

肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

白皮杉醇增强顺铂杀伤喉癌Hep-2细胞的作用及其机制

段传新

引用本文:

段传新. 白皮杉醇增强顺铂杀伤喉癌Hep-2细胞的作用及其机制[J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45(06): 367-370.

DUAN Chuanxin. Mechanism About How Piceatannol Enhances Anti-tumor Effect of Cisplatin on Laryngeal Cancer Hep-2 Cells[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2018, 45(06): 367-370.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.1241>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

拉帕替尼联合顺铂抗食管鳞癌的作用及机制

Antitumor Efficacy and Mechanisms of Lapatinib in Combination with Cisplatin on Esophageal Squamous Cancer Cells

肿瘤防治研究. 2019, 46(09): 766-772 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.19.0150>

沉默UBE2N对人喉鳞癌hep-2细胞放射敏感度的影响

Effects of UBE2N Knockdown on Radiosensitivity of Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma hep-2 Cells

肿瘤防治研究. 2019, 46(07): 583-587 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1648>

自噬在视网膜母细胞瘤Y79细胞顺铂耐药中的作用及其机制

Role of Autophagy in Cisplatin Resistance of Retinoblastoma Y79 Cells and Its Mechanism

肿瘤防治研究. 2018, 45(08): 517-522 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.1438>

小干扰RNA沉默YKL-40基因对子宫内膜癌HEC-1A细胞顺铂化疗敏感度的影响

Effects of siRNA Targeting YKL-40 Gene on Chemosensitivity of Endometrial Cancer HEC-1A Cells to Cisplatin

肿瘤防治研究. 2017, 44(6): 398-402 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.16.1210>

沉默FANCD2对人头颈鳞癌SIHN-005A细胞化疗敏感度的影响及其机制

Effects and Mechanisms of FANCD2 Knock Down on Chemotherapy Sensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells SIHN-005A

肿瘤防治研究. 2017, 44(3): 162-167 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.03.002>



杂志官网



微信公众号

白皮杉醇增强顺铂杀伤喉癌Hep-2细胞的作用及其机制



段传新

Mechanism About How Piceatannol Enhances Anti-tumor Effect of Cisplatin on Laryngeal Cancer Hep-2 Cells

DUAN Chuanxin

Department of Otolaryngology, Head & Neck Surgery, Hubei Maternal and Child Health Hospital, Wuhan 430070, China

Abstract: Objective To investigate how piceatannol enhances the anti-tumor effect of cisplatin on laryngeal cancer cells and related molecular mechanism. **Methods** Laryngeal carcinoma Hep-2 cells were cultured *in vitro* and then treated with piceatannol and cisplatin. Cell proliferation apoptosis, karyopyknosis ratio and proteins expression of BCL-2 family were detected by CCK8, flow cytometry, Hoechst staining and Western blot, respectively. **Results** No effect of 50 $\mu\text{mol/L}$ piceatannol was found on the Hep-2 cell apoptosis or proliferation. Compared with cisplatin, cisplatin combined with piceatannol could significantly decrease the cell proliferation; after 48h, the absorbance of cells treated with cisplatin and piceatannol was decreased for 60%, and the apoptosis ratio was significantly increased ($P < 0.05$). Hoechst staining revealed the karyopyknosis ratio of Hep-2 cells treated with cisplatin and piceatannol was significantly increased. Western blot showed piceatannol could down-regulate BCL-2 expression and up-regulate BAX expression. **Conclusion** The anti-tumor effect of cisplatin on laryngeal cancer cells could be enhanced by piceatannol, and its molecular mechanism is related to the regulatory effect of piceatannol on the key proteins of BCL-2 family.

Key words: Laryngeal cancer; Piceatannol; Cisplatin; Apoptosis; BCL-2 family

摘要: 目的 探讨白皮杉醇增强顺铂对喉癌细胞的杀伤作用及其分子机制。**方法** 体外培养喉癌细胞Hep-2, 联合使用白皮杉醇及顺铂, CCK8法检测喉癌Hep-2细胞的增殖能力, 流式细胞术检测喉癌Hep-2细胞的凋亡率, Hoechst染色检测喉癌Hep-2细胞中细胞核固缩比例, 蛋白印迹法检测BCL-2家族蛋白表达变化。**结果** 白皮杉醇在50 $\mu\text{mol/L}$ 时对喉癌Hep-2细胞的增殖凋亡并无显著影响。与顺铂组相比, 白皮杉醇联合顺铂组细胞的增殖能力显著降低, 48 h细胞吸光度值白皮杉醇联合顺铂组较顺铂组降低60%, 流式细胞术检测发现48 h时, 白皮杉醇联合顺铂组喉癌Hep-2细胞的凋亡率显著高于顺铂组 ($P < 0.05$), Hoechst染色发现白皮杉醇联合顺铂组喉癌Hep-2细胞的细胞核固缩比例显著增高, 差异有统计学意义。蛋白印迹检测发现, 白皮杉醇可以显著下调BCL-2蛋白表达水平, 上调BAX蛋白表达水平。**结论** 白皮杉醇可以有效增强顺铂对喉癌细胞的杀伤作用, 其分子机制与白皮杉醇可以显著调控BCL-2家族蛋白表达有关。

关键词: 喉癌; 白皮杉醇; 顺铂; 凋亡; BCL-2家族

中图分类号: R739.65 **文献标识码:** A

0 引言

头颈部鳞状细胞癌是目前世界范围内发病率第六位的恶性肿瘤, 喉癌是其中最常见的一种, 世界范围内每年新发病例约600 000例, 其中约12%确诊病例在中国^[1-2], 是影响我国人民健康的常见恶性肿瘤之一。手术治疗及常规放化疗是喉癌治疗的主要手段, 近几十年来, 随着手术技术的进步, 手术治疗对喉癌患者的5年生存时间有一定的提高, 但是进入2010年之后, 头颈部鳞状细

胞癌患者的总体生存期延长不显著^[3], 而作为头颈部鳞状细胞癌治疗的另外一个重要手段, 化疗也受到一定的重视, 研究如何增强化疗药物的效果是一个重要的临床研究思路, 有较多研究报道了通过增强常规化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用提高治疗效果, 本文也是从这个角度来进行研究。

白皮杉醇是一种化学结构类似于白藜芦醇的化合物, 广泛存在于葡萄、蓝莓、百香果等水果中, 目前的研究发现其可以抑制非受体激活酶以及淋巴细胞特异性蛋白质酪氨酸激酶, 具有抗炎、心血管保护、免疫调节及抗肿瘤活性^[4]。本文主要研究白皮杉醇与顺铂联合使用时对喉癌细胞的杀伤作用, 探讨其在增强顺铂疗效中的作用及可能的分子机制。

收稿日期: 2017-09-28; 修回日期: 2018-03-16

作者单位: 430070 武汉, 湖北省妇幼保健院耳鼻喉头颈外科

作者简介: 段传新 (1970-), 男, 本科, 副主任医师, 主要从事头颈肿瘤的研究

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人喉癌细胞株Hep-2（中国典型培养物保藏中心）。RPMI 1640培养液、PBS溶液及胰蛋白酶-EDTA（杭州吉诺生物），胎牛血清（美国Gibco公司），CCK8试剂盒（日本同仁生物科技有限公司），FITC-Annexin V-PI凋亡双染试剂盒（瑞士Roche公司），Hoechst 33258和白皮杉醇（美国Sigma-Aldrich公司），BAX、BCL-2及GAPDH一抗（Cell Signaling Technology公司）。

1.2 细胞培养及分组

人喉癌细胞株Hep-2用RPMI 1640培养液+10%胎牛血清常规培养，置入37℃、5%CO₂饱和湿度条件下的恒温培养箱中培养。细胞分四组，空白对照组、顺铂组、白皮杉醇组及白皮杉醇联合顺铂组。

1.3 CCK8法检测细胞增殖

取处于对数生长期的Hep-2细胞进行培养，待细胞生长至近融合状态，用0.25%胰蛋白酶消化细胞，吸管反复将细胞轻轻吹打呈单细胞悬液，用计数板计数，将细胞按1 500个/孔接种于96孔板，置于37℃、含5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养24 h，按照上述分组处理，每种浓度均设3个复孔。分别在培养24、48及72 h后取出培养板，每孔加入CCK8试剂10 μl继续培养1 h，用酶标仪检测450 nm处培养细胞的OD值，并按以下公式计算细胞生长抑制率，抑制率（%）=肿瘤细胞抑制率（IR）=（OD_{对照孔} - OD_{实验孔}）/OD_{对照孔} × 100%。实验总共重复3次，并描绘细胞生长曲线。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

取处于对数生长期的Hep-2细胞进行培养，待细胞生长至近融合状态，用0.25%胰蛋白酶消化细胞，吸管反复将细胞轻轻吹打呈单细胞悬液，用计数板计数，将细胞按1×10⁵个/孔接种于6孔板，置于37℃、含5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养24 h，按照上述分组处理，每种浓度均设3个复孔。培养48 h后，收集细胞，离心，PBS洗涤一次，加入FITC-Annexin V及PI染料，避光孵育30 min，上机检测。

1.5 Hoechst染色法检测细胞核固缩

取处于对数生长期的Hep-2细胞进行培养，待细胞生长至96%融合状态，用0.25%胰蛋白酶消化细胞，吸管反复将细胞轻轻吹打呈单细胞悬液，用计数板计数，将细胞按1×10⁴个/孔接种于6孔板，置于37℃、含5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养24 h，按照上述分组处理，每种浓度均设3个复孔。培养48 h后，在培养液中加入Hoechst 33258至终浓度为

10 mg/L，避光孵育30 min，荧光显微镜下观察细胞核固缩比例并拍照。

1.6 蛋白印迹法检测BCL-2家族相关蛋白表达

取对数生长期的Hep-2细胞进行培养，按3×10⁵个/瓶接种于培养瓶中，置于37℃、含5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养24 h，按照上述分组处理，每组三瓶，培养48 h后，收集细胞，离心，PBS洗涤一次，加入细胞裂解液提取细胞总蛋白，测定浓度并调整各组一致。聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜及封闭后，分别加入兔抗人BAX、BCL-2及GAPDH一抗4℃孵育过夜，洗涤后荧光二抗孵育1 h，LI-COR公司Odyssey检测并分析结果。

1.7 统计学方法

采用SPSS20.0分析软件，配对t检验进行数据分析，P<0.05为差异有统计学意义。

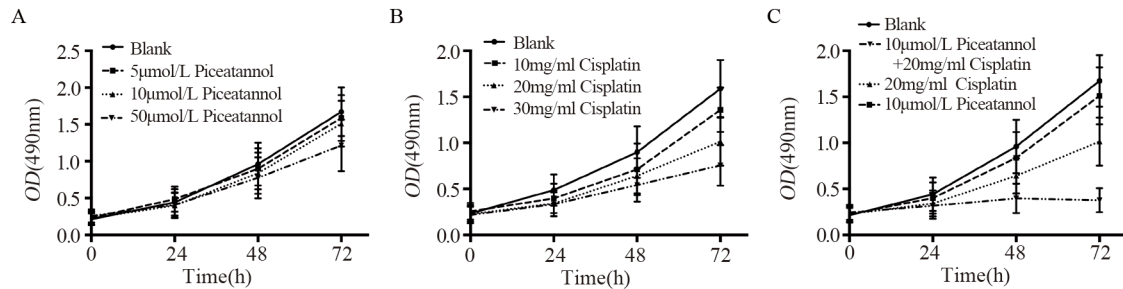
2 结果

2.1 白皮杉醇可以显著增强顺铂对喉癌Hep-2细胞的增殖抑制作用

首先，我们研究了不同浓度白皮杉醇对喉癌Hep-2细胞是否有增殖抑制作用，结果发现，当白皮杉醇浓度达到50 μmol/L时，喉癌Hep-2细胞增殖能力为对照组的75%，当白皮杉醇浓度为10 μmol/L时Hep-2细胞增殖能力为对照组的90%，与对照组比较差异无统计学意义（P=0.143），见图1A。其次，我们研究了不同浓度顺铂对喉癌Hep-2细胞增殖的抑制作用，结果发现，随着顺铂浓度的增加，喉癌Hep-2细胞的增殖能力逐渐下降，呈显著的浓度依赖作用，20 mg/ml顺铂处理48 h时，Hep-2细胞的增殖能力是对照组的64%（P=0.028），见图1B，白皮杉醇联合顺铂同时处理喉癌Hep-2细胞后发现，白皮杉醇可以显著增强顺铂对喉癌Hep-2细胞增殖能力的抑制，10 μmol/L白皮杉醇联合20 mg/ml顺铂处理48 h后，Hep-2细胞增殖能力仅仅是对照组的23%，差异有统计学意义（P=0.000），见图1C。

2.2 白皮杉醇可以显著增强顺铂诱导喉癌Hep-2细胞凋亡的能力

首先，我们研究了不同浓度白皮杉醇诱导喉癌细胞凋亡的能力，结果发现，当50 μmol/L白皮杉醇处理喉癌Hep-2细胞48 h后，凋亡率为（7.6±3.3）%，与对照组比较差异无统计学意义（P=0.213），见图2A。其次，我们研究了不同浓度顺铂诱导喉癌细胞凋亡的能力，结果发现，随着顺铂浓度的增加，喉癌Hep-2细胞的凋亡率



A: $P>0.05$, Blank group vs. 10 $\mu\text{mol/L}$ Piceatannol group; B: $P<0.05$, Blank group vs. 20 mg/ml Cisplatin group; C: $P<0.01$, Blank group vs. Piceatannol 10 $\mu\text{mol/L}$ +Cisplatin 20 mg/ml group

图1 白皮杉醇显著增强顺铂对喉癌Hep-2细胞的增殖抑制作用

Figure1 Inhibitory effect of cisplatin on proliferation of laryngeal carcinoma Hep-2 cells was significantly enhanced by piceatannol

逐渐增高,呈显著的浓度依赖作用,10、20、30 mg/ml顺铂处理48 h后, Hep-2细胞的凋亡率分别为 $(8.7\pm 3.2)\%$ 、 $(15.5\pm 4.1)\%$ 和 $(33.2\pm 8.4)\%$ ($P=0.021$),见图2B。白皮杉醇联合顺铂处理喉癌Hep-2细胞后发现,喉癌Hep-2细胞的凋亡率显著增高,与顺铂组比较差异有统计学意义,10 $\mu\text{mol/L}$ 白皮杉醇联合20 mg/ml顺铂处理48 h后, Hep-2细胞的凋亡率为 $(54.7\pm 10.3)\%$ ($P=0.019$),见图2C。

2.3 白皮杉醇可以显著增强顺铂诱导的喉癌Hep-2细胞的细胞核固缩

首先,我们研究了不同浓度白皮杉醇诱导喉癌Hep-2细胞的细胞核固缩的作用,结果发现,50 $\mu\text{mol/L}$ 白皮杉醇处理48 h后, Hep-2细胞出现细胞核固缩的比例是6.7%,与对照组比较差异无统计学意义。其次,研究了不同浓度顺铂诱导喉癌Hep-2细胞细胞核固缩的作用,结果发现,随着顺铂浓度的增加, Hep-2细胞出现细胞核固缩的比例逐渐增高,30 mg/ml顺铂处理48 h后, Hep-2细胞出现细胞核固缩的比例为24.1%,当使用白皮杉醇联合顺铂后, Hep-2细胞出现细胞核固缩的比例显著增加,10 $\mu\text{mol/L}$ 白皮杉醇联合20 mg/ml顺铂处理48 h后, Hep-2细胞出现细胞核固缩的比例为58.1%,差异有统计学意义 ($P=0.014$),见图3。

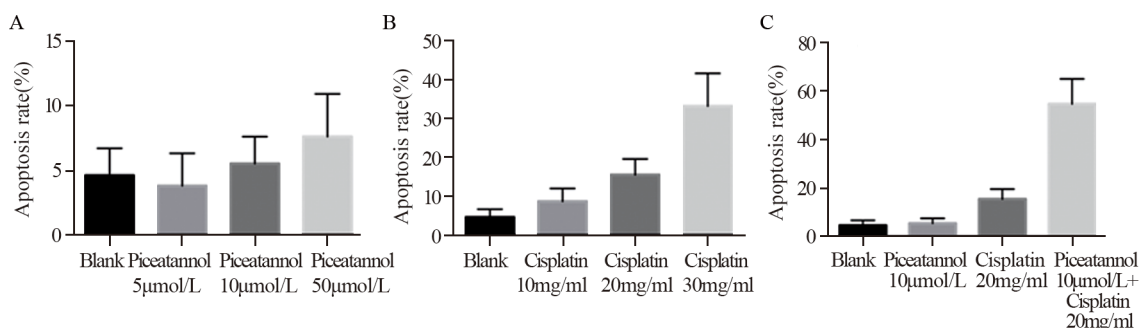
2.4 白皮杉醇调控喉癌Hep-2细胞BCL-2家族蛋白表达

蛋白印迹检测发现,白皮杉醇可以显著下调喉癌Hep-2细胞BCL-2蛋白表达水平,上调BAX蛋白表达水平,与对照组及顺铂组相比,差异有统计学意义 ($P=0.032$),见图4。

3 讨论

目前白皮杉醇的抗肿瘤活性逐渐受到学者的重视,有研究报道白皮杉醇可以抑制对苯二甲酸诱导的乳腺癌细胞内NF-kappaB激活及COX-2蛋白表达,对乳腺癌细胞的增殖具有抑制作用,且这种作用要强于白藜芦醇的作用^[5],但是白皮杉醇在增强化疗药物敏感度的作用方面仍需进一步的深入研究,本研究发现白皮杉醇对喉癌Hep-2细胞的增殖抑制作用较弱,但是却可以显著增强顺铂对喉癌Hep-2细胞的杀伤作用。

顺铂是目前治疗头颈部鳞癌的主要化疗药物之一,其对鳞状细胞癌的疗效较好,但是临床使用中发现,顺铂在治疗肿瘤的同时不良反应也较大,对患者的生活质量有较大影响,因此,研究如何在不提高顺铂使用剂量的前提下增强其治疗效果是目前研究的热点之一,有文献报道可以将顺铂联合不同的药物,达到增强其杀伤肿瘤细胞



A: $P>0.05$, Blank group vs. 50 $\mu\text{mol/L}$ Piceatannol group; B: $P<0.05$, Blank group vs. 30 mg/ml Cisplatin group; C: $P<0.05$, Blank group vs. Piceatannol 10 $\mu\text{mol/L}$ +Cisplatin 20 mg/ml group

图2 白皮杉醇显著增强顺铂诱导喉癌Hep-2细胞凋亡的能力

Figure2 Inducement effect of cisplatin on apoptosis of laryngeal carcinoma Hep-2 cells was significantly enhanced by piceatannol

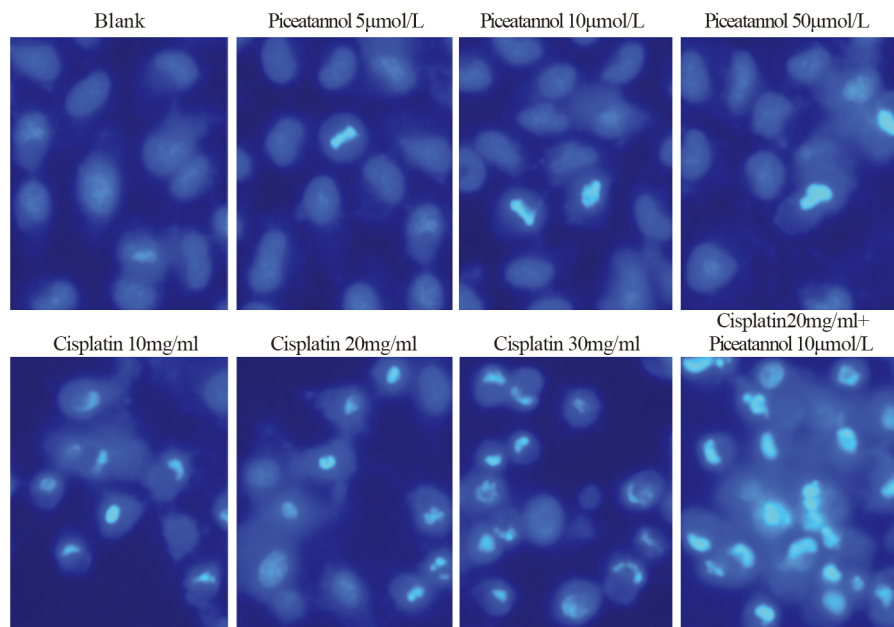
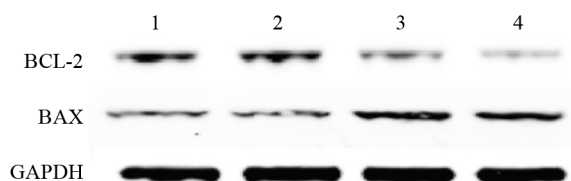


图3 白皮杉醇可以显著增强顺铂诱导的喉癌Hep-2细胞核固缩

Figure 3 Inducement effect of cisplatin on karyopyknosis of laryngeal carcinoma Hep-2 cells was significantly enhanced by piceatannol



1: Blank; 2: Cisplatin 20mg/ml; 3: Piceatannol 10 μmol/L; 4: Cisplatin 20mg/ml+Piceatannol 10 μmol/L

图4 白皮杉醇调控喉癌Hep-2细胞BCL-2家族蛋白表达

Figure 4 Key proteins expression of BCL-2 family could be regulated by piceatannol

的作用^[6-7]，本研究中发现使用白皮杉醇联合顺铂可以显著增强顺铂对喉癌Hep-2细胞的杀伤作用，且白皮杉醇本身对喉癌Hep-2细胞并无显著的抑制增殖或诱导凋亡的作用。

BCL-2家族在头颈部肿瘤中的作用十分重要，该家族成员的生物学作用主要分为两大类，一类是促进凋亡，主要成员包括Bax、Bak、Bid等，这一类成员的表达水平在细胞出现凋亡时显著增高，另外一类是促进细胞存活，主要成员包括Bcl-2、Bcl-x1及MCL-1等，这一类成员的表达水平增高有助于细胞在遇到外界因素干扰时的存活^[8-9]。BCL-2家族两类成员表达水平之间的平衡是维持细胞存活的重要因素，当这一平衡改变时，如促进细胞存活的成员表达水平显著降低时，细胞对外界因素刺激的敏感度会显著增强，有文献报道，靶向抑制BCL-2蛋白表达后，肿瘤细胞对化疗药物的敏感度显著增高^[10]，本文发现白皮杉醇虽然并不能有效诱导喉癌Hep-2细胞出现细胞凋亡，但是可以显著下调Hep-2细胞中BCL-2蛋白表达水平，使Hep-2细胞对顺铂的敏感度显著增高，在不增加顺铂使用剂量的同时，可以显著增强顺铂杀伤喉癌细胞的作用，对临床中的治疗研究具有一定的意义。

综上所述，白皮杉醇可以通过下调Hep-2细胞中BCL-2蛋白表达，增强顺铂对Hep-2细胞的杀伤作用。

参考文献:

- [1] Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, *et al.* Head and neck cancer[J]. Lancet, 2008, 371(9625): 1695-709.
- [2] Giraldi L, Leoncini E, Pastorino R, *et al.* Alcohol and cigarette consumption as predictors of mortality in patients with head and neck cancer: a pooled analysis within the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium[J]. Ann Oncol, 2017, 28(11): 2843-51.
- [3] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-86.
- [4] Piotrowska H, Kucinska M, Murias M. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol[J]. Mutat Res, 2012, 750(1): 60-82.
- [5] 刘丹. Piceatannol对佛波酯诱导MCF-10A细胞NF-κB激活和COX-2表达的抑制作用[D]. 沈阳药科大学, 2008. [Liu D. The effect of Piceatannol on NF-κB activation and COX-2 Inhibition in MCF-10A cells[D]. Shenyang Yao Ke Da Xue, 2008.]
- [6] 孟祥丽, 李伟伟, 崔艳慧, 等. 二甲双胍对顺铂治疗食管鳞癌的增敏作用[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(4): 253-5. [Meng XL, Li WW, Cui YH, *et al.* Metformin improve cisplatin chemosensitivity on esophageal cancer cell lines[J]. Xinxiang Yi Xue Yuan Xue Bao, 2014, 31(4): 253-5.]
- [7] 蔡勇, 王季颖. 姜黄素联合顺铂对非小细胞肺癌细胞A549放疗增敏作用的初步研究[J]. 临床肿瘤杂志, 2015, 13(1): 13-7. [Cai Y, Wang JY. A preliminary study on radiosensitization effect of curcumin plus cisplatin on non-small cell lung cancer A549 cells[J]. Lin Chuang Zhong Liu Za Zhi, 2015, 13(1): 13-7.]
- [8] Ludwig LM, Nassin ML, Hadji A, *et al.* Killing Two Cells with One Stone: Pharmacologic BCL-2 Family Targeting for Cancer Cell Death and Immune Modulation[J]. Front Pediatr, 2016, 4: 135.
- [9] Schenk RL, Strasser A, Dewson G. BCL-2: Long and winding path from discovery to therapeutic target[J]. BiochemBiophys Res Commun, 2017, 482(3): 459-69.
- [10] Levy MA, Claxton DF. Therapeutic inhibition of BCL-2 and related family members[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2017, 26(3): 293-301.

[编辑校对: 黄国玲]