

芒果甙诱导鼻咽癌 CNE3 细胞凋亡及其对细胞内钙含量的影响

刘晓春, 蓝 娇, 农朝赞, 潘莉莉, 焦 伟

基金项目: 广西自然科学基金课题(桂科青 0447018)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院(刘晓春, 蓝 娇, 焦 伟); 530022 南宁, 广西民族医院(农朝赞, 潘莉莉)

作者简介: 刘晓春(1975-), 男, 硕士研究生, 硕士学位, 副主任医师, 研究方向: 鼻咽癌治疗分子机制研究。E-mail: tonyliu75@126.com

[摘要] 目的 研究芒果甙在体外对人鼻咽癌细胞系 CNE3 细胞凋亡和细胞内钙离子(IECa^{2+})含量的影响。方法 采用流式细胞术检测不同浓度芒果甙作用 24、48 和 72 h 后诱导 CNE3 细胞凋亡和 IECa^{2+} 的含量。结果 (1) 芒果甙作用 24、48 和 72 h 后, 不同浓度的芒果甙均可诱导 CNE3 细胞凋亡, 呈现时间及剂量效应; (2) 不同浓度芒果甙作用 24、48 和 72 h 后, CNE3 细胞内 IECa^{2+} 含量显著上升, 呈现时间及剂量效应。结论 芒果甙能显著诱导 CNE3 细胞凋亡; CNE3 细胞内 IECa^{2+} 含量的升高在芒果甙诱导 CNE3 细胞凋亡中起到重要作用。

[关键词] 芒果甙; CNE3 细胞系; 凋亡; 细胞内钙

[中图分类号] R 739.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)09-0805-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.09.01

Effects of mangiferin on induction of apoptosis and intracellular Ca^{2+} concentration in nasopharyngeal carcinoma CNE3 cells Liu Xiao-chun, LAN Jiao, NONG Chao-zan, et al. The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of mangiferin on cell apoptosis and intracellular Ca^{2+} (IECa^{2+}) concentration in nasopharyngeal carcinoma CNE3 cells in vitro. **Methods** After CNE3 cells were treated with different concentrations of mangiferin for 24, 48 and 72 hours, the apoptosis ratio and changes of IECa^{2+} were assessed by flow cytometry. **Results** (1) After 24, 48 and 72 hours of mangiferin administration, the different concentrations of mangiferin can induced the CNE3 cells apoptosis and the effect were dependent on time and concentration; (2) After CNE3 cells were treated with mangiferin for 24, 48 and 72 hours, IECa^{2+} were significantly increased, and the effect were dependent on time and concentration. **Conclusion** Mangiferin can markedly induce apoptosis in CNE3 cell, and the increase of IECa^{2+} may play an important role to the induce apoptosis of mangiferin.

[Key words] Mangiferin; CNE3 cell lines; Apoptosis; Intracellular Ca^{2+}

鼻咽癌是一种上皮源性的恶性肿瘤, 广西是鼻咽癌的高发区之一。当前临床上对鼻咽癌的治疗以放射治疗为主, 但放疗后发生远处转移致死者接近鼻咽癌死亡总数的一半, 鼻咽癌的 5 年生存率也仅为 50% 左右。近年来的研究显示黄酮类化合物在鼻咽癌治疗中具有重要作用, 芒果甙(Mangiferin)是一种天然黄酮类化合物(化学名为氧杂蒽酮 C-葡萄糖甙), 存在于芒果树、扁桃树、知母等植物的茎、叶中, 具有抑制脂质过氧化、抗感染、增强免疫以及诱导人肝癌细胞 BEL-7404、白血病 K562 细胞凋亡的

作用^[1-3]。我们的前期研究也发现, 芒果甙可显著抑制人鼻咽癌上皮细胞株 CNE3 细胞增殖, 并具有细胞周期阻滞效应^[4]。为观察芒果甙诱导 CNE3 细胞凋亡及细胞内钙离子含量的影响, 本实验以 CNE3 细胞为研究对象, 初步探讨其抗癌作用机理, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器 CO_2 培养箱(美国 Harris 公司); FACS-Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 试剂 芒果甙(由广西民族医院中心实验室

提供,用 DMSO 配制成 100 mmol/L,分装 -20 ℃ 冻存);RPMI1640、胎牛血清(美国 Hyclone 公司产品);Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit(美国 Bipecc 公司产品);Fluo-3/AM(Sigma 公司产品,用 DMSO 配成 1.0 mmol/L 备用)。人鼻咽癌 CNE3 细胞株(由广西壮族自治区人民医院科研实验中心提供)。

1.3 方法

1.3.1 CNE3 细胞的培养 将 CNE3 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和链霉素的 RPMI1640 完全培养基中,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养。取对数生长期 CNE3 细胞用 0.125% 胰酶消化后收集细胞悬液,细胞计数板计算细胞数,加入 RPMI1640 培养基制备成 1×10^5 /ml 细胞悬液。

1.3.2 流式细胞仪分析 CNE3 细胞凋亡 (1)实验分组:将 CNE3 细胞接种于 25 ml 培养瓶中,设 A 组为试验组,细胞分别给予 25、50、100、150 μ mol/L 芒果甙处理 24、48 和 72 h;设 B 组为空白对照组,加入与试验组药物等量的生理盐水。(2)细胞收集:收集试验组与空白对照组 CNE3 细胞,用 PBS 洗涤 2 次;加入 500 μ l 的 Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5 μ l Annexin V-FITC,混匀后避光 5 min,加入 10 μ l PI,混匀后避光 10 min;30 min 内完成流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3.3 流式细胞仪分析 CNE3 细胞内钙离子 (IECa²⁺) 含量^[5] (1)实验分组与细胞药物处理同前。(2)细胞收集:用不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 漂洗细胞 2 次备用;取两支试管,第 1 支加细胞悬液 490 μ l 和 10 μ l 1.0 mM 的 Fluo-3/AM 液;第 2 支仅取 500 μ l 细胞悬液,不加 Fluo-3/AM 液,置 37 ℃ 孵育 30 min,用不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 洗涤细胞 2 次,最后加 500 μ l 不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 缓冲液,用流式细胞仪检测。分析每例样品 Fluo-3/AM 染色管或无 Fluo-3/AM 染色管 CNE3 细胞荧光强度(平均道数值),得出每例 IECa²⁺ 含量(以细胞内钙离子指数表示 IECa²⁺),公式为:IECa²⁺ = (受 Fluo-3/AM 作用后 CNE3 细胞荧光强度平均道数)/(无 Fluo-3/AM 作用后 CNE3 细胞荧光强度平均道数) × 1000。

1.4 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行两因素方差分析及 q 检验,检验水准 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同浓度芒果甙对 CNE3 细胞凋亡的影响 不同浓度芒果甙作用 24、48 和 72 h 后,可显著诱导

CNE3 细胞凋亡,随着芒果甙药物浓度的增加和作用时间的延长,细胞凋亡率有不断增加的趋势,呈现剂量及时间效应。见表 1。

表 1 不同浓度芒果甙作用不同时间对 CNE3 细胞凋亡率的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

药物浓度 (μ mol/L)	细胞凋亡率(%)		
	24 h	48 h	72 h
空白	5.76 $\pm$ 0.57	9.64 $\pm$ 0.77	14.25 $\pm$ 1.32
25	12.53 $\pm$ 1.31 *	17.22 $\pm$ 1.56 * [▲]	26.42 $\pm$ 2.33 * [▲]
50	21.36 $\pm$ 2.02 *	27.47 $\pm$ 2.36 * [▲]	38.23 $\pm$ 3.12 * [▲]
100	25.72 $\pm$ 2.45 *	37.14 $\pm$ 3.14 * [▲]	47.75 $\pm$ 4.58 * [▲]
150	27.84 $\pm$ 2.57	43.62 $\pm$ 4.38 * [▲]	56.62 $\pm$ 5.87 * [▲]

注: $F_{\text{浓度}}=43.071, P<0.01, F_{\text{时间}}=24.472, P<0.01$;同一作用时间,与前一药物浓度比较, * $P<0.01$;同一药物浓度,与前一作用时间比较, [▲] $P<0.01$

2.2 不同浓度芒果甙对 CNE3 细胞 IECa²⁺ 的影响 不同浓度芒果甙作用 24、48 和 72 h 后, CNE3 细胞 IECa²⁺ 含量呈显著上升,随着芒果甙药物浓度的增加和作用时间的延长, CNE3 细胞 IECa²⁺ 含量亦不断增加,呈现剂量及时间效应。见表 2。

表 2 不同浓度芒果甙不同处理时间对 CNE3 细胞 IECa²⁺ 的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

药物浓度 (μ mol/L)	细胞内钙离子含量 (IECa ²⁺)		
	24 h	48 h	72 h
空白	5375.2 $\pm$ 412.5	5941.7 $\pm$ 474.6	7443.6 $\pm$ 525.9
25	7582.6 $\pm$ 528.7 *	8798.7 $\pm$ 563.5 * [▲]	10025.3 $\pm$ 614.6 * [▲]
50	9021.5 $\pm$ 576.8 *	11548.1 $\pm$ 645.3 * [▲]	13054.6 $\pm$ 697.5 * [▲]
100	10141.5 $\pm$ 624.9 *	13224.7 $\pm$ 732.3 * [▲]	14754.8 $\pm$ 769.6 * [▲]
150	11763.8 $\pm$ 656.2 *	14352.6 $\pm$ 745.1 * [▲]	16844.5 $\pm$ 843.7 * [▲]

注: $F_{\text{浓度}}=70.856, P<0.01, F_{\text{时间}}=17.837, P<0.01$;同一作用时间,与前一药物浓度比较, * $P<0.01$;同一药物浓度,与前一作用时间比较, [▲] $P<0.01$

3 讨论

3.1 有研究表明,肿瘤的发生发展不仅是细胞增殖失控的结果,也是由于细胞凋亡受阻所致^[6]。因此,诱导和加速肿瘤细胞凋亡已经成为目前治疗恶性肿瘤的重要手段。近年来,我国的传统中医药在治疗恶性肿瘤方面越来越受到人们的青睐。从天然中草药中提取抗癌的有效成分,成为了治疗恶性肿瘤的新希望和新途径。

3.2 黄华艺和程鹏等^[2,3]的研究报道,芒果甙具有诱导人肝癌细胞株 BEL-7404 和白血病 K562 细胞凋亡的作用。不同浓度的芒果甙能显著诱导肝癌 BEL-7404 细胞和白血病 K562 细胞凋亡,其诱导作

用具有剂量及时间效应。本研究发现,芒果甙可显著诱导 CNE3 细胞凋亡,不同浓度的芒果甙作用 24、48 和 72h 后,其凋亡率呈现逐渐增高的趋势,表明芒果甙具有较强的诱导 CNE3 细胞凋亡作用,且随着芒果甙药物浓度的增加和作用时间的延长,细胞凋亡率亦不断增加。

3.3 诱导肿瘤细胞凋亡是当前抗肿瘤药物研究的热点,目前已知可以通过 3 个主要的信号传导通路诱导凋亡^[7],它们是:(1)线粒体通路;(2)死亡受体通路;(3)内质网通路。所有这些信号传导通路都能激活凋亡执行者 caspase3,它会水解各种各样的细胞成分而使其凋亡,以上通路的激活与细胞内 Ca^{2+} 浓度有密切的关系。细胞内 Ca^{2+} 是一种重要的第二信使,参与调节细胞膜的通透性,影响环核苷酸及磷酸肌醇代谢,调控酶活性等。 Ca^{2+} 本身作为一种凋亡信号,可调节 Ca 敏感的关键酶如蛋白激酶、磷脂酶、核酸内切酶及谷氨酰氨转移酶等诱导凋亡。细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高作为细胞凋亡的启动信号,几乎参与了所有的凋亡通路^[8-10]。本实验结果显示,不同浓度芒果甙作用 24、48 和 72h 后,CNE3 细胞内 $IECa^{2+}$ 含量显著增高;表明芒果甙作用后可导致 CNE3 细胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高,其作用具有剂量及时间效应。说明芒果甙诱导细胞凋亡与芒果甙引起的 CNE3 细胞内 Ca^{2+} 浓度的增高有着直接关系,提示 CNE3 细胞内 $IECa^{2+}$ 含量的变化在芒果甙诱导 CNE3 细胞凋亡中起到重要作用。本实验中芒果甙可能是通过上调死亡受体 Fas 蛋白表达,激活细胞中的蛋白酪氨酸激酶,使钙库内 Ca^{2+} 释放以及 Ca^{2+} 进入细胞浆,引起核和细胞的损害。钙结合蛋白对内质网腔内 Ca^{2+} 的变化非常敏感,与 Fas 受体结合后,使其 Ca^{2+} 内流,启动 Fas 受体介导的细胞凋亡^[3,11]。

3.4 广西有大量芒果叶资源,原料易得,价格低廉,芒果叶的主要有效成分是芒果甙。广西是鼻咽癌的高发区,如果能够找到芒果甙在鼻咽癌药物治疗上

的直接证据,那么将大大促进广西本地中草药资源在肿瘤治疗中的应用和发展。研究表明,芒果甙能够显著诱导人鼻咽癌 CNE3 细胞凋亡, $IECa^{2+}$ 含量的增高在芒果甙诱导 CNE3 细胞凋亡过程中可能起到重要作用。本研究结果初步证实芒果甙在鼻咽癌药物治疗中具有潜在的应用价值,但其抗癌作用的机制还有待进一步研究。

参考文献

1 邓家刚,覃福兰. 芒果苷近 5 年研究进展[J]. 长春中医药大学学报,2008,24(4):463-464.
2 黄华艺,农朝赞,郭凌霄,等. 芒果甙对肝癌细胞增殖的抑制和凋亡的诱导[J]. 中华消化杂志,2002,22(6):341-343.
3 程 鹏,彭志刚,杨 杰,等. 芒果甙对白血病 K562 细胞端粒酶活性和凋亡的影响[J]. 中药材,2007,30(3):306-309.
4 刘晓春,农朝赞,蓝 娇,等. 芒果甙对鼻咽癌细胞系 CNE3 生长抑制与细胞周期阻滞的研究[J]. 现代检验医学杂志,2009,24(11):10-12.
5 尹格平,李云飞,朱彤宇,等. 正常孕妇和妊娠高血压综合征患者外周血红细胞内钙含量测定及其临床价值[J]. 中华围产医学杂志,2002,5(1):18-20.
6 Thompson CB. Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995,267(5203):1456-1462.
7 Chen QM, Tu VC. Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications[J]. Am J Cardiovasc Drugs, 2002, 2(1):43-57.
8 Marin MC, Fernandez A, Bick RJ, et al. Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca^{2+} [J]. Oncogene, 1996, 12(11):2259-2266.
9 Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, et al. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol[J]. J Cell Biol, 2003, 160(7):1115-1127.
10 Lamb HK, Mee C, Xu W, et al. The affinity of a major Ca^{2+} binding site on GRP78 is differentially enhanced by ADP and ATP[J]. J Biol Chem, 2006, 281(13):8796-8805.
11 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation [J]. Science, 1998, 281(5381):1305-1308.

[收稿日期 2010-04-09][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

《中国临床新医学》杂志会员入会登记表
(复印填写后寄回本刊)

姓 名		性 别		出生年月		职 务	
职 称		学 位		专 业			
单 位			地 址				
电 话		E-mail			邮 编		