 之间的调控关系还有待进一步研究。为进一步明确 NF-κB 与 HIF-1α 在 2-MeOE2 抑制 NPCSC 增殖、迁移及放疗抵抗中的作用,本课题组将采用基因干扰技术分别下调 NF-κB 与 HIF-1αRNA,以明确 NF-κB 和 HIF-1α 之间的调控关系以及二者在 2-MeOE2 抗癌效应中的作用,为 2-MeOE2 抗肿瘤的临床应用提供实验依据。

综上所述,2-MeOE2 能抑制 NPCSC 增殖、迁移并增加其放疗敏感性,其机制可能为 2-MeOE2 抑制 HIF-1α 和 NF-κB 蛋白表达。2-MeOE2 有望成为一种新型的肿瘤治疗药物或放疗增敏剂,但需要更多的研究与论证。

参考文献:

[1] 王志海, 曾泉, 陈弢, 等. 抑制 NFBD1 基因的表达对鼻咽癌 CNE-1 细胞放射敏感性的影响[J]. 肿瘤, 2014, 34(2): 101-107. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431

[2] Long H, Xie R, Xiang T, *et al*. Autocrine CCL5 signaling promotes invasion and migration of CD133 + ovarian cancer stem-like cells *via* NF-κB-mediated MMP-9 upregulation[J]. Stem Cells, 2012, 30(10): 2309-2319. DOI: 10.1002/stem.1194

[3] Yu S, Zhang R, Liu F, *et al*. Notch inhibition suppresses nasopharyngeal carcinoma by depleting cancer stem-like side population cells[J]. Oncology Reports, 2012, 28(2): 561-566. DOI: 10.3892/or.2012.1830

[4] Guo D, Xu B L, Zhang X H, *et al*. Cancer stem-like side population cells in the human nasopharyngeal carcinoma cell line cne-2 possess epithelial mesenchymal transition properties in association with metastasis[J]. Oncology Reports, 2012, 28(1): 241-247. DOI: 10.3892/or.2012.1781

[5] Oliveira L R, Oliveira-Costa J P, Soave D F, *et al*. P177. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Pathol Med, 2011, 40(2): 135-142. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2010.00967

[6] Annunziata C M, Stavnes H T, Kleinberg L, *et al*. Nuclear Factor kappa B Transcription Factors Are Coexpressed and Convey a Poor Outcome in Ovarian Cancer[J]. Cancer, 2010, 116(13): 3276-3284. DOI: 10.1002/cncr.25190

[7] Masi C M, Hawkley L C, Cacioppo J T. Serum 2-methoxyestradiol, an estrogen metabolite, is positively associated with serum HDL-C in a population-based sample[J]. Lipids, 2012, 47(1): 35-38. DOI: 10.1002/ cncr.25190

[8] Qi B, Chen H L, Shang D, *et al*. Effects of hypoxia-inducible factor-1α and matrix metalloproteinase-9 on alveolar-capillary barrier disruption and lung edema in rat models of severe acute pancreatitis-associated lung injury[J]. Experimental & Therapeutic Med, 2014, 8(3): 899-906. DOI: 10.3892/etm.2014.1810

[9] Xie H C, He J P, Zhu J F, *et al*. Expression of HIF-1alpha and VEGF in skeletal muscle of plateau animals in response to hypoxic stress[J]. Physiological Res, 2014, 63(6): 801-805.

[10] Pan H, Chen S, Yuan W, *et al*. Down-regulated CBS/H2S pathway is involved in high-salt-induced hypertension in Dahl rats[J]. Nitric Oxide Biology & Chemistry, 2015, 46: 192-203. DOI: 10.1016/j.niox.2015.01.004

[11] Ricker J L, Chen Z, Yang X P, *et al*. 2-Methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor 1α, tumor growth, and angiogenesis and augments paclitaxel efficacy in head and neck

squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8665-8673. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1393

[12] Parrondo R, Pozas D L A, Reiner T, *et al*. NF-κB activation enhances cell death by antimitotic drugs in human prostate cancer cells[J]. Molecular Cancer, 2010, 9(2): 1-13. DOI: 10.1186/1476-4598-9-182

[13] Kumar A P, Garcia G E, Orsborn J, *et al*. 2-Methoxyestradiol interferes with NFκB transcriptional activity in primitive neuroectodermal brain tumors: implications for management [J]. Carcinogenesis, 2003, 24(2): 209-216. DOI: 10.1093/carcin/24.2.209

[14] Zhang X Y, Zhan R, Huang H B, *et al*. Mechanism underlying 2-methoxyestradiol inducing apoptosis of K562 cells [J]. Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi, 2009, 17(2): 340-344.

[15] Sutherland T E, Anderson R L, Hughes R A, *et al*. 2-Methoxyestradiol—a unique blend of activities generating a new class of anti-tumour/anti-inflammatory agents[J]. Drug Discov Today, 2007, 12: 577-584. DOI: 10.1016/ j.drudis.2007.05.005

[16] Zhao C, Setrerrahmane S, Xu H. Enrichment and characterization of cancer stem cells from a human non-small cell lung cancer cell line[J]. Oncology Reports, 2015. DOI: 10.3892/or.2015.4163

[17] Miranda-Lorenzo I, Dorado J, Lonardo E, *et al*. Intracellular autofluorescence: a biomarker for epithelial cancer stem cells[J]. Nature Methods, 2014, 11(11): 1161-1169. DOI: 10.1038/nmeth.3112

[18] Li Y J, Wu S L, Lu S M, *et al*. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits nasopharyngeal cancer stem cell self-renewal and migration and reverses the epithelial-mesenchymal transition via NF-κB p65 inactivation [J]. Tumor Biology, 2015, 36(4): 2747-2761. DOI: 10.1007/s13277-014-2899-4

[19] 李亚军, 郭颖, 吴顺龙, 等. 人鼻咽癌干细胞微球体培养并鉴定其生物特性[J]. 医学研究生学报, 2014, 27(11): 1133-1138. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8199.2014.11.004

[20] Reumann S, Shogren K L, Yaszemski M J, *et al*. Inhibition of Autophagy Increases 2-Methoxyestradiol-Induced Cytotoxicity in SW1353 Chondrosarcoma Cells[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(3): 751-759. DOI: 10.1002/jcb.25360

[21] Shigdar S, Qiao L, Zhou S F, *et al*. RNA aptamers targeting cancer stem cell marker CD133[J]. Cancer letters, 2013, 330(1): 84-95. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.11.032

[22] Zhang X, de Milito A, Olofsson M H, *et al*. Targeting Mitochondrial Function to Treat Quiescent Tumor Cells in Solid Tumors[J]. Mol Sci, 2015, 16(11): 27313-27326. DOI: 10.3390/ijms161126020

[23] Yang P, Reece E A. 45: Role of HIF-1alpha in maternal hyperglycemia-induced embryonic vasculopathy[J]. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2011, 204(1): S27. DOI: 10.1016/j.ajog.2011.01.012

[24] Tang N, Wang L, Esko J, *et al*. Loss of HIF-1α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis[J]. Cancer Cell, 2004, 6(5): 485-495. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.09.026

[25] Li H, Chen J, Zen W, *et al*. Effect of hypoxia inducible factor-1 antisense oligonucleotide on liver cancer [J]. Int Clin Exp Med,2015,8(8): 12650-12655.

[26] Zhang H, Qian D Z, Tan Y S, *et al*. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1α synthesis and block tumor growth[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(50): 19579-19586. DOI: 10.1073/pnas.0809763105

[27] Didonato J A, Frank M, Michael K. NF-κB and the link between inflammation and cancer[J]. Immunological Reviews, 2012, 246(1): 379-400. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01099.x

[28] Luqman S, Pezzuto J M. NF-κB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention[J]. Phytotherapy Res, 2010, 24(7): 949-963. DOI: 10.1002/ptr.3171

[29] Chen C, Yu Z. siRNA targeting HIF-1alpha induces apoptosis of pancreatic cancer cells through NF-kappaB-independent and -dependent pathways under hypoxic conditions[J]. Anticancer Res, 2009, 29(4): 1367-1372.

[30] Rius J, Guma M, Schachtrup C, *et al*. NF-κB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1α[J]. Nature,2008,453: 807-811. DOI: 10.1038/nature06905

[31] Belaiba R S, Bonello S, Zähringer C, *et al*. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor κB in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Mol Biol Cell, 2007, 18: 4691-4697. DOI: 10.1091/mbc.E07-04-0391

(收稿:2016-01-27;修回:2016-05-17)

(编辑 汪勤俭)