

## 葡萄籽提取物对人鼻咽癌细胞HIF-1 $\alpha$ 表达的影响

胡俊丽<sup>1</sup>, 张月飞<sup>2</sup>, 宋瑾<sup>1</sup>, 钟木生<sup>1</sup>, 张中华<sup>1</sup> (1. 广东省深圳市盐田区人民医院耳鼻咽喉科, 广东深圳 518000; 2. 广东医科大学附属医院耳鼻咽喉-头颈外科, 广东湛江 524023)

**摘要:** 目的 研究葡萄籽提取物(GSE)对鼻咽癌细胞生长及HIF-1 $\alpha$ 表达的影响。方法 用100  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub>处理鼻咽癌CNE-2Z细胞, 建立细胞拟缺氧模型; 不同质量浓度GSE干预一定时间后, MTT检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞周期, 荧光定量PCR和Western blot检测HIF-1 $\alpha$ 表达。结果 GSE抑制低氧环境下CNE-2Z细胞生长, 12.5、25 mg/L GSE处理细胞发生G1/S期阻滞, 不同质量浓度GSE处理减少CNE-2Z细胞表达HIF-1 $\alpha$ 蛋白。结论 GSE抑制低氧环境下CNE-2Z细胞HIF-1 $\alpha$ 表达。

**关键词:** 鼻咽癌; 葡萄籽提取物; 低氧诱导因子-1 $\alpha$

**中图分类号:** R 739.6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 2096-3610(2017)04-0356-04

## Effect of grape seed extract on HIF-1 $\alpha$ expression of human nasopharyngeal carcinoma cells

HU Jun-li<sup>1</sup>, ZHANG Yue-fei<sup>2</sup>, SONG Jing<sup>1</sup>, ZHONG Mu-sheng<sup>1</sup>, ZHANG Zhong-hua<sup>1</sup> (1. Department of Otorhinolaryngology, Yantian District People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518000, China; 2. Department of Otorhinolaryngology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of grape seed extract (GSE) on the growth and HIF-1 $\alpha$  expression of nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** CNE-2Z cells were treated with 100  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub> to establish the hypoxic cell model. After adding various concentrations of GSE for different times, the proliferation, cell cycle and HIF-1 $\alpha$  expression of hypoxic cell model were detected by MTT, flow cytometry, fluorescent quantitative PCR and Western blot, respectively. **Results** In the hypoxic CNE-2Z cells, GSE inhibited the growth, 12.5 mg/L and 25 mg/L GSE induced the G1/S phase blockade, and different concentrations of GSE decreased the HIF-1 $\alpha$  protein expression. **Conclusion** GSE can inhibit HIF-1 $\alpha$  expression in hypoxic CNE-2Z cells.

**Key words:** nasopharyngeal carcinoma; grape seed extract; HIF-1 $\alpha$

鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方高发的恶性肿瘤之一, 具低分化、高转移的特点, 其位置隐蔽、恶性程度高。目前, NPC治疗主要以放疗为主。葡萄籽提取物(Grape seed extract, GSE)是一种生物类黄酮, 在抗氧化、清除自由基活性、促进伤口愈合及组织修复活性及对人类多种肿瘤细胞(如肺癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌及结肠癌等)均有明显的生长抑制或凋亡诱导作用<sup>[1]</sup>, 但其对NPC细胞的影响国内外目前尚未见文献报道。本研究以CNE-2Z细胞缺氧模型为研究对象, 研究GSE对NPC细胞生长及HIF-1 $\alpha$ 表达的影响, 为GSE在NPC治疗中的应用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料与仪器

鼻咽癌CNE-2Z细胞来源于广东医科大学生物化学教研室; RPMI1640培养液、胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司, 0.25%胰蛋白酶液、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、RIPA裂解液、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液购自碧云天生物研究所; 兔抗人HIF-1 $\alpha$ 和VEGF抗体为Santa Cruz公司产品; Transgene Biotech反转录试剂盒及Real Master Mix (SYBR Green)定量PCR试剂盒购自大连宝生物公司; GSE为MUST公司产品; CoCl<sub>2</sub>为美国BBI公司产品; 二甲基乙砒(DMSO)及普通化学试剂均购于上海阿拉丁产品; 7500实时定量PCR仪为美国Applied Biosystems公司产品, 多功能酶标仪为BioTek公司产品, Chemi Doc XRS+凝胶成像系统为美国Bio-Rad公司产品, FACSCanto II流式细胞分析仪为美国BD公司产品。

**基金项目:** 湛江市非资助科技攻关课题(No.2014B101)

**收稿日期:** 2017-03-14; **修订日期:** 2017-06-06

**作者简介:** 胡俊丽(1982-), 女, 硕士研究生, 主治医师。

**通信作者:** 张月飞, 女, 教授。

## 1.2 细胞培养

CNE-2Z细胞培养于含10%FBS、双抗溶液(100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素)的RPMI1640培养液。待细胞生长密度为80%左右时0.25%胰蛋白酶消化传代,并以 $5 \times 10^4$ 个/cm<sup>2</sup>重新接种,隔天换液1次。

## 1.3 细胞拟缺氧模型建立

选择生长状态良好的细胞经胰酶消化后调整细胞浓度为 $1 \times 10^5$ 个/mL置于6孔板,培养过夜后,不同浓度GSE处理细胞1 h后加入100  $\mu$ mol/L CoCl<sub>2</sub>分别处理12、24、72 h获得CNE-2Z细胞拟缺氧模型。

## 1.4 MTT检测细胞增殖

胰酶消化生长良好的细胞调整细胞浓度为 $2 \times 10^3$ 个/孔置于96孔板,培养过夜后,不同质量浓度(0、10、20、50、100 mg/L)GSE处理,1 h后加入100  $\mu$ mol/L CoCl<sub>2</sub>,继续培养24、48、72 h后于每孔加入20  $\mu$ l 0.5%MTT,继续培养4 h左右,小心吸出培养基,加入150  $\mu$ L DMSO于摇床上低速振荡10 min充分溶解孔内结晶于酶标仪检测吸光度值。

## 1.5 流式检测细胞周期

取出细胞经PBS清洗后加入适量胰酶消化细胞,1 000 r/min离心细胞后弃上清,用PBS清洗一遍后加入适量75%无水乙醇固定细胞,固定后的细胞经离心收集后PBS清洗1次,加入适量PI染色工作液孵育30 min左右,PI孵育完成后即可进行流式检测。

## 1.6 荧光定量PCR检测HIF-1 $\alpha$ mRNA表达

细胞总RNA的提取采用Trizol法。大致方法如下:各处理组细胞弃去培养液后,加入1 mL Trizol室温裂解5 min,0.2 mL氯仿,剧烈振摇30 s,静置5 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心15 min,吸上清液加入等体积异丙醇,静置10 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心5 min,含75%乙醇DEPC水洗涤沉淀,干燥后DEPC水溶解RNA。采用Transgene Biotech逆转录试剂盒进

行反转录(具体操作按说明书进行);采用引物HIF-1 $\alpha$  for 5'-GTTTACTAAAGGACAAGTCACC-3', HIF-1 $\alpha$  rev 5'-TCCTGTTTGTGAAGGGAG-3'; GAPDH for 5'-TGGAGTCTACTGGCGTCTT-3', GAPDH rev 5'-TGTCATATTT CTCGTGGTTCA-3'。按Real Master Mix (SYBR Green)说明书操作进行实时荧光定量PCR检测,计算各目标基因相对mRNA表达量。

## 1.7 免疫印迹检测HIF- $\alpha$ 表达

细胞总蛋白的提取采用RIPA裂解液提取法(具体操作按说明书进行),蛋白定量按BCA蛋白定量试剂盒说明书进行,定量后采用10% SDS-PAGE蛋白电泳系统进行凝胶电泳,100 V电泳90 min至溴酚蓝指示剂迁移至底部后,进行电转移,300 mA冰浴电转90 min。电转结束后,膜使用5%脱脂奶粉封闭30 min, TBST漂洗3次每次5 min,加入稀释的一抗工作液(1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST漂洗3次每次5 min,加入稀释的HRP-羊抗小鼠工作液(1:5 000),室温孵育1 h, TBST漂洗3次,每次5 min,加入ECL发光液,置ChemiDoc XRS+成像系统中,检测化学发光情况。

## 1.8 统计学处理

采用SPSS19.0软件进行统计学处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析及 $q$ 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 GSE干预后CNE-2Z细胞增殖检测

MTT检测0、10、20、50、100 mg/L GSE分别干预CNE-2Z细胞24、48、72 h后结果见表1。结果显示在GSE处理的48、72 h,随着GSE质量浓度的增加吸光度值呈下降趋势,说明GSE抑制CNE-2Z细胞增殖。

### 2.2 GSE干预后CNE-2Z细胞周期检测

流式检测GSE干预后CNE-2Z细胞周期结果见表

表1 MTT比色法检测GSE作用对CNE-2Z细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , 吸光度)

组别	n	24 h	48 h	72 h
0 mg/L GSE组	5	0.933 $\pm$ 0.067	1.171 $\pm$ 0.107	1.493 $\pm$ 0.022
10 mg/L GSE组	5	1.181 $\pm$ 0.144 <sup>a</sup>	1.157 $\pm$ 0.192	1.359 $\pm$ 0.136
20 mg/L GSE组	5	1.173 $\pm$ 0.091 <sup>a</sup>	1.342 $\pm$ 0.131	1.356 $\pm$ 0.140
50 mg/L GSE组	5	1.364 $\pm$ 0.106 <sup>abc</sup>	0.821 $\pm$ 0.119 <sup>acf</sup>	0.941 $\pm$ 0.152 <sup>acf</sup>
100 mg/L GSE组	5	1.402 $\pm$ 0.089 <sup>abg</sup>	0.630 $\pm$ 0.246 <sup>acf</sup>	0.855 $\pm$ 0.221 <sup>ach</sup>

与0 mg/LGSE组比较: <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与10 mg/LGSE组比较: <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与20 mg/LGSE组比较: <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ ; 与50 mg/LGSE组比较: <sup>g</sup> $P < 0.05$ , <sup>h</sup> $P < 0.01$

2. 12.5、25 mg/L GSE组G1期含量显著高于对照组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $0.01$ )。

RT-PCR检测不同质量浓度GSE干预CNE-2Z细胞48 h *HIF-1 $\alpha$*  mRNA结果见表3。 *HIF-1 $\alpha$*  mRNA表达量无明显变化, 差异无统计学意义(均 $P>0.05$ )。

2.3 GSE干预后*HIF-1 $\alpha$*  mRNA表达检测

表2 GSE作用48 h后CNE-2Z细胞周期分布 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	n	G0/G1	S	G2/M
常氧对照组	5	47.2±0.2	42.3±0.8	9.5±0.8
缺氧对照组(0 mg/L GSE)	5	52.5±0.3 <sup>a</sup>	30.8±0.5 <sup>a</sup>	16.2±0.5 <sup>a</sup>
12.5 mg/L GSE组	5	55.1±2.6 <sup>ab</sup>	29.2±1.2 <sup>ac</sup>	10.7±1.4 <sup>c</sup>
25 mg/L GSE组	5	57.2±2.0 <sup>acc</sup>	28.4±0.6 <sup>ac</sup>	8.4±1.9 <sup>ce</sup>
50 mg/L GSE组	5	53.2±0.7 <sup>ah</sup>	35.3±0.8 <sup>acfh</sup>	6.9±0.8 <sup>acf</sup>

与常氧对照组比较: <sup>a</sup> $P<0.01$ ; 与缺氧对照组比较: <sup>b</sup> $P<0.05$ , <sup>c</sup> $P<0.01$ ; 与12.5 mg/LGSE组比较: <sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ ; 与25 mg/LGSE组比较: <sup>g</sup> $P<0.05$ , <sup>h</sup> $P<0.01$

表3 实时荧光定量PCR检测HIF-1 $\alpha$ 在各组的表达情况

组别	n	Ct		$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
		HIF-1 $\alpha$	$\beta$ -actin			
常氧对照组	5	19.49±0.13	16.24±0.11	3.26±0.11	0	1
缺氧对照组 (0 mg/L GSE)	5	19.56±0.12	16.27±0.06	3.30±0.12	0.043±0.12	0.97±0.08
12.5 mg/L GSE组	5	19.45±0.31	16.24±0.09	3.21±0.05	0.047±0.02	1.03±0.02
25 mg/L GSE组	5	19.58±0.08	16.25±0.18	3.34±0.21	0.08±0.05	0.95±0.21
50 mg/L GSE组	5	19.54±0.22	16.25±0.05	3.28±0.23	0.03±0.23	0.99±0.15

各组两两比较: <sup>a</sup> $P>0.05$

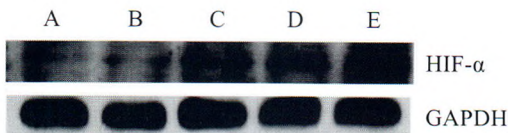
2.4 GSE干预后HIF- $\alpha$ 蛋白表达检测

随着GSE质量浓度的增高, CNE-2Z细胞的HIF- $\alpha$ 表达水平降低(均 $P<0.01$ ), 详见表4、图1。

表4 目的基因蛋白水平的相对含量 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	HIF- $\alpha$ /GAPDH <sup>a</sup>
常氧对照组	5	0.256±0.012
缺氧对照组(0 mg/L GSE)	5	1.159±0.037
12.5 mg/L GSE组	5	0.810±0.010
25 mg/L GSE组	5	0.559±0.016
50 mg/L GSE组	5	0.356±0.022

各组两两比较: <sup>a</sup> $P<0.01$



A. 常氧对照组; B. 50 mg/L GSE组; C. 25 mg/L GSE组; D. 12.5 mg/L GSE组; E. 缺氧对照组(0 mg/L GSE)。

图1 Western Blot检测HIF- $\alpha$ 表达

尽管近 30 年来随着基础医学与临床医学的发展, 鼻咽癌的诊断和治疗水平有了很大的提高, 但鼻咽癌治疗效果远未达到令人满意的程度。鼻咽癌是实体瘤的一种, 与其它实体肿瘤一样存在着缺氧现象, Sung等<sup>[2]</sup>利用基因芯片技术测定鼻咽癌细胞在缺氧和常氧下基因表达谱的变化, 结果提示低氧的条件可以诱导鼻咽癌细胞 HIF-1 $\alpha$ 表达增强。Shou等<sup>[3]</sup>应用免疫组化技术分析了59例鼻咽癌与20例鼻咽炎组织中HIF-1 $\alpha$ 的表达及微血管密度, 证实了HIF-1 $\alpha$ 的表达与鼻咽癌组织中新生血管成正相关, 它在鼻咽癌发生、侵袭及转移中起着重要作用。另一研究<sup>[4]</sup>发现在低氧条件下, CNE-2细胞HIF-1 $\alpha$  mRNA水平稳定, 蛋白表达明显升高。siRNA转染鼻咽癌细胞系CNE-2后显著下调了HIF-1 $\alpha$ 基因的表达, 同时也明显抑制了VEGF基因的表达。提示HIF-1 $\alpha$ 的RNA干扰有可能在抗肿瘤血管生成的基因治疗中发挥重要作用, 为鼻咽癌的治疗提供了新的靶点和思路。

GSE是一种生物类黄酮, 其中含有 80%~85%的原花青素, 原花青素(Proanthocyanidins)简称PC或GSPE(Grape seed proanthocyanidins extract), 是植物

3 讨论

王国中广泛存在的一大类多酚化合物的总称。对GSE的药理研究<sup>[1]</sup>集中在以下几个方面:抗氧化、清除自由基活性、心血管保护作用、细胞保护作用,促进伤口愈合及组织修复活性,体内外抗肿瘤作用的研究也有很多报道。Agarwal等<sup>[5]</sup>发现GSE对前列腺癌细胞DU145细胞有明显的生长抑制或凋亡诱导作用。Tyagi等<sup>[6-7]</sup>发现GSE对人非小细胞肺癌细胞(H460和H322)活性氧及凋亡诱导,且可靶向NF- $\kappa$ B, Stat3和AP1转录因子诱导人前列腺癌细胞(PCa细胞)凋亡。Shrotriya等<sup>[8]</sup>发现GSE诱导人头颈部鳞状细胞癌(Detroit 562和FaDu细胞)G2/M期阻滞及凋亡。Kaur等<sup>[9]</sup>发现GSE诱导人结肠癌细胞(HT29细胞)G1期阻滞。Raina等<sup>[10]</sup>发现GSE诱导人膀胱癌细胞(T24和HTB9细胞)氧化应激。本研究我们发现GSE抑制鼻咽癌CNE-2Z细胞生长,12.5 mg/L和25 mg/L GSE干预的细胞均能明显发生G1/S期阻滞,不同质量浓度GSE干预抑制鼻咽癌细胞HIF-1 $\alpha$ mRNA水平的表达无明显的影响;而在蛋白水平,原花青素可明显抑制HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达,并且这种抑制作用表现出一定剂量依赖性。本研究结果有助于为研制针对鼻咽癌的有效、价廉、低毒的西药奠定实验基础,并为探讨鼻咽癌的靶向治疗提供新的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Kaur M, Agarwal C, Agarwal R. Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products[J]. *J Nutr*, 2009, 139(9): 1806S-1812S.
- [2] Sung F L, Hui E P, Tao Q, et al. Genome-wide expression analysis using microarray identified complex signaling pathways modulated by hypoxia in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2007, 253(1): 74-88.
- [3] Shou Z, Lin L, Liang J, et al. Expression and prognosis of FOXO3a and HIF-1 $\alpha$  in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(4): 585-593.
- [4] 曾伟, 张建国. siRNA沉默HIF-1 $\alpha$ 在缺氧状态下对鼻咽癌细影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18(21): 2499-2505.
- [5] Agarwal C, Veluri R, Kaur M, et al. Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3, 3'-di-O-gallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(7): 1478-1484.
- [6] Tyagi A, Raina K, Gangar S, et al. Differential effect of grape seed extract against human non-small-cell lung cancer cells: the role of reactive oxygen species and apoptosis induction [J]. *Nutr Cancer*, 2013, 65(Suppl 1): 44-53.
- [7] Tyagi A, Raina K, Shrestha SP, et al. Procyanidin B2 3,3 (")-di-O-gallate, a biologically active constituent of grape seed extract, induces apoptosis in human prostate cancer cells via targeting NF- $\kappa$ B, Stat3, and AP1 transcription factors[J]. *Nutr Cancer*, 2014, 66(4): 736-746.
- [8] Shrotriya S, Deep G, Gu M, et al. Generation of reactive oxygen species by grape seed extract causes irreparable DNA damage leading to G2/M arrest and apoptosis selectively in head and neck squamous cell carcinoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(4): 848-858.
- [9] Kaur M, Tyagi A, Singh R P, et al. Grape seed extract upregulates p21 (Cip1) through redox-mediated activation of ERK1/2 and posttranscriptional regulation leading to cell cycle arrest in colon carcinoma HT29 cells[J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50(7): 553-562.
- [10] Raina K, Tyagi A, Kumar D, et al. Role of oxidative stress in cytotoxicity of grape seed extract in human bladder cancer cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 61: 187-195.