

引用本文: 曹华琳, 尹昕, 梁天嵩. 紫草素调控 Hippo 信号通路抑制鼻咽癌细胞株生物学功能及其机制研究[J]. 安徽医药, 2024, 28(1): 31-36. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2024.01.007.



◇ 药学研究 ◇

紫草素调控 Hippo 信号通路抑制鼻咽癌细胞株生物学功能及其机制研究

曹华琳¹, 尹昕¹, 梁天嵩²

作者单位:¹南阳市中心医院耳鼻喉科, 河南 南阳 473000;

²郑州大学第一附属医院放疗科, 河南 郑州 450000

基金项目: 2019年度河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20190046)

摘要 **目的** 探讨紫草素介导 Hippo 信号通路对鼻咽癌(NPC)细胞株 CNE2 生物学功能的影响。**方法** 于 2021 年 1—12 月使用含不同浓度紫草素培养液(0、2.0、4.0、8.0、16.0 mg/L)培养对数生长期鼻咽癌细胞(CNE2 细胞)48 h, 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测细胞存活率; 流式细胞术、平板克隆、伤口愈合及 Transwell 实验分别检测 CNE2 细胞凋亡、集落形成、迁移及侵袭情况; 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)技术检测细胞 yes 相关蛋白 1(YAP1)、具有 PDZ 结合基序的转录共激活子(TAZ)mRNA 相对表达情况; 蛋白质印迹法检测 YAP1、yes 相关蛋白 1(p-YAP1)、TAZ、磷酸化具有 PDZ 结合基序的转录共激活子(p-TAZ)、N-钙黏蛋白(N-cad)、波形蛋白(Vim)及 E-钙黏蛋白(E-cad)蛋白表达情况。**结果** 与 0 mg/L 浓度紫草素 CNE2 细胞存活率(100%)、集落形成数(514.67±25.81)个、划痕愈合率(88.58±3.40)%、侵袭细胞数(233.67±15.01)个、YAP1 与 TAZ mRNA 及蛋白(1.01±0.02、1.00±0.01、0.68±0.04、0.51±0.03)比较, 2 mg/L 浓度紫草素[(92.70±5.92)%、(452.33±22.72)个、(69.91±3.03)%、(195.33±18.15)个、0.93±0.02、0.91±0.05、0.56±0.03、0.44±0.02], 4 mg/L 浓度紫草素[(81.75±3.83)%、(308.33±22.12)个、(53.61±3.21)%、(153.33±10.02)个、0.81±0.03、0.76±0.04、0.45±0.03、0.30±0.03], 8 mg/L 浓度紫草素[(54.93±3.89)%、(173.67±13.65)个、(30.32±1.68)%、(92.67±6.66)个、0.65±0.03、0.54±0.04、0.31±0.03、0.24±0.02], 16 mg/L 浓度紫草素[(33.89±2.14)%、(85.33±13.05)个、(18.31±1.42)%、(52.33±6.03)个、0.41±0.02、0.30±0.02、0.18±0.02、0.16±0.02]降低($P<0.05$), CNE2 细胞凋亡率、p-YAP1 与 p-TAZ 及 E-cad 蛋白相对表达水平均随紫草素作用浓度增大而升高($P<0.05$); 紫草素作用效果呈剂量依赖性($P<0.05$)。**结论** 紫草素可抑制 NPC 细胞株 CNE2 细胞恶性生物学功能, 其作用机制可能与抑制 Hippo 信号通路核心下游信号因子 YAP1、TAZ 蛋白激活, 阻止上皮间质转化(EMT)有关。

关键词 紫草素; Hippo 信号通路; 鼻咽肿瘤; 波形蛋白; 上皮-间质转化; 鼻咽癌细胞株; 生物学功能

Shikonin inhibits the biological function of nasopharyngeal carcinoma cell line by regulating the Hippo signaling pathway and its mechanism

CAO Hualin¹, YIN Xin¹, LIANG Tiansong²

Author Affiliations:¹Department of Otolaryngology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, He'nan 473000, China;

²Department of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, He'nan 450000, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of shikonin on the biological function of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE2 by regulating Hippo signaling pathway. **Methods** From January 2021 to December 2021, CNE2 cells in logarithmic growth phase were cultured by culture medium containing different concentrations of shikonin (0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 mg/L) for 48 hours, the cell survival rate was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method. The apoptosis, colony formation, migration and invasion of CNE2 cells were detected by flow cytometry, plate cloning, wound healing and Transwell assay. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the relative expression of cell yes associated protein 1 (YAP1) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) with PDZ binding motif mRNA. The expression levels of YAP1, phosphorylated yes associated protein 1 (p-YAP1), TAZ, phosphorylated transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (p-TAZ), N-cadherin (N-cad), vimentin (Vim) and E-cadherin (E-cad) protein were detected by western blotting. **Results** Compared with 0 mg/L shikonin CNE2 cell survival rate (100%), colony formation number (514.67±25.81) cells, scratch healing rate (88.58±3.40)%, invasive cell number [(233.67±15.01) cells], YAP1 and TAZ mRNA and protein (1.01±0.02, 1.00±0.01, 0.68±0.04, 0.51±0.03), 2 mg/L shikonin (92.70±5.92)%, (452.33±22.72) cells, (69.91±3.03)%, (195.33±18.15)

cells, (0.93±0.02), (0.91±0.05), (0.56±0.03), (0.44±0.02), 4 mg/L shikonin [(81.75±3.83)%], (308.33±22.12) cells, (53.61±3.21)% , (153.33±10.02) cells , (0.81±0.03), (0.76±0.04), (0.45±0.03), (0.30±0.03), 8 mg/L shikonin [(54.93±3.89)%], (173.67±13.65) cells, (30.32±1.68)% , (92.67±6.66) cells, (0.65±0.03), (0.54±0.04), (0.31±0.03), (0.24±0.02), 16 mg/L shikonin [(33.89±2.14)%], (85.33±13.05) cells, (18.31±1.42)% , (52.33±6.03) cells, (0.41±0.02), (0.30±0.02), (0.18±0.02), (0.16±0.02) decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate of CNE2 cells, the relative expression levels of p-YAP1, p-TAZ and E-cad protein increased with the increase of shikonin concentration ($P<0.05$). The effects of shikonin were dose-dependent ($P<0.05$). **Conclusion** Shikonin can inhibit the malignant biological function of NPC cell line CNE2 cells, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of the core downstream signaling factors of the Hippo signaling pathway including YAP1 and TAZ proteins, and preventing epithelial mesenchymal transformation (EMT).

Keywords Shikonin; Hippo signal pathway; Nasopharyngeal neoplasms; Vimentin; Epithelial-mesenchymal transition; CNE2 line; Biological function

鼻咽癌(NPC)是一种罕见的头颈癌,位于鼻咽部上皮层,居我国头颈部恶性肿瘤发病率之首^[1],具有典型的地域性和种族分布性,多见于中国南部和东南亚地区^[2]。目前,NPC治疗的主要策略为放射疗法^[3],但易导致NPC局部复发及远处转移,病人5年生存率也因此不足60%^[4],积极探索NPC侵袭和转移的分子机制并开发新型治疗药物,可能是提高病人生存率的有效手段。紫草素广泛用于治疗烧伤、麻疹、痢和黄斑疹^[5],据报道,其可通过多种途径抑制NPC发展^[6]。研究发现,Hippo通路有助于顺铂耐药诱导的NPC细胞上皮间质转化(EMT)进而利于癌症侵袭和远处转移^[7],但关于紫草素是否可通过Hippo信号通路作用NPC细胞的相关报道较少,故本研究于2021年1—12月以人鼻咽癌细胞(CNE2细胞)为研究载体并利用不同浓度紫草素加以作用,探讨其抗CNE2效果及可能机制,以期对NPC干预机制及治疗药物选择提供一定的参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人鼻咽癌细胞株CNE2购自中国科学院细胞库。

1.1.2 试剂和仪器 紫草素(纯度98%)(南京道斯夫生物科技有限公司,批号517-89-5);Matrigel基质胶(美国BD公司,批号356234);AnnexinV-FITC/PI流式细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司,批号KGA106);胎牛血清(美国Gibco公司,批号10270);肿瘤抑制激酶1/2抗体(LATS1/2)(武汉艾美捷生物科技有限公司,批号ABP51705);p-LATS1/2抗体(bs-7913R)及波形蛋白(Vim)抗体(bs-8533R)购自北京博奥森生物科技有限公司;yes相关蛋白1(YAP1)抗体(批号ab52771)、p-YAP1抗体(批号ab76252)、具有PDZ结合基序的转录共激活子(TAZ)抗体(批号ab176396)、N-钙黏蛋白(N-cad)抗体(批号ab76011)、E-钙黏蛋白(E-cad)抗体(批号ab227639)购自美国Abcam公司;p-TAZ抗体(批号sc-17610)购自细胞生物科技上海股份有限公司;550型全自动酶标仪购自

美国Bio-Rad公司;FluorChem HD2化学发光凝胶成像系统购自美国ProteinSimple公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RPMI 1640完全培养液(含10%胎牛血清)复苏CNE2细胞,以 1×10^5 个/毫升密度接种至25 cm²培养瓶中,于37℃、体积分数为5%二氧化碳及饱和湿度环境条件下的培养箱中培养,待细胞生长至80%左右时即进行传代,传代2~3次。

1.2.2 CCK8法检测紫草素对CNE2细胞存活率的影响 收集对数期细胞,配制RPMI 1640条件培养液(含0、2.0、4.0、8.0、16.0 mg/L紫草素),分别重悬细胞,并以 5×10^3 个/毫升密度接种200 μL细胞悬液于96孔板中,相应浓度各设5个复孔。培养箱内培养48 h,直接加入20 μL CCK8试剂于培养箱内培养2 h。全自动酶标仪测定450 nm处的吸光度(OD)值,细胞存活率(%)=实验组OD值/对照组OD值×100%(实验组指含有紫草素的实验孔,对照组不含紫草素的对照孔),重复3次。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 收集对数期细胞,RPMI 1640条件培养液培养48 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,1 000 r/min离心5 min,收集细胞沉淀,70%乙醇-PBS溶液4℃固定过夜,PBS洗涤2~3次,结合缓冲液重悬,5 μL Annexin V-FITC溶液、5 μL PI溶液避光染色15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率,重复3次。

1.2.4 平板克隆形成实验检测集落形成能力 收集对数期细胞,RPMI条件培养液重悬,并以每孔100个细胞的密度接种在6孔板中,对应培养14 d,至肉眼可见的细胞克隆后终止培养,冷4%多聚甲醛固定,1%结晶紫染色,显微镜下观察并利用ImageJ计算菌落(超过50个细胞)。

1.2.5 伤口愈合实验检测细胞迁移能力 收集对数期细胞,RPMI完全培养液重悬,以 2×10^5 个细胞接种于6孔板中。待培养至汇合,10 μL塑料移液枪头作垂直细胞面划痕,PBS洗涤细胞3次,拍照记录划痕;后利用RPMI 1640条件培养液(不含胎牛血清)

培养 48 h, 拍照记录划痕, ImageJ 软件测量划痕宽度变化, 计算划痕愈合率即(0 h 划痕宽度-48 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 \times 100%, 重复 3 次。

1.2.6 Transwell 检测细胞侵袭能力 Matrigel 基质胶涂布上腔室, 4 °C 下干燥, RPMI 1640 条件培养液(不含胎牛血清)重悬的细胞以每孔 1×10^5 个接种 200 μ L 至 Transwell 24 孔板上室, 下室加入 500 μ L 含 10% 胎牛血清的对应条件培养液, 48 h 后弃去培养液, 甲醇固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 擦除过滤器上层细胞, 镜下观察底部细胞并计数, 重复 3 次。

1.2.7 RT-qPCR 技术检测 YAP1、TAZ mRNA 相对表达水平 收集对数期细胞, RPMI 1640 条件培养液培养 48 h, Trizol 试剂提取紫草素各浓度下细胞总 RNA, 检测其浓度及纯度可用后逆转录为 cDNA。制备 RT-PCR 反应体系, 反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s 40 个循环。以 β -actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。Primer Premier 5.0 软件设计引物, 送至华大基因合成。引物序列: YAP1 正向 5'-ACCCACAGCTCAGCATCTT C-3', 反向引物 5'-GCTGTGACGTTTCATCTGGGA-3'; TAZ 正向 5'-ACCCGC GAGTACAACCTTCTT-3', 反向 5'-TATC-GTCATCCATGGCGAACT-3'; β -actin 正向 5'-CCCA-CACTGTGCCATCTAC-3', 反向 5'-GGAACCGCT-CATT GCCAATG-3'。

1.2.8 蛋白质印迹法技术检测相关蛋白相对表达情况 收集对数期细胞, RPMI 1640 条件培养液培养 48 h, 收集细胞沉淀, RIPA 裂解液提取细胞总蛋白并测定蛋白浓度, 取约 50 μ g 总蛋白上样, 10%

SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 一抗(均 1:1 000 稀释)4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 二抗(1:8 000 稀释)室温孵育 1 h, 洗膜, HRP-ECL 法显影, 化学发光凝胶成像系统曝光, Image J 分析条带灰度值, 以目的蛋白与内参 β -actin 灰度值比值表示蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法 SPSS 26.0 软件进行数据统计学处理, 多组计量资料比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD-*t* 检验, 计量结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 紫草素对 CNE2 细胞增殖、集落形成能力及 CNE2 细胞凋亡的影响 CNE2 细胞存活率随紫草素浓度增大而降低(P<0.05), 集落形成数随紫草素作用浓度增大而减少(P<0.05)。CNE2 细胞凋亡率随紫草素浓度增大而升高(P<0.05)。见表 1, 图 1。

2.2 紫草素对 CNE2 细胞迁移能力的影响 CNE2 细胞划痕愈合率随紫草素作用浓度增大而降低(P<0.05)。见图 2, 表 2。

2.3 紫草素对 CNE2 细胞侵袭能力的影响 CNE2 侵袭细胞数随紫草素作用浓度增大而减少(P<0.05)。见表 2。

2.4 紫草素对 CNE2 细胞 YAP1、TAZ mRNA 表达的影响 CNE2 细胞 YAP1、TAZ mRNA 相对表达水平均随紫草素作用浓度增大而降低(P<0.05)。见表 3。

2.5 紫草素对 Hippo 信号通路相关蛋白表达的影响 YAP1、TAZ、N-cad 及 Vim 蛋白相对表达水平随

表 1 不同浓度紫草素培养下 CNE2 细胞存活率比较 $\bar{x} \pm s$

紫草素浓度	重复次数	细胞存活率/%	细胞凋亡率/%	集落形成数/个
0 mg/L	3	100.00	0.97 \pm 0.29	514.67 \pm 25.81
2.0 mg/L	3	92.70 \pm 5.92 ^①	7.97 \pm 1.14 ^①	452.33 \pm 22.72 ^①
4.0 mg/L	3	81.75 \pm 3.83 ^{①②}	19.91 \pm 3.21 ^{①②}	308.33 \pm 22.12 ^{①②}
8.0 mg/L	3	54.93 \pm 3.89 ^{①②③}	42.67 \pm 5.27 ^{①②③}	173.67 \pm 13.65 ^{①②③}
16.0 mg/L	3	33.89 \pm 2.14 ^{①②③④}	62.31 \pm 5.50 ^{①②③④}	85.33 \pm 13.05 ^{①②③④}
F 值		274.49	138.90	242.50
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: ①与 0 mg/L 紫草素比较, P<0.05。②与 2.0 mg/L 紫草素比较, P<0.05。③与 4.0 mg/L 紫草素比较, P<0.05。④与 8.0 mg/L 紫草素比较, P<0.05。

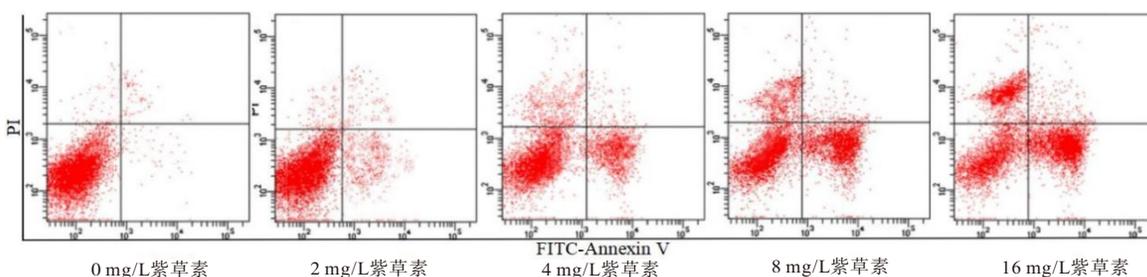


图 1 流式细胞仪检测紫草素各浓度下 CNE2 细胞凋亡情况

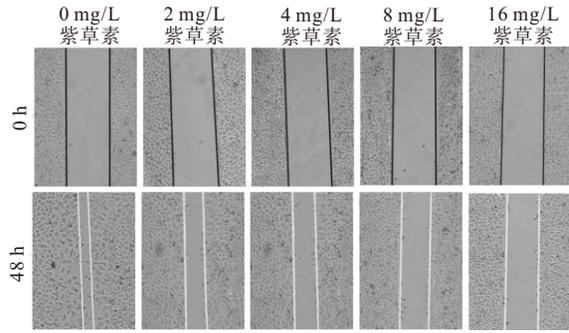


图2 各浓度紫草素培养下CNE2细胞迁移情况

表2 不同浓度紫草素培养下CNE2侵袭细胞数比较 $\bar{x} \pm s$

紫草素浓度	重复次数	侵袭细胞数/个	划痕愈合率/%
0 mg/L	3	233.67±15.01	88.58±3.40
2.0 mg/L	3	195.33±18.15 ^①	69.91±3.03 ^①
4.0 mg/L	3	153.33±10.02 ^{①②}	53.61±3.21 ^{①②}
8.0 mg/L	3	92.67±6.66 ^{①②③}	30.32±1.68 ^{①②③}
16.0 mg/L	3	52.33±6.03 ^{①②③④}	18.31±1.42 ^{①②③④}
F值		111.05	341.35
P值		<0.001	<0.001

注:①与0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。②与2.0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。③与4.0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。④与8.0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。

表3 不同浓度紫草素培养下CNE2细胞YAP1、TAZ mRNA相对表达水平比较 $\bar{x} \pm s$

紫草素浓度	重复次数	YAP1	TAZ
0 mg/L	3	1.01±0.02	1.00±0.01
2.0 mg/L	3	0.93±0.02 ^①	0.91±0.05 ^①
4.0 mg/L	3	0.81±0.03 ^{①②}	0.76±0.04 ^{①②}
8.0 mg/L	3	0.65±0.03 ^{①②③}	0.54±0.04 ^{①②③}
16.0 mg/L	3	0.41±0.02 ^{①②③④}	0.30±0.02 ^{①②③④}
F值		285.60	325.89
P值		<0.001	<0.001

注: YAP1为yes相关蛋白1, TAZ为具有PDZ结合基序的转录共激活子。

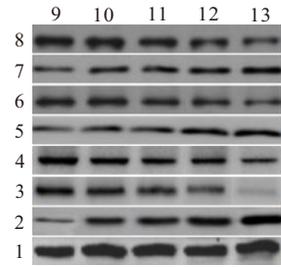
①与0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。②与2.0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。③与4.0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。④与8.0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。

表4 不同浓度紫草素培养下CNE2细胞YAP1等蛋白相对表达水平比较 $\bar{x} \pm s$

紫草素浓度	重复次数	YAP1	p-YAP1	TAZ	p-TAZ	N-cad	Vim	E-cad
0 mg/L	3	0.68±0.04	0.16±0.02	0.51±0.03	0.17±0.02	0.64±0.03	0.50±0.02	0.15±0.02
2.0 mg/L	3	0.56±0.03 ^①	0.22±0.02 ^①	0.44±0.02 ^①	0.23±0.02 ^①	0.53±0.03 ^①	0.46±0.01 ^①	0.28±0.02 ^①
4.0 mg/L	3	0.45±0.03 ^{①②}	0.29±0.02 ^{①②}	0.30±0.03 ^{①②}	0.28±0.03 ^{①②}	0.38±0.02 ^{①②}	0.34±0.02 ^{①②}	0.36±0.02 ^{①②}
8.0 mg/L	3	0.31±0.03 ^{①②③}	0.36±0.02 ^{①②③}	0.24±0.02 ^{①②③}	0.44±0.03 ^{①②③}	0.32±0.02 ^{①②③}	0.19±0.02 ^{①②③}	0.56±0.03 ^{①②③}
16.0 mg/L	3	0.18±0.02 ^{①②③④}	0.48±0.03 ^{①②③④}	0.16±0.02 ^{①②③④}	0.52±0.03 ^{①②③④}	0.23±0.01 ^{①②③④}	0.09±0.01 ^{①②③④}	0.71±0.03 ^{①②③④}
F值		124.88	93.12	103.00	92.44	150.28	327.11	249.35
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: YAP1为yes相关蛋白1, p-YAP1为磷酸化yes相关蛋白1, TAZ为具有PDZ结合基序的转录共激活子, p-TAZ为磷酸化具有PDZ结合基序的转录共激活子, N-cad为N-钙黏蛋白, Vim为波形蛋白, E-cad为E-钙黏蛋白。

①与0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。②与2.0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。③与4.0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。④与8.0 mg/L紫草素比较, $P < 0.05$ 。



注: 1— β -肌动蛋白(β -actin); 2—E-钙黏蛋白(E-cad); 3—波形蛋白(Vim); 4—N-钙黏蛋白(N-cad); 5—磷酸化具有PDZ结合基序的转录共激活子(p-TAZ); 6—具有PDZ结合基序的转录共激活子(TAZ); 7—磷酸化yes相关蛋白1(p-YAP1); 8—yes相关蛋白1(YAP1); 9—0 mg/L紫草素; 10—2.0 mg/L紫草素; 11—4.0 mg/L紫草素; 12—8.0 mg/L紫草素; 13—16.0 mg/L紫草素。

图3 蛋白质印迹法检测紫草素培养下CNE2细胞相关蛋白条带图

紫草素作用浓度增大而降低; p-YAP1、p-TAZ及E-cad蛋白相对表达水平随紫草素作用浓度增大而升高。见图3, 表4。

3 讨论

紫草素是一种萘醌色素, 为紫草主要生物活性成分之一, 对多种类型肿瘤具有抗癌作用^[8]。研究发现, 其可以时间和剂量依赖性方式显著抑制结直肠癌细胞的活性并促进其凋亡^[9], 并可通过调节细胞增殖、凋亡、迁移及有氧糖酵解途径发挥抗NPC作用^[6, 10]。鼻咽部位隐匿, 多数病人在确诊时已出现淋巴结转移, 预后较差, 抗凋亡特性及肿瘤细胞向周围组织和远处器官的侵袭与转移是恶性肿瘤的重要特征^[11-12], 本研究发现, 紫草素可显著抑制CNE2细胞的增殖活性、集落形成、迁移及侵袭能力, 并可诱导其凋亡, 且呈剂量依赖性, 提示紫草素可以剂量依赖性方式抑制CNE2癌细胞的恶性发展, 可能是改善NPC复发及转移等不良预后的潜在药物。

EMT已被证明是介导NPC转移的关键因素, 此过程中上皮性肿瘤细胞转化为间充质表型, 细胞形态改变、上皮细胞极性丧失、细胞间黏附中断、迁移和侵袭能力增强^[13]。E-cad是上皮细胞中的特征性分子标志, 位于黏附连接处和基底外侧质膜上,

Vim和N-cad则主要在间充质来源的细胞中表达,与肿瘤细胞侵袭密切相关^[14],抑制NPC细胞中EMT可降低Vim和N-cad表达,上调E-cad水平并来抑制NPC细胞侵袭、转移^[15-16]。Mo等^[17]研究发现,紫草素可逆转EMT,抑制膀胱癌细胞的迁移和侵袭;Li、Zeng^[18]研究结果显示,紫草素可下调EMT标志蛋白N-cad、Vim水平,上调E-cadherin蛋白表达,抑制肝细胞癌的恶性生物学行为,包括增殖、抗凋亡、迁移及侵袭。本研究经不同浓度紫草素作用后发现,CNE2细胞中N-cad及Vim蛋白相对表达水平降低,E-cad蛋白相对表达水平升高,且呈剂量依赖性,提示紫草素可能通过减少上皮细胞向间质细胞形态转化,促进细胞极性及细胞间黏附能力恢复,抑制EMT进展,进而抑制CNE2细胞迁移及侵袭。

Hippo通路控制组织稳态,包括器官大小、细胞增殖和凋亡,YAP和TAZ是该通路中的关键蛋白,在许多肿瘤中过度表达^[19]。研究发现,癌细胞中增加的YAP及TAZ可破坏细胞间连接,促进间充质基因表达,并增强EMT相关的形态变化^[20],Hippo/YAP/TAZ信号通路可通过调节EMT促进肿瘤的转移及侵袭^[21]。在没有活性激酶级联反应的情况下,YAP1和TAZ蛋白以其未磷酸化的形式转移到细胞核中并充当转录辅助因子,并结合TEA结构域转录因子家族的成员并促进促增殖和抗凋亡基因的转录^[22];Hippo激酶存在时,YAP1和TAZ被上游信号磷酸化,p-YAP和p-TAZ在细胞质中积累并被定向降解^[23]。据报道,紫草素可依赖于Hippo通路的活性,调节癌细胞葡萄糖代谢,发挥肿瘤抑制作用^[24],但关于紫草素介导Hippo信号通路调节EMT过程而发挥抗NPC作用的相关研究较少。本研究经分子实验分析紫草素可能通过减少YAP1及TAZ的核转移,降低与TEA结构域转录因子家族的成员结合,促进两者在细胞质内的积累并通过定向降解,抑制癌细胞恶性生物学相关基因转录,进而发挥抗EMT及抗增殖作用。

综上所述,紫草素可抑制鼻咽癌细胞株CNE2恶性生物学功能,其作用机制可能与抑制Hippo信号通路中核心下游信号因子YAP1、TAZ蛋白表达并抑制EMT进展有关。

参考文献

[1] 张贵,尚蕾,李晓玲,等.结肠癌转移相关基因1、磷酸化需肌醇酶1蛋白在鼻咽癌组织中表达及与其临床病理特征、放疗敏感度及预后的关系[J].安徽医药,2022,26(2):360-364.

[2] LUNG RW, HAU PM, YU KH, et al. EBV-encoded miRNAs target ATM-mediated response in nasopharyngeal carcinoma [J]. J

Pathol, 2018, 244(4): 394-407.

[3] KONG L, HU J, GUAN X, et al. Phase I/II trial evaluating carbon ion radiotherapy for salvaging treatment of locally recurrent nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cancer, 2016, 7(7): 774-783.

[4] LI J, WANG W, CHEN S, et al. FOXA1 reprograms the TGF- β -stimulated transcriptional program from a metastasis promoter to a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer Lett, 2019, 442(1): 1-14.

[5] ZHANG X, CUI JH, MENG QQ, et al. Advance in anti-tumor mechanisms of shikonin, alkannin and their derivatives [J]. Mini Rev Med Chem, 2018, 18(2): 164-172.

[6] LIU T, SUN X, CAO Z. Shikonin-induced necroptosis in nasopharyngeal carcinoma cells via ROS overproduction and upregulation of RIPK1/RIPK3/MLKL expression [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12(1): 2605-2614.

[7] LI S, ZHANG X, ZHANG R, et al. Hippo pathway contributes to cisplatin resistant-induced EMT in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Cell Cycle, 2017, 16(17): 1601-1610.

[8] GUO CJ, HE J, SONG XM, et al. Pharmacological properties and derivatives of shikonin-A review in recent years [J]. Pharmacol Res, 2019, 149: 104463.DOI:10.1016/j.phrs.2019.104463.

[9] QI H, ZHANG X, LIU H, et al. Shikonin induced apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress in colorectal cancer cells [J]. J Cancer, 2022, 13(1): 243-252.

[10] ZHANG J, ZHOU J, XIAO S. Shikonin inhibits growth, invasion and glycolysis of nasopharyngeal carcinoma cells through inactivating the phosphatidylinositol 3 kinase/AKT signal pathway [J]. Anticancer Drugs, 2020, 31(9): 932-941.

[11] 代文意.锚蛋白B在鼻咽癌组织中的表达及其对鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J].安徽医药,2022,26(2):347-350.

[12] PASTUSHENKO I, BRISEBARRE A, SIFRIM A, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT [J]. Nature, 2018, 556(7702): 463-468.

[13] YANG Z, WANG J, ZHANG Z, et al. Epstein-barr virus-encoded products promote circulating tumor cell generation: a novel mechanism of nasopharyngeal carcinoma metastasis [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12(8): 11793-11804.

[14] CHEN L, LIN G, CHEN K, et al. VEGF promotes migration and invasion by regulating EMT and MMPs in nasopharyngeal carcinoma [J]. J Cancer, 2020, 11(24): 7291-7301.

[15] CHEN M, CHEN C, LUO H, et al. microRNA-296-5p inhibits cell metastasis and invasion in nasopharyngeal carcinoma by reversing transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition [J]. Cell Mol Biol Lett, 2020, 25(1): 49.

[16] TSENG PY, LIU YT, LIN CC, et al. Pinostilbene hydrate inhibits the migration and invasion of human nasopharyngeal carcinoma cells by downregulating MMP-2 expression and suppressing epithelial-mesenchymal transition through the mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J]. Front Oncol, 2019, 9(8):1364.

[17] MO L, XU L, JIA M, et al. Shikonin suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition by downregulating NHE1 in bladder cancer cells [J]. J Cancer, 2021, 12(22): 6814-6824.

[18] LI X, ZENG X. Shikonin suppresses progression and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by modulating miR-106b/SMAD7/TGF- β signaling pathway [J]. Cell Biol

- Int, 2020, 44(2): 467-476.
- [19] WARREN JSA, XIAO Y, LAMAR JM. YAP/TAZ Activation as a target for treating metastatic cancer[J]. Cancers, 2018, 10(4):115.
- [20] ZHENG D, JIN L, CHEN B, et al. The ETNK2 gene promotes progression of papillary thyroid carcinoma through the HIPPO pathway[J]. J Cancer, 2022, 13(2): 508-516.
- [21] ZANCONATO F, CORDENONSI M, PICCOLO S. YAP/TAZ at the roots of cancer[J]. Cancer Cell, 2016, 29(6): 783-803.
- [22] CUNNINGHAM R, HANSEN CG. The Hippo pathway in cancer: YAP/TAZ and TEAD as therapeutic targets in cancer [J]. Clin Sci, 2022, 136(3): 197-222.
- [23] COLLAK FK, DEMIR U, OZKANLI S, et al. Increased expression of YAP1 in prostate cancer correlates with extraprostatic extension[J]. Cancer Biol Med, 2017, 14(4): 405-413.
- [24] VALIŠ K, TALACKO P, GROBÁROVÁ V, et al. Shikonin regulates C-MYC and GLUT1 expression through the MST1-YAP1-TEAD1 axis[J]. Exp Cell Res, 2016, 349(2): 273-281.
- (收稿日期:2022-04-29,修回日期:2022-07-18)

引用本文:赵冯,张杞柳,陈辉,等.电感耦合等离子体质谱法测定盐酸溴己新葡萄糖注射液中29种元素杂质含量[J].安徽医药,2024,28(1):36-40.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2024.01.008.

◇药物分析◇



电感耦合等离子体质谱法测定盐酸溴己新葡萄糖注射液中29种元素杂质含量

赵冯,张杞柳,陈辉,张磊

作者单位:徐州市检验检测中心,江苏 徐州 221000

通信作者:张磊,女,高级工程师,研究方向为中药检验及质量标准,Email:3646857166@qq.com

基金项目:江苏省市场监督管理局科技计划项目(KJ21125019)

摘要 目的 建立利用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)同时测定盐酸溴己新葡萄糖注射液中29种元素杂质含量的分析方法。**方法** 自2022年9—10月,采用ICP-MS法。样品直接稀释后分析,通过在线加入内标元素来校正测量结果。内标液添加异丙醇进行基质匹配以减少仪器信号漂移干扰和样品基体效应。射频功率1 550 W;雾化气流量1.05 L/min;辅助气流量0.90 L/min;KED模式;碰撞气流量4.5 mL/min;全定量法采集。**结果** 29个元素在各自的检测浓度范围内线性关系良好($r > 0.9987$)。检测限为0.000 057 3~0.285 $\mu\text{g/L}$,平均回收率为91.0%~108.4% ($n=3$),重复性为1.3%~7.2% ($n=6$)。**结论** 该方法快速、准确、操作简便,可用于盐酸溴己新葡萄糖注射液中元素杂质的质量控制。

关键词 药物污染; 盐酸溴己新葡萄糖注射液; 电感耦合等离子体质谱法; 国际药典委员会Q3D元素杂质指导原则; 元素杂质; 基质匹配

Content determination of 29 element impurities by inductively coupled plasma-mass spectrometry in bromhexine hydrochloride and glucose injection

ZHAO Feng,ZHANG Qiliu,CHEN Hui,ZHANG Lei

Author Affiliation:Xuzhou Inspection Testing Center, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

Abstract Objective To develop a method for simultaneous content determination of 29 elemental impurities in bromhexine hydrochloride and glucose injection by inductively coupled plasma-mass spectroscopy (ICP-MS). **Methods** From September to October 2022, ICP-MS method was adopted. Samples were analyzed after direct dilution, measurement results were corrected by adding internal standard elements online. The internal standard solution was supplemented with 2-propanol for matrix matching to reduce the signal drift and the interference of matrix effect. RF power was set at 1 550 W; the nebulizer gas flow was set at 1.05 L/min; auxiliary gas flow was set at 0.90 L/min; KED mode; collision gas flow was set at 4.5 mL/min. The data were collected by quantitative method. **Results** The 29 elements showed good linearity in the specified concentration range with the correlation coefficients (r) being all above 0.998 7. Detection limits were 0.000 057 3-0.285 $\mu\text{g/L}$. The average recoveries were 91.0%-108.4% ($n=3$). The repeatability was 1.3%-7.2% ($n=6$). **Conclusion** The method is rapid, accurate and simple, and applicable for the elemental impurity control of bromhexine hydrochloride and glucose injection.

Keywords Drug contamination; Bromhexine hydrochloride and glucose injection; Inductively coupled plasma-mass spectroscopy; ICH Q3D; Elemental impurity; Matrix matching