

水蛭素对人鼻咽癌细胞增殖的影响及机制

陶义丰, 黄玲莎, 刘冬华, 劳明, 黄浩, 黄文成, 谢娟
(广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021)

摘要: 目的 探讨水蛭素对人鼻咽癌细胞(CNE2)增殖的影响及机制。方法 取对数生长期的 CNE2 细胞随机分为对照组与水蛭素组。对照组常规培养,水蛭素组加入不同浓度的水蛭素进行培养。倒置显微镜下观察细胞形态学变化;MTT 法测算 CNE2 细胞生长抑制率,计算不同时间点半抑制浓度(IC_{50});实时荧光定量 PCR 检测 CNE2 细胞内 Bax、p21 mRNA 表达。结果 不同浓度不同时间点水蛭素组生长抑制率均高于对照组,水蛭素组各浓度各时间点生长抑制率比较差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。药物作用 24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为(8.28 ± 2.1)、(5.11 ± 0.7)、(4.83 ± 0.5) ATU/mL,48、72 h 时间点 IC_{50} 比 24 h 高(P 均 <0.05)。与对照组比较,5、8 ATU/mL 水蛭素组 Bax、p21 mRNA 相对表达量高(P 均 <0.05)。8 ATU/mL 水蛭素组最高(P 均 <0.05)。结论 水蛭素可明显抑制 CNE2 细胞增殖,该作用可能与水蛭素上调 Bax、p21 mRNA 表达有关。

关键词: 水蛭素;鼻咽肿瘤;CNE2 细胞;Bax 基因;p21 基因

doi: 10.3969/j.issn.1002-266X.2018.33.012

中图分类号: R932; R739.63 文献标志码: A 文章编号: 1002-266X(2018)33-0043-04

The proliferation inhibition effect with hirudin on human nasopharyngeal cancer CNE2 cells

TAO Yifeng, HUANG Lingsha, LIU Donghua, LAO Ming, HUANG Hao, HUANG Wencheng, XIE Juan

(The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To investigate the proliferation inhibition effect of hirudin on human nasopharyngeal cancer CNE2 cells. **Methods** The human nasopharyngeal carcinoma CNE2 were cultured with common cell culture technique, and assigned to control group (culture medium + cells) and observation group (culture medium + cells + hirudin). Morphological changes of cells were observed under inverted microscope. Inhibitory effect of cell proliferation was measured by MTT assay and calculation of inhibition concentration at different time(IC_{50}). Quantitative real-time polymerase chain reaction was used to demonstrate expression levels of involved mRNA such as p21, Bax. **Results** Compared with the control group, CNE2 cells in the observation group were cultured at 5 ATU/mL and 8 ATU/mL for 24 h and 48 h, respectively, and then increased with the time and the dosing concentration, the cells adhered to the wall decreased, debris increased, and apoptosis was obvious. Hirudin could inhibit CNE2 cells proliferation, with the increasing of concentration and time of hirudin on CNE2 cells(all $P < 0.05$). The IC_{50} at 24 h, 48 h and 72 h was (8.28 ± 2.1), (5.11 ± 0.7) and (4.83 ± 0.5) ATU/mL respectively. The apoptosis rate of the group treated by hirudin raised in evidence(all $P < 0.05$). The expression levels of p21 and Bax mRNA were significantly increased with hirudin(all $P < 0.05$). **Conclusion** Hirudin significantly inhibits the proliferation of CNE2 cells, which may be related to the up-regulation of p21 and Bax mRNA expression by hirudin.

Key words: hirudin; nasopharyngeal tumor; CNE2 cells; Bax gene; p21 gene

鼻咽癌是鼻咽部上皮细胞的恶性肿瘤,发病常较隐匿,临床确诊时多半患者已为中晚期,放疗成为治疗鼻咽癌的主要方式^[1]。单纯放疗复发率及远处转移率均较高,并且放射常不可避免地损伤正常

组织,导致患者生活质量下降;而化疗药物又有不同程度的不良反应。因此寻找治疗鼻咽癌有效并且毒副作用少的药物是临床研究热点之一。活体菲牛蛭是药用动物资源,从欧洲医蛭的唾液腺中分离出抗

基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题(2016503)。

通信作者:黄玲莎(E-mail:ls_huang@163.com)

凝物质的活性成分并命名为水蛭素^[2]。水蛭素具有抗血栓、抗炎、抗氧化、降血脂作用,已广泛应用于心脑血管及血栓性性疾病的治疗^[3-4]。水蛭素还具有抗肿瘤作用,可根据肿瘤部位及性质联合或单药治疗血管瘤、肝癌等^[5]。2017 年 6 月~2017 年 12 月,本研究探讨水蛭素对人鼻咽癌细胞(CNE2)增殖的影响及机制,以期为进一步开发抗肿瘤中药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人鼻咽癌细胞株 CNE2(广西医科大学医学实验中心肿瘤实验室);天然水蛭素冻干粉(南宁市金海科康生物医药科技有限公司);RPMI1640(北京赛默飞世尔生化制品有限公司);胎牛血清(上海依科赛生物制品有限公司);MTT(北京索莱宝科技有限公司)、DMSO(北京索莱宝科技有限公司)、胰酶(北京索莱宝科技有限公司);Trizol(In-vitrogen 公司);RevertAid First Strand cDNA Synthesis(Takara);SYBR Mix(Takara);CKX31SF 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);MK3 酶标仪(上海热电仪器有限公司);实时荧光定量 PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司);微量核酸测定仪(美国 Thermo 公司)。

1.2 CNE2 细胞培养及水蛭素干预 CNE2 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素及 100 IU/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,用 0.25% 的胰酶消化传代。取对数生长期的 CNE2 细胞随机分为对照组与水蛭素组。将细胞按 100 μL/孔接种于 96 孔板,放入 37℃ 的 CO₂ 培养箱中继续培养 24 h。将水蛭素冻干粉加入 RPMI1640 培养液配置 30 ATU/mL 母液,采用倍比稀释法配制相应浓度的水蛭素。在倒置相差显微镜下观察细胞形态学变化。

1.3 CNE2 细胞生长抑制率测算 采用 MTT 法。对照组常规培养,水蛭素组加入不同浓度(2、4、8、16 ATU/mL)的水蛭素,分别于作用 24、48、72 h 后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μL,培养 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,微量振荡器摇振荡 10 min,用酶标仪测定 492 nm 波长处的吸光度值(OD)。实验重复 3 次取平均值。抑制率 = (1 - 加药组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。

1.4 CNE2 细胞内 Bax、p21 mRNA 表达检测 对照组常规培养,水蛭素组加入不同浓度(5、8 ATU/mL)的水蛭素进行培养。培养 24 h 后取细胞分别加入胰酶消化,用预先配备好的培养液中和胰酶,重悬细胞于 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,

弃上清,加等量培养液打散,转至 EP 管,以同样的条件再次离心后,每 EP 管分别加入的 TRIzol 1 mL,室温下静置 10 min;每管加入氯仿 0.2 mL 振荡 60 s,冰上静置 10 min;按照说明书要求 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,EP 管内分三层,收集上层溶液,即目标 RNA。加入异丙醇 0.2 mL,混匀,冰上置 10 min;离心,弃上清液,获得实验目标产物 RNA;用 75% 乙醇洗涤管内白色沉淀,离心去上清液纯化目标;加入无酶去离子水 20 μL 保存。按逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。PCR 扩增体系:premix ex taqTM 12.5 μL,β-actin 上游引物 0.75 μL,β-actin 下游引物 0.75 μL,RNase-free Water 10 μL,cDNA 模板 1 μL;premix ex taqTM 12.5 μL,p21 上游引物 0.75 μL,p21 下游引物 0.75 μL,RNase-free Water 10 μL,cDNA 模板 1 μL;premix ex taqTM 12.5 μL,Bax 上游引物 0.75 μL,Bax 下游引物 0.75 μL,RNase-free Water 10 μL,cDNA 模板 1 μL。反应条件:94℃ 2 min 94℃ 20 s 60℃ 35s,共 40 个循环。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,扩增产物 289 bp。采用 β-actin 作为内参,β-actin 的拷贝数作为校正基数,实验获得各样本的 Ct 值与同样本中的内参 Ct 值相减即获得目的基因相对表达量。

1.5 统计学方法 采用 SPSS16.0 统计软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 SNK 检验。采用简单线性回归分析浓度、时间依赖性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CNE2 细胞形态学变化 对照组细胞贴壁良好,细胞形态大小基本一致,大多为多边形似铺路石状,轮廓清晰,连接紧密;折光性强,胞膜完整,胞质均匀、透明,胞质内颗粒较少。水蛭素组经 5 ATU/mL 水蛭素作用 24 h 后,细胞贴壁一般,可见细胞缩小,折光性弱,些许细胞漂浮;作用 48 h 后,细胞形态改变更加明显,折光性明显减弱,小片细胞皱缩变小,抱团漂浮。8 ATU/mL 水蛭素作用 24 h 后,贴壁细胞减少,细胞皱缩变圆,折光性减弱,片状漂浮成团;作用 48 h 后贴壁细胞明显减少,伪足断裂,折光性减弱,大量细胞皱缩变圆,成片细胞漂浮结团,细胞碎片增多,细胞凋亡明显,并释放出大量代谢颗粒。

2.2 水蛭素对 CNE2 细胞增殖的影响 不同浓度不同时间点水蛭素组生长抑制率均高于对照组,水蛭素组各浓度各时间点生长抑制率比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),有浓度、时间依赖性。见

表 1。根据水蛭素作用 CNE2 细胞的生长抑制率,计算药物作用 24、48、72 h 水蛭素组的 IC_{50} 分别为 (8.28 ± 2.1) 、 (5.11 ± 0.7) 、 (4.83 ± 0.5) ATU/mL,48、72 h 时间点 IC_{50} 比 24 h 高(P 均 <0.05) ,72 h 与 48 h 比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 水蛭素对 CNE2 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	生长抑制率		
	药物作用 24 h	药物作用 48 h	药物作用 72 h
对照组	0	0	0
水蛭素组			
2 ATU/mL	8.4 ± 5.8	9.3 ± 7.2	9.6 ± 4.8
4 ATU/mL	35.7 ± 10.5	48.4 ± 7.9	55.0 ± 2.3
8 ATU/mL	62.0 ± 5.2	88.5 ± 0.7	90.3 ± 0.9
16 ATU/mL	74.9 ± 2.0	90.3 ± 0.6	93.3 ± 2.2

2.3 水蛭素对 CNE2 细胞内 Bax、p21 mRNA 表达的影响 与对照组比较,5、8 ATU/mL 水蛭素组 Bax、p21 mRNA 相对表达量高(P 均 <0.05) ,8 ATU/mL 水蛭素组最高(P 均 <0.05)。见表 2。

表 2 各组 Bax、p21 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Bax mRNA	p21 mRNA
对照组	1.11 ± 0.16	1.13 ± 0.15
5 ATU/mL 水蛭素组	3.16 ± 1.06	4.54 ± 0.47
8 ATU/mL 水蛭素组	5.92 ± 1.01	7.77 ± 0.87

3 讨论

鼻咽癌是好发于头颈部的恶性肿瘤,易发生转移。尽管放疗化疗技术不断改进,但是鼻咽癌发生位置隐匿,易局部转移、复发及耐药性高导致患者 5 年生存率低。因此,开发新型可靠、有效的药物刻不容缓。目前天然抗肿瘤药物的研究已受到越来越多的关注,临床一线抗肿瘤药如紫杉醇、长春碱等得到广泛应用。近年来,水蛭素治疗恶性肿瘤的效果也引起广泛关注。

活体菲牛蛭是具有广西特色的药用动物资源。《神农本草经》认为水蛭有破血通经,逐瘀消癥之效^[6]。17 世纪就已经在水蛭中提取了抗凝物质^[7]。直到 1957 年,Markwardt^[2] 才从欧洲医蛭的唾液腺中分离出这种抗凝物质的活性成分,并命名为水蛭素。水蛭素具有多种生物活性的天然产物^[8],富含锰、镁、锌等元素。药理学实验认为水蛭素抗癌机制可能源于其高抗凝作用,可促进药理活性物质及免疫活性细胞侵入肿瘤,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[9,10]。水蛭素作用于体外培养的人舌鳞癌 TCA8113 细胞呈现出剂量依赖性的抑制效应,且联合阿霉素后有较好的增效减毒作用^[11]。水蛭素通过下调 B 淋巴细胞瘤-2 基因及上调促凋亡蛋白的表达诱导喉癌 Hep-2 细胞凋亡,且可明显降低血管内皮细胞生长因子受体 2 和局部黏着斑激酶的表达,从而抑制

Hep-2 细胞迁移、黏附和入侵^[12]。众多对水蛭素抗癌抑瘤功效的研究表明,水蛭素通过抑制纤维蛋白形成,切断肿瘤细胞的纤维蛋白形成或血小板聚集这一过程,最终达到抑制肿瘤细胞转移的功效^[13]。重组水蛭素可以抑制小鼠肿瘤的生长,并能够进一步促进长春新碱抑制黑色素瘤生长和转移^[14],表明水蛭素具有抑制肿瘤转移甚至诱导凋亡的功能^[15,16]。但是,水蛭素对人鼻咽癌细胞的影响尚未见文献报道。

本文选取人鼻咽癌细胞株 CNE2 为靶细胞进行水蛭素抗肿瘤效应的研究,观察不同浓度、不同时间点的水蛭素对 CNE2 细胞增殖抑制的影响。结果表明,水蛭素在 2~16 ATU/mL 浓度范围内对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖均有抑制作用,且水蛭素作用于 CNE2 细胞 24、48、72 h 的 IC_{50} 值逐渐降低。可见水蛭素对 CNE2 细胞的抑制作用具有时间、剂量依赖性。

p21 是一种广谱细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子,可竞争性地与细胞周期蛋白结合,从而抑制该酶活性,减少靶蛋白磷酸化。王文兰等^[17] 认为冬凌草甲素通过使 p21mRNA 表达增加来诱导细胞发生 G_2 期阻滞,黄连碱对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞周期阻滞于 G_2 期时检测到 p21 表达增加^[18]。同时还有研究者发现 p21 这个抑癌基因在鼻咽癌发病过程中起着重要作用,p21 基因 3' UTR 多态性与鼻咽癌发病的启动密切相关^[19],nt590 p21 基因多态性也与鼻咽癌易感性有着密切联系。本研究通过实时荧光定量 PCR 发现水蛭素作用于人鼻咽癌 CNE2 细胞 24 h 后,5 ATU/mL 组和 8 ATU/mL 组的 p21 mRNA 表达升高。显示水蛭素可能通过增加 p21 的表达而导致人鼻咽癌 CNE2 细胞周期阻滞,增殖抑制,但具体机制还需进一步研究证实。

Bax 作为 Bcl-2 家族成员之一,是家族所有促凋亡基因中最具有代表性的。在细胞发生凋亡时,Bax 在凋亡因子刺激下通过寡聚化在线粒体外膜上形成微孔通道,使细胞色素 C 及凋亡诱导因子从线粒体内轻易进入到细胞质,导致胞质中的离子中和了线粒体内外膜间隙中的离子,使线粒体跨膜电位丧失,外膜肿胀释放出凋亡相关的蛋白,可进一步诱导凋亡^[20~23]。本研究分别经 5、8 ATU/mL 水蛭素作用 24 h 后,CNE2 细胞内 Bax 基因表达较对照组高。显示水蛭素可能通过升高 Bax 的表达改变 CNE2 细胞线粒体膜的通透性,进而对细胞增殖抑制产生影响。

本研究以天然水蛭素对人鼻咽癌 CNE2 细胞的

作用为切入点,在 CNE-2 细胞模型中采用 MTT 法测定其对 CNE-2 细胞有生长抑制作用,利用 RT-PCR 观察水蛭素可使 CNE2 细胞 Bax 和 p21mRNA 表达均增高,此结果可为水蛭素类抗肿瘤药物的开发利用提供理论依据。

参考文献:

- [1] Kamran SC, Riaz N, Lee N. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2015, 24(3): 547-561.
- [2] Markwardt F. Quantitative determination of prothrombin by titration with hirudin[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol, 1958, 232(3): 487-498.
- [3] 杨洪雁, 张香东, 刘可圆, 等. 水蛭对血瘀证家兔血脂代谢及相关基因表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(9): 959-963.
- [4] 杨尚雪, 李珣, 王晓晔, 等. 水蛭素对冷冻前后猪精液中超氧化物歧化酶活性及 mRNA 表达的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 275-278.
- [5] 杨才志, 陈胜贤, 黄锦菁, 等. 水蛭素对小鼠 EOMA 血管瘤细胞体外增殖及凋亡的影响[J]. 中国老年学, 2015, 35(16): 4445-4446.
- [6] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 517-518.
- [7] Haycraft JB. Über die einwirkung eines sekretes des offi-ciellen blutegels auf die gerinnbarkeit des bluts[J]. Arch Exp Pathol Pharmacol, 1884, 18(3-4): 209-217.
- [8] 苏承武, 周维官, 周维海, 等. 天然水蛭素冻干粉实验结果的分析[J]. 蛇志, 2010, 22(4): 336-338.
- [9] 修霞, 聂海霞. 水蛭化学成分及其药理作用探讨综述[J]. 中国热带医学, 2005, 5(8): 1733-1734.
- [10] 郭晓庆, 孙佳明, 张辉. 水蛭的化学成分与药理作用[J]. 吉林中医药, 2015, 35(1): 47-50.
- [11] 贺彬, 苏承武, 蔡捷, 等. 水蛭素联合阿霉素对 TCA8113 细胞株作用机制的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(12): 1447-1450.
- [12] Lu Q, Lv M, Xu E, et al. Recombinant hirudin suppresses the viability, adhesion, migration and invasion of Hep-2 human laryngeal cancer cells[J]. Oncology Rep, 2015, 33(3): 3354.
- [13] 胡哲, 张静. 水蛭素的应用研究进展[J]. 包头医学院学报, 2014, 30(3): 152-154.
- [14] Guo RR, Liu Y, Lu WL, et al. A recombinant peptide, hirudin, potentiates the inhibitory effects of stealthy liposomal vinblastine on the growth and metastasis of melanoma[J]. 2008, 31(4): 696-702.
- [15] Jha K, Garg A, Narang R, et al. Hirudotherapy in medicine and dentistry[J]. J Clin Diagn Res, 2015, 9(12): 5-7.
- [16] Abdulkader AM, Ghawi AM, Alaama M, et al. Leech therapeutic applications[J]. Indian J Pharm Sci, 2013, 75(2): 127-137.
- [17] 王文兰, 付彩文, 付文浩. 冬凌草甲素对胰腺癌 SW1990 细胞的抑制作用及机制[J]. 实用药物与临床, 2015, 18(7): 765-768.
- [18] 李静, 曹素萍. 黄连碱对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞周期和增殖的作用及其机制[J]. 江苏医药, 2015, 41(9): 285-287.
- [19] 许珊, 姜学钧. p21 基因 nt590 多态性与鼻咽癌易感性的相关性研究[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(12): 89-92.
- [20] Szabadkai G, Rizzuto R. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood[J]. FEBS Lett, 2004, 567(1): 111-115.
- [21] Tian XM, Zhang ZX. Resveratrol promote permeability transition pore opening mediated by Ca^{2+} [J]. Yao Xue Xue Bao, 2003, 38(2): 81-84.
- [22] Sola S, Aranha MM, Steer CJ. Game and players: mitochondrial apoptosis and the therapeutic potential of ursodeoxycholic acid[J]. Curr Issues Mol Biol, 2007, 9(2): 123-138.
- [23] Strasser A, Cory S, Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases[J]. EMBO J, 2011, 30(18): 3667-3683.

(收稿日期: 2018-06-28)