

叶黄素对鼻咽癌 C666-1 细胞的抑制作用及其机制

沈敏*, 刘辉, 万俐佳(华中科技大学同济医学院附属荆州医院耳鼻咽喉科头颈外科, 湖北荆州 434020)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)01-0053-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.01.17

摘要 目的:研究叶黄素对鼻咽癌 C666-1 细胞的抑制作用及其机制。方法:以 0(空白对照)、20、40、80、160 mg/L 的叶黄素培养 C666-1 细胞 0、12、24、48 h,以 CCK-8 法测定细胞增殖率,以 TUNEL 法测定细胞凋亡率,以 Western blot 法测定细胞腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)和 mTOR 通路中核糖体蛋白 S6 激酶(S6K)、S6 蛋白的磷酸化程度。结果:与空白对照比较,80、160 mg/L 叶黄素作用 48 h 及 160 mg/L 叶黄素作用 12、24、48 h 的细胞增殖率均降低($P < 0.05$);80、160 mg/L 叶黄素作用 48 h 及 160 mg/L 叶黄素作用 24、48 h 的细胞凋亡率增加($P < 0.05$);80、160 mg/L 叶黄素作用 48 h 的细胞内磷酸化 AMPK 增加,磷酸化 S6K、S6 蛋白减少($P < 0.05$)。结论:叶黄素能有效抑制 C666-1 细胞增殖,可能通过促进 AMPK 磷酸化,抑制 S6K、S6 蛋白磷酸化诱导其凋亡。

关键词 叶黄素;鼻咽癌;C666-1 细胞;增殖;凋亡

Inhibitory Effects and Mechanism of Lutein on Nasopharyngeal Carcinoma C666-1 Cells

SHEN Min, LIU Hui, WAN Lijia (Dept. of Otolaryngology and Head & Neck Surgery, the Affiliated Jingzhou Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Jingzhou 434020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects and mechanism of lutein on nasopharyngeal carcinoma C666-1 cells. METHODS: C666-1 cells were stimulated by lutein at different concentrations [0 (blank control), 20, 40, 80, 160 mg/L] for different time (0, 12, 24, 48 h). The proliferation rate of cells was determined by CCK-8 assay, and apoptotic rate of cells was determined by TUNEL method; Western blot was adopted to determine the phosphorylation of S6K and S6 proteins of AMPK and mTOR pathway. RESULTS: Compared with blank control group, proliferation rate of C666-1 cells was significantly reduced after treated with lutein (80, 160 mg/L) for 48 h and lutein (160 mg/L) for 12, 24, 48 h ($P < 0.05$). After treated with lutein (80, 160 mg/L) for 48 h and lutein (160 mg/L) for 24, 48 h, cell apoptosis was significantly increased ($P < 0.05$). Lutein (80, 160 mg/L) could promote intracellular AMPK phosphorylation, and inhibits mTOR pathway S6K, S6 protein phosphorylation after 48 h treatment ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Lutein can inhibit nasopharyngeal carcinoma C666-1 cell proliferation and induce nasopharyngeal carcinoma cell apoptosis and inhibit S6K, S6 protein phosphorylation through promoting AMPK phosphorylation.

KEYWORDS Lutein; Nasopharyngeal carcinoma; C666-1 cells; Proliferation; Apoptosis

鼻咽癌是一种鼻咽部的鳞状上皮细胞癌,临床具有发病部位较深、病变难以被发现的特点,癌变后易发生浸润转移^[1]。当前临床治疗以放疗联合辅助化疗为主,但传统化疗后,患者常出现骨髓抑制、胃肠功能紊乱等不良反应,影响患者的预后^[2]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路具有整合细胞内外各种传递信号的功能,并能调节细胞代谢、增殖等生理过程,癌症发生后,mTOR 信号通路调节出现异常^[3]。叶黄素是一种天然胡萝卜素,药理

学实验和流行病学均发现叶黄素具有抗癌作用,该作用可能与叶黄素的抗氧化及免疫调节功能有关^[4]。此外,叶黄素还在心血管疾病、提高机体免疫力方面有较好的生物学活性^[5]。当前,叶黄素对鼻咽癌 C666-1 细胞增殖、凋亡的影响的研究报道很少。为此,本文就叶黄素对鼻咽癌 C666-1 细胞增殖、凋亡的影响进行了探讨,并通过检测 mTOR 通路中能量感受器腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)和核糖体蛋白 S6 激酶(S6 kinase, S6K),对 mTOR 信号通路的作用

价[J].中国医药工业杂志,2012,43(2):107.

[9] 薛彩红,罗远,梁健钦.优化壮药六味巴布剂的处方及制备工艺[J].中药材,2013,36(10):1 694.

[10] Parhi R, Suresh P, Mondal S, et al. Novel penetration enhancers for skin applications: a review[J]. *Curr Drug Deliv*, 2012, 9(2): 219.

[11] 何嘉仑,唐洪梅,涂星.吴茱萸提取物的透皮吸收促进剂的筛选[J].中成药,2013,35(6):1 184.

[12] 祁艳,陈军,李磊,等.不同促渗剂对马钱子碱贴剂体外透

皮吸收的影响[J].中国药房,2011,22(3):195.

[13] 陈军,刘培,蒋秋冬,等.中药挥发油作为透皮吸收促进剂的现状与展望[J].中草药,2014,45(24):3 651.

[14] 侯雪梅,李国栋,李卫华.化学促渗剂及其机理的探讨[J].上海医药,2008,29(5):232.

[15] 王瑾,杨明,李剑.中药巴布膏剂的研究进展及存在的问题[J].中国药业,2009,18(24):15.

[16] 石恩娴,邢桂琴.不同透皮促进剂对复方黄芩巴布剂中黄芩苷透皮吸收的影响[J].山西医科大学学报,2008,39(1):36.

* 主治医师,硕士。研究方向:耳鼻咽喉头颈外科。E-mail: 18352126@qq.com

(收稿日期:2015-07-16 修回日期:2015-09-10)
(编辑:邹丽娟)

进行了初步探讨。

1 材料

1.1 仪器

AF6000型荧光显微镜(德国Leica公司);ELx-808型酶标仪(美国Bio-Tek公司);2-16N型医用高速离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

叶黄素对照品(上海纯优生物科技有限公司,批号:P0383,纯度:≥90%);DMEM培养基、胎牛血清、S6K(分子量:70 kDa)兔多抗、磷酸化AMPK(p-AMPK)兔单抗、p-S6K小鼠单抗、p-S6兔多抗(武汉博士德生物技术有限公司);Cell Counting Kit-8(CCK-8)检测试剂盒(日本同仁化学研究所);TUNEL细胞凋亡测试试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.3 细胞

鼻咽癌C666-1细胞株购自中山大学医学院。

2 方法

2.1 细胞培养

将C666-1细胞加入至含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,37℃、5%CO₂下培养。将对数生长期C666-1细胞接种到培养板上,贴壁培养12h后,以终质量浓度为0、20、40、80、160 mg/L的叶黄素分别培养细胞1h,每组6个复孔。用0.25%胰酶-0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化,传代,取增殖旺盛、状态良好的细胞用于试验研究。

2.2 细胞增殖率的检测

将C666-1细胞接种于96孔板中,每孔细胞密度为 1×10^5 个,培养24h后在无血清状态下加入0(对照)、20、40、80、160 mg/L的叶黄素,分别作用0、12、24、48 h,每组6个复孔。培养结束前1h向培养板样品孔中加入CCK-8试剂,结束时用酶标仪在450 nm波长下测定光密度(OD),计算细胞增殖率(%)=(试验孔OD/对照孔OD)×100%。

2.3 细胞形态观察

取“2.2”项下经0、160 mg/L叶黄素作用48h后的C666-1细胞,进行常规Hoechst33258染色,荧光显微镜下观察细胞形态。

2.4 细胞凋亡的检测

以TUNEL法测定细胞凋亡率。将C666-1细胞接种于48孔板中,处理后再在无血清状态下加入0(对照)、40、80、160 mg/L的叶黄素,分别作用0、12、24、48 h,弃掉培养基并用PBS进行漂洗,加入4%的多聚甲醛进行固定,用PBS漂洗后加入1%的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100),加入3%的H₂O₂封闭,漂洗。依次加入DNase I反应液、TdT酶反应液。荧光显微镜下(激发波长:450~500 nm,发射波长:515~565 nm)观察细胞凋亡情况,细胞核呈绿色为阳性凋亡细胞。计算凋亡率(%)=1-试验孔OD/对照孔OD×100%。

2.5 蛋白磷酸化水平的检测

以Western blot法检测不同质量浓度(0、40、80、160 mg/L)叶黄素作用于C666-1细胞48h后AMPK、S6K、S6蛋白磷酸化水平。加入不同质量浓度的叶黄素(0、40、80、160 mg/L)处理细胞,给药结束后,收集细胞,加细胞裂解液提取总蛋白,定量后取等量样本进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,封闭,4℃孵育一抗过夜,第2天室温孵育二抗1h。采用电化学发光法检测蛋白表达情况,使用Image J软件进行条带灰度分析。

2.6 统计学分析

用SPSS 16.0进行数据统计处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖率变化

与对照比较,80、160 mg/L叶黄素作用48h及160 mg/L叶黄素作用12、24、48 h的细胞增殖率均降低($P < 0.05$)。叶黄素不同质量浓度、作用不同时间对细胞增殖的影响见图1。

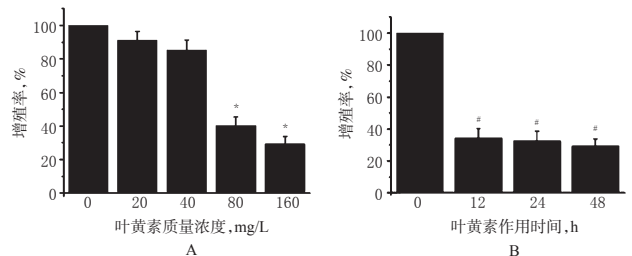


图1 叶黄素不同质量浓度、作用不同时间对细胞增殖的影响

A.不同质量浓度;B.作用不同时间

注:与0 mg/L比较,* $P < 0.05$;与作用0 h比较,# $P < 0.05$

Fig 2 Effect of different concentrations and different duration of lutein on cell proliferation

A. different concentrations; B. different duration

Note: vs. 0 mg/L,* $P < 0.05$; vs. treated for 0 h,# $P < 0.05$

3.2 细胞形态分析

镜下,与0 mg/L比较,经160 mg/L叶黄素处理后,死细胞较多、细胞碎片较多,而且存活细胞胞质浓缩、变圆变小,说明细胞出现明显凋亡。2种质量浓度叶黄素作用于细胞后的倒置显微镜图见图2。

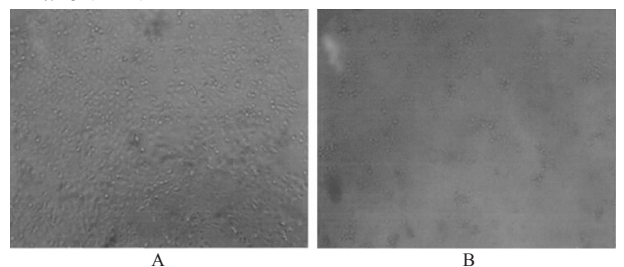


图2 2种质量浓度叶黄素作用于细胞后的倒置显微镜图(×200)

A. 0 mg/L叶黄素;B. 160 mg/L叶黄素

Fig 2 Inverted microscope of cells stimulated with two kinds of concentrations of lutein (×200)

A. 0 mg/L lutein;B. 160 mg/L lutein

3.3 细胞凋亡情况

与对照比较,80、160 mg/L叶黄素作用48h及160 mg/L叶黄素作用24、48 h后的细胞凋亡率增加($P < 0.05$)。叶黄素不同质量浓度、作用不同时间对细胞凋亡的影响见图3。

3.4 mTOR信号通路的变化

与0 mg/L比较,80、160 mg/L叶黄素作用48 h的细胞内磷酸化AMPK增加,磷酸化S6K、S6蛋白减少($P < 0.05$)。不同质量浓度叶黄素对细胞中AMPK、S6K1、S6蛋白磷酸化的影响见图4。

4 讨论

鼻咽癌临床属上皮源性恶性肿瘤,恶性程度较高,有着高度的侵袭性及转移性,患者5年生存率仅60%左右^[6-7]。由于鼻咽癌的解剖位置特殊,临床治疗以放疗联合顺铂化疗为

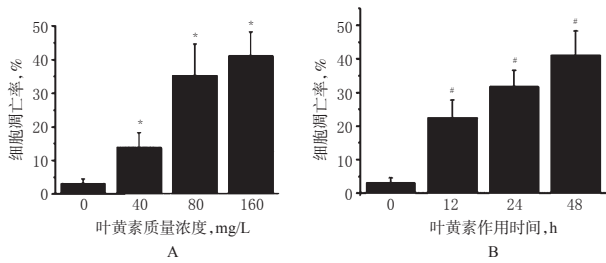


图3 叶黄素不同质量浓度、作用不同时间对细胞凋亡的影响
A.不同质量浓度;B.作用不同时间

注:与0 mg/L比较,* $P < 0.05$;与作用0 h比较,* $P < 0.05$

Fig 3 Effect of different concentrations and different duration of lutein on cell apoptosis

A. different concentrations; B. different duration

Note: vs. 0 mg/L, * $P < 0.05$; vs. treated for 0 h, * $P < 0.05$

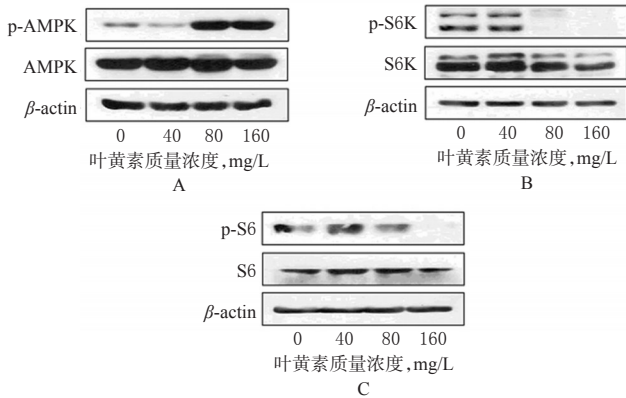


图4 不同质量浓度叶黄素对细胞中AMPK、S6K、S6蛋白磷酸化的影响

A. AMPK磷酸化;B.S6K磷酸化;C.S6磷酸化

Fig 4 Effect of different concentrations of lutein on AMPK, S6K and S6 protein phosphorylation

A. AMPK phosphorylation; B. S6K phosphorylation; C. S6 phosphorylation

主。但在治疗过程中患者的不耐受等常导致治疗的中断,在一定程度上增加了鼻咽癌的复发或转移。当前,新型、高效、低毒的抗肿瘤药物的寻找成为了研究的热点。

叶黄素为广泛存在于水果、蔬菜、花卉等中的天然类胡萝卜素,在预防白内障、黄斑变性、心血管疾病及肿瘤的发生中有着重要的作用。流行病学调查结果显示,饮食中叶黄素的摄入量和多种肿瘤的发生呈负相关性^[8-9]。王若仲、付蕾等^[10-11]的研究显示,叶黄素可有效抑制HepG2肝癌细胞的增殖,其机制可能与叶黄素抑制三磷酸腺苷(ATP)生成、上调凋亡基因Bax和p53 mRNA表达有关。当前,类胡萝卜素在治疗口腔黏膜白斑病、鼻咽癌等癌症和癌前病变中有较好的效果。而作为类胡萝卜素中的一种,叶黄素对鼻咽癌的效果需要验证。本研究发现,叶黄素可有效抑制C666-1细胞的增殖,且抑制效果随药物浓度的增加和作用时间的延长而增强。

mTOR是丝/苏蛋白激酶,负责磷脂酰肌醇3激酶/AKT信号通路与其下游通路的联系,并能加速肿瘤细胞的生长和存活^[12]。mTOR在人体中有2种存在形式,包括mTORC1及mTORC2。AMPK为mTOR上游底物,对mTOR活性具有负向调控作用^[13];S6K为mTORC2下游底物,对核糖体产生和蛋白质合成进行调控^[14-15]。因此,检测其下游S6K、S6蛋白的磷酸化水平可间接反映mTOR活性。本研究结果显示,叶黄素可有

效促进细胞内AMPK磷酸化,并抑制下游mTOR信号通路中S6K、S6蛋白的磷酸化活化。

综上所述,叶黄素可抑制C666-1细胞增殖,并诱导C666-1细胞凋亡,其效果与叶黄素的浓度和作用时间相关,其机制可能与抑制mTOR信号通路有关。

参考文献

- [1] Chen X, Hong Y, Feng J, *et al.* Concurrent chemoradiotherapy comparison of taxanes and platinum versus 5-fluorouracil and platinum in nasopharyngeal carcinoma treatment[J]. *Chin Med J; Engl*, 2014, 127(1):142.
- [2] Lee AW, Tung SY, Chua DT, *et al.* Randomized trial of radiotherapy plus concurrent-adjuvant chemotherapy vs radiotherapy alone for regionally advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(15):188.
- [3] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(1):21.
- [4] 付蕾,陈晓哲,张慧娟,等.叶黄素对人结肠癌HT29细胞增殖的抑制及其机制[J].世界华人消化杂志,2013,21(13):1239.
- [5] 秦蓉,曹渊,方悦,等.汉防己甲素对胃癌BGC-823细胞增殖和凋亡的影响[J].现代肿瘤医学,2013,21(9):1911.
- [6] 赵莉,蔡轶,何艳华,等.姜黄素对鼻咽癌C666-1细胞增殖的抑制作用及其可能机制[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2014,21(3):293.
- [7] Hong B, Lui VW, Hui EP, *et al.* Reverse phase protein array identifies novel anti-invasion mechanisms of YC-1[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(6):842.
- [8] Yan F, Liu Y, Wang WB. Matrine inhibited the growth of rat osteosarcoma UMR-108 cells by inducing apoptosis in a mitochondrial-caspase-dependent pathway[J]. *Tumor Biol*, 2013, 34(4):2135.
- [9] Wu JM, Chen Y, Chen JC, *et al.* Tetrandrine induces apoptosis and growth suppression of colon cancer cells in mice[J]. *Cancer Lett*, 2010, 287(2):187.
- [10] 王若仲,沈新南,施冬云,等.叶黄素对人肝癌细胞HepG2的抑制作用及其机制研究[J].营养学报,2012,34(4):332.
- [11] 付蕾,冀波,王聪,等.基于活性氧机制的叶黄素诱导胃癌SGC-7901细胞凋亡的研究[J].时珍国医国药,2012,23(4):970.
- [12] Reuter S, Charlet J, Juncker T, *et al.* Effect of curcumin on nuclear factor kappaB signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04731.x.
- [13] 潘太彬.汉防己甲素诱导人肝癌SMMC7721细胞凋亡的机制研究[J].中国药房,2015,26(19):2648.
- [14] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 20):3589.
- [15] 陶黎阳,黎渐英,张建业,等.氧化苏木素诱导人乳癌MCF-7细胞凋亡及其作用机制[J].中山大学学报:医学科学版,2011,32(4):449.

(收稿日期:2015-08-01 修回日期:2015-09-15)

(编辑:邹丽娟)