

木黄酮对人喉癌细胞 Hep-2 诱导 凋亡及抑制增殖的研究

席盼盼^{1△} 张淑香¹

[摘要] 目的:探讨木黄酮对人喉癌细胞 Hep-2 的诱导凋亡及抑制作用。方法:采用 CCK-8 法测定木黄酮抑制细胞系 Hep-2 增殖的 IC₅₀ 值;应用流式细胞术检测木黄酮对喉癌细胞所引起的周期分布变化与凋亡率;倒置相差显微镜下观察木黄酮干预人喉癌细胞 Hep-2 前后的细胞形态学变化。结果:木黄酮抑制 Hep-2 细胞增殖的 IC₅₀ 值为 23.64 μg/ml;采用浓度为 12 μg/ml 和 24 μg/ml 的木黄酮分别作用于喉癌细胞 24 h 的凋亡率为 22.4%±1.65%和 30.64%±2.95%,与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);采用浓度为 12 μg/ml 和 24 μg/ml 的木黄酮分别作用于喉癌细胞 48 h 的凋亡率为 30.55%±0.72%和 48.69%±1.06%,与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。同一浓度的木黄酮作用于喉癌细胞 24、48 h 的凋亡率差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:木黄酮能够明显抑制人喉癌细胞 Hep-2 细胞增殖,并引起 Hep-2 细胞的凋亡,凋亡率随时间的延长和剂量的增加而增高。

[关键词] 木黄酮;喉肿瘤;Hep-2 细胞;细胞凋亡

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.07.016

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

The research of apoptosis and proliferation inhibition of human laryngeal carcinoma cell line Hep-2 induced by Genistein

XI Panpan ZHANG Shuxiang

(Department of Otorhinolaryngology, Affiliated Hospital Logistics University of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin, 300162, China)

Corresponding author: ZHANG Shuxiang, E-mail: zhangsx78754@163.com

Abstract Objective: To investigate the effect of genistein on cell proliferation and apoptosis in human laryngeal carcinoma cell line Hep-2. **Method:** Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was used to measure the 50% inhibiting concentration (IC₅₀) value of genistein; cell apoptosis rate and the distribution changes of cell cycle were determined with flow cytometry assay after treatment by genistein. The morphological changes of tumor cells were evaluated by inverted phase contrast microscopy. **Result:** The IC₅₀ of genistein responses to Hep-2 cells for 24 h was 23.64 μg/ml. The apoptotic rates of Hep-2 cells treated by genistein for 24 h were 22.40%±1.65% (at 12 μg/ml genistein) and 30.64%±2.94% (at 24 μg/ml genistein) respectively, significantly statistical differences were found between above treated groups and the control group ($P<0.05$); the apoptotic rates of Hep-2 cells treated by genistein for 48 h were 30.55%±0.72% (at 12 μg/ml genistein) and 48.69%±1.06% (at 24 μg/ml genistein) respectively, significantly statistical differences were found between above treated groups and the control group ($P<0.05$). When Hep-2 cells exposed to the same concentration of genistein for 24 h, 48 h respectively, the difference in apoptotic rate was statistically significant. **Conclusion:** Genistein inhibited Hep-2 cells growth obviously, meanwhile it could induced apoptosis of Hep-2 cells, the apoptotic rate was increasing with the increase of the time and dose of genistein.

Key words Genistein; laryngeal carcinoma; Hep-2; apoptosis

喉癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,90%~95%是以鳞状细胞癌的方式存在,是全人类第11种常见肿瘤^[1]。尽管目前喉癌的诊断及治疗技术有所改善,但是患者的远期生存率及生活质量仍不能提高^[2]。木黄酮(Genistein)是从大豆中提取的异黄酮类化合物,其化学名为4,5,7-三羟基异黄酮,是表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸蛋白激酶(PTK)抑制剂。近年来,大量的动物实验、临床研究及流行病学

调查结果表明,通过膳食摄入的木黄酮具有多种利于身体健康的生物化学成分,对许多疾病(尤其是肿瘤)具有预防和治疗的作用^[3]。本研究通过观察木黄酮对人喉癌细胞 Hep-2 增殖及凋亡的影响,为其应用于喉癌的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

木黄酮购于北京寰宇科创生物科技发展有限公司, RPMI1640 培养液和胎牛血清购自 HyClone, 人喉癌细胞系 Hep-2 购于北京协和细胞资源中心, CCK-8 试剂盒购自 Dojindo, 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 购自 Sigma, Annexin V-FLOUS 凋亡

¹ 中国人民解放军警察部队后勤学院附属医院耳鼻咽喉科(天津,300162)

[△] 现在天津市第五中心医院耳鼻咽喉科(天津,300450)

通信作者:张淑香, E-mail: zhangsx78754@163.com

检测试剂盒购自 Roche。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与药物配制 将 Hep-2 人喉癌细胞置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,在 37℃、5% CO₂ 气体及适宜饱和湿度的培养箱中培养,2~3 d 用 0.25% 胰酶消化传代 1 次。取对数生长期的细胞进行实验,分为加药(实验组)和不加药(空白对照组)。将木黄酮溶解于细胞专用二甲基亚砜(DMSO)溶液中,并将 DMSO 溶液终浓度控制在 1% 以内。

1.2.2 CCK-8 法测定木黄酮对 Hep-2 细胞的 IC₅₀ 值 取对数生长的 Hep-2 细胞,制成单细胞悬液,以每孔 5×10^3 个细胞密度接种于 96 孔培养板中,每孔培养液为 100 μ l,每组设 6 个平行孔,并设有空白对照组及空白调零组。细胞培养 24 h 后,将培养液更换为含有不同浓度木黄酮(6.25 μ g/ml,12.5 μ g/ml,25.0 μ g/ml,50.0 μ g/ml,100.0 μ g/ml)的培养液,继续培养 24 h 后,再将培养液更替为每 100 μ l 含有 10 μ l CCK-8 的培养液,移入 37℃ 孵箱中继续孵育 1.5 h,用全自动酶标仪在波长 450 nm 下测定每孔的光密度(A)值。根据抑制率公式:抑制率/% = (A 对照 - A 实验)/(A 对照 - A 空白) × 100%,计算细胞生长抑制率,绘制生长抑制曲线。采用 SPSS 13.0 统计学软件中的 Probit 分析得出各效应概率水平的剂量值(包括 0.50,即 IC₅₀)。

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期 取各组对数生长期细胞,制备成单细胞悬液,用 70% 乙醇在 4℃ 固定 2 h, PBS 洗涤,加入碘化丙啶染液(PI,含 50 mg/L PI、0.05% Triton X-100 和 100 mg/L RNase),37℃ 孵育 40 min,300 目尼龙滤网过滤后,用 Beckman Coulter FC500 流式细胞仪测定,并用 FlowJo 软件进行分析,实验重复 3 次,计算各组细胞的细胞周期各时相分布情况。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 采用 Annexin V-Flores/PI 双染色法检测细胞凋亡,收集各组对数生长期细胞,按照试剂盒说明进行操作后,用流式细胞仪进行检测。重复测定 3 次,计算各组细胞的平均凋亡率。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计学软件处理数据,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用单因素方差分析各组间数据的差异,均数两两比较采用 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 CCK-8 试剂盒测定木黄酮对人喉癌细胞系 Hep-2 的抑制作用及 IC₅₀ 值

采用 0~100 μ g/ml 的木黄酮干预人喉癌细胞系 Hep-2 于 24 h 后,再与 CCK-8 溶媒对照组比较,

获得细胞抑制率。人喉癌细胞系 Hep-2 抑制率随着木黄酮浓度的增加而逐渐升高,表明木黄酮对人喉癌细胞系 Hep-2 增殖的抑制作用呈剂量依赖性的上升趋势,见图 1。各效应概率水平的剂量值中 IC₅₀ 为 23.64 μ g/ml。

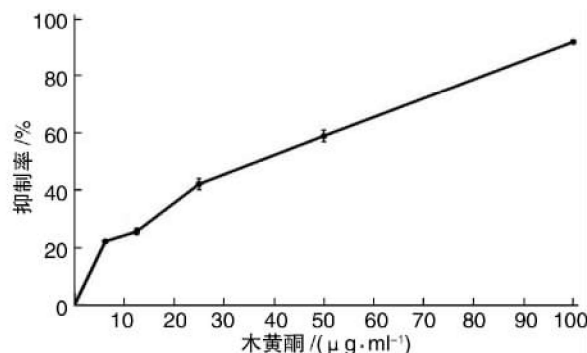


图1 木黄酮对人喉癌细胞的抑制作用

2.2 木黄酮对细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果表明:木黄酮可以引起喉癌细胞 G₂ 期阻滞,当药物浓度增加时会出现 S 期阻滞,并伴随着 G₁ 期细胞比例的下降。不同浓度(12 μ g/ml、24 μ g/ml)的木黄酮作用 24 h 后,其 G₂ 期与 S 期所占细胞百分比与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。12 μ g/ml 的木黄酮作用 24 h 后将细胞阻滞在 G₂ 期,阻滞作用明显,随着作用浓度增加出现明显的 S 期阻滞,见图 2。

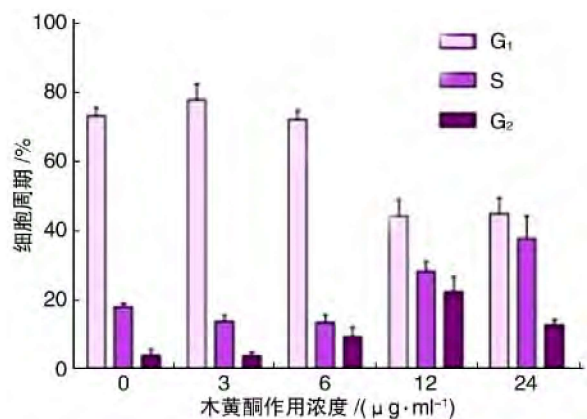


图2 流式细胞仪分析细胞周期

2.3 木黄酮对细胞凋亡率的影响

采用流式细胞术检测不同浓度的木黄酮分别作用于人喉癌 Hep-2 细胞系 24、48 h 后的细胞凋亡情况。采用浓度为 12 μ g/ml 和 24 μ g/ml 的木黄酮分别作用于喉癌细胞 24 h 的凋亡率为 $22.4\% \pm 1.65\%$ 和 $30.64\% \pm 2.95\%$,与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);采用浓度为 12 μ g/ml、24 μ g/ml 的木黄酮分别作用于喉癌细

胞 48 h 的凋亡率为 $30.55\% \pm 0.72\%$ 和 $48.69\% \pm 1.06\%$, 与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。同一浓度的木黄酮作用于喉癌细胞 24、48 h 的凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。木黄酮诱导喉癌细胞的凋亡呈时间和剂量依赖关系, 见图 3。

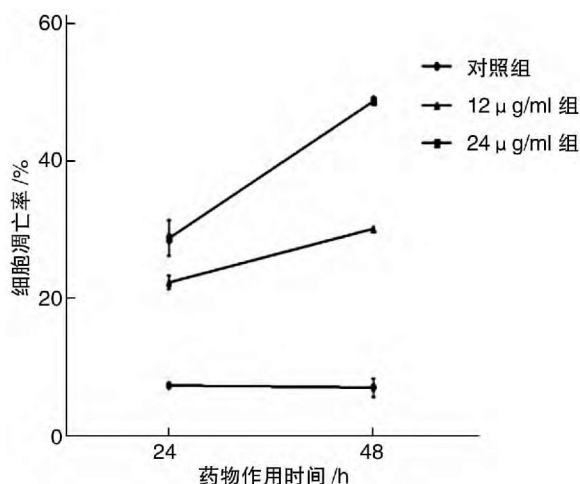


图 3 流式细胞仪分析细胞凋亡

2.4 木黄酮干预人喉癌细胞 Hep-2 前后的细胞形态学变化

倒置相差显微镜下观察可见: 阴性对照组 Hep-2 细胞为贴壁生长, 呈梭形或多边形, 细胞形态饱满且轮廓清晰, 无明显悬浮细胞。经木黄酮干预的细胞胞质浓缩, 边缘不规则, 部分细胞表面有出芽现象, 还可见一些溶解破碎细胞及脱落的悬浮细胞, 见图 4。

3 讨论

肿瘤是以异常的细胞增殖、失控的细胞周期和紊乱的细胞凋亡程序为特征。因此抑制肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞发生凋亡, 已成为肿瘤治疗的重要策略之一。那些可以通过阻滞或抑制细胞增殖诱导细胞凋亡的化合物极可能成为抗肿瘤药物^[4]。

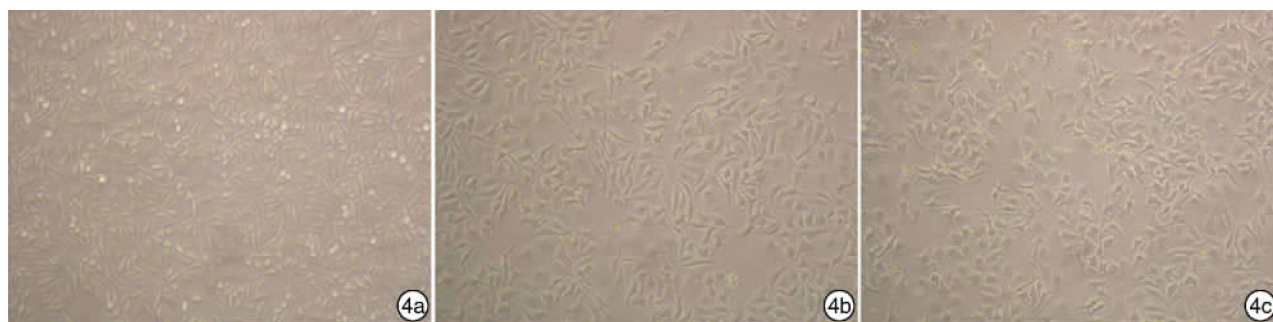
木黄酮又称染料木素或金雀异黄素, 是一种广泛存在于豆科植物的天然异黄酮类化合物^[5]。诱导细胞发生 G_2/M 期阻滞和细胞凋亡是木黄酮抑制肿瘤的主要机制^[6-7]。木黄酮对乳腺癌、前列腺癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌及宫颈癌等多种肿瘤均能发挥抗癌作用^[8]。木黄酮主要是通过抑制酪氨酸激酶和 DNA 拓扑异构酶 II, 激活 caspase-9、caspase-3 等途径, 具有防止 DNA 突变, 减少细胞增殖, 抑制血管形成及诱导凋亡和细胞周期停滞等抗肿瘤作用^[9-12]。本研究是以体外培养的人喉癌细胞系 Hep-2 作为研究对象, 对木黄酮对 Hep-2 细胞体外生长、细胞周期和凋亡的影响进行深入探讨。

CCK-8 法检测结果表明木黄酮对 Hep-2 细胞具有明显的增殖抑制活性, 生长抑制率随着药物剂量的增加而升高, 表现出一定的剂量-效应依赖关系。通过流式细胞术检测木黄酮对 Hep-2 细胞周期及凋亡的影响, 其结果表明木黄酮抑制 Hep-2 细胞增殖的主要机制是引起细胞发生 G_2/M 期阻滞, 随药物剂量的增加会出现明显的 S 期阻滞, 并诱导 Hep-2 细胞发生凋亡。

综上所述, 木黄酮能够诱导人喉癌细胞系 Hep-2 发生细胞凋亡, 并抑制其细胞增殖, 然而尚需进一步研究才能了解木黄酮诱导凋亡的机制, 为其在临床上的应用提供一定的实验依据。

参考文献

- [1] CHU E A, KIM Y J. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up[J]. Otolaryngol Clin North Am, 2008, 41: 673-695.
- [2] MARIONI G, AGOSTINI M, BEDIN C, et al. Survivin and laryngeal carcinoma prognosis: nuclear localization and expression of splice variants[J]. Histo-pathology, 2012, 61: 247-256.
- [3] 李明, 周永, 糜漫天. 木黄酮的研究进展[J]. 西南国防医药, 2008, 18(4): 617-620.
- [4] FRANKFURT O S, KRISHAN A. Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2003, 14: 555-561.



4a: 对照组; 4b: 12 $\mu\text{g/ml}$ 组; 4c: 24 $\mu\text{g/ml}$ 组。

图 4 倒置相差显微镜下细胞的变化

白花蛇舌草多糖诱导鼻咽癌细胞 凋亡及其机制研究

景艳¹ 康敏² 刘津³ 李静雨⁴ 唐安洲⁴

[摘要] 目的:研究白花蛇舌草多糖(PEHD)体外抑制鼻咽癌 CNE2 细胞株增殖,诱导细胞凋亡及其凋亡机制。方法:用不同剂量 PEHD(2、4、6 mg/ml)处理 CNE2 细胞 24 h、48 h、72 h,用四甲基偶氮唑蓝法(MTT)检测 CNE2 细胞的增殖情况,计算抑制率。在不同药物浓度(2、4、6 mg/ml)PEHD 作用 48 h 后,用 Annexin V-FITC/碘化丙啶双染法(Annexin V/PI)标记的流式细胞术检测 CNE2 细胞的凋亡率。采用 Western blot 检测用药前后细胞中 Bax 蛋白、Bcl-2 蛋白和 caspase-3 蛋白的表达水平。结果:MTT 结果显示,2、4、6 mg/ml PEHD 可以明显抑制 CNE2 细胞增殖(均 $P < 0.05$),最高抑制率可达 76.5%,在 2~6 mg/ml 浓度内随着浓度的增加、时间的延长抑制作用逐渐增强,呈时间-剂量依赖性。流式细胞术检测到 4、6 mg/ml PEHD 作用 48 h 后,CNE2 凋亡细胞比例显著增加,凋亡率分别为 31.32%、46.28%,高于空白对照组 4.86%($P < 0.01$)。Western blot 显示 PEHD 处理 48 h 后,CNE2 细胞 Bax 蛋白和 caspase-3 蛋白表达上升,Bcl-2 的表达下降。结论:在一定浓度范围内 PEHD(2、4、6 mg/ml)能够明显抑制鼻咽癌 CNE2 细胞的增殖,呈时间-剂量依赖性,其抑制作用与诱导细胞凋亡有关;PEHD 可通过上调 Bax、caspase-3 蛋白表达、下调 Bcl-2 蛋白表达,诱导 CNE2 细胞凋亡。

[关键词] 白花蛇舌草多糖;鼻咽肿瘤;CNE2 细胞;细胞凋亡

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.07.017

[中图分类号] R739.63 **[文献标志码]** A

Mechanism of apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells induced by polysaccharides extracts from *Hedyotis diffusa*

JING Yan¹ KANG Min² LIU Jin³ LI Jingyu⁴ TANG Anzhou⁴

(¹Department of Otolaryngology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, 530021, China; ²Department of Radiotherapy, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University; ³Department of Otolaryngology, Youjiang Medical College For Nationalities, Baise; ⁴Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University)

Corresponding author: TANG Anzhou, E-mail: anzhoutang@126.com

¹广西壮族自治区人民医院耳鼻咽喉科(南宁,530021)

²广西医科大学第一附属医院放疗科

³右江民族医学院附属医院耳鼻咽喉科

⁴广西医科大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:唐安洲, E-mail: anzhoutang@126.com

- [5] GOSSNER G, CHOI M, TAN L, et al. Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2007, 105: 23-30.
- [6] LI W, FRAME L T, HOO K A, et al. Genistein inhibited proliferation and induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells in vitro[J]. Leuk Lymphoma, 2011, 52: 2380-2390.
- [7] YAN G R, XIAO C L, HE G W, et al. Global phosphoproteomic effects of natural tyrosine kinase inhibitor, genistein, on signaling pathways [J]. Proteomics, 2010, 10: 976-986.
- [8] YAN G R, ZOU F Y, DANG B L, et al. Genistein-induced mitotic arrest of gastric cancer cells by down-regulating KIF20A, a proteomics study [J]. Proteomics, 2012, 12: 2391-2399.
- [9] ALHASAN S A, ARANHA O, SARKAR F H. Genistein elicits pleiotropic molecular effects on head and neck cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7: 4174-4181.
- [10] LI Y, LIU L, ANDREWS L G, et al. Genistein depletes telomerase activity through cross-talk between genetic and epigenetic mechanisms[J]. Int J Cancer, 2009, 125: 286-296.
- [11] ISMAIL I A, KANG K S, LEE H A, et al. Genistein-induced neuronal apoptosis and G2/M cell cycle arrest is associated with MDC1 up-regulation and PLK1 down-regulation [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 575: 12-20.
- [12] MORITO K, HIROSE T, KINJO J, et al. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta[J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24: 351-356.

(收稿日期:2014-06-25)