



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.05.11

文章编号: 2095-1264(2025)05-0656-08

甘草查尔酮 A 通过激活线粒体依赖性凋亡途径 抑制结直肠癌 HT29 细胞增殖研究^{*}

耿宏伟^{1,4}, 贺介甫¹, 陈超爽⁴, 周腾飞⁴, 杨昊^{2,3*}

(¹内蒙古医科大学, 内蒙古呼和浩特, 010000; ²北京大学肿瘤医院内蒙古医院/内蒙古医科大学附属肿瘤医院放疗中心, 内蒙古呼和浩特, 010000; ³内蒙古医科大学放射物理与放射生物重点实验室, 内蒙古呼和浩特, 010000; ⁴解放军 92493 部队医院核医学肿瘤科, 辽宁葫芦岛, 125000)

摘要: **目的** 探讨甘草查尔酮 A(LCA) 对人结直肠癌 HT29 细胞凋亡的影响及相关分子机制。**方法** 通过 CCK-8 实验检测不同药物浓度处理不同时间后 HT29 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀), 并筛选出最佳药物浓度和时间。EdU 染色法检测 LCA 对细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术测定 LCA 对细胞凋亡的影响。Western blotting 检测 LCA 对细胞内凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达的影响, 透射电镜观察细胞线粒体结构变化。**结果** CCK-8 实验结果显示, 24、48、72 h 后, LCA 对 HT29 细胞的 IC₅₀ 值分别为 154.3、20.14、7.943 μmol·L⁻¹。筛选后分别选择 0、10、20、40 μmol·L⁻¹ 作为空白对照组(NC)、LCA 低(Low)、中(Middle)、高(High)浓度组, 处理 48 h 后用于后续实验。与对照组相比, LCA 组细胞 EdU 阳性率显著降低(P<0.001), 且浓度越高抑制效果越显著。流式结果显示, 随着药物浓度增加, 细胞凋亡率也增加(P<0.001)。Western blotting 结果显示, 与对照组相比, LCA 组 Bcl-2 蛋白表达显著降低(P<0.001), Bax 蛋白表达显著升高(P<0.05), 且药物浓度越高, Bcl-2、Bax 蛋白水平变化越明显, Bcl-2/Bax 比值降低越显著。透射电镜观察发现, LCA 组细胞线粒体变形肿胀, 嵴减少。**结论** LCA 可通过下调 Bcl-2、上调 Bax 蛋白诱导人结直肠癌 HT29 细胞凋亡, 并抑制其增殖。

关键词: 甘草查尔酮 A; 结直肠癌; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A

Licochalcone A inhibits proliferation of HT29 colorectal cancer cells by activating the mitochondria-dependent apoptotic pathway^{*}

GENG Hongwei^{1,4}, HE Jiepu¹, CHEN Chaoshuang⁴, ZHOU Tengfei⁴, YANG Hao^{2,3*}

(¹Inner Mongolia Medical University, Huhhot, 010000, Inner Mongolia, China; ²Department of Radiation Oncology, Inner Mongolia Campus of Peking University Cancer Hospital/the Affiliated Cancer Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhhot, 010000, Inner Mongolia, China; ³Key Laboratory of Radiation Physics and Biology of Inner Mongolia Medical University, Inner Mongolia Autonomous Region, Huhhot, 010000, Inner Mongolia, China; ⁴Department of Nuclear Medicine Oncology, 92493 Troop Hospital of the People's Liberation Army, Huludao, 125000, Liaoning, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of licochalcone A (LCA) on apoptosis in human colorectal cancer HT29 cells and to elucidate the underlying molecular mechanisms. **Methods** The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of LCA against HT29 cells at different time points (24, 48, 72 h) was determined using the CCK-8 assay. Based on these results, an optimal treatment duration of 48 h and LCA concentrations of 0, 10, 20, and 40 μmol·L⁻¹ were selected for subse-

^{*}基金项目:内蒙古医科大学平台建设项目(PIKY2023030);公立医院科研联合基金科技项目(2023GLLHO136);自治区卫生健康委 2023 年首府地区公立医院高水平临床专科建设科技项目(2023SGGZ114)。

作者简介:耿宏伟,女,硕士研究生,研究方向为肿瘤放射治疗。

^{*}通信作者:杨昊,男,医学博士,副教授,研究方向为肿瘤放射治疗。

quent experiments, designated as the blank control (NC), low-, middle-, and high-concentration groups, respectively. The inhibitory effect of LCA on cell proliferation was assessed by EdU staining. Apoptosis was measured by flow cytometry. The expression levels of apoptosis-related proteins, Bcl-2 and Bax, were analyzed by Western blotting. Morphological changes in mitochondria were observed using transmission electron microscopy. **Results** The IC_{50} values of LCA for HT29 cells were 154.3, 20.14, and 7.943 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ after 24, 48, and 72 hours of treatment, respectively. Compared to the control group, LCA treatment significantly reduced the EdU-positive rate in a dose-dependent manner ($P<0.001$). Flow cytometry confirmed that LCA induced apoptosis in a concentration-dependent fashion ($P<0.001$). Western blot analysis showed that LCA significantly downregulated Bcl-2 expression ($P<0.001$) and upregulated Bax expression ($P<0.05$), leading to a marked decrease in the Bcl-2/Bax ratio in a dose-dependent manner. Furthermore, transmission electron microscopy revealed characteristic mitochondrial damage in LCA-treated cells, including swelling, deformation, and a reduction in cristae. **Conclusion** Licochalcone A suppresses proliferation and induces apoptosis in human colorectal cancer HT29 cells, potentially through a mitochondrial pathway involving the regulation of Bcl-2 and Bax expression.

Keywords: Licochalcone A; colorectal cancer; cell apoptosis; Bcl-2; Bax

0 前言

结直肠癌是临床上常见的消化系统恶性肿瘤之一,发病率居所有癌症第三位,死亡率居第二位,严重威胁人类生命健康^[1]。目前,结直肠癌的治疗仍以手术为主,但术后转移复发率高,而辅助放疗及抗血管生成治疗等可能因部分患者发生耐药而导致治疗效果不佳甚至无效^[2-4],晚期转移性结直肠癌的5年生存率仅14%^[5]。因此,进一步探究结直肠癌的发病机制,寻找更有效的治疗手段来提高患者的治愈率和长期生存率至关重要。中医作为一种补充和替代治疗方式,具有可缓解症状、调节免疫功能、提高生活质量,且副作用小的独特优势,已经成为一种重要的癌症辅助治疗方式^[6-7]。在晚期结直肠癌的治疗中,中药无论是单独应用还是与化疗药物联合使用,均展现出了积极的治疗潜力,为患者开辟了新的治疗途径^[8]。近年来,随着对传统中药的深入研究与探索,许多中药成分已被发现具有治疗肿瘤的潜力。作为天然药物,中药具有药性温和、低毒、高效及逆转多药耐药等优势^[9]。甘草为豆科多年生草本植物,是世界上历史最悠久、使用最广泛的中草药之一。其不仅具备益气补中、止咳化痰、抗炎等多种功效,还在抗肿瘤方面展现出了一定潜力^[10]。因其药性温,能调和百药,解百药之毒,在中药中享有“众药之王”“国之药老”等美誉^[11-12]。甘草查尔酮A(Licochalcone, LCA)即是从甘草根部提取的一种黄酮类化合物,因其具有良好的抗肿瘤效果而逐渐受到广泛关注和重视。研究表明,LCA可以通过调节凋亡相关蛋白表达诱导

肿瘤细胞发生凋亡,从而发挥抗肿瘤作用^[13-14]。LCA还可以影响细胞周期相关蛋白的表达,导致细胞周期停滞在 G_2/M 期,进而抑制肿瘤细胞的增殖^[15]。此外,LCA还能够下调肿瘤细胞表面程序性死亡受体配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)的表达,从而抑制肿瘤细胞与T细胞表面程序性死亡受体1(Programmed Death 1, PD-1)结合,降低肿瘤细胞逃避免疫系统攻击的可能性,通过增强免疫应答来提升抗肿瘤效果^[16]。

诱导细胞凋亡是LCA发挥抗肿瘤活性的重要途径之一。研究表明,LCA能够调控凋亡相关蛋白,如Bcl-2和Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X, Bax)的表达,并通过靶向p38 MAPK信号通路诱导食管癌、鼻咽癌和肺癌细胞发生凋亡^[17-19]。细胞凋亡是指在生理或病理条件下,细胞通过一种程序化、受控的方式自主死亡,这一过程通常由Bcl-2家族蛋白、Caspase蛋白、PD-1/PD-L1及凋亡抑制因子等多种分子介导。近年来,诱导肿瘤细胞凋亡已成为治疗多种癌症的重要策略^[20]。目前,关于LCA通过介导线粒体凋亡途径抑制结直肠癌发生发展的相关研究和报道较少。本研究拟探讨LCA对结直肠癌HT29细胞的影响及其作用机制,以期为LCA的临床应用提供依据和支持。

1 材料

1.1 细胞株

人结直肠癌HT29细胞系购于北京北纳创联生物技术研究院。

1.2 药物与试剂

LCA(批号:DSTDG001201, HPLC测定质量分

数 $\geq 98\%$,规格:20 mg)购自德思特生物技术有限公司。CCK8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(批号:C0009S)购自上海碧云天生物技术有限公司;EdU 试剂盒(批号:E-CK-A376)购自 Elabscience 公司;4%多聚甲醛固定液(批号:P0099)购自上海碧云天生物技术有限公司;Bax 抗体(批号:ab32503)、Bcl-2 抗体(批号:ab182858)、 β -actin 抗体(批号:ab8227)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号:ab7090)均购自美国 Abcam 公司。

1.3 主要仪器

酶标分析仪(型号:DNM-9602)购自北京普朗新技术有限公司;荧光显微镜(型号:BH2-RFCA)购自日本 OLYMPUS 公司;倒置显微镜(型号:SOPTOP OD630K)购自上海舜宇恒平科学仪器有限公司;流式细胞仪(型号:E97501093)购自美国 BD Biosciences 公司, DYCZ-24DN 型垂直电泳装置购自北京市六一仪器厂;DK-8B 型电热恒温水槽购自上海精宏实验设备有限公司;HT7700 透射电子显微镜购自日本日立公司。

2 方法

2.1 细胞培养

HT29 细胞株经液氮复苏后,接种于含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 1% 青霉素-链霉素溶液(双抗)的高糖 DMEM 培养基中。置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养,待细胞生长至对数期进行实验。

2.2 CCK-8 测定 LCA 对细胞增殖的影响

取对数生长期细胞,经胰酶消化、离心后,重悬于培养基中制备细胞悬液,接种至 96 孔板,每组设 6 个复孔。待细胞贴壁后,加入含不同浓度(0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)LCA 的培养基,并分别在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24、48 和 72 h。在各时间点使用 Hank's 平衡盐缓冲液(Hank's balanced salt solution, HBSS)洗涤细胞 3 次,加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 4 h。随后使用酶标仪在 490 nm 波长处测定每孔的吸光度(A 值)。细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。基于吸光度进一步计算 LCA 对 HT29 细胞的半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC₅₀),并确定最佳药物干预浓度与处理时间。

2.3 EdU 实验检测细胞增殖

取对数生长期细胞接种至 24 孔板,待细胞完全贴壁后,加入 EdU 工作液,继续在培养箱中孵育 2 h。孵育结束后,用 4% 甲醛固定 40 min。吸去甲醛后,用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次,每次 5 min。去除洗涤液后,每孔加入 1 mL 含 0.3% Triton X-100 的 PBS,室温下进行通透处理 20 min。配制 Click 反应液,通透处理结束后,每孔加入 500 μL Click 反应液,室温避光孵育 30 min。吸去反应液后,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。随后加入 500 μL DAPI 工作液,避光孵育 5~10 min。弃去上清液后,再次用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。最后,用封片剂封片,并通过荧光显微镜进行观察和拍照记录。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组细胞,以 $5 \times (10^4 \sim 10^5)$ 个细胞重悬于适量培养基中,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃去上清液,加入 500 μL 1 \times Binding Buffer 轻轻重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀,室温避光孵育 15 min。孵育结束后,加入 10 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液,混匀后,继续室温避光孵育 10~20 min。最后,将样本置于冰浴中,使用流式细胞仪进行检测。

2.5 Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达

在细胞中加入相应浓度(0、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 LCA 溶液,培养 48 h 后,每孔加入 300 μL RIPA 裂解液裂解细胞,提取蛋白质,并通过 Bradford 法进行蛋白定量。配制 SDS-PAGE 10% 下层聚丙烯酰胺凝胶与 5% 上层聚丙烯酰胺凝胶,加载等量蛋白样品进行电泳分离。电泳结束后,将目标蛋白转移至 PVDF 膜,置于含 5% 脱脂奶粉的封闭液中,室温封闭 2 h。随后,加入相应一抗(Bcl-2、Bax),4 °C 孵育过夜。次日,加入同源二抗,室温孵育 1.5 h。膜用显色剂处理 30 s,随后置于曝光盒中,暗室曝光 1 min。显影、定影后,用扫描仪扫描胶片图像,并分析各组蛋白条带的相对亮度值。以对照组为标准绘制相应柱状图。

2.6 透射电子显微镜观察线粒体结构

各组细胞经 2.5% 的戊二醛固定 3~4 h 后,磷酸漂洗液漂洗 3 次,每次 15 min。漂洗结束后经 1% 锇酸室温固定 2 h,再漂洗 3 次。随后用不同浓度梯度酒精进行脱水,每次 15 min。渗透过夜后包埋,常规切片,经醋酸双氧铀及柠檬酸铅染色后室温干燥过夜。透射电镜观察各组细胞线粒体结构,拍片。

2.7 统计学方法

采用 Graphpad 6 统计软件进行数据处理, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 LCA 对 HT29 细胞存活率的影响

本研究评估了不同浓度 LCA 对 HT29 细胞存活率的影响, 并进一步确定了药物的 IC₅₀ 值。实验结

果表明, 随着 LCA 浓度的增加及处理时间的延长, HT29 细胞存活率下降。经过 24、48 和 72 h 处理后, LCA 对 HT29 细胞的 IC₅₀ 值分别为 154.3、20.14、7.943 μmol·L⁻¹ (图 1)。我们根据 IC₅₀ 值选择了适宜的培养浓度和时间, 即设置培养时长为 48 h, 并选择接近 IC₅₀ 值的 20 μmol·L⁻¹ 作为中浓度, 以其 1/2 和 2 倍分别作为低浓度 (10 μmol·L⁻¹) 和高浓度 (40 μmol·L⁻¹), 同时将 0 μmol·L⁻¹ 作为空白对照组用于后续实验。

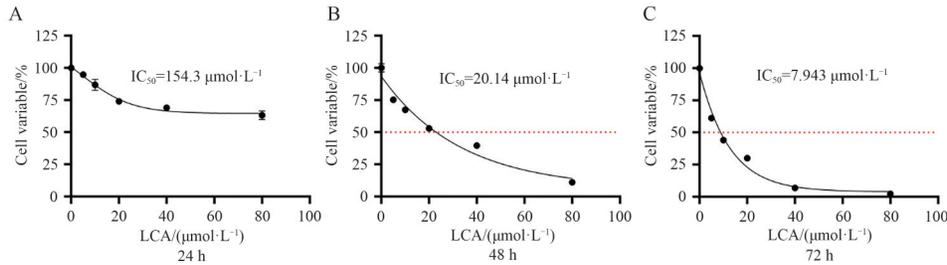


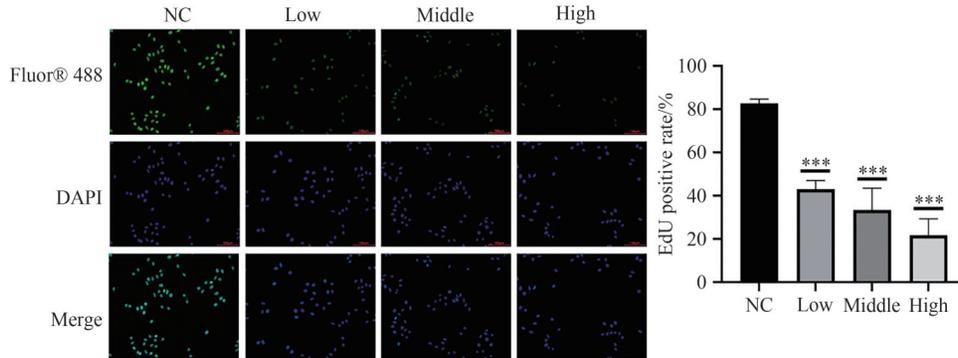
图 1 LCA 对结直肠癌细胞的 IC₅₀ 值

Fig. 1 IC₅₀ values of LCA in colorectal cancer cells

3.2 LCA 显著抑制 HT29 细胞增殖

EdU 实验结果显示, 与空白对照组比较, LCA

低、中、高浓度组 EdU 染色阳性率均显著下降 (P<0.001), 且具有明显的剂量依赖性 (图 2)。



注: 与对照组比较, ***P<0.001。

Note: Compared with the control group, ***P<0.001.

图 2 EdU 实验检测各组细胞增殖能力

Fig. 2 EdU assay to test the proliferation ability of various cell groups

3.3 LCA 对 HT29 细胞凋亡的影响

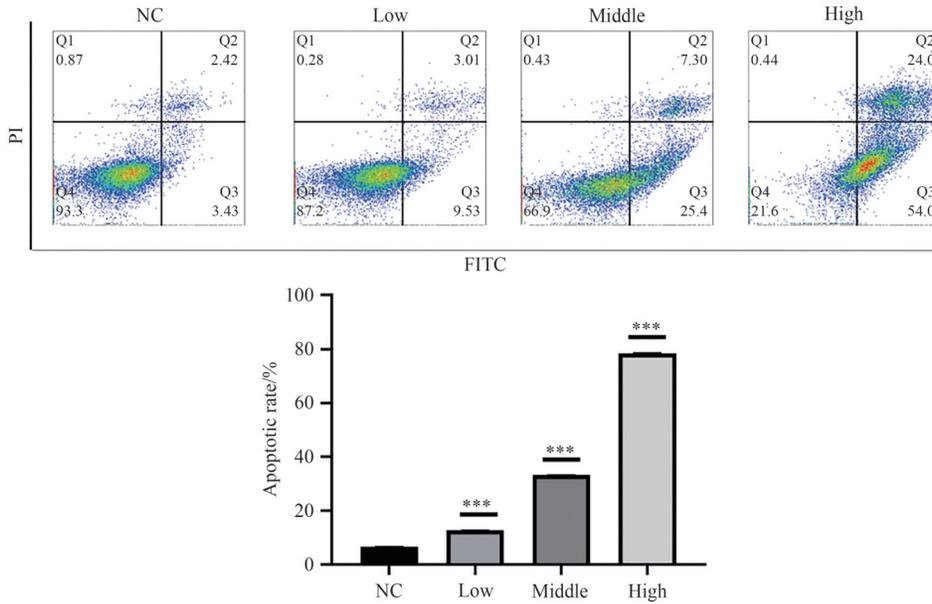
流式细胞术结果显示, 与对照组相比, LCA 组 HT29 细胞凋亡率显著升高, 且药物浓度的增加与凋亡率呈明显正相关 (P<0.001) (图 3)。处理 48 h 后, 各组细胞凋亡率分别为: 对照组 (6.65±0.08)%、低浓度组 (12.77±0.08)%、中浓度组 (33.21±0.08)%、高浓度组 (78.43±0.16)%, 提示 LCA 能够有效诱导 HT29 细胞凋亡, 且作用呈浓度依赖性, 进一步支持了 LCA 作为潜在抗肿瘤药物的应用前景。

3.4 LCA 对 HT29 细胞凋亡相关蛋白的影响

Western blotting 结果显示, 与对照组相比, LCA 组 Bax 蛋白表达均显著升高 (P<0.05), 而 Bcl-2 蛋白表达均显著下降 (P<0.001), 且两种蛋白在 LCA 浓度为 20、40 μmol·L⁻¹ 时变化更为显著 (图 4), 表明 LCA 可能通过调控 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达诱导 HT29 细胞凋亡。

3.5 LCA 对 HT29 细胞线粒体的影响

透射电镜观察结果显示, 图像中箭头所指示区

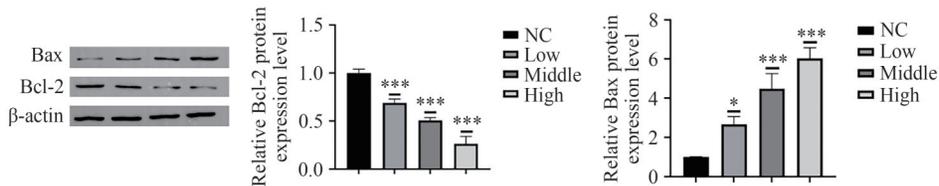


注:与对照组比较,*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

图3 流式细胞术检测 HT29 细胞凋亡率

Fig. 3 The apoptosis rate of HT29 cells was measured by flow cytometry.



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$.

图4 Western blotting 检测各组 HT29 细胞中 Bcl-2、Bax 的蛋白表达水平

Fig. 4 Detection of Bcl-2 and Bax protein expression levels in HT29 cells by Western blotting

域为线粒体及其对应的放大结构。对照组细胞线粒体形态较为规整,结构完整。与对照组相比,经 LCA 处理后,低、中、高浓度组细胞的线粒体均出现

不同程度的改变,包括线粒体肿胀、膜嵴减少及形态不规则等(图 5),提示 LCA 可能通过损伤线粒体结构干扰线粒体功能,从而促进 HT29 细胞凋亡。

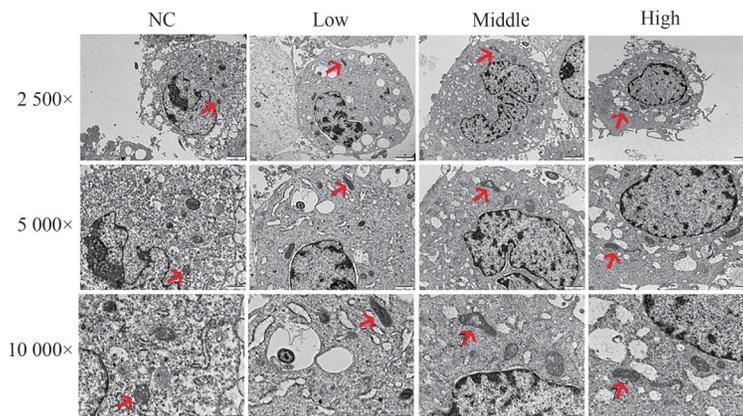


图5 透射电镜下细胞线粒体结构

Fig. 5 Mitochondrial structure of various cell groups under transmission electron microscopy

4 讨论

近年来,随着经济的快速发展及人们生活方式和饮食习惯的变化,结直肠癌的发病率和死亡率在我国呈持续上升趋势^[21]。因此,积极寻找直肠癌的高效治疗方法十分重要。在结直肠癌的治疗过程中,中医药展现出了显著疗效。中医理论认为,结肠癌属于“肠风脏毒”“下痢”等范畴,多数是由人体正气虚弱,无力抗邪,导致淤、气、毒滞留结肠,日久形成“肠风脏毒”。中药在预防和治疗结直肠癌方面有着悠久的历史,可行气活血、祛瘀散结、健脾固泄,在对抗结直肠癌方面具有极好的潜力。中医药通过调节肠道微生物的组成、分布及其代谢产物,改善肠道微环境,促进益生菌功能增强,从而为抗肿瘤治疗提供有利的生理基础。中药成分在这一过程中发挥了生物调节作用,优化肠道菌群的平衡,并通过这一机制增强抗肿瘤药物的疗效^[22-23]。研究表明,中医药及其成分可以有效阻断细胞周期的关键调控点,抑制结直肠癌细胞增殖并诱导其凋亡,还能够促进细胞自噬,进一步抑制肿瘤生长^[24]。中医药与放疗和化疗联合应用时,能够增强放化疗的抗肿瘤效果,同时显著减轻由治疗引起的毒副作用,延长结直肠癌患者的生存期^[25-26]。

甘草作为传统中药材之一,应用历史悠久。LCA 是从甘草根中提取的黄酮类化合物,具有抗炎、抗过敏、抗肿瘤等多种药理活性^[27-29]。LCA 可以通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活减少 TNF、IL-1、IL-6 等炎症因子的产生,发挥抗炎作用^[30]。LCA 还可以减少 NO 和前列腺素 E2 的产生,延缓慢性炎症的进展^[31]。研究表明,LCA 可通过下调 Bcl-2 蛋白表达促进细胞色素 C (cytochrome C, CytC) 的释放和 Caspases 3 的活化,最终引起 PARP-1 的裂解,从而诱导乳腺癌细胞凋亡^[32]。LCA 通过调节 CyclinA、CyclinB 等蛋白的表达阻断食管癌细胞从 G₂ 期进入 M 期,抑制食管癌进展^[17]。LCA 还能够通过抑制酪氨酸酶的活性起到保护皮肤、防止皮肤老化的功效^[33]。总之,LCA 具有广泛的药理学作用,对多种疾病的治疗具有潜在应用价值。

目前关于 LCA 治疗结直肠癌的研究较少。有研究发现,LCA 能够通过增加细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的水平诱导结直肠癌细胞凋亡,并下调 PD-L1 的表达,抑制结直肠癌细胞增殖^[34-35]。LCA 在结直肠癌治疗中的具体作用机制尚

不完全明确。为进一步探讨其作用机制,本研究通过体外实验评估了 LCA 对结直肠癌 HT29 细胞的影响。结果显示,随着 LCA 浓度和处理时间的增加,HT29 细胞存活率显著下降。EdU 实验结果表明,LCA 浓度越高,细胞增殖能力越弱。流式细胞术分析表明,HT29 细胞经 LCA 处理后均有不同程度的凋亡,当药物浓度为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞凋亡率最高。上述结果表明,LCA 能够有效抑制 HT29 细胞增殖,其抑制作用可能通过激活特定的细胞凋亡途径实现。

细胞凋亡通常分为外源性和内源性两条主要途径。在内源性凋亡途径中,细胞遭受诸如药物、DNA 损伤或缺氧等内在刺激时,通过线粒体介导的机制启动凋亡,而 Bcl-2 家族蛋白在此过程中发挥着关键调节作用^[36]。当接收到凋亡信号时,Bcl-2 家族中促凋亡蛋白发挥作用,使线粒体膜电位降低、外膜通透性增加,随后局限于内外膜间隙的 CytC 和其他促凋亡因子释放到细胞质中,从线粒体中释放的 CytC 与 Apaf-1 结合,形成凋亡复合体,进而激活 Caspase-9,触发下游 Caspase 级联反应,最终导致细胞死亡^[37]。Bcl-2 家族可以分为两大类:一类可抑制凋亡,如 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-W 等;另一类可促进凋亡,如 Bax、Bak 等^[38]。这些家族成员通过控制线粒体外膜通透性来调节细胞凋亡。抗凋亡蛋白通常在线粒体外膜上发挥抑制凋亡因子释放的作用^[39]。而促凋亡蛋白则通过寡聚化形成复合物,与线粒体外膜结合,促进凋亡因子释放,从而启动细胞凋亡程序^[40]。由此可见,Bcl-2 家族蛋白在线粒体凋亡途径中起到了“凋亡开关”的作用。细胞是否发生凋亡的关键在于促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白之间的平衡,当 Bcl-2/Bax 比值下降时,细胞发生凋亡,反之凋亡受到抑制^[41-42]。本研究中,HT29 细胞经 LCA 处理后促凋亡蛋白 Bax 表达水平显著升高,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平则显著下降,从而导致 Bcl-2/Bax 比值显著降低。此外,药物浓度的增加进一步增强了这种效应,表明 LCA 处理可引发 Bcl-2 家族蛋白表达失衡,进而推动细胞凋亡的发生。透射电子显微镜观察结果也表明,LCA 组细胞的线粒体结构发生了明显改变,表现出线粒体肿胀、内膜结构紊乱等典型的凋亡特征,进一步支持 LCA 通过线粒体途径诱导凋亡的推测。

综上所述,本研究通过体外实验验证了 LCA 能够抑制 HT29 结直肠癌细胞增殖,并通过调节 Bcl-2、

Bax 蛋白表达激活线粒体依赖的凋亡途径,这可能是 LCA 发挥抗结直肠癌作用的关键机制。这一发现为 LCA 在结直肠癌治疗中的应用提供了新的理论依据,提示其作为一种潜在抗肿瘤药物具有重要的临床应用前景。然而,本研究仍存在一些不足之处。本实验仅基于 HT29 细胞系对 LCA 的抗肿瘤效果进行了验证,未在其他结直肠癌细胞及动物模型中进一步验证,也未全面评估 LCA 在体内的抗肿瘤效果及安全性。未来的研究应着重于动物实验中的验证、不同肿瘤细胞系的筛选,以及 LCA 与其他治疗方式联合应用的可能性,为结直肠癌的治疗提供更加有效的策略。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] ZHANG C, STAMPFL-MATTERSBERGER M, RUCKSER R, et al. Kolorektales Karzinom [J]. Wien Med Wochenschr, 2023, 173(9): 216–220. DOI: 10.1007/s10354-022-00975-6.
- [3] HUANG X X, KE K, JIN W W, et al. Identification of genes related to 5-fluorouracil based chemotherapy for colorectal cancer [J]. Front Immunol, 2022, 13: 887048. DOI: 10.3389/fimmu.2022.887048.
- [4] 蒋海涛, 许阳贤. 抗血管生成靶向药物在治疗结直肠癌的耐药机制研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2025, 30(2): 193–199. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2025.02.005.
- [5] SHIN A E, GIANCOTTI F G, RUSTGI A K. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics [J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(4): 222–236. DOI: 10.1016/j.tips.2023.01.003.
- [6] ZHANG X Y, QIU H, LI C S, et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer [J]. Biosci Trends, 2021, 15(5): 283–298. DOI: 10.5582/bst.2021.01318.
- [7] CHEN J F, WU S W, SHI Z M, et al. Traditional Chinese medicine for colorectal cancer treatment: potential targets and mechanisms of action [J]. Chin Med, 2023, 18(1): 14. DOI: 10.1186/s13020-023-00719-7.
- [8] MA S C, ZHANG J Q, YAN T H, et al. Novel strategies to reverse chemoresistance in colorectal cancer [J]. Cancer Med, 2023, 12(10): 11073–11096. DOI: 10.1002/cam4.5594.
- [9] LIAO Y L, GUI Y, LI Q Z, et al. The signaling pathways and targets of natural products from traditional Chinese medicine treating gastric cancer provide new candidate therapeutic strategies [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(6): 188998. DOI: 10.1016/j.bbcan.2023.188998.
- [10] 杨必乾, 何昱洁, 何慧明, 等. 甘草中三萜皂苷类成分抗肿瘤及联合抗肿瘤机制研究进展[J]. 中医药导报, 2024, 30(1): 106–110, 116. DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2024.01.022.
- [11] 王晓敏, 张芳红, 郭红云, 等. 甘草查尔酮 B 抗肿瘤、抗炎及抗病毒作用研究进展[J]. 甘肃医药, 2023, 42(10): 865–867. DOI: 10.15975/j.cnki.gsy.2023.10.002.
- [12] LI M T, XIE L, JIANG H M, et al. Role of licochalcone a in potential pharmacological therapy: a review [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 878776. DOI: 10.3389/fphar.2022.878776.
- [13] FAN Y, LING Y, ZHOU X, et al. Licochalcone a ameliorates cognitive dysfunction in an Alzheimer's disease model by inhibiting endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis [J]. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2025, 38(3): 201–213. DOI: 10.1177/08919887241295730.
- [14] LI Y H, ZHAO M T, LIN Y, et al. Licochalcone A induces mitochondria-dependent apoptosis and interacts with venetoclax in acute myeloid leukemia [J]. Eur J Pharmacol, 2024, 968: 176418. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176418.
- [15] SEO J, LEE D E, KIM S M, et al. Licochalcone a exerts anti-cancer activity by inhibiting STAT3 in SKOV3 human ovarian cancer cells [J]. Biomedicines, 2023, 11(5): 1264. DOI: 10.3390/biomedicines11051264.
- [16] YUAN L W, JIANG X M, XU Y L, et al. Licochalcone A inhibits interferon-gamma-induced programmed death-ligand 1 in lung cancer cells [J]. Phytomedicine, 2021, 80: 153394. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153394.
- [17] LIU J, DENG L Y, WANG L Y, et al. Licochalcone A induces G₂/M phase arrest and apoptosis via regulating p53 pathways in esophageal cancer: *in-vitro* and *in-vivo* study [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 958: 176080. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.176080.
- [18] CHUANG C Y, TANG C M, HO H Y, et al. Licochalcone A induces apoptotic cell death via JNK/p38 activation in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Environ Toxicol, 2019, 34(7): 853–860. DOI: 10.1002/tox.22753.
- [19] FAN X L, GUAN G Q, WANG J, et al. Licochalcone A induces cell cycle arrest and apoptosis via suppressing MAPK signaling pathway and the expression of FBXO5 in lung squamous cell cancer [J]. Oncol Rep, 2023, 50(6): 214. DOI: 10.3892/or.2023.8651.
- [20] KASHYAP D, GARG V K, GOEL N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: role in cancer development and prognosis [J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2021, 125: 73–120. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2021.01.003.
- [21] LI N, LU B, LUO C Y, et al. Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: a comparison among China, Europe, and northern America [J]. Cancer Lett, 2021, 522: 255–268. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.09.034.
- [22] ZOU Y Q, WANG S L, ZHANG H H, et al. The triangular relationship between traditional Chinese medicines, intestinal flora, and colorectal cancer [J]. Med Res Rev, 2024, 44(2): 539–567. DOI: 10.1002/med.21989.
- [23] ZHOU M Y, YUE Y Z, WANG Y H, et al. Polysaccharides from Chinese herbs as natural weapons against colorectal cancer [J]. Biosci Rep, 2023, 43(5): BSR20230041. DOI: 10.1042/BSR20230041.
- [24] WANG K L, CHEN Q, SHAO Y Y, et al. Anticancer activities of TCM and their active components against tumor metastasis [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 111044. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.111044.
- [25] FAN W H, WANG F C, JIN Z, et al. Curcumin synergizes with cisplatin to inhibit colon cancer through targeting the microRNA-137-glutaminase axis [J]. Curr Med Sci, 2022, 42(1): 108–117. DOI: 10.1007/s11596-021-2469-0.

- [26] XU Q, ZHANG H, QIN H R, et al. Norcantharidin sensitizes colorectal cancer cells to radiotherapy *via* reactive oxygen species-DRP1-mediated mitochondrial damage [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(3): 347. DOI: 10.3390/antiox13030347.
- [27] FURUSAWA J I, FUNAKOSHI-TAGO M, MASHINO T, et al. *Glycyrrhiza inflata*-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF- κ B p65 in LPS signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(4): 499-507. DOI: 10.1016/j.intimp.2009.01.031.
- [28] SHU J, CUI X, LIU X, et al. Licochalcone A inhibits IgE-mediated allergic reaction through PLC/ERK/STAT3 pathway [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2022, 36: 3946320221135462. DOI: 10.1177/03946320221135462.
- [29] TSENG T Y, LEE C H, LEE H L, et al. Licochalcone a suppresses renal cancer cell proliferation and metastasis by engagement of Sp1-mediated LC3 expression [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(2): 684. DOI: 10.3390/pharmaceutics15020684.
- [30] PAN C H, CHEN H J, YANG B L. Licochalcone a inhibits proliferation and metastasis of colon cancer by regulating miR-1270/ADAM9/Akt/NF- κ B axis [J]. *Iran J Public Health*, 2023, 52(9): 1962-1972. DOI: 10.18502/ijph.v52i9.13578.
- [31] CHEN W P, HU Z N, JIN L B, et al. Licochalcone a inhibits MMPs and ADAMTSs *via* the NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling pathways in rat chondrocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(3): 937-944. DOI: 10.1159/000481645.
- [32] HUANG W C, SU H H, FANG L W, et al. Licochalcone a inhibits cellular motility by suppressing E-cadherin and MAPK signaling in breast cancer [J]. *Cells*, 2019, 8(3): 218. DOI: 10.3390/cells8030218.
- [33] HONG J H, CHEN H J, XIANG S J, et al. Capsaicin reverses the inhibitory effect of licochalcone A/ β -Arbutin on tyrosinase expression in b16 mouse melanoma cells [J]. *Pharmacogn Mag*, 2018, 14(53): 110-115. DOI: 10.4103/pm.pm_103_17.
- [34] WU P, YU T, WU J, et al. Licochalcone a induces ROS-mediated apoptosis through TrxR1 inactivation in colorectal cancer cells [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 5875074. DOI: 10.1155/2020/5875074.
- [35] LIU X S, XING Y, LI M Y, et al. Licochalcone A inhibits proliferation and promotes apoptosis of colon cancer cell by targeting programmed cell death-ligand 1 *via* the NF- κ B and Ras/Raf/MEK pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 273: 113989. DOI: 10.1016/j.jep.2021.113989.
- [36] XU Y L, YE H G. Progress in understanding the mechanisms of resistance to BCL-2 inhibitors [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2022, 11(1): 31. DOI: 10.1186/s40164-022-00283-0.
- [37] KING L E, HOHORST L, GARCÍA-SÁEZ A J. Expanding roles of BCL-2 proteins in apoptosis execution and beyond [J]. *J Cell Sci*, 2023, 136(22): jcs260790. DOI: 10.1242/jcs.260790.
- [38] KALONI D, DIEPSTRATEN S T, STRASSER A, et al. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy [J]. *Apoptosis*, 2023, 28(1): 20-38. DOI: 10.1007/s10495-022-01780-7.
- [39] LALIER L, VALLETTE F, MANON S. Bcl-2 family members and the mitochondrial import machineries: the roads to death [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(2): 162. DOI: 10.3390/biom12020162.
- [40] PEÑA-BLANCO A, GARCÍA-SÁEZ A J. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis [J]. *FEBS J*, 2018, 285(3): 416-431. DOI: 10.1111/febs.14186.
- [41] 谢燕华, 康超, 缙娇, 等. 黄芩苷诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡及对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2023, 46(5): 78-82. DOI: 10.13424/j.cnki.jsectm.2023.05.012.
- [42] PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4): 603-619. DOI: 10.18632/aging.100934.

校稿: 于静 李征

本文引用格式: 耿宏伟, 贺介甫, 陈超爽, 等. 甘草查尔酮 A 通过激活线粒体依赖性凋亡途径抑制结肠癌 HT29 细胞增殖研究 [J]. *肿瘤药学*, 2025, 15(5): 656-663. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.05.11.

Cite this article as: GENG Hongwei, HE Jiefu, CHEN Chaoshuang, et al. Licochalcone A inhibits proliferation of HT29 colorectal cancer cells by activating the mitochondria-dependent apoptotic pathway [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2025, 15(5): 656-663. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2025.05.11.