

双氢青蒿素对下咽癌 Fadu 细胞凋亡的影响*

贾立峰^{1△} 李晓明¹ 申宇鹏¹ 路秀英¹

[摘要] 目的:探讨双氢青蒿素(DHA)对下咽癌 Fadu 细胞凋亡的影响。方法:用不同浓度 DHA 干预下咽癌 Fadu 细胞,观察 DHA 对细胞形态的影响;分别于 24 h 或 48 h 后用 MTT 法检测细胞增殖的变化并计算 IC₅₀ 值。用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒分析 DHA 对 Fadu 细胞凋亡的影响。用 Western Blot 法测定 DHA 对 Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1、Bax 和 C-PARP 凋亡相关基因的影响。结果:一定浓度的 DHA 可显著改变细胞的形态学变化,抑制下咽癌 Fadu 细胞增殖且明显增加凋亡细胞的数量,该变化与干预浓度和时间呈依赖关系。进一步研究结果提示,DHA 可显著抑制 Bcl-2、Bcl-xl 和 Mcl-1 抗凋亡蛋白的表达,同时增加促凋亡蛋白 Bax 和 C-PARP 的表达。结论:DHA 可显著抑制下咽鳞状细胞癌 Fadu 细胞的增殖,并明显增加细胞的凋亡,其机制与 DHA 调控 Bcl-2 家族密切相关。提示,Bcl-2 家族成员在 DHA 抑制下咽鳞状细胞癌 Fadu 细胞增殖的过程中发挥了重要作用。

[关键词] 双氢青蒿素;下咽肿瘤;凋亡;Bcl-2

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.21.005

[中图分类号] R739.6 **[文献标志码]** A

Effects of dihydroartemisinin on the apoptosis of Fadu cells

JIA Li feng LI Xiaoming SHEN Yu peng LU Xiu ying

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang, 050082, China)

Corresponding author: LI Xiaoming, E-mail: xmlmo@126.com

Abstract Objective: To investigate the effect of dihydroartemisinin (DHA) on the apoptosis of Fadu cells. **Method:** Fadu cells were treated with DMSO or different doses of DHA for 24 or 48 h. After that, IC₅₀ values of DHA were calculated based on the cell viability tested via MTT assay, the cell morphology was observed, the percentage of apoptotic cells was analyzed with the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, and some important regulators of apoptosis, such as Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bax, and C-PARP were determined by Western blotting. **Result:** Certain doses of DHA significantly inhibited the proliferation and induced apoptosis of Fadu cells in a dose & time-dependent manners. DHA also downregulated the expression of antiapoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xl, and Mcl-1) and upregulated the expression of proapoptotic proteins (Bax and C-PARP). **Conclusion:** DHA remarkably inhibited proliferation and induction of apoptosis in Fadu cells via affecting proteins of Bcl-2 family. DHA may be a promising drug to treat hypopharyngeal carcinoma.

Key words dihydroartemisinin; hypopharyngeal neoplasms; apoptosis; Bcl-2

双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)是抗疟中药青蒿素的重要衍生物和主要活性成分。提到 DHA,就必须提及我国第一位获得诺贝尔生理学奖的科学家——屠呦呦教授,其获奖理由恰恰是创制青蒿素和 DHA,这 2 种新型抗疟药物挽救了全球数百万人的生命。DHA 已被 WHO 推荐为最佳抗疟药物之一。近年的研究发现,除了抗疟,DHA 还可抑制肺癌、乳腺癌、肝癌和结直肠癌等肿瘤的生长,且与多种化疗药物有协同效应^[1-7]。DHA 的特点是低毒高效,这为其成为一种新型化疗药物打下了基础。

目前,DHA 对下咽癌的影响还不清楚。基于

此,本实验用 DHA 干预下咽癌 Fadu 细胞,观察凋亡指标的变化并探讨其可能机制,为 DHA 能否用于头颈部恶性肿瘤的化疗提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂和细胞

DMEM 培养液和胎牛血清分别购自美国 Gibico 公司和以色列 BI 公司。DHA 购自日本东京的 TCI 公司。Bcl-x2、Bcl-xl、Mcl-1、Bax 和 Cleaved-PARP(C-PARP)抗体均购自美国 CST 公司。MTT 和 ECL 发光液分别来源于美国的 Sigma 公司和 GE Amersham 公司。AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒为美国 BD 公司产品。人下咽癌 Fadu 细胞购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所,用含 10% 胎牛血清和 1×10⁵ U/L 青链霉素的 DMEM 培养液于 5% CO₂、37℃ 饱和湿度的培养箱中培养。

* 基金项目:河北省应用基础研究计划重点基础研究项目

¹ 白求恩国际和平医院耳鼻咽喉头颈外科(石家庄,050082)

[△] 现在解放军 93498 部队卫生队

通信作者:李晓明,E-mail:xmlmo@126.com

1.2 Fadu 细胞形态学观察

消化对数生长期 Fadu 细胞,计数后以 $4 \times 10^5/2$ ml 细胞密度接种到 6 孔培养板中,待细胞贴壁后加入现配制的 DHA(干预剂量为 0、80、160 和 $320 \mu\text{mol/L}$)干预 24 h。采用倒置显微镜观察肿瘤细胞形态的变化。

1.3 MTT 法观察 DHA 对 Fadu 细胞增殖的抑制作用

对数生长期 Fadu 细胞消化计数后以 $1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ 接种到 96 孔板中,细胞贴壁后加入现配制的 DHA(浓度为 0、2.5、5、10、20、40、80 和 $160 \mu\text{mol/L}$)干预。培养 24 h 或 48 h 后加入 MTT,细胞培养箱反应 4 h。而后加入 DMSO,用酶标仪检测细胞活力情况。抑制率 = $1 - \text{加药组 A 值} / \text{对照组 A 值} \times 100\%$ 。

1.4 AnnexinV-FITC 检测 Fadu 细胞的凋亡

消化对数生长期 Fadu 细胞,计数后以 $4 \times 10^5/2$ ml 细胞密度接种到 6 孔培养板中,待细胞贴壁后加入现配制的 DHA(浓度为 0、20、40 和 $80 \mu\text{mol/L}$)。干预 24 h 后根据 AnnexinV-FITC 试剂盒说明书步骤检测细胞凋亡情况。

1.5 Western Blot 检测相关蛋白的表达

细胞用不同浓度 DHA(浓度为 0、20、40、80 和 $160 \mu\text{mol/L}$)处理 24 h 后,加入裂解液裂解细胞。采用 BCA 法定量蛋白浓度,而后进行蛋白变性。配制分离胶和浓缩胶,蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。结束后将分离胶上的蛋白转至 PVDF 膜。用含一抗的脱脂奶粉孵育 4°C 过夜。次日孵育二抗,ECL 方法显影。

1.6 统计学处理

所有实验重复 3 次,数据用 SPSS 21.0 软件统计分析, IC_{50} 和直方图用 GraphPad Prism(6.0)软件计算操作,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间比较用 Student's *T* 检验,多组间比较用 one way ANOVA

检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHA 对 Fadu 细胞形态的影响

不同剂量 DHA 干预 Fadu 细胞 24 h 后细胞形态学变化见图 1。对照组细胞生长均匀密集,融合好,细胞形态清楚,伸展性和折光性好,细胞质透亮,核仁清楚,贴壁生长良好,死细胞很少或没有。DHA 干预组,当剂量 $> 80 \mu\text{mol/L}$ 时,Fadu 细胞数量明显减少,融合差,培养液中悬浮死亡细胞较多,存活细胞贴壁差且多呈圆形,体积皱缩缩小,细胞质混浊,折光性差,局部可见大片细胞剥脱死亡。结果提示,DHA 可明显改变 Fadu 细胞的形态,抑制细胞生长,这种变化与药物剂量呈依赖关系。

2.2 DHA 对 Fadu 细胞增殖的影响

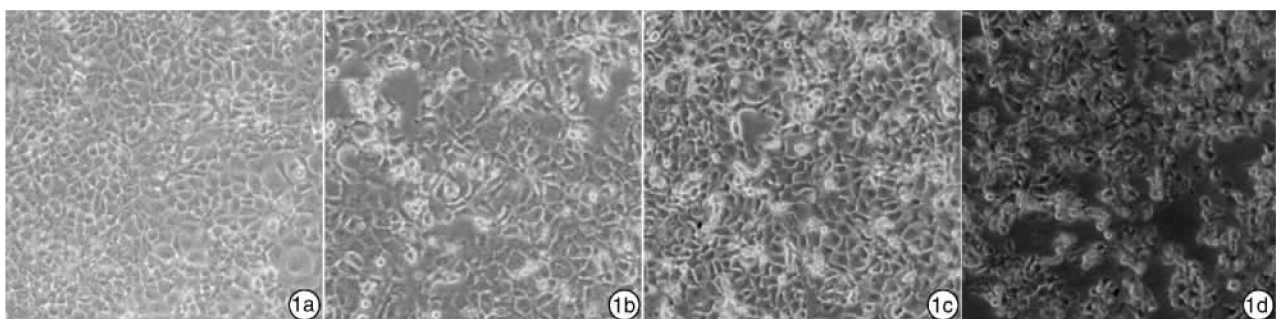
MTT 方法检测 DHA 对 Fadu 细胞干预 24 h 和 48 h 后的增殖抑制情况并计算相应的 IC_{50} 值。结果如图 2 所示,DHA 显著抑制 Fadu 细胞的增殖,且与药物剂量及干预时间呈依赖关系。DHA 对 Fadu 细胞干预 24 h 和 48 h 时的 IC_{50} 值分别为 $85.4 \mu\text{mol/L}$ 和 $25.7 \mu\text{mol/L}$ 。

2.3 DHA 对 Fadu 细胞凋亡的影响

DHA 干预 24 h 后细胞凋亡数量明显增加,Fadu 细胞的凋亡比例增至 $55\% \sim 65\%$,而对照组凋亡细胞比例只有 $2\% \sim 3\%$ 。统计学分析显示,当 DHA 干预浓度 $> 20 \mu\text{mol/L}$ 时,Fadu 细胞凋亡即显著增多($P < 0.01$,图 3)。DHA 剂量越高,凋亡细胞数量越多,说明 DHA 诱导癌细胞凋亡的作用与药物剂量呈依赖关系。

2.4 DHA 对 Fadu 细胞相关凋亡蛋白的影响

为进一步明确 DHA 抑制下咽癌细胞增殖的机制,本实验用 Western Blot 法分析了与凋亡密切相关的 Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1、Bax 和 C-PARP 蛋白表达情况。DHA($20、40、80$ 和 $160 \mu\text{mol/L}$)干预 24 h 后,Fadu 细胞中 Bcl-2、Bcl-xl 和 Mcl-1 蛋白的



1a: DHA 浓度为 0; 1b: DHA 浓度为 $80 \mu\text{mol/L}$; 1c: DHA 浓度为 $160 \mu\text{mol/L}$; 1d: DHA 浓度为 $320 \mu\text{mol/L}$ 。

图 1 不同剂量 DHA 对 Fadu 细胞形态的影响

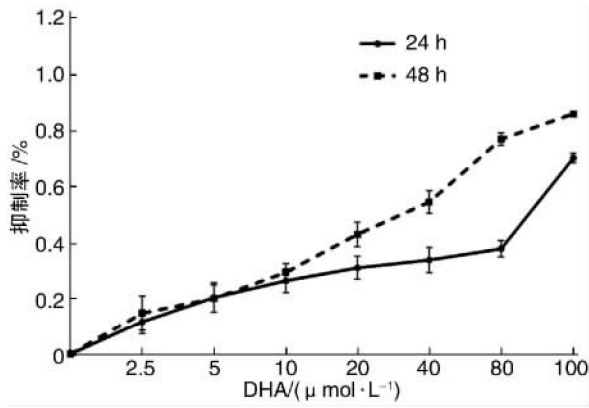


图 2 不同剂量 DHA 对 Fadu 细胞增殖的影响

表达随着浓度增加而降低,而 Bax 和 C-PARP 蛋白则随 DHA 浓度的增加而增多,这些蛋白与 DHA 剂量均呈依赖关系,对照组则未见明显变化(图 4)。以上结果提示,DHA 诱导癌细胞凋亡不仅与 Bcl-2、Bcl-x1 和 Mcl-1 蛋白表达下降紧密联系,而且与 Bax 和 C-PARP 蛋白表达增多关系密切。

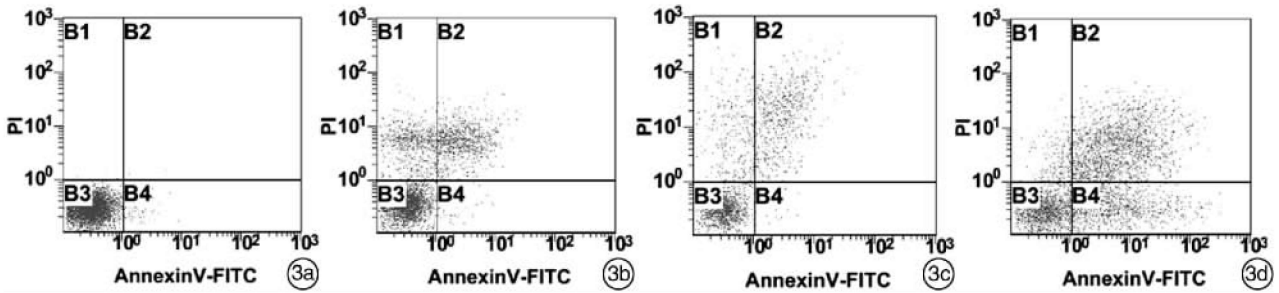
3 讨论

下咽癌占头颈恶性肿瘤的 2%~6%^[8-9],其中 95%以上是鳞状细胞癌,本实验中的 Fadu 细胞也是一种鳞状细胞癌细胞。研究发现,有接近 75%~80%的下咽癌患者在诊断时已有局部侵袭和淋巴结转移,为 III/IV 期^[10]。根据 AJCC 的 TNM 分期系统,III/IV 患者已有淋巴结转移。这些患者由于

远处转移和治疗后复发等原因,预后较差,亟待新的治疗药物和策略以改善其远期存活率。当前,DHA 对头颈部恶性肿瘤细胞凋亡影响的研究相对较少^[11],故将其作为研究内容有助于了解该药物对头颈肿瘤的作用及机制。

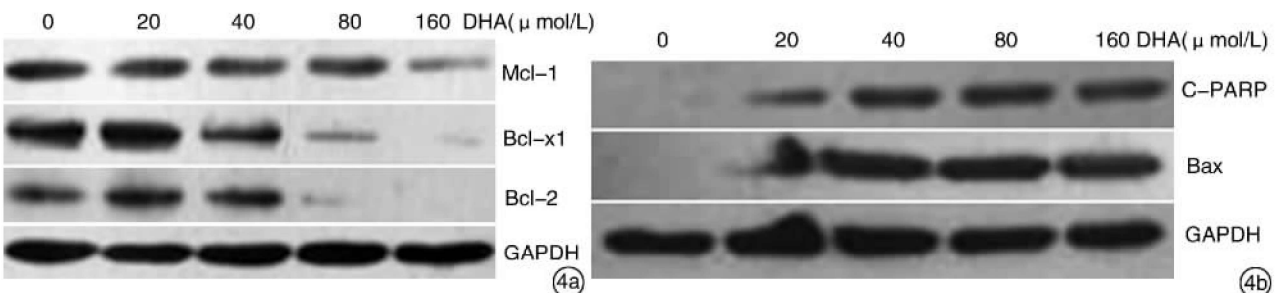
Bcl-2 家族可分为促凋亡和抗凋亡 2 大类,Bcl-2、Bcl-x1、Mcl-1 和 Bcl-w 属于抗凋亡基因成员,能通过调节线粒体膜的通透性和稳定跨膜电位等途径避免凋亡发生;Bax、Bad、Bak 和 Bid 则属于促凋亡成员,其作用是抑制抗凋亡基因促进凋亡,这 2 类成员互相调控存活(凋亡),掌握着细胞的“生杀大权”。PARP 大部分位于细胞核内,它的激活被认为是 Caspase-3 活化的标志。激活的 PARP 能修复受损的 DNA,但当 DNA 损伤严重则促进细胞凋亡。

当前,尽管有部分学者对 DHA 诱导肿瘤细胞凋亡进行了实验研究,但其具体机制仍不清楚,且 Bcl-2 家族在 DHA 抑制癌细胞过程中扮演的角色也不明确^[12-13]。Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族抗凋亡和促凋亡基因中最具代表性的成员,两者作用相反并互相制约,其比值已成为评估肿瘤细胞存活(凋亡)的重要指标^[14-15],比值增大趋向存活,比值减小则促进凋亡。此外,许多恶性肿瘤中 Mcl-1 和 Bcl-x1 都高表达,是 Bax 等促凋亡基因的重要抑制蛋白^[16]。本研究发现,一定剂量的 DHA 可显著抑制 Bcl-2 而增加 Bax,使两者比例减小;同时,DHA 还



3a,3b,3c,3d: DHA 的浓度分别为 0、20、40、80 μmol/L。

图 3 不同剂量 DHA 对 Fadu 细胞凋亡的影响



4a:对 Mcl-1、Bcl-x1 及 Bcl-2 蛋白表达的影响;4b:对 C-PARP 和 Bax 蛋白表达的影响。

图 4 不同剂量 DHA 对凋亡相关蛋白表达的影响

可下调 Mcl-1、Bcl-xl 的表达并上调 PARP 的表达, 这些变化均可抑制 Fadu 细胞增殖分化、诱导细胞趋于凋亡, 导致死亡和凋亡细胞增多, 最终改变细胞形态。因此, 我们可以推断 DHA 诱导 Fadu 细胞凋亡的机制很可能与 Bcl-2/Bax 比例变化、Mcl-1 和 Bcl-xl 减少增多密切相关。同时, 随着剂量的增加, DHA 也能导致 Fadu 细胞的 DNA 严重损伤, 而这已经超出了 PARP 对 DNA 的修复范围则促进细胞凋亡。这与前期的研究结论基本一致^[14, 17-18]。

综上, 一定剂量的 DHA 干预下咽癌 Fadu 细胞后, 肿瘤细胞增殖明显受到抑制, 存活细胞显著减少且状态较差; DHA 还可诱导细胞凋亡, 明显增加早期和晚期凋亡细胞的数量。从分子蛋白水平上, 我们证实了 DHA 诱导 Fadu 细胞凋亡的机制是通过下调抗凋亡基因 Bcl-2、Bcl-xl 和 Mcl-1, 并伴随上调促凋亡 Bax 和 PARP 蛋白表达实现的。由于调控 Bcl-2 家族和 PARP 蛋白的信号通路众多, 都有哪些信号通路参与了 DHA 诱导 Fadu 细胞的过程, 值得我们继续思考和研究。

参考文献

- [1] MI Y J, GENG G J, ZOU Z Z, et al. Dihydroartemisinin inhibits glucose uptake and cooperates with glycolysis inhibitor to induce apoptosis in non-small cell lung carcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0120426–e0120426.
- [2] LUCIBELLO M, ADANTI S, ANTELM E, et al. Phospho-TCTP as a therapeutic target of Dihydroartemisinin for aggressive breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6:5275–5291.
- [3] ZHANG C Z, ZHANG H, YUN J, et al. Dihydroartemisinin exhibits antitumor activity toward hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83:1278–1289.
- [4] ZHAO X, ZHONG H, WANG R, et al. Dihydroartemisinin and its derivative induce apoptosis in acute myeloid leukemia through Noxa-mediated pathway requiring iron and endoperoxide moiety [J]. *Oncotarget*, 2015, 6:5582–5596.
- [5] JIA G, KONG R, MA Z B, et al. The activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase is required for dihydroartemisinin-induced autophagy in pancreatic cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33:8–12.
- [6] ZHANG Z S, WANG J, SHEN Y B, et al. Dihydroartemisinin increases temozolomide efficacy in glioma cells by inducing autophagy [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10:379–383.
- [7] ZHAO C, GAO W, CHEN T. Synergistic induction of apoptosis in A549 cells by dihydroartemisinin and gemcitabine [J]. *Apoptosis*, 2014, 19:668–681.
- [8] TAKES R P, STROJAN P, SILVER C E, et al. Current trends in initial management of hypopharyngeal cancer: the declining use of open surgery [J]. *Head Neck*, 2012, 34:270–281.
- [9] LIGIER K, BELOT A, LAUNOY G, et al. Descriptive epidemiology of upper aerodigestive tract cancers in France: incidence over 1980–2005 and projection to 2010 [J]. *Oral Oncol*, 2011, 47:302–307.
- [10] PFISTER D G, ANG K K, BRIZEL D M, et al. National comprehensive cancer network clinical practice guidelines in oncology head and neck cancers [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2011, 9:596–650.
- [11] 黄振河, 张月飞, 蒋东辉, 等. 双氢青蒿素诱导鼻咽癌 CNE-2 细胞凋亡及其机制 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2013, 27(13):717–720.
- [12] GAO X, LUO Z, XIANG T, et al. Dihydroartemisinin induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in HepG2 human hepatoma cells [J]. *Tumori*, 2011, 97:771–780.
- [13] HANDRICK R, ONTIKATZE T, BAUER K D, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis by a Bak-dependent intrinsic pathway [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9:2497–2510.
- [14] CHEN T, LI M, ZHANG R, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13:1358–1370.
- [15] LU C X, NAN K J, NIE Y L, et al. Delisheng, a Chinese medicinal compound, exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HepG2 cells through extrinsic and intrinsic pathways [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37:3407–3412.
- [16] KANG M H, REYNOLDS C P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15:1126–1132.
- [17] GAO N, BUDHRAJA A, CHENG S, et al. Interruption of the MEK/ERK signaling cascade promotes dihydroartemisinin-induced apoptosis in vitro and in vivo [J]. *Apoptosis*, 2011, 16:511–523.
- [18] ZHOU H J, WANG Z, LI A. Dihydroartemisinin induces apoptosis in human leukemia cells HL60 via downregulation of transferrin receptor expression [J]. *Anticancer Drugs*, 2008, 19:247–255.

(收稿日期:2016-01-12)