

烟酰胺对鼻咽癌 CNE-1 细胞增殖、凋亡与迁移作用机制研究

杨亚利, 张声源, 潘增烽, 陈欢珠, 姚前尹

摘要 目的 探讨烟酰胺对人鼻咽癌 CNE-1 细胞增殖、凋亡及迁移的影响和机制。方法 将人鼻咽癌 CNE-1 细胞株分为烟酰胺处理组(10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 烟酰胺)及对照组。CCK-8 法检测不同浓度烟酰胺作用 48、72 h 后 CNE-1 细胞增殖率, Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测 40 $\mu\text{mol/L}$ 烟酰胺作用 48 h 后 CNE-1 细胞凋亡率和细胞周期, Transwell 小室实验检测 CNE-1 细胞迁移及侵袭能力的变化, 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测 CNE-1 细胞中 p53 蛋白和基质金属蛋白酶 9(MMP-9) mRNA 和蛋白水平。结果 与对照组相比, CCK-8 法检测结果显示, 烟酰胺处理组 CNE-1 细胞增殖抑制率升高($P < 0.01$), 且随着烟酰胺处理浓度的升高和处理时间的延长而升高, 呈浓度和时间依赖性; 40 $\mu\text{mol/L}$ 烟酰胺处理 CNE-1 细胞 48 h(即 40 $\mu\text{mol/L}$ 实验组)后, CNE-1 细胞凋亡率升高($P < 0.01$); 40 $\mu\text{mol/L}$ 实验组 G_2/M 期细胞比例增加, G_0/G_1 期细胞比例降低($P < 0.05$); CNE-1 细胞经 40 $\mu\text{mol/L}$ 烟酰胺处理后其侵袭及迁移能力均下降($P < 0.01$); 40 $\mu\text{mol/L}$ 实验组 p53 蛋白表达水平升高, MMP-9 蛋白表达水平下降。结论 烟酰胺可通过上调 p53 蛋白的表达、恢复细胞周期从而抑制人鼻咽癌 CNE-1 细胞增殖, 促进其凋亡, 同时亦可影响 MMP-9 蛋白的表达进而降低 CNE-1 细胞迁移和侵袭能力。

关键词 烟酰胺; CNE-1 细胞; 增殖; 凋亡; 迁移

中图分类号 R 453.3; R 739.6; R 977.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)03-0418-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.016

鼻咽癌是一种常见的头颈部恶性肿瘤, 具有高复发和高转移性, 主要分布在中国华南地区、东南亚和北非等区域^[1]。由于早期鼻咽癌患者症状的非特异性, 临床上预测鼻咽癌发展的准确性不高。故研究鼻咽癌发生发展的分子机制, 寻找用于鼻咽癌早期诊断及预后评估的分子标志物和安全有效的治疗药物有重要的临床意义。烟酰胺, 又称维生素 PP, 具有加强 DNA 修复并参与能量代谢及肿瘤预

防与治疗的作用^[2-4]。口服大剂量烟酰胺可增强鼻咽癌的放疗疗效^[5], 但其是否通过影响鼻咽癌细胞生长来增强疗效的分子机制需进一步确认。该研究以人鼻咽癌细胞 CNE-1 为研究对象, 探讨烟酰胺对人鼻咽癌 CNE-1 细胞增殖、凋亡、周期和迁移能力的影响及其相关作用机制, 旨在为其临床应用提供更多理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与主要试剂 人鼻咽癌 CNE-1 细胞购于中国科学院典型培养物保藏委员会上海细胞库。烟酰胺, 纯度 > 99%, 货号: YZ-1001 15-100 mg, 品牌: 中检所。RPMI-1640 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司); 青-链霉素(北京索莱宝公司); CCK-8 试剂盒(日本同仁公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(北京全式金生物公司); 细胞周期检测试剂盒(南京凯基生物公司); Transwell 细胞培养板(货号: 353097)和 matrigel 胶(货号: 356234)(美国 Becton, Dickinson and Company 公司); p53 和 MMP-9 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司)。

1.2 主要仪器 IX70 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); Tecan Infinite 200 全自动酶标仪(瑞士 TE-CAN 公司); 流式细胞仪(美国 Becton, Dickinson and Company 公司); 电泳仪、转膜电泳槽(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 人鼻咽癌细胞 CNE-1 细胞培养 人鼻咽癌细胞 CNE-1 用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 隔天换培养液。待细胞长成致密单层后, 以 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期的人鼻咽癌 CNE-1 细胞用于后续实验。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率 取对数生长期的人鼻咽癌 CNE-1 细胞, 调整细胞浓度为 1×10^4 个/ml, 加入 96 孔板中, 每孔 100 μl 。待细胞贴壁后弃去培养液, 分为对照组和烟酰胺处理组, 烟酰胺处理组加入烟酰胺至终浓度为 10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$,

2020-10-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81703662); 广东省医学科学技术研究基金(编号: A2017541)

作者单位: 嘉应学院医学院分子生物学中心实验室 梅州 514031

作者简介: 杨亚利, 女, 讲师;

姚前尹, 男, 副教授, 责任作者, E-mail: gdmzyqy@163.com

对照组则加入等体积不含药物的完全培养基。培养 48 h 和 72 h 后,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μ l,培养 2 h 后,450 nm 测定各孔的吸光度(optical density, OD)值,计算细胞增殖抑制率,抑制率=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值 $\times$ 100%,实验重复 3 次,取平均值。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞周期及凋亡 收集对照组细胞和 40 μ mol/L 烟酰胺处理 48 h 后的 CNE-1 细胞,调整细胞密度后用预冷的 PBS 洗涤 3 次,于 295 μ l 细胞悬液中加入 5 μ l Annexin V-FITC,避光孵育 15 min,再加入碘化丙啶(PI) 5 μ l,4 $^{\circ}$ C 避光反应 5 min,用流式细胞分析仪检测细胞周期及细胞凋亡率,并计算处于 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期的细胞所占比例。

1.6 Transwell 法检测细胞的迁移和侵袭 收集对照组和 40 μ mol/L 烟酰胺处理 48 h 后的 CNE-1 细胞,调整细胞密度后加入 Transwell 小室。下室加入 600 μ l 完全培养基。上室加入相应体积无血清的细胞悬液,培养 48 h。取出小室,用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min,结晶紫染色 10 min, PBS 清洗 1 次,显微镜下观察。每个样本随机取 5 个视野计数透膜细胞并拍照,每个视野细胞计数 3 次,求出平均值。

1.7 qRT-PCR 检测 CNE-1 细胞 p53 和 MMP-9 mRNA 水平 收集对照组和 40 μ mol/L 烟酰胺处理 48 h 后的 CNE-1 细胞,提取细胞总 mRNA,反转录成 cDNA 后进行 qRT-PCR 检测。引物序列有, MMP-9 (F): 5'-GACGCCATCGCGGAGATTG-3'; MMP-9 (R): 5'-GCCACTTGTGCGCGATAAG-3'; p53 (F): 5'-CAA-GACAGAAGGGCCTGACTC-3'; p53 (R): 5'-CATCTC-CCAAACATCCCTCAC-3'; Hsa-Actin β (F): 5'-GGCAC-CCAGCACAATGAAG-3'; Hsa-Actin β (R): 5'-GGTG-TAACGCAACTAAGTCATAG-3'。

1.8 Western blot 检测 CNE-1 细胞 p53 和 MMP-9 相关蛋白表达 收集对照组和 40 μ mol/L 烟酰胺处理 48 h 后的 CNE-1 细胞,提取细胞总蛋白并进行蛋白定量检测,聚丙烯酰胺凝胶电泳及转膜,室温孵育一抗 p53、MMP-9、 β -actin(1:1 000),加相应辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000),最后经凝胶成

像系统显影,凝胶分析软件处理计算各组 p53、MMP-9 蛋白表达量。

1.9 统计学处理 用 SPSS19.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用双尾 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 烟酰胺对人鼻咽癌 CNE-1 细胞增殖的影响

人鼻咽癌 CNE-1 细胞经不同浓度(10、20、40、80 μ mol/L)烟酰胺处理作用 48、72 h 后,CNE-1 细胞增殖受到不同程度的抑制,表现为随着 OD 值逐渐降低,增殖抑制率逐渐升高,各组 CNE-1 细胞增殖抑制率随着烟酰胺浓度的升高和处理时间的延长而升高,呈浓度和时间依赖。差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。

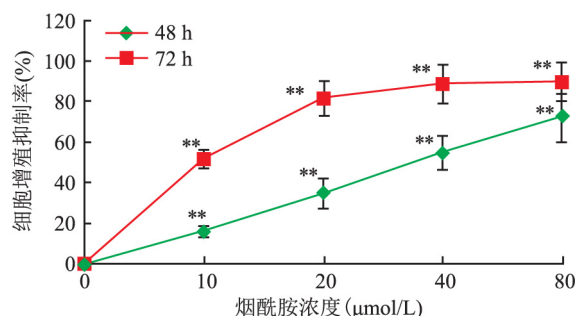


图1 烟酰胺对鼻咽癌 CNE-1 细胞增殖抑制率的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 烟酰胺对人鼻咽癌细胞 CNE-1 细胞凋亡和周期的影响 40 μ mol/L 烟酰胺处理 CNE-1 细胞 48 h 总凋亡率高于对照组(表 1,图 2A),差异有统计学意义($t = 2.78$, $P < 0.01$);与对照组相比,40 μ mol/L 烟酰胺处理组 G_0/G_1 期细胞比例降低($t = 4.30$, $P < 0.01$),S 期细胞比例无明显变化, G_2/M 期细胞比例升高($t = 2.78$, $P < 0.05$)(图 2B),表明烟酰胺能够将 CNE-1 细胞阻滞于 G_2/M 期。

2.3 烟酰胺对人鼻咽癌 CNE-1 细胞迁移和侵袭的影响 用 40 μ mol/L 烟酰胺处理 CNE-1 细胞 48 h 后,与对照组相比,40 μ mol/L 烟酰胺处理组发生迁移的透膜细胞数减少($t = 2.45$, $P < 0.01$)

表1 烟酰胺对鼻咽癌 CNE-1 细胞凋亡和周期的影响($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	总凋亡率(%)	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照	2.20 $\pm$ 0.54	29.11 $\pm$ 0.10	53.83 $\pm$ 2.91	17.08 $\pm$ 2.90
40 μ mol/L 烟酰胺处理	7.19 $\pm$ 0.41**	25.57 $\pm$ 0.51**	52.36 $\pm$ 0.58	22.06 $\pm$ 0.77*

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(图3A);同时相比于对照组 $40 \mu\text{mol/L}$ 烟酰胺处理组发生侵袭的透膜细胞数减少 ($t = 2.45$, $P <$

0.01) (图3B)。

2.4 烟酰胺对人鼻咽癌CNE-1细胞中野生型p53

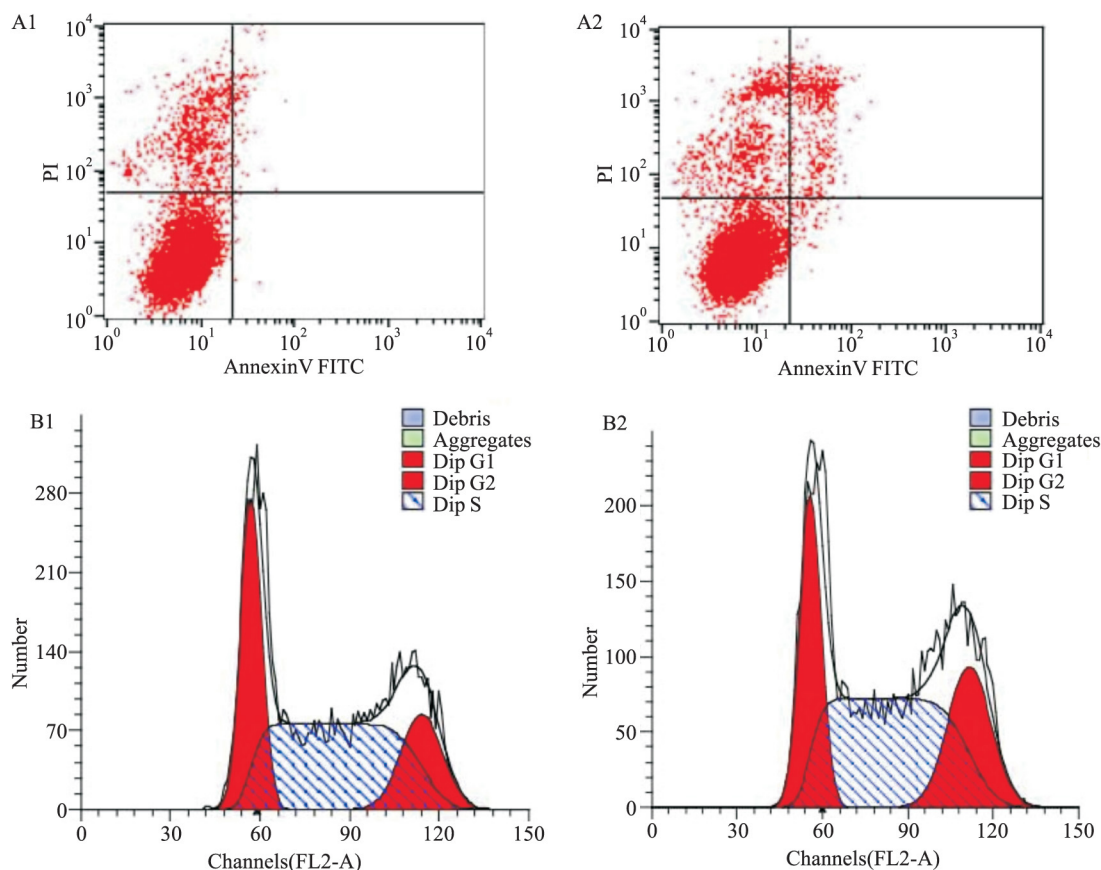


图2 烟酰胺对人鼻咽癌 CNE-1 细胞凋亡和周期的影响

A: 细胞凋亡; B: 细胞周期; 1: 对照组; 2: $40 \mu\text{mol/L}$ 烟酰胺处理组

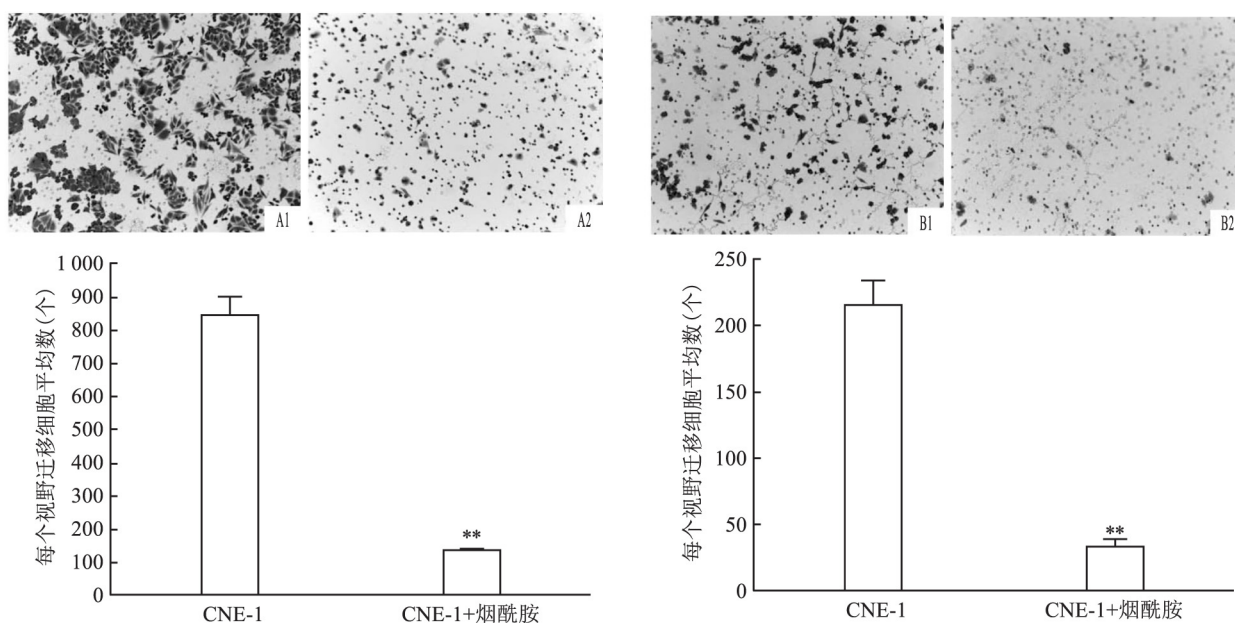


图3 烟酰胺对人鼻咽癌 CNE-1 细胞迁移和侵袭的影响 $\times 100$

A: $40 \mu\text{mol/L}$ 烟酰胺处理对 CNE-1 迁移的影响; B: $40 \mu\text{mol/L}$ 烟酰胺处理对 CNE-1 侵袭的影响; 1: 对照组; 2: $40 \mu\text{mol/L}$ 烟酰胺处理组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

和 MMP-9 表达的影响 与对照组相比 40 $\mu\text{mol/L}$ 烟酰胺处理组 p53 mRNA 相对表达量 ,p53 基因表达量升高($t = 2.30$, $P < 0.01$) ,同时 p53 蛋白表达量升高(图 4A、C);与对照组相比 40 $\mu\text{mol/L}$ 烟酰胺处理组基质金属蛋白酶 MMP-9 mRNA 相对表达量 ,MMP-9 基因表达降低($t = 2.78$, $P < 0.01$) ,同时 MMP-9 蛋白表达量降低(图 4B、D)。

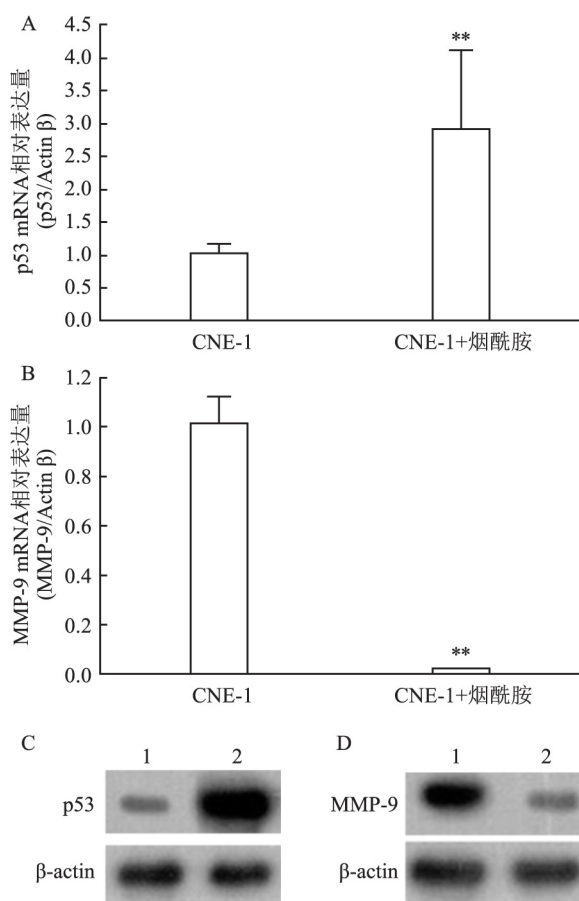


图 4 烟酰胺对人鼻咽癌 CNE-1 细胞 p53 蛋白和蛋白酶 MMP-9 表达的影响

A: 对照组和烟酰胺处理组中 p53 mRNA 相对表达量; B: 对照组和烟酰胺处理组中 MMP-9 mRNA 相对表达量; C: 对照组和烟酰胺处理组中 p53 蛋白表达量; D: 对照组和烟酰胺处理组中 MMP-9 蛋白表达量; 1: 0 $\mu\text{mol/L}$; 2: 40 $\mu\text{mol/L}$; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

鼻咽癌是一种低分化、高转移性的恶性肿瘤 ,其发病与细胞周期失调密切相关。为了进一步了解鼻咽癌发生的分子机制 ,研究人员利用基因编辑技术 ,对鼻咽癌细胞进行全基因组 CRISPR 基因敲除筛选 ,鉴定并确认与 NPC 相关的细胞因子和信号通路 ,如 MYST 组蛋白乙酰化转移酶复合体、NF- κ B 信

号通路及 p53 信号途径等^[6]。p53 是细胞中最为重要的肿瘤抑制因子之一 ,它能够响应细胞内外众多的信号刺激 ,通过引起细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡和促进 DNA 损伤修复等过程抑制肿瘤的发生发展^[7]。其在鼻咽癌及头颈部鳞癌、非小细胞癌、肺癌、膀胱癌等治疗中也有极其重要的地位^[8]。

该研究结果表明 ,人鼻咽癌 CNE-1 细胞经过烟酰胺处理后细胞增殖受到明显抑制 ,与浓度及时间具有一定相关性 ,且细胞凋亡增加。这与槲皮素通过非依赖性 Caspase 诱导 NPC 细胞凋亡的机制不同^[9] ,本研究中肿瘤抑制基因 p53 的表达量显著升高 ,表明烟酰胺可能通过调节 p53 的表达去激活或抑制 p53 相关信号通路 ,从而诱导细胞的凋亡 ,并引发细胞周期阻滞。p53 在肿瘤细胞中表达失调可加剧癌细胞的转移速率诱导 ,研究^[10]表明突变的 p53 可以通过 Wnt 信号通路参与调控中性粒细胞促进乳腺癌细胞的转移。在癌细胞迁移研究^[11-12]中 ,MMP-9 在肿瘤侵袭、肿瘤诱导的血管生成、肿瘤微环境的免疫调节以及介导转移前微环境的形成以促进肿瘤细胞的远处转移等细胞扩散过程中发挥不同作用。同时已有研究^[13]显示 MMP-1 参与鼻咽癌细胞的侵袭过程。该研究中 ,烟酰胺可以明显抑制鼻咽癌细胞迁移和侵袭的能力 ,同时鼻咽癌细胞内 MMP-9 蛋白的表达显著降低。这与野生型 p53 表达上升 ,细胞凋亡进程恢复的结果一致 ,但烟酰胺抑制鼻咽癌的具体机制有待进一步研究。

综上 ,烟酰胺可通过上升 p53 蛋白的表达 ,恢复细胞周期抑制人鼻咽癌 CNE-1 细胞增殖 ,促进其凋亡 ,同时亦可影响 MMP-9 蛋白的表达降低 CNE-1 细胞迁移和侵袭能力。

参考文献

- [1] Wei W I , Sham J S. Nasopharyngeal carcinoma [J]. Lancet , 2005 , 365(9476) : 2041 - 54.
- [2] Shen C , Dou X , Ma Y , et al. Nicotinamide protects hepatocytes against palmitate-induced lipotoxicity via SIRT1-dependent autophagy induction[J]. Nutr Res , 2017 , 40: 40 - 7.
- [3] Thompson B C , Halliday G M , Damian D L. Nicotinamide enhances repair of arsenic and ultraviolet radiation-induced DNA damage in HaCaT keratinocytes and ex vivo human skin[J]. PLoS One , 2015 , 10(2) : e117491.
- [4] Kim J Y , Lee H , Woo J , et al. Reconstruction of pathway modification induced by nicotinamide using multi-omic network analyses in triple negative breast cancer [J]. Sci Rep , 2017 , 7(1) : 3466.
- [5] 陆雪官 , 胡超苏 , 冯 炎. 烟酰胺配合放射治疗鼻咽癌的临床

- 初步研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2003(6): 442-4.
- [6] Wang C, Jiang S, Ke L, et al. Genome-wide CRISPR-based gene knockout screens reveal cellular factors and pathways essential for nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(25): 9734-45.
- [7] Chen J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016, 6(3): a026104.
- [8] 翁国庆. p53 基因与鼻咽癌关系的研究进展 [J]. *广西医学*, 2009, 31(6): 877-9.
- [9] 陈秋生, 林春燕, 何康等. 槲皮素诱导人鼻咽癌 CNE2 细胞发生 Caspase 非依赖性细胞凋亡的研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2019, 54(7): 1038-41.
- [10] Wellenstein M D, Coffelt S B, Duits D E M, et al. Loss of p53 triggers WNT-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2019, 572(7770): 538-42.
- [11] Isaacson K J, Martin J M, Subrahmanyam N B, et al. Matrix-metalloproteinases as targets for controlled delivery in cancer: An analysis of upregulation and expression [J]. *J Control Release*, 2017, 259: 62-75.
- [12] 张梅, 束军, 朱宁等. 3-溴丙酮酸对肺腺癌 A549 细胞迁移、侵袭能力及转移相关蛋白表达水平的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2019, 54(8): 1174-8.
- [13] Pang J S, Yen J H, Wu H T, et al. Gallic acid inhibited matrix invasion and AP-1/ETS-1-mediated MMP-1 transcription in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1354.

Effects and mechanism of nicotinamide on proliferation, apoptosis and migration of nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cells

Yang Yali, Zhang Shengyuan, Pan Zengfeng, et al

(Central Laboratory of Molecular Biology, Medical College of Jiaying University, Meizhou 514031)

Abstract Objective To investigate the effect and potential mechanism of nicotinamide on proliferation, apoptosis and migration of nasopharyngeal carcinoma (NPC) CNE-1 cells. **Methods** NPC CNE-1 cells were divided into blank control group and the experimental groups, which were treated with 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ of nicotinamide respectively, while the blank control was treated without nicotinamide. The proliferation rate of CNE-1 cells was detected by CCK-8 after 48 h and 72 h treatment with the concentrations mentioned above, the apoptosis rates and the cell cycle retardation of CNE-1 cells treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ nicotinamide for 48 h were detected by Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry. Cell migration and invasion were evaluated by transwell assay. Real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot were used to detect the mRNA level and the expression of p53 and matrix metalloproteinases 9 (MMP-9) proteins in CNE-1 cells. **Results** Compared with the blank control group, the data of CCK-8 assay showed that nicotinamide had an effective inhibition on the proliferation activity of CNE-1 cells ($P < 0.01$), and the effect was in time-dose dependence manner. Flow cytometry results showed that the nicotinamide could promote apoptosis of CNE-1 cells treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ nicotinamide for 48 h ($P < 0.01$), with the number of cells increased in G_2/M and decreased in G_0/G_1 phase ($P < 0.05$). And the migration and invasion were inhibited. Compared with the control group, the level of p53 protein was upregulated, while the level of MMP-9 protein decreased with 40 $\mu\text{mol/L}$ nicotinamide treatment for 48 h. **Conclusion** Nicotinamide can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cells by up-regulating the expression of p53 protein and restoring the cell cycle, and also affect the expression of MMP-9 protein, thus reducing the migration and invasion ability of CNE-1 cells.

Key words nicotinamide; CNE-1 cells; proliferation; apoptosis; migration