

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.06.004

• 基础研究 •

# 唑来膦酸影响人鼻咽癌HNE-1细胞增殖和凋亡的体外实验



王鸿彪, 林文照, 林穗玲, 李绪渊, 林英城, 林雯

## Inhibitory Effects of Zoledronic Acid on Proliferation and Apoptosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line HNE-1 *in vitro*

WANG Hongbiao, LIN Wenzhao, LIN Suiling, LI Xuyuan, LIN Yingcheng, LIN Wen

Department of Medical Oncology, Cancer Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Corresponding author: LIN Wen, E-mail: wenlinst@yahoo.com.cn

**Abstract: Objective** To demonstrate the effects of apoptosis-inducing and proliferation-inhibiting of zoledronic acid (ZOL) in human nasopharyngeal carcinoma cell HNE-1 and explore its potential mechanism.

**Methods** The ability of cell proliferation was detected by MTT assay. Cell apoptosis and cycle were analyzed by flow cytometry. DNA fragmentation of apoptotic cells was detected by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. The expression of mRNA and protein of apoptosis-related genes, such as Bcl-2, Bad, Bax and Caspase-9, were investigated by Real-time PCR and Western blot. **Results** Compared with control group, different concentrations of ZOL (2.5, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) did not show an inhibition effect on the proliferation of HNE-1 cells at the time point of 24 h by MTT assay. While the anti-proliferative effect was found obviously over a period of incubation of 48 h as well as 72 h ( $P < 0.05$ ), but not shown in a dose- or time-dependent manner ( $P > 0.05$ ). The rate of early apoptosis was significantly higher than that of control group over an incubation time of 48 and 72 h. After incubated with ZOL for 48 h, HNE-1 cells showed a cell cycle arrest in S phases. TUNEL method showed more apoptotic cells in the experiment group ( $P < 0.05$ ). Real-time PCR and Western blot revealed that the proapoptotic genes, Bad, Bax, and Caspase-9, were up-regulated in ZOL-treated HNE-1 cells, whereas the antiapoptotic gene Bcl-2 was down-regulated both in mRNA and protein levels. **Conclusion** ZOL could inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in HNE-1 cells, which might be related with down-regulating protein expressions of antiapoptotic Bcl-2 gene and up-regulating proapoptotic genes, Bax, Bad and Caspase-9.

**Key words:** Zoledronic acid; Human nasopharyngeal carcinoma cell line (HNE-1); Apoptosis; Proliferation

**摘要:目的** 观察唑来膦酸对鼻咽癌细胞系HNE-1的增殖抑制及凋亡诱导作用并探索其相关机制。**方法** MTT法检测体外细胞增殖能力; 流式细胞仪分析细胞凋亡和细胞周期变化; 原位末端标记法 (TUNEL) 检测DNA片段化以标记凋亡细胞; Real-time PCR和Western blot检测凋亡相关基因Bcl-2、Bad、Bax及Caspase-9 mRNA和蛋白表达。**结果** MTT显示不同浓度唑来膦酸处理组(2.5、5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ )作用24 h, 对HNE-1细胞增殖无抑制作用( $P > 0.05$ ); 作用48和72 h均能明显抑制HNE-1细胞增殖( $P < 0.05$ ); 但抑制增殖能力与药物浓度和作用时间未呈时效和量效关系( $P > 0.05$ )。10~40  $\mu\text{mol/L}$ 唑来膦酸处理后, 48和72 h的早期凋亡率明显高于对照组; S期细胞比例较对照组升高( $P < 0.01$ ); TUNEL法染色显示, 作用72 h后凋亡细胞明显增多( $P < 0.05$ ); Real-time PCR和Western blot显示, 唑来膦酸下调Bcl-2 mRNA和蛋白的表达, 同时上调Bad、Bax及Caspase-9 mRNA和蛋白表达。**结论** 唑来膦酸可以抑制HNE-1细胞增殖, 诱导HNE-1细胞凋亡, 可能与促进Bad、Bax及Caspase-9的表达并降低Bcl-2的表达有关。

**关键词:** 唑来膦酸; HNE-1细胞; 凋亡; 增殖

中图分类号: R739.62 文献标识码: A

## 0 引言

基础研究发现唑来膦酸对多种肿瘤有直接或间接的抗肿瘤作用<sup>[1-3]</sup>, 包括抑制肿瘤细胞增

殖、诱导凋亡、降低肿瘤细胞的迁移、侵袭能力, 抑制肿瘤新生血管形成等。在鼻咽癌细胞系HNE-1, 已有体外研究证明唑来膦酸可以抑制其侵袭、迁移能力<sup>[4]</sup>, 但对其增殖及凋亡作用未见报道。本研究通过体外试验, 观察唑来膦酸对人鼻咽癌细胞株HNE-1增殖抑制及凋亡诱导作用并探索相关机制, 为临床治疗提供基础理论依据。

收稿日期: 2013-02-07; 修回日期: 2013-04-18

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2011B031800190)

作者单位: 515031 广东汕头, 汕头大学医学院附属肿瘤医院内科

通信作者: 林雯, E-mail: wenlinst@yahoo.com.cn

作者简介: 王鸿彪(1976-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事头颈部肿瘤的诊治与研究

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 唑来膦酸(瑞士Novartis公司), Trizol(美国Invitrogen公司), SYBR<sup>®</sup> Green Ex Taq™ 试剂盒(日本TaKaRa公司), 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基公司), TUNEL试剂盒(德国罗氏公司), 兔抗人Bcl-2、Bad、Bax、Caspase-9、GAPDH多克隆抗体(北京博奥森公司)。

1.1.2 细胞株 人鼻咽癌细胞株HNE-1由中南大学肿瘤研究所提供, 细胞培养用含15%胎牛血清、100 u/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的DMEM培养液, 于37℃、95%湿度、5%CO<sub>2</sub>条件下进行培养。

### 1.2 实验方法

1.2.1 MTT法检测 取对数生长期HNE1细胞, 按每孔 $2 \times 10^3$ 个细胞种植于96孔板, 以不同浓度(0、2.5、5、10、20、40 μmol/L)唑来膦酸分别作用24、48、72 h后, 每孔加入浓度为5 g/L的MTT 20 μl, 继续培养4 h, 加入150 μl 二甲基亚砜, 待MTT结晶充分溶解后, 应用酶标光度仪测定各孔492 nm的A值, 计算唑来膦酸对细胞的增殖抑制率。增殖抑制率 =  $(1 - A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。根据MTT结果筛选出唑来膦酸的最佳处理剂量组, 分为4组, 即对照组、10、20和40 μmol/L处理组。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 药物作用48及72 h, 用0.25%胰蛋白酶常规消化, 收集 $1 \times 10^5$ 个细胞, 500 μl Binding buffer悬浮细胞, 加入5 μl Annexin V-FITC混匀后加入5 μl Propidium Iodide, 室温避光5 min, 在1 h用内流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期 药物作用48 h, 常规消化, 加入预冷的70%乙醇4 ml悬浮细胞, 加入PI染液400 μl(含0.25 mg/ml RNase A), 室温避光30 min, 用流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.2.4 原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测凋亡细胞片段化 收集细胞, 固定、脱水、浸蜡制成细胞团石蜡块, 4 μm厚连续切片, 脱蜡、水化后按TUNEL试剂盒说明书操作。显微镜下( $\times 400$ )随机计数上下左右中5个不同视野的凋亡细胞数及总细胞数, 计算凋亡率。凋亡率 =  $(\text{凋亡细胞数}/\text{总细胞数}) \times 100\%$ 。

1.2.5 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定Bcl-2、Bax、Bad和Caspase-9 mRNA的表达 药物作用48h后, 以Trizol液提取细胞总RNA, 取1 μg用于反转录, 产物用于反转录PCR扩增。目的基因Bcl-2上游引物为5'-CTC CCT CTC CCC GCG ACT CC-3', 下游引物为5'-GGG GGT GTC TTC AAT CAC GCG

G-3', Bax上游引物5'-TCCAGGATCGAGCAGGG CGA-3', 下游引物为5'-AAA AGG GCG ACA ACC CGG CC-3', Bad上游引物为5'-GGG ATG GGG GAG GAG CCCAG-3', 下游引物: 5'-AAG GTC ACT GGG AGG GGG CG-3', Caspase-9上游引物为5'-TCCCAGGGGCTGTCTACGGC-3', 下游引物为5'-TCC AGCTGGTCGAAGGTCCTCA-3', GAPDH上游引物5'-ACC CAG AAG ACTGTG GATGG-3', 下游引物为5'-TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3'。在PCR结束后由实时荧光定量PCR仪自动绘制扩增曲线, 各组标本中目的基因mRNA表达量的检测: 在反应结束后PCR仪会自动分析给出每个标本的Ct值, 应用 $\Delta\Delta Ct$ 法根据公式: 相对表达量 =  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ , 其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{测量样本}} - \Delta Ct_{\text{参照样本}}$ ,  $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 。

1.2.6 Western blot法测定Bcl-2、Bax、Bad和Caspase-9蛋白的表达 HNE1细胞经不同浓度唑来膦酸作用48 h后, 加入适量裂解液, 收集蛋白上清液, 每孔加入20 μg蛋白, 变性不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 转移至PVDF膜上, 加入Bcl-2、Bax、Bad、Caspase-9和GAPDH抗体, 用辣根过氧化物酶标记的二抗检测蛋白表达。于PVDF膜上滴加化学发光荧光增强剂显影。不做任何处理的HNE1细胞作为对照组。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS17.0软件进行分析。用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较多组样本均数用单因素方差分析, 比较均数间相差的显著性用方差分析中的Student-Newman-Keult Q检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 唑来膦酸对HNE-1细胞的增殖抑制作用

与对照组比较, 各处理组作用24 h后唑来膦酸对HNE-1细胞无增殖抑制作用( $P > 0.05$ ); 而作用48和72 h均能抑制细胞增殖, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 但抑制增殖能力未呈时效和量效关系( $P > 0.05$ ), 见图1。

### 2.2 唑来膦酸诱导HNE-1细胞凋亡的作用

唑来膦酸处理HNE-1细胞48 h后, 10、20、40 μmol/L唑来膦酸组的早期凋亡率分别为(13.6 ± 2.3)%、(16.2 ± 3.42)%和(17.9 ± 1.64)%, 与对照组凋亡率(4.2 ± 0.1)%比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 处理72 h后, 早期凋亡率分别为(12.9 ± 3.6)%、(13.6 ± 1.2)%和(27.2 ± 0.6)%, 与对照组凋亡率(3.53 ± 0.44)%比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 唑来膦酸影响HNE-1细胞周期的分布

不同浓度唑来膦酸作用HNE-1细胞48 h, S期细胞比例较对照组升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 见图2。

### 2.4 TUNEL法检测不同浓度唑来膦酸诱导的凋亡细胞

经TUNEL法染色后阳性物质呈棕褐色颗粒, 位于细胞核内。凋亡细胞多呈圆形, 少数形状不规则。各个浓度组作用HNE-1细胞48 h后的凋亡细胞数分别为(4.25±3.33)%、(4.45±2.56)%、(5.55±2.87)%和(5.12±3.14)%, 与对照组(3.33±4.25)%比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 作用72 h的凋亡指数分别为(5.00±5.84)%、(11.67±3.33)%、(16.67±5.29)%和(26.11±4.92)%, 与对照组(5.00±5.84)%比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图3。

### 2.5 唑来膦酸对HNE1细胞Bcl-2、Bax、Bad和Caspase-9 mRNA和蛋白表达的影响

Real time-PCR和Western blot检测结果显示经唑来膦酸处理48 h, 无论是mRNA还是蛋白水平, Bax、Bad和Caspase-9三者的表达均有不同程度的上升, 而Bcl-2表达则在高浓度唑来膦酸处理时下降, 见图4、5。

### 3 讨论

本体外实验发现唑来膦酸能抑制鼻咽癌HNE-1细胞的增殖, 诱导细胞凋亡; 并进一步发现可能与上调HNE-1细胞Bax、Bad和Caspase9 mRNA和蛋白的表达, 下调Bcl-2 mRNA和蛋白的表达有关。

本研究显示唑来膦酸对HNE-1细胞的抗增殖作用不存在时间及浓度的依赖性。作用24 h对细胞增殖无影响; 作用48 h和72 h, 浓度为10~40μmol/L的增殖抑制率均接近50%, 组间差异无统计学意义。与文献报道唑来膦酸对乳腺癌细胞的增殖抑制不存在浓度依赖相一致<sup>[5-6]</sup>。但在其他研究中唑来膦酸对一些肿瘤表现出较强的抗增殖作用并且呈时效及量效关系<sup>[7-8]</sup>。Li等<sup>[7]</sup>报道唑来膦酸50 μmol/L对肺癌细胞系BABB/cByJ的增殖抑制率达80%; Ory等<sup>[8]</sup>报道唑来膦酸对在骨肉瘤细胞系MG63、SaOS2、U2OS和MNNG-HOS的增殖抑制率接近90%。这可能是唑来膦酸对不同细胞系的敏感度差异所致。

本研究发现唑来膦酸可以诱导HNE-1细胞凋亡, 并影响细胞周期的分布, 这与文献报道相符<sup>[9-10]</sup>。张卫东等<sup>[9]</sup>报道, 唑来膦酸在浓度为30 μmol/L时能诱导

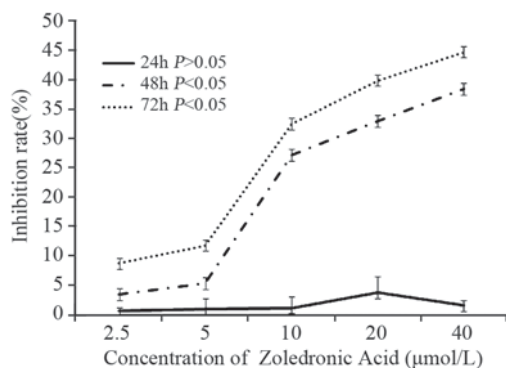


图1 不同浓度唑来膦酸对HNE-1细胞的增殖抑制作用  
Figure1 The anti-proliferative effect of different concentrations of Zoledronic Acid on HNE-1 cells

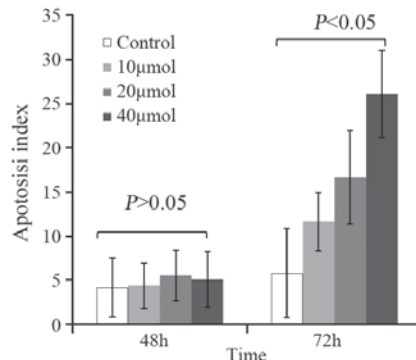
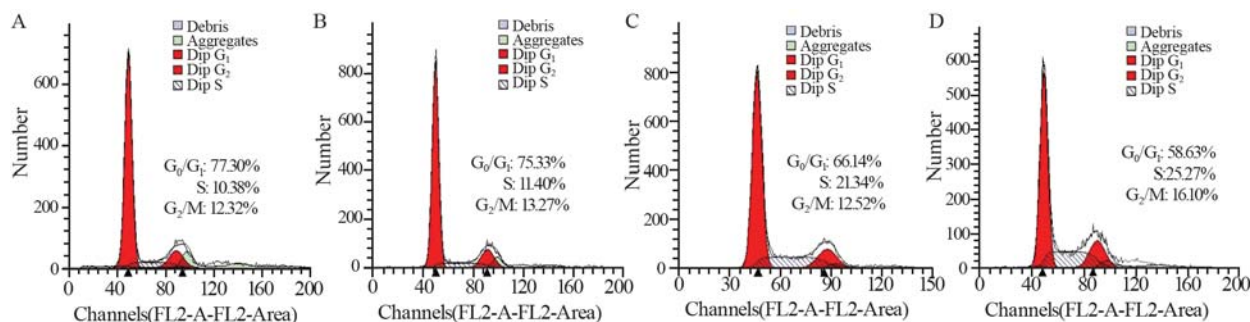


图3 不同浓度唑来膦酸作用HNE-1细胞48及72h后的凋亡率  
Figure3 Apoptotic rates of HNE-1 cells treated with different concentrations of Zoledronic Acid for 48 and 72h



A: Zoledronicacid 0μmol/L; B:Zoledronicacid 10μmol/L; C:Zoledronicacid 20μmol/L; D:Zoledronicacid 40μmol/L

图2 不同浓度唑来膦酸作用HNE-1细胞48h后细胞周期分布情况

Figure2 Cell cycle distribution of HNE-1 cells treated with various concentrations of Zoledronic Acid for 48h

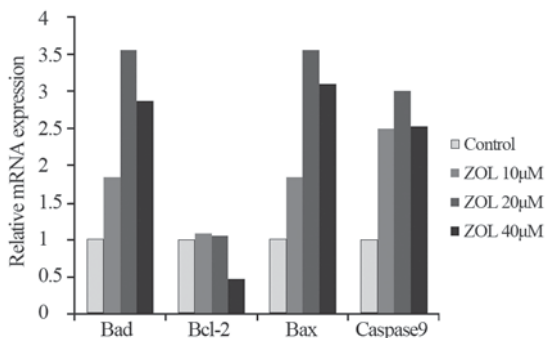


图4 不同浓度唑来膦酸处理后HNE-1细胞Bcl-2、Bax、Bad和Caspase9 mRNA的表达

Figure4 The mRNA expressions of Bcl-2,Bax,Bad and Caspase9 treated with different concentrations of Zoledronic Acid

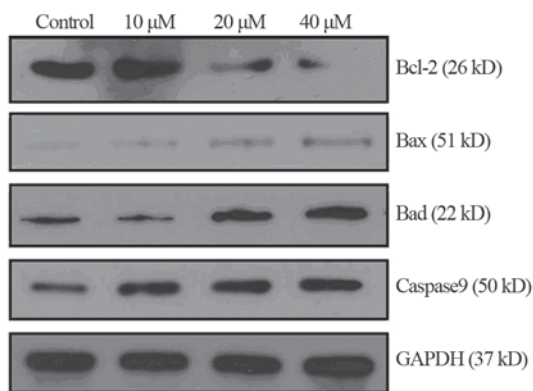


图5 不同浓度唑来膦酸处理后HNE-1细胞Bcl-2、Bax、Bad和Caspase9 蛋白的表达

Figure5 The protein expressions of Bcl-2, Bax, Bad and Caspase9 treated with different concentrations of Zoledronic Acid

肺癌95D细胞凋亡, 并增加G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞比例; Iguchi等<sup>[10]</sup>研究指出, 唑来膦酸在(10~100)µmol/L时能诱导骨肉瘤HOS细胞和MG63细胞凋亡, 并明显增加S期的细胞比例。本研究进一步探讨唑来膦酸诱导凋亡的可能机制。

细胞凋亡通过两个途径, 胞膜死亡受体介导的外在通路及线粒体介导的内在通路。已有研究报道唑来膦酸诱导肿瘤细胞的凋亡是通过线粒体途径<sup>[11]</sup>。本研究中唑来膦酸处理后, Bcl-2家族抑制凋亡成员如Bcl-2表达抑制, 而促凋亡成员如Bax、Bad的表达上调, 且凋亡执行蛋白Caspase9 的表达上调。提示唑来膦酸诱导HNE-1细胞凋亡可能也是通过线粒体介导的内在通路, 此结果为唑来膦酸抗鼻咽癌

作用的体内抑癌研究、抗癌机制的进一步阐明, 以及临床治疗提供一定的理论依据。但更具体的机制, 如细胞色素C的释放、线粒体膜电位的改变这些更经典的表现等均需要进一步研究证实。

参考文献:

- [1] Okamoto S, Kawamura K, Li Q, *et al.* Zoledronic acid produces antitumor effects on mesothelioma through apoptosis and S-phase arrest in p53-independent and Ras prenylation-independent manners[J]. *J Thorac Oncol*,2012,7(5):873-82.
- [2] Ibrahim T, Mercatali L, Sacanna E, *et al.* Inhibition of breast cancer cell proliferation in repeated and non-repeated treatment with zoledronic acid[J]. *Cancer Cell Int*,2012,12(1):48.
- [3] Koto K, Murata H, Kimura S, *et al.* Zoledronic acid significantly enhances radiation-induced apoptosis against human fibrosarcoma cells by inhibiting radioadaptive signaling[J]. *Int J Oncol*,2013,42(2):525-34.
- [4] Li XY, Lin YC, Huang WL, *et al.* Zoledronic acid inhibits proliferation and impairs migration and invasion through downregulating VEGF and MMPs expression in human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Med Oncol*,2012,29(2):714-20.
- [5] Neville-Webbe HL, Coleman RE, Holen I. Combined effects of the bisphosphonate, zoledronic acid and the aromatase inhibitor letrozole on breast cancer cells in vitro:evidence of synergistic interaction[J]. *Br J Cancer*,2010, 102(6):1010-7.
- [6] Rachner TD, Singh SK, Schoppert M, *et al.* Zoledronic acid induces apoptosis and changes the TRAIL/OPG ratio in breast cancer cells[J]. *Cancer Lett*,2010,287(1):109-16.
- [7] Li YY, Chang JW, Chou WC, *et al.* Zoledronic acid is unable to induce apoptosis, but slows tumor growth and prolongs survival for non-small-cell lung cancers[J]. *Lung Cancer*,2008,59(2):180-91.
- [8] Ory B, Blanchard F, Battaglia S, *et al.* Zoledronic acid activates the DNA S-phase checkpoint and induces osteosarcoma cell death characterized by apoptosis-inducing factor and endonuclease-G translocation independently of p53 and retinoblastoma status[J]. *Mol Pharmacol*,2007,71(1):333-43.
- [9] Zhang WD, Han YP, Zong ZH, *et al.* Zoledronic acid blocks cell cycle and induces apoptosis in lung cancer cell line 95D cells and their mechanisms of action[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*,2009,31(6):418-22. [张卫东,韩轶鹏,宗志红,等.唑来膦酸对肺癌95D细胞周期阻滞和诱导凋亡的作用机制[J].*中华肿瘤杂志*,2009,31(6):418-22.]
- [10] Iguchi T, Miyakawa Y, Saito K, *et al.* Zoledronate-induced S phase arrest and apoptosis accompanied by DNA damage and activation of the ATM/Chk1/cdc25 pathway in human osteosarcoma cells[J]. *Int J Oncol*,2007,31(2):285-91.
- [11] Mitrofan LM, Castells FB, Pelkonen J, *et al.* Lysosomal-mitochondrial axis in zoledronic acid-induced apoptosis in human follicular lymphoma cells[J]. *J Biol Chem*,2010,285(3):1967-79.

[编辑校对: 刘红武]