

# 紫杉醇通过抑制 PI3K/AKT/p53 信号通路诱导人鼻咽癌细胞株 CNE2 增殖抑制和凋亡

李涛<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨紫杉醇(PTX)对人鼻咽癌细胞株 CNE2 的作用及机制。方法:取对数生长期的 CNE2 细胞分别用不同浓度(0、5、10、20 mol/L)的 PTX 处理。细胞培养 72 h 后,利用 MTT 检测细胞增殖;流式检测细胞凋亡和膜电位;免疫印迹法检测 PI3K, p-AKT, AKT, p53, p21, Caspase3, Cleavage-Caspase3, PARP, Cleavage-PARP, CytC, AIF, Bcl-2 和 Bax 表达。结果:PTX 呈浓度依赖性诱导 CNE2 细胞增殖抑制和凋亡,增加 Caspase3、PARP、CytC、AIF 和 Bax 表达,下调 PI3K、p-AKT、p53、p21、Cleavage-PARP、Cleavage-Caspase3 和 Bcl-2 的表达和细胞膜电位,但对 AKT 表达无明显影响。结论:PTX 可通过抑制 PI3K/AKT/p53 信号通路而诱导 CNE2 细胞增殖抑制和凋亡。

**[关键词]** 鼻咽肿瘤;紫杉醇;增殖;凋亡

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.24.011

**[中图分类号]** R739.63 **[文献标志码]** A

## Pacilitaxel induces human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2 apoptosis and growth inhibition by suppressing PI3K/AKT/p53 signaling pathway

LI Tao

(Department of Otolaryngology, People's Hospital of Zibo District, Zibo, 255000, China)

Corresponding author: LI Tao, E-mail: 870772422@qq.com

**Abstract Objective:** To investigate the effect and mechanisms of the PTX on the human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE2. **Method:** Cells from CNE2 were cultured in vitro and the cells at logarithmic growth phase were processed with different concentration of PTX(0, 5, 10, 20) mol/L for 72h. MTT was used to evaluate the proliferation and flow cytometric analysis was utilized to detect membrane potential and apoptosis of CNE2 cells. The expression of PI3K, p-AKT, AKT, p53, p21, Caspase3, Cleavage-Caspase3, PARP, Cleavage-PARP, AIF, CytC, Bcl-2 and Bax in CNE2 cells were examined by Western Blot. **Result:** The results showed that PTX could increase the apoptosis and the expression of Caspase3, PARP, CytC, AIF and Bax and reduce the proliferation, membrane potential and the expression of PI3K, p-AKT, p53, p21, Cleavage-PARP, Cleavage-Caspase3 and Bcl-2 in CNE2 cell in a concentration-dependent manner. However, PTX had no effect on the expression of AKT. **Conclusion:** PTX can promote apoptosis and growth inhibition of human nasopharyngeal cancer cell line CNE2 and the mechanism involves suppressing PI3K/AKT/p53 signaling pathway.

**Key words** nasopharyngeal neoplasms; pacilitaxel; proliferation; apoptosis

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)好发于我国南方和东南亚地区<sup>[1-3]</sup>。目前治疗以放疗为主,放疗可使鼻咽癌局部控制率达到 90%以上,但鼻咽癌远处迁徙率未达到控制,5 年生存率只有 70%~80%,尤其是对于中晚期鼻咽癌患者,其 5 年生存率只有 40%。因此,寻找新的抗癌药物至关重要<sup>[1-3]</sup>。紫杉醇(pacilitaxel, PTX)是临床上广泛用于治疗肿瘤的一种生物碱类化疗药物,已被广泛应用于胶质瘤、乳腺癌、肝癌等,但对鼻咽癌的作用尚不清楚<sup>[4-8]</sup>。因此本研究以人鼻咽癌细胞株 CNE2 为靶细胞,探讨 PTX 对人鼻咽癌细胞株

CNE2 的作用及其机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药品与试剂

人鼻咽癌细胞株 CNE2(购于 ATCC), PTX (Sigma, USA)经 HPLC 鉴定纯度超过 99%; MTT 试剂盒(碧云天,中国), Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(凯基,中国); RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司);小牛血清(杭州四季青公司); 12 孔培养板(美国 Falcon 公司);  $\beta$ -actin (Abmart, china), Bcl-2 抗体(Santa Cruz, CA), Bax(Santa Cruz, CA), PARP(CST, USA), Cleavage-PARP (CST, USA), Caspase3(Santa Cruz, CA), Cleavage-Caspase3 (Santa Cruz, CA), PI3K (CST,

<sup>1</sup>淄博市淄博区人民医院耳鼻咽喉科(山东淄博, 255000)  
通信作者:李涛, E-mail: 870772422@qq.com

USA), AKT(CST, USA), p-AKT(CST, USA), CytC(CST, USA), p53(CST, USA), p21(CST, USA)。蛋白裂解液 RIPA(碧云天), 蛋白酶抑制剂 cocktail 及 Western Blot 凝胶制备试剂盒(武汉谷歌生物公司), BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天)。

## 1.2 细胞培养

人鼻咽癌细胞株 CNE2, 置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640, 细胞培养于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 加入浓度含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 生长至占据 75%~85% 培养瓶面积时用胰蛋白酶消化传代。

## 1.3 细胞增殖实验

取对数生长期 CNE2 细胞, 接种于 96 孔培养板, 每孔  $1 \times 10^4$ , 共 100  $\mu$ l, 每组 3 孔, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。将实验分为正常对照组、不同浓度(5、10、20 mol/L) PTX 刺激组。细胞在药物作用 72 h 后, 每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 20  $\mu$ l, 放入孵箱继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加入 200  $\mu$ l DMSO, 在振荡器上轻微避光震荡 10 min 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上于 570 nm 波长下测定各孔吸光度值, 以不加细胞的空白组为 0。细胞增殖率 = (PTX 组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)  $\times$  100%。

## 1.4 CNE2 细胞凋亡测定

收集不同浓度 PTX 干预 72 h 后的细胞, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入 1 ml  $1 \times$  Annexin V 结合缓冲液, 离心去上清液, 再加入 200  $\mu$ l 结合缓冲液重悬细胞, 然后分别加入 10  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l 碘化吡啶(PI), 室温避光孵育 20 min 后, 行流式细胞仪检测。

## 1.5 流式细胞术检测线粒体膜电位

取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中, 调整密度为  $1 \times 10^4$ /ml。细胞培养 48 h 后, 收集各组所有悬浮细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^4$ /ml, 每孔 100  $\mu$ l, 将实验分为正常对照组、不同浓度(5、10、20 mol/L) PTX 刺激组。细胞在药物作用 72 h 后收集各组细胞悬液, PBS 洗涤, 弃上清液, 1 mmol/L Fluo-3, 1 mmol/L rhodamine 123, 37℃ 孵育 20 min, PBS 洗涤, 重悬, 流式检测。

## 1.6 Western Blot 检测

收集正常对照组、不同浓度(5、10、20 mol/L) PTX 刺激组的细胞在药物作用 72 h 后, PBS 洗涤 3 次; 加入 450  $\mu$ l 细胞裂解液裂解细胞, 行 SDS-PAGE 蛋白电泳; 在电泳结束后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 加入稀释好的各种一抗, 4℃ 孵育过夜, 孵育结束后用 TBST 洗膜 3 次, 然后加入辣根酶标记的二抗室温

孵育 2 h, 孵育结束后用 TBST 洗膜 3 次。ECL 化学发光液与膜孵育 3 min 后, 在暗盒内与 X 线胶片曝光, 显影冲洗, 扫描仪扫描胶片。以  $\beta$ -actin 作为内参。

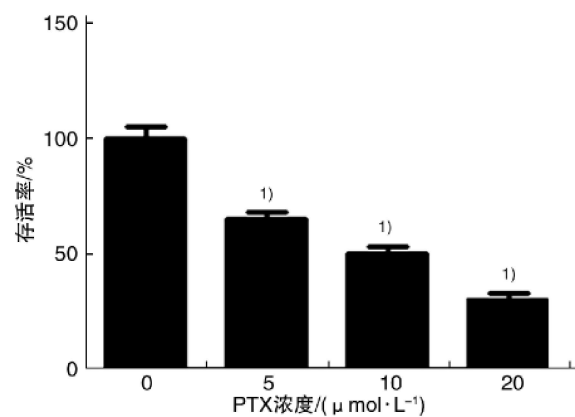
## 1.7 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件包进行资料分析, 多组样本间两两比较用单因素方差分析(ANOVA), 两组样本间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PTX 对 CNE2 细胞增殖的影响

MTT 检测 PTX 对 CNE2 细胞增殖的影响, 结果如图 1 所示; 随着 PTX 浓度的增高, PTX 抑制 CNE2 细胞增殖的作用增强, 表明 PTX 可显著抑制鼻咽癌细胞增殖, 并具浓度依赖( $P < 0.05$ )。



与加入 PTX 浓度为 0 的正常对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

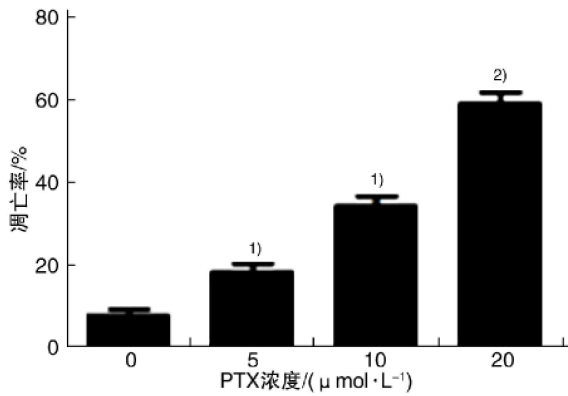
图 1 MTT 检测 PTX 对 CNE2 细胞增殖的影响

### 2.2 PTX 对 CNE2 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测 PTX 对 CNE2 细胞凋亡的影响, 不同浓度 PTX 干预细胞 72 h 后, 细胞凋亡率如图 2 所示: PTX 细胞无药物干预时, 凋亡率为  $(8 \pm 3)\%$ ; 不同浓度 PTX 干预后, 凋亡率分别为  $(16 \pm 3)\%$ 、 $(35 \pm 4)\%$  和  $(63 \pm 6)\%$ 。结果表明 PTX 可显著促进 PTX 细胞的凋亡 ( $P < 0.05$ )。PTX 可以呈浓度依赖性促进 CNE2 细胞凋亡。

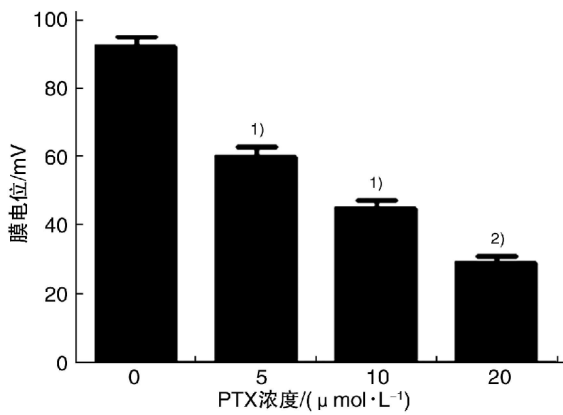
### 2.3 PTX 对 CNE2 细胞线粒体膜电位的影响

流式细胞仪检测 PTX 对 CNE2 细胞线粒体的影响, 不同浓度 PTX 干预细胞 72 h 后, 线粒体膜电位如图 3 所示: PTX 细胞无药物干预时, 膜电位为  $(92 \pm 6)$  mV; 不同浓度 PTX 干预后, 膜电位分别为  $(60 \pm 5)$  mV、 $(45 \pm 4)$  mV 和  $(29 \pm 3)$  mV。PTX 可显著降低 CNE2 细胞膜电位 ( $P < 0.05$ )。表明 PTX 可以呈浓度依赖性降低 CNE2 细胞膜电位。



与加入 PTX 浓度为 0 的正常对照组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

图 2 流式检测 PTX 对 CNE2 细胞凋亡的影响



与加入 PTX 浓度为 0 的正常对照组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

图 3 流式检测 PTX 对 CNE2 细胞膜电位的影响

### 2.4 PTX 对 PI3K/AKT/p53 信号通路的影响

Western Blot 检测 PTX 对 PI3K/AKT/p53 信号通路的影响,不同浓度 PTX 干预细胞 72 h 后,蛋白表达如图 4 所示:与正常对照组相比,经不同浓度 PTX 干预后,PI3K, p-AKT, p53, p21 的表达明显增高 ( $P < 0.05$ ), AKT 表达无明显变化 ( $P > 0.05$ )。PTX 可抑制 PI3K/AKT/p53 信号通路 ( $P < 0.05$ )。表明 PTX 可以呈浓度依赖性抑制 CNE2 细胞 PI3K/AKT/p53 信号通路的激活。

### 2.5 PTX 对 CNE2 细胞 Bcl-2, Bax, Caspase3, Cleavage-Caspase3, PARP, Cleavage-PARP 和 CytC 表达的影响

Western Blot 检测 PTX 对凋亡相关蛋白的影响,不同浓度 PTX 干预细胞 72 h 后,蛋白表达如图 5 所示:与正常对照组相比,经不同浓度 PTX 干预后, Bax, Cleavage-PARP, Cleavage-Caspase3, AIF 和 CytC 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ), 而 Bcl-2, Caspase3 和 PARP 表达明显减少 ( $P < 0.05$ )。结果表明 PTX 可促进凋亡信号通路

激活。PTX 可以呈浓度依赖性促进 Bax, Cleavage-PARP, Cleavage-Caspase3, AIF 和 CytC 表达增高,而减少 Bcl-2, Caspase3 和 PARP 表达。

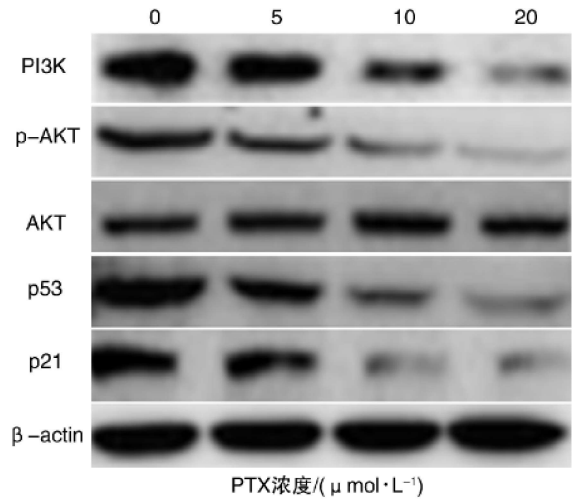


图 4 Western Blot 检测 PTX 对各组细胞 PI3K, p-AKT, AKT p53 和 p21 的表达影响

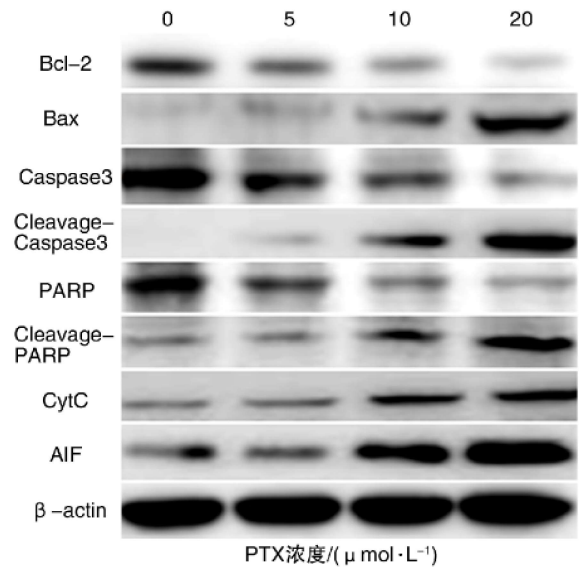


图 5 Western Blot 检测 PTX 对 CNE2 细胞 Bcl-2, Bax, Caspase3, Cleavage-Caspase3, PARP, Cleavage-PARP, AIF 和 CytC 表达的影响

### 3 讨论

鼻咽癌发病与 EBV 病毒感染、遗传易感性和接触某些化学致癌物相关。目前主要以放疗和化疗为主,虽然获得了较好的缓解率,但仍存在严重的毒副作用、局部复发和远处转移等情况,远期效果仍不甚理想,5 年生存率为 70%~80%。因此有必要寻找高效低毒的抗鼻咽癌药物<sup>[1-3]</sup>。

PTX 是从短叶红豆杉的树皮中提取分离的一种三环二萜类化合物,能显著抑制神经胶质瘤和肝

癌细胞生长,具有抗肿瘤多药耐药性<sup>[4-7]</sup>,但在抗鼻咽癌方面未见详细报道。

本研究中我们利用不同浓度的 PTX 处理人鼻咽癌细胞株 CNE2 72 h,实验结果显示 PTX 可以呈浓度依赖性诱导 CNE2 增殖抑制和促进 CNE2 细胞凋亡,增加 Caspase3 和 PARP 表达,下调 Cleavage-PARP 和 Cleavage-Caspase3 表达,证实 PTX 具有抑制 CNE2 细胞增殖和促进 CNE2 细胞凋亡的活性,进一步证实了 PTX 具有抗肿瘤的活性<sup>[9-10]</sup>。但其具体机制不明。

既往研究发现线粒体在细胞凋亡过程中起着重要作用,线粒体膜电位与线粒体内膜通透性呈负相关,而线粒体内膜通透性则取决于线粒体内外膜之间由多个蛋白质组成的通透转运孔道-线粒体膜通透性转运孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)开放,MPIP 开放越多,线粒体内膜通透性越高,导致线粒体膜电位崩解下降的越快<sup>[10-11]</sup>。而线粒体膜电位的崩解将导致位于线粒体膜间隙之间的细胞色素 C(CytC)、钙离子、凋亡诱导因子(AIF)等多种促凋亡因子释放,从而促进凋亡信号通路的激活,进而增加促凋亡蛋白的表达<sup>[9]</sup>。在实验中我们发现 PTX 可以呈浓度依赖性降低细胞膜电位和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,而增加 CytC、AIF 和促凋亡蛋白 Bax 的表达。因此我们推测 PTX 可通过促进 MPTP 的开放,增高线粒体内膜通透性,下调细胞膜电位,引发线粒体的崩解,使位于线粒体间隙的 CytC 和 AIF 增加,进而引发凋亡信号通路的广泛激活。但 PTX 增加 MPTP 开放的具体机制不清楚。既往研究发现 PI3K/AKT/p53 信号途径与 MPTP 的开放密切相关<sup>[12]</sup>,而 PTX 可调控 PI3K/AKT 信号途径<sup>[13]</sup>。

实验结果显示 PTX 可以呈浓度依赖性促进 PI3K 降解,下调 p-AKT、p53 和 p21 表达,但对 AKT 表达无明显影响。因此我们推测 PTX 可通过抑制 PI3K/AKT/p53 信号通路而增加 MPTP 的开放。

综上所述,PTX 可通过抑制 PI3K/AKT/p53 信号通路抑制 CNE2 细胞增殖和促进 CNE2 细胞凋亡,从而具有抗鼻咽癌的活性。但是 PTX 是直接作用于 PI3K 信号分子还是通过调节其上游激酶和(或)信号分子而间接发挥作用仍不清楚,除 PI3K/AKT 信号通路外,是否还有其他信号通路涉及 PTX 诱导 CNE 细胞增殖抑制和凋亡尚需更深入的研究。

#### 参考文献

[1] KAMRAN S C, RIAZ N, LEE N. Nasopharyngeal

carcinoma[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2015, 24: 547-561.

- [2] PETERSSON F. Nasopharyngeal carcinoma: a review[J]. Semin Diagn Pathol, 2015,32:54-73.
- [3] 刘超,李果,刘勇,等. miRNA-324-3p 及其靶基因 WNT2B 在鼻咽癌组织中的表达及临床意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 28(21): 1676-1684.
- [4] ONISHI Y, ESHITA Y, JI R C, et al. Anticancer efficacy of a supramolecular complex of a 2-diethylaminoethyl-dextran-MMA graft copolymer and paclitaxel used as an artificial enzyme[J]. Beilstein J Nanotechnol, 2014, 5: 2293-2307.
- [5] LI Y, ZHANG G, PFEIFER B A. Current and emerging options for taxol production[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2015, 148: 405-425.
- [6] GOEL A, AGGARWAL B B. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs[J]. Nutr Cancer, 2010, 62: 919-930.
- [7] 孔建强,王伟,朱平,等. 紫杉醇生物合成的研究进展[J]. 药学学报, 2007, 42(4): 358-365.
- [8] GANDHI S, FLETCHER G G, EISEN A, et al. Adjuvant chemotherapy for early female breast cancer: a systematic review of the evidence for the 2014 Cancer Care Ontario systemic therapy guideline[J]. Curr Oncol, 2015, 22(Suppl 1): S82-94.
- [9] SHAN X, LI Y, MENG X, et al. Curcumin and (-)-epigallocatechin-3-gallate attenuate acrylamide-induced proliferation in HepG2 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 66: 194-202.
- [10] JUHASZOVA M, ZOROV D B, KIM S H, et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore[J]. J Clin Invest, 2004, 113: 1535-1549.
- [11] WEISS J N, KORGE P, HONDA H M, et al. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease[J]. Circ Res, 2003, 93: 292-301.
- [12] JIE B, ZHANG X, WU X, et al. Neuregulin-1 suppresses cardiomyocyte apoptosis by activating PI3K/Akt and inhibiting mitochondrial permeability transition pore[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 370: 35-43.
- [13] YING L, ZHU Z, XU Z, et al. Cancer Associated Fibroblast-Derived Hepatocyte Growth Factor Inhibits the Paclitaxel-Induced Apoptosis of Lung Cancer A549 Cells by Up-Regulating the PI3K/Akt and GRP78 Signaling on a Microfluidic Platform[J]. PLoS One, 2015, 10: e0129593.

(收稿日期: 2015-09-23)