

黄芪多糖对人鼻咽癌CNE-1细胞的放疗增敏及 上皮间质转化的作用

张树聪¹, 蔡治祥², 王学涛³, 李志英⁴, 宋慧胜^{4*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006;
2. 广州市番禺中心医院, 广州 511400; 3. 广州中医药大学第二附属医院, 广州 510006;
4. 广州医科大学第六附属医院 清远市人民医院, 广东 清远 511518)

[摘要] 目的:采用黄芪多糖(APS)与放射治疗(IR)联用,研究APS对人鼻咽癌CNE-1细胞的放疗敏感性及其上皮间质转化(EMT)的作用机制。方法:采用细胞计数(CCK-8)法检测不同质量浓度APS(0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 g·L⁻¹)对CNE-1细胞的细胞毒性;克隆形成实验计算12.5 g·L⁻¹ APS与不同放射剂量(0, 2, 4, 6 Gy)联用后对CNE-1细胞的存活分数(SF),利用线性二次方程数学模型(LQ)根据SF值绘制放射敏感曲线;细胞划痕和transwell小室实验分别检测各组细胞的迁移和侵袭能力;流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞的EMT标记物、凋亡标记物以及蛋白激酶B/细胞外调节蛋白激酶(Akt/ERK)通路蛋白的表达水平。结果:克隆形成实验和放射敏感曲线结果表明,非毒性剂量12.5 g·L⁻¹ APS与4 Gy放射剂量联合给药可以明显增加CNE-1细胞的放疗敏感性;与空白组及IR组比较,APS与IR联用可以抑制CNE-1细胞的迁移和侵袭能力($P<0.05$),明显增加CNE-1细胞的凋亡率($P<0.05$)。与空白组及IR组比较,APS与IR联用可以显著下调间质型钙黏蛋白(N-cadherin), p-Akt和p-ERK蛋白表达水平,明显上调上皮型钙黏蛋白(E-cadherin), B淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax)和半胱天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达水平($P<0.05$)。结论:APS与IR联用可以抑制CNE-1细胞的迁移和侵袭,增加放疗引起的细胞凋亡,其可能通过抑制EMT和Akt/ERK通路有关。

[关键词] 黄芪多糖; CNE-1细胞; 放疗增敏; 上皮间质转化; 迁移; 细胞凋亡

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0059-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201967

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200727.1338.018.html>

[网络出版日期] 2020-7-27 13:39

Effect of Astragalus Polysaccharide on Radiosensitivity and Epithelial-mesenchymal Transition of Human Nasopharyngeal Carcinoma CNE-1 Cells

ZHANG Shu-cong¹, CAI Zhi-xiang², WANG Xue-tao³, LI Zhi-ying⁴, SONG Hui-sheng^{4*}

(1. The Second Clinical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, China;
3. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
4. Qingyuan People's Hospital, The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan 511518, China)

[Abstract] **Objective:** Astragalus polysaccharide (APS) was used in combination with ionizing radiation (IR) to investigate the mechanism of APS on the radiosensitivity of human nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cells and the epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) was used

[收稿日期] 20200105(019)

[基金项目] 广东省自筹经费类科研计划项目(2017ZC0165)

[第一作者] 张树聪,在读硕士,从事中西医结合防治肿瘤研究, E-mail: shucongzhang123@163.com

[通信作者] *宋慧胜,副主任医师,从事肿瘤放射治疗临床研究, E-mail: 13824940897@163.com

to detect the cytotoxicity of different concentrations of APS (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) on CNE-1 cells. Colony formation assay was used to calculate the survival fraction (survival fraction, SF) of CNE-1 cells treated with 12.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ APS combined with different radiation doses (0, 2, 4, 6 Gy). The linear quadratic equation mathematical model (LQ) was used to draw the radiosensitivity curve according to SF value. Cell scratch and transwell chamber test were used to detect the migration and invasion ability of cells in each group. The apoptosis of cells in each group was detected by flow cytometry, Western blot was used to detect the expressions of EMT markers, apoptosis markers and protein kinase B/extracellular regulated protein kinases (Akt/ERK) pathway proteins in each group. **Result:** The results of colony formation assay and radiosensitivity curve showed that the combination of non-toxic dose of 12.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ APS and radiation dose of 4 Gy could significantly increase the radiosensitivity of CNE-1 cells. Compared with blank group and IR group, APS combined with IR could significantly inhibit the migration and invasion of CNE-1 cells ($P<0.05$), and increase the rate of apoptosis ($P<0.05$). In addition, compared with the blank group and the IR group, APS combined with IR could significantly down-regulate the expressions of N-cadherin, p-Akt and p-ERK, and significantly up-regulate the expressions of E-cadherin, Bax and Caspase-3 ($P<0.05$). **Conclusion:** APS combined with IR can inhibit the migration and invasion of CNE-1 cells, and increase the apoptosis induced by radiotherapy, which may be related to the inhibition of EMT and Akt/ERK pathway.

[Key words] astragalus polysaccharides; CNE-1 cells; radiosensitization; epithelial-mesenchymal transition; migration; apoptosis

鼻咽癌是一种发生于鼻咽腔顶部和侧壁的恶性上皮性肿瘤,在全球范围内每年大约新增鼻咽癌病例13万,约有7万人死于鼻咽癌,分别占全球癌症发病率和死亡率的0.7%和0.8%^[1]。鼻炎癌具有明显的地域性发病差异,在我国的南部地区最为常见,中国鼻咽癌的发病率和死亡率分别占全球的39%和41%^[2]。由于鼻咽的解剖位置隐蔽,结构复杂且其病理分型多以非角化癌为主,对放射治疗较为敏感,早期鼻咽癌患者放疗后5年总体生存率可达80%以上,然而放疗只有局部治疗作用,大约30%的鼻咽癌患者治疗后发现有远处转移或局部恶化^[3-4]。目前,靶向药物和同步放化疗(综合治疗)是针对晚期转移性鼻咽癌患者的主要治疗方法,但其增加了毒副作用等不良反应,治疗价格昂贵,患者的临床预后和生存质量较差^[5]。因此,寻找疗效好毒副作用低,具有抗转移的放疗增敏剂对于鼻咽癌患者的治疗具有非常重要的意义。

大量的研究表明,上皮间质转化(EMT)在肿瘤的发展和转移中发挥着重要的作用,肿瘤细胞发生EMT时会失去其上皮特征,获得更具有侵袭和转移能力的间质特征^[6]。黄芪多糖(APS)是豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪根的主要有效成分之一,具有很高的研究和经济价值,APS具有增强免疫系统、降血糖、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等药理活性^[7-8]。相关研究表明,APS可以明显缓解癌症化疗和放疗患者的

恶心呕吐、疲劳和疼痛等不良反应,并且与化疗药物联用具有协同作用^[9-11]。目前国内外关于APS对鼻咽癌细胞的放疗增敏的作用及其机制研究尚未见报道。本研究拟探讨APS与放疗联用后对人鼻咽癌CNE-1细胞的增殖、迁移、凋亡和EMT的作用机制,为临床上应用APS辅助治疗鼻咽癌提供实验基础。

1 材料

1.1 细胞株 人鼻咽癌CNE-1细胞株由中山大学药学院馈赠,本文实验均采用传代20代以内的CNE-1细胞。

1.2 药品与试剂 APS冻干粉(美伦生物科技有限公司,批号0080A);二甲基亚砜(美国MP公司,批号6352K);RPMI 1640培养基,青霉素-链霉素,胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为9115002,1430518,42G5180K);细胞增殖毒性检测(CCK-8)试剂盒(日本同仁化学研究所,批号KQ810);transwell小室(美国Corning公司,批号353086);Annexin V/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号20180530);兔抗人 β -肌动蛋白(β -actin),上皮型钙黏蛋白(E-cadherin),间质型钙黏蛋白(N-cadherin),B淋巴瘤细胞瘤-2相关X(Bax),半胱天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),蛋白激酶B(Akt),磷酸化(p)-Akt,细胞外调节蛋白激酶(ERK),p-ERK一抗(美国Cell

Signaling Technology公司,批号分别为4,13,12,6,10,8,6,10,12);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(武汉 Abclonal公司,批号9300014001)。

1.3 仪器 HERAcell 240i型二氧化碳培养箱(美国 Thermo公司);MIT-2型倒置相差显微镜(日本 Olympus公司);SW-CJ-2F型净化工作台(苏州净化设备有限公司);PRIMUS H型直线加速器(德国 Siemens公司);iMark型酶标仪,Powerpac300型垂直电泳仪(美国 Bio-Rad公司);BD FACSCanto II型细胞流式仪(美国 BD公司);Tanon-5200型全自动化学发光凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人鼻咽癌细胞株 CNE-1 使用含 10%胎牛血清,1%青-链霉素混合液的 RPMI 1640 培养基于 37 °C 5%CO₂培养箱中培养。

2.2 药物配制 APS冻干粉用二甲基亚砷配制成 20 g·mL⁻¹母液,0.22 μm 微孔滤膜过滤后置 -20 °C 冰箱保存备用。使用时用 RPMI 1640 培养基稀释至相应的浓度即可。

2.3 CCK-8 实验检测 APS 对 CNE-1 细胞的增殖活性 取对数生长期的细胞以每孔 3×10³ 个细胞 100 μL 接种于 96 孔板,培养过夜,各孔加入 APS(0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 g·L⁻¹) 100 μL, 每组 5 个复孔,培养箱中继续培养 24 h 或 48 h; 每组加入 CCK-8 溶液 10 μL, 培养箱中继续培养 2~3 h, 于酶标仪 450 nm 处测定各组吸光度 A, 并计算各组细胞活性。

2.4 放射线照射 细胞培养板采用 6 MV 直线加速器 X 射线进行照射细胞时,细胞板上放置 1.5 cm 硅胶补偿膜,吸收剂量率为 250 cGy·min⁻¹,总照射剂量分别为 0, 2, 4, 6 Gy。照射后将细胞放回培养箱中继续培养。

2.5 克隆形成实验检测细胞放射敏感性 取对数生长期的细胞以每孔 500 个细胞接种于 6 孔板中,培养过夜,将细胞分为空白组,APS 组,不同剂量(2, 4, 6 Gy)放疗(IR)组,APS+IR 联用组。培养箱中培养 2 周左右,当培养板中出现肉眼可见集落形成时,终止培养,弃去培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,4%多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 3 次,用稀释后 0.1%的结晶紫染色 15 min,流水洗去染液,干燥后计算各组克隆形成细胞数。首先计算各组相对克隆率=药物组克隆形成数/空白组克隆形成数×100%;计算各组 PE(接种效率),为细胞未受照射时,形成的实际克隆形成数与原接种细胞数之比;

采用 PE 值计算 SF 值(细胞克隆存活分数)=克隆形成数/(接种细胞数×PE);并以横坐标为辐射剂量(0, 2, 4, 6 Gy),纵坐标为 SF,采用 GraphPad Prism 6 软件采用线性二次方程数学模型(LQ),公式为 SF=e^{-αD-βD²},绘制 SF 对辐射剂量的放射敏感曲线图,并求出 IR 组和 APS+IR 组的放射生物学参数 α 和 β 的比值,比值较大的细胞修复能力较弱,放射敏感性越高,反之亦然^[12-13]。

2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 取对数生长期的细胞以每孔 5×10⁵ 个细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长融合达 90% 以上,采用 10 μL 的枪头在每孔中间划出一道笔直的竖线, PBS 洗 3 遍,尽量洗去脱落的细胞,此时记为 0 h,拍照;然后将细胞分为空白组,APS 组,IR 组,APS+IR 联用组,细胞放入培养箱继续培养 24 h,用倒置显微镜观察并拍摄各组细胞的迁移状况。

2.7 transwell 小室实验检测细胞侵袭能力 取对数生长期的细胞用含 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基制成单细胞悬液,以每孔 3×10⁴ 个细胞 200 μL 接种于 transwell 小室的上室中,然后将细胞分为空白组,APS 组,IR 组,APS+IR 联用组;transwell 下室中加入含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 800 μL,培养箱中培养 48 h, PBS 洗 3 次,4%多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 3 次,用棉签轻轻擦去 transwell 小室上室中的 Matrigel 胶和细胞, PBS 洗干净,待风干后,用倒置显微镜观察并拍摄各组细胞的侵袭状况。

2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 取对数生长期的细胞以每孔 5×10⁵ 个细胞 2 mL 接种于 6 孔板中,将细胞分为空白组,APS 组,IR 组,APS+IR 联用组,培养箱中培养 48 h,根据 Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒检测说明书,各组使用 Annexin V-FITC 和 PI 溶液避光染色 15 min,采用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 取对数生长期的细胞以每孔 3×10⁵ 个细胞接种于 6 孔板中,将细胞分为空白组,APS 组,IR 组,APS+IR 联用组,培养 48 h,使用含 1% 蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上提取细胞总蛋白后,根据 BCA 试剂盒说明书定量各组蛋白浓度,然后将各组蛋白样品 30 μg 进行 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品,湿转法转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入一抗 E-cadherin, N-cadherin, Bax, Akt, p-Akt, ERK(1:1 000); Caspase-3, p-ERK

(1:500); β -actin(1:3000),4℃孵育过夜,加入二抗(1:5000)室温孵育1h,化学发光法显影,运用全自动化学发光图像分析系统对蛋白条带进行分析,检测蛋白表达情况。

2.10 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件对数据进行分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用单因素方差分析比较组间差异,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 APS对鼻咽癌CNE-1细胞增殖的影响 与空白组比较,(6.25,12.5 g·L⁻¹)处理CNE-1细胞24,48h,CNE-1细胞活性降低,但差异无统计学意义,APS(≥ 25 g·L⁻¹)处理24,48h,CNE-1细胞活性明显降低($P<0.05$),具有一定的时间-浓度依赖性。为了更好地研究APS与放疗联用对鼻咽癌CNE-1细胞的放疗增敏的作用,本研究选取杀伤作用较弱的最大非毒性质量浓度APS(12.5 g·L⁻¹)进行后续联合放疗给药实验。见表1。

表1 APS对CNE-1细胞生长抑制的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Inhibitory effect of APS on growth of CNE-1 cells($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	抑制率/%	
		24 h	48 h
空白	-	0.67±1.14	0.57±0.67
APS	6.25	2.33±1.53	2.99±1.72
	12.5	3.63±1.57	4.13±1.63
	25	13.67±3.06 ¹⁾	18.24±4.02 ¹⁾
	50	24.33±4.04 ¹⁾	30.33±5.03 ¹⁾
	100	38.92±4.48 ¹⁾	47.33±3.06 ¹⁾
	200	63.67±3.79 ¹⁾	70.33±3.51 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$ 。

3.2 APS对鼻咽癌CNE-1细胞放疗敏感性的影响

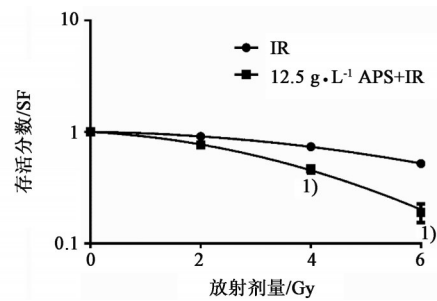
与空白组和IR组比较,APS与不同放射剂量(2,4,6 Gy)联用后的细胞克隆形成率明显降低($P<0.05$);此外,根据线性二次方程数学模型(LQ)绘制的放射敏感曲线,分别求得IR和APS+IR两组的放射生物学参数 α/β 为0.856和1.752,可知APS与放疗联用后,放射生物学参数 α/β 值明显增大,放疗敏感性显著增强;根据拟合曲线图可知,与IR组比较,100 g·L⁻¹APS与4或6 Gy放射剂量联合给药,能够明显增加对CNE-1细胞的放疗敏感性($P<0.05$)。因此,本研究采用12.5 g·L⁻¹APS与4 Gy放射剂量联合给药进行后续实验。见表2,图1。

表2 APS对CNE-1细胞克隆能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of APS on cloning rate of CNE-1 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	相对克隆形成率/100%空白
空白	-	100.09±0.24
IR	2 Gy	89.67±3.51 ¹⁾
	4 Gy	71.62±3.22 ¹⁾
	6 Gy	51.11±3.57 ¹⁾
APS	12.5	93.94±5.82
APS+IR	12.5+2 Gy	74.33±4.04 ^{1,2)}
	12.5+4 Gy	45.16±4.03 ^{1,3)}
	12.5+6 Gy	18.39±3.49 ^{1,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与2 Gy组比较²⁾ $P<0.05$;与4 Gy组比较³⁾ $P<0.05$;与6 Gy组比较⁴⁾ $P<0.05$ 。



与IR组比较¹⁾ $P<0.05$

图1 线性二次方程数学模型放射敏感曲线

Fig. 1 Radiosensitivity curve of linear quadratic equation mathematical model

3.3 APS联合放疗对鼻咽癌CNE-1细胞迁移的影响

在划痕24 h空白组细胞的伤口已经接近愈合状态,与空白组比较,APS组与IR组CNE-1细胞的迁移能力减小,但差异无统计学意义;与空白组,APS组和IR组比较,APS+IR组可明显抑制CNE-1细胞的迁移能力($P<0.05$)。见表3,图2。

表3 APS及IR对CNE-1细胞迁移的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

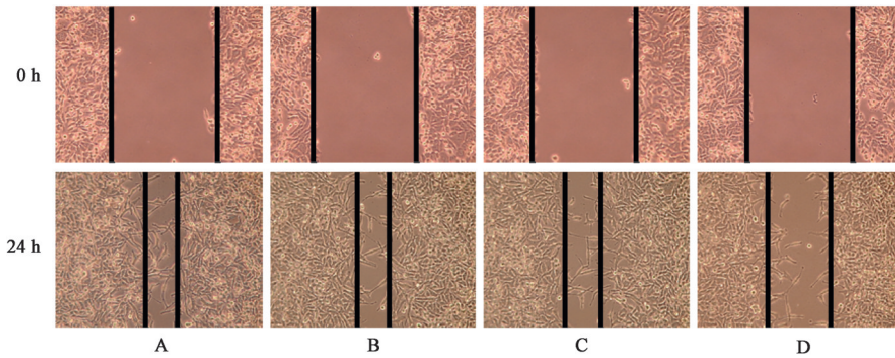
Table 3 Effect of APS and IR on migration of CNE-1 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	相对迁移率 /100%空白
空白	-	100.33±2.52
APS	12.5	96.33±3.21
IR	4 Gy	92.76±5.85
APS+IR	12.5+4 Gy	69.06±5.65 ^{1,2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与APS组比较²⁾ $P<0.05$;与IR组比较³⁾ $P<0.05$ (表4~7同)。

3.4 APS联合放疗对鼻咽癌CNE-1细胞侵袭的影响

空白组CNE-1细胞穿过Matrigel胶的细胞数量



A.空白组;B.APS组;C.IR组;D.APS+IR组(图3~5同)

图2 APS及IR对CNE-1细胞迁移的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 2 Effect of APS and IR on migration of CNE-1 cells(invert microscope, ×100)

较多,与空白组比较,APS组CNE-1细胞的侵袭能力下降,但差异无统计学意义,IR组和APS+IR组可以明显抑制CNE-1细胞的侵袭能力($P<0.05$);与APS组和IR组比较,APS+IR组CNE-1细胞的侵袭能力明显降低($P<0.05$)。见表4,图3。

表4 APS及IR对CNE-1细胞侵袭的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of APS and IR on invasion of CNE-1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	相对侵袭率/%
空白	-	100.67±2.08
APS	12.5	93.86±3.01
IR	4 Gy	81.88±6.82 ¹⁾
APS+IR	12.5+4 Gy	55.33±9.45 ^{1,2,3)}

3.5 APS联合放疗对鼻咽癌CNE-1细胞凋亡的影响 与空白组比较,APS组的凋亡率增加,但差异无统计学意义,IR组和APS+IR组的凋亡率明显增加($P<0.05$);此外与APS组和IR组比较,APS+IR组CNE-1细胞的凋亡率明显增加($P<0.05$)。见表5。

3.6 APS联合放疗对鼻咽癌CNE-1细胞EMT和凋亡相关蛋白的影响 与空白组比较,APS组各相关蛋白表达水平差异无统计学意义;与空白组,APS组和IR组比较,APS+IR组CNE-1细胞的N-cadherin蛋白表达明显降低,E-cadherin, Bax和

表6 APS及IR对CNE-1细胞E-cadherin, N-cadherin, Bax和Caspase-3蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of APS and IR on expressions of E-cadherin, N-cadherin, Bax and Caspase-3 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	E-cadherin/ β -actin	N-cadherin/ β -actin	Bax/ β -actin	Caspase-3/ β -actin
空白	-	0.32±0.03	0.77±0.02	0.58±0.02	0.24±0.04
APS	12.5	0.42±0.02	0.71±0.03	0.56±0.04	0.31±0.03
IR	4 Gy	0.48±0.03	0.52±0.02 ¹⁾	0.62±0.06	0.35±0.05
APS+IR	12.5+4 Gy	0.61±0.04 ^{1,2,3)}	0.33±0.05 ^{1,2,3)}	0.83±0.08 ^{1,2,3)}	0.67±0.04 ^{1,2,3)}

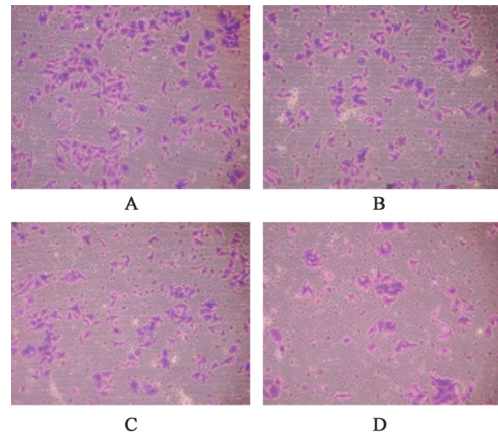


图3 APS及IR对CNE-1细胞侵袭的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 3 Effect of APS and IR on invasion of CNE-1 cells (invert microscope, ×100)

表5 APS及IR对CNE-1细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of APS and IR on apoptosis of CNE-1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Q2+Q4凋亡率/%
空白	-	2.55±0.53
APS	12.5	3.04±0.63
IR	4 Gy	5.63±0.67 ¹⁾
APS+IR	12.5+4 Gy	10.75±0.73 ^{1,2,3)}

Caspase-3蛋白表达明显增加($P<0.05$)。APS可以增加放疗的敏感性,促进鼻咽癌CNE-1细胞凋亡并抑制其EMT。见表6,图4。

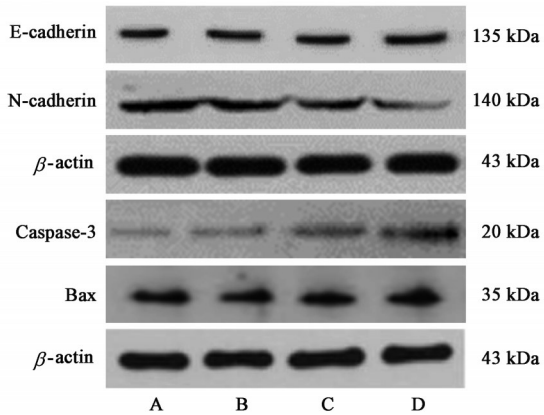


图4 E-cadherin, N-cadherin, Bax和Caspase-3蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of E-cadherin, N-cadherin, Bax and Caspase-3 protein expressions

3.7 APS联合放疗对鼻咽癌CNE-1细胞Akt/ERK通路的影响 与空白组, APS组和IR组进行比较, APS+IR组CNE-1细胞的p-Akt和p-ERK蛋白均明显降低($P < 0.05$), 总蛋白Akt和ERK表达没有显著变化, 差异无统计学意义。APS与放疗联用可以抑制Akt/ERK通路。见表7, 图5。

表7 APS及IR对CNE-1细胞p-Akt, Akt, p-ERK和ERK蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of APS and IR on protein expressions of p-Akt, Akt, p-ERK and ERK ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	p-Akt/Akt	p-ERK/ERK
空白	-	1.16±0.08	1.23±0.03
APS	12.5	0.86±0.04 ¹⁾	0.89±0.08 ¹⁾
IR	4 Gy	0.87±0.03 ¹⁾	1.07±0.06
APS+IR	12.5+4 Gy	0.53±0.05 ^{1,2,3)}	0.76±0.03 ^{1,2,3)}

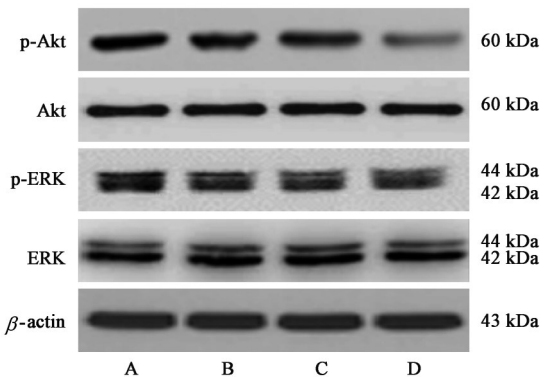


图5 p-Akt, Akt, p-ERK和ERK蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of p-Akt, Akt, p-ERK and ERK protein expressions

4 讨论

鼻咽癌由于其特殊的解剖结构和病理分型, 使得放射治疗是其首先的治疗方法, 早期放疗效果较

为明显, 但长期放疗会导致肿瘤细胞对射线的耐受性增加且逐渐发生转移, 加大放射剂量会增加毒副作用, 因而增加放疗的敏感性及抑制鼻咽癌的转移已成为临床研究的关键所在^[14]。APS作为中药黄芪的主要成分之一, 大量的研究已经表明其具有安全高效、毒副作用小, 并具有显著的抗肿瘤和免疫调节作用^[15], 但是关于APS对于鼻咽癌的放疗增敏性尚无相关报道。

放射生物学研究多采用线性二次数学方程模型(LQ)根据SF值绘制拟合曲线, 在LQ模型中, α 代表线性部分对细胞的杀灭程度, β 代表平方部分(即超线性部分)对细胞的损伤程度, α/β 代表癌细胞亚致死性损伤修复能力的大小即放射敏感性指标, α/β 越大, 细胞亚致死性损伤修复能力越小, 放射敏感性越强^[16]。选取不同放射剂量点的SF值采用LQ绘制放射敏感曲线求得 α/β , 目前已成为放射生物学研究照射后肿瘤细胞存活状况的专有研究方法。一般情况选用活性明确、细胞毒性较低的药物浓度测定其放疗增敏作用, 因此在这项研究中, 首先通过CCK-8实验选取对鼻咽癌CNE-1细胞无明显杀伤作用的APS质量浓度($12.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 并通过克隆形成实验发现, 与空白组和IR比较, APS与不同放射剂量联用可以显著抑制CNE-1细胞的克隆形成能力, 并且根据CNE-1细胞放射敏感曲线可知, $12.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ APS与4.6 Gy放射剂量联用具有协同增敏作用, APS与不同放射剂量联用后 α/β 明显增加(1.752/0.856), 这些结果表明了APS明显增强了对人鼻咽癌CNE-1细胞的放疗敏感性。

肿瘤细胞的转移是一个漫长且复杂的过程, 侵袭和转移也是进展期和晚期鼻咽癌患者的重要特征之一, 也绝大多数癌症患者死亡的重要原因, 诱导肿瘤细胞凋亡是目前治疗肿瘤患者和延长生存期的一个重要策略^[17]。本实验中证明了低浓度的APS与IR联用后, 可以显著抑制鼻咽癌CNE-1细胞的迁移和侵袭, 并且可以显著增加IR引起的细胞凋亡。大量文章报道, 肿瘤细胞发生EMT过程中, 癌细胞的上皮标记物, 如E-cadherin, 紧密连接蛋白-1(ZO-1)等蛋白会逐渐丧失, 此时细胞与细胞之间的黏附性会降低, 并且获得侵袭性、抗凋亡性和耐药性更强的间质标记物, 如N-cadherin, 波形蛋白(Vimentin)等蛋白^[18-19]。抑制肿瘤细胞的EMT, 对肿瘤的转移和凋亡有重要的意义^[20-21]; 目前研究最多的肿瘤细胞凋亡的途径主要有2条^[22], 一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶Caspase, 另一条是

通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 Caspase; Caspase是引起细胞凋亡的关键蛋白酶,一旦被激活便能将细胞内的蛋白质降解,使细胞不可逆的走向死亡。Caspase家族中 Caspase-3处于凋亡级联反应的下游,是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶(凋亡执行者),故也被称之为“死亡蛋白酶”;Bax主要定位于细胞质中属于 Bcl-2家族,是促凋亡蛋白,其可以通过线粒体途径,释放从线粒体中的凋亡因子如细胞色素 C(Cytochrome C),激活 Caspase 级联反应,导致细胞凋亡^[23]。相关研究报道亦表明,APS 可以上调 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平,下调 Bcl-2 表达水平,诱导肝癌,胃癌和肺癌等多种细胞发生凋亡^[24]。此外,据大量的研究报道,Akt/ERK 通路在癌细胞的侵袭转移,EMT,耐药性和凋亡中发挥着关键的作用,活化的 p-Akt 和 p-ERK 蛋白可以上调 EMT 转录因子如蜗牛蛋白(Snail)等表达,上调 EMT 间质标记物表达,诱导 EMT 的发展^[25-26];并且 Akt/ERK 通路的抑制,亦可以下调 Bcl-2 蛋白表达,上调 Bax 和 Caspase-3 等凋亡蛋白表达水平,诱导癌细胞发生凋亡^[27-28]。本研究表明,APS 与 IR 联用后不仅可以显著抑制 N-cadherin, p-Akt 和 p-ERK 蛋白的表达,还可以上调 E-cadherin, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平,抑制 CNE-1 细胞的 EMT 的发展并促进其发生凋亡。

综上所述,APS 可以显著增加放疗对人鼻咽癌 CNE-1 细胞的敏感性,其可能通过调控 EMT 和 Akt/ERK 通路,抑制 CNE-1 细胞迁移和侵袭,促进 CNE-1 细胞的凋亡,从而发挥其对 CNE-1 细胞放疗增敏的作用。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 梁铎,杨剑,高婷,等. 中国鼻咽癌流行概况[J]. *中国肿瘤*, 2016, 25(11): 835-840.
- [3] CHEN H, MA X, YE M, et al. Effectiveness and toxicities of intensity-modulated radiotherapy for patients with locally recurrent nasopharyngeal carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73918.
- [4] LI X, CHEN Q, SUN X, et al. Ten-year outcomes of survival and toxicity for a phase III randomised trial of concurrent chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in stage II nasopharyngeal carcinoma [J]. *Eur J Cancer*, 2019, 110(2): 24-31.
- [5] TANG X, LI Y, LIANG S, et al. Development and validation of a gene expression-based signature to predict distant metastasis in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: a retrospective, multicentre, cohort study [J]. *The Lancet Oncol*, 2018, 19(3): 382-393.
- [6] SALEHI B, VARONI E M, SHARIFI-RAD M, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a target for botanicals in cancer metastasis [J]. *Phytomed*, 2019, 55(3): 125-136.
- [7] 谢荣丹,孙少伯,何建新,等. 黄芪多糖对人乳腺癌 MDA-MB-231 裸鼠移植瘤生长及肿瘤相关凋亡蛋白的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(16): 37-43.
- [8] 芮雯,李婵艺,陈宏远. 黄芪多糖的结构表征与生物活性研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(2): 264-270.
- [9] 陈卓,于卫江. 注射用黄芪多糖对非小细胞肺癌放疗的作用及对机体免疫的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(6): 309-313.
- [10] WU C, KE Y, ZENG Y, et al. Anticancer activity of astragalus polysaccharide in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17(1): 115.
- [11] GUO L, BAI S P, ZHAO L, et al. Astragalus polysaccharide injection integrated with vinorelbine and cisplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer: effects on quality of life and survival [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3): 1656-1662.
- [12] 李芷茹,李超,曾守群,等. 不同剂量率高能 X 射线对宫颈癌 HeLa 细胞生物学效应的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2018, 45(11): 870-873.
- [13] TAN Y, WEI X, ZHANG W, et al. Resveratrol enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by downregulating E2F1 [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(3): 1833-1841.
- [14] CHEN Y, CHAN A T C, LE Q, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *The Lancet*, 2019, 394(10192): 64-80.
- [15] LI W, HU X, WANG S, et al. Characterization and anti-tumor bioactivity of astragalus polysaccharides by immunomodulation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 145(2): 985-997.
- [16] 李夏东,吴稚冰,马胜林,等. 放射生物 LQ 线性二次模型的数理基础及临床意义 [J]. *中国医学物理学杂志*, 2012, 29(1): 3188-3193.
- [17] BRABLETZ T, KALLURI R, NIETO M A, et al.

- EMT in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(2): 128-134.
- [18] 潘晶, 杜月光, 郭焱. 三七皂苷对 TGF- β_1 诱导的大鼠肾小管上皮细胞 EMT 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6): 89-94.
- [19] XU H, ZHENG J, HOU C, et al. Up-regulation of long intergenic noncoding RNA 01296 in ovarian cancer impacts invasion, apoptosis and cell cycle distribution via regulating EMT[J]. *Cell Signal*, 2019, 62(8): 109341.
- [20] PASTUSHENKO I, BRISEBARRE A, SIFRIM A, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT[J]. *Nature*, 2018, 556(7702): 463-468.
- [21] NAJAFI M, MORTEZAEE K, MAJIDPOOR J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers [J]. *Life Sci*, 2019, 234(10): 116781.
- [22] RAMIREZ M L G, SALVESEN G S. A primer on caspase mechanisms[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 82(10): 79-85.
- [23] 罗吉, 罗燕, 李勇敏, 等. 重楼皂苷 I 对结肠癌 HCT116 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(6): 172-176.
- [24] 周蔚, 陈连云. 黄芪多糖抗肿瘤作用机制研究进展[J]. *云南中医中药杂志*, 2018, 39(10): 79-82.
- [25] LIN L, CHENG K, HE Z, et al. A polysaccharide from *Hedyotis diffusa* interrupts metastatic potential of lung adenocarcinoma A549 cells by inhibiting EMT via EGFR/Akt/ERK signaling pathways[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 129(5): 706-714.
- [26] HA G, PARK J, BREUER E Y. TACC3 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) through the activation of PI3K/Akt and ERK signaling pathways [J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(1): 63-73.
- [27] YAO W, LIN Z, SHI P, et al. Delicaflavone induces ROS-mediated apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR and Ras/MEK/ERK signaling pathways in colorectal cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 171(1): 113680.
- [28] YE H, TSAI Y, CHEN M, et al. Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the Akt/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 863(11): 172658.

[责任编辑 张丰丰]