

绿原酸通过 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路对喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡的影响^Δ

张立坤^{1*}, 邵东风^{2#}, 王东海¹, 李 扬¹(1. 唐山市协和医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学附属医院呼吸与危重症医学科, 河北 唐山 063000)

中图分类号 R979.1 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)10-1206-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.10.012



摘要 目的:探讨绿原酸(CGA)对喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡及对 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)/B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)/胱天蛋白酶-3(Caspase-3)信号通路的影响。方法:分别用含有 0、250、500、750 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 CGA 培养液处理喉癌 Hep-2 细胞 24、48 h, 找出最适宜 CGA 的浓度和处理时间;将喉癌 Hep-2 细胞分为对照组(正常培养的喉癌 Hep-2 细胞)、CGA 低浓度组(750 $\mu\text{mol/L}$ CGA 培养液)、CGA 高浓度组(1 000 $\mu\text{mol/L}$ CGA 培养液)和 CGA 高浓度+通路抑制剂组(1 000 $\mu\text{mol/L}$ CGA 培养液+50 $\mu\text{mol/L}$ Bax/Bcl-2/Caspase-3 通路抑制剂 Bax inhibitor peptide V5)。采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法测定喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率,通过流式细胞仪检测喉癌 Hep-2 细胞凋亡率,采用蛋白质印迹法检测喉癌 Hep-2 细胞中增殖相关蛋白(ki-67)、凋亡相关蛋白(p53)及 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路相关蛋白的表达情况。结果:与对照组相比,CGA 低、高浓度组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率、细胞凋亡率,p53、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平显著升高,ki-67、Bcl-2 蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);且 CGA 高浓度组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率、细胞凋亡率,p53、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平高于 CGA 低浓度组,ki-67、Bcl-2 蛋白表达水平低于 CGA 低浓度组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 CGA 高浓度组相比,CGA 高浓度+通路抑制剂组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率、细胞凋亡率,p53、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平显著降低,ki-67、Bcl-2 蛋白表达水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:CGA 可显著抑制喉癌 Hep-2 细胞的增殖,并促进其凋亡,可能与 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路激活有关。

关键词 绿原酸;喉癌 Hep-2 细胞;Bcl-2 相关 X 蛋白;B 淋巴细胞瘤 2;胱天蛋白酶-3

Effects of Chlorogenic Acid on Proliferation and Apoptosis of Laryngeal Cancer Hep-2 Cells Through Bax/Bcl-2/Caspase-3 Signaling Pathway^Δ

ZHANG Likun¹, SHAO Dongfeng², WANG Donghai¹, LI Yang¹(1. Dept. of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Tangshan Union Medical College Hospital, Hebei Tangshan 063000, China; 2. Dept. of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of North China University of Technology, Hebei Tangshan 063000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the effects of chlorogenic acid (CGA) on proliferation and apoptosis of laryngeal cancer Hep-2 cells through Bcl-2-associated X protein (Bax)/B cell lymphoma-2 (Bcl-2)/cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3). **METHODS:** Laryngeal cancer Hep-2 cells were treated with CGA culture medium of 0, 250, 500, 750 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$ for 24 and 48 h respectively to find out the most suitable concentration and treatment time of CGA. Laryngeal cancer Hep-2 cells were divided into the control group (normally cultured laryngeal cancer Hep-2 cells), CGA low concentration group (750 $\mu\text{mol/L}$ CGA medium), CGA high concentration group (1 000 $\mu\text{mol/L}$ CGA medium), and CGA high concentration + pathway inhibitor group (1 000 $\mu\text{mol/L}$ CGA medium+50 $\mu\text{mol/L}$ Bax/Bcl-2/Caspase-3 pathway inhibitor Bax inhibitor peptide V5). Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to determine the proliferation inhibition rate of laryngeal cancer Hep-2 cells in each group, flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of laryngeal cancer Hep-2 cells in each group, Western blotting was used to determine the expression of proliferation related protein (ki-67), apoptosis related protein (p53) and Bax/Bcl-2/Caspase-3 signaling pathway related proteins in laryngeal cancer Hep-2 cells. **RESULTS:** Compared with the control group, the proliferation inhibition rate, apoptosis rate, p53, Bax and Caspase-3 protein expression levels of laryngeal cancer Hep-2 cells in CGA low and high concentration group were significantly higher,

^Δ 基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目(No. 20201550)

* 副主任医师,硕士。研究方向:耳鼻咽喉头颈外科学。E-mail:zhanglikun852@163.com

通信作者:主任医师,硕士。研究方向:呼吸与危重症医学。E-mail:sdf771214@163.com

and the ki-67 and Bcl-2 protein expression levels were significantly lower, with statistically significant differences ($P<0.05$); and the proliferation inhibition rate, apoptosis rate, p53, Bax and Caspase-3 protein expression levels of laryngeal cancer Hep-2 cells in CGA high concentration group were higher than those in CGA low concentration group, the of ki-67 and Bcl-2 protein expression levels were lower than those in CGA low concentration group, with statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with the CGA high concentration group, the proliferation inhibition rate, apoptosis rate, p53, Bax and Caspase-3 protein expression levels of laryngeal cancer Hep-2 cells in the CGA high concentration+pathway inhibitor group were significantly lower, and the ki-67 and Bcl-2 protein expression levels were significantly higher, with statistically significant differences ($P<0.05$). CONCLUSIONS: CGA can significantly inhibit the proliferation of laryngeal cancer Hep-2 cells and promote the apoptosis, which may be related to the activation of Bax/Bcl-2/Caspase-3 signaling pathway.

KEYWORDS Chlorogenic acid; Laryngeal cancer Hep-2 cells; Bcl-2-associated X protein; B cell lymphoma-2; Cysteinyl aspartate specific proteinase-3

喉癌是具有早期淋巴结转移和高侵袭特性的恶性肿瘤,全球发病率估计为 2.32/10 万^[1-2]。减轻患者病痛和经济压力尤为重要,寻找用于临床的有效药物显得极为迫切。绿原酸(chlorogenic acid,CGA)是具有悠久历史的中药多酚,金银花、杜仲、小粒咖啡和绿茶等植物中都含有该物质。目前,CGA 的抗肿瘤、抗炎、抗真菌和抗氧化等方面的研究已有报道^[3-4]。研究结果发现,CGA 对乳腺癌等肿瘤的治疗有积极的影响^[5]。然而,关于 CGA 对喉癌细胞影响的研究还未见报道。B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)在淋巴瘤细胞中被发现,当 Bcl-2 过表达时,能有效抑制细胞程序性死亡或者凋亡^[6]。凋亡相关因子 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)与 Bcl-2 具有氨基酸同源性,在体内 Bax 与 Bcl-2 可形成异型二聚体,过表达的 Bax 能有效抑制 Bcl-2 的活性^[7]。Bax 与 Bcl-2 是细胞凋亡重要的开关分子,其在恶性肿瘤细胞凋亡中具有重要的作用^[8]。胱天蛋白酶(Caspase)家族主要通过线粒体通路、死亡受体通路促进细胞凋亡,Caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键因子,具有蛋白失活和切割作用,激活 Caspase-3 蛋白后可促进细胞的凋亡^[9]。本研究采用不同浓度 CGA 及 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路抑制剂处理喉癌 Hep-2 细胞,探究 CGA 对喉癌 Hep-2 细胞及 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路的影响,为临床治疗喉癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞:喉癌 Hep-2 细胞(批号为 CCL-23)购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.1.2 仪器:BPH-9162 型细胞培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);CellDiscoverer 7 型倒置显微镜(卡尔蔡司上海管理有限公司);A49891 型细胞计数器(美国赛默飞世尔科技有限公司);SAF-680T 型酶标仪(上海巴玖实业有限公司);EX-1026 型流式细胞仪、EL-3047 型蛋白凝胶成像仪(常州必达科生物科技有限公司)。

1.1.3 药品与试剂:CGA(原料药,纯度为 98.5%,批号为 S30617-3)购自西安天广源生物科技有限公司;Bax/Bcl-2/Caspase-3 通路抑制剂 Bax inhibitor peptide V5(批号为 A15337)购自南京百鑫德诺生物科技有限公司;DMEM 培养液

(批号为 P-CA-307)、细胞计数试剂盒-8(CCK-8,批号为 P-CA-402)和细胞凋亡双染试剂盒(Annexin V-FITC/PI,批号为 P-CA-201)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;蛋白提取试剂盒(批号为 ab113476)购自美国 Abcam 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号为 GK10009)购自美国 GIpBio 公司;鼠源 Bax(批号为 sc-7480)、Bcl-2(批号为 sc-7382)、Caspase-3(批号为 sc-7272)、凋亡相关蛋白(p53,批号为 sc-23900)、增殖相关蛋白(ki-67,批号为 sc-1269)、GAPDH 抗体(批号为 sc-47724)和羊抗人二抗(批号为 sc-51993)购自上海江莱生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及含药培养液制备:取喉癌 Hep-2 细胞,于 96 孔培养板中,用 90% DMEM 培养基和 10% 胎牛血清,在 37℃、5%二氧化碳与 95%空气的条件下在培养箱中进行培养,细胞密度达到 80%以上进行传代,每 3 d 更新 1 次培养液;倒置显微镜观察到细胞长满培养瓶。将 CGA 溶解于 DMEM 培养液中,配制成含有 0、250、500、750 和 1 000 μmol/L 的 CGA 培养液,用于后续实验^[10]。

1.2.2 CCK-8 法检测不同浓度 CGA 对喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率的影响:取对数生长期喉癌 Hep-2 细胞,调整喉癌 Hep-2 细胞浓度为 2×10^5 个/孔,接种于 24 孔培养板,分别用含有 0、250、500、750 和 1 000 μmol/L 的 CGA 培养液处理喉癌 Hep-2 细胞 24、48 h,用 CCK-8 法检测喉癌 Hep-2 细胞增殖能力,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL,培养 1 h 后,于酶标仪(450 nm)中测定各孔吸光度(OD_{450})值,根据公式计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组 OD_{450} 值/对照组 OD_{450} 值) $\times 100\%$,其中实验组为各浓度 CGA 培养液,对照组为 0 μmol/L 的 CGA 培养液,以此寻找出最适宜 CGA 的浓度和处理时间。实验重复 6 次。

1.2.3 细胞分组及处理:取对数生长期喉癌 Hep-2 细胞,分为对照组(正常培养的喉癌 Hep-2 细胞)、CGA 低浓度组(CGA 培养液 750 μmol/L)、CGA 高浓度组(CGA 培养液 1 000 μmol/L)、CGA 高浓度+通路抑制剂组(CGA 培养液 1 000 μmol/L+Bax/Bcl-2/Caspase-3 通路抑制剂 Bax inhibitor peptide V5 50 μmol/L,Bax inhibitor peptide V5 的浓度依据试剂盒说明书

进行设置), 各组喉癌 Hep-2 细胞按照上述方式给药进行培养。

1.2.4 CCK-8 法检测各组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率: 取各组对数生长期喉癌 Hep-2 细胞, 测定方法同“1.2.2”, 分别在培养至 48 h 时测定于每孔细胞在 450 nm 处 OD₄₅₀ 值, 并计算喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率。实验重复 6 次。

1.2.5 流式细胞仪检测各组喉癌 Hep-2 细胞凋亡情况: 用胰蛋白酶消化各组喉癌 Hep-2 细胞, 终止消化后用胎牛血清培养基进行培养, 调整细胞密度为 2×10⁵ 个/mL, 用 PBS 清洗 2 次, 3 300 r/min 离心(离心半径为 15 cm) 5 min 去除上清液, 加入 500 μL 稀释的膜联蛋白 V 结合缓冲液重悬细胞, 再加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI 5 μL 染色, 室温(25 ℃)避光孵育 20 min 后于流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复 6 次。

1.2.6 蛋白质印迹法检测各组喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡和 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路相关蛋白表达: 取各组喉癌 Hep-2 细胞, 调整细胞浓度为 5×10⁵ 个/mL 接种于 24 孔板中, 按照蛋白提取试剂盒操作流程提取各组喉癌 Hep-2 细胞的总蛋白, 8 500 r/min 离心(离心半径为 15 cm) 5 min 取上清液, 根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒的操作流程测定其中蛋白质含量, 使用凝胶电泳 1.5 h, 分离等量蛋白质, 转移至聚偏氟乙烯膜上, 加入封闭液封闭 1 h, 添加鼠源 p53(1:300)、ki-67(1:300)、Bax(1:500)、Bcl-2(1:500)、Caspase-3(1:1 000)、GAPDH(1:500)一抗孵育 4 ℃过夜, 添加羊抗人二抗(1:2 000)后室温孵育 2 h。采用蛋白凝胶成像仪对相关蛋白水平进行半定量分析。实验重复 6 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较进行单因素方差分析, 有差异则进一步通过 SNK-*q* 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 CGA 对喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率的影响

与 0 μmol/L CGA 相比, 250、500、750 和 1 000 μmol/L 的 CGA 对喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且呈现浓度依赖性; 其中 750、1 000 μmol/L 的 CGA 对喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率相对较高, 因此, 选择 750、1 000 μmol/L 的 CGA 用于后续的实验; 与 24 h 相比, 250、500、750 和 1 000 μmol/L 的 CGA 对喉癌 Hep-2 细胞处理 48 h 后的增殖抑制率显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 因此, 后续实验对喉癌 Hep-2 细胞处理 48 h, 见表 1。

2.2 四组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率比较

与对照组相比, CGA 低、高浓度组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率显著升高; CGA 高浓度组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率高于 CGA 低浓度组; 与 CGA 高浓度组相比, CGA 高浓度+通路抑制剂组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率显著降低, 上述差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

表 1 不同浓度 CGA 对喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 1 Effects of different concentrations of CGA on proliferation inhibition rate of laryngeal cancer Hep-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

CGA 浓度/(μmol/L)	细胞增殖抑制率/%	
	24 h	48 h
0	0.00±0.00	0.00±0.00
250	15.01±0.82 ^a	21.01±1.19 ^{ab}
500	18.90±1.04 ^a	28.90±1.83 ^{ab}
750	22.57±1.26 ^a	32.57±2.26 ^{ab}
1 000	34.18±2.01 ^a	44.18±3.41 ^{ab}

注: 与 0 μmol/L 相比, ^a $P < 0.05$; 与 24 h 相比, ^b $P < 0.05$

Note: vs. 0 μmol/L, ^a $P < 0.05$; vs. 24 h, ^b $P < 0.05$

表 2 四组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 2 Comparison of proliferation inhibition rate of laryngeal cancer Hep-2 cells among four groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	细胞增殖抑制率/%
对照组	0.00±0.00
CGA 低浓度组	32.39±2.23 ^a
CGA 高浓度组	44.12±3.35 ^{ab}
CGA 高浓度+通路抑制剂组	25.06±2.67 ^{ac}

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 CGA 低浓度组相比, ^b $P < 0.05$; 与 CGA 高浓度组相比, ^c $P < 0.05$

Note: vs. the control group, ^a $P < 0.05$; vs. the CGA low concentration group, ^b $P < 0.05$; vs. the CGA high concentration group, ^c $P < 0.05$

2.3 四组喉癌 Hep-2 细胞凋亡率比较

与对照组相比, CGA 低、高浓度组喉癌 Hep-2 细胞凋亡率显著升高; CGA 高浓度组喉癌 Hep-2 细胞凋亡率高于 CGA 低浓度组; 与 CGA 高浓度组相比, CGA 高浓度+通路抑制剂组喉癌 Hep-2 细胞凋亡率显著降低, 上述差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见表 3、图 1。

表 3 四组喉癌 Hep-2 细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6, \%$)

Tab 3 Comparison of apoptosis rate of laryngeal cancer Hep-2 cells among four groups ($\bar{x} \pm s, n = 6, \%$)

组别	细胞凋亡率
对照组	10.97±1.83
CGA 低浓度组	18.16±2.15 ^a
CGA 高浓度组	26.81±4.27 ^{ab}
CGA 高浓度+通路抑制剂组	18.06±2.49 ^{ac}

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 CGA 低浓度组相比, ^b $P < 0.05$; 与 CGA 高浓度组相比, ^c $P < 0.05$

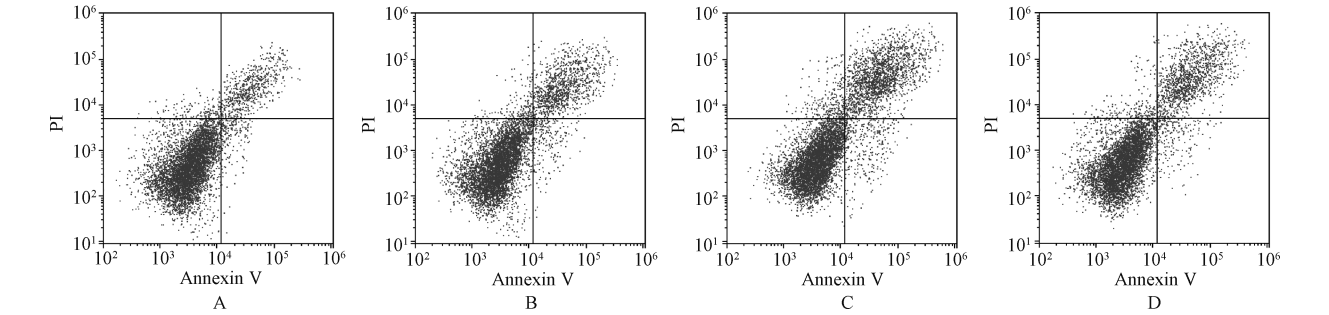
Note: vs. the control group, ^a $P < 0.05$; vs. the CGA low concentration group, ^b $P < 0.05$; vs. the CGA high concentration group, ^c $P < 0.05$

2.4 四组喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达水平比较

与对照组相比, CGA 低、高浓度组喉癌 Hep-2 细胞中 ki-67 蛋白表达水平显著降低, p53 蛋白表达水平显著升高; CGA 高浓度组喉癌 Hep-2 细胞中 ki-67 蛋白表达水平低于 CGA 低浓度组, p53 蛋白表达水平高于 CGA 低浓度组; 与 CGA 高浓度组相比, CGA 高浓度+通路抑制剂组喉癌 Hep-2 细胞中 ki-67 蛋白表达水平显著升高, p53 蛋白表达水平显著降低, 上述差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见表 4、图 2。

2.5 四组喉癌 Hep-2 细胞 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路相关蛋白表达水平比较

与对照组相比, CGA 低、高浓度组喉癌 Hep-2 细胞中 Bax、



A. 对照组;B. CGA 低浓度组;C. CGA 高浓度组;D. CGA 高浓度+通路抑制剂组

A. control group; B. CGA low concentration group; C. CGA high concentration group; D. CGA high concentration+pathway inhibitor group

图 1 四组喉癌 Hep-2 细胞凋亡流式图

Fig 1 Flow cytometry of laryngeal cancer Hep-2 cells apoptosis among four groups

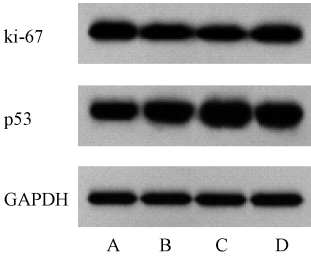
表 4 四组喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 Comparison of expression levels of proliferation and apoptosis related proteins in laryngeal cancer Hep-2 cells among four groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ki-67/GAPDH	p53/GAPDH
对照组	2.03±0.16	1.96±0.18
CGA 低浓度组	1.62±0.14 ^a	2.55±0.27 ^a
CGA 高浓度组	1.33±0.10 ^{ab}	3.21±0.35 ^{ab}
CGA 高浓度+通路抑制剂组	1.61±0.13 ^{ac}	2.76±0.24 ^{ac}

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 CGA 低浓度组相比,^b $P<0.05$;与 CGA 高浓度组相比,^c $P<0.05$

Note:vs. the control group, ^a $P<0.05$; vs. the CGA low concentration group, ^b $P<0.05$; vs. the CGA high concentration group, ^c $P<0.05$



A. 对照组;B. CGA 低浓度组;C. CGA 高浓度组;D. CGA 高浓度+通路抑制剂组

A. control group; B. CGA low concentration group; C. CGA high concentration group; D. CGA high concentration+pathway inhibitor group

图 2 四组喉癌 Hep-2 细胞 p53、ki-67 蛋白质印迹图

Fig 2 Western blotting of p53 and ki-67 in laryngeal cancer Hep-2 cells among four groups

Caspase-3 蛋白表达水平显著升高,Bcl-2 蛋白表达水平显著降低;CGA 高浓度组喉癌 Hep-2 细胞中 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平高于 CGA 低浓度组,Bcl-2 蛋白表达水平低于 CGA 低浓度组;与 CGA 高浓度组相比,CGA 高浓度+通路抑制剂组喉癌 Hep-2 细胞中 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著降低,Bcl-2 蛋白表达水平显著升高,上述差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 5、图 3。

3 讨论

喉癌在头颈部恶性肿瘤中的发病率居第 2 位,喉癌的治疗需要考虑根治问题,还需要考虑保留喉功能,术后进行化疗辅

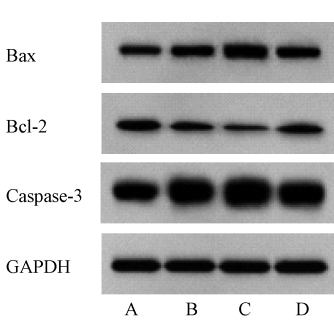
表 5 四组喉癌 Hep-2 细胞 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路相关蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 5 Comparison of expression levels of Bax/Bcl-2/Caspase-3 signal pathway related proteins in laryngeal cancer Hep-2 cells among four groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Caspase-3/GAPDH
对照组	0.45±0.08	0.82±0.15	1.24±0.16
CGA 低浓度组	1.05±0.19 ^a	0.47±0.11 ^a	1.98±0.37 ^a
CGA 高浓度组	1.47±0.30 ^{ab}	0.24±0.05 ^{ab}	2.55±0.45 ^{ab}
CGA 高浓度+通路抑制剂组	0.93±0.17 ^{ac}	0.51±0.09 ^{ac}	1.82±0.33 ^{ac}

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 CGA 低浓度组相比,^b $P<0.05$;与 CGA 高浓度组相比,^c $P<0.05$

Note:vs. the control group, ^a $P<0.05$; vs. the CGA low concentration group, ^b $P<0.05$; vs. the CGA high concentration group, ^c $P<0.05$



A. 对照组;B. CGA 低浓度组;C. CGA 高浓度组;D. CGA 高浓度+通路抑制剂组

A. control group; B. CGA low concentration group; C. CGA high concentration group; D. CGA high concentration+pathway inhibitor group

图 3 四组喉癌 Hep-2 细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白质印迹图

Fig 3 Western blotting of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in laryngeal cancer Hep-2 cells among four groups

助是一种公认的根本方法,寻找新型的化疗药,提高根治率和患者健康水平,保留喉功能显得尤为重要^[11-13]。CGA 可以减轻肺炎危害,影响肺炎中巨噬细胞由 M1 向 M2 极化,抑制炎症发生^[14];并被证明可以用于辅助治疗乳腺癌,对乳腺癌 MCF-7 细胞具有更强的抑制作用^[15]。本研究结果显示,250、500、750 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 CGA 均具有抑制喉癌 Hep-2 细胞增殖的作用,且具有浓度依赖性,其中 750、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 CGA 对喉癌

Hep-2 细胞的抑制作用较为显著,因此,选择 750、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 CGA 用于后续实验。使用 750、1 000 $\mu\text{mol/L}$ CGA 处理喉癌 Hep-2 细胞 48 h 后,结果发现,与对照组相比,CGA 低、高浓度组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率、细胞凋亡率显著升高,p53 蛋白表达水平显著升高,ki-67 蛋白表达水平显著降低,表明 CGA 可以显著抑制喉癌 Hep-2 细胞的增殖,促进其凋亡。

Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路与细胞的凋亡过程有密切关系,Bax 的过表达能有效抑制 Bcl-2 表达,并能激活 Caspase-3,激活后的 Caspase-3 导致染色质凝聚和核酸酶激活,进一步促进细胞凋亡,在细胞凋亡过程中 Caspase-3 发挥最后执行者的作用,而 Bcl-2 过表达时能有效抑制 Bax 和 Caspase-3 的表达,显著抑制细胞凋亡^[16]。Bcl-2 与 Bax 能够特异性结合而发挥抗凋亡作用,Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 能够发生级联反应促进细胞凋亡^[17]。刘磊峰等^[18]的研究结果发现,通过影响 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达水平,可以促进喉癌 Hep-2 细胞的凋亡。p53 基因是肿瘤抑制基因的一种,当促进 p53 蛋白高表达时,能有效诱导细胞凋亡^[19];ki-67 是细胞核中增殖能力的标志物,其高表达提示细胞具有活跃的增殖能力^[20]。本研究结果显示,CGA 低、高浓度组喉癌 Hep-2 细胞 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平高于对照组,Bcl-2 蛋白表达水平低于对照组,表明 CGA 可促进喉癌 Hep-2 细胞中 Bax、Caspase-3 蛋白表达,抑制 Bcl-2 蛋白表达。本研究结果还发现,与 CGA 高浓度组相比,CGA 高浓度+通路抑制剂组喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制率、细胞凋亡率,p53、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平显著降低,ki-67、Bcl-2 蛋白表达水平显著升高,表明 Bax/Bcl-2/Caspase-3 通路抑制剂 Bax inhibitor peptide V5 能够逆转 CGA 抑制喉癌 Hep-2 细胞增殖和诱导其凋亡的作用,因此,CGA 可能通过激活 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路发挥抑癌作用。

综上所述,CGA 可显著抑制喉癌 Hep-2 细胞的增殖,并促进其凋亡,可能与 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路激活有关,但影响喉癌增殖与凋亡的因素较多,信号通路纷繁复杂而且未进行体内验证,因此仍需进一步研究。

参考文献

[1] 龚恒,吴俐萍,吴倩,等. 1990—2019 年中国喉癌疾病负担分析[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2021, 13(12): 53-59.

[2] WANG J Y, ZHANG Q W, WEN K X, et al. Temporal trends in incidence and mortality rates of laryngeal cancer at the global, regional and national levels, 1990-2017[J]. BMJ Open, 2021, 11(10): e050387.

[3] 王庆华,杜婷婷,张智慧,等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展[J]. 药学报, 2020, 55(10): 2273-2280.

[4] 翟阳,高樱,赵渤年. 绿原酸药代动力学研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 5095-5099.

[5] CHANGIZI Z, MOSLEHI A, ROHANI A H, et al. Chlorogenic acid inhibits growth of 4T1 breast cancer cells through involvement in Bax/Bcl2 pathway[J]. J Cancer Res Ther, 2020, 16(6): 1435-1442.

[6] PUNNOOSE E, PEALE F V, SZAFAER-GLUSMAN E, et al. BCL2 expression in first-line diffuse large B-cell lymphoma identifies a patient population with poor prognosis[J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2021, 21(4): 267-278. e10.

[7] ZHANG D, LI X F, SONG D Q, et al. Atractylenolide III induces apoptosis by regulating the Bax/Bcl-2 signaling pathway in human colorectal cancer HCT-116 Cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Anticancer Drugs, 2022, 33(1): 30-47.

[8] 周晓红,卢晓丽,杨雪,等. 熊果酸对喉癌 Hep-2 细胞 bcl-2、Bax 基因表达和凋亡影响[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(3): 434-437.

[9] 周晓谦,金星姬,杨竹生,等. 百里香醌调控 Caspase-3/Bax/Bcl-2 信号通路诱导人皮肤鳞状细胞癌增殖和凋亡的作用机制研究[J]. 中国美容医学, 2021, 30(6): 114-117, 163.

[10] LUQUE-BADILLO A C, HERNANDEZ-TAPIA G, RAMIREZ-CASTILLO D A, et al. Gold nanoparticles enhance microRNA 31 detection in colon cancer cells after inhibition with chlorogenic acid[J]. Oncol Lett, 2021, 22(4): 742.

[11] KIM S Y, HAN K D, JOO Y H. Metabolic syndrome and incidence of laryngeal cancer: a nationwide cohort study[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 667.

[12] 潘新良,林云. 正确选择喉癌治疗方式、提高患者的生存率及生活质量[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2020, 55(12): 1111-1115.

[13] YE B B, YANG R, YAN Y F, et al. Research progress regarding surgical margins, molecular margins, and prognosis of laryngeal carcinoma[J]. Ear Nose Throat J, 2021, 100(8): 597-603.

[14] ZENG J H, WAN X Y, LIU T, et al. Chlorogenic acid ameliorates *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumonia in immunosuppressed mice *via* inhibiting the activation of NLRP3 inflammasomes[J]. Food Funct, 2021, 12(19): 9466-9475.

[15] HSU P H, CHEN W H, JUAN-LU C, et al. Hesperidin and chlorogenic acid synergistically inhibit the growth of breast cancer cells *via* estrogen receptor/mitochondrial pathway[J]. Life (Basel), 2021, 11(9): 950.

[16] LIN K N, ZHAO W, HUANG S Y, et al. Grape seed proanthocyanidin extract induces apoptosis of HL-60/ADR cells *via* the Bax/Bcl-2 caspase-3/9 signaling pathway[J]. Transl Cancer Res, 2021, 10(9): 3939-3947.

[17] LUO Y, FU X Y, RU R Z, et al. CpG oligodeoxynucleotides induces apoptosis of human bladder cancer cells *via* caspase-3-Bax/Bcl-2-p53 axis[J]. Arch Med Res, 2020, 51(3): 233-244.

[18] 刘磊峰,邱海涛,江枫,等. miR-19 b-3 p 靶向 LRIG1 调控喉癌细胞凋亡和放射敏感性分子机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(12): 1466-1472.

[19] 常远,谭立君,王启威,等. MiR-125a 靶向调节 P53 表达对人喉癌细胞增殖、凋亡以及放射治疗敏感性的影响[J]. 中国肿瘤, 2020, 29(9): 708-714.

[20] 李清华,马志红,李立,等. SLC7A11 与 Ki-67 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 河北医学, 2020, 26(12): 1978-1982.

(收稿日期:2022-02-16 修回日期:2022-07-01)