

# 化香树果序乙醇提取物调控 RAS/MAPK 通路对鼻咽癌细胞的影响

刘金坤<sup>1,2</sup>, 应敏<sup>3</sup>, 敖利<sup>1</sup>, 涂维<sup>4,5</sup>, 蔡红兵<sup>4,5\*</sup>

- (1. 重庆市中医院, 重庆 400021; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137;  
3. 重庆大学附属肿瘤医院, 重庆 400030; 4. 南方医科大学, 广州 510515;  
5. 南方医科大学中西医结合医院, 广州 510315)

**[摘要]** 目的:研究化香树果序醇提取物(ethanol extract of infructescence of *Platycarya strobilacea*, EPS)的对鼻咽癌 CNE1, CNE2 细胞的药理作用机制。方法:以鼻咽癌 CNE1, CNE2 细胞为研究对象,以 EPS 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g·L<sup>-1</sup> 干预,设空白组,孵育 24 h 后,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测 EPS 对 CNE1, CNE2 细胞活力的影响。用 1.0 g·L<sup>-1</sup> EPS 处理 CNE1, CNE2 细胞 24 h,倒置显微镜观察细胞形态变化,透射电镜观察细胞器的变化。流式细胞仪检测细胞凋亡程度, RNA 高通量测序检测 EPS 处理后细胞中的差异基因。蛋白免疫印迹法检测 HRas proto-oncogene (HRAS) 蛋白细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) 和 c-Fos proto-oncogene (c-Fos) 蛋白表达水平。结果:与空白组比较, EPS 能明显抑制 CNE1, CNE2 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ), 且呈浓度依赖性。与空白组比较, EPS 明显诱导 CNE1, CNE2 细胞质出现大量空泡, 空泡相互融合, 不断增大, 最后细胞膜破裂, 透射电镜发现细胞核没有发生明显的变化, 溶酶体空泡化明显, 流式结果未发现明显凋亡, 与细胞 methuosis 死亡特征一致。高通量测序结果显示与癌蛋白 (RAS)/ 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路相关, 与空白组比较 HRAS, ERK1/2, c-Fos 蛋白表达降低, 磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2 (p-ERK1/2) 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。结论: EPS 可通过调控 RAS/MAPK 信号通路诱导人鼻咽癌细胞 CNE1, CNE2 发生 methuosis 死亡, 导致细胞相互融合, 细胞内出现大量空泡。

**[关键词]** 鼻咽癌; 化香树果序醇提取物; 丝裂原活化蛋白激酶; 巨泡化死亡

**[中图分类号]** R22; R242; R285.5; R2-031; R279 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0145-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181815

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180629.1107.011.html>

**[网络出版时间]** 2018-07-02 8:48

## Effect of Ethanol Extract of Infructescence of *Platycarya strobilacea* on Nasopharyngeal Carcinoma Cells Through RAS/MAPK Pathway

LIU Jin-kun<sup>1,2</sup>, YING Min<sup>3</sup>, AO Li<sup>1</sup>, TU Wei<sup>4,5</sup>, CAI Hong-bing<sup>4,5\*</sup>

- (1. Chongqing Traditional Chinese Medicine (TCM) Hospital, Chongqing 400021, China;  
2. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China;  
3. Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400030, China;  
4. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;  
5. TCM-Integrated Cancer Center of Southern Medical University, Guangzhou 510315, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the pharmacological mechanism of ethanol extract of infructescence of *Platycarya strobilacea* (EPS) treatment on CNE1 and CNE2 cells in nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Method:**

**[收稿日期]** 20171222(010)

**[基金项目]** 重庆市科委基础与前沿项目 (cste2017jcyjAX0369); 重庆市卫计委中医药科技项目 (ZY201702038); 广东省自然科学基金项目 (2016A030313724)

**[第一作者]** 刘金坤, 硕士, 执业药师, 从事中药抗肿瘤药理机制和中药新剂型研究, Tel: 023-67633702, E-mail: liujinkun007@163.com

**[通信作者]** \* 蔡红兵, 博士, 教授, 从事中西医结合抗肿瘤研究, Tel: 023-67633702, E-mail: zhiyin666666@126.com

NPC cells (CNE1 and CNE2) were taken as the research objects and treated with 0 (blank group), 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g·L<sup>-1</sup> for 24 h. The effect of EPS on viability of CNE1 and CNE2 cells were detected by (4, 5-dimethyl-2-thiazolyl) -2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay. After CNE1 and CNE2 cells were treated with 1.0 g·L<sup>-1</sup> EPS for 24 h, the morphological changes of the cells were observed by inverted microscope. The changes of organelles were observed by transmission electron microscopy (TEM). Flow cytometry was used to detect the apoptosis of CNE1 and CNE2 cells induced by EPS. The differential genes in the cells were detected by nucleotide high throughput sequencing, and the expression levels of HRas proto-oncogene (HRAS), extracellular regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) and c-Fos proto-oncogene (c-Fos) proteins were detected by Western blot (WB). **Result:** As compared with blank control group, EPS could significantly inhibit the growth of CNE1 and CNE2 cells in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). After being treated with EPS, CNE1 and CNE2 cells showed a large number of vacuoles, and the vacuoles became confluent with each other and became larger and larger. Finally, the cell membrane ruptured and the nucleus did not change obviously. EPS could not promote CNE1 and CNE2 cells apoptosis and NPC cells had obvious characteristic methuosis changes in the observation under phase contrast microscope. RNA sequencing results showed that renin-angiotensin system (RAS) /mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway was involved. WB results showed that as compared with the blank control group, EPS could reduce the protein expression levels of HRAS, c-Fos and ERK1/2, but increase the protein expression levels of p-ERK1/2 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** EPS can induce methuosis death in human nasopharyngeal carcinoma cells CNE1 and CNE2 through regulating RAS/MAPK signaling pathway, thus leading to confluence of cells and resulting in a large number of vacuoles.

[**Key words**] nasopharyngeal carcinoma; ethanol extract of infructescence of *Platycarya strobilacea*; mitogen-activated protein kinase; methuosis

鼻咽癌是源自于人鼻咽部上皮组织的恶性肿瘤,2012 年全球约有 86 700 新发病例和 50 800 名患者死亡<sup>[1]</sup>,我国 5 年内诊断为鼻咽癌患者达 13.85 万,且在南方省份高发(发病率为 30/10 万 ~ 50/10 万)<sup>[2]</sup>。目前鼻咽癌的临床治疗主要以放疗为主、化疗为辅的治疗模式,尚无特效药物。鼻咽癌原发部位隐蔽不易观察且早期症状不典型、分化程度低,极易出现淋巴结转移和血行转移<sup>[2]</sup>。因此,寻找新的药物和分子治疗靶点具有重要意义,从而提高鼻咽癌的治愈率和生存率。化香树为胡桃木科化香树属,产于黄河流域以及以南地区,又名必栗香、烧为香、杀虫鱼<sup>[3]</sup>。化香树果序中含有糖及其苷类、酚类和鞣质、黄酮类、生物碱、萜醌等化学成分<sup>[4-5]</sup>,具有抗肿瘤、抗炎、消肿止痛、清热解毒等多种功效<sup>[6-7]</sup>。前期研究发现化香树果序醇提物(EPS)能够抑制爱泼斯坦-巴尔二氏病毒(EBV)壳抗原的表达,对人鼻咽癌 CNE2 细胞具较强的细胞毒作用<sup>[8]</sup>。化香树果序多酚提取物显著抑制非小细胞肺癌 A549 细胞、肝癌 HepG2 细胞、结肠癌 HCT116 细胞等多种肿瘤细胞的生长<sup>[9]</sup>。EPS 的抗氧化成分阻碍了肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )诱导的核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的活化、趋化因子的诱导及单

核细胞在肠道炎症部位的黏附<sup>[10]</sup>;EPS 诱导人鼻咽癌细胞 CNE1, CNE2 发生 methuosis 死亡<sup>[11-12]</sup>,导致细胞内出现大量囊泡,囊泡不断累积、融合,最终细胞膜破裂细胞死亡,Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (RAC1)是 methuosis 死亡的关键靶点。本研究旨在探讨 EPS 诱导鼻咽癌细胞发生 methuosis 死亡的相关信号通路,筛选作用靶点,为鼻咽癌的防治、中药抗肿瘤资源开发等提供研究思路和方法借鉴,为化香树果序临床应用提供一定的理论基础。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人鼻咽癌 CNE1, CNE2 细胞由南方医科大学肿瘤研究所提供。CNE1 为鼻咽高分化鳞状细胞癌细胞系, CNE2 为鼻咽低分化鳞状细胞癌细胞系。

**1.2 药物** 化香树果序样品于 2016 年 8 月至 12 月采于陕西省汉中市略阳县破口驿镇大院子村,本地区属于秦岭山脉地区,具有大量化香树果序资源可开发利用。经重庆市中医院药剂科主任中药师敖利鉴定为胡桃科单叶化香树 *Platycarya strobilacea* 的果序。

**1.3 试剂** RPMI 1640 培养基,胎牛血清(Biological Industries 公司,批号分别为 01-100-1A,

04-001-1A); 0.25% 胰蛋白酶, 噻唑蓝 (MTT) (Sigma 公司, 批号分别为 T4049-500ML, M2128); Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 凋亡检测试剂盒, 磷酸酶抑制剂, 蛋白酶抑制剂 (南京凯基生物公司, 批号分别为 KGA101, KGP602, KGP603); 细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) (Cell Signaling Technology 公司, 批号 4695T); 磷酸化细胞外调节蛋白激酶 1/2 (p-ERK1/2), HRas proto-oncogene (HRAS) 蛋白抗体, c-Fos proto-oncogene (c-Fos) 蛋白抗体, 磷酸化 Fos (p-c-Fos) 蛋白抗体 (Abcam 公司, 批号分别为 ab76299, ab108602, ab429, ab43175); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH), 兔抗鼠二抗 (Proteintech Group 公司, 批号分别为 10494-1-AP, SA00001-2); 高灵敏度化学发光检测试剂盒 (康为世纪公司, 批号 CW0049)。

**1.4 仪器** ThermoPico17 型离心机, Thermo 3111 型 CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SB-100 型旋转蒸发器 (上海爱朗仪器有限公司); PL303 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); FACS Calibur 型流式细胞仪 (美国 BD Biosciences 公司); H-7650 型透射电镜 (日本日立公司); Mini-PROTEAN 型电泳仪及转膜仪, ChemiDoc XRS + 型化学发光仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物提取** 称取化香树果序 4.5 kg, 去除种子后粉碎, 过 80 目筛, 药粉加 3 倍量 95% 乙醇, 超声提取 3 次, 每次 0.5 h。用旋转蒸发器移去溶剂, 浓缩稠膏放入低温烘箱中至浸膏总质量不再变化, 得化香树果序乙醇总提取物 180 g<sup>[11]</sup>, 得率为 4.0%。

**2.2 药物配制** 称取化香树果序醇提物浸膏 200 mg, 加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶解为 20 g·L<sup>-1</sup> 的母液, 并用 0.22 μm 滤器过滤除菌, 保存于 4 °C 冰箱备用。空白组加入细胞培养液、实验组加入 1.0 g·L<sup>-1</sup> 化香树果序醇提物, 并进行后续实验。

**2.3 MTT 比色法检测细胞增殖** 取对数生长期的 CNE1, CNE2 细胞, 以 4 × 10<sup>3</sup> 个/孔接种于 96 孔板铺板, 培养 24 h, 分别加入 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 g·L<sup>-1</sup> EPS 处理细胞 24 h, 每孔加入 0.5 g·L<sup>-1</sup> MTT 100 μL。置 37 °C 细胞培养箱中继续培养 4 h, 弃去上清, 每孔加入 DMSO 20 μL, 振荡或摇晃 5 ~ 10 min 至结晶完全溶解。在 490 nm 下用酶标仪检测吸光度 A, 每组实验至少 5 个复孔, 实验均重复 3 次。

**2.4 观察细胞形态和细胞器变化** CNE1, CNE2

(2.4 × 10<sup>5</sup> 个/孔) 细胞接种于 6 孔培养板, 进行 EPS (1.0 g·L<sup>-1</sup>) 处理, 设空白组, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 倒置显微镜观察培养 12, 24 h 后各组细胞的形态变化。取处理细胞 24 h 后, 收集 5 × 10<sup>6</sup> 个细胞, 用 PBS 洗涤, 加 2.5% 戊二醛 1 mL 悬浮细胞, 经离心、漂洗、固定、脱水、包埋、烘烤后超薄切片, 醋酸铅铀染色, 透射电子显微镜观察并拍照。

**2.5 细胞凋亡率检测** 离心收集各组细胞, 收集细胞, 用预冷 PBS 洗涤细胞, 预冷 binding buffer 400 μL 悬浮细胞, 加入 Annexin V-FITC 5 μL, PI 10 μL 避光孵育 15 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡。

**2.6 高通量 RNA 测序筛选差异基因** CNE1, CNE2 细胞空白组, EPS (1.0 g·L<sup>-1</sup>, 24 h) 组样品提取 RNA, 反转录成 cDNA, 构建文库, 产生 DNA 簇, 采用 Illumina HiSeq2500 双端测序, 进行数据分析<sup>[13]</sup>。对得到的差异基因进行基因本体 (GO), 京都基因与基因组百科全书数据库 (KEGG) 分析, 确定 EPS 作用的靶基因及相关信号通路。

**2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 HRAS, ERK1/2, C-Fos 蛋白的表达** 细胞处理 24 h 后, 提取总蛋白, 调整蛋白浓度, 95 °C 煮沸 5 min 变性。浓缩胶恒压 80 V, 30 min; 分离胶恒压 100 V, 1 h; 湿法转膜, 恒流 300 mA, 2 h。孵育一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育 15 h, 二抗 (1:2 000) 孵育 1 h, 化学发光试剂盒检测, 使用 Image Lab 显影成像, 并对各组条带灰度值进行分析, 所有实验均至少重复 3 次。

**2.8 统计学分析** 使用 SPSS 23.0 软件进行数据处理, 计量分析用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多个样本均数比较用单因素方差分析, 组间比较用 LSD-t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 EPS 对鼻咽癌 CNE1, CNE2 细胞生长的影响** 与空白组比较, 随给药质量浓度的增加, EPS 给药组细胞存活率逐渐降低, 给药质量浓度从 0.25 g·L<sup>-1</sup> 开始, EPS 组 CNE1, CNE2 细胞存活率明显减低 (P < 0.05, P < 0.01), EPS 以浓度依赖性抑制 CNE1, CNE2 细胞的增殖。EPS 质量浓度为 1.0 g·L<sup>-1</sup> 时, 对 CNE1, CNE2 细胞的增殖抑制率显著高于空白组 (P < 0.01), 后续实验均选取 EPS 1.0 g·L<sup>-1</sup> 处理细胞。见表 1。

**3.2 EPS 对细胞形态和细胞器变化的影响** 与空白组比较, 1.0 g·L<sup>-1</sup> EPS 作用 CNE1, CNE2 细胞 12,

表 1 EPS 对 CNE1, CNE2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 1 Effect of EPS on cell survival rates in CNE1 and CNE2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ ) %

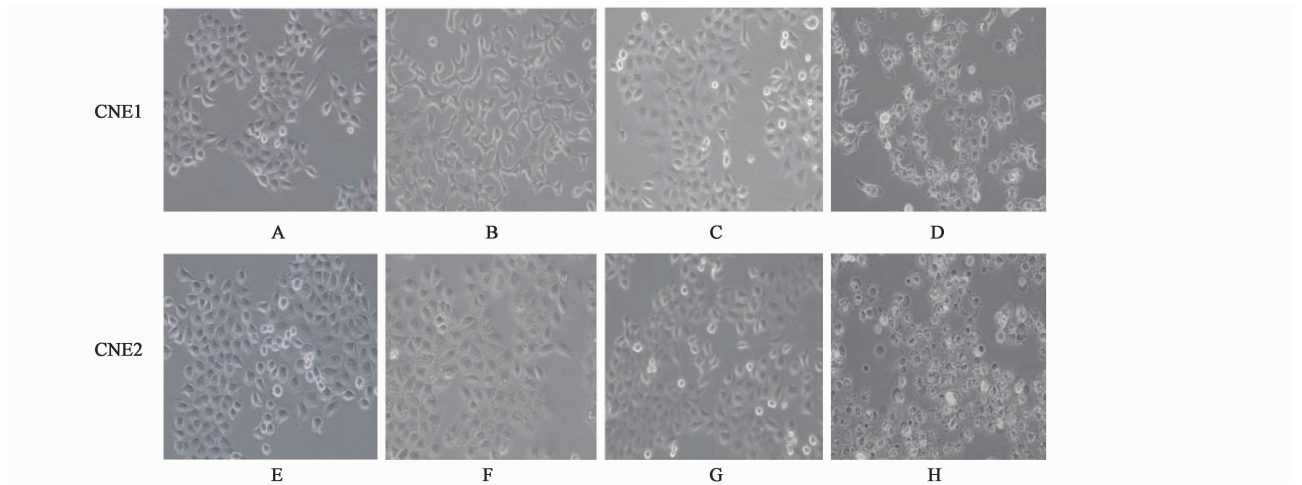
组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	CNE1	CNE2
空白	-	100	100
EPS	0.25	$91 \pm 4^{1)}$	$93 \pm 3$
	0.5	$75 \pm 3^{2)}$	$79 \pm 2^{1)}$
	1.0	$51 \pm 2^{2)}$	$51 \pm 4^{2)}$
	1.5	$37 \pm 1^{2)}$	$41 \pm 4^{2)}$
	2.0	$23 \pm 2^{2)}$	$27 \pm 4^{2)}$

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2, 3 同)。

24 h 后, 随着药物作用时间的延长, 细胞膜相互融合, 细胞质可见大量空泡, 空泡相互融合, 不断增大, 最后细胞膜破裂。见图 1, 2。

与空白组比较, 透射电镜观察发现 EPS 处理组出现大量囊泡, 细胞膜出现破损, 但是细胞核没有明显变化, 部分溶酶体呈现空泡化明显。与自噬、凋亡、坏死有明显区别, 符合细胞 methuosis 死亡的特征。见图 3。

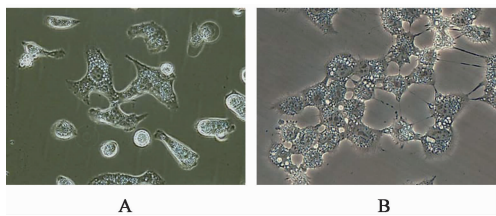
**3.3 EPS 对细胞凋亡的影响** EPS  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  作用于 CNE1, CNE2 细胞 24 h 后, 与空白组比较, 细胞凋亡率没有明显变化, 但由细胞膜和溶酶体破裂所形



A, E. 12 h 空白组; B, F. 12 h EPS 组; C, G. 24 h 空白组; D, H. 24 h EPS 组

图 1 EPS  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 CNE1, CNE2 细胞 12, 24 h 对细胞形态的影响 (倒置显微镜,  $\times 200$ )

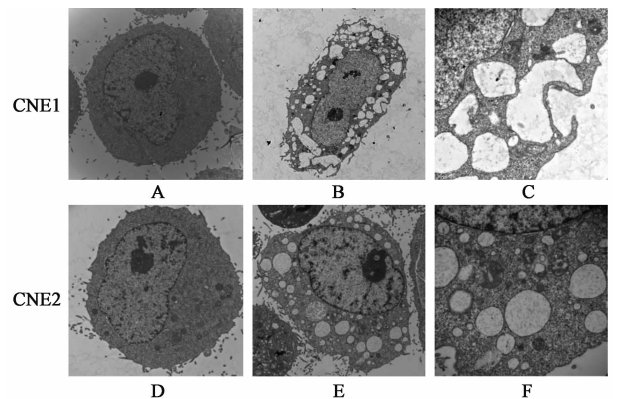
Fig. 1 Morphology of CNE1, CNE2 cells under inverted microscope after 12, 24 h treatment with EPS  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (inverted microscope,  $\times 200$ )



A. CNE1; B. CNE2

图 2 EPS  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 CNE1, CNE2 细胞 24 h 对细胞膜破裂的影响 (倒置显微镜,  $\times 400$ )

Fig. 2 Cells membrane rupture in CNE1 and CNE2 cells after 24 h treatment with EPS  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (inverted microscope,  $\times 400$ )



A, D. 空白组; B, E. EPS 组; C, F. EPS 组局部放大

图 3 EPS  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  处理细胞 24 h 对细胞超微结构的影响 (透射电镜,  $\times 10\ 000$ )

Fig. 3 Ultrastructure of cells were treated with EPS  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  for 24 h (transmission electron microscopy,  $\times 10\ 000$ )

成的细胞 Methuosis 死亡显著多于空白组 ( $P < 0.01$ ), 说明化香树果序醇提取物处理后, 细胞没有出现明显的凋亡。见表 2。

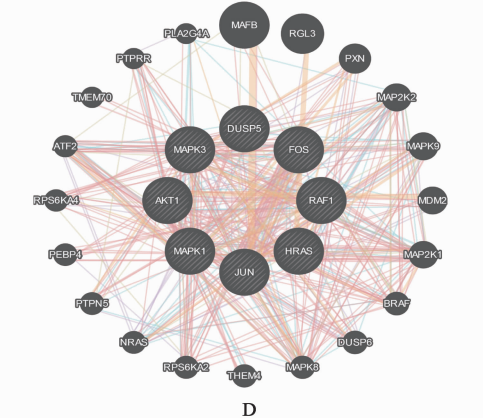
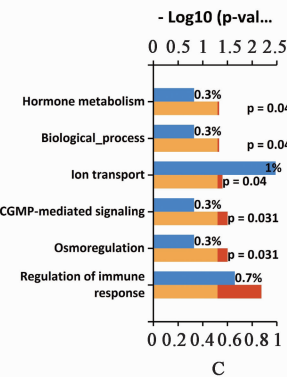
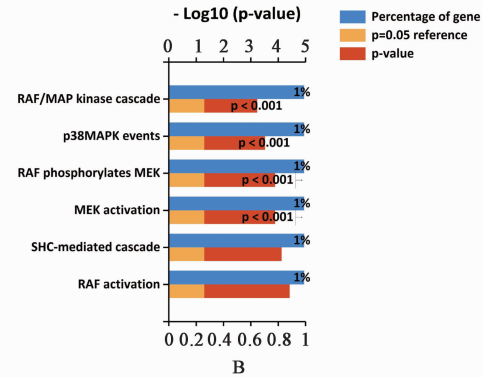
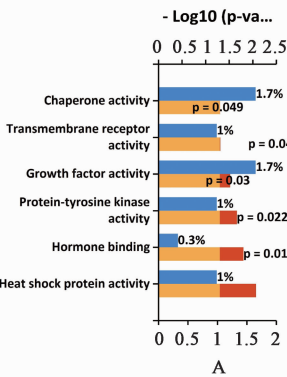
**3.4 EPS 对细胞 RNA 高通量测序筛选 EPS 作用靶基因和信号通路的影响** 筛选出 463 个差异基因和 325 个差异转录本。GO 数据库分析了差异基因的

分子功能、相关信号通路和生物过程, 发现主要集中于癌蛋白 (RAS)/丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)

表 2 EPS 1.0 g·L<sup>-1</sup> 作用 24 h 对 CNE1, CNE2 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of EPS (1.0 g·L<sup>-1</sup>) on CNE1 and CNE2 cells apoptosis rates ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) %

细胞	组别	凋亡率	methuosis 死亡率
CNE1	空白	0.33 ± 0.15	0.47 ± 0.21
	EPS	0.33 ± 0.11	35.43 ± 6.34 <sup>2)</sup>
CNE2	空白	0.34 ± 0.05	0.43 ± 0.15
	EPS	1.20 ± 0.96	19.60 ± 8.23 <sup>2)</sup>



A. 分子功能分析; B. 信号通路分析; C. 生物过程分析; D. 靶基因相互作用分析

图 4 RNA 高通量转录组测序

Fig. 4 Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis

3.5 EPS 对细胞 HRAS, ERK1/2, p-ERK1/2, c-Fos, p-Fos 蛋白表达的影响 与空白组比较, EPS 1.0 g·L<sup>-1</sup> 处理 CNE1, CNE2 细胞 24 h 后, HRAS, ERK1/2, Fos, p-c-Fos 蛋白表达量明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), p-ERK1/2 蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ), 这与前期的测序结果吻合, 说明 EPS 可诱导 ERK1/2 磷酸化表达水平升高。见图 7, 表 3。

#### 4 讨论

现代药理研究显示, 化香树果序中所含的没食子酸、鞣花酸和熊果酸具有抗氧化、抗癌和抗诱变活性的作用<sup>[14-15]</sup>。课题组前期研究发现化香树果序

通路 ( $P < 0.05$ ), 并对 RAS/MAPK 通路上的靶基因相互作用进行了分析。见图 4。

KEGG 信号通路分析发现 EPS 可以作用于细胞内的 RAS/MAPK 信号通路, 调控细胞内的转录因子激活蛋白-1 (AP-1) 的表达水平。见图 5。

STITCH (Version 5.0, <http://stitch.embl.de/>) 数据库检索发现没食子酸, 鞣花酸可以作用于丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8, JNK), JUN 蛋白 (JUN), c-Fos 蛋白等。见图 6。

挥发油对肝癌 HepG2 细胞、鼻咽癌 CNE2 细胞及宫颈癌 HeLa 细胞均表现出不同程度的抑制活性<sup>[16]</sup>, EPS 诱导鼻咽癌 CNE1, CNE2 细胞发生 methuosis 死亡<sup>[12]</sup>, 其中 RAC1 在基因和蛋白水平表达均增加。EHT1864 抑制细胞 RAC1 表达后, EPS 引起的细胞 methuosis 死亡现象消失。说明 RAC1 是 EPS 诱导人鼻咽癌细胞 CNE1, CNE2 发生 methuosis 死亡的关键靶点<sup>[12]</sup>。以前研究结果发现 methuosis 的死亡方式与 HRAS, RAS 癌基因家族成员 (RAB) 5, RAB7, 原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶-1 (Raf-1), ERK1/2 等存在联系。

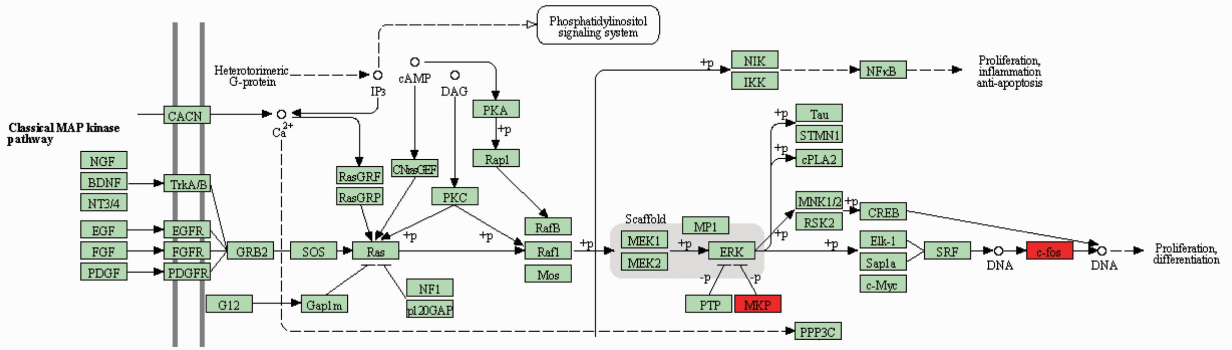
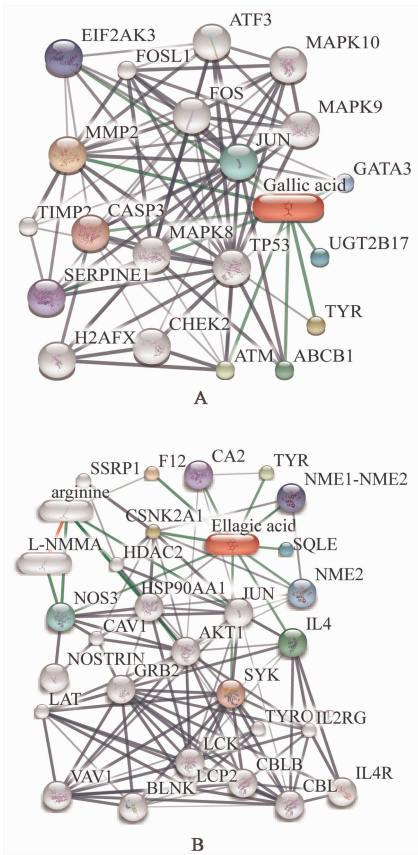
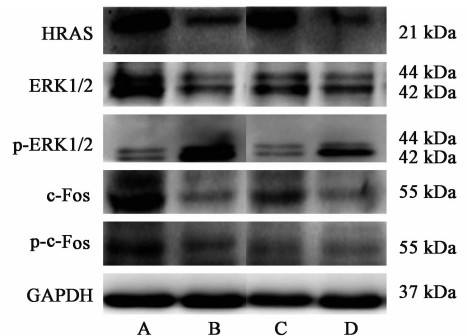


图 5 KEGG 信号通路  
Fig.5 KEGG signal path diagram



A. 没食子酸; B. 鞣花酸  
图 6 EPS 中没食子酸和鞣花酸作用靶蛋白  
Fig.6 Target protein of gallic acid and ellagic acid in EPS

以往的研究表明,表皮生长因子受体(EGFR)是鼻咽癌发生、发展、侵袭转移以及药物耐受的重要靶分子。EGFR 下游信号通路的活化与鼻咽癌恶性表型和侵袭转移存在密切关联。EGFR 属于 I 型受体酪氨酸激酶超家族。EGFR 和配体结合生成二聚体的形式,发生自身磷酸化,激活下游一系列信号通路。与 EGFR 相关的主要有两条信号通路,一是与增殖激活有关的 RAS/Raf/MAPK 信号通路<sup>[17-18]</sup>;



A. CNE1 空白组; B. CNE1 EPS 组; C. CNE2 空白组; D. CNE2 EPS 组  
图 7 EPS 1.0 g·L<sup>-1</sup> 处理 CNE1, CNE2 细胞 24 h 相关蛋白表达电泳  
Fig.7 Electrophoresis of proteins tested by Western blot in CNE1 and CNE2 cells after EPS (1.0 g·L<sup>-1</sup>, 24 h) treatment

另一条是与细胞移动性的增强有关的磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路<sup>[19-20]</sup>。RAS 蛋白为膜结合型的三磷酸鸟苷/二磷酸鸟苷 (GTP/GDP) 结合蛋白,定位于细胞膜内侧。Ras 蛋白有 4 种异构型, HRAS, N-RAS, K-RAS4A 和 K-RAS4B, 它们是 3 种基因的产物,其中 K-RAS4A 和 K-RAS4B 是同一基因不同剪接的结果<sup>[21]</sup>。Ras 蛋白在合成后,经过两种方式翻译后修饰,定位于细胞膜内侧。HRAS 基因激活导致 RAC1 蛋白表达增加, RAC1 通过刺激二磷酸腺苷核糖基化因子 (ARF6)-三磷酸鸟苷酶活化蛋白 (GAP), G 蛋白偶联受体激酶相互作用蛋白-1 (GIT-1) 蛋白,使 ARF6/GTP 蛋白功能减弱或消失,最终 ARF6 蛋白失活,巨胞饮小体不能回到细胞膜<sup>[22-24]</sup>。HRAS 也参与了 LAMP1 和 RAB7 诱导的核内体晚期大空泡的形成。Marieke 等<sup>[25]</sup> 研究表明, RAC1 通过 Armus 蛋白能够降低 RAB7 蛋白表达。Armus 蛋白特异性结合激活 RAC1 蛋白 C 端 TBC (Tre2/Bub2/Cdc16)/RAB-GAP 导致 RAB7 蛋白的失调。而 RAB7 蛋白的功能是

表 3 EPS 1.0 g·L<sup>-1</sup>处理 CNE1, CNE2 细胞 24 h 对蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of EPS(1.0 g·L<sup>-1</sup>) on of protein expressions of in CNE1, CNE2 cells of each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

细胞	组别	HRAS/GAPDH	ERK1/2/GAPDH	p-ERK1/2/GAPDH	c-Fos/GAPDH	p-c-Fos/GAPDH
CNE1	空白	0.21 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.29 ± 0.03
	EPS	0.07 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.85 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>1)</sup>
CNE2	空白	0.27 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.26 ± 0.03
	EPS	0.16 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>1)</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.25 ± 0.03

特异识别晚期胞内体等囊泡,介导晚期胞内体与溶酶体膜融合,RAB7 蛋白功能失常可能导致囊泡之间的相互融合,从而产生更大的囊泡,最终细胞膜破裂导致死亡<sup>[26]</sup>。

根据以上的研究结果,本研究推测化香树果序醇提物诱导鼻咽癌肿瘤细胞死亡的机制为药物刺激因子与细胞膜上的特异受体结合,可使受体形成二聚体,二聚体的受体使其自身酪氨酸激酶被激活;受体上磷酸化的酪氨酸又与位于胞膜上的生长因子受体结合蛋白 2(Grb2)的 Src 同源结构域 2(SH2)结构域相结合,而 Grb2 的 SH3 结构域则同时与鸟苷酸交换因子(SOS)结合,后者使小分子鸟苷酸结合蛋白 RAS 的 GDP 解离而结合 GTP,从而激活 RAS;激活的 RAS 与丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶 RAF-1 的氨基端结合,通过 RAF-1 激活信号转导丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶,并通过磷酸化激活 ERK1/2(即 MAPK1/3)。ERK1/2 激活后转位进入细胞核,磷酸化胞浆蛋白和一些核内的转录因子如 c-Fos, c-JUN 等(此处本实验主要检测了 c-Fos),从而参与细胞增殖与分化的调控。另外,ERK1/2 还可以磷酸化 RAS/MAPK 通路的上游蛋白如 SOS, Raf-1, MAPK/ERK 激酶(MEK)等,进而对该通路进行负反馈调节。ERK1/2 可磷酸化胞浆内的细胞骨架成分,如微管相关蛋白 1(microtubule-associated protein 1, MAP-1), MAP-2, MAP-4, 参与细胞形态调节、细胞骨架的重分布,导致相邻细胞发生膜融合,细胞的形态发生相应变化<sup>[25]</sup>。其详细机制还需要进一步分析。

[参考文献]

[1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.

[2] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.

[3] 刘永新, 林余霖. 本草纲目彩色图鉴[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2006:321.

[4] 徐荣章. 天目山木本植物图鉴[M]. 北京:中国林业出版社, 1989:43.

[5] 贾晓妮, 王军宪, 成昱霖, 等. 化香树果序化学成分研究[J]. 中药材, 2016, 39(8):1786-1788.

[6] 付丽香, 周焕弟, 温燕, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯烷基化衍生物合成及其体外抗癌活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2):38-42.

[7] 王茂义, 王军宪, 贾晓妮, 等. 化香树果序挥发油化学成分分析[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(9): 736-738.

[8] 李亚萍, 莫志贤, 曹露晔. 化香树果序对 EB 病毒抗原表达的抑制作用及其细胞毒作用[J]. 今日药学, 2014, 24(2):93-95.

[9] ZHANG L, WANG Y, XU M. *In vitro* antitumor activities of *Platycarya strobilacea* sieb et zucc infructescence extracts[J]. Trop Jpharm Res, 2014, 13(6):849-854.

[10] Babu D, Lee J S, Park S Y, et al. Involvement of NF- $\kappa$ B in the inhibitory actions of *Platycarya strobilacea* on the TNF- $\alpha$ -induced monocyte adhesion to colon epithelial cells and chemokine expression [J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(6):727-735.

[11] 朱俊谕, 涂维, 曾超, 等. 化香树果序乙醇提取物诱导 CNE1、CNE2 细胞发生 Methuosis 死亡的机制[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(6):827-832.

[12] 蔡红兵, 刘金坤, 范钦, 等. 巨泡式死亡:一种新的细胞死亡方式[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(12):1844-1847.

[13] Reuter J A, Spacek D V, Snyder M P. High-throughput sequencing technologies[J]. Mol Cell, 2015, 58(4): 586-597.

[14] 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.

[15] SUN L, LI B, SU X, et al. An ursolic acid derived small molecule triggers cancer cell death through hyperstimulation of micropinocytosis[J]. J Med Chem,

- 2017, 60(15):6638-6648.
- [16] 邓毅, 李欣, 邵萌, 等. 化香树果序挥发油的气相色谱-质谱联用分析及体外抗肿瘤活性研究[J]. 中医药导报, 2013, 19(11):80-82.
- [17] Battle E, Sancho E, Francí C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2):84-89.
- [18] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100(1):57-70.
- [19] Vetter I R, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions[J]. *Science*, 2001, 294(5545):1299-1304.
- [20] Amatar A A, Poulikakos P I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(12):928-942.
- [21] Malumbres M, Barbacid M. Ras oncogenes: the first 30 years[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6):459-465.
- [22] Bhanot H, Young A M, Overmeyer J H, et al. Induction of nonapoptotic cell death by activated Ras requires inverse regulation of Rac1 and Arf6[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(10):1358-1374.
- [23] Maltese W A, Overmeyer J H. Methuosis: nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(6):1630-1642.
- [24] 温丽娜, 韩宗强. 以 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 为靶点的小檗碱对人结肠癌细胞 SW620 的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12):143-149.
- [25] Marieke A F, Maximiano F C, Smolarczyk K, et al. Armut is a Rac1 effector that inactivates Rab7 and regulates E-Cadherin degradation[J]. *Curr Bio*, 2010, 20(3):198-208.
- [26] Trabbic C J, Overmeyer J H, Alexander E M, et al. Synthesis and biological evaluation of indolyl-pyridinyl-propenones having either methuosis or microtubule disruption activity[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(5):2489-2512.

[责任编辑 张丰丰]