

没食子酸对人食管癌TE-1细胞的体外抑制作用及其机制[△]

吴昊^{1*}, 努兰·拜都拉¹, 刘琳玉², 任艳利^{1#} (1. 伊犁师范大学生物与地理科学学院, 新疆伊宁 835000; 2. 伊犁师范大学微生物资源保护与开发利用重点实验室, 新疆伊宁 835000)

中图分类号 R963 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)12-1448-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.12.07



摘要 目的 探究没食子酸(GA)对人食管癌TE-1细胞的体外抑制作用及潜在机制。方法 MTT法检测GA作用24 h和48 h后对TE-1细胞增殖的影响,细胞荧光计数(CCK-F)法和倒置荧光显微镜观察GA作用后TE-1细胞的数量变化和形态变化,划痕实验检测细胞迁移能力的变化,平板集落形成实验检测GA对TE-1细胞集落形成能力的影响,流式细胞术检测细胞凋亡情况,荧光探针(DCFH-DA)法观察活性氧(ROS)产生情况;Western blot法检测胱天蛋白酶3(caspase-3)、caspase-9、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、cyclin D3的表达水平。结果 GA能够明显降低TE-1细胞的增殖能力,且有时间和浓度依赖趋势,其对细胞的半数抑制浓度分别为(281.22±26.81)μmol/L(24 h)和(220.90±31.15)μmol/L(48 h)。与对照组比较,给药组细胞出现皱缩、排列稀疏、细胞核固缩等现象,且细胞数量明显减少。与对照组比较,给药组细胞的细胞迁移能力和集落形成能力均显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。经100、300、500 μmol/L的GA作用24 h后,细胞凋亡率分别为(6.21±0.32)%、(12.59±0.58)%和(15.41±0.41)%,均显著高于对照组的(5.29±0.28)%($P<0.01$ 或 $P<0.05$);除100 μmol/L GA组外,其余给药组细胞ROS的产生水平均显著提高($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与对照组比较,各给药组细胞中Bcl-2(仅GA 200 μmol/L组)、Bax(GA 100 μmol/L组除外)、caspase-3、caspase-9(GA 100 μmol/L组除外)的表达水平均显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$),Bcl-2(GA 100、200 μmol/L组除外)、cyclin D1、cyclin D3蛋白的表达水平均显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 GA能够抑制人食管癌TE-1细胞的增殖,限制其迁移能力及集落形成能力,促进其凋亡;上述作用可能与该成分可提高ROS水平并上调促凋亡蛋白caspase-3、caspase-9、Bax的表达,下调抗凋亡蛋白Bcl-2和细胞周期蛋白cyclin D1、cyclin D3的表达有关。

关键词 没食子酸;食管癌;凋亡;活性氧;TE-1细胞

Inhibitory effects of gallic acid on human esophageal cancer TE-1 cells *in vitro* and its mechanism

WU Hao¹, Nuran · Baydolla¹, LIU Linyu², REN Yanli¹ (1. College of Biology and Geography, Yili Normal University, Xinjiang Yining 835000, China; 2. Key Laboratory for Protection, Development and Utilization of Biological Resources, Yili Normal University, Xinjiang Yining 835000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate inhibitory effects of gallic acid (GA) on human esophageal cancer TE-1 cells *in vitro* and its potential mechanism. **METHODS** The effects of GA on the proliferation of TE-1 cells were determined by MTT assay after treated with GA for 24 h and 48 h. Cell fluorescence counting (CCK-F) method and inverted fluorescence microscope were used to observe the changes in the number and morphology of TE-1 cells after treated with GA. The change of cell migration ability was detected by scratch test. The effects of GA on the colony-forming ability of TE-1 cells were tested by plate colony formation experiment. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Fluorescence probe (DCFH-DA) method was used to observe reactive oxygen species (ROS) production. Western blot assay was used to detect the expression of caspase-3, caspase-9, Bcl-2, Bcl-2 associated X protein (Bax), cyclin D1 and cyclin D3. **RESULTS** GA significantly reduced the proliferation ability of TE-1 cells in time and concentration dependent manner. the IC₅₀ of GA to TE-1 cells were (281.22±26.81) μmol/L (24 h) and (220.90±31.15) μmol/L (48 h), respectively. Compared with control group, the cells in the administration group showed shrinkage, sparse arrangement and nuclear pyknosis, and the number of cells decreased significantly. Compared with control group, the cell migration ability and colony formation ability were decreased significantly in administration groups ($P<0.01$ or $P<0.05$). The apoptosis rates of TE-1 cells were (6.21±0.32)%, (12.59±0.58)% and (15.41±0.41)% after treated with 100, 300 and 500 μmol/L GA for 24 h, all of which were significantly higher than (5.29±0.28)% of control group ($P<0.01$ or $P<0.05$). Except for GA 100 μmol/L group, the level of ROS in other administration groups were significantly increased ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with control group, the expressions of Bcl-2 (only GA 200 μmol/L group), Bax (except for GA 100 μmol/L), caspase-3 and caspase-9 (except for GA 100 μmol/L) were increased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$), while the protein expressions of Bcl-2 (except GA 100, 200 μmol/L group), cyclin D1 and cyclin D3 were significantly decreased ($P<0.01$ or $P<0.05$). **CONCLUSIONS** GA can inhibit the proliferation of esophageal cancer TE-1 cells, restrict their migration ability and colony-forming ability, and promote apoptosis. The mechanism may be related to the increase of ROS level, up-regulation of the expressions of

[△] 基金项目:新疆维吾尔自治区研究生科研创新计划项目(No. XJ2020G303)

* 硕士研究生。研究方向:肿瘤遗传学。电话:0999-8338370。E-mail:1209364115@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:肿瘤遗传学。电话:0999-8138036。E-mail:864672445@qq.com

pro-apoptotic proteins caspase-3, caspase-9 and Bax, and down-regulation of the expressions of anti-apoptotic protein Bcl-2, cyclin D1 and cyclin D3.

KEYWORDS gallic acid; esophageal cancer; apoptosis; reactive oxygen; TE-1 cells

食管癌作为全世界发病率和病死率前10位的癌症,其治疗情况和患者预后情况均较差^[1-2];特别是在中国,食管癌的发病率和病死率分列第4位和第6位,均超过世界平均水平的2倍^[3]。根据全球癌症观察站的预测结果,我国男性食管癌新发病例数占比将超过全球新发食管癌病例数的一半^[4]。食管癌患者的早期症状并不明显,而当患者出现明显的吞咽梗阻、声音沙哑或淋巴结肿大则提示其病情已进入晚期^[5]。目前,食管癌的治疗以手术切除、放化疗为主,其中手术切除常伴随着出血、穿孔、食管狭窄和感染等多种并发症,而放化疗会引发营养不良、骨髓抑制、肝肾功能损害和神经系统毒性等明显的毒副作用^[6]。可见,寻找新的治疗方案和新型药物来改善食管癌患者的治疗效果显得尤为重要。

没食子酸(gallic acid, GA)的分子式为 $C_7H_6O_5$,是一种多酚类化合物,通常为白色或淡黄色的针状结晶,易溶于水 and 乙醇,具有抗氧化、抗菌和抗肿瘤等广泛生理活性^[7]。该成分在自然界中分布广泛,是五倍子、大叶桉、红景天等多种传统中药的主要活性成分之一^[8]。已有研究表明,GA能够抑制人肺癌A549细胞的增殖和迁移,并可通过调节Janus激酶/信号转导及转录激活因子3(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3, JAK/STAT3)信号通路及下游凋亡分子来增强顺铂的抗肿瘤作用^[9]。另有研究表明,GA能够提高活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,从而可诱导人胶质母细胞瘤细胞、膀胱癌细胞、人乳腺癌细胞以及黑色素瘤细胞的凋亡^[10-12]。基于此,本研究拟以人食管癌TE-1细胞为对象,首先考察GA对细胞增殖、迁移和集落形成能力的影响,其次探究该成分对TE-1细胞ROS水平的影响,最后根据GA处理后TE-1细胞内凋亡相关因子B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X, Bax)、胱天蛋白酶3(caspase-3)、caspase-9以及细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、cyclin D3的表达水平来探索GA治疗食管癌的潜在机制,以期为该成分抗肿瘤作用的阐释以及食管癌的治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括Multiskan GO型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),CytoFLEX型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),Galaxy 170S型恒温二氧化碳(CO₂)细胞培养箱、5430型低温高速离心机(德国Eppendorf公司),Mini-PROTEAN Tetra型蛋白电泳仪和转膜仪、GS-900型校准型密度计(美国Bio-Rad公司),Ti-s型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司),HH-2型电热恒温水浴锅(上海力辰仪器科

技有限公司),BSA124S型电子天平(德国Sartorius公司),SX-500型高压灭菌锅[天美(中国)科学仪器有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

GA对照品(批号63262,纯度≥98%)购自美国MCE公司;胎牛血清、RPMI 1640培养基、胰蛋白酶(批号分别为RB35941、AF29531042、J180022)均购自美国HyClone公司;Annexin V/PI细胞凋亡检测试剂盒(批号0315976)购自美国BD公司;MTT试剂(批号0793)购自合肥白鲨生物科技有限公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS, pH7.4,批号69092500)购自北京索莱宝科技有限公司;细胞荧光计数(cell fluorescence counting kit-F, CCK-F)试剂盒、ROS荧光探针(DCFH-DA)试剂盒、特超敏ECL化学发光试剂盒(批号分别为122920210601、S0033S、082020201106),兔源Bcl-2、caspase-3、cyclin D1单克隆抗体(批号分别为090220210406、121520210422、020321210405),鼠源Bax、caspase-9、cyclin D3、 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(批号分别为090920210311、090820210407、021219210413、120319201012),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)二抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG二抗(批号分别为020821210409、121020210409),以及RIPA裂解液等Western blot相关试剂均购自上海碧云天生物技术有限公司;二甲基亚砜等其余试剂均购自天津北联试剂厂;水为双蒸水。

1.3 细胞

人食管癌细胞TE-1购自武汉普诺赛生物科技有限公司,批号为CL-0231。

2 方法

2.1 细胞培养

将人食管癌TE-1细胞培养于含10%胎牛血清、100 u/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的RPMI 1640培养基中,于37.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度条件下培养(培养条件下同),取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.2 细胞增殖活性的检测

采用MTT法进行检测。取对数生长期的TE-1细胞,调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,按每孔100 μ L接种于96孔板中,培养过夜,待细胞贴壁后,分为给药组和对照组(每组设置6个复孔),并另设空白调零孔(不加细胞和药物,只加培养基)。给药组加入含GA 100、200、300、400、500 μ mol/L(浓度依据前期预实验结果设置)的培养基(无双抗)100 μ L,对照组加入同体积的培养基。分别培养24 h和48 h后,每孔加入5 mg/mL的MTT试剂20 μ L,孵育2 h;弃去上清液,每孔加入二甲基亚砜200 μ L,

振荡 10 min 使充分溶解,用酶标仪于 570 nm 波长下检测吸光度(A)值,通过以下公式计算细胞存活率:细胞存活率($\%$)=(给药组 A 值-空白调零孔 A 值)/(对照组 A 值-空白调零孔 A 值) $\times 100\%$ 。采用 SPSS 26.0 软件计算 GA 作用不同时间后对细胞的半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC_{50})。

2.3 细胞形态和细胞活性的检测

采用 CCK-F 法和倒置荧光显微镜进行检测、观察。取对数生长期的 TE-1 细胞,调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,分为给药组和对照组,每组设置 3 个复孔。给药组加入含 GA 100、300、500 μ mol/L(浓度依据“2.2”项下实验结果设置)的培养基 100 μ L,对照组加入同体积的培养基。培养 24 h 后,采用倒置荧光显微镜观察 TE-1 细胞的形态变化;同时,采用 CCK-F 法检测 TE-1 细胞数量变化,按其试剂盒说明书方法进行作。

2.4 细胞迁移情况的检测

采用划痕实验进行检测。取对数生长期的 TE-1 细胞,调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,按每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,培养 4 h,待细胞基本长满时,使用 10 μ L 白枪头在皿底作笔直的划痕,用 PBS 冲洗细胞 2 次。将细胞分为给药组和对照组,给药组加入含 GA 100、300、500 μ mol/L(浓度依据“2.2”项下实验结果设置)的培养基 1 mL,对照组加入同体积的培养基,每组设置 3 个复孔。分别于培养 0、4、12、24 h 时观察并拍照,用 Image J 软件分析划痕面积并按以下公式计算 24 h 时的相对划痕愈合率:相对划痕愈合率($\%$)=(0 h 时划痕面积-培养 24 h 时划痕面积)/0 h 时划痕面积 $\times 100\%$ 。

2.5 细胞集落形成的检测

采用平板集落形成实验进行检测。取对数生长期的 TE-1 细胞,调整细胞密度至 1×10^3 个/mL,按每孔 1 mL 接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,分为给药组和对照组,每组设置 3 个复孔。弃去培养基,给药组加入含 GA 5、10、15、20、25 μ mol/L(浓度依据前期预实验结果设置)的培养基 2 mL,对照组加入同体积的培养基。培养 10 d 后,弃去培养基,用 PBS 冲洗 3 次;以 10% 甲醛溶液室温固定 15 min,用 PBS 冲洗 3 次,再以结晶紫染色 3 min,用 PBS 洗去浮色,采用 Image J 1.8.0 软件分析集落数量(肉眼可见的集落也计算在内)并按下列公式计算集落形成相对数量:集落形成相对数量($\%$)=(给药组集落数量/对照组集落数量) $\times 100\%$ 。

2.6 细胞凋亡的检测

采用流式细胞术进行检测。取对数生长期的 TE-1 细胞,调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,按每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,分为给药组和对照组,每组设置 3 个复孔。弃去培养基,给药组加入含 GA 100、300、500 μ mol/L(浓度依据“2.2”项下实验结果设置)的培养基 2 mL,对照组加入同体积的培养基。培养 24 h 后,收集细胞,加入 Annexin V-FITC 和 PI 染料,室温避光染色

15 min,过滤,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.7 细胞内 ROS 水平的检测

采用 DCFH-DA 法进行检测。DCFH-DA 能够自由进入细胞膜并在细胞内被酯酶水解为 DCFH,细胞内的 ROS 能够氧化无荧光的 DCFH 使其变为有荧光的 DCF,检测其荧光强度即可反应 ROS 水平。取对数生长期的 TE-1 细胞,调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,分为给药组和对照组,每组设置 3 个复孔。给药组加入含 GA 100、200、300、400、500 μ mol/L(浓度依据前期预实验结果设置)的培养基 100 μ L,对照组加入同体积的培养基。培养 24 h 后,收集细胞,于稀释好的 DCFH-DA 中吹散,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,每隔 5 min 取出混匀。孵育完成后,用无血清的培养基洗涤细胞 2 次,利用 FITC 通道检测各孔的荧光强度,通过 ModfitLT 5 软件分析其平均荧光强度,再按以下公式计算 ROS 水平:ROS 水平($\%$)=给药组的平均荧光强度/对照组的平均荧光强度 $\times 100\%$ 。

2.8 细胞中 caspase-3、caspase-9、Bcl-2、Bax、cyclin D1、cyclin D3 蛋白表达的检测

采用 Western blot 法进行检测。取对数生长期的 TE-1 细胞,调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,分为给药组和对照组,每组设置 3 个复孔。给药组加入含 GA 100、200、300、400、500 μ mol/L(浓度依据前期预实验结果设置)的培养基 100 μ L,对照组加入同体积的培养基。培养 24 h 后,收集细胞,使用 RIPA 裂解液及苯甲基磺酰氟提取总蛋白,以 BCA 法检测蛋白浓度,参照最低浓度对所有蛋白浓度进行归一化处理后,在蛋白样品中加入上样缓冲液,沸水浴中放置 3 min 使变性。取变性蛋白适量,进行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(分离胶电压 70 V,浓缩胶电压 110 V,电泳时间 120 min)后,转移至硝酸纤维素膜(电流 300 mA;转膜时间根据蛋白大小决定,一般 1 kDa 转膜 1 min)上;用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,分别按 1:1 000 的稀释比例加入各目的蛋白和内参蛋白(β -actin)一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,按 1:1 000 的稀释比例加入相应二抗,室温孵育 2 h;用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,加入 ECL 发光液适量,于暗室内曝光,使用 Image J 1.8.0 软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白的灰度比值作为目的蛋白的表达水平。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。每组实验至少重复 3 次。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,组间两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 GA 对细胞存活率的影响

不同浓度(100、200、300、400、500 μ mol/L)的 GA 处理 24 h 和 48 h 对 TE-1 细胞均有明显的抑制作用,且该抑制作用具有一定的浓度和时间依赖趋势。24 h 和 48

h 时, GA 的 IC_{50} 分别为 $(281.22 \pm 26.81) \mu\text{mol/L}$ 和 $(220.90 \pm 31.15) \mu\text{mol/L}$ 。结果见图 1。

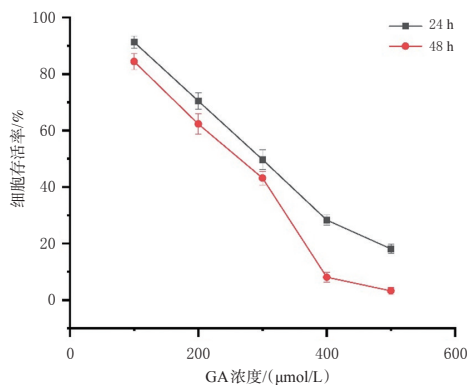


图 1 不同浓度 GA 处理 24 h 和 48 h 时 TE-1 细胞的存活率 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 GA 对细胞形态和细胞活性的影响

CCK-F 结果显示,随着 GA 浓度的增加,TE-1 细胞数量明显减少,且细胞形态发生明显变化;当 GA 浓度为 $500 \mu\text{mol/L}$ 时,TE-1 细胞排列稀疏,细胞体积缩小、变圆,细胞核固缩,染色质凝集。结果见图 2。

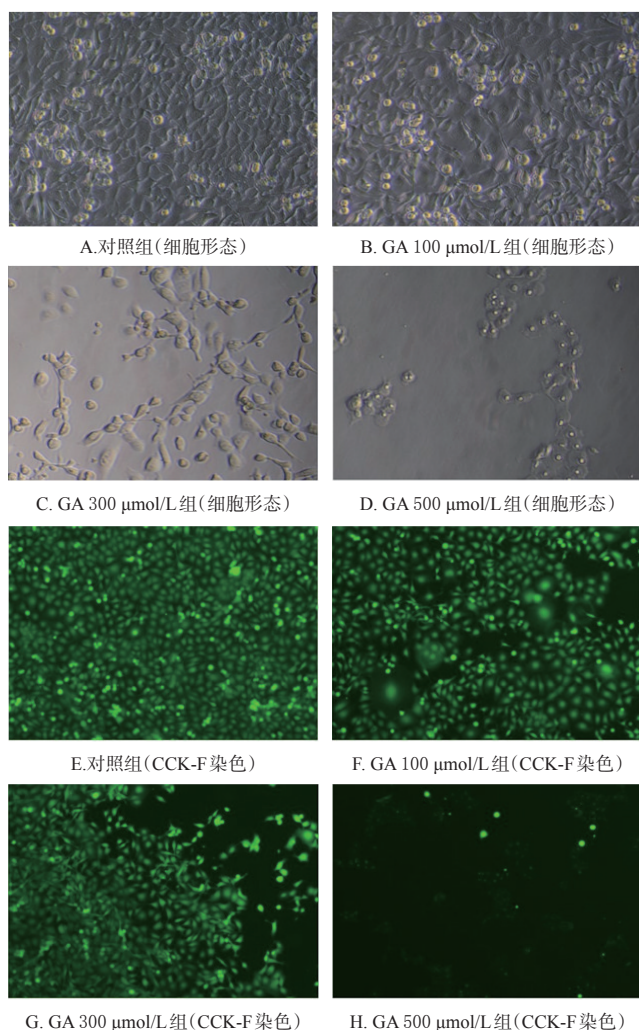


图 2 不同浓度 GA 作用于 TE-1 细胞后的细胞形态学图及 CCK-F 染色图 ($\times 200$)

3.3 GA 对细胞迁移的影响

对照组细胞的划痕面积随着时间的延长而不断缩小,在 24 h 时其相对划痕愈合率可达 $(62.31 \pm 2.41)\%$ 。随着 GA 浓度的增加,各给药组细胞的相对划痕愈合率均显著下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);当 GA 浓度为 $500 \mu\text{mol/L}$ 时,相对划痕愈合率为 $(6.71 \pm 1.33)\%$,且 GA 的抑制迁移作用有浓度依赖趋势。结果见图 3、图 4。

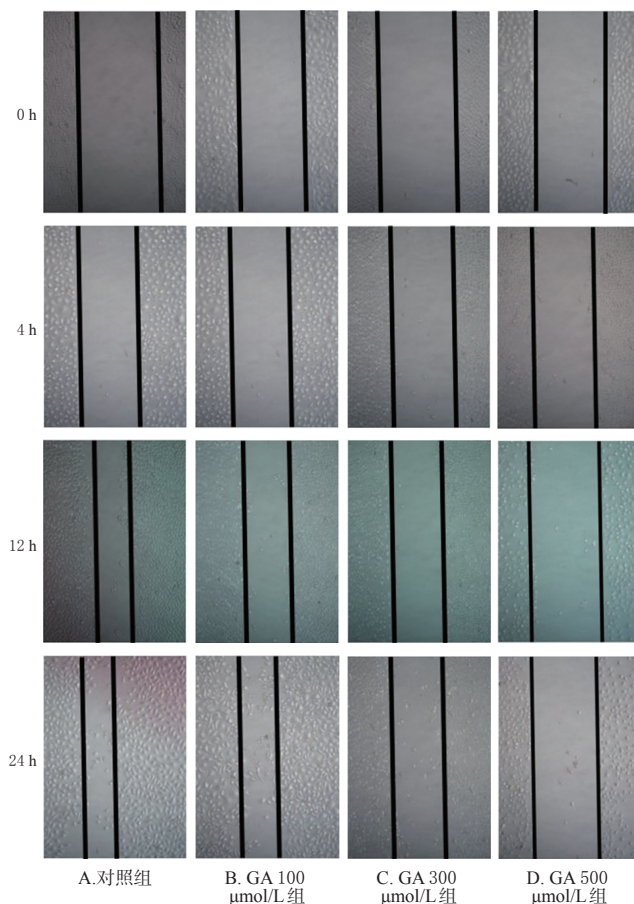
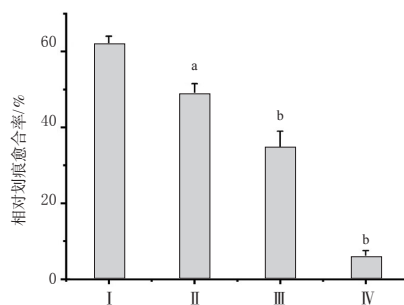


图 3 不同浓度 GA 作用于 TE-1 细胞的划痕面积图



I : 对照组; II : GA $100 \mu\text{mol/L}$ 组; III : GA $300 \mu\text{mol/L}$ 组; IV : GA $500 \mu\text{mol/L}$ 组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

图 4 不同浓度 GA 对 TE-1 细胞相对划痕愈合率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 GA 对细胞集落形成的影响

在培养 10 d 后,对照组存在大量肉眼可见的细胞集落;与对照组比较,各给药组细胞集落形成相对数量均显著减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且有随 GA 浓度增加而减少的趋势。结果见图 5、图 6。

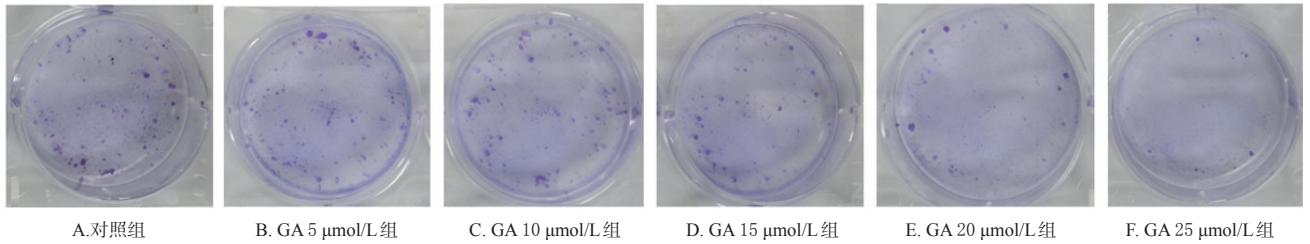
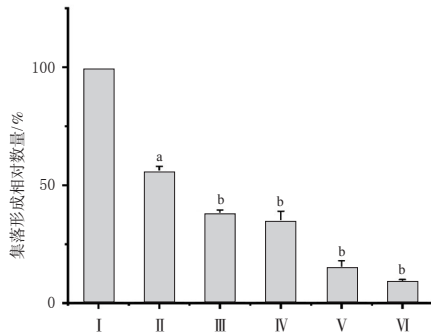


图5 不同浓度GA作用于TE-1细胞的集落数量图



I : 对照组; II : GA 5 μmol/L 组; III : GA 10 μmol/L 组; IV : GA 15 μmol/L 组; V : GA 20 μmol/L 组; VI : GA 25 μmol/L 组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

图6 不同浓度GA对TE-1细胞集落形成相对数量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.5 GA对细胞凋亡的影响

当TE-1细胞经不同浓度(100、300、500 μmol/L)的GA作用24 h后,其凋亡率分别为(6.21 ± 0.32)%、(12.59 ± 0.58)%和(15.41 ± 0.41)%,对照组TE-1细胞的凋亡率为(5.29 ± 0.28)%。与对照组比较,各给药组细胞的凋亡率均显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且有随着GA浓度增加而升高的趋势。结果见图7、图8。

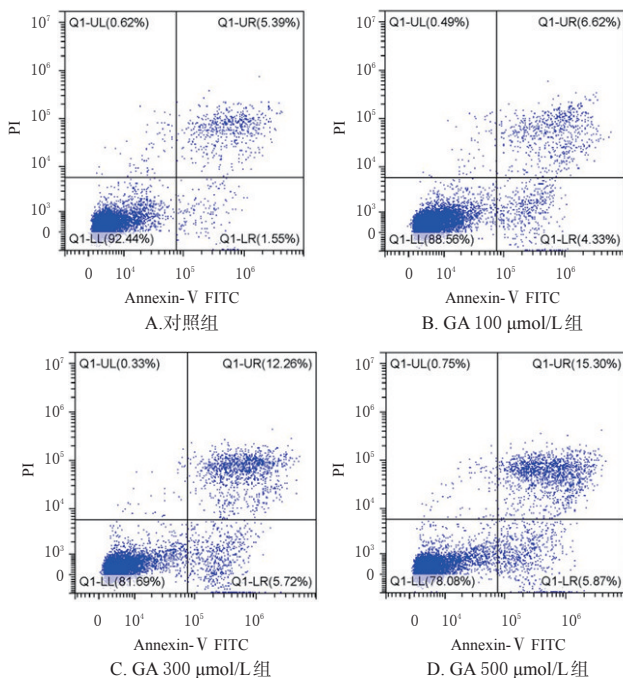
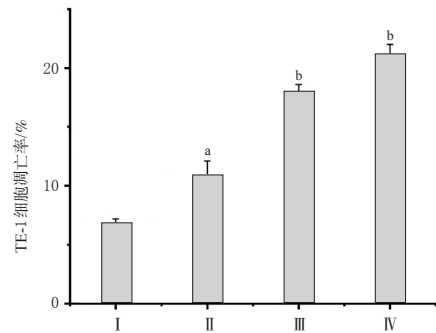


图7 不同浓度GA作用于TE-1细胞的凋亡图



I : 对照组; II : GA 100 μmol/L 组; III : GA 300 μmol/L 组; IV : GA 500 μmol/L 组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

图8 不同浓度GA对TE-1细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

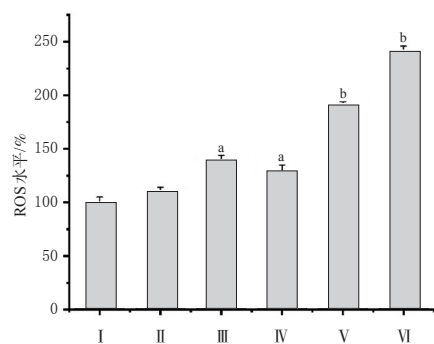
3.6 GA对细胞ROS水平的影响

经DCFH-DA染色后,与对照组比较,除100 μmol/L的GA外,其余给药组细胞的荧光强度和ROS水平均显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且均有随着GA浓度增加而升高的趋势。结果见表1、图9。

表1 不同浓度GA作用下TE-1细胞的ROS荧光强度($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	荧光强度	组别	荧光强度
对照组	10 701 ± 291	GA 300 μmol/L 组	12 913 ± 189 ^a
GA 100 μmol/L 组	9 895 ± 234	GA 400 μmol/L 组	19 269 ± 152 ^b
GA 200 μmol/L 组	13 948 ± 106 ^a	GA 500 μmol/L 组	23 343 ± 206 ^b

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

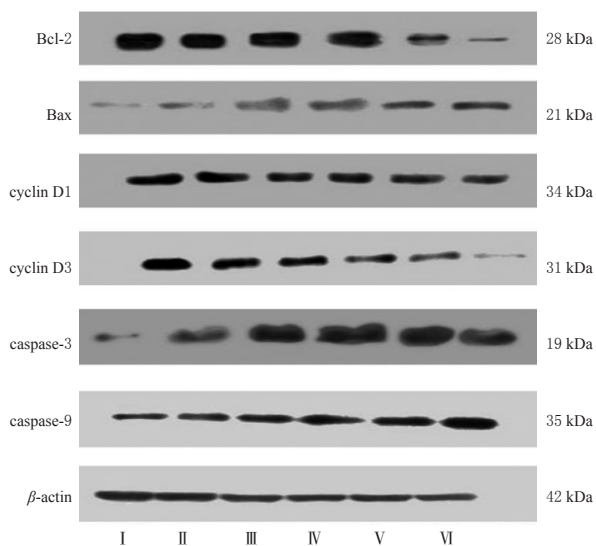


I : 对照组; II : GA 100 μmol/L 组; III : GA 200 μmol/L 组; IV : GA 300 μmol/L 组; V : GA 400 μmol/L 组; VI : GA 500 μmol/L 组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$

图9 不同浓度GA对TE-1细胞ROS水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.7 GA对细胞中Bax、Bcl-2、caspase-3、caspase-9、cyclin D3和cyclin D1蛋白表达的影响

与对照组比较,各给药组细胞中Bcl-2(仅GA 200 $\mu\text{mol/L}$ 组)、Bax(GA 100 $\mu\text{mol/L}$ 组除外)、caspase-3、caspase-9(GA 100 $\mu\text{mol/L}$ 组除外)的表达水平均显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$),Bcl-2(GA 100、200 $\mu\text{mol/L}$ 组除外)、cyclin D1、cyclin D3蛋白的表达水平均显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$),且均有一定的浓度依赖趋势。结果见图10、图11。



I: 对照组; II: GA 100 $\mu\text{mol/L}$ 组; III: GA 200 $\mu\text{mol/L}$ 组; IV: GA 300 $\mu\text{mol/L}$ 组; V: GA 400 $\mu\text{mol/L}$ 组; VI: GA 500 $\mu\text{mol/L}$ 组

图10 不同浓度GA对TE-1细胞Bcl-2、Bax、caspase-3、caspase-9、cyclin D1、cyclin D3蛋白表达影响的电泳图

4 讨论

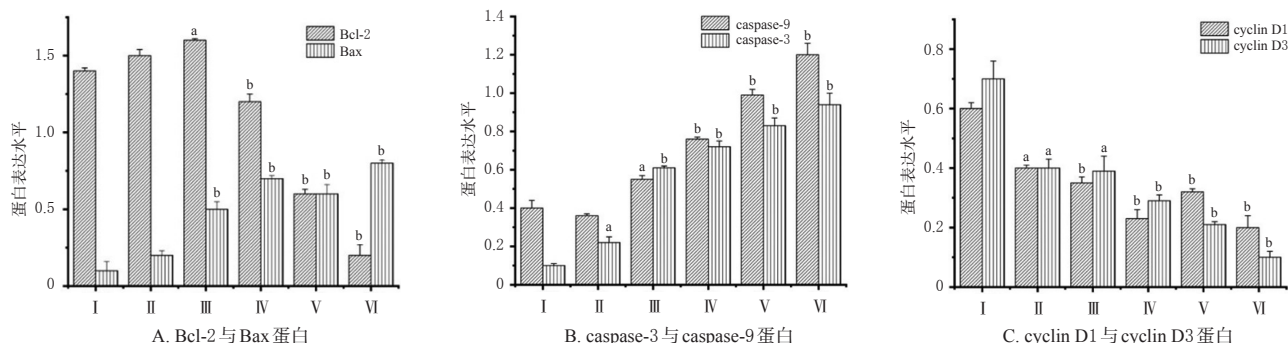
在我国,食管癌是较为高发的恶性肿瘤之一,由于其发病位置特殊、诱发因素较多、早期症状不明显、传统手术和化疗药物对患者伤害较大等诸多原因,使得其整体治疗水平尚未令人满意^[13]。

ROS形式多样,如超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢

(H_2O_2)、羟基自由基($\text{HO}\cdot$)等。在正常的代谢过程中,机体会不断产生ROS,后者会被一些抗氧化酶(如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶)和一些具有还原作用的小分子(如维生素C和还原型谷胱甘肽)所消耗,从而维持机体氧化与抗氧化的动态平衡^[14]。不同浓度的ROS对细胞有着不同的作用:高浓度的ROS会破坏质膜的完整性,影响actin骨架的动力学稳定性,造成DNA损伤,并导致正常的细胞信号转导机制受损;而低浓度的ROS可能会促进细胞的增殖和分化,并可能会诱导肿瘤发生^[15]。有研究指出,与正常组织细胞相比,肿瘤细胞处于较高的氧化还原状态,可通过提高肿瘤细胞的ROS水平来使其先于正常细胞达到ROS的死亡阈值;换言之,肿瘤细胞对ROS的敏感性高于正常细胞。这一特点使ROS对肿瘤细胞具有一定的选择性杀伤能力^[16]。范桂娟^[17]的研究也证实,在由白藜芦醇衍生物和Cu(II)构建的促氧化体系中,ROS对肝癌细胞HepG2的毒性显著高于正常细胞L02。

本研究发现,GA能明显抑制食管癌TE-1细胞的活动,并且呈一定的时间和剂量依赖趋势;划痕实验和集落形成实验结果显示,GA能够显著抑制TE-1细胞的集落形成能力和迁移能力,且其在较低浓度(5~25 $\mu\text{mol/L}$)就能体现较强的集落形成抑制能力。凋亡检测结果显示,GA处理24 h能明显提高TE-1细胞的凋亡水平,且有随着药物浓度增加而升高的趋势。

为了进一步探究GA诱导食管癌TE-1细胞的凋亡机制,本研究检测了经不同浓度GA处理后细胞中ROS水平的变化,结果显示,随着GA浓度的增加,TE-1细胞内的ROS水平也随之提高。随后的Western blot结果显示,与对照组比较,300~500 $\mu\text{mol/L}$ 的GA能使抗凋亡蛋白Bcl-2蛋白的表达水平显著降低,200~500 $\mu\text{mol/L}$ 的GA能使促凋亡蛋白Bax蛋白的表达水平显著上升;同时,GA能够提高caspase-3、caspase-9的表达水平,降低cyclin D1、cyclin D3的表达水平,且有浓度依赖趋势。caspase家族是含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶的全



I: 对照组; II: GA 100 $\mu\text{mol/L}$ 组; III: GA 200 $\mu\text{mol/L}$ 组; IV: GA 300 $\mu\text{mol/L}$ 组; V: GA 400 $\mu\text{mol/L}$ 组; VI: GA 500 $\mu\text{mol/L}$ 组; a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与对照组比较, $P<0.01$

图11 不同浓度GA对TE-1细胞相关凋亡蛋白表达水平的影响

称,其中 caspase-9 可与细胞色素、凋亡酶激活因子形成复合物,从而激活 caspase-9;激活的 caspase-9 可再激活细胞凋亡的关键启动者 caspase-3,从而诱导后续的细胞凋亡^[18]。cyclin D1 和 cyclin D3 均为 cyclin 家族成员,其主要作用是对细胞周期进行正调控,促进细胞增殖,其中 cyclin D1 是细胞进入 G₁/S 期检测点的关键蛋白,其表达上调会导致 G₁/S 期检测点失效,从而造成细胞越过此检测点而直接进入 S 期,允许未经修复的突变 DNA 进行复制,最终增加癌症发生的风险^[19]。cyclin D1 和 cyclin D3 在不同组织中有着明显的表达差异,Yu 等^[20]研究发现,cyclin D1 的过量表达和胃癌的病理程度没有明显的相关性,但 cyclin D3 的表达却与胃癌恶性程度存在明显关联。

综上所述,GA 能够抑制 TE-1 细胞的增殖、迁移和集落形成,其机制可能是通过提高食管癌 TE-1 细胞内 ROS 的产生水平来启动凋亡,并通过上调 Bax、caspase-3、caspase-9 的表达和下调 Bcl-2、cyclin D1、cyclin D3 的表达来实现凋亡。本研究结果为阐明 GA 抑制食管癌的作用机制提供了一定的理论基础,然而将 GA 作为抗食管癌的特效药物并应用于临床,还需要大量深入研究以完善其具体的作用机制。

参考文献

[1] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020 全球癌症统计报告解读[J/OL]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2021,7(2): 1-14[2021-12-23]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFDLAST2021&filename=ZLZD20210-2001&uniplatform=NZKPT&v=bYntJ_LGNY0FGNw6V-bTxTFb0Nby28Lxtan-pBnc3ZW9rsvovCq5mw9_7Af8-HMmZ. DOI: 10.12151/JMCM.2021.02-01.

[2] DI PARDO B J, BRONSON N W, DIGGS B S, et al. The global burden of esophageal cancer: a disability-adjusted life-year approach[J]. *World J Surg*, 2016, 40(2): 395-401.

[3] 王宁,刘硕,杨雷,等. 2018 全球癌症统计报告解读[J/OL]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2019,5(1): 87-97[2021-12-23]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZLZD201901013&dbcode=CJFD&dbcode=CJFQ>. DOI: 10.12151/JMCM.2019.01-10.

[4] 赫捷,邵康. 中国食管癌流行病学现状、诊疗现状及未来对策[J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21(7): 501-504.

[5] 王国清,魏文强,乔友林. 食管癌筛查和早诊早治的实践与经验[J]. *中国肿瘤*, 2010, 19(1): 4-8.

[6] 国家卫生健康委员会. 食管癌诊疗规范: 2018 年版[J/OL]. *中华消化病与影像杂志(电子版)*, 2019, 9(4): 158-192[2021-12-23]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/>

<detail.aspx?filename=ZHYE201904006&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.

[7] 郭晓丹,宋京九,王东,等. 没食子酸及其衍生物的生理活性及研究现状[J]. *化学世界*, 2020, 61(9): 585-593.

[8] 汪莹莹. 没食子酸、并没食子酸的分离、性能及应用研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2012.

[9] ZHANG T X, MA L J, WU P F, et al. Gallic acid has anti-cancer activity and enhances the anticancer effects of cisplatin in non-small cell lung cancer A549 cells via the JAK/STAT3 signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1779-1788.

[10] HSU S S, CHOU C T, LIAO W C, et al. The effect of gallic acid on cytotoxicity, Ca²⁺ homeostasis and ROS production in DBTRG-05MG human glioblastoma cells and CTX TNA2 rat astrocytes[J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 252: 61-73.

[11] ZENG M L, SU Y, LI K Y, et al. Gallic acid inhibits bladder cancer T24 cell progression through mitochondrial dysfunction and PI3K/Akt/NF-κB signaling suppression[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1222.

[12] KHORSANDI K, KIANMEHR Z, HOSSEINMARDI Z, et al. Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 18.

[13] 梁好. 胃癌、食管癌的病因学研究 and 环境危险因素人群归因危险度的评价[D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.

[14] 熊珊珊, 石英英, 石汉平. 活性氧与肿瘤研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(13): 1045-1048.

[15] LAU A T Y, WANG Y, CHIU J F. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(2): 657-667.

[16] 朱春鹏. 基于 ROS 治疗肿瘤的关键问题: ROS 与其剂量效应的探讨[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.

[17] 范桂娟. 羧基肉桂酸、白藜芦醇衍生物和 Cu(II) 离子构建的促氧化体系在癌预防中的活性和机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2011.

[18] 余莹华, 徐志猛, 曾昊, 等. Caspase 家族与固有免疫关系研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2019, 50(5): 622-630.

[19] 卢梦玲, 闫超, 赖多, 等. Cyclin D1 与细胞周期调控[J]. *生物技术通报*, 2011(10): 55-59.

[20] YU J, MIEHLKE S, EBERT M P A, et al. Expression of cyclin genes in human gastric cancer and in first degree relatives[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2002, 115(5): 710-715.

(收稿日期: 2022-01-03 修回日期: 2022-04-15)

(编辑: 曾海蓉)