维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0037-04

熊果酸诱导鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 凋亡的实验研究

李 洁,魏莲枝,向银洲

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨熊果酸诱导人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 凋亡的作用机制。方法:用不同浓度的熊果酸处理 CNE-2Z 细胞,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色检测熊果酸对 CNE-2Z 细胞的增殖抑制效应;流式细胞术分析细胞周期和凋亡率;应用免疫组织化学 SP 法检测凋亡相关基因 bcl-2,bax 和 cox-2 表达的变化;Western blot 检测 CNE-2Z 细胞内 caspase 3 的表达。结果:熊果酸对 CNE-2Z 细胞具有抑制增殖和诱导凋亡作用,并呈浓度依赖性;流式细胞术分析表明 S 期细胞数减少,细胞主要阻滞在 G_0/G_1 期;免疫组织化学检测显示在凋亡过程中 bax 表达上调,bcl-2、cox-2 表达下调;Western blot 检测 CNE-2Z 细胞中 caspase 3 表达增强。结论:熊果酸在体外对 CNE-2Z 细胞有诱导凋亡的作用,其作用机制可能是通过促进 caspase 3 的活化和 bax 的表达上调、bcl-2、cox-2 的表达下调来实现。

【关键词】熊果酸;鼻咽癌细胞;CNE-2Z;凋亡

【中国图书分类法分类号】R739.63 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-07-05

Empirical study on ursolic acid inducing apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2Z

LI Jie, et al

(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mechanism of ursolic acid inducing the apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2Z. *Methods*: CNE-2Z were treated by ursolic acid with different concentration. Cell proliferation was determined by MTT assay. Cell cycle and apoptosis rate were analysed by flow cytometry (FCM). The expressions of bax, bcl-2 and cox-2 were assessed by SP method of immunocytochemistry, while the expression of caspase 3 by Western blot. *Results*: Ursolic acid inhibited the proliferation of CNE-2Z cells and induced the apoptosis in dosage and time dependent manner. FCM showed that the cell population reduced in S phase and cell cycle was arrested in G_0/G_1 phase. Immunocytochemistry showed that the expression of bax was up-regulated in the apoptosis, while the expression of bcl-2 and cox-2 down-regulated. Western blot showed that the expression of caspase 3 was strengthened. *Conclusion*: Ursolic acid can induce apoptosis of CNE-2Z in vitro. Its molecular mechanism probably is through promoting activation of caspase3, up-regulating the expression of bax, and down-regulating the expressions of bcl-2 and cox-2.

【Key words】 Ursolic acid; Nasopharyngeal carcinoma cell; CNE-2Z; Apoptosis

熊果酸(Ursolic acid,UA),又名乌索酸,乌苏酸,为三萜酸类化合物,广泛存在于熊果、白花蛇舌草等天然草药以及多种食品中,具有多种生物学效应,其中最为突出的为抗肿瘤作用。体外实验显示熊果酸能够诱导多种细胞株的凋亡,如 HL-60[1]、人类表皮癌细胞 A431[2]和 Hacat 细胞[3]。熊果酸既能诱导肿瘤细胞凋亡,又能抑制正常细胞的恶变,还能干扰 DNA 合成相关的酶;熊果酸也可以通过碱性神经脂酶介导的 caspase 3,8,9 的激活来抑制 HT-29 增殖[4],并能诱导其凋亡[5]。熊果酸还可以下调人纤维肉瘤 HT1080 细胞 MMP9 基因的表达,从而降低肿瘤的侵袭力[6]。但有关熊果酸对鼻咽癌细胞作用的报道较少,本文观察了熊果酸对鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 的体外增殖及凋亡的影响,为熊果酸的抗鼻咽癌作用及其机制提供实验依据。

作者介绍:李 洁(1980-),女,硕士生,
主要研究方向:耳鼻喉科肿瘤学。
通讯作者:魏莲枝,女,教授,联系电话:023-89013121。

1 材料和方法

1.1 材料

维普资讯 http://www.cqvip.com

人鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 为低分化鳞癌细胞株，购于南京凯基生物有限公司。熊果酸为美国 Sigma 公司产品，稀释成 5×10^3 μmol/L，置于 -20℃保存，临用前解冻。RPMI 1640 购自 HyClone 公司；四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于上海生物工程公司；RNA 酶(RNase)、碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司；SP-9000 免疫组化盒，鼠抗人 bcl-2、bax 和 cox-2，DAB 染色盒购于北京中杉公司；caspase 3 购于博奥森公司；胰酶、新生牛血清购于杭州四季青公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将细胞接种在 50ml 培养瓶中，用含 10% 小牛血清的 RPIM 1 640 培养液，37℃，5%CO_2 培养箱内传代培养，取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 细胞增殖抑制实验（MTT 法） 1×10^5 个 /ml 细胞 200μl 接种于 96 孔培养板，加入熊果酸使终浓度分别为 10、20、30、40、50 μmol/L，每组设 6 个复孔；另设空白及细胞对照组。将 96 孔板置于培养箱内分别培养 24、48、72h 吸去培养基，换上无血清的 RPMI 1 640，并加入 MTT20μl，继续培养 4h。弃去培养基，每孔加二甲基亚砜 200μl，混匀后置于酶标仪 570nm 波长处测吸光度值(A)。参照文献[7]计算细胞抑制率。癌细胞生长抑制率%=(1- 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值)×100%。

1.2.3 流式细胞术检测凋亡及细胞周期的改变 用不同终浓度(10、20、30、40、50 μmol/L)的熊果酸作用 CNE-2Z 细胞 24h，同时设立细胞对照组。每组收集 10^6 个细胞，用冰预冷的 70%乙醇固定 12h；离心弃固定液，PBS 重悬 5min 后 300 目筛网过滤；加入 1ml PI 染液，4℃避光染色 30min，流式细胞仪(Beckman)分析细胞周期及凋亡率。

1.2.4 免疫细胞化学染色 细胞以 1×10^5 个 /ml 接种于预置盖玻片的 6 孔板中，加入熊果酸使终浓度分别为 10、20、30、40、50 μmol/L，培养 24h 后，常规 SP 法免疫化学染色，DAB 显色，凉干封片后光镜下观察。结果分析：排除爬片边缘细胞，10×10 低倍镜下随机选取 10 个细胞分布均匀的视野，10×20 倍镜下每个视野随机选 50 个细胞，按着色强弱分为 4 个等级：无着色 0 分，淡黄色 1 分，棕黄色 2 分，棕褐色 3 分。按公式 HSCORE=ΣPi(i+1)(I=0,1,2,3；Pi 表示评分为 i 的比例)计算细胞 HSCORE 得分。

1.2.5 Western blot 分别取 10、20、30、40、50 μmol/L 熊果酸作用于细胞 24h，每组收集 10^7 个细胞，并设立细胞对照组；分别加入 120μl 蛋白裂解液裂解后，在冰浴下静置裂解 30min，离心后收集上清；提取蛋白质后，用考马斯兰亮法定量，进行 SDS—PAGE 电泳，每孔加入 50μg 样品。电泳结束后取出凝胶，于 4℃下，电流 60mA 转印过夜至硝酸纤维素膜。5%脱脂奶粉封闭 1h 后，依次加第一抗体 caspase 3 和第二抗体，各孵育 1h，DAB 显色液显色并摄像、保存，并用 Quantity One 分析软件进行灰度值测定。

1.3 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$) 表示，采用 SPSS 统计软件对数据进行 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 细胞增殖抑制作用

熊果酸呈浓度依赖性的抑制 CNE-2Z 细胞增殖(图 1)，差异有显著性($P<0.05$)。40~50 μmol/L 熊果酸分别作用 24h、48h、72h 后，CNE-2Z 细胞几乎停止增殖。熊果酸处理 24h、48h 和 72h 时的 IC_{50} 分别为 30.56 μmol/L，31.94 μmol/L 和 33.06 μmol/L。48h、72h 的数据与 24h 比较 $P>0.05$，差别无统计学意义，所以其后的实验均以 24h 之数据处理。

2.2 流式细胞术检测凋亡及细胞周期的改变

经熊果酸作用 24h 后，随着药物浓度的增加，细

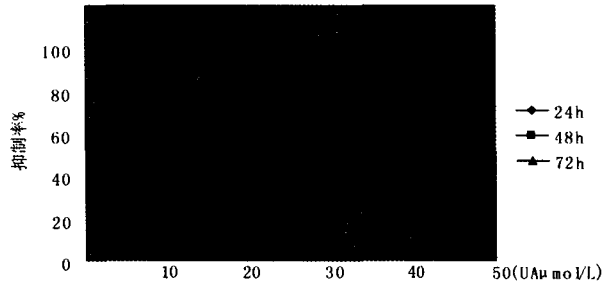


图 1 熊果酸对 CNE-2Z 细胞生长的抑制作用

表 1 熊果酸对 CNE-2Z 细胞周期的影响

熊果酸 (μmol/L)	细胞周期分布(%)			凋亡率(%)
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	
对照	65.20 ± 2.02	24.08 ± 2.03	10.72 ± 1.27	0.13 ± 0.07
10	67.73 ± 2.23[a]	21.37 ± 1.65[a]	9.90 ± 0.82	0.22 ± 0.03[a]
20	69.96 ± 2.42[b]	20.29 ± 1.42[b]	9.75 ± 0.79	0.30 ± 0.08[b]
30	75.19 ± 3.05[b]	15.96 ± 1.26[b]	8.85 ± 0.80[a]	1.81 ± 0.37[b]
40	85.69 ± 3.62[b]	7.26 ± 0.98[b]	7.05 ± 0.72[b]	5.45 ± 0.48[b]
50	88.23 ± 4.09[b]	4.80 ± 0.62[b]	6.97 ± 0.71[b]	7.01 ± 0.65[b]

实验组与对照组比较 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 熊果酸作用后 CNE-2Z 中 bcl-2,bax 和 cox-2 的得分

熊 果 酸(μmol/L)	bax	bcl-2	cox-2
对照	1.220 ± 0.115	2.561 ± 0.145	2.751 ± 0.175
10	1.520 ± 0.157[b]	2.234 ± 0.135[b]	2.424 ± 0.125[b]
20	1.786 ± 0.183[b]	2.054 ± 0.187[b]	2.146 ± 0.148[b]
30	2.123 ± 0.208[b]	1.782 ± 0.148[b]	1.951 ± 0.185[b]
40	2.521 ± 0.238[b]	1.356 ± 0.158[b]	1.589 ± 0.147[b]
50	2.756 ± 0.254[b]	1.256 ± 0.116[b]	1.354 ± 0.151[b]

实验组与对照组比较 b:$P<0.01$。

胞凋亡率逐渐升高,S 期细胞的比例逐渐下降,G_0/G_1 期细胞的比例逐渐增加,主要呈现 G_0/G_1 期阻滞,并存在浓度依赖性(表 1)。

2.3 免疫组化法测 bcl-2,bax 和 cox-2 的表达

bcl-2,bax 和 cox-2 的表达可见于胞膜和胞浆,在 24h 时随着药物浓度的升高,bax 的表达逐渐增强(图 2);bcl-2(图 3)和 cox-2(图 4)与对照组比较表达则明显降低(表 2)。

2.4 Western blot

用 10 ~ 50 μmol/L UA 处理细胞 24h 后,随着 UA 浓度增加,活化的 caspase 3 蛋白条带逐渐加深(图 5)。用 Quantity One 分析软件测定条带灰度值,



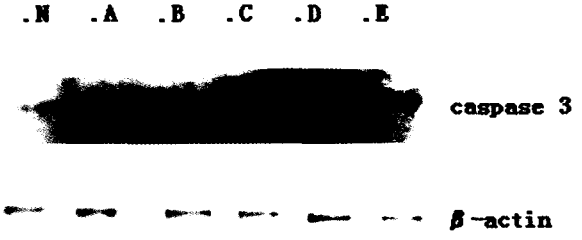
图 2 UA(50μmol/L)作用后 CNE-2Z 细胞中 Bax 的表达×200



图 3 UA(50μmol/L)作用后 CNE-2Z 细胞中 bcl-2 的表达×200



图 4 UA(50μmol/L)作用后 CNE-2Z 细胞中 cox-2 的表达×200



N.control(0 μmol/LUA); A.10 μmol/LUA; B.20 μmol/LUA; C.30 μmol/LUA; D.40 μmol/LUA; E.50 μmol/LUA

图 5 Western blot 中,不同浓度 UA 处理细胞 24h 后 caspase 3 蛋白的表达

求出每组 caspase 3 与 β-actin 条带的灰度比值,实验组与对照组的灰度比值差异有统计学意义($t=2.76$, $t_{0.05}=2.132$, $P<0.05$)。

3 讨 论

熊果酸是五环的三萜系化合物,广泛存在于白花蛇草等许多天然药物中,具有免疫调节、抗炎、抗氧化及抗肿瘤等多种生物学活性。研究表明,熊果酸除了可以抑制 DNA 聚合酶及 DNA 拓扑酶活性、抑制细胞的增殖之外,还可以提高细胞内钙离子水平,激

维普资讯 http://www.cqvip.com

活半胱天冬酶的蛋白酶解级联反应,诱导肺癌细胞 A-549、白血病细胞 P—388 等多种肿瘤细胞凋亡[8]。

在本实验中,通过细胞增殖抑制实验得出,熊果酸对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞株的生长活性有明显的抑制作用,且呈浓度依赖性。从细胞形态上可见原来呈多角形贴壁生长的一部分细胞变为椭圆形或圆形细胞而凋亡,随着培养时间的延长,镜下可见细胞内存在大颗粒物质和空泡,并有碎片出现,提示 UA 抑制其增殖代谢,同时也具有一定的细胞毒作用。通过对细胞周期的分析发现,与对照组细胞相比,经熊果酸作用 24h 后 CNE-2Z 细胞就开始出现 G_0/G_1 期阻滞,而标志 DNA 合成的 S 期细胞则明显减少。随着 UA 浓度的增大,其阻滞细胞周期的作用逐渐增强,呈显著的浓度依赖性。这一结果提示,熊果酸可能直接损伤 DNA,通过阻滞细胞 G_0/G_1 期从而延长细胞周期,降低细胞的恶性增殖。

哺乳动物细胞凋亡主要有 3 条信号传导途径,1 条是细胞死亡受体介导的外源性信号传导途径,另 2 条是线粒体介导与内质网介导的内源性信号传导途径,来自这 3 条途径的凋亡信号都要激活下游的 caspase 3,导致细胞凋亡[9]。bcl-2 是一种癌基因,不影响细胞增植,而是作为细胞凋亡的抑制剂调节细胞的死亡,可抑制各种生理和病理刺激引起的细胞凋亡[10]。bax 是一种凋亡促进基因,与 bcl-2 同一族。bax 基因不但拮抗 bcl-2 的凋亡抑制作用,而且有直接促进细胞凋亡的功能[11]。bax/bcl-2 的比值对决定细胞接受刺激信号后存活与否有关,并决定细胞是否进入凋亡通路:bax/bcl-2 升高,细胞接受凋亡信号刺激发生凋亡;bax/bcl-2 降低,细胞则不凋亡[12]。bcl-2 和 bax 基因是目前研究最多的一对细胞凋亡调节基因,现已发现淋巴瘤、胸腺瘤等淋巴造血肿瘤和鳞状上皮的基底细胞、神经组织、唾液腺导管上皮等非造血组织均有 bcl-2 及 bax 基因的表达,也可见胶质病、胃癌、乳腺癌等肿瘤组织的表达[13]。cox-2 在多数正常组织中并不表达,在多种癌前病变及癌组织中高表达,与肿瘤发生发展密切相关,但 cox-2 本身并不直接参与肿瘤形成,而是通过其催化产物经多种途径促进肿瘤发生发展,其中最为重要的就是 PGE2。研究表明:PGE2 可能与相应膜受体及核受体如过氧化物酶体增殖因子活化受体(PPAR)结合,促进 bcl-2 基因表达而抑制肿瘤细胞凋亡[14]。本实验中,在经熊果酸干预的 CNE-2Z 细胞中出现凋亡峰,并且 bax 基因的高表达与 bcl-2 基因的低表达,使 bax/bcl-2 的比值升高,caspase 3 表达的增加,cox-2 表达的降低提示:熊果酸诱导鼻咽癌细胞 CNE-2Z 的凋亡可能是通过促进 caspase 3 的活化和 bax 的表达上调、bcl-2、cox-2 的表达下调来实现。但由于细胞凋亡是一个多系统、多阶段参与的复杂过程,熊果酸在体内对细胞凋亡的影响尚有待进一步研究[15]。

参 考 文 献

[1] Choi B,Park R,Pae H,et al. Cyclic adenosine monophosphate inhibits ursolic acid induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 Cells[J]. Pharmacology & Toxicology,2000;86(2):53.

[2] Hollosy F,Idei M,Csorba G,et al. Activation of caspase 3 protease during the process of ursolic acid and its derivative induced apoptosis[J]. Anticancer Research,2001;21(5):3485.

[3] Harmand P,Duval R,Liagre B,et al. Ursolic acid induces apoptosis through caspase 3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells[J]. International Journal of Oncology,2003;23(1):105.

[4] Novotny L,Vachalkova A,Biggs D. Ursolic acid: an antitumorigenic and chemopreventive activity[J]. Minireview.Neoplasma,2001;48(4):241.

[5] Andersson D, Liu J, Nilsson A,et al. Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase[J]. Anticancer Research,2003;23(4):3 317.

[6] 张秋萍,谢珞琨,邓 涛,等. 熊果酸促进 K562 细胞凋亡[J]. 基础医学与临床,2004;24(4):414.

[7] 沈 宜,汤为学,段 红,等. 中效原理在顺铂、足叶乙甙对人肺癌细胞株(PAa)相互作用中的应用[J]. 重庆医科大学学报,2000;25(2):118-120.

[8] Lee KH,Lin YM,Wu TS,et al. The cytotoxic principles of prunella vulgaris,psychotria serpens and hyptis capitata:ursolic acid related derivatives[J]. Planta Med,1988;54(4):308-311.

[9] Gup ta S. Molecular signaling in death recep tor and mitochondrial pathways of apop tosis[J]. Int J Oncol,2003;22(1):15-20.

[10] Korameyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oneogenes: regulation of cell death[J].Blood,1992;80(4):879.

[11] Krajewski S,Kr ewska M,Shabaik A,et al. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax adomlnant inbitor of Bcl-2 [J]. Am J Pathol,1994;145(6):1 323-1 336.

[12] Krasmeyer SJ,Shu er JR,Veis DJ,et al. Bcl-2/Bax:a rheostat that regulates/tn anti-oxidant pathway and cell[J]. Semin Cancer Bilo,1993;4(6):327.

[13] 欧阳森,张桂英,徐美华.大肠黏膜癌变过程中 Bcl-2 及 Bar 的表达及其相关性研究[J]. 中国现代医学杂志,2003;13(17):130-132.

[14] Liu XH,Yao S,Kirschenbaum,et al. NS398,a selective Cyclooxygenase 2 inhibitor,induces apoptosis and downregulates bcl-2 expression in LNCap cells[J].Cancer Res,1998;58(19):4 245-4 249.

[15] Oohyun S,Vladimir I,Qing X,et al. The effect of ursodeoxycholic acid on the survivin in thapsigargin2inducedapoptosis[J]. Cancer Letters,2003;191(1)1:83.

(责任编辑:谭乐勤)