

榄香烯注射液对鼻咽癌细胞株 CNE1 增殖和凋亡的影响

魏玮¹, 相芳^{1*}, 相红²

(1. 中国人民解放军第八一医院药剂科, 南京 210002;
2. 江苏省军区南京第一干休所门诊部, 南京 210037)

[摘要] 目的:探讨榄香烯注射液对鼻咽癌细胞株 CNE1 增殖和凋亡的影响。方法:分别用 20, 10, 5, 2.5, 0 g·L⁻¹榄香烯注射液处理 CNE1 细胞 12, 24, 48 h 后, Prestoblue 法检测细胞的增殖抑制率, 光镜观察细胞形态变化, Hoechst-PI 双染、流式细胞仪检测细胞的凋亡。结果:榄香烯注射液对 CNE1 细胞的增殖有抑制作用, 并呈剂量和时间依赖性, 处理 12, 24, 48 h 的 IC₅₀ 值分别为 (10.70 ± 0.26), (7.06 ± 0.11), (5.52 ± 0.10) g·L⁻¹; 光镜下显示, 给药后细胞大量凋亡, 折光性下降; 榄香烯注射液可诱导 CNE1 细胞凋亡。结论:榄香烯注射液能抑制 CNE1 细胞增殖并诱导其凋亡。

[关键词] 榄香烯注射液; 鼻咽癌; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0283-03

[doi] 10.11653/syjf2013100283

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130308.1037.001.html>

[网络出版时间] 2013-03-08 10:37

Effects of Elemene Injection on Proliferation and Apoptosis of Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line CNE1

WEI Wei¹, XIANG Fang^{1*}, XIANG Hong²

(1. Department of Pharmacy, the 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China;
2. Nanjing First Cadre Sanatorium Clinic, Jiangsu Provincial Military District, Nanjing 210037, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of elemene injection on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1. **Method:** The cytotoxic effect of elemene injection (20, 10, 5, 2.5, 0 g·L⁻¹; 12, 24, 48 h) on CNE1 cells was tested by Prestoblue, cell morphological changes was observed by

[收稿日期] 20121217(645)

[第一作者] 魏玮, 研究生, 副主任药师, 从事抗肿瘤的中药研究, Tel:15877558947, E-mail:769334032@qq.com

[通讯作者] *相芳, 主管药师, 从事药事管理研究, Tel:13605144515, E-mail:shuangw1968@163.com

- [2] 仇成纤, 施侣元. 进一步重视我国老年性痴呆流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(12):931.
- [3] 王红梅, 宋彩梅, 刘新民, 等. 六味地黄丸对肾虚型老年痴呆动物模型的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):112.
- [4] 赵立刚, 马莉. 针灸百会、大椎治疗老年性痴呆的疗效观察[J]. 针灸临床杂志, 2007, 23(9):42.
- [5] 王月菊, 陈贵海, 周江宁, 等. 阿尔茨海默病海马 CaMK II- α 神经元表达的变化[J]. 安徽医药, 2007, 1(11):64.
- [6] 杨斌. 复方地黄对老年痴呆动物模型学习记忆能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):195.
- [7] 孙丽慧, 费洪新, 纪慧. 复方地黄对老年痴呆小鼠形态影响和相关增殖因素变化的研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(12):2605.
- [8] 刘丹阳, 侯魁元. 复方地黄对快速老化痴呆小鼠脑组织凋亡机制的实验研究[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(6):66.
- [9] 冯靖涵, 蔡宝昌, 过伟峰, 等. 中医药治疗阿尔茨海默病的实验研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(4):394.
- [10] 李林, 张兰. 中药治疗阿尔茨海默病的作用特点[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(8):816.

[责任编辑 何伟]

light microscope and apoptosis of CNE1 cells was observed by Hoechst-PI double staining and flow cytometric analysis. **Result:** Elemene injection showed an inhibitory effect with dose-response relation on CNE1 cells. The IC_{50} values at 12, 24, 48 h were (10.70 ± 0.26) , (7.06 ± 0.11) , $(5.52 \pm 0.10) g \cdot L^{-1}$ respectively. Light microscope and hoechst-PI double staining showed apoptotic morphology change. **Conclusion:** Elemene injection can inhibit the proliferation of cell line CNE1 through the induction of apoptosis.

[**Key words**] elemene injection; nasopharyngeal carcinoma; proliferation; apoptosis

榄香烯注射液的主要成分 β -榄香烯是从姜科植物温郁金中提取的抗癌有效成分。其主要生物学活性为降低肿瘤细胞有丝分裂能力,诱发肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的生长^[1-2]。药理实验表明,榄香烯注射液对肿瘤细胞的 DNA, RNA 及蛋白质合成有明显的抑制作用。该制剂还能直接作用于细胞膜,使肿瘤细胞破裂,可以改变和增强肿瘤细胞的免疫原性,诱发和促进机体对肿瘤细胞的免疫反应^[3-4],临床用于恶性胸、腹腔积液、脑瘤、呼吸道和消化道肿瘤的一线治疗。榄香烯注射液对人鼻咽癌细胞株 CNE1 增殖和凋亡的影响尚未见报道,本实验对此进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 药物、试剂和仪器 榄香烯注射液(大连华立金港药业有限公司), RPMI1640、F12 Nutrient Mix、IMBM 培养基(Gibco 公司), Prestoblu e(Invitrogen 公司), Safire² 酶联免疫检测仪(Tecan 公司), 3111 型 CO₂ 恒温培养箱(Forma scientific 公司), SW-CJ-1C 型双人单面净化工作台(苏州净化有限公司), Nikon Eclipse Ts100 型显微镜、Nikon D5000 型相机(Nikon 公司)。

1.2 细胞及培养^[5] 人高分化鼻咽癌细胞株 CNE1 购自中国科学院上海细胞研究所,细胞用含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液于 37 ℃, 5% CO₂ 的培养箱培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 细胞增殖抑制实验^[6](Prestoblu e 法) 取对数生长期 CNE1 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,使贴壁细胞脱落,用 RPMI-1640 培养液(含 10% 小牛血清)调整成密度 4×10^4 个/mL 的细胞悬液。取细胞悬液接种于 96 孔板中,50 μ L/孔,置 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,换液,加入受试药物,10 μ L/孔,终质量浓度为 20, 10, 5, 2.5, 0 $g \cdot L^{-1}$, 培养 72 h。将 Prestoblu e 加入 96 孔板中,10 μ L/孔,10 min 后比色。用酶联免疫检测仪(激发波长 560 nm, 发射波长 590 nm)测定每孔的吸光度(A),并计算细胞增殖抑制率及 IC_{50} , 绘制浓度-抑制率曲线。应用 Graph-Pad Prism 5.0 软件计算半数抑制量(IC_{50})。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{阴性对照组}} \times 100\%$$

1.4 细胞形态学变化^[7] 取对数生长期的 CNE1 细胞,调整细胞密度为 2×10^5 个/mL,接种于 24 孔板中,每孔 1 mL,在 37 ℃, 5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,换液,并加入受试药物使终质量浓度为 20, 10, 5 $g \cdot L^{-1}$,同时设置阴性对照,继续培养 24 h 后将细胞置于显微镜下观察。

1.5 细胞凋亡检测^[8] 取对数生长期 CNE1 细胞, PBS 洗 2 遍后,0.25% 胰蛋白酶消化,用 RPMI-1640 (含 10% 小牛血清)制备成密度为 2×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种于 50 mL 的培养瓶中,每瓶接种 6 mL。在 37 ℃, 5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,换液,并加入受试药物使终质量浓度为 20, 10, 5 $g \cdot L^{-1}$,同时设阴性对照。分别在给药 24 h 后,用胰蛋白酶消化细胞,离心收集细胞, PBS 洗 2 遍,细胞沉淀用 70% 乙醇悬浮,在 -20 ℃ 冰箱固定 24 h,离心洗去乙醇,细胞加 PI 染液(含 PI 50 $mg \cdot L^{-1}$, RnaseA 10 $mg \cdot L^{-1}$, 0.1% TritonX-100, 0.1% 柠檬酸钠和 0.5% NaCl),室温下避光染色 30 min, 400 目筛网过滤,于流式细胞仪(激发波长 488 nm, 发射波长 630 nm)检测细胞凋亡率,实验重复 3 次。

1.6 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 14.0 软件进行处理。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 CNE1 细胞生长增殖的影响 20, 10, 5, 2.5, 0 $g \cdot L^{-1}$ 的榄香烯注射液处理 CNE1 细胞 12, 24, 48 h 后,抑制率均随质量浓度的增加而增大,有剂量依赖性($P < 0.05$),处理 12, 24, 48 h 的 IC_{50} 分别为 (10.70 ± 0.26) , (7.06 ± 0.11) , $(5.52 \pm 0.10) g \cdot L^{-1}$,各 IC_{50} 间比较差异显著($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 对 CNE1 细胞形态学的影响 光镜下,阴性对照组细胞数目较多,大小均匀,明亮清晰,折光性好。药物组细胞大量凋亡,细胞数目明显减少,细胞大小不一,折光性下降。见图 2。

2.3 对 CNE1 细胞凋亡的影响 20, 10, 5, 2.5, 0 $g \cdot L^{-1}$ 的榄香烯注射液作用 24 h 后, CNE1 细胞的

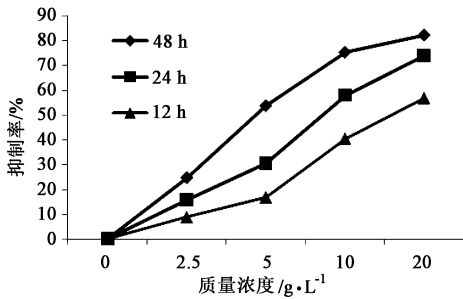
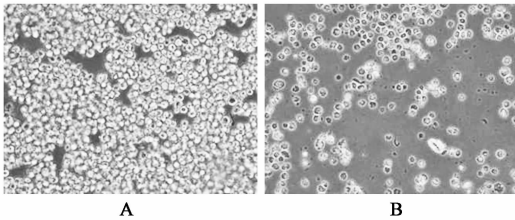


图1 榄香烯注射液对 CNE1 细胞的浓度-抑制率曲线 ($n=3$)



A. 阴性对照组; B. 榄香烯 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图2 榄香烯对 CNE1 细胞形态学的影响 ($200\times$)

凋亡率分别为 $(47.1 \pm 1.3)\%$, $(36.6 \pm 0.9)\%$, $(25.8 \pm 0.8)\%$, $(15.0 \pm 1.3)\%$, $(7.6 \pm 0.5)\%$, 组间比较差异显著 (均 $P < 0.05$)。以 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 榄香烯作用 24, 48 h 后, CNE1 细胞的凋亡率分别为 $(36.6 \pm 0.9)\%$, $(43.7 \pm 1.1)\%$, 组间差异显著 ($P < 0.05$)。其促细胞凋亡的作用呈时间-剂量依赖性。

3 讨论

鼻咽癌是头颈部最常见的恶性肿瘤,在我国南方地区的发病率居全世界首位,该病的治疗措施是以放射治疗为主的综合治疗,然而,放化疗所引起的多种急慢性并发症,导致患者在放化疗后的无瘤生存期全身情况不佳、生存质量低下。榄香烯注射液的应用,在提高患者生存率的同时,可提高患者的生存质量,具有重要的临床应用价值^[9-10]。本研究结果表明,榄香烯注射液能有效抑制 CNE1 细胞的增殖,并呈剂量-时间依赖性;光镜观察显示,榄香烯组细胞大量凋亡,折光性下降;细胞凋亡检测结果显示,榄香烯促 CNE1 细胞凋亡的作用亦呈时间-剂量依赖性。本研究结果为榄香烯注射液的推广应用提供理论支持,但其作用机制还需进一步的研究。

本实验采用 Prestoblue 法检测榄香烯注射液对人鼻咽癌细胞 CNE1 的增殖抑制作用, Prestoblue 试剂是一种基于刃天青 (resazurin) 的即用型溶液。它利用活细胞的还原能力来定量测定细胞的增殖,从而指示细胞活性。Prestoblue 试剂中包含了一种细胞通透性的化合物,这种化合物是蓝色的,且几乎没

有荧光。在加入细胞后, Prestoblue 试剂被活细胞的还原环境所修饰,变成红色,且荧光很强。利用荧光或吸光度测量,可检测这种变化。整个分析流程可在 10 min 内完成。由于常规的 MTT 还原后产生的 Formazan 不溶于水,还要再用 DMSO 溶解,这就延长了检测时间,也在一定程度上影响了准确性。因此 Prestoblue 法较 MTT 法检测效率更高,准确性更好,更安全。

[参考文献]

- [1] Yang F Q, Li S P, Chen Y, et al. Identification and quantitation of eleven sesquiterpenes in three species of Curcuma rhizomes by pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 39(3/4): 552.
- [2] Zhou X, Li Z W, Liang G Y, et al. Analysis of volatile components of Curcuma sichuanensis X. X. Chen by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(2): 440.
- [3] Zhang H Y, Hu C X, Liu C P, et al. Screening and analysis of bioactive compounds in traditional Chinese medicines using cell extract and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(1): 151.
- [4] Lei Tao, Liang Zhou, Luying Zheng, et al. Elemene display anti-cancer ability on laryngeal cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2006(58): 24.
- [5] 夏春波, 蒋常文, 秦小云, 等. 莪术油对鼻咽癌细胞 X-连锁凋亡抑制蛋白 mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 204.
- [6] 金春丽, 朴熙绪, 李春浩, 等. 草苈蓉乙醇提取物对大鼠肝星状细胞体外增殖与凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 246.
- [7] 阎莉, 卫智权, 郑作文, 等. 广西藤茶双氢杨梅树皮素对小鼠肝细胞凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 102.
- [8] 陈志红, 龚先玲, 刘义. 重楼总皂苷对人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 周期及凋亡的影响 [J]. 中成药, 2011, 33(1): 25.
- [9] 汤秀红, 秦叔逵, 谢恬, 等. 榄香烯注射液抗肿瘤作用基础研究的现状和进展 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(3): 266.
- [10] 傅乃武, 全兰萍, 郭永泐, 等. β -榄香烯的抗肿瘤作用和药理学研究 [J]. 中国中药杂志, 1984, 9(2): 35.

[责任编辑 何伟]