

# 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

陈秋生<sup>1</sup> 林春燕<sup>1</sup> 何康<sup>1</sup> 李明勇<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨槲皮素抗鼻咽癌(NPC) CNE2 细胞的机制。方法 通过 CCK-8 实验检测槲皮素在 CNE2 中的抗肿瘤活性;流式细胞术 Annexin V-FITC//PI 双染法检测细胞凋亡情况;采用 Western blot 检测槲皮素对 CNE2 细胞中凋亡标志蛋白、凋亡相关蛋白和凋亡诱导因子(AIF)以及细胞色素 C(Cyt-C)的影响。结果 槲皮素能抑制 CNE2 细胞生长、诱导细胞凋亡;Western blot 结果显示 槲皮素能下调 B 淋巴细胞瘤/白血病-2 蛋白(Bcl-2)和上调 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达;虽不能激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)但能通过切割 DNA 修复酶(PARP)促进 AIF 和 Cyt-C 从线粒体释放从而诱导 NPC 细胞凋亡。结论 槲皮素诱导鼻咽癌 CNE2 细胞发生了 Caspase 非依赖性细胞凋亡。

**关键词** 槲皮素;鼻咽癌;非 Caspase 依赖性凋亡

**中图分类号** R 730.1

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2019)07-1038-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.07.007

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是起源于鼻咽黏膜被覆上皮的头颈部肿瘤,其病因非常复杂,发病部位隐蔽,早期无明显症状,大多数患者确诊时已为中晚期;治疗上,主要采用放疗或放化疗相结合的方法进行,但由于转移和原病灶复发等因素, NPC 患者生存率和治愈率很低<sup>[1-2]</sup>。因此,从天然药物中寻找高效、低毒的抗癌活性成分,单独使用或与放疗联合使用,对提高 NPC 的生存率和治愈率具有重要意义。

槲皮素是广泛存在于蔬菜、水果及药用植物中的一种多羟基黄酮类化合物。近年来发现,槲皮素具有抗肿瘤活性,它可以通过抑制细胞生长、侵袭及诱导细胞凋亡等方式发挥着抗肿瘤作用<sup>[3-5]</sup>。研

究<sup>[6-7]</sup>表明,槲皮素在 NPC 中也能诱导细胞凋亡,但主要机制仍不明确。该研究以 NPC 细胞系 CNE2 为研究对象,对细胞凋亡进行了深入分析,发现了槲皮素诱导 NPC 细胞发生了非半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteine-containing aspartate-specific proteases, Caspase)依赖性凋亡,为临床上 NPC 的治疗提供了新的理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** CNE2 细胞由本实验室保存,槲皮素(Q4951)购自 Sigma 上海分公司;1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司;溴化丙啶(propidium iodide, PI)、Caspase 抑制剂 Z-vad-fmk、鼠抗人细胞色素 C(cytochrome C, Cyt-C)抗体和兔抗人凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)抗体购自上海碧云天生物有限公司;Annexin V-FITC 流式抗体购自美国 Invitrogen 公司;鼠抗人  $\beta$ -actin 抗体、兔抗人 DNA 修复酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抗体、兔抗人 B 淋巴细胞瘤/白血病-2 蛋白(B-cell lymphoma-2 protein, Bcl-2)抗体、兔抗人 Bcl-XL 抗体、兔抗人 Mcl1 抗体、兔抗人 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl2-associated X protein, Bax)抗体、鼠抗人 Caspase-9 抗体购自美国 CST 公司;鼠抗人 XIAP 抗体、鼠抗人 Caspase-8 抗体购自美国 BD 公司;鼠抗人 Caspase-3 抗体购自美国 Novus 公司;羊抗兔二抗和羊抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** CNE2 采用含有 10% 胎牛血清的 1640 培养基(含 100  $\mu$ g/ml 青霉素, 100  $\mu$ g/ml 链霉素)置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱培养。

**1.2.2 CCK-8 法检测细胞活力** 取对数期生长细胞  $2 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁后加入含不同浓度槲皮素的 1640 培养基培养,分别培养 24、48、72 h,在培养时间结束前 2~4 h,每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 检测液,放入培养箱中继续培养 2~4 h。结束后用酶标仪读取在 450 nm 处的光密度值(opti-

2019-01-16 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(编号:81603147);

广东医科大学科研基金项目(编号:2001/2XJ14017)

作者单位:<sup>1</sup>广东医科大学生理科学实验室 湛江 524023

<sup>2</sup>广东医科大学病理生理学教研室 湛江 524023

作者简介:陈秋生,男,本科;

李明勇,男,硕士,讲师,责任作者, E-mail: yancy02@126.

com

cal density, OD)。计算所有样品孔与对照孔的 OD 百分比,并求出槲皮素对 CNE2 细胞的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration  $IC_{50}$ )。

**1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡** 取对数期生长细胞  $1 \times 10^5$  /ml 传代于六孔板中,待细胞贴壁后分别加入槲皮素 100  $\mu\text{mol/L}$ ,槲皮素 100  $\mu\text{mol/L}$  + Z-vad-fmk 20  $\mu\text{mol/L}$  Z-vad-fmk 20  $\mu\text{mol/L}$ ,另设空白对照组。各组细胞放入  $CO_2$  培养箱中继续培养 24 h 结束后收集细胞并混悬于 500  $\mu\text{l}$  结合缓冲液中;先后加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{l}$  的 PI 轻轻混匀,避光,室温反应 15 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

**1.2.4 Western blot 检测蛋白表达** 将各处理组细胞培养 24 h 后,用 PBS 洗涤 3 次,甩干液体后,冰浴条件下用 RIPA 裂液裂解 30 min,然后用低温高速离心机 13 000 r/min 离心 15 min。取上清液,采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量,蛋白样品和上样缓冲液按 3 : 1 的比例混合,100  $^{\circ}\text{C}$  水中煮沸 5 min 使蛋白质变性。Western blot 实验方法参考《分子克隆实验指南》<sup>[8]</sup> 进行,以  $\beta$ -actin 作内参,电泳条带用 Glyko BandScan 图像分析软件进行光密度值分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 进行统计处理,两两比较采用  $t$  检验分析,组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CCK-8 实验结果** 不同浓度的槲皮素 (0, 0.82、2.47、7.41、22.22、66.67、200.00  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 NPC 细胞 24、48、72 h 后,均呈浓度依赖性和时间依赖性地抑制 CNE2 细胞增殖 ( $F = 37.423, P < 0.05$ ) (见图 1)。采用 LOGIT 法回归计算不同浓度槲皮素作用 CNE2 细胞 24、48、72 h 的  $IC_{50}$  分别为 89.6、64.9、46.4  $\mu\text{mol/L}$ 。

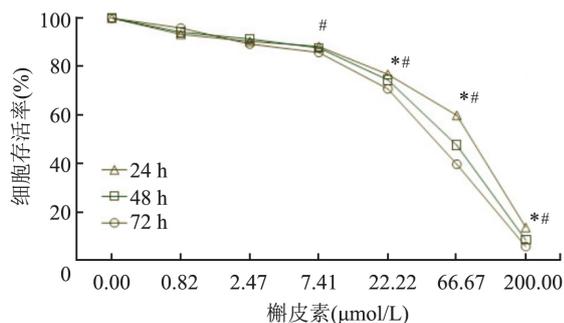


图 1 不同浓度槲皮素处理 24、48 和 72 h 后 CNE2 的细胞活力与空白对照组 (0  $\mu\text{mol/L}$  槲皮素) 相同时间比较: #  $P < 0.05$ ; 与相同浓度的 24 h 存活率比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 槲皮素诱导细胞凋亡情况** 流式细胞仪检测结果显示,槲皮素可明显诱导 CNE2 细胞凋亡,且以早期凋亡为主。在槲皮素 + Caspase 抑制剂组中观察到,抑制 Caspase 经典途径后,细胞凋亡比例仍较高 ( $F = 122.366, P < 0.01$ ),提示可能存在非 Caspase 依赖性细胞凋亡程序。见图 2。

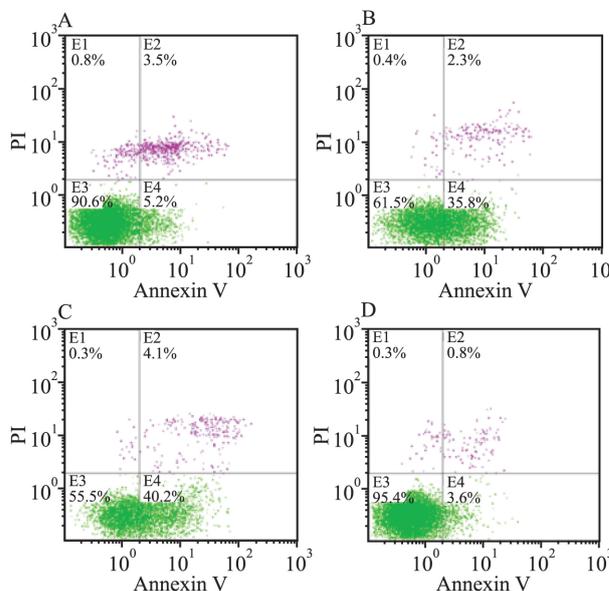


图 2 流式细胞术检测槲皮素诱导 CNE2 细胞凋亡情况 A: 对照组; B: 槲皮素处理组; C: 槲皮素 + Caspase 抑制剂组; D: Caspase 抑制剂组

**2.3 槲皮素对凋亡标志蛋白的影响** 采用 Western blot 检测槲皮素对凋亡标志分子 PARP 和 Caspase-3 的影响。结果显示,槲皮素处理组、槲皮素加 Caspase 抑制剂组能明显检测 PARP 被切割现象,而对照组、Caspase 抑制剂组没有检测到,提示槲皮素能明显切割细胞核内 PARP,从而使其失去酶活性,促进细胞凋亡。但槲皮素对 Caspase-3 蛋白水平的影响不显著 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

**2.4 槲皮素对凋亡相关蛋白水平的影响** 为探索槲皮素诱导 NPC 细胞凋亡的分子机制,通过 Western blot 法检测槲皮素对 CNE2 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的影响。结果显示,槲皮素能下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平 ( $P < 0.05$ ),上调促凋亡蛋白 Bax 的表达 ( $P < 0.05$ )。见图 4。实验进一步检测槲皮素对线粒体释放 Cyt-c 和 AIF 的影响。槲皮素处理组及槲皮素 + Caspase 抑制剂组中, CNE2 细胞胞质中 Cyt-c 和 AIF 含量显著增高,与对照组比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

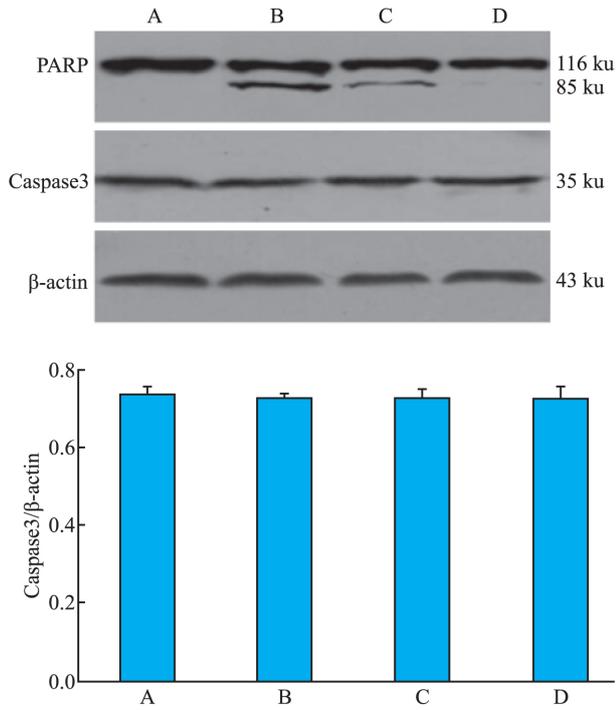


图3 Western blot 检测槲皮素对凋亡标志蛋白的影响

A: 对照组; B: 槲皮素处理组; C: 槲皮素 + Caspase 抑制剂组; D: Caspase 抑制剂组

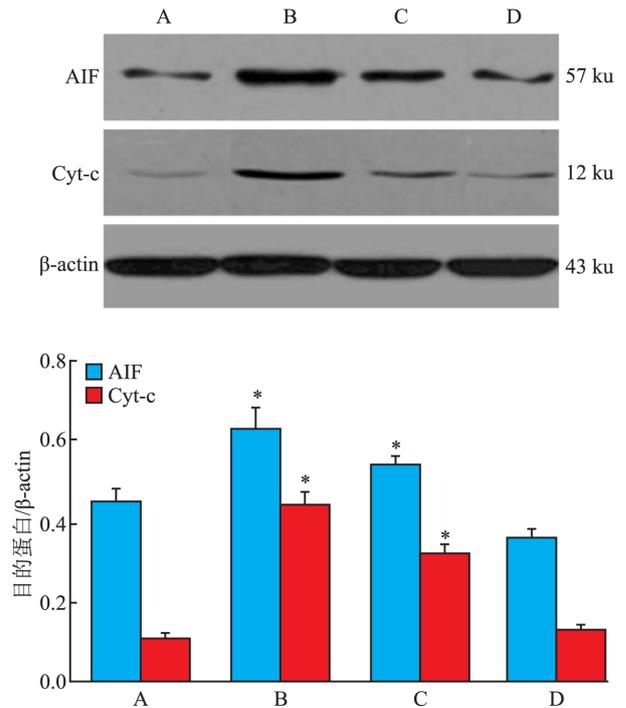


图5 Western blot 检测细胞质中 AIF 和 Cyt C 的含量

A: 对照组; B: 槲皮素处理组; C: 槲皮素 + Caspase 抑制剂组; D: Caspase 抑制剂组; 与对照组同种蛋白比较: \*  $P < 0.05$

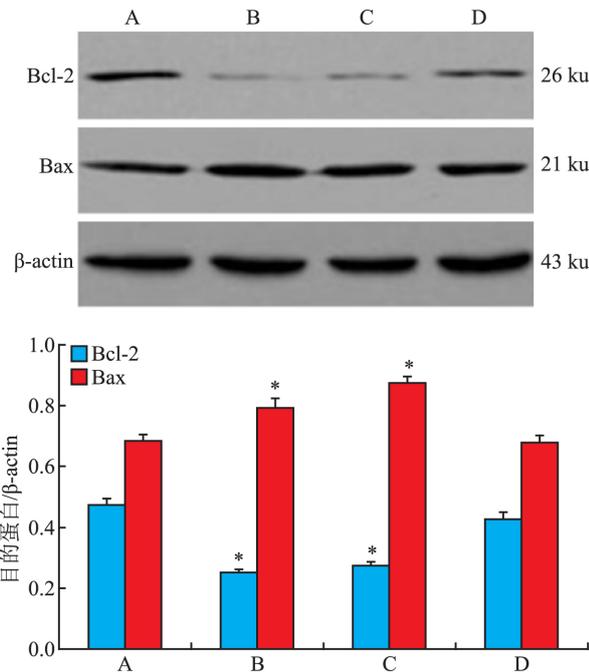


图4 Western blot 检测槲皮素对凋亡相关蛋白的影响

A: 对照组; B: 槲皮素处理组; C: 槲皮素 + Caspase 抑制剂组; D: Caspase 抑制剂组; 与对照组同种蛋白比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

众所周知,槲皮素是中药里抗癌能力最有效的成分之一,在不同肿瘤细胞中都表现出一定的抗肿

瘤活性。在 NPC 细胞中也发现槲皮素能够抑制 NPC 细胞增殖,诱导细胞凋亡,但是其抗肿瘤机制,特别是槲皮素诱导 NPC 细胞凋亡的分子机制,仍未完全阐明。本研究以 NPC 细胞系 CNE2 为研究对象,通过 CCK-8 实验、流式细胞术以及 Western blot 等技术,发现槲皮素诱导 CNE2 细胞发生了非 Caspase 依赖性凋亡。

经典的细胞凋亡途径主要包括外源性凋亡和内源性凋亡,两条途径最终都是通过激活 Caspases 诱导凋亡,其中 Caspase-3 是凋亡过程中重要的终末剪切酶<sup>[9]</sup>。本实验数据显示,槲皮素诱导 CNE2 细胞凋亡过程中,Caspase-3 没有被检测到切割激活。但作为凋亡标志蛋白的 PARP 能被检测到切割带。PARP 是细胞核中与 DNA 修复密切相关的一种酶,对维持基因组稳定性和细胞生存至关重要。当槲皮素诱导 PARP 被切割而失去酶活性后,细胞就会发生凋亡。这些证据说明,槲皮素诱导细胞凋亡,主要不是通过经典的凋亡途径。

为了进一步探索槲皮素诱导鼻咽癌 CNE2 细胞凋亡的具体机制,本实验检测了细胞促凋亡基因 Bax、抑凋亡基因 Bcl-2、AIF 和 Cyt-c 的含量。AIF 是一种定位于线粒体的黄素蛋白,它能促进线粒体释

放 Cyt-c 激活 Caspase-9 诱导内源性凋亡,也能介导细胞发生非 Caspase 依赖性凋亡<sup>[10-11]</sup>。当细胞受到凋亡的刺激时,通过激活线粒体膜上 Bcl-2 家族的促凋亡 Bax 的表达和抑制 Bcl-2 的表达,引起线粒体外膜通透性改变并形成稳定的孔隙,释放 AIF、Cyt-c 等因子进入胞质。特别是 AIF 从线粒体释放到细胞溶质后,进而转位入核,引起染色质凝集和 DNA 大规模片段化(约 50 kb),进而引发不依赖 Caspase 的凋亡途径<sup>[12-13]</sup>。但是 AIF 引起染色质凝集和 DNA 片段化的机制目前还不是很清楚。实验结果显示,槲皮素处理 NPC 细胞 24 h 后,能下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平,上调促凋亡蛋白 Bax 的表达;在细胞溶质中明显检测到 AIF、cyt-C 表达上调,有力地证明了槲皮素诱导 CNE2 细胞发生凋亡的主要机制是非 Caspase 依赖性凋亡途径。

### 参考文献

- [1] Wei W I, Sham J S. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2005, 365 (9476): 2041-54.
- [2] Colaco R J, Betts G, Donne A, et al. Nasopharyngeal carcinoma: a retrospective review of demographics, treatment and patient outcome in a single centre [J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2013, 25 (3): 171-7.
- [3] Kim H S, Wannatung T, Lee S, et al. Quercetin enhances hypoxia-mediated apoptosis via direct inhibition of MAPK activity in HCT116 colon cancer [J]. *Apoptosis*, 2012, 17 (9): 938-49.
- [4] Li N, Sun C, Zhou B, et al. Low concentration of quercetin an-

- tagonizes the cytotoxic effects of anti-neoplastic drugs in ovarian cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (7): e100314.
- [5] Ko C C, Chen Y J, Chen C T, et al. Chemical proteomics identifies heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1 as the molecular target of quercetin in its anti-cancer effects in PC-3 cells [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (32): 22078-89.
  - [6] 冯红波,张军辉. 槲皮素对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞增殖的影响及机制研究 [J]. *中国现代药物应用*, 2010, 4(20): 33-4.
  - [7] 杨娜,朱开梅,顾生玖. 槐米中槲皮素对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖与凋亡作用的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(9): 2215-7.
  - [8] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂,译. 北京: 科学出版社 2016: 1723-6.
  - [9] 冯群,夏婧. 基于细胞凋亡信号通路的抗菌肽抗肿瘤机制的研究进展 [J]. *广东医学*, 2018, 39(3): 466-9.
  - [10] Mao W P, Ye J L, Guan Z B, et al. Cadmium induces apoptosis in human embryonic kidney (HEK) 293 cells by caspase-dependent and-independent pathways acting on mitochondria [J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21 (3): 343-54.
  - [11] Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, et al. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization [J]. *EMBO J*, 2003, 22 (17): 4385-99.
  - [12] Meggyeshazi N, Andocs G, Balogh L, et al. DNA fragmentation and caspase-independent programmed cell death by modulated electrohyperthermia [J]. *Strahlenther Onkol*, 2014, 190 (9): 815-22.
  - [13] Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, et al. No death without life: vital functions of apoptotic effectors [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15 (7): 1113-23.

## Caspase – independent apoptosis is triggered by quercetin in CNE2 cells

Chen Qiusheng, Lin Chunyan, He Kang, et al

(Dept of Pathophysiology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023)

**Abstract Objective** To elucidate the anti-tumor activity of quercetin in nasopharyngeal carcinoma cell lines. **Methods** CCK-8 assay was employed to test the anti-tumor activity of quercetin. Cell apoptosis was detected by flow cytometry with AnnexinV-FITC / PI double-staining method. Apoptosis related protein was measured by western blot. **Results** Quercetin effectively inhibited cell proliferation in CNE2 cells by CCK-8 assay. Quercetin induced the cleavage of poly ADP-ribose polymerase (PARP) and triggered significant release of apoptosis inducing factor (AIF) and cytochrome C from mitochondria in a concentration-dependent and time-dependent manner. **Conclusion** Quercetin induced caspase-independent apoptosis in CNE2 Cells.

**Key words** quercetin; nasopharyngeal carcinoma; Caspase-independent apoptosis