doi:10.11659/jjssx.03E021065

·基础研究·

# 白杨素对舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞活力、形态及凋亡的影响

林晨阳,许志亮,曾宾华,罗艳荣 (中国人民解放军联勤保障部队第九〇九医院耳鼻喉颌面外科,福建 漳州 363000)

[摘 要] **目的** 探讨白杨素对舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞活力、形态、凋亡的影响。**方法** 体外培养舌鳞状癌细胞 CAL-27,空白对照组不给予任何药物,DMSO 组以 0.1% DMSO 试剂处理,白杨素组给予不同浓度白杨素(1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 μmol/L)处理。MMT 法检测细胞活力,采用倒置显微镜观察细胞形态变化,TUNEL 法检测细胞凋亡,Western blot 印迹法检测凋亡蛋白(Bcl-2、Caspase-3)的表达情况。**结果** CAL-27 细胞经不同浓度白杨素处理 24 h 后,其细胞增殖活性被抑制;白杨素对 CAL-27 细胞形态存在显著影响,且凋亡小体数量增加;白杨素可促进 CAL-27 细胞凋亡($P<0.05$);白杨素可诱导 Bcl-2 表达显著下降及 Caspase-3 活性表达显著上升($P<0.05$)。**结论** 白杨素可以抑制舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞增长,降低细胞活力,调控细胞凋亡蛋白 Bcl-2、Caspase-3 活性的表达,促进细胞凋亡。

[关键词] 舌鳞状细胞癌;白杨素;细胞活力;细胞凋亡

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-03-17

## Effects of chrysin on viability, morphology and apoptosis of CAL-27 cells in tongue squamous cell carcinoma

LIN Chen-yang, XU Zhi-liang, ZENG Bin-hua, LUO Yan-rong (Department of Otolaryngology and Maxillofacial Surgery, 909th Hospital of Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Zhangzhou Fujian 363000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of chrysin on the viability, morphology and apoptosis of CAL-27 cells in tongue squamous cell carcinoma. **Methods** The tongue squamous carcinoma cell CAL-27 were cultured in vitro. The blank control group was not given any drugs, the DMSO group was treated with 0.1% DMSO reagent, and the chrysin group was treated with different concentrations of chrysin (1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μmol/L). The MMT method was used to detect the cell viability. The inverted microscope was used to observe the morphological changes of cells. The TUNEL method was used to detect the apoptosis of cells. And Western blot method was used to detect the expression of apoptotic proteins (Bcl-2, Caspase-3). **Results** The proliferation activity of CAL-27 cells was inhibited after treatment with different concentrations of chrysin for 24 hours. Chrysin had a significant effect on the morphology of CAL-27 cells and the number of apoptotic bodies was increased. Chrysin could promote the apoptosis of CAL-27 cells ($P<0.05$). Chrysin could induce a significant decrease in the expression of Bcl-2 and a significant increase in the expression of Caspase-3 activity ($P<0.05$). **Conclusion** Chrysin can inhibit the growth of CAL-27 cells in tongue squamous cell carcinoma, reduce the cell viability, regulate the expression of apoptotic proteins activities of Bcl-2 and Caspase-3, and promote the apoptosis.

**Keywords:** tongue squamous cell carcinoma; chrysin; cell viability; apoptosis

舌鳞状细胞癌是一种恶性肿瘤,常发病于口腔面部,其病因目前尚不清楚。长时间吸烟喝酒、日常不注意口腔卫生、长期异物饮食是需要注意的致病因素。鳞状细胞癌具有生长速度快、转移频率高、容易浸润等特征,是导致患者病情加重甚至死亡的重要原因[1-2]。因此,研究有效抗鳞状细胞癌生长、转移的药物具有重要意义。白杨素是从传统天然药物蜂胶以及中草药中提取的具有抗炎、抗氧化、抗恶性肿瘤等药理学作用的黄酮类化合物[3-4]。体内外研究证实,白杨素及其衍生物具有抑制癌细胞活力、诱导癌细胞凋亡的作用[5-6]。有研究发现,白杨素具有抑制舌鳞状细胞活力以及促进细胞凋亡的作用[7]。因此,本研究从细胞水平角度进行分析,观察白杨素对舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞活力、形态及凋亡的影响,以期为舌鳞状细胞癌的诊治提供分子基础方面的参考。

[通信作者] 罗艳荣,E-mail:125082243@qq.com

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

人口腔舌鳞状细胞 CAL-27 细胞系购自上海富盛实业有限公司;RPMI 1640 培养基购自友康恒业生物科技(北京)有限公司;白杨素、噻唑蓝溴化四唑(MTT)以及活性 Caspase-3 抗体购于美国 Sigma-Aldrich 公司;TUNEL 试剂盒、免疫染色固定液(P0098)、PBS 磷酸盐缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Bcl-2 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

### 1.2 MTT 法检测细胞活力

将对数生长期的 CAL-27 细胞接种于 96 孔板,加入不同浓度的白杨素(1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 μmol/L),并设置不做任何处理的空白对照组及以 0.1% DMSO 试剂处理的 DMSO 组,每组设立 5 个复孔。24 h 后,向每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL,以 PBS 配制)10 μL 继续孵育 4 h,培养结束后,将培养上清液小心吸出并丢弃,将 0.1% DMSO 试剂加入到每孔中,每孔 100 μL,振荡 10~15 min,直到结晶物充分溶解后,开始测定各孔光密度值(OD 值)。细胞生存率 =(白杨素各组 OD 值均数 - 空白对照组 OD 值均数)/(DMSO 组 OD 值均数 - 空白对照组 OD 值均数)×100%。

### 1.3 细胞培养及形态观察

将舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞系放置于 RPMI 1640 培养基中,将细胞浓度调整为 $1\times10^6$/mL,置于无菌恒温(37 ℃)培养箱中进行培育。将舌鳞状细胞癌CAL-27 分为空白对照组和白杨素组。空白对照组采用正常培养液培养,不加任何药物试剂;在 MTT 实验中,白杨素的 IC50 值为 10.27 μmol/L,因此,白杨素组细胞用 10.0 μmol/L白杨素连续处理 5 d,记作白杨素组。将空白对照组与白杨素组细胞放置于细胞培养箱中培养 30 min,然后使用倒置光学显微镜观察并记录。

### 1.4 TUNEL 法检测细胞凋亡

将实验培养所用的 CAL-27 贴壁细胞接种于载玻片上,药物处理分组如下:空白对照组、白杨素组(10.0 μmol/L),药物作用时间为 48 h。用 PBS 洗涤后,使用细胞固定剂对细胞进行免疫染色 30~60 min,用 PBS 洗涤,然后添加 TUNEL 检测液 100 μL,对细胞进行 1 h 避光培育,用 PBS 洗涤 1 次,用抗荧光淬灭封片液封片后在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

### 1.5 Western blot 印迹法检测 Bcl-2 及活性 Caspase-3 蛋白的表达

将对数生长期的 CAL-27 细胞接种到 6 孔板上,药物处理分组如下:空白对照组、白杨素组(10.0 μmol/L),药物作用时间为 48 h。将多余培养液全部吸走,PBS 预冷洗涤,在低温环境下加入裂解液对细胞进行裂解,充分裂解后,采集细胞裂解液进行离心,提取上清液,使用 BCA 蛋白定量方法测定蛋白浓度。取相同数量的蛋白和 10% SDS-PAGE 进行凝胶电泳,60 min后,将凝胶浸于转膜缓冲液 10 min 后移至 PVDF 膜,加入封闭剂封闭过夜,加入一抗(1∶1 000),4 ℃孵育过夜,回收一抗,TBST 溶液清洗膜 3 次,每次10 min;然后加入对应二抗(1∶2 000)孵育 30~60 min,PBS 清洗,然后显影。

### 1.6 统计学分析

数据运用 IBM SPSS Statistics 26.0 进行分析,以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组间比较采用 $t$ 检验,率的比较采用 $\chi^2$ 检验,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度白杨素对 CAL-27 细胞活力的影响

MTT 试验显示:CAL-27 细胞经不同浓度白杨素(1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 μmol/L)处理 24 h 后,其细胞增殖活性被抑制($P<0.05$);空白对照组与 DMSO 组的细胞增殖能力比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。白杨素的 IC50 值为 10.27 μmol/L,故采用浓度为10.0 μmol/L的白杨素用于后续实验。

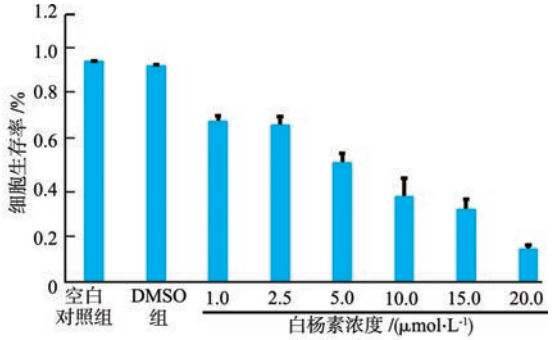



**图 1 各组 CAL-27 细胞活力比较**

### 2.2 细胞形态学改变

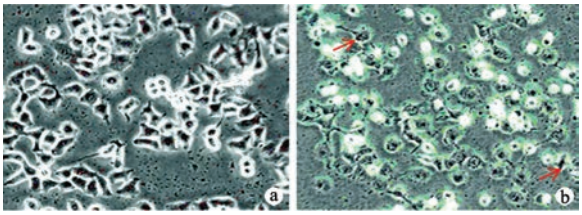
空白对照组,即正常舌细胞为梭型,较圆润,分散贴壁生长。白杨素组细胞较扁,体积明显增加,核分裂现象较多,48 h 后贴壁不佳,视野范围内可见少数凋亡小体,极少数细胞呈现固缩状态,悬于培养基中(图 2)。

### 2.3 白杨素对 CAL-27 细胞凋亡的影响

TUNEL 法检测细胞凋亡发现,10.0 μmol/L 白杨素显著促进 CAL-27 细胞凋亡($P<0.05$),而空白对照组与 DMSO 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。

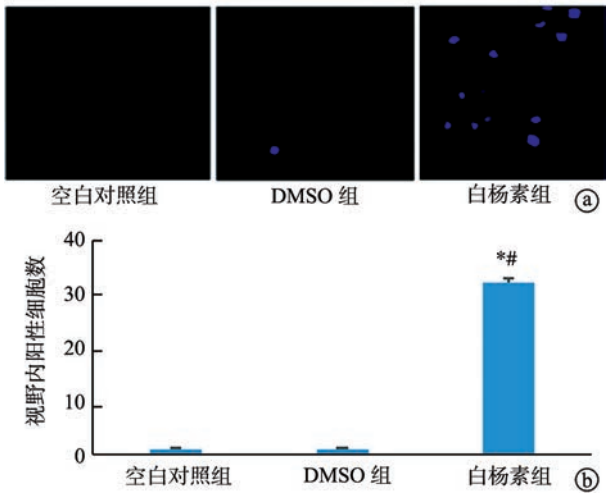
### 2.4 白杨素对 CAL-27 细胞的 Bcl-2 及 Caspase-3 表达的影响

Western blot 结果显示,白杨素可诱导 Bcl-2 表达显著下降及 Caspase-3 活性表达显著上升,但空白对照组与 DMSO 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4。



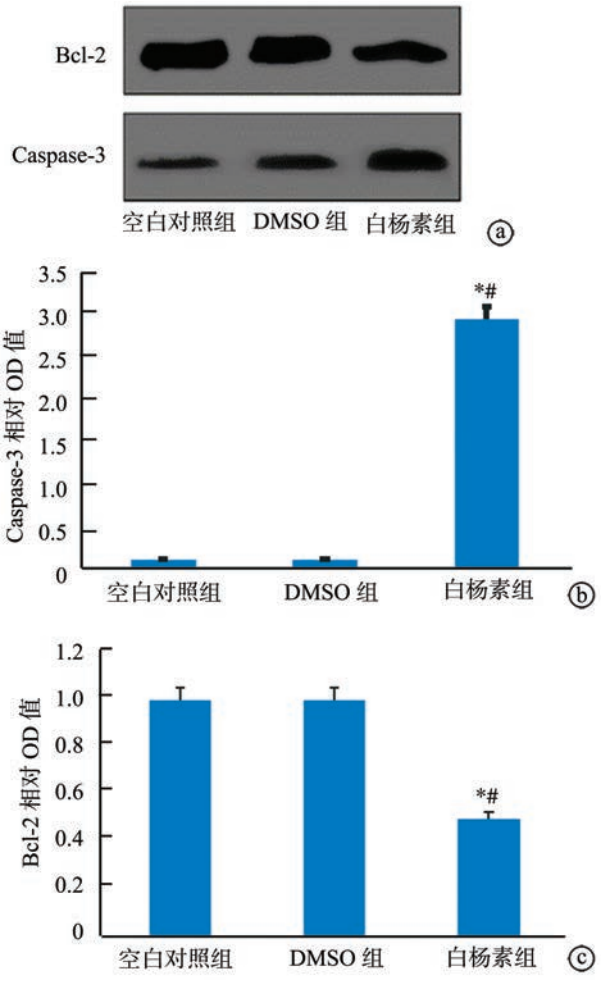

a:空白对照组;b:白杨素组

**图 2 倒置光学显微镜下细胞形态(×200)**




a:CAL-27 细胞凋亡情况;b:视野内阳性细胞数统计 *:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与 DMSO 组比较,$P<0.05$

**图 3 TUNEL 法检测细胞凋亡情况**




a:Western blot 检测 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达;b:Caspase-3 相对 OD 值;c:Bcl-2 相对 OD 值 *:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与 DMSO 组比较,$P<0.05$

**图 4 白杨素对 CAL-27 细胞的 Bcl-2 及 Caspase-3 表达的影响**

## 3 讨论

舌鳞状细胞癌常发生于人面部,除了手术切除,暂无其他合适的临床治疗手段,且手术前后仍需要进行持续的化疗和放疗。目前,临床使用的化疗、放疗不良反应大,许多患者在化疗、放疗过程中需承受巨大痛苦,且治疗效果不佳。因此,研究不良反应轻、易被大众接受的抗口腔鳞状细胞癌药物具有重要意义。白杨素是一种黄酮类化合物,具有明显的抗癌作用[8-11],可通过诱导癌细胞凋亡等途径实现抗癌作用,值得深入研究。

在细胞的凋亡机制中,处于非常核心地位的 Caspase 系列蛋白酶可以直接参与凋亡细胞的离散过程。而在细胞凋亡过程中,活性 Caspase-3 蛋白的表达和细胞凋亡程度紧密相关[12-15]。Bcl-2 蛋白则是另一类凋亡调控蛋白,与细胞凋亡也密切相关[16-19]。谢雅馨等[20]通过体外培养口腔鳞状细胞癌 KB 细胞研究白杨素对细胞凋亡的影响,发现白杨素能够显著抑制 KB 细胞增殖,诱导其凋亡,且随着白杨素浓度的增加,其抑制增殖及诱导凋亡的作用也会明显增强,提示白杨素抗口腔鳞状细胞癌作用明显,且其机制可能与诱导癌细胞凋亡相关。

本研究选取体外人工培养的舌鳞状细胞癌 CAL-27细胞作为实验对象,设立空白对照组和 DMSO 组,白杨素组给予 CAL-27 细胞不同浓度的白杨素提取物,采用 MTT 法检测细胞的生存率,发现 CAL-27 细胞经不同浓度白杨素(1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 μmol/L)处理 24 h 后,其细胞增殖活性逐渐被抑制,且浓度越高,被抑制的程度越明显,说明白杨素会导致 CAL-27 细胞活力降低,且具有剂量依赖性;采用倒置光学显微镜观察 CAL-27 细胞形态发现,空白对照组与白杨素组细胞有明显差异,同时白杨素组出现凋亡小体;TUNEL 检测时发现与空白对照组以及 DMSO 组比较,白杨素组凋亡细胞显著增多,说明白杨素可以诱导 CAL-27 细胞凋亡;Western blot 实验显示,白杨素可显著抑制 Bcl-2 的表达,增加 Caspase-3 活性表达,因此,可以初步判断,白杨素通过影响 Bcl-2 及 Caspase-3 活性表达对舌鳞状细胞癌的凋亡产生调控作用。结合上述实验结果,本研究初步证明了白杨素可影响舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞的存活和凋亡,但其具体的作用机制仍需要进一步探讨。

综上所述,白杨素可抑制舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞增殖,降低细胞活力,并通过调控细胞凋亡蛋白 Bcl-2、Caspase-3 表达,促进细胞凋亡。

## [参考文献]


[1] Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management[J]. Oral Oncol, 2003, 39(3): 213 - 221. doi: 10.1016/S1368 - 8375(02)00162 - 8.

[2] 樊燕青,孙兰池,李大鹏. 茯苓酸对舌鳞状细胞癌细胞 CAL-27 增殖、凋亡及细胞周期的影响[J]. 中成药,2021,43(7):1909 - 1914. doi:10.3969/j. issn. 1001 - 1528. 2021. 07. 043.

[3] Kasala ER, Bodduluru LN, Madana RM, et al. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives[J]. Toxicol Let, 2015, 233(2): 214 - 225. doi: 10. 1016/j. toxlet. 2015. 01. 008.

[4] 布威海丽且姆·阿巴拜科日,木塔力甫·艾买提,阿米尼姑丽·买买提,等. 新疆蜂胶提取物抗氧化活性及槲皮素和白杨素含量测定[J]. 生物技术通报,2013,29(2):163. doi:10. 13560/j. cnki. biotech. bull. 1985. 2013. 02. 016.

[5] Bahadori M, Baharara J, Amini E. Anticancer properties of chrysin on colon cancer cells, in vitro and in vivo with modulation of Caspase-3, -9, Bax and Sall4[J]. Iran J Biotechnol, 2016, 14(3): 177. doi: 10.15171/ijb. 1374.

[6] 李华珍. ADFMChR 通过活化 PPARγ 诱导人卵巢癌 CoC1 细胞凋亡作用的实验研究[D]. 衡阳:南华大学,2008.

[7] 李 霞,孙青奕,张卫东. 作用于 AP-1 信号转导通路的抗肿瘤天然产物[J]. 中国医药工业杂志,2020(3):305 - 315.

[8] 王秋亚,王烨娟,高锦红. 白杨素衍生物的合成及生理活性研究进展[J]. 化学研究,2011,22(1):96 - 103. doi:10. 14002/j. hxya. 2011. 01. 007.

[9] 胡乃华. 白杨素作为 DGKα/FAK 相互作用的新型抑制剂可抑制食管鳞状细胞癌的恶性转移[J]. 天然产物研究与开发,2021,33(7):1155.

[10] 何 宇. 白杨素通过促进 ROS 介导的 Akt/mTOR 通路失活在子宫内膜癌细胞中诱导自噬[D]. 合肥:安徽医科大学,2021.

[11] 徐 军,杨美林,仲崇琳. 白杨素 Mannich 衍生物的合成及其抗 IgE 介导Ⅰ型过敏反应活性研究[J]. 中国中医药科技,2021,28(2):203 - 207.

[12] Deng X, Zhao Z, Xiong S, et al. Synthesis and evaluation of antitumour activity in vitro and in vivo of chrysin salicylate derivatives[J]. Nat Prod Res, 2018, 32(18): 2178. doi: 10. 1080/14786419. 2017. 1371159.

[13] Ryu S, Lim W, Bazer FW, et al. Chrysin induces death of prostate cancer cells by inducing ROS and ER stress[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(12): 3786. doi: 10. 1002/jcp. 25861.

[14] Souers AJ, Leverson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets[J]. Nat Med, 2013, 19(2): 202 - 208. doi: 10. 1038/nm. 3048.

[15] Yoon TM, Kim SA, Lee DH, et al. EGR1 regulates radiation-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2015, 33(4): 1717 - 1722. doi: 10. 3892/or. 2015. 3747.

[16] Nile SH, Keum YS, Nile AS, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives[J]. J Bio chem Mol Toxicol, 2018, 32(1): e22002. doi: 10. 1002/jbt. 22002.

[17] 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. doi:10. 11665/j. issn. 1000 - 5048. 20190517.

[18] Lopez J, Tait SW. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within[J]. Br J Cancer, 2015, 112(6): 957 - 962. doi: 10. 1038/bjc. 2015. 85.

[19] 李世清,陈福敏,罗 君,等. 顺铂对结肠癌细胞株 Caco-2 增殖凋亡和 Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2015,23(9):1460 - 1464. doi:10. 11569/wcjd. v23. i9. 1460.

[20] 谢雅馨,彭小宁. 白杨素对口腔鳞状细胞癌 KB 细胞凋亡的影响及其机制[J]. 中南大学学报(医学版),2019,44(5):522 - 527. doi:10. 11817/j. issn. 1672 - 7347. 2019. 05. 008.


(编辑:贺绍梅)