

基于Nrf2/ARE信号通路探讨海南五指山裸花紫珠对鼻咽癌 细胞顺铂诱导凋亡敏感性的作用及其机制

苏乙花, 汪云鑫, 姜靖雯*
(海南省中医院, 海口 570203)

[摘要] 目的:探讨海南五指山裸花紫珠(LHZZ)对鼻咽癌(NPC)细胞顺铂(DDP)诱导凋亡敏感性的影响,并探究其作用机制。方法:细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测不同浓度DDP(0, 2, 4, 8, 16, 32 mg·L⁻¹)和不同浓度海南五指山裸花紫珠(0, 25, 50, 75, 100 mg·L⁻¹)处理后的细胞存活率。实验分组为空白组(正常HNE1细胞), DDP组(8 mg·L⁻¹, 24 h), LHZZ组(50 mg·L⁻¹, 24 h), DDP+LHZZ组(8 mg·L⁻¹ DDP+50 mg·L⁻¹ LHZZ, 24 h), DDP+LHZZ+核因子E2相关因子2(Nrf2)激活剂莱菔硫烷(SFN)组(8 mg·L⁻¹ DDP+50 mg·L⁻¹ LHZZ, 24 h; 然后10 μmol·L⁻¹ SFN, 24 h), CCK-8法检测细胞存活率, 集落克隆形成实验检测细胞集落形成能力, 流式细胞术和原位末端标记法(TUNEL)染色检测细胞凋亡情况, 荧光探针2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)检测培养细胞活性氧(ROS)水平, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞内凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)表达, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞内Nrf2, 抗氧化反应元件(ARE) mRNA表达。结果:与空白组比较, 经过不同浓度DDP和不同浓度LHZZ处理后, 细胞存活率均明显下降($P<0.05$); 与DDP组和LHZZ组比较, DDP+LHZZ组细胞存活率下降, 细胞集落克隆形成数目减少, 细胞凋亡水平升高, Bcl-2蛋白表达水平下调, Bax和Caspase-3蛋白表达水平则上调, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 而在DDP+LHZZ组中加入SFN激活Nrf2/ARE信号通路, 上述效果均受到抑制($P<0.05$)。此外, 与空白组比较, LHZZ组细胞内ROS水平下调($P<0.05$); 与DDP组比较, DDP+LHZZ组ROS水平明显下调($P<0.05$); 与DDP+LHZZ组比较, DDP+LHZZ+SFN组细胞ROS水平明显上调($P<0.05$)。结论: LHZZ可增加DDP诱导的鼻咽癌细胞凋亡的敏感性, 其机制可能与阻断Nrf2/ARE信号通路并抑制ROS水平相关。

[关键词] 鼻咽癌; 顺铂; 海南五指山裸花紫珠; 凋亡; 敏感性

[中图分类号] R22; R242; R285.5; R2-031; R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0131-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220296

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211118.1603.002.html>

[网络出版日期] 2021-11-20 8:29

Effect of Wuzhishan *Callicarpa nudiflora* in Hainan Province on Cisplatin-induced Apoptosis of Nasopharyngeal Carcinoma Cells and Mechanism: Based on Nrf2/ARE Pathway

SU Yi-hua, WANG Yun-xin, JIANG Jing-wen*

(Chinese Medicine Hospital of Hainan Province, Haikou 570203, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Wuzhishan *Callicarpa nudiflora* (LHZZ) on the sensitivity of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells to cisplatin (DDP) and the mechanism. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the survival rate of NPC HNE1 cells after treatment with different concentration of DDP (0, 2, 4, 8, 16, 32 mg·L⁻¹) and different concentration of LHZZ (0, 25, 50, 75, 100 mg·L⁻¹). The following groups were designed: control group (normal HNE1 cells), DDP group (8 mg·L⁻¹ DDP, 24 h), LHZZ group (50 mg·L⁻¹ LHZZ, 24 h), DDP + LHZZ group (8 mg·L⁻¹ DDP + 50 mg·L⁻¹ LHZZ,

[收稿日期] 20210318(023)

[基金项目] 海南省自然科学基金青年项目(819QN358)

[第一作者] 苏乙花, 硕士, 主治医师, 从事肿瘤中西医结合治疗及相关研究, E-mail: aabu123@163.com

[通信作者] *姜靖雯, 博士, 副主任医师, 从事肿瘤中西医结合治疗及相关研究, E-mail: 174676785@qq.com

24 h), DDP + LHZZ + nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activator sulforaphane (SFN) group (8 mg·L⁻¹ DDP + 50 mg·L⁻¹ LHZZ, 24 h, 10 μmol·L⁻¹ SFN, 24 h). Then CCK-8 assay was employed to examine cell survival rate, colony formation test the colony-forming ability, flow cytometry and in situ terminal end-labeling (TUNEL) staining cell apoptosis, fluorescent probe 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) the level of reactive oxygen species (ROS) in cultured cells, Western blot the expression of apoptosis-related proteins in cells, such as B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3), and Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) the expression of Nrf2 and antioxidant response element (ARE) mRNA in cells. **Result:** The survival rates of cells treated with different concentration of DDP and different concentration of LHZZ decreased compared with that in the control group ($P < 0.05$). Compared with the DDP group and the LHZZ group, DDP + LHZZ group demonstrated decrease in cell survival rate, number of cell colonies, and Bcl-2 level, and increase in the apoptosis level and the expression of Bax and Caspase-3 ($P < 0.05$). However, after the addition of SFN, the Nrf2/ARE signaling pathway was activated and the above variation was inhibited ($P < 0.05$). In addition, the level of intracellular ROS in the LHZZ group was lower than that in the control group ($P < 0.05$) and the level in the DDP + LHZZ group was lower than that in the DDP group ($P < 0.05$). Moreover, the ROS level in the DDP + LHZZ + SFN group was higher than that in the DDP+LHZZ group ($P < 0.05$). **Conclusion:** LHZZ can enhance the sensitivity of DDP-induced NPC apoptosis, possibly by blocking the Nrf2/ARE signaling pathway and inhibiting the level of ROS.

[Keywords] nasopharyngeal carcinoma; cisplatin; Wuzhishan *Callicarpa nudiflora* in Hainan province; apoptosis; sensitivity

鼻咽癌(NPC)是一种发生在鼻咽黏膜内膜上皮的恶性肿瘤,具有高侵袭性,且容易发生淋巴结转移^[1]。近年来,NPC在我国的发生率呈上升趋势,严重威胁人们的身心健康^[2]。由于鼻咽区域复杂的解剖结构,使其很难进行手术治疗,放射疗法和化学疗法是治疗NPC的常见手段,随着治疗技术的不断发展,NPC得到了局部控制与改善,患者的生存率也明显提高^[3-4],然而,在治疗过程中肿瘤细胞耐药性及药物不良反应成为NPC治疗的一大瓶颈,寻找有效干预目标及靶标分子来增加肿瘤细胞对放疗的敏感性,对于提高NPC患者的生存率来说至关重要^[5]。

紫珠属 *Callicarpa* 植物属于马鞭草科 Verbenaceae,灌木至小乔木,在全球大约有190种,主要分布在亚洲和大洋洲的热带、亚热带地区,具有抗炎、抗氧化、抗病毒、止血止痛及散瘀消肿的作用^[6-9]。化学成分是中药发挥药理作用的物质基础,海南五指山裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* (LHZZ) 含有较多以梓醇为母核的环烯醚萜、倍半萜,不仅具有止血和抗炎活性。多种药物联合使用可能会产生不同的结果,例如协同作用、相加作用和拮抗作用,药物相互作用的评估在所有医学领域的研究中都很重要,特别是在肿瘤化疗中,通常使用联合

治疗的方法以更好地发挥抑癌作用,已有研究表明 LHZZ 具有抗肿瘤作用,并且能够逆转结肠癌细胞的体外耐药性^[10]。然而,关于其在NPC方面的作用及机制研究却未见报道,鉴于此,本研究旨在探讨海南五指山 LHZZ 在顺铂(DDP)诱导的NPC肿瘤细胞凋亡中是否发挥有利作用,并初步探究相关的作用机制,以期为NPC治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器 NPC细胞株 HNE1(美国 ATCC 公司,批号 YS901C); DDP(齐鲁制药,国药准字 H37021357);海南五指山 LHZZ 由海南医学院提供(批号 151206),参考文献[11]的方法进行的制备。核因子 E₂ 相关因子 2(Nrf2) 激活剂莱菔硫烷(SFN, 纯度 ≥95%, 美国 LKT 公司,批号 L0036)。胎牛血清, RPMI 1640 培养液(美国 HyClone 公司,批号分别为 16000-044, Sh30809.01);青霉素-链霉素溶液(美国 Gibco 公司,批号 15140-122);细胞增殖与活性检测(CCK-8), Annexin V-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI),原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(上海碧云天生物研究所,批号分别为 C0037, C1075M, C1091);结晶紫染液(上海经科化学科技公司,批号 WB1014);2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)试剂盒(北京索莱宝科技公司,批

号CA1410); TRIzol, 反转录及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本Takara公司, 批号分别为RR9767, RR390A); Bradford试剂盒, ECL(上海贝博生物科技公司, 批号分别为BB-3102-2, 320011); B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物公司, 批号分别为ZA-0127, ZA-0435, ZA-0657, ZA-0156, ZB-2301)。

BC-J160S型细胞培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); M340651型酶标仪(北京中西远大科技有限公司); MACSQuant Analyzer型流式细胞仪(德国Miltenyi公司); BX53型荧光显微镜(日本Olympus公司); DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂); CFX96型Real-time PCR扩增仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 细胞培养 将HNE1细胞置于37℃水浴锅内, 轻轻摇晃使其完全溶解, 在离心机中以1 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径12 cm, 下同), 弃去上清液, 加入含10%胎牛血清, 1%青霉素-链霉素双抗的RPMI 1640培养液, 将细胞吹打均匀, 培养于37℃, 5%CO₂饱和湿度的培养箱中, 每2 d换液1次, 并进行传代培养。

1.3 CCK-8法检测细胞存活率 将对数生长期的HNE1细胞调整为密度5×5⁵个/mL, 取100 μL加入到96孔板, 37℃, 5%CO₂饱和湿度培养箱过夜培养。用含不同终质量浓度DDP(0, 2, 4, 8, 16, 32 mg·L⁻¹)的培养基培养细胞, 24 h后每孔加入CCK-8试剂10 μL, 轻轻混匀, 继续培养4 h, 采用全自动酶标仪在450 nm处检测各孔细胞的吸光度A。实验重复3次。

在96孔板中加入细胞, 过夜培养, 使用含不同终质量浓度海南五指山裸花紫珠(0, 25, 50, 75, 100 mg·L⁻¹)的培养基培养细胞, 24 h后采用CCK-8试剂盒进行检测, 具体操作同上。实验重复3次。

使用LHZZ与DDP共同处理HNE1细胞, 实验分组为空白组(正常培养的HNE1细胞), DDP组(含终质量浓度8 mg·L⁻¹DDP培养24 h), LHZZ组(含终质量浓度50 mg·L⁻¹LHZZ培养24 h), DDP+LHZZ组(含终质量浓度8 mg·L⁻¹DDP与50 mg·L⁻¹LHZZ培养24 h), DDP+LHZZ+SFN组(含终质量浓度8 mg·L⁻¹DDP与50 mg·L⁻¹LHZZ培养24 h, 接着换用含终浓度10 μmol·L⁻¹SFN培养24 h), 处理结

束后, 采用CCK-8试剂盒进行检测, 具体操作同上。实验重复3次。

1.4 集落克隆形成实验检测细胞增殖情况 收集处理后的HNE1细胞, 接种4×10³个到无菌培养皿, 轻轻晃动使细胞均匀分布于皿底, 置于培养箱内培养, 14 d有明显的细胞集落形成。磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 4%多聚甲醛固定菌落, 0.5%结晶紫染色15 min, 流水下冲洗掉染液, 自然条件下干燥后, 利用光学显微镜进行观察, 计数细胞集落克隆形成数目(≥50个细胞克隆团记为1个集落)。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 收集处理后的HNE1细胞, 采用0.25%胰蛋白酶消化细胞, PBS洗涤细胞, 2 000 r·min⁻¹离心5 min, 加入1×Binding缓冲液500 μL, 吹打均匀, 得到重悬细胞液。取适量细胞悬液, 依次加入Annexin V-FITC试剂液10 μL与PI溶液5 μL, 混合均匀, 室温避光孵育10 min, 通过流式细胞仪检测各处理组细胞凋亡情况。

1.6 TUNEL染色检测细胞凋亡 收集处理后的HNE1细胞, PBS洗涤, 4%多聚甲醛固定细胞30 min后, 加入含0.3% Triton X-100的PBS液重悬细胞, 置于室温下孵育5 min, 再加TUNEL检测液, 吹打使其充分混匀, 再放置于37℃下, 避光孵育1 h, PBS洗涤细胞, 涂片, 通过荧光显微镜观察, 随机选择5个视野, 计数该视野下细胞总数目与凋亡数目, 计算细胞TUNEL阳性率。

1.7 荧光探针DCFH-DA检测培养细胞ROS水平 收集处理后的HNE1细胞, PBS清洗, 调整密度后以1×10⁴个/孔接种到96孔培养板, 加入终浓度为20 μmol·L⁻¹的DCFH-DA试剂液, 置于培养箱内避光孵育35 min, 在离心机中以1 000 r·min⁻¹离心10 min, 收集细胞, PBS再次清洗, 接着用无血清细胞培养液洗涤细胞。检测前加PI溶液5 μL, 利用流式细胞仪进行检测。

1.8 Real-time PCR检测Nrf2, 抗氧化反应元件(ARE) mRNA表达情况 TRIzol法提取各处理组HNE1细胞总RNA, 紫外分光光度计检测总RNA质量。根据反转录试剂盒说明书进行操作, 将总RNA反转录合成cDNA, 再以cDNA为模板, 通过Real-time PCR实验检测Nrf2与ARE基因的表达, 根据SYBR[®]Premix Ex Taq[™] II试剂盒说明书操作, β-肌动蛋白(β-actin)作为内参基因。扩增程序为95℃ 5 min, 循环1次; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 58℃ 30 s, 循环40次。运用2^{-ΔΔC_t}法来计算基因的相对表达水平。引物序列如下, Nrf2上游引物5'-

CTTTAGTCAGCGACAGAAGGAC-3',下游引物 5'-AGGCATCTTGTGGGAATGTG-3'(227 bp); ARE 上游引物 5'-AAGATGTCCTTTCGGGCAGC-3',下游引物 5'-TCCGTGGCCTTGGAATCTTT-3'(231 bp); β -actin 上游引物 5'-ATGGTGGGAATGGGTCAGAG-3',下游引物 5'-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3'(158 bp),序列交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bcl-2, Bax, Caspase-3 蛋白表达情况 将预冷的 RIPA 缓冲液加入各处理组 HNE1 细胞中进行裂解, 1 200 r·min⁻¹ 离心 10 min, 提取总蛋白, Bradford 法检测各蛋白样品的浓度。分别取各组蛋白样品 40 μ g 经 10% SDS-PAGE 电泳进行分离, 将分离后的蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜, 室温下置于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h, TBST 洗膜, 加入兔抗 Bcl-2, Bax, Caspase-3(均 1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。第 2 天, 弃去一抗工作液, TBST 洗膜后, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(1:5 000)作为二抗工作液, 室温继续孵育 1 h, TBST 再次洗膜, 滴加 ECL 化学发光液显色曝光, 凝胶成像系统拍摄蛋白条带图像, 利用 Image J 软件分析条带灰度值, 以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.10 统计学分析 采用统计软件 SPSS 23.0 对本实验数据进行分析, GraphPad Prism 8.3 软件作图。计量资料符合正态分布时, 数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用 ANOVA 方差分析, 组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t*, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对 HNE1 细胞存活率的影响 CCK-8 检测结果显示, 与空白组比较, 各质量浓度 DDP 与 LHZZ 处理的 HNE1 细胞存活率均明显下降, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 见表 1。

2.2 对 HNE1 细胞 DDP 敏感性的影响 CCK-8 检测结果显示, 与空白组比较, DDP 组和 LHZZ 组 HNE1 细胞存活率明显下降($P<0.05$)。与 DDP 组和 LHZZ 组比较, DDP+LHZZ 组细胞存活率明显下降($P<0.05$)。与 DDP+LHZZ 组比较, DDP+LHZZ+SFN 组细胞存活率明显升高($P<0.05$), 见表 2。

2.3 对 HNE1 细胞集落形成能力的影响 与空白组比较, DDP 组和 LHZZ 组 HNE1 细胞的集落克隆形成数目明显减少($P<0.05$)。与 DDP 组比较, DDP+LHZZ 组细胞集落克隆形成数目明显减少, 同

表 1 DDP 与 LHZZ 对 HNE1 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of DDP and LHZZ on survival rate of HNE1 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白		100.00±8.97
DDP	2	85.97±8.52 ¹⁾
	4	78.90±7.67 ¹⁾
	8	71.01±7.02 ¹⁾
	16	59.89±5.88 ¹⁾
LHZZ	32	47.06±4.60 ¹⁾
	25	84.56±8.12 ¹⁾
	50	77.89±7.60 ¹⁾
	75	69.08±6.85 ¹⁾
	100	57.89±5.51 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P<0.05$ 。

表 2 LHZZ 对 HNE1 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of LHZZ on survival rate of HNE1 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	存活率/%
空白		100.00±9.16
DDP	8	76.61±7.42 ¹⁾
LHZZ	50	80.35±8.01 ¹⁾
DDP+LHZZ	8+50	49.36±4.84 ^{2,3)}
DDP+LHZZ+SFN	8+50+10 ⁵⁾	72.52±7.17 ⁴⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P<0.05$; 与 DDP 组比较²⁾ $P<0.05$; 与 LHZZ 组比较³⁾ $P<0.05$; 与 DDP+LHZZ 组比较⁴⁾ $P<0.05$; ⁵⁾单位为 μ mol·L⁻¹ (表 3~8 同)。

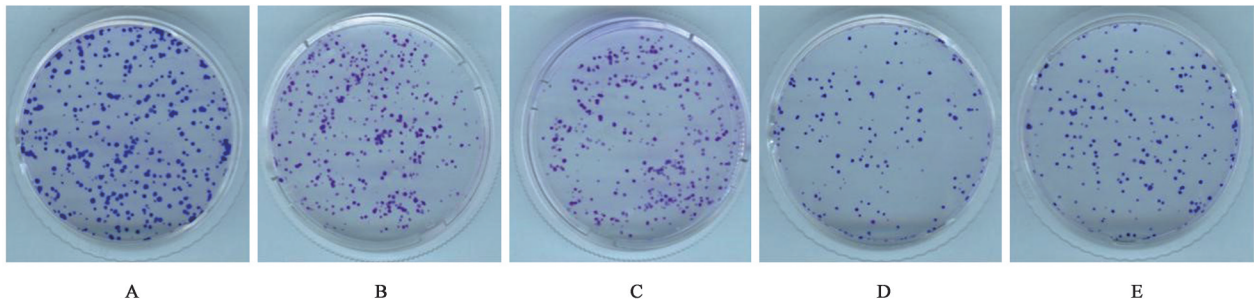
时, DDP+LHZZ 组细胞集落克隆形成数目较 LHZZ 组也明显减少, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 与 DDP+LHZZ 组比较, DDP+LHZZ+SFN 组细胞集落克隆形成数目则明显增加, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 见表 3, 图 1。

表 3 LHZZ 对 HNE1 细胞集落形成的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of LHZZ on colony of HNE1 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	细胞集落形成数目/个
空白		170.46±16.58
DDP	8	111.38±11.40 ¹⁾
LHZZ	50	120.35±12.15 ¹⁾
DDP+LHZZ	8+50	81.08±8.08 ^{2,3)}
DDP+LHZZ+SFN	8+50+10 ⁵⁾	123.78±11.98 ⁴⁾

2.4 对 HNE1 细胞凋亡的影响 与空白组比较, DDP 组和 LHZZ 组 HNE1 细胞凋亡率均明显升高($P<0.05$)。与 DDP 组比较, DDP+LHZZ 组细胞凋亡



A. 空白组; B. DDP组; C. LHZZ组; D. DDP+LHZZ组; E. DDP+LHZZ+SFN组(图2, 3同)

图1 LHZZ HNE1细胞集落形成能力的影响

Fig. 1 Effect of LHZZ on colony forming ability of HNE1 cells

率明显升高($P<0.05$),与LHZZ组比较,DDP+LHZZ组细胞凋亡率也明显升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。与DDP+LHZZ组比较,DDP+LHZZ+SFN组细胞凋亡率明显降低($P<0.05$),见表4。

与空白组比较,DDP组和LHZZ组HNE1细胞TUNEL阳性率明显增加($P<0.05$)。与DDP组和LHZZ组比较,DDP+LHZZ组细胞TUNEL阳性率均明显增加($P<0.05$)。与DDP+LHZZ组比较,DDP+LHZZ+SFN组细胞TUNEL阳性率明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表5,图2。

表4 LHZZ对HNE1细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of LHZZ on apoptosis of HNE1 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞凋亡率/%
空白		10.19±0.12
DDP	8	29.89±2.94 ¹⁾
LHZZ	50	22.74±2.16 ¹⁾
DDP+LHZZ	8+50	42.86±4.21 ^{2,3)}
DDP+LHZZ+SFN	8+50+10 ⁵⁾	30.99±3.03 ⁴⁾

表5 LHZZ对HNE1细胞TUNEL阳性率及ROS生成的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of LHZZ on TUNEL positive rate of HNE1 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	TUNEL阳性率/%
空白		9.14±0.90
DDP	8	26.09±2.51 ¹⁾
LHZZ	50	23.57±2.13 ¹⁾
DDP+LHZZ	8+50	39.48±3.79 ^{2,3)}
DDP+LHZZ+SFN	8+50+10 ⁵⁾	27.68±2.66 ⁴⁾

2.5 对HNE1细胞ROS生成的影响 研究结果显示,与空白组比较,DDP组细胞内ROS水平差异无统计学意义;LHZZ组HNE1细胞内ROS水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与DDP组比较,DDP+LHZZ组细胞内ROS水平明显升高($P<0.05$)。与DDP+LHZZ组比较,DDP+LHZZ+SFN组细胞内ROS水平明显降低($P<0.05$)。见表6。

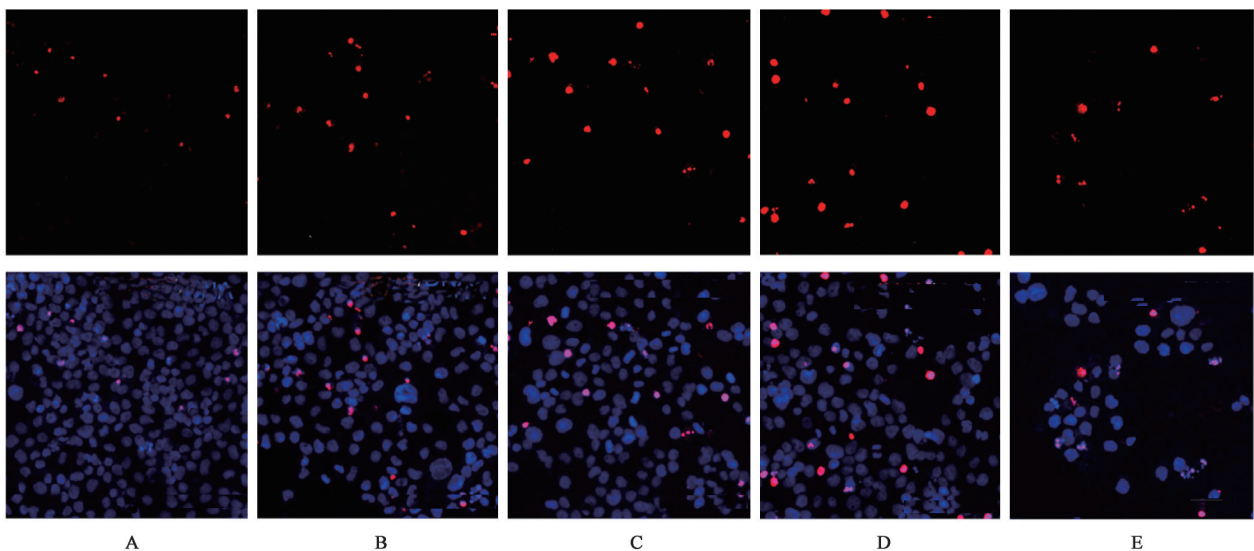


图2 LHZZ对HNE1细胞凋亡的影响(TUNEL, ×100)

Fig. 2 Effect of LHZZ on apoptosis of HNE1 cells(TUNEL, ×100)

表 6 LUZZ 对 HNE1 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of LHZZ on ROS level of HNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	ROS(%)
空白		7.81±0.76
DDP	8	6.26±0.63
LHZZ	50	15.67±1.46 ¹⁾
DDP+LHZZ	8+50	19.60±1.87 ²⁾
DDP+LHZZ+SFN	8+50+10 ⁵⁾	9.68±0.94 ⁴⁾

2.6 对 HNE1 细胞内凋亡相关蛋白水平的影响

研究结果显示,与空白组比较,DDP 组和 LHZZ 组 HNE1 细胞内 Bcl-2 蛋白表达水平明显下调 ($P<0.05$), Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平明显上调,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与 DDP 组和 LHZZ 组比较,DDP+LHZZ 组细胞 Bcl-2 蛋白表达水平明显下调 ($P<0.05$), Bax 和 Caspase-3 蛋白表达

水平则均明显上调 ($P<0.05$)。与 DDP+LHZZ 组比较,DDP+LHZZ+SFN 组细胞 Bcl-2 蛋白表达水平明显上调 ($P<0.05$), Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平明显下调,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3,表 7。

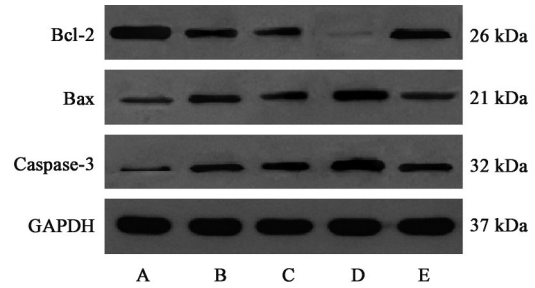


图 3 各组 HNE1 细胞内凋亡相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of apoptosis-related protein expression in HNE1 cells in each group

表 7 LHZZ 对 HNE1 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of LHZZ on expression of apoptosis-related proteins in HNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Caspase-3/GAPDH
空白		1.18±0.10	0.17±0.01	0.11±0.01
DDP	8	0.38±0.03 ¹⁾	0.37±0.04 ¹⁾	0.37±0.03 ¹⁾
LHZZ	50	0.35±0.03 ¹⁾	0.35±0.03 ¹⁾	0.39±0.04 ¹⁾
DDP+LHZZ	8+50	0.08±0.00 ^{2,3)}	0.81±0.08 ^{2,3)}	0.80±0.08 ^{2,3)}
DDP+LHZZ+SFN	8+50+10 ⁵⁾	0.49±0.04 ⁴⁾	0.36±0.03 ⁴⁾	0.38±0.03 ⁴⁾

2.7 对 HNE1 细胞内 Nrf2, ARE mRNA 表达的影响

与空白组比较,LHZZ 组 HNE1 细胞中 Nrf2, ARE 的 mRNA 相对表达水平明显下调 ($P<0.05$), DDP 组差异无统计学意义。与 DDP 组比较,DDP+LHZZ 组细胞中 Nrf2, ARE mRNA 相对表达水平明显下调 ($P<0.05$)。与 DDP+LHZZ 组比较,DDP+LHZZ+SFN 组细胞中 Nrf2, ARE mRNA 相对表达水平则明显上调 ($P<0.05$),见表 8。

表 8 LHZZ 对 HNE1 细胞 Nrf2 和 ARE mRNA 相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of LHZZ on relative expression levels of Nrf2 and ARE mRNA in HNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	Nrf2	ARE
空白		1.00±0.05	1.00±0.05
DDP	8	0.97±0.06	0.98±0.08
LHZZ	50	0.53±0.05 ¹⁾	0.63±0.06 ¹⁾
DDP+LHZZ	8+50	0.51±0.04 ²⁾	0.66±0.06 ²⁾
DDP+LHZZ+SFN	8+50+10 ⁵⁾	0.98±0.10 ⁴⁾	1.21±0.11 ⁴⁾

3 讨论

NPC 主要发生在我国南方沿海地区,仅广东省每年就有约 5 000 例新 NPC 病例^[12]。单一的放疗、化疗或两者联合使用是早期和局部晚期 NPC 患者的主要治疗方法,近年来,由于放疗技术的进步和化学疗法的广泛应用使 NPC 得到了局部控制。然而,NPC 患者的预后仍然较差,据统计,10%~20% 的患者在治疗后出现复发和转移的情况,这是因为肿瘤抵抗力的产生^[3]。由于化学治疗药物有限,因此迫切需要开发针对 NPC 的靶向疗法或措施,以降低化疗药物的毒性并提高肿瘤细胞对药物的敏感性。

目前尚无用于 NPC 的特殊有效药物,DDP, 5-氟尿嘧啶(5-Fu)和环磷酰胺仍然是 NPC 中常用的化疗药物^[13],然而,耐药性和药物不良反应仍然使得化疗效果具有一定的局限性,寻找新的特异性抗 NPC 药物并逆转化疗耐药对于 NPC 患者来说至关重要。联合治疗越来越多地运用于癌症治疗当中,以避免单药治疗相关的不良反应和耐药性的产生。以往研究表明,联合治疗可以协同抑制肿瘤生长,

最大限度地提高化疗的治疗反应,同时最大限度地减少肿瘤多药耐药的发生,例如ZHANG等^[14]报道发现,与单独使用DDP进行化学治疗相比,吉西他滨和DDP诱导化疗治疗NPC的效果更佳,患者的无复发生存率从75.7%显著提高到85.3%;VERMORKEN等^[15]研究证实,在NPC的化疗中加入帕尼单抗可以改善无进展生存期,并且显示出更小的药物毒性;陈学武等^[10]研究发现LHZZ能够通过激活白细胞介素-6(IL-6)/信号转导和活化转录因子3(STAT3)信号通路逆转结肠癌细胞对5-Fu的耐药作用。本研究结果同样显示,在DDP与LHZZ分别单独作用下,HNE1细胞存活率下降,细胞集落克隆形成数目减少,细胞凋亡率升高,而两者联合作用下HNE1细胞存活率进一步下降,细胞集落克隆形成数目减少,细胞凋亡率更高,由此说明,LHZZ不仅具有促进NPC肿瘤细胞凋亡的作用,而且在与DDP联合使用时抗癌作用更佳。

研究NPC发病及转移进展的相关机制,对于寻找有效干预目标和治疗的分子靶标具有重要意义。Nrf2/ARE途径是强大的抗氧化途径,在基础条件下Nrf2与Kelch样ECH相关蛋白(Keap1)-Cullin3(Cul3)E3泛素连接酶结合,并与E2泛素结合酶连接,将泛素转移至Nrf2,靶向Nrf2降解蛋白酶体^[16-17]。然而,在暴露于亲电试剂或氧化应激下时,Keap1 IVR结构域感受外来刺激被直接修饰,降低了Keap1-Cul3复合体的泛素E3连接酶活性,并使Nrf2稳定表达,而新产生的Nrf2可以直接转运到细胞核中,Nrf2的Neh1与Maf蛋白结合形成异源二聚体,与ARE结合,并激活一系列基因转录,来调控氧化应激、炎症反应、细胞调等多个过程^[18-20]。已有研究证明,Nrf2/ARE通路过度激活可能与肿瘤耐药性相关。经检测发现,多药耐药的肺癌细胞中Nrf2活性升高,通过基因敲除实验沉默Nrf2表达后,细胞内多药耐药蛋白表达水平明显降低,提高了肺癌细胞对药物的敏感性^[21];葫芦巴碱可抑制非小细胞肺癌细胞内Nrf2激活及其核易位,进而增强肿瘤细胞对DDP和依托泊苷作用的敏感性^[22]。同样,本研究在LHZZ处理下HNE1细胞中Nrf2,ARE表达水平明显下调,而DDP与LHZZ联合作用细胞同时以Nrf2激活剂SFN处理下,Nrf2,ARE表达水平明显上调,并促进了肿瘤细胞增殖,抑制了肿瘤细胞凋亡。由此可见,LHZZ发挥协同作用的途径可能与抑制Nrf2/ARE途径有关。

本研究发现,在使用LHZZ处理后的HNE1细胞中,ROS水平明显升高,同时,Nrf2,ARE mRNA

相对表达水平明显下调,说明LHZZ抑制了Nrf2/ARE途径的激活,进而诱导氧化反应的发生,促进了NPC肿瘤细胞的凋亡。ROS水平与体内氧化还原平衡的之间密切相关,ROS产生过多,激活细胞相关信号通路能触发凋亡发生,进而影响机体的相关生理病理过程^[23]。而在使用Nrf2激活剂莱菔硫烷处理HNE1细胞后,清除了细胞内ROS,同时抑制了细胞凋亡的发生。

综上所述,LHZZ能够通过阻碍Nrf2/ARE途径的激活来诱导氧化反应,增强了NPC细胞对DDP诱导凋亡的敏感性。然而,该过程中LHZZ作用NPC的具体靶标需进一步探究,以期对NPC的临床治疗提供实验参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CHEN Y P, CHAN A T C, LE Q T, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2019, 394 (10192):64.
- [2] NG W T, TUNG S Y, LEE V, et al. Concurrent-adjuvant chemoradiation therapy for stage III - IV B nasopharyngeal carcinoma-exploration for achieving optimal 10-year therapeutic ratio [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2018, 101(5):78.
- [3] MOON S H, CHO K H, LEE C G, et al. IMRT vs. 2D-radiotherapy or 3D-conformal radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma : survival outcome in a Korean multi-institutional retrospective study (KROG 11-06) [J]. *Strahlenther Onkol*, 2016, 192 (6) : 377-385.
- [4] LEE A W M, NG W T, CHAN J Y W, et al. Management of locally recurrent nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 79:101890.
- [5] LIANG S B, CHEN L S, YANG X L, et al. Influence of tumor necrosis on treatment sensitivity and long-term survival in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Radiother Oncol*, 2020, 18:219-225.
- [6] 张力军,陈曦,冯世,等. 基于系统药理学探索裸花紫珠有效成分的作用机制[J]. *药物评价研究*, 2018, 41 (10):1759-1769.
- [7] FU H Z, MA Y Y, MA S C, et al. Two new iridoid glycosides from *Callicarpa nudiflora* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2020, 22(3):264-270.
- [8] 占丽丽,叶先文,张敏,等. 紫珠属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. *江西中医药*, 2020, 51(8) : 66-73.

- [9] WU Y S, SHI L, LIU X G, et al. Chemical profiling of *Callicarpa nudiflora* and its effective compounds identification by compound-target network analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 182: 113110.
- [10] 陈学武, 姜靖雯, 张永杰. 海南五指山裸花紫珠通过 IL-6/STAT3 信号通路对结肠癌体外耐药的逆转作用及其机制研究 [J]. *中药材*, 2020, 43(9): 2269-2273.
- [11] 张仲, 罗贤强, 周金娜, 等. 正交试验优化裸花紫珠水提取工艺及外用止血作用的评估 [J]. *中国现代中药*, 2018, 20(6): 734-737.
- [12] LAM W K J, CHAN J Y K. Recent advances in the management of nasopharyngeal carcinoma [J]. *F1000Res*, 2018, dio: 10.12688/f1000research.15066.1.
- [13] 黄岚晖, 韦小娜, 刘俊波. 化疗联合放射治疗在局部晚期鼻咽癌中的应用效果 [J]. *微创医学*, 2020, 15(3): 335-337.
- [14] ZHANG Y, CHEN L, HU G Q, et al. Gemcitabine and cisplatin induction chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(12): 1124-1135.
- [15] VERMORKEN J B, STÖHLMACHER-WILLIAMS J, DAVIDENKO I, et al. Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(8): 697-710.
- [16] SHELTON P, JAISWAL A K. The transcription factor NF-E2-related factor 2 (nrf2): a protooncogene? [J]. *FASEB J*, 2013, 27(2): 414-423.
- [17] GONG M, LI Y, YE X, et al. Loss-of-function mutations in KEAP1 drive lung cancer progression via KEAP1/NRF2 pathway activation [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 98.
- [18] TIAN Y, WU K, LIU Q, et al. Modification of platinum sensitivity by KEAP1/NRF2 signals in non-small cell lung cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1): 83.
- [19] TAGUCHI K, MOTOHASHI H, YAMAMOTO M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution [J]. *Gene Cell*, 2011, 16(2): 123-140.
- [20] YAMAZAKI H, TANJI K, WAKABAYASHI K, et al. Role of the Keap1/Nrf2 pathway in neurodegenerative diseases [J]. *Pathol Int*, 2015, 65(5): 210-219.
- [21] JI L, LI H, GAO P, et al. Nrf2 pathway regulates multidrug-resistance-associated Protein 1 in small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63404.
- [22] FOUZDER C, MUKHUTY A, MUKHERJEE S, et al. Trigonelline inhibits Nrf2 via EGFR signalling pathway and augments efficacy of Cisplatin and Etoposide in NSCLC cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2021, 70: 105038.
- [23] CHEN B, LU Y, CHEN Y, et al. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries [J]. *J Endocrinol*, 2015, 225(3): R83-R99.

[责任编辑 王鑫]