

中药臭灵丹中 3, 5-二羟基-6, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮 对人鼻咽癌 CNE 细胞凋亡的影响及机制*

曹长姝¹⁾ 沈伟哉^{1)**} 李药兰^{2, 3)} 王 辉⁴⁾ 高明雅¹⁾

(¹⁾暨南大学医学院解剖学教研室, 广州 510632; (²⁾暨南大学药学院中药及天然产物研究所, 广州 510632;

(³⁾暨南大学中药药效物质基础及创新药物研究所广东省重点实验室, 广州 510632; (⁴⁾暨南大学医学院微生物及免疫学教研室, 广州 510632)

摘要 中药臭灵丹中黄酮类化合物 3, 5-二羟基-6, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮(3, 5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone, HTMF)体外对多种肿瘤细胞有增殖抑制作用, 但机制尚未完全清楚. 为探讨 HTMF 对人鼻咽癌 CNE 细胞凋亡的影响, 用 MTT 法检测 HTMF 对 CNE 细胞株的增殖抑制率, 倒置显微镜观察 HTMF 作用于 CNE 细胞后细胞形态变化, Hoechst 33258 荧光染色观察细胞核形态的变化, 流式细胞仪检测细胞的凋亡率, Western blot 法检测凋亡蛋白 Caspase3 和 Caspase9 的变化, 流式细胞仪检测线粒体跨膜电位($\Delta\phi_m$)值的改变, 并用 JC-1 荧光染料染色, 激光共聚焦显微镜观察线粒体膜电位变化. 结果显示, 分离自臭灵丹的 HTMF 呈浓度、时间双重依赖性显著抑制 CNE 细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 引起线粒体膜电位下降及凋亡蛋白 Caspase3 和 Caspase9 的活化. 提示: 3, 5-二羟基-6, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮对人鼻咽癌 CNE 细胞的生长有显著的抑制作用, 并可通过降低线粒体膜电位激活 Caspase9, 进而活化 Caspase3 诱导 CNE 细胞凋亡.

关键词 3, 5-二羟基-6, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮(HTMT), CNE 细胞, 细胞凋亡, 线粒体

学科分类号 R739.6, R285.5

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00539

传统中药臭灵丹广泛分布于我国长江流域以南及西南部^[1], 民间用于治疗上呼吸道感染、扁桃体炎、咽喉炎、支气管炎等, 从臭灵丹可提取黄酮类和萜类化合物等^[2-4], 分离自臭灵丹(*Laggera pterodonta*)中的 3, 5-二羟基-6, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮(3, 5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone, HTMF)为多甲氧基黄酮单体. 研究表明, 多种黄酮类单体可通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤活性^[5-7], HTMF 的 B 环上为甲氧基, 曾有研究报道多甲氧基黄酮 B 环中的邻-儿茶酚部分结构是多甲氧基黄酮抗肿瘤活性的先决条件^[8], 且多甲氧基黄酮可显著提高肝代谢稳定性和肠道的吸收, 有更好的口服吸收及组织分布^[9].

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)为我国常见的恶性肿瘤之一, 80%发生在中国广东、广西、湖南和福建等省及东南亚各国, 是中国南方最常见的肿瘤之一, 发病率超过 20/10 万^[10-12]. 鼻咽癌发生部位隐蔽, 不易被早期发现, 且恶性程度高, 易转移及复发, 现临床以高剂量的放疗联合化

疗治疗为主^[13], 但化疗药物多对人体的副作用大, 易产生耐药^[14], 因此迫切需要研究和开发高效低毒的新药. HTMF 为分离自传统中药臭灵丹中的黄酮类单体, 来源广泛, 并有研究表明来源于中草药的低分子质量黄酮类化合物与合成的相比在肿瘤的治疗中显示出相对低毒的特性^[9]. 在前期实验中已发现 HTMF 可抑制多种肿瘤细胞的增殖, 但抑制 CNE 细胞增殖及诱导凋亡机制尚需进一步阐明.

1 材料和方法

1.1 主要试剂

从中草药臭灵丹中提取的黄酮类化合物 3, 5-二

* 广东省自然科学基金(9151064101000027)和广东省自然科学基金团队(039213)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-85223503, E-mail: tshenwz@jnu.edu.cn

收稿日期: 2010-10-19, 接受日期: 2010-12-08

羟基-6, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮(3, 5-hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone, HTMF), 由暨南大学药学院中药及天然药物研究所分离提取(HPLC 分析 90%以上, 数据另行发表)。DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲亚砜(DMSO)、Hoechst33258、PI 染料和罗丹明 123 (rhodamine123, Rho123) 均购自 Sigma 公司; AnnexinV-FITC 试剂盒和 JC-1(线粒体膜电位检测试剂盒)均购自上海碧云天生物公司; 鼠抗人 β -Actin 一抗, Caspase3 和 Caspase9 兔抗人多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 形态学观察

CNE 细胞接种于 6 孔培养板(8×10^4 个/ml, 2 ml/孔), 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后分组进行药物处理, 对照组(只加培养液和细胞); 实验组(分别加入 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L 样品), 继续培养 48 h 后在倒置显微镜下观察各组细胞的形态变化并拍照。

1.3 细胞培养

人类鼻咽癌 CNE 细胞系购自中山大学实验动物中心细胞库。CNE 细胞用含 10%新生牛血清的 DMEM 培养基, 于 5% CO₂、95%湿度、37℃ 培养箱中培养并传代, 取对数生长期细胞进行实验。

1.4 MTT 法测定细胞增殖抑制率

将 HTMF 先溶于 DMSO。CNE 细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 37℃ 培养箱中过夜使细胞贴壁, 用 DMEM 培养液做系列 2 倍梯度稀释, 检测的终浓度为: 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L, 继续培养 24、48、72 h 后, 各孔加入 MTT 溶液 10 μ l。4 h 后吸出上清液, 加入 100 μ l DMSO, 震荡 10 min 后在波长 570 nm 下测定 A 值, 计算 HTMF 对细胞增殖的抑制率: 细胞增殖的抑制率(%)=1-实验组 A/对照组 A $\times$ 100%。HTMF 对细胞的半数致死浓度 IC₅₀ (50% inhibitory concentration)根据系列样品的值推算而得。

1.5 Hoechst 33258 荧光染色观察细胞核形态改变

将无菌盖玻片置于 6 孔培养板, 接种 CNE 细胞悬液, 进行细胞爬片。待细胞爬满盖玻片后, 分组进行药物处理: 对照组(只加培养液和细胞); 实验组(分别加入 5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L 样品)。48 h 后吸弃培养液, PBS 清洗 2 遍, 加入 0.5 ml/孔 4%多聚甲醛固定液固定 30 min。弃去固定液后 PBS 清洗 2 遍, 加入 Hoechst 33258 染色液染色 20 min, PBS 洗 2 遍, 每次 5 min, 自然干燥后用中性甘油

封片。荧光显微镜下观察并拍照。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

CNE 细胞接种于 6 孔培养板, 37℃、CO₂ 培养箱中培养 24 h 后分组进行药物处理, 对照组(只加培养液和细胞), 实验组(分别加入 5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L 样品)。继续培养 48 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞, 加入 5 μ l Annexin-V 和 10 μ l PI 染料后充分混匀, 避光反应 15 min 后进行流式细胞仪检测。

1.7 细胞线粒体膜电位 ($\Delta\phi_m$) 检测

1.7.1 流式细胞术检测线粒体膜电位。CNE 细胞接种于 6 孔培养板, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后分组。a. 对照组(只加培养液和细胞), 实验组(分别加入 5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L 样品), 继续培养 48 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞; b. 对照组(只加培养液和细胞), 实验组加 40 mg/L 样品, 分别于 6、12、24、48 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞。细胞收集后加入 Rho123 使其终浓度为 10 mg/L, 37℃ 避光孵育 30 min, 冷 PBS 洗涤 5 min, 冷 PBS 重悬细胞, 流式细胞仪(FCM)检测 $\Delta\phi_m$ 的改变。

1.7.2 激光共聚焦显微镜观察线粒体膜电位变化。CNE 细胞接种于激光共聚焦培养皿, 37℃、CO₂ 培养箱中培养 24 h 后分组进行药物处理。a. 对照组(只加培养液和细胞), 实验组(分别加入 5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L 样品), 继续培养 48 h; b. 对照组(只加培养液和细胞), 实验组加 40 mg/L 样品, 分别于培养 6、12、24、48 h 后用 PBS 洗涤 1 次, 分别加入 1 ml 细胞培养液和 1 ml JC-1 染色工作液, 充分混匀, 37℃ 细胞培养箱中孵育 20 min, 吸取上清, 用 JC-1 染色缓冲液(1 $\times$)洗涤 2 次, 加入 1 ml 细胞培养液, 于激光共聚焦显微镜下观察。JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位的荧光探针, 可通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化。

1.8 Western blot 法检测 Caspase3 和 Caspase9 表达

CNE 细胞接种于 6 孔培养板, 37℃、CO₂ 培养箱中培养 24 h 后分组进行药物处理。a. 对照组(只加培养液和细胞), 实验组(分别加入 5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L 样品), 继续培养 48 h; b. 对照组(只加培养液和细胞), 实验组加 40 mg/L 样品, 分别于培养 6、12、24、48 h 后分别收集细胞, 在收集好的细胞中加入细胞裂解液, 冰上放置 20 min,

12 000 r/min 离心 15 min 收集蛋白质. 取上清液用考马斯亮蓝法(Bradford 法)检测样品的总蛋白含量, 加入上样缓冲液煮沸 10 min, 离心并取 30 μg 蛋白质上样到 SDS-PAGE 进行电泳, 再将蛋白质转到 0.22 μm PVDF 膜, 牛奶封闭 1 h 后膜与一抗(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日牛奶封闭 1 h 后与二抗(1:2 000)室温孵育 1 h, 发光试剂发光, X 线胶片进行显影、定影、图像分析.

1.9 统计学处理

数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 One-way

ANOVA(单因素方差分析)与 student's t 检验各组间差异的显著性, 以 $P < 0.05$ 时为有统计学意义.

2 结 果

2.1 HTMF 体外抑制 CNE 细胞增殖实验

2.1.1 细胞形态的变化. HTMF 作用于 CNE 细胞 48 h 后, 随着浓度的升高细胞变圆、体积缩小、贴壁能力下降、同细胞对照组相比, 其细胞数及细胞密度均明显下降(图 1).

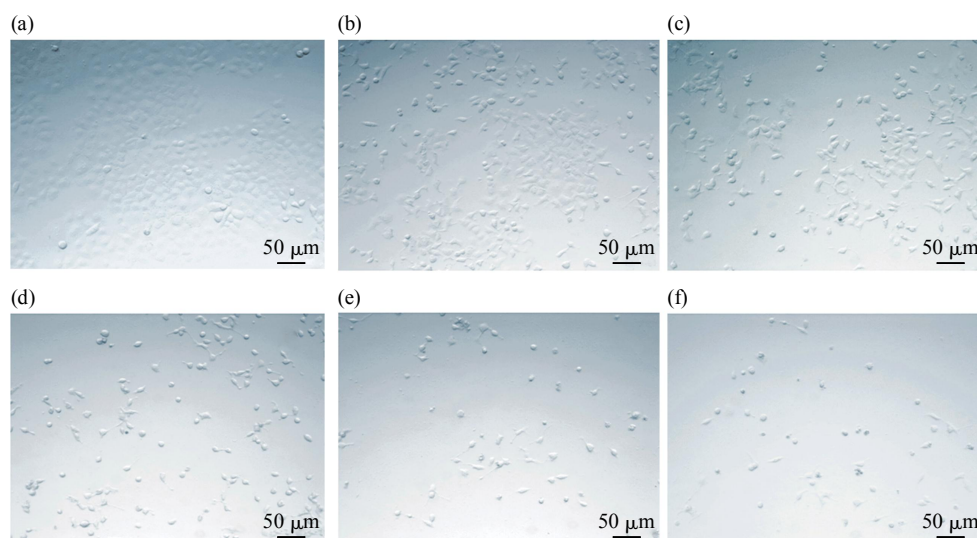


Fig. 1 Morphological change of CNE cells treated with HTMF with different concentration after 48 h

(a) Control. (b) 2.5 mg/L. (c) 5.0 mg/L. (d) 10.0 mg/L. (e) 20.0 mg/L. (f) 40.0 mg/L.

2.1.2 HTMF 体外抑制 CNE 细胞增殖抑制率.

HTMF 作用于 CNE 细胞后, 发现其呈剂量和时间双重依赖性抑制细胞增殖(图 2), 作用 24、48、72 h 后 IC_{50} 值分别为 69.02、28.31、3.95 mg/L.

2.2 Hoechst 33258 荧光染色观察细胞核形态变化

染色质凝聚是凋亡细胞典型的细胞形态学变化之一. CNE 细胞用不同浓度 HTMF 处理 48 h 后进行 Hoechst 33258 染色, 于荧光显微镜下观察: 细胞对照组核膜完整、核呈圆形或椭圆形、分布较均匀、细胞数较多(图 3a); 随 HTMF 浓度的增加细胞出现核固缩、核体积变小、分布不均匀; 部分细胞核出现碎裂、呈现致密的蓝色颗粒状荧光、形成凋亡小体(图 3b~e).

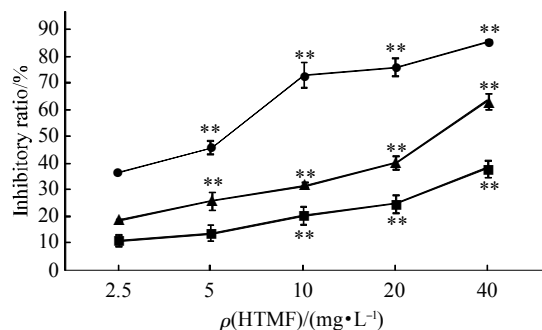


Fig. 2 Inhibitory effect of HTMF with different concentration on CNE cells at different times

** $P < 0.01$ vs 2.5 mg/L, $n=8$. ●—●: CNE-72 h; ▲—▲: CNE-48 h; ■—■: CNE-24 h.

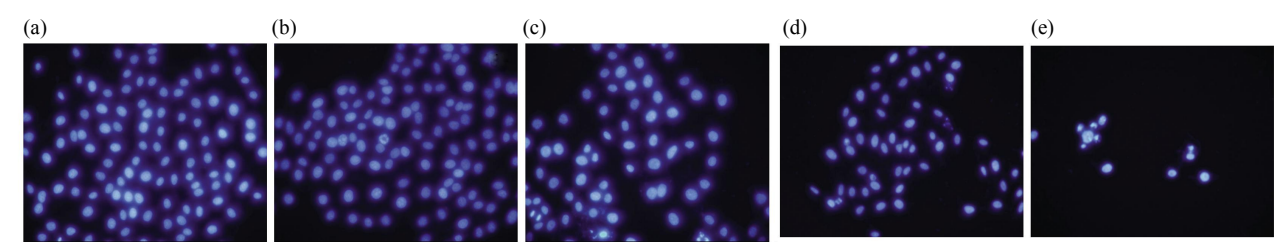


Fig. 3 Nuclear morphology of CNE cells treated with HTMF after 48 h (×400)
(a) Control. (b) 5.0 mg/L. (c) 10.0 mg/L. (d) 20.0 mg/L. (e) 40.0 mg/L.

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

HTMF 作用于 CNE 细胞 48 h 后, 随浓度的增加, 细胞凋亡率显著性增加(表 1).

Table 1 The effect of HTMF on CNE cell apoptosis	
$\rho/(mg \cdot L^{-1})$	CNE- Apoptosis rate/%
Control	4.25 ± 0.49
5.0	5.20 ± 0.14
10.0	$7.80 \pm 0.64^*$
20.0	$11.95 \pm 0.07^{**}$
40.0	$20.50 \pm 0.57^{**}$

Compared with control, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $n=3$.

2.4 细胞线粒体膜电位检测

2.4.1 HTMF 作用 CNE 细胞后, 线粒体 $\Delta\phi_m$ 的平均荧光指数值随浓度及时间增加而下降(图 4).

2.4.2 激光共聚焦显微镜下观察线粒体 $\Delta\phi_m$ 的变化. JC-1 荧光染料聚集在线粒体的基质中, 形成聚合物, 在线粒体膜电位较高时, 产生红色荧光; 在线粒体膜电位较低时, JC-1 不能聚集在线粒体的基质中, JC-1 为单体, 可以产生绿色荧光. 图 5 显示 JC-1 荧光颜色随着浓度和时间的增加由红色

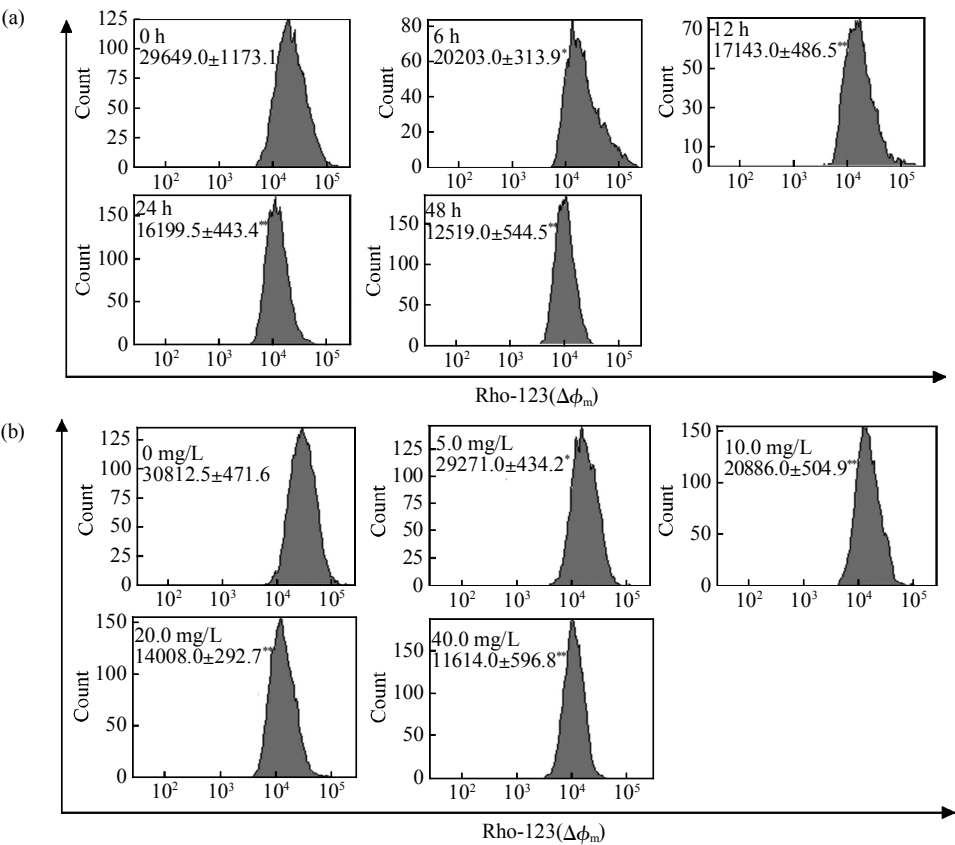


Fig. 4 HTMF induced mitochondria dysfunction in CNE cells

Effect of HTMF on mitochondrial membrane potential. (a) After treatment with 40.0 mg/L of HTMF at different times. (b) After treatment with different concentration of HTMF for 48 h. Cells were stained with Rho-123 dye and analyzed by flow cytometry. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs control, $n=3$.

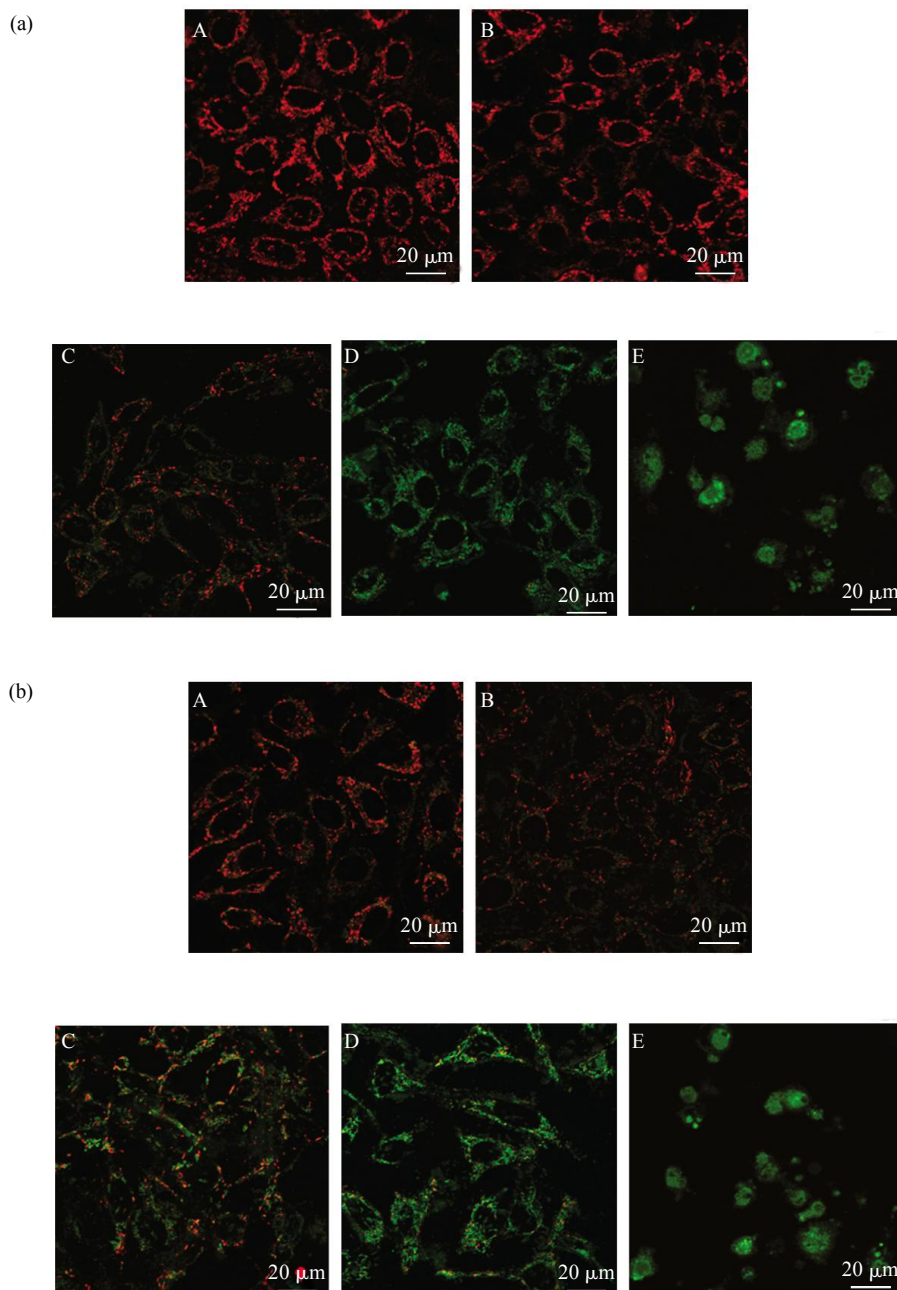


Fig. 5 HTMF induced mitochondria dysfunction in CNE cells with JC-1 fluorescence staining by laser confocal microscope

Effect of HTMF on mitochondrial membrane potential. (a) After treatment with different concentration of HTMF for 48 h. A: Control; B: 5.0 mg/L; C: 10.0 mg/L; D: 20.0 mg/L; E: 40.0 mg/L; (b) After treatment with 40.0 mg/L of HTMF at different times. A: Control; B: 6 h; C: 12 h; D: 24 h; E: 48 h.

向绿色转变,表明随着浓度和时间的增加线粒体膜电位逐渐下降,线粒体数目越来越少且分布不均匀.

2.5 Western blot 法检测 Caspase3、Caspase9 表达的变化

以不同浓度 HTMF 处理 CNE 细胞,结果显示

HTMF 呈浓度依赖性激活 Caspase3、Caspase9; 经 40 mg/L 浓度 HTMF 处理后,随着时间延长细胞中 Caspase3、Caspase9 被激活,蛋白量随着时间的延长而减少(图 6).

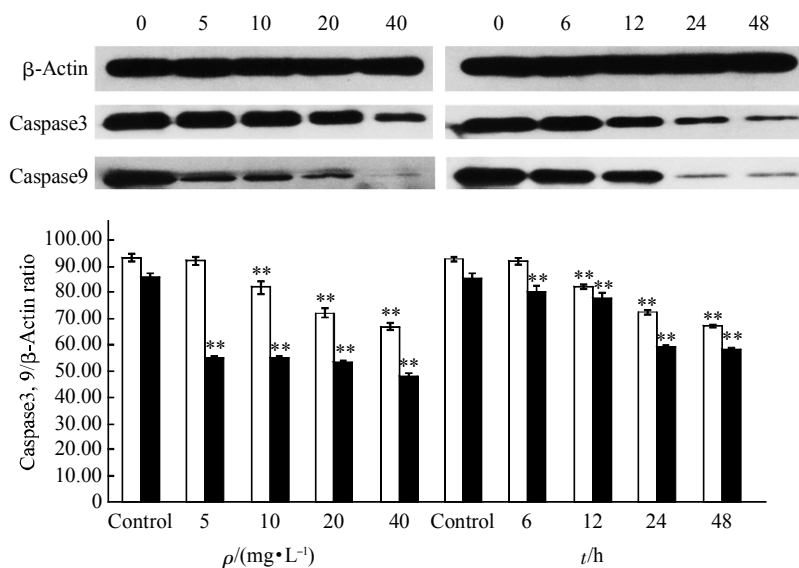


Fig. 6 The effect of HTMF with different concentration and times on the expression of Caspase3 and Caspase9 on CNE cells detected by Western blotting

** $P < 0.01$ vs control, $n=4$. □: Caspase3; ■: Caspase9.

3 讨 论

鼻咽癌为我国南方常见的恶性肿瘤之一, 临床上广泛应用放疗, 在杀死肿瘤细胞的同时也无选择地损伤正常的组织细胞, 毒副作用大. 黄酮类化合物是具有 2-苯基色原酮结构, 广泛分布于蔬菜、水果和植物体内的低分子质量多酚类物质, 是许多药用植物的主要活性成分, 但因其来源不同、结构不同, 表现出来的生物活性差异很大. 本实验中从中草药臭灵丹中提取的 3, 5-二羟基-6, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮来源广泛, 因其特有的结构特点——B 环上的邻-儿茶酚结构, 表现出对多种肿瘤细胞具有抑制作用的生物活性, 而对正常细胞的毒性相对较小^[15].

抗肿瘤分子机制中细胞凋亡的诱导现已成为肿瘤治疗的重要途径之一, 黄酮类化合物通过促凋亡作用发挥抗肿瘤作用也倍受国内外广泛关注. 有研究报道凋亡的抑制是鼻咽癌发生的至关重要因素^[16], 本实验中化合物 3, 5-二羟基-6, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮呈浓度和时间双重依赖性对 CNE 细胞显著抑制, 72 h 后 IC_{50} 值达到 3.95 mg/L. Hoechst 33258 染色可观察到随着浓度的增高, 染色质浓缩且边缘化, 核体积变小, 在高浓度时部分细胞核出现碎裂, 形成凋亡小体, 细胞数减少明显, 这与直接细

胞形态的观察相一致. 细胞凋亡率也呈浓度依赖性增高. 凋亡执行蛋白 Caspase3 呈浓度和时间双重依赖性被激活. 我们的结果说明, HTMF 可通过凋亡的诱导发挥抗鼻咽癌细胞 CNE 的作用. 有研究强调线粒体在凋亡通路中起重要作用^[17], 线粒体是细胞维持生命活动的重要细胞器, 参与细胞进行呼吸链、电子传递、三羧酸循环和氧化磷酸化. 细胞在应激或受到细胞毒、化疗药物作用时线粒体膜破坏, 膜电位下降、膜通透性转换孔开放, 线粒体内与凋亡相关的基因产物, 促凋亡蛋白经凋亡信号刺激释放进入细胞质, 细胞进入凋亡过程. 线粒体跨膜电位的耗散是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的, 且其一旦发生, 细胞即进入不可逆的凋亡过程^[18]. 在线粒体介导的凋亡通路中, 线粒体中的促凋亡蛋白经凋亡信号刺激释放进入细胞质, 可激活 Caspase9 以及下游的 Caspase3、Caspase7 或 Caspase6 蛋白. 本实验中 HTMF 对 CNE 细胞随浓度和时间的增加, JC-1 荧光染料颜色由红色向绿色转变. 流式细胞检测结果也显示线粒体膜电位呈浓度和时间双重依赖性显著性下降, 凋亡蛋白 Caspase9 以及下游的 Caspase3 蛋白也随浓度和时间的增加被激活, 这些说明 HTMF 可通过线粒体跨膜电位的耗散, 使膜通透性转换孔开放, 激活 Caspase9 进而活化 Caspase3 诱导凋亡发挥抗肿瘤

作用. 对于 HTMF 抗肿瘤的分子机制, 如线粒体跨膜电位与细胞色素 c 及与线粒体介导的凋亡通路中调节因子 Bcl-2 家族蛋白的关系正在进一步研究中.

参 考 文 献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(75 卷). 北京: 科学出版社, 1979: 46
Editorial Committee of Flora of China of Chinese Academy of Science. Flora of China (Vol.75). Beijing: Science Press, 1979: 46
- [2] 梅之南, 李芸芳, 喻 昕, 等. 四棱峰属植物化学成分及其药理活性研究进展. 中南民族大学学报, 2005, **24**(3): 32-35
Mei Z N, Li Y F, Yu X, *et al.* J South-Central University for Nationalities (Nat Sci Edition), 2005, **24**(3): 32-35
- [3] 杨光忠, 李芸芳, 喻 昕, 等. 臭灵丹萜类和黄酮化合物. 药学通报, 2007, **42**(5): 511-515
Yang G Z, Li Y F, Yu X, *et al.* Acta Pharm Sinica, 2007, **42**(5): 511-515
- [4] 刘百联, 张 婷, 张晓琦, 等. 臭灵丹化学成分的研究. 中国中药杂志, 2010, **35**(5): 602-606
Liu B L, Zhang T, Zhang X Q, *et al.* Chin J Chinese Materia Medica, 2010, **35**(5): 602-606
- [5] Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. Can Treat Rev, 2009, **35**(1): 57-68
- [6] Chang H L, Wu Y C, Su J H, *et al.* Protoapigenone, a novel flavonoid, induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of P38 mitogen-activated protein kinase and C-Jun N-terminal kinase 1/2. Pharmaol Exp Ther, 2008, **325**(3): 841-849
- [7] Zhang Q, Zhao X H, Wang Z J. Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cells line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. Toxicol In Vitro, 2009, **23**(5): 797-807
- [8] Tang W, Hemm I, Bertram B. Recent development of antitumor agents from Chinese herbral medicines; PartI. Low molecular compounds. Planta Med, 2003, **69**(2): 97-108
- [9] Walle T, Ta N, Kawamori T, *et al.* Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable favonoids- Methylated versus unmethylated favones. Biochem Pharm, 2007, **73**(9): 1288-1296
- [10] Lo K W, To K F, Huang D P. Focus on nasopharyngeal carcinoma. Cancer Cell, 2004, **5**(5): 423-428
- [11] Chou J, Lin Y, Kim J, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma--review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. Head Neck, 2008, **30**(7): 946-963
- [12] Cho W C. Nasopharyngeal carcinoma: molecular biomarker discovery and progress. Molecular Cancer, 2007, **6**: 1-9
- [13] Baujat B, Audry H, Bourhis J, *et al.* Chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: an individual patient data meta-analysis of eight randomized trials and 1753 patients. International J Radiation Oncology, 2006, **64**(1): 47-56
- [14] Wang Y, He Q Y, Tsao S W, *et al.* Cytokeratin 8 silencing in human nasopharyngeal carcinoma cells leads to cisplatin sensitization. Cancer Letter, 2008, **265**(2): 188-196
- [15] 曹长姝, 沈伟哉, 李药兰, 等. 臭灵丹中黄酮类化合物对人喉癌细胞 Hep-2 凋亡的影响及机制. 中国病理生理杂志, 2010, **26**(7): 1362-1365
Cao C S, Shen W Z, Li Y L, *et al.* Chin J Phathophysiology, 2010, **26**(7): 1362-1365
- [16] Chou J, Lin Y C, Kim J, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma--review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. Head Neck, 2008, **30**(7): 946-963
- [17] Jeong S Y, Seol D W. The role of mitochondria in apoptosis. BMB Reports, 2008, **41**(1): 11-22
- [18] Alison M, Adrian F, Nicola E, *et al.* The antipsoriatic drug anthralin accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria. FASEB J, 2005, **19**(8): 1012-1014

3, 5-Hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone Isolated From *Laggera pterodonta* Induces CNE Cell Apoptosis*

CAO Chang-Shu¹⁾, SHEN Wei-Zai^{1)**}, LI Yao-Lan^{2, 3)}, WANG Hui⁴⁾, GAO Ming-Ya¹⁾

¹⁾ Department of Anatomy, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

²⁾ Institute of Traditional Chinese Medicine & Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

³⁾ Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drugs Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China

⁴⁾ Department of Microbiology and Immunology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract 3, 5-Hydroxy -6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone (HTMF) isolated from *Laggera pterodonta* is known to have an antiproliferative effects *in vitro* on human cancer. However, the exact mechanisms retain unclear. HTMF was investigated for its antiproliferative effects on human nasopharyngeal carcinoma CNE cells. 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay was used to deserve the inhibitory effect of HTMF. The changes of the cell and nuclear morphological characteristics were observed under the inverted and fluorescence microscope. The cell apoptosis was displayed by Hoechst 33258 staining and flow cytometry (FCM). The expression of Caspase3 and Caspase9 was detected by Western blotting. The mitochondrial membrane potential were analyzed by FCM and laser confocal microscope with Jc-1 fluorescence staining. MTT assay results show that HTMF significantly inhibited the growth of CNE cells in dose and time dependent manners. The IC_{50} values of HTMF were 69.02, 28.31 and 3.95 mg/L at 24, 48 and 72 h treatments, respectively. The apoptosis percentage in CNE cells is significantly increased compared with control group. HTMF with 0, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 mg/L at 48 h and 40.0 mg/L at 0, 6, 12, 24 and 48 h treatments, respectively increased the expression of Caspase3 and Caspase9 and degraded mitochondrial membrane potential in dose and time dependent manners. The mechanistic investigation revealed that HTMF has high inhibitory effects on the proliferation of CNE cells and induced the apoptosis of CNE cells by the decrease in mitochondrial membrane potential and increasing the expression of Caspase3 and Caspase9.

Key words 3, 5-hydroxy -6, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone, CNE cells, apoptosis, mitochondria

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00539

*This work was supported by grants from Guangdong Provincial Natural Science Foundation of China (9151064101000027) and Guangdong Provincial Natural Science Foundation of China (039213).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-85223503, E-mail: tshenwz@jnu.edu.cn

Received: October 19, 2010 Accepted: December 8, 2010