

[文章编号] 1671-587X(2024)04-0917-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240405

冬凌草甲素对人鼻咽癌 HONE-1 细胞增殖、迁移和凋亡的影响

梁超^{1,2}, 代娟娟², 周宁³, 王丹丹^{1,2}, 赵杰^{1,2}, 安迪^{1,2}, 武艳^{1,2}

(1. 滨州医学院附属医院医学研究中心, 山东 滨州 256600; 2. 滨州医学院附属医院肿瘤科, 山东 滨州 256600; 3. 滨州医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 山东 滨州 256600)

[摘要] **目的:** 探讨冬凌草甲素对人鼻咽癌 HONE-1 细胞增殖、迁移、上皮-间质转化 (EMT) 和凋亡的影响, 阐明其相关抗肿瘤机制。**方法:** 鼻咽癌 HONE-1 细胞经不同浓度 (0、5、10、20、40、80 和 160 mg·L⁻¹) 冬凌草甲素处理 48 h 后, 采用 CCK-8 法检测各组细胞增殖抑制率, 确定后续实验的用药浓度。HONE-1 细胞分为对照组、3 mg·L⁻¹ 冬凌草甲素组和 6 mg·L⁻¹ 冬凌草甲素组, 培养 24 和 48 h 后, 采用 CCK-8 法检测各组细胞增殖活性, 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 法检测各组细胞中 EdU 阳性细胞率, 克隆形成实验检测各组细胞中克隆形成数, Transwell 小室实验和细胞划痕实验检测各组细胞中迁移细胞数和划痕愈合率, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组细胞中细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1) 和细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4) mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组细胞中 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Caspase-3) 和多腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 (PARP1) 蛋白表达水平。**结果:** CCK-8 法确定冬凌草甲素 48 h 半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 12.18 mg·L⁻¹, 以 1/4 IC₅₀ 和 1/2 IC₅₀ 值为后续实验用药浓度。与对照组比较, 24 和 48 h 时 3 和 6 mg·L⁻¹ 冬凌草甲素组细胞增殖活性降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), EdU 阳性细胞率降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 细胞中克隆形成数和迁移细胞数减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 划痕愈合率降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 细胞中 CDK1 和 CDK4 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), E-cadherin、Caspase-3 和 PARP1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Vimentin 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。 **结论:** 冬凌草甲素可通过抑制细胞周期相关蛋白的表达及 EMT, 进而抑制人鼻咽癌 HONE-1 细胞增殖、克隆形成和迁移能力, 促进细胞凋亡, 发挥抗肿瘤作用。

[关键词] 冬凌草甲素; 鼻咽肿瘤; 细胞周期; 上皮-间质转化; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5; R739.63 **[文献标志码]** A

Effect of oridonin on cell proliferation, migration, and apoptosis of human nasopharynx carcinoma HONE-1 cells

LIANG Chao^{1,2}, DAI Juanjuan², ZHOU Ning², WANG Dandan³, ZHAO Jie^{1,2}, AN Di^{1,2}, WU Yan^{1,2}

(1. Medical Research Center, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256600, China;

2. Department of Oncology, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256600, China;

3. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital, Binzhou Medical University, Binzhou 256600, China)

[收稿日期] 2023-09-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81903102); 山东省科技厅自然科学基金项目 (ZR2023MH126); 山东省卫健委医药卫生科技发展计划项目 (202202080906); 滨州医学院科研计划与科研启动基金项目 (BY2019KJ04); 滨州医学院“临床+X”项目 (BY2021LCX23)

[作者简介] 梁超 (1998—), 女, 山东省临沂市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤发病机制方面的研究。

[通信作者] 武艳, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: wuyan55@126.com)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of oridonin on the proliferation, migration, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and apoptosis of the human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells, and to clarify its related antitumor mechanism. **Methods:** The HONE-1 cells were treated with different concentrations (0, 5, 10, 20, 40, 80, and 160 mg·L⁻¹) of oridonin for 48 h. CCK-8 method was used to detect the inhibitory rates of proliferation of the cells in various groups and the drug concentration for subsequent experiment was confirmed. The HONE-1 cells were divided into control group, 3 mg·L⁻¹ oridonin group, and 6 mg·L⁻¹ oridonin group. After 24 and 48 h of culture, CCK-8 method was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) method was used to detect the rates of EdU-positive cells in various groups; colony formation assay was used to detect the numbers of clone formation in the cells in various groups; Transwell chamber experiment and cell wound assay were used to detect the numbers of migration cells and the scratch healing rates of the cells in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) and cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of E-cadherin, Vimentin, Caspase-3, and poly ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) proteins in the cells in various groups. **Results:** The CCK-8 method results showed that the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of oridonin at 48 h was 12.18 mg·L⁻¹, and 1/4 IC₅₀ and 1/2 IC₅₀ values were used as the concentrations for subsequent experiments. Compared with control group, after treated for 24 and 48 h, the proliferation activities of the cells in 3 and 6 mg·L⁻¹ oridonin groups were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the rate of EdU-positive cells were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the numbers of clone formation and migraton cells were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the scratch healing rates were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the expression levels of CDK1 and CDK4 mRNA in the cells were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the expression levels of E-cadherin, Caspase-3, and PARP1 proteins were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the expression levels of Vimentin protein were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Oridonin can inhibit the proliferation, clone formation, and migration of the human nasopharyngeal carcinoma HONE-1 cells by downregulating the expression of cell cycle-related proteins and EMT, and promote the apoptosis to exert an antitumor effect.

KEYWORDS Oridonin; Nasopharyngeal neoplasm; Cell cycle; Epithelial-Mesenchymal transit; Apoptosis

我国是鼻咽癌高发国家之一^[1],且南方发病率高于北方。鼻咽癌是一种发生于鼻咽部上皮内黏膜的鳞状细胞癌,以远处转移为特征^[2],因鼻咽位置隐蔽,同时鼻咽癌的早期症状比较复杂,缺乏特异性表现,易被忽视,故多数患者就诊时常处于晚期阶段^[3]。鼻咽癌治疗方式主要是以放疗为主^[4]、化疗为辅的综合治疗,但有许多患者易产生放疗抵抗和化疗耐药。冬凌草甲素是一种从唇形科香茶菜属植物中分离出来的有生物活性的二萜类天然物质^[5]。既往研究^[6-9]表明:冬凌草甲素具有抗炎和抗氧化的功效,同时还具有诱导细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡和抑制血管生成等明显的抗癌活性及肝肾和心脏保护活性。冬凌草甲素在肺癌、甲状腺癌和肝癌等多种肿瘤中发挥一定的抗肿瘤作用,但其在鼻咽癌中的作用鲜有报道。本研究探讨冬凌草

甲素对人鼻咽癌 HONE-1 细胞增殖和凋亡的影响,阐明其相关抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人鼻咽癌 HONE-1 细胞由滨州医学院附属医院医学研究中心提供。冬凌草甲素购于上海麦克林生化科技股份有限公司,DMEM 培养基购于上海龙田生物科技有限公司,胎牛血清购于中国 ExCell Bio 科技有限公司,CCK-8 试剂购于美国 Genview 公司,5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine EdU)试剂盒购于苏州优逸兰迪生物科技有限公司,Transwell 小室购于武汉来博赛斯科技有限公司,预染蛋白 marker 购于中国台湾 SMOBIO 科技有限公司,聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,

PVDF)膜和ECL显影液购于美国Millipore公司,结晶紫染液和RIPA裂解液购于北京索莱宝科技有限公司,TRIzol试剂、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)和脱脂奶粉购于生工生物工程(上海)股份有限公司,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)购于上海雅酶生物科技有限公司,5×loading buffer购于上海碧云天生物科技有限公司,GAPDH抗体、E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)抗体和多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1(poly ADP-ribose polymerase 1, PARP1)抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司,波形蛋白(Vimentin)抗体购于天津博士德生物科技有限公司,SYBR qPCR SuperMix plus购于中国Novoprotein生物公司,逆转录试剂盒购于美国Thermo Fisher Scientific公司。CO₂细胞培养箱和多功能酶标仪购于美国Thermo Fisher Scientific公司,普通光学显微镜购于中国Motic公司,荧光显微镜购于日本Olympus公司,Count star全自动细胞计数仪购于上海睿钰生物科技有限公司,涡旋混合仪购于宁波新芝生物科技股份有限公司,实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)仪、电泳槽和凝胶成像仪购于美国Bio-Rad公司。

1.2 细胞培养 HONE-1细胞在DMEM培养基(含10%胎牛血清和1%链霉素-青霉素双抗)中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,待细胞贴壁生长后取对数生长期HONE-1细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,在显微镜下观察,细胞变圆、间距变大并有细胞脱落时加入等体积的完全培养基终止消化,用移液枪轻柔吹打直至贴壁细胞完全脱落。将吹打混匀的细胞悬液移至高压灭菌的离心管中,1000 r·min⁻¹离心5 min,弃上清,加入1 mL完全培养基重悬,1:3比例接种至培养皿中继续培养,用于后续实验或制成单细胞悬液备用。

1.3 CCK-8法检测不同浓度冬凌草甲素组细胞增殖抑制率和各组细胞增殖活性 取对数生长期HONE-1细胞制成单细胞重悬液,按照台盼蓝:细胞重悬液=1:1比例混合均匀。调整细胞密度为3×10⁴ mL⁻¹,取100 μL接种于96孔细胞培养板中,每组设3个复孔。待细胞贴壁后,用浓度为0、5、

10、20、40、80和160 mg·L⁻¹冬凌草甲素培养48 h,每孔加5 μL CCK-8试剂继续培养3 h,采用酶标仪测定450 nm波长处吸光度(A)值,实验重复3次,取不同时间点的平均A值,并且以0 h的平均A值进行归一化处理后,绘制随药物浓度变化的细胞增殖抑制率曲线,计算各组细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率=(对照组A值-实验组A值)/对照组A值×100%,采用GraphPad Prism 8.0.1统计软件计算冬凌草甲素半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。将单细胞悬液接种于培养皿中,待细胞贴壁且铺满培养皿50%~60%时,以不加药组细胞为对照组,以加入不同浓度(1/4 IC₅₀和1/2 IC₅₀,即3和6 mg·L⁻¹)冬凌草甲素组为实验组,继续培养48 h后,调整细胞密度为3×10⁴ mL⁻¹,取100 μL接种于96孔细胞培养板中,每组设3个复孔。在细胞贴壁24和48 h时每孔加入5 μL CCK-8试剂,3 h后检测各组细胞A值,以A值代表各组细胞增殖活性。

1.4 EdU法检测各组HONE-1细胞中EdU阳性细胞率 细胞分组方法见“1.3”。取各组细胞制成单细胞重悬液,细胞计数后调整细胞密度为2×10⁴ mL⁻¹,取100 μL接种于96孔细胞培养板中,每组设3个复孔,培养48 h后,采用EdU试剂盒进行染色,染色完成后采用荧光显微镜观察拍照。在荧光显微镜下,EdU标记的阳性细胞为红色。随机选取3个视野计数阳性细胞数,计算EdU阳性细胞率。EdU阳性细胞率=EdU阳性细胞数/总细胞数×100%。

1.5 克隆形成实验检测各组细胞中克隆形成数 取处于对数生长期且状态良好的细胞,计数,调整细胞密度为300 mL⁻¹,接种于6孔细胞培养板中,分组和处理方法见“1.3”。在37℃、5% CO₂细胞孵育箱中培养10 d,更换培养基2次,待肉眼观察到细胞集落后终止培养。弃上清,用PBS缓冲液清洗3次,80%无水乙醇固定30 min。弃掉固定液,用PBS缓冲液清洗3次,结晶紫溶液染色15 min。用流水冲洗,干燥后拍照,计数克隆形成数。

1.6 Transwell小室实验检测各组细胞中迁移细胞数 细胞分组方法见“1.3”。取各组HONE-1细胞制成单细胞重悬液,细胞计数后用无血清培养基调整细胞密度为1.5×10⁴ mL⁻¹,Transwell小室下室加入含有20% FBS的培养基800 μL,轻轻放入小室避免产生气泡,小室上室加入200 μL细胞悬液。

轻轻震荡后放入细胞培养箱孵育72 h。孵育完成后弃掉上室细胞悬液,用棉签轻轻擦掉上室底层的细胞,结晶紫溶液染色10 min,用PBS缓冲液浸泡数次,倒置显微镜下采集图像。各组随机选取6个视野,计数各组细胞中迁移细胞数。

1.7 细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合率 细胞分组方法见“1.3”。取各组生长状态良好的细胞制成单细胞重悬液,细胞计数后取 5×10^5 个细胞接种于6孔细胞培养板中。待细胞贴壁且铺满孔板后,取一直尺使其平面横穿于孔板上方,使用20 μ L灭菌枪头,垂直并紧贴直尺进行划痕,每孔横纵各一条划痕。划痕结束后,采用PBS缓冲液清洗3次,去除滑落的细胞,加入无血清培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞孵育箱中培养,分别于0、24和48 h后取样拍照。测量各组不同时间段的划痕宽度,计算细胞划痕愈合率。细胞划痕愈合率=(0 h划痕宽度-24或48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.8 RT-qPCR法检测各组细胞中CDK1和CDK4 mRNA表达水平 细胞分组方法见“1.3”。收集各组细胞沉淀,参照说明书采用TRIzol法提取细胞总RNA,逆转录合成cDNA,使用Nanodrop测定逆转录产物浓度,并用DEPC水稀释至200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以GAPDH为内参扩增CDK1和CDK4基因。引物序列:CDK1, F 5'-GTGCATC-TACACCGACA ACTCCA-3', R 5'-TGAGCTTG-TTCACCAGGAGCA-3'; CDK4, F 5'-CTCTGC-GTCCAGCTGCTCCG-3', R 5'-AGGGAGACCC-TCACGCCAGC-3'; GAPDH, F 5'-CTCCTCCT-GTTCGACAGTCAGC-3', R 5'-CCCAATACG-ACCAAATCCGTT-3'。反应条件:95 $^{\circ}$ C、15 s, 53 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、20 s,共35个循环。实验重复3次。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因mRNA水平。

1.9 Western blotting法检测各组细胞中E-cadherin、Vimentin、Caspase-3和PARP1蛋白表达水平 细胞分组方法见“1.3”。收集各组细胞,以预冷的PBS缓冲液充分洗涤细胞2次,加入适量RIPA裂解液:PMSF=100:1比例配制的蛋白裂解液(现用现配)后冰上裂解30 min,每10 min震荡混匀1次使其充分裂解,4 $^{\circ}$ C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清转移至新的EP管中,加入1/4的5 \times 蛋白上样缓冲液,金属浴100 $^{\circ}$ C,10 min变性。采用SDS-PAGE电泳。上样体积为10 μ L,中间上蛋白样品,两边上maker并用1 \times 蛋白上样缓

冲液补齐上样体积。半干法将凝胶上的蛋白质转移到PVDF膜上,5%脱脂牛奶常温封闭1 h,分别加入一抗E-cadherin、Vimentin、Caspase-3、PARP1和GAPDH抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,洗膜完成后加入HRP标记的羊抗兔或羊抗鼠抗体(稀释比例1:1 000)常温孵育1 h,TBST洗膜3次,每次10 min。配制ECL显影液,采用化学发光法显色曝光。采用Image J图像分析系统对图像扫描,计算各组细胞中目的蛋白的表达水平。目的蛋白的表达水平=目的蛋白条带的灰度值/内参GAPDH灰度值 $\times 100\%$ 。

1.10 统计学分析 采用GraphPad Prism 8.0.1统计软件进行统计学分析。采用Shapiro-Wilk检验对各组数据进行正态性检验,各组细胞增殖活性、EdU阳性细胞率、克隆形成数、迁移细胞数和划痕愈合率,各组细胞中CDK1和CDK4 mRNA表达水平,各组细胞中E-cadherin、Vimentin、Caspase-3和PARP1蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

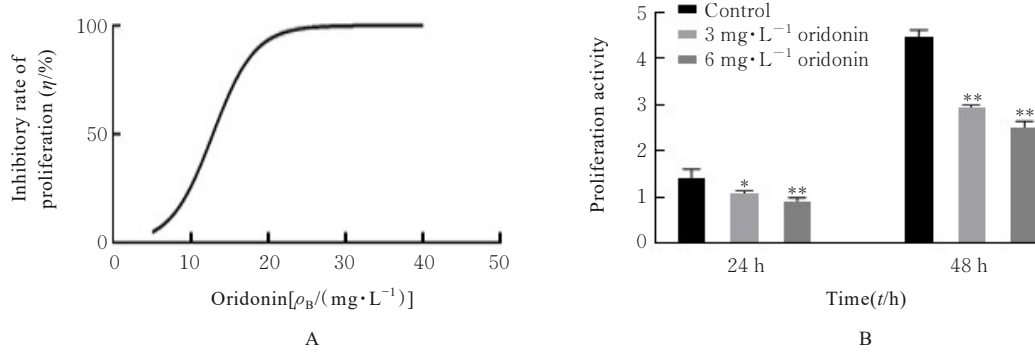
2.1 冬凌草甲素的 IC_{50} 和各组细胞增殖活性 不同浓度(0、5、10、20、40、80和160 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)冬凌草甲素(每组3个复孔)分别作用于HONE-1细胞48 h后,随着冬凌草甲素浓度升高,各组细胞增殖抑制率明显升高。根据以上结果计算出冬凌草甲素的 IC_{50} 为12.18 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与对照组比较,24和48 h时3和6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 冬凌草甲素组细胞增殖活性降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图1。

2.2 各组细胞中EdU阳性细胞率 与对照组(34.35% \pm 1.01%)比较,3和6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 冬凌草甲素组EdU阳性细胞率(29.83% \pm 1.33%和19.34% \pm 0.32%)降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图2。

2.3 各组细胞克隆形成数 与对照组(81.00个 \pm 5.66个)比较,3和6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 冬凌草甲素组克隆形成数(51.00个 \pm 2.83个和3.50个 \pm 0.707个)减少($P < 0.05$)。见图3。

2.4 各组细胞中迁移细胞数 与对照组(52.00个 \pm 3.00个)比较,3和6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 冬凌草甲素组细胞中迁移细胞数(42.00个 \pm 3.00个和22.67个 \pm 1.53个)减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图4。

2.5 各组细胞划痕愈合率 与对照组(59.80% \pm



*P<0.05, **P<0.01 compared with control group.

图1 各组细胞增殖抑制率(A)和增殖活性(B)

Fig. 1 Inhibitory rates of proliferation (A) and proliferation activities(B) of cells in various groups

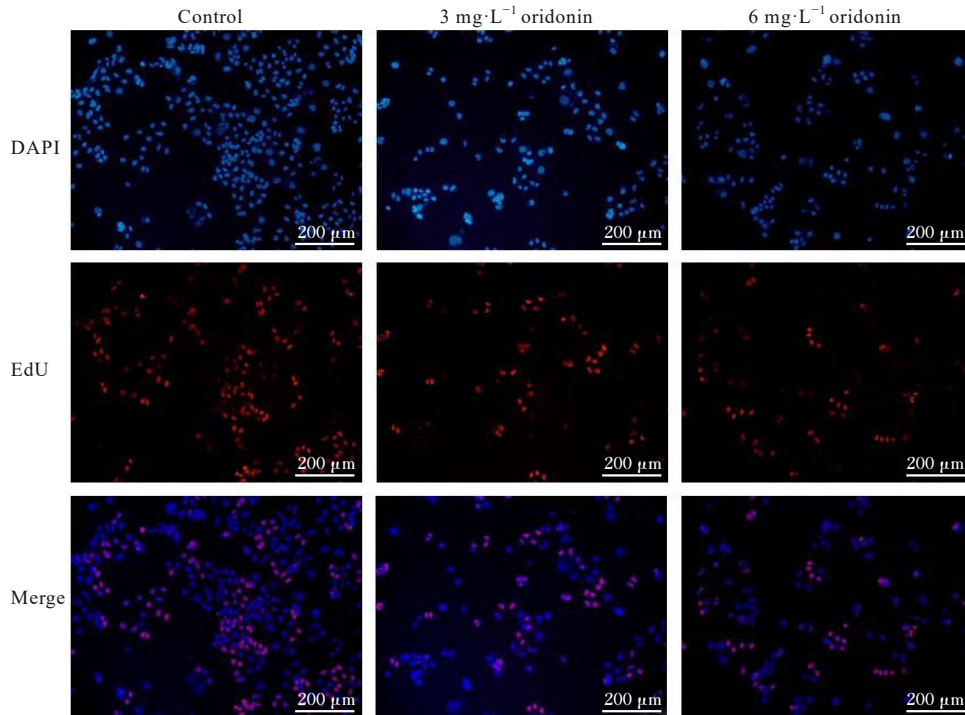
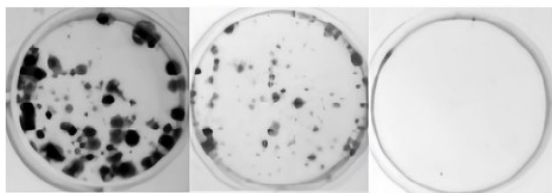


图2 EdU法检测各组细胞中EdU阳性表达情况

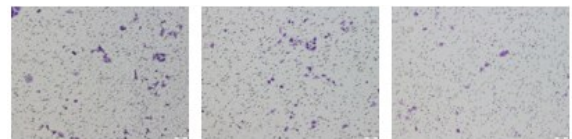
Fig. 2 Positive expression of EdU in various groups detected by EdU method



A: Control group; B: 3 mg·L⁻¹ oridonin group; C: 6 mg·L⁻¹ oridonin group.

图3 克隆形成实验检测各组细胞克隆形成情况(结晶紫)

Fig. 3 Clone formation of cells in various groups detected by clone formation assay(Crystal violet)

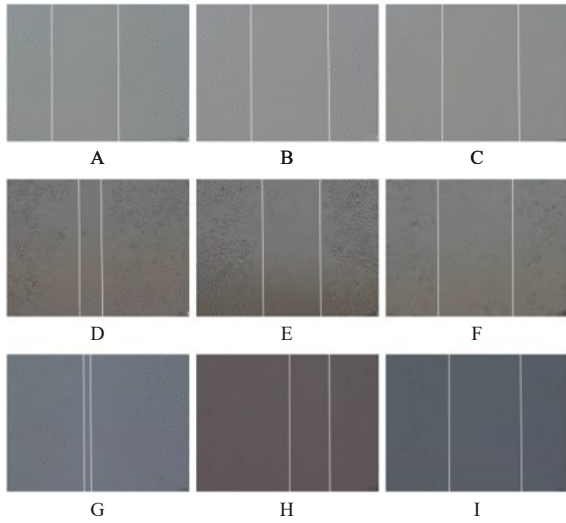


A: Control group; B: 3 mg·L⁻¹ oridonin group; C: 6 mg·L⁻¹ oridonin group.

图4 Transwell小室实验检测各组细胞迁移情况(结晶紫, ×400)

Fig. 4 Migration of cells in various groups detected by Transwell chamber assay(Crystal violet, ×400)

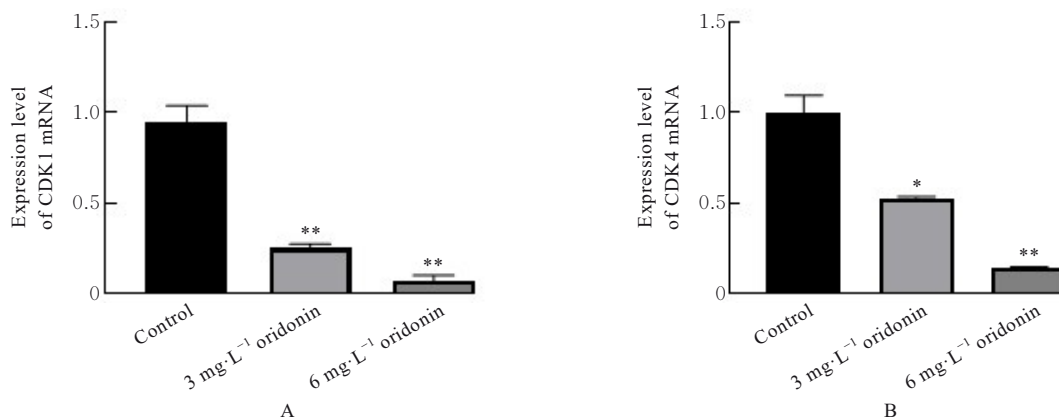
7.02%和86.70%±2.83%)比较,3和6 mg·L⁻¹冬凌草甲素组细胞24 h划痕愈合率(26.42%±1.21%和6.09%±4.44%)和48 h划痕愈合率(47.25%±3.75%和9.62%±4.66%)降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见图5。



A—C: 0 h; D—F: 24 h; G—I: 48 h; A, D, G: Control group; B, E, H: 3 mg·L⁻¹ oridonin group; C, F, I: 6 mg·L⁻¹ oridonin group.

图5 细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合情况(×400)
Fig. 5 Scratch healing of cells in various groups detected by cell scratch assay(×400)

2.6 各组细胞中CDK1和CDK4 mRNA表达水平 与对照组比较,3和6 mg·L⁻¹冬凌草甲素组细胞中CDK1和CDK4 mRNA表达水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见图6。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

图6 RT-qPCR法检测各组细胞中CDK1(A)和CDK4(B) mRNA表达水平

Fig. 6 Expression levels of CDK1(A) and CDK4(B) mRNA in cells in various groups detected by RT-qPCR method

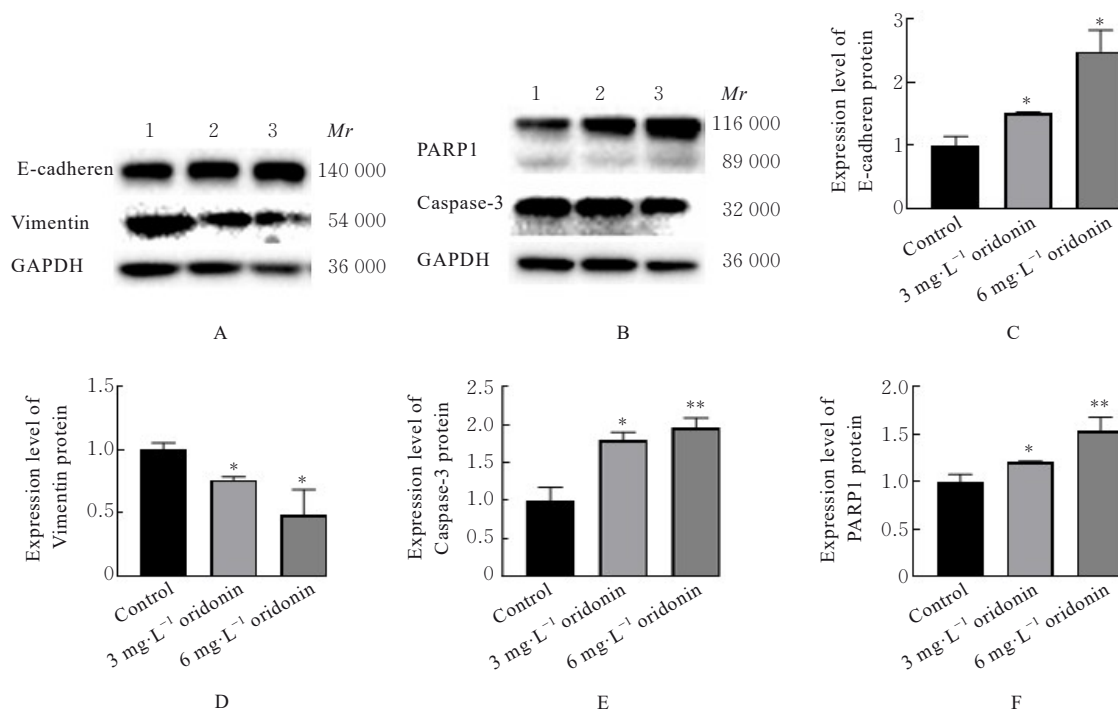
2.7 各组细胞中E-cadherin、Vimentin、Caspase-3和PARP1蛋白表达水平 与对照组比较,3和6 mg·L⁻¹冬凌草甲素组细胞中E-cadherin、Caspase-3和PARP1蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Vimentin蛋白表达水平降低($P<0.05$)。见图7。

3 讨论

近年来,国内外多项研究^[10-14]表明:冬凌草甲素对肿瘤的发生发展具有一定的抑制作用。在肺癌中,冬凌草甲素能抑制肺癌细胞生长并促进细胞凋亡,与放疗联合使用时可通过增加细胞DNA损伤和细胞凋亡来增强放疗反应,同时也可有效抑制异种移植瘤的生长,可通过下调B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和上调Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)增强肺癌的放疗敏感性;在甲状腺癌中,冬凌草甲素可通过下调非受体型蛋白酪氨酸激酶家族信号通路抑制EMT和血管生成;在肝癌中,其衍生物可通过线粒体途径触发肝癌细胞的凋亡;但其在鼻咽癌中的作用少见报道。

本研究结果显示:采用冬凌草甲素处理后,与对照组比较,HONE-1细胞的增殖能力、克隆形成能力、迁移能力和划痕愈合能力均减弱,表明冬凌草甲素能够抑制HONE-1细胞的增殖和迁移。

细胞周期蛋白是一类与细胞周期功能状态密切相关的蛋白质家族,可通过与特定蛋白激酶结合并激活其活性,从而在细胞周期的不同阶段发挥调控作用^[15]。CDK1和CDK4是高度保守的丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶,在细胞周期循环中发



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group. Lane 1: Control group; Lane 2: 3 mg·L⁻¹ oridonin group; Lane 3: 6 mg·L⁻¹ oridonin group.

图7 Western blotting法检测各组细胞中EMT相关蛋白和凋亡相关蛋白表达电泳图(A,B)和直条图(C~F)

Fig. 7 Electrophoregrams(A,B) and histograms(C~F) of expressions of EMT-related proteins and apoptosis-related proteins in HONE-1 cells detected by Western blotting method

挥重要作用^[16-17]。本研究结果显示：冬凌草甲素处理后人鼻咽癌 HONE-1 细胞中 CDK1 和 CDK4 mRNA 表达水平降低，提示冬凌草甲素能抑制鼻咽癌 HONE-1 细胞的分裂能力。

EMT 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程，在癌症的进展和转移过程中发挥了重要作用^[18]，其主要的特征为细胞黏附分子表达水平降低^[19-20]，细胞角蛋白细胞骨架转化为 Vimentin 为主的细胞骨架及形态上具有间充质细胞的特征^[21]。通过 EMT，上皮细胞失去了细胞极性，失去了与基底膜的连接等上皮表型，获得了较高的迁移、侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型。本研究结果显示：冬凌草甲素作用后，HONE-1 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平升高，Vimentin 蛋白表达水平降低，说明冬凌草甲素可控制 HONE-1 细胞的 EMT 过程，抑制其迁移和侵袭，促进细胞凋亡，抑制细胞外基质的降解。Caspase-3 是细胞凋亡过程中主要的终末剪切酶，在细胞凋亡中发挥着重要的作用^[22]。多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerases, PARPs) 是一个超大蛋白酶家族，在 DNA 修复、

染色质组织、基因组完整性、炎症过程和细胞凋亡过程中发挥重要作用^[23]，也是细胞凋亡核心成员含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteine aspartic acid-specific proteases, Caspases) 的切割底物。PARP1 作为 PARPs 家族的重要成员之一，能快速标记细胞 DNA 损伤的位置，通过相关系统来清除 DNA 的损伤^[24]。本研究结果显示：冬凌草甲素处理后，鼻咽癌 HONE-1 细胞中 Caspase-3 和 PARP1 蛋白表达水平升高，表明冬凌草甲素可以诱导鼻咽癌 HONE-1 细胞凋亡，但其具体促凋亡机制仍有待深入研究。

综上所述，冬凌草甲素可抑制鼻咽癌 HONE-1 细胞的增殖能力、克隆形成能力和迁移能力，并参与诱导细胞凋亡过程，进而抑制肿瘤的生长。本研究为寻找鼻咽癌新的治疗方法奠定了基础。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

梁超参与研究设计、实验操作和论文撰写，代娟娟参与实验操作，周宁参与数据收集、整理和分析，王丹丹和

赵杰参与细胞表型实验和细胞处理, 安迪参与论文校对, 武艳参与论文审校。

[参考文献]

- [1] SUN L L, SONG J J, HUANG Q L. Clinicopathological and prognostic significance of p16 protein in nasopharynx cancer patients: a PRISMA-compliant meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(11): e14602.
- [2] BAI R H, SUN J Z, XU Y, et al. Incidence and mortality trends of nasopharynx cancer from 1990 to 2019 in China: an age-period-cohort analysis [J]. *BMC Public Health*, 2022, 22(1): 1351.
- [3] MAHDAVIFAR N, GHONCHEH M, MOHAMMADIAN-HAFSHEJANI A, et al. Epidemiology and inequality in the incidence and mortality of nasopharynx cancer in Asia [J]. *Osong Public Health Res Perspect*, 2016, 7(6): 360-372.
- [4] LIU G S, ZHANG S M, MA Y Z, et al. Effects of error on dose of target region and organs at risk in treating nasopharynx cancer with intensity modulated radiation therapy [J]. *Pak J Med Sci*, 2016, 32(1): 95-100.
- [5] AN Y P, ZHU J, WANG X, et al. Oridonin delays aging through the AKT signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 888247.
- [6] LI C Y, ZHU Y H, WU Y Y, et al. Oridonin alleviates LPS-induced depression by inhibiting NLRP3 inflammasome *via* activation of autophagy [J]. *Front Med*, 2021, 8: 813047.
- [7] LI X, ZHANG C T, MA W, et al. Oridonin: a review of its pharmacology, pharmacokinetics and toxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 645824.
- [8] LI D H, HAN T, LIAO J, et al. Oridonin, a promising ent-kaurane diterpenoid lead compound [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): 1395.
- [9] HONG M K, LIU H H, CHEN G H, et al. Oridonin alters hepatic urea cycle via gut microbiota and protects against acetaminophen-induced liver injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 3259238.
- [10] PARK H, JEONG Y J, HAN N K, et al. Oridonin enhances radiation-induced cell death by promoting DNA damage in non-small cell lung cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2378.
- [11] LI S R, SHI D, ZHANG L Y, et al. Oridonin enhances the radiosensitivity of lung cancer cells by upregulating Bax and downregulating Bcl-2 [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6): 4859-4864.
- [12] LIU W, WANG X D, WANG L, et al. Oridonin represses epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis of thyroid cancer via downregulating JAK2/STAT3 signaling [J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(6): 965-974.
- [13] LUO D D, YI Y J, PENG K, et al. Oridonin derivatives as potential anticancer drug candidates triggering apoptosis through mitochondrial pathway in the liver cancer cells [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 178: 365-379.
- [14] 何静, 严如根, 金国钰, 等. 冬凌草甲素体内外抗卵巢癌活性及相关机制研究 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2023, 58(4): 480-489.
- [15] TCHAKARSKA G, SOLA B. The double dealing of cyclin D1 [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(2): 163-178.
- [16] CHEN N P, ARETZ J, FÄSSLER R. CDK1-cyclin-B1-induced kindlin degradation drives focal adhesion disassembly at mitotic entry [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(5): 723-736.
- [17] YIN Q Y, JIAN Y L, XU M, et al. CDK4/6 regulate lysosome biogenesis through TFE3/TFEB [J]. *J Cell Biol*, 2020, 219(8): e201911036.
- [18] SINGH M, YELLE N, VENUGOPAL C, et al. EMT: mechanisms and therapeutic implications [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 182: 80-94.
- [19] SOMMARIVA M, GAGLIANO N. E-cadherin in pancreatic ductal adenocarcinoma: a multifaceted actor during EMT [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 1040.
- [20] HASHEMI M, ARANI H Z, OROUEI S, et al. EMT mechanism in breast cancer metastasis and drug resistance: Revisiting molecular interactions and biological functions [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113774.
- [21] BRABLETZ S, SCHUHWERK H, BRABLETZ T, et al. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression [J]. *EMBO J*, 2021, 40(18): e108647.
- [22] ESKANDARI E, EAVES C J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis [J]. *J Cell Biol*, 2022, 221(6): e202201159.
- [23] ARRURI V K, GUNDU C, KHAN I, et al. PARP overactivation in neurological disorders [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(3): 2833-2841.
- [24] WANG Y, LUO W, WANG Y. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2019, 81: 102651.