

DOI:10. 11798/j. issn. 1007-1520. 201905011

· 论 著 ·

# 吲哚-3-甲醇抑制喉癌细胞体外生长的研究

毛承刚<sup>1</sup>,周小淳<sup>1</sup>,姜义道<sup>1</sup>,万俐佳<sup>1</sup>,陶泽璋<sup>2</sup>

(1. 荆州市中心医院 长江大学第二临床医学院 耳鼻咽喉科,湖北 荆州 434020; 2. 武汉大学人民医院 耳鼻咽喉科,湖北 武汉 430060)

**摘 要:** **目的** 通过体外实验,研究吲哚-3-甲醇(indole-3-carbinol,I3C)对 Hep-2 喉癌细胞的抑制增殖和促进凋亡及机制。**方法** 根据 I3C 浓度分组,用不同浓度的 I3C 即 0、100、200 μM 和 300 μM 作用于 Hep-2 喉癌细胞株 0、24、48 和 72 h 后,测定 Hep-2 细胞增殖能力。测定不同浓度 I3C 处理 Hep-2 喉癌细胞株 48 h 后细胞凋亡率。测定不同浓度 I3C 处理 Hep-2 喉癌细胞株后 PI3K/Akt 通路相关蛋白的表达情况。**结果** 当 I3C 浓度增加时,Hep-2 喉癌细胞株的增殖能力明显减弱,凋亡率显著增加,同时监测到 PI3K/Akt 通路相关蛋白的表达水平降低。**结论** 在体外实验,I3C 可以有效地抑制 Hep-2 喉癌细胞的生长,同时诱导凋亡,抑制 PI3K/Akt 信号通路可能是其作用机制。  
**关 键 词:**喉癌;吲哚-3-甲醇;细胞凋亡;PI3K/Akt 通路  
**中图分类号:**R739. 65

## Indole-3-carbinol inhibits in vitro growth of laryngeal cancer cells

MAO Cheng-gang<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-chun<sup>1</sup>, JIANG Yi-dao<sup>1</sup>, WAN Li-jia<sup>1</sup>, TAO Ze-zhang<sup>2</sup>

(1. Department of Otolaryngology, Jingzhou Central Hospital, the Second Clinical Medical College, Yangtze University, Jingzhou 434020, China; 2. Department of Otolaryngology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**Abstract:** **Objective** To study the inhibition of proliferation and stimulation of apoptosis of Hep-2 laryngeal carcinoma cells by indole-3-carbinol (I3C) via in vitro experiments. **Methods** Cells were grouped according to the concentration of I3C. The proliferation capacities of Hep-2 cell lines were determined at time-points 0, 24, 48, and 72h after treatment with I3C at different concentrations of 0, 100, 200, and 300 μM. Their apoptosis rates and expressions of PI3K/Akt pathway related proteins at 48h after treatment with I3C were determined. **Results** With the increase of I3C concentration, the proliferation abilities of Hep-2 cell lines were significantly decreased with obvious increase of apoptosis rates, and the reduced expression levels of PI3K/Akt pathway related proteins were also observed. **Conclusion** In vitro, I3C can effectively inhibit the growth of Hep-2 laryngeal cancer cells and induce apoptosis by possible mechanism of inhibiting PI3K/Akt signaling pathway.  
**Key words:**Laryngeal cancer; Indole-3-carbinol; Apoptosis; PI3K/Akt pathway

喉癌是头颈部主要的恶性肿瘤之一,据报道在发达国家的发病率较高。男性患者的发病率和死亡率明显高于女性患者<sup>[1]</sup>。喉癌的治疗方法有很多,包括传统的手术、化疗和放疗。然而,喉癌的整体疗效仍然欠佳,治疗方法需要改进。

流行病学研究表明,摄入西兰花,花椰菜等十字花科植物蔬菜可以显著降低膀胱癌、胰腺癌、结肠癌、肺癌和胃癌的发病率<sup>[2]</sup>。吲哚-3-甲醇(indole-3-carbinol,I3C)是十字花科蔬菜的活性成分,显著抑制多种肿瘤的生长。然而,它在喉癌中的作用仍不清楚。本研究旨在研究 I3C 对人喉癌 Hep-2 细胞系细胞增殖和凋亡的影响,阐明其潜在的杀瘤机制,为肿瘤的靶向治疗和药物筛选提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞培养和 I3C 的制备

人喉癌 Hep-2 细胞系来自武汉大学中心实验室。采用含 10% 胎牛血清和 20 μg/ml 抗生素(青

基金项目:荆州市科技局基金资助项目(2017038;2017044)。  
作者简介:毛承刚,男,博士,副主任医师;周小淳,女,主管护师;毛承刚与周小淳对本文有同等贡献,为并列第一作者。  
通信作者:姜义道,Email: mcg126@126. com

霉素和链霉素)的 RPMI 1640 培养基培养人喉癌 Hep-2 细胞。细胞置于 CO<sub>2</sub> 含量为 5% 的 37℃ 培养箱中培养。把 I3C 溶于二甲基亚砜(DMSO)浓度至 1M,然后分别稀释至浓度 100、200、300 μM 用于实验。最终 I3C 制剂中 DMSO 的浓度 <0.5%。为了证明 DMSO 的最终浓度没有影响喉癌细胞,培养 Hep-2 细胞仅在完全培养基中,不接触 I3C(作为未处理的对照),因此 DMSO(<0.5%)用作阴性对照组(0 μM)。

1.2 CCK-8 试剂测定 Hep-2 细胞增殖

将 Hep-2 细胞以 1 × 10<sup>3</sup>/ml 的密度接种到96 孔板中。I3C 在 0、100、200、300 μM 每个浓度重复 6 个孔。另外 6 个孔仅含有培养基作为空白对照。在 0、24、48、72 h 后,细胞用 10 μl CCK-8 试剂处理,在 37℃ 下孵育 1 h。根据空白对照孔,将自动微量滴定板读数器设定为零。吸光度(A)在450 nm的波长下读取。百分比细胞增殖抑制的计算根据下式:细胞增殖抑制率(%) = [1 - 实验组的平均吸光度(A)/平均值对照组的吸光度(A)] × 100%。重复实验 3 次。

1.3 Annexin V 和碘化丙啶(PI)双重染色法检测细胞凋亡

将 Hep-2 细胞接种到 6 孔中平板和含有 0、100、200 μM 的完全培养基和 300 μM 的 I3C,并用单独的孔接种培养基单独作为未处理的对照组。培养 48 h 后,细胞通过离心收获,重悬于结合中缓冲液,依次与 5 μl 膜联蛋白 V-FITC 孵育和 5 μl PI 在室温下进行 15 min,使用 FACSCanto™ II 分光光度计,通过流式细胞术分析确定细胞凋亡。对于流式细胞仪点图,膜联蛋白 V 染色设定为横轴和 PI 染色

设定为垂直轴。重复实验 3 次。

1.4 Western 印迹分析

用不同浓度的 I3C 处理 48 h 后,将细胞在 RIPA 缓冲液中裂解以提取总细胞蛋白。根据 BCA 定量方法测定蛋白质浓度,每种蛋白质 30 μg 通过 SDS-PAGE 和蛋白质条带分离样品转移到硝酸纤维素膜上。蛋白质转移后,将膜阻断 1 h 通过孵育,获得 5% 脱脂乳蛋白质。在 4℃ 与一抗,PI3Kp110α、PI3K p85、p-Akt、Akt、p-GSK3-β、GSK3-β 和 GAPDH 过夜。第 2 天,将印迹与次级孵育抗体在室温下保持 1 h,使特异性蛋白质通过增强的化学发光让条带可视化(ECL)。重复实验 3 次。

1.5 统计学分析

所有实验数据分析通过 SPSS 16.0 进行统计分析,结果表示为  $\bar{x} \pm s$ 。差异通过 ANOVA 比较多组之间的差异, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 I3C 明显抑制喉癌 Hep-2 细胞的生长

I3C 处理 Hep-2 细胞,遵循剂量依赖性(0、100、200、300 μM)和时间依赖性(24、48、72 h),治疗组和阴性对照组之间细胞生长有显著差异( $P < 0.05$ ),见图 1。在 I3C 200 μM 组,24、48、72 h 的时间点,Hep-2 细胞增殖抑制的百分比分别为22.8%、26.0%、34.2%。另外,在 I3C 300μM 治疗组中,细胞增殖抑制的百分比 24、48、72 h,分别为29.4%、48.4%、63.9%(图 1)。检测 I3C 抑制 Hep-2 喉癌细胞增殖呈高剂量依赖性。

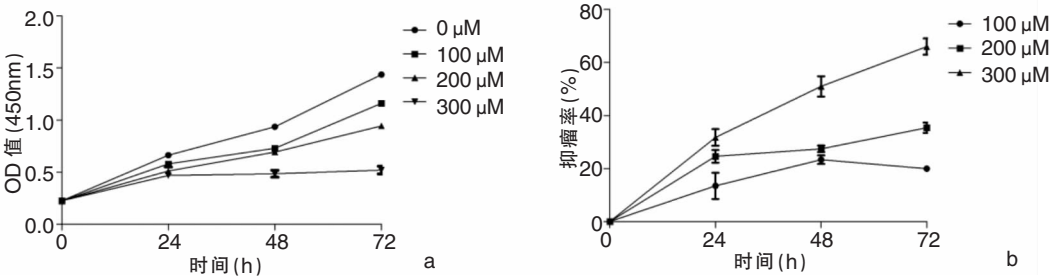


图1 I3C 抑制 Hep-2 细胞增殖 a:不同浓度 I3C 处理喉癌细胞 Hep-2 后,不同时间各组细胞 CCK8 法检测结果; b:不同浓度 I3C 处理喉癌细胞 Hep-2 的抑瘤率

2.2 I3C 治疗诱导喉癌 Hep-2 细胞凋亡

Annexin V-PI 双分子印迹法检测 Hep-2 细胞凋亡染色显示,经过 0、100、200、300  $\mu\text{M}$  的 I3C 在 48 h 的治疗后,细胞凋亡率为分别为  $(0.60 \pm 0.35)\%$ 、 $(7.20 \pm 1.35)\%$ 、 $(29.2 \pm 2.12)\%$ 、 $(50.60 \pm 4.28)\%$ 。另外,比较 100  $\mu\text{M}$  与 0  $\mu\text{M}$  组,细胞凋亡率组间的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。200  $\mu\text{M}$  与 300  $\mu\text{M}$  组相比 0  $\mu\text{M}$  组细胞凋亡率显著升高( $P < 0.01$ )。这表明浓度 100  $\mu\text{M}$  I3C 诱导 Hep-2 细胞的细胞凋亡,300  $\mu\text{M}$  浓度显著增加了凋亡细胞比例,细胞凋亡率  $> 50\%$ 。这表明细胞凋亡的比例与 I3C 呈剂量依赖性(图 2)。

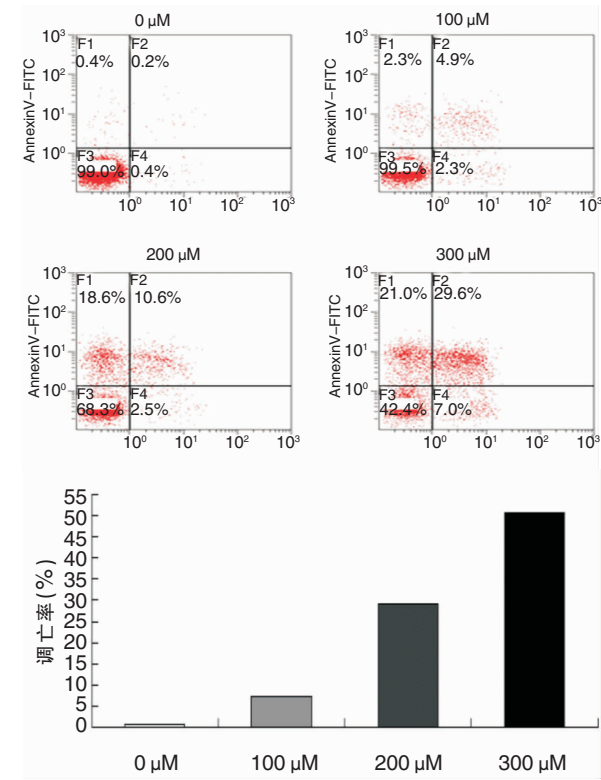


图 2 不同浓度 I3C 处理喉癌细胞 Hep-2 后各组细胞的凋亡率

2.3 显著降低 I3C 处理后 Hep-2 细胞中 PI3K/Akt 蛋白表达

本研究检验了 PI3K/Akt 通路的关键信号蛋白和与癌细胞增殖和凋亡相关的下游信号蛋白。研究发现在阴性对照组, PI3Kp110 $\alpha$ 、PI3Kp85、p-Akt、Akt、p-GSK3- $\beta$  和 GSK3- $\beta$  的蛋白表达量都明显增加。与阴性对照组相比,I3C 处理 Hep-2 细胞显著减少 PI3Kp110 $\alpha$ 、PI3Kp85、p-Akt、Akt、p-GSK3- $\beta$  和 GSK3- $\beta$  蛋白质的表达,信号蛋白下降的表达水平与 I3C 呈剂量依赖性(图 3)。

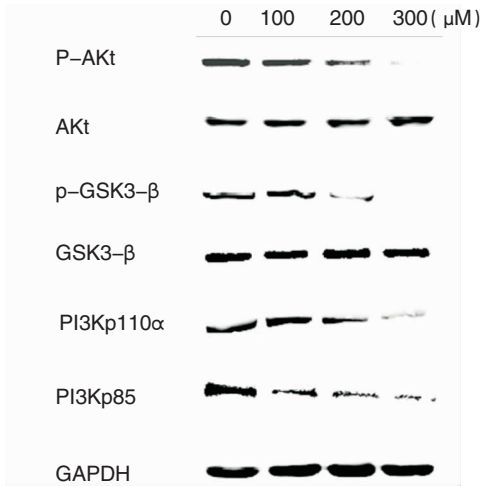


图 3 不同浓度 I3C 处理喉癌细胞 Hep-2 后 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达情况

3 讨论

吡啶-3-甲醇是从十字花科蔬菜中硫代葡萄糖酸盐水解提取而来<sup>[3]</sup>。有研究表明 I3C 对多种肿瘤细胞通过诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡抑制肿瘤细胞生长<sup>[4]</sup>。然而,I3C 在喉癌中的作用还不清楚。本研究结果发现,I3C 可显著抑制 Hep-2 细胞的增殖,I3C 300  $\mu\text{M}$  治疗组中,细胞增殖抑制的百分比 24、48、72 h,分别为 29.4%、48.4%、63.9%。抑癌机制与癌细胞增殖的改变和诱导细胞凋亡有关。本实验观察到 300  $\mu\text{M}$  I3C 诱导细胞凋亡作用明显,且细胞凋亡率升高与 I3C 呈剂量依赖性。Rahman 等<sup>[5]</sup>报道治疗乳腺癌细胞的 30 ~ 100  $\mu\text{M}$  I3C 经过 24 ~ 72 h 诱导细胞凋亡。

PI3K/Akt 通路与受体酪氨酸相关激酶信号通路相关。通路突变激活组件可能激活 PI3K 和下游靶蛋白 Akt 和磷酸化 Akt (p-Akt),随后会导致磷酸化和 mTORGSK3、mdm2、Bad 和 caspase 家族成员活化,它们共同在促进肿瘤细胞生长、增殖、抑制凋亡、促进细胞侵袭、肿瘤转移和血管生成等方面起着重要作用<sup>[6]</sup>。尤其是 PI3K/Akt 信号通路异常,Akt 磷酸化异常与舌癌以及头颈鳞状细胞癌的发生发展密切相关<sup>[7]</sup>。

为了进一步明确 I3C 在喉癌中诱导细胞凋亡及 PI3K/Akt 信号通路二者之间的潜在关系,本研究分析了 I3C 治疗前后 PI3K/Akt 通路特异性信号蛋白与下游同源蛋白差异表达。Hep-2 细胞中,I3C 治疗后, PI3K p110 $\alpha$ 、PI3K class III、p-Akt、p-c-Raf 和 GSK3- $\beta$  的表达与对照组细胞相比明显下降。这一

结果表明,抑制喉癌细胞增殖和诱导凋亡与 PI3K/Akt 信号通路密切相关,这些结果与在乳腺癌和前列腺癌的发现是一致的<sup>[8]</sup>。

有研究显示,I3C 抗肿瘤作用的机制部分原因在于增加了肿瘤细胞膜的通透性和活化 caspase-3,从而诱导癌细胞凋亡<sup>[9]</sup>。前列腺癌老鼠模型被喂食 10 周含 1% (w/w) I3C 的肿瘤细胞,可诱导细胞凋亡,激活 Nrf2,此即一种已知的调节抗氧化信号通路的通路<sup>[10]</sup>。Newfield 等<sup>[11]</sup>报道了用 I3C 喂养可诱导小鼠的免疫反应,产生抗增殖物质二羟基雌激素酮。

总之,本研究的体外实验证明,I3C 能显著抑制喉癌细胞增殖和诱导细胞凋亡。研究表明,I3C 效应可能参与的 PI3K/Akt 信号通路及下游蛋白表达调节有关。I3C 因其有效、无毒及天然抗肿瘤被认为是一种可能的预防和治疗喉癌的药物。需要进一步的研究确定 I3C 在分子水平上抑制喉癌的潜在机制,为临床及肿瘤的治疗提供理论依据。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Annema N, Heyworth JS, McNaughton SA, et al. Fruit and vegetable consumption and the risk of proximal colon, distal colon, and rectal cancers in a case-control study in Western Australia[J]. J Am Diet Assoc, 2011, 111(10): 1479-1490.

[3] Keck AS, Finley JW. Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium[J]. Integr Cancer Ther, 2004, 3(1): 5-12.

[4] Aggarwal BB, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives[J]. Cell Cycle, 2005, 4(9):1201-1215.

[5] Rahman KM, Aranha O, Sarkar FH. Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast ep-

ithelial cells[J]. Nutr Cancer, 2003, 45(1): 101-112.

[6] 凌航,廖前进,钟外生,等. p53、p73 与生存素及 caspase-7 蛋白酶在喉癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2015,21(6):447-452.

Ling H, Liao QJ, Zhong WS, et al. Expression and its clinical significance of p53, p73, survivin and caspase-7 in laryngeal carcinoma[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2015,21(6): 447-452.

[7] Watanabe S, Sato K, Okazaki Y, et al. Activation of PI3K-AKT pathway in oral epithelial dysplasia and early cancer of tongue[J]. Bull Tokyo Dent Coll, 2009,50(3):125-133.

[8] Rahman KM, Li Y, Sarkar FH. Inactivation of akt and NF-κB play important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells[J]. Nutr Cancer, 2004,48(1): 84-94.

[9] Chen DZ, Qi M, Auburn KJ, et al. Indole-3-carbinol and diindolylmethane induce apoptosis of human cervical cancer cells and in murine hpv16-transgenic preneoplastic cervical epithelium[J]. J Nutr, 2001, 131(12): 3294-3302.

[10] Wu TY, Saw CL, Khor TO, et al. In vivo pharmacodynamics of indole-3-carbinol in the inhibition of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: involvement of Nrf2 and cell cycle/apoptosis signaling pathways[J]. Mol Carcinog, 2012, 51(10): 761-770.

[11] Newfield L, Goldsmith A, Bradlow HL, et al. Estrogen metabolism and human papillomavirus-induced tumors of the larynx: chemoprophylaxis with indole-3-carbinol[J]. Anticancer Res, 1993,13(2): 337-341.

(收稿日期:2018-12-27)

本文引用格式:毛承刚,周小淳,姜义道,等. 吲哚-3-甲醇抑制喉癌细胞体外生长的研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2019,25(5):504-507. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201905011

Cite this article as: MAO Cheng-gang, ZHOU Xiao-chun, JIANG Yi-dao, et al. Indole-3-carbinol inhibits in vitro growth of laryngeal cancer cells[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2019,25(5):504-507. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201905011