

蟾毒灵通过激活内质网应激通路诱导 HCT116 细胞凋亡

尚靖^{1,2,4}, 李宗恒^{1,2,4}, 夏琪^{3,4}, 唐东豪^{1,2,4}, 陈佳^{3,4}, 袁泽婷^{3,4}, 殷佩浩^{1,2,3,4}

摘要 目的 研究蟾毒灵对人结直肠癌细胞 HCT116 增殖及凋亡的影响,并探讨内质网应激(ERS)在此过程中的作用。方法 采用 CCK-8 法测定蟾毒灵对 HCT116 细胞增殖活性的影响;不同浓度蟾毒灵作用 HCT116 细胞 48 h 后,采用 Annexin V/PI 法检测细胞凋亡情况,用 Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达情况,同时用 Western blot 法检测内质网应激相关蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、磷酸化蛋白激酶 R 样内质网激酶(p-PERK)、真核翻译起始因子 2 α (eIF2 α)、磷酸化真核翻译起始因子 2 α (p-eIF2 α)和 C/EBP 同源蛋白(CHOP)的表达情况;将 HCT116 细胞分为对照组、蟾毒灵组和联合组(蟾毒灵+4-苯基丁酸),Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达变化。结果 CCK-8 法检测结果显示蟾毒灵对 HCT116 细胞的增殖活性有抑制作用;细胞凋亡实验表明蟾毒灵能引起 HCT116 细胞的凋亡;Western blot 实验结果显示,蟾毒灵能够上调促凋亡蛋白 Bax 表达,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,同时也能诱导 ERS 并激活 PERK/eIF2 α /CHOP 通路;当蟾毒灵联合 4-苯基丁酸后,蟾毒灵的促凋亡作用得到了抑制。结论 蟾毒灵能有效地抑制 HCT116 的增殖活性,并能诱发 HCT116 的凋亡,而该作用在一定程度上是通过激活 ERS 来实现的。

关键词 蟾毒灵;内质网应激;细胞凋亡;结直肠癌

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)02-0274-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.018

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球最普遍的一种恶性肿瘤,有调查显示,2020 年全球有 940 000 人死于 CRC,死亡人数仍在增加^[1]。在一定程度上,传统的术后放疗和化疗能改善疗效,但放

疗耐受和化疗耐药常常导致治疗失败。抗凋亡是大多数癌症产生放疗耐药和化疗耐药的主要原因,因此促进肿瘤细胞凋亡是改善癌症治疗的关键目标之一^[2]。

蟾毒灵是从中药蟾酥中提取的中药单体,研究^[3-8]表明蟾毒灵具有广泛的抗肿瘤作用,包括抑制细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的耐药,防止侵袭和转移。研究^[9]指出,诱导细胞凋亡是蟾毒灵最重要的抗肿瘤方式之一。而持续的内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)与细胞凋亡密不可分^[10]。因此该研究观察蟾毒灵对结直肠癌 HCT116 细胞凋亡和增殖的作用,并探讨 ERS 在 HCT116 细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RPMI-1640 培养基、双抗(青霉素-链霉素溶液)和胰酶购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自以色列 BI 公司;蟾毒灵购自成都瑞芬思生物科技有限公司;4-苯基丁酸购自美国 MedChemExpress 公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)细胞增殖毒性检测试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自日本 DOJINDO 公司;RIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethane-sulfonyl fluoride, PMSF)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 SDS-PAGE 电泳相关试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;兔源 B 淋巴细胞瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(ab32124)和鼠源 β -actin 抗体(ab6276)购自英国 Abcam 公司;兔源葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)抗体(3177S)、兔源 Bcl-2 关联 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)抗体(2772S)、兔源真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α)抗体(5324S)、兔源磷酸化真核翻译起始因子 2 α (phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 α , p-eIF2 α)抗体(3398S)和鼠源 C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)抗体(2895P)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;兔源磷酸化蛋白激酶 R 样内

2022-12-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81873137、81973700);上海市普陀区卫生健康系统科技创新项目(编号:ptkwss202004)

作者单位:¹安徽医科大学上海普陀中心临床学院,上海 200062

²安徽医科大学第五临床医学院,安徽 230032

³上海中医药大学附属普陀医院普外科,上海 200062

⁴上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所,上海 200062

作者简介:尚靖,男,硕士研究生;

殷佩浩,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yinpeihao@shutcm.edu.cn

质网激酶(phosphorylated protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase, p-PERK) 抗体(abs137056) 购自爱必信(上海) 生物科技有限公司; ECL 显影液和 PVDF 膜购自美国 Miliipore 公司。

1.2 细胞培养 用含有 1% 双抗和 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基培养 HCT116 细胞, 在 5% CO₂、37 °C 的培养箱中培养, 取对数生长期细胞进行实验。

1.3 CCK-8 法检测细胞活力 取 HCT116 细胞接种至 96 孔板(1.5 × 10⁴ 个/孔)。第 2 天用含不同浓度蟾毒灵(0、2.5、5、10、20、40 nmol/L) 的培养基或含不同浓度 4-苯基丁酸(0、1、2、4、8、16 mmol/L) 的培养基替换原来的培养基, 并孵育 48 h 然后根据制造商的说明书加入 CCK-8 工作液, 培养箱中孵育 1h 后, 然后根据制造商的说明书用酶标仪检测在 450 nm 处的吸光度, 并计算细胞存活率。

1.4 AnnexinV/PI 流式细胞术检测细胞凋亡 取 HCT116 细胞接种至 6 孔板(1 × 10⁵ 个/孔)。待贴壁后弃去原有的培养基, 用含有不同浓度蟾毒灵(0、2.5、5、10 nmol/L) 的新鲜培养基孵育 48 h。收集细胞至离心管, 用 PBS 洗涤后, 用 1 × Annexin V Binding Solution 重悬, 将细胞浓度调整至 1 × 10⁶ 个/ml。取 100 μl 细胞悬液至流式管, 加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μl, 室温下避光孵育 15 min, 加入 500 μl PBS 混匀后用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.5 Western blot 检测蛋白表达 取 HCT116 细胞接种至 6 孔板(3 × 10⁵ 个/孔)。待贴壁后弃去原有的培养基, 根据实验分组分别处理 48 h 后, 用 PBS 洗 3 次后, 加入 RIPA 裂解液(含 PMSF), 在冰上裂解 10 min, 将裂解物转移至 EP 管后, 在 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 25 min, 取上清液, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液后在金属浴(100 °C) 中煮 10 min; 取 15 μg 细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 结束后将其转移至 PVDF 膜, 并用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 按目标蛋白的分子量裁剪 PVDF 膜, 将目标条带与对应的一抗孵育过夜(4 °C), 一抗包括 GRP78(1 : 1 000)、Bax(1 : 1 000)、eIF2α(1 : 1 000)、p-eIF2α(1 : 1 000)、CHOP(1 : 1 000)、Bel-2(1 : 1 000) 和 β-actin(1 : 5 000); 洗涤 3 次后与对应的二抗(兔二抗 1 : 2 000, 鼠二抗 1 : 2 000) 在常温下孵育 1h, 洗膜 3 次后, 用 ECL 显影液进行显色。

1.6 统计学处理 每个实验独立进行 3 次, 实验结果均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 Graphpad

Prism 8 软件进行统计分析和作图, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蟾毒灵对 HCT116 细胞增殖活性的影响 如图 1 所示, 不同浓度的蟾毒灵(0、2.5、5、10、20、40 nmol/L) 作用 HCT116 细胞 48 h 之后, 用 CCK-8 法检测细胞增殖活性, 蟾毒灵抑制了 HCT116 细胞的增殖活力, 测得半数抑制浓度为(19.86 ± 1.49) nmol/L, 且随蟾毒灵浓度增大, 抑制作用逐渐增强, 与 0 nmol/L 相比, 差异有统计学意义($F = 301.9$, $P < 0.001$), 同时确定选用 10 nmol/L 作为后续实验的最大干预浓度。结果表明蟾毒灵抑制 HCT116 细胞的增殖活性。

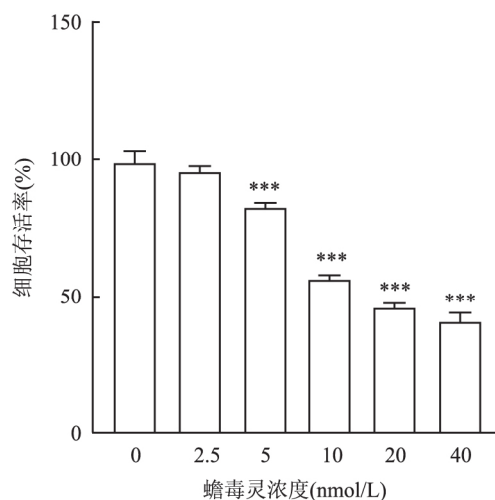


图 1 蟾毒灵对 HCT116 细胞增殖的影响
与对照组(0 nmol/L 蟾毒灵)比较: *** $P < 0.001$

2.2 蟾毒灵可以促进 HCT116 细胞凋亡 将 HCT116 细胞用不同浓度的蟾毒灵(0、2.5、5、10 nmol/L) 干预 48 h 后, 用流式细胞术检测细胞凋亡, 结果如图 2 所示, 与对照组(0 nmol/L 蟾毒灵) 相比, 随蟾毒灵浓度升高, HCT116 细胞的细胞凋亡率依次升高($F = 85.27$, $P < 0.001$), 提示蟾毒灵可以促进 HCT116 细胞凋亡。

2.3 蟾毒灵对 HCT116 细胞凋亡蛋白的影响 为了进一步验证蟾毒灵可以促进 HCT116 细胞的凋亡, 将 HCT116 细胞用不同浓度的蟾毒灵(0、2.5、5、10 nmol/L) 干预 48 h 后, 用 Western blot 法检测 HCT116 细胞内凋亡相关蛋白的变化, 结果如图 3 显示, 与对照组(0 nmol/L 蟾毒灵) 相比, 随着蟾毒灵

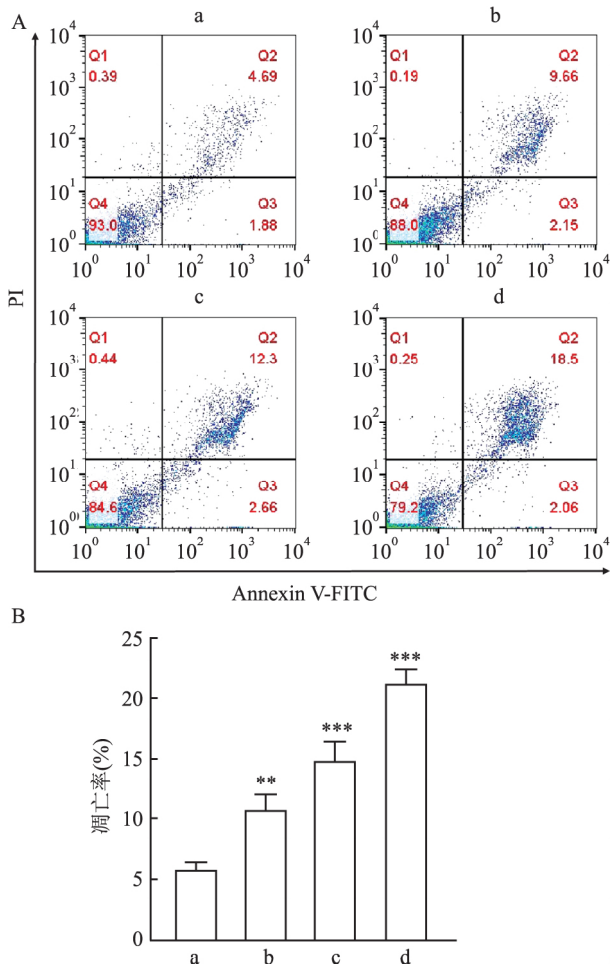


图2 蟾毒灵对 HCT116 细胞凋亡的影响

A: Annexin V/PI 流式细胞术结果图; B: AnnexinV/PI 流式细胞术结果统计图; a: 对照组(0 nmol/L 蟾毒灵); b: 2.5 nmol/L 蟾毒灵组; c: 5 nmol/L 蟾毒灵组; d: 10 nmol/L 蟾毒灵组; 与对照组(0 nmol/L 蟾毒灵)比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

浓度增加, Bax 蛋白相对表达量逐渐升高 ($F = 8.062, P < 0.01$), Bcl-2 蛋白相对表达量逐渐下降 ($F = 68.94, P < 0.001$)。以上数据表明, 蟾毒灵可以提高 Bax 的水平, 并使 Bcl-2 表达降低, 从而诱导 HCT116 的凋亡。

2.4 蟾毒灵对 HCT116 细胞 ERS 通路蛋白表达的影响 为了进一步验证蟾毒灵能否诱导 HCT116 细胞发生 ERS, 将 HCT116 细胞用不同浓度的蟾毒灵 (0、2.5、5、10 nmol/L) 干预 48 h 后, 用 Western blot 法检测 ERS 相关蛋白 GRP78、p-PERK、eIF2 α 、p-eIF2 α 和 CHOP 的表达情况。结果如图 4 所示, 与对照组(0 nml/L 蟾毒灵)相比, 随着蟾毒灵浓度增加, GRP78、p-PERK、p-eIF2 α 和 CHOP 蛋白相对表达量逐渐升高 ($F_{GRP78} = 26.18, F_{p-PERK} = 42.35, F_{p-eIF2\alpha} = 23.83, F_{CHOP} = 132.9, P < 0.001$) 而 eIF2 α

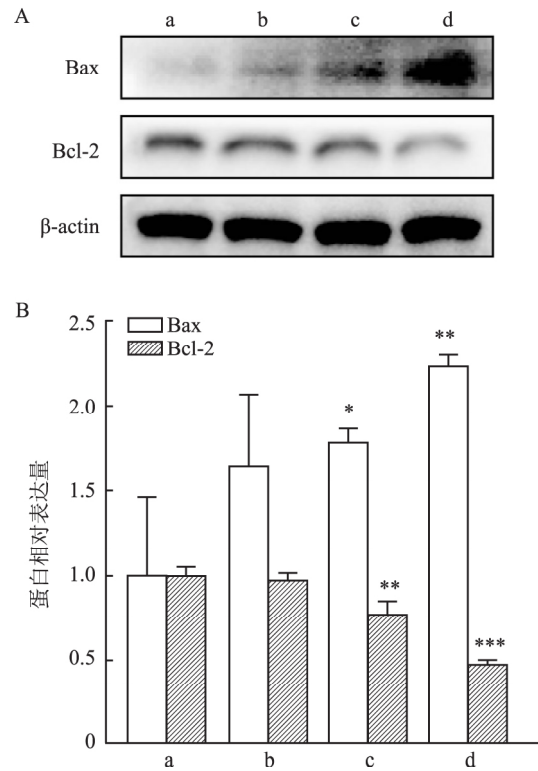


图3 蟾毒灵对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

A: Western blot 实验结果图; B: Western blot 实验结果统计图; a: 对照组(0 nmol/L 蟾毒灵); b: 2.5 nmol/L 蟾毒灵组; c: 5 nmol/L 蟾毒灵组; d: 10 nmol/L 蟾毒灵组; 与对照组(0 nmol/L 蟾毒灵)比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

蛋白相对表达量逐渐下降 ($F = 31.74, P < 0.001$)。表明蟾毒灵上调了 GRP78 蛋白的表达, 说明蟾毒灵能诱导 HCT116 细胞 ERS; 同时, 蟾毒灵对 p-PERK、p-eIF2 α 和 CHOP 蛋白表达起到了上调作用, 对 eIF2 α 的蛋白表达起到下调作用, 对 PERK/eIF2 α /CHOP 信号通路起到激活作用。

2.5 蟾毒灵联合 ERS 抑制剂对 HCT116 细胞凋亡蛋白的影响 用 ERS 抑制剂 4-苯基丁酸处理 HCT116 细胞 48 h, 选用非杀伤浓度 2 mmol/L (图 5A) 作为联合用药的浓度。设置对照组、蟾毒灵组 (10 nmol/L 蟾毒灵) 和联合组 (10 nmol/L 蟾毒灵 + 2 mmol/L 4-苯基丁酸) 分别处理 HCT116 细胞 48 h, 随后用 Western blot 对 HCT116 细胞中 Bax 和 Bcl-2 的变化进行检测, 图 5B 和 5C 可以看出, 蟾毒灵组 Bax 蛋白的相对蛋白表达量高于对照组, 而在联合 4-苯基丁酸后, 表达量下降 ($F = 68.18, P < 0.001$); 蟾毒灵组 Bcl-2 蛋白的相对表达量低于对照组, 而在联合 4-苯基丁酸后, 表达量上升 ($F = 47.82, P < 0.001$)。以上结果进一步验证蟾毒灵可通过诱导 ERS 来促进细胞凋亡。

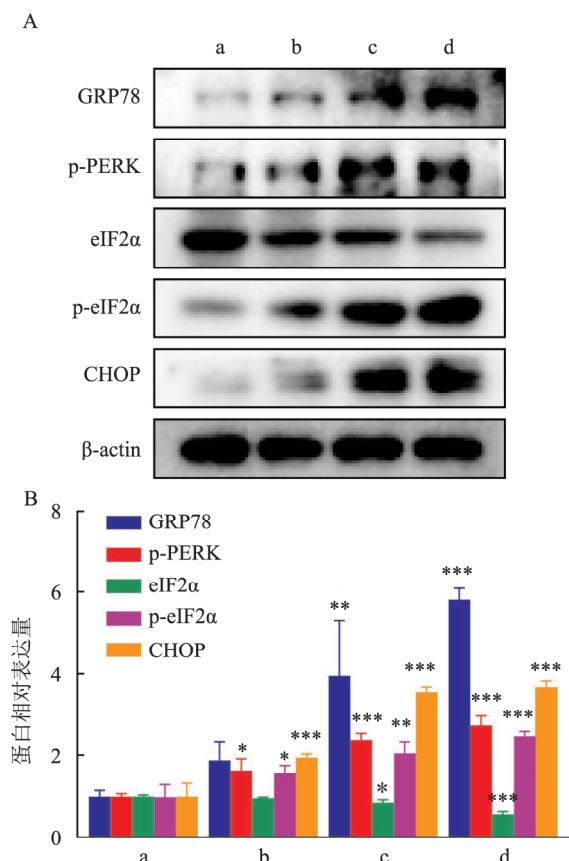


图4 蟾毒灵对内质网应激相关蛋白表达的影响

A: Western blot 实验结果图; B: Western blot 实验结果统计图; a: 对照组 (0 nmol/L 蟾毒灵); b: 2.5 nmol/L 蟾毒灵组; c: 5 nmol/L 蟾毒灵组; d: 10 nmol/L 蟾毒灵组; 与对照组 (0 nmol/L 蟾毒灵) 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

内质网在缺氧、营养缺乏、突变蛋白过多、药物作用及氧化还原状态的改变等不利条件下,蛋白质的折叠功能受损,错误折叠的蛋白质积累在内质网会触发 ERS 对此,细胞为了保持细胞内环境稳态而发生一系列反应,称为未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)^[11]。UPR 三种主要的应力传感器为三种跨膜蛋白(位于内质网中),分别为蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)、肌醇需求酶 1(inositol-requiring protein 1, IRE1)和激活转录因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)^[12]。当内质网相对动态平衡时,应力传感器在内质网管腔中的 GRP78 结合,使其处于灭活状态;在 ERS 条件下,GRP78 对错误折叠蛋白质中暴露的疏水多肽结构域具有更高的亲和力,从而导致 GRP78 与三种跨膜蛋白解离,UPR 信号通路被激活^[11]。UPR 的主要目的是恢复内质网

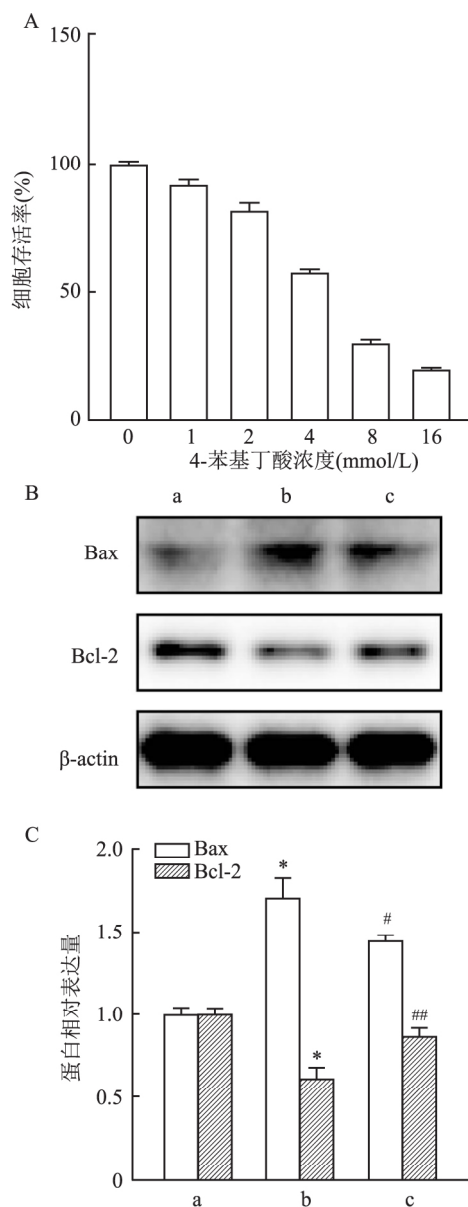


图5 蟾毒灵联合 4-苯基丁酸对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

A: 4-苯基丁酸处理 HCT116 细胞 48 h 的 CCK-8 结果图; B: Western blot 实验结果图; C: Western blot 实验结果统计图; a: 对照组(未加药处理); b: 蟾毒灵组 (10 nmol/L 蟾毒灵); c: 联合组 (10 nmol/L 蟾毒灵 + 2 mmol/L 4-苯基丁酸); 与对照组比较: * $P < 0.001$; 与蟾毒灵组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

的动态平衡,以确保细胞存活,而持续且严重的 ERS 会引起细胞凋亡^[13]。例如,在 ERS 被激活时,PERK 的磷酸化使多种 PERK 底物(其中包含 eIF2α)磷酸化,进而阻断了 eIF2-GTP-Met-tRNA 的形成,减少蛋白质翻译,从而缓解内质网中的蛋白质折叠负担^[11,14]。然而,如果 ERS 仍未缓解,持续的 PERK 激活将导致 CHOP 上调,增加促凋亡的 Bcl-2 家族蛋白的表达,以促进细胞凋亡^[11,15]。

本研究结果显示,蟾毒灵可呈浓度依赖性地抑制 HCT116 细胞增殖活性;蟾毒灵可以诱导 HCT116 细胞凋亡,Western blot 检测结果显示蟾毒灵可以下调 Bcl-2 并上调 Bax 表达,表明蟾毒灵能诱导 HCT116 细胞发生凋亡。为了确定蟾毒灵是否诱导了 HCT116 细胞的 ERS,首先分析了 ERS 的标志蛋白 GRP78 的表达情况,结果显示 GRP78 表达上调,表明蟾毒灵诱导了 ERS;紧接着对于 ERS 通路 PERK/eIF2 α /CHOP 上的蛋白的表达情况进行检测,结果显示在蟾毒灵的刺激下,p-PERK、p-eIF2 α 和 CHOP 表达会随浓度上升而上升,而 eIF2 α 表达会随浓度上升而下降,说明蟾毒灵激活了该通路。为了探讨 ERS 与 HCT116 细胞凋亡的关系,使用了 4-苯基丁酸(ERS 抑制剂)联合用药组(蟾毒灵+4-苯基丁酸)与蟾毒灵组相比,Bcl-2 的表达显著上调,Bax 的表达下调,表明在 4-苯基丁酸抑制 ERS 之后,细胞凋亡也被抑制了,表明在蟾毒灵诱导 HCT116 细胞凋亡中,ERS 起到了重要作用。

综上所述,本研究证实,蟾毒灵能有效地抑制 HCT116 细胞增殖的活性,并能诱发 HCT116 的凋亡,而该作用在一定程度上是通过激活 ERS 来实现的。这说明蟾毒灵有可能成为一种直接靶向凋亡途径来治疗 CRC 的潜在药物,并为蟾毒灵的临床转化提供了理论依据。

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): 209–49.
- [2] Mortezaee K, Salehi E, Mirtavoos-mahyari H, et al. Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12537–50.

- [3] Zhan Y, Qiu Y, Wang H, et al. Bufalin reverses multidrug resistance by regulating stemness through the CD133/nuclear factor-kappaB/MDR1 pathway in colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(5): 1619–30.
- [4] Chen J, Wang H, Jia L, et al. Bufalin targets the SRC-3/MIF pathway in chemoresistant cells to regulate M2 macrophage polarization in colorectal cancer [J]. *Cancer Lett*, 2021, 513: 63–74.
- [5] Li H, Xie S, Liu X, et al. Matrine alters microRNA expression profiles in SGC-7901 human gastric cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(5): 2118–26.
- [6] Yuan Z, Liu C, Sun Y, et al. Bufalin exacerbates photodynamic therapy of colorectal cancer by targeting SRC-3/HIF-1 α pathway [J]. *Int J Pharm*, 2022, 624: 122018.
- [7] Dou L, Zou D, Song F, et al. Bufalin suppresses ovarian cancer cell proliferation via EGFR pathway [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 135(4): 456–61.
- [8] Xie J, Lin W, Huang L, et al. Bufalin suppresses the proliferation and metastasis of renal cell carcinoma by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3867–73.
- [9] Zhang X, Zhao X, Liu K, et al. Bufalin: A systematic review of research hotspots and antitumor mechanisms by text mining and bioinformatics [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(7): 1633–50.
- [10] Fu X, Cui J, Meng X, et al. Endoplasmic reticulum stress, cell death and tumor: Association between endoplasmic reticulum stress and the apoptosis pathway in tumors (review) [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(3): 801–8.
- [11] Oakes S A. Endoplasmic reticulum stress signaling in cancer cells [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190(5): 934–46.
- [12] Chen X, Cubillos-ruij J R. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(2): 71–88.
- [13] 汪超,彭万仁,童斯浩,等. 橙皮素通过内质网应激通路诱导人肺癌细胞 PC9 发生凋亡 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(1): 11–6.
- [14] Ibrahim I M, Abdelmalek D H, Elfiky A A. GRP78: A cell's response to stress [J]. *Life Sci*, 2019, 226: 156–63.
- [15] Qi H, Zhang X, Liu H, et al. Shikonin induced apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress in colorectal cancer cells [J]. *J Cancer*, 2022, 13(1): 243–52.

Bufalin induces apoptosis of HCT116 cells by activating endoplasmic reticulum stress pathway

Shang Jing^{1 2 4}, Li Zongheng^{1 2 4}, Xia Qi^{3 4}, Tang Donghao^{1 2 4}, Chen Jia^{3 4}, Yuan Zeting^{3 4}, Yin Peihao^{1 2 3 4}

(¹Shanghai Putuo Central School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Shanghai 200062;

²The Fifth School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Dept of General Surgery,

Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062; ⁴Interventional Cancer Institute of Chinese Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062)

Abstract Objective To study the effect of bufalin on the proliferation and apoptosis of human colorectal cancer cell line HCT116, and to explore the role of endoplasmic reticulum stress (ERS) in this process. **Methods** The effect of bufalin on the proliferation of HCT116 cells was determined by CCK-8 assay. After HCT116 cells were

treated with different concentrations of bufalin for 48 hours, cell apoptosis was detected by Annexin V/PI assay, and the expression of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 was detected by Western blot. At the same time, the expression of ERS-related proteins glucose regulated protein 78 (GRP78), phosphorylated protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase (p-PERK), eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 α (p-eIF2 α) and C/EBP homologous protein (CHOP) was detected by Western blot. HCT116 cells were divided into control group, bufalin group and combination group (bufalin + 4-phenylbutyric acid), and the expression of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 was observed by Western blot. **Results** CCK-8 assay showed that bufalin could inhibit the proliferation of HCT116 cells. Apoptosis assay showed that bufalin could induce apoptosis of HCT116 cells. The results of Western blot showed that bufalin could up-regulate the expression of pro-apoptotic protein Bax and down-regulate the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2. It could also induce ERS and activate PERK/eIF2 α /CHOP pathway. When bufalin combined with 4-phenylbutyric acid, the apoptosis-promoting effect of bufalin was inhibited. **Conclusion** Bufalin can effectively inhibit the proliferative activity and induce apoptosis of HCT116, which is achieved to some extent by activating ERS.

Key words bufalin; endoplasmic reticulum stress; cell apoptosis; colorectal cancer

(上接第 273 页)

biomimetic mineralization system for inducing the remineralization of dentin collagen matrix [J]. *Materials* (Basel, Switzerland), 2015, 8(11): 7889–99.

- [8] Anastasiou A D, Strafford S, Thomson C L, et al. Exogenous mineralization of hard tissues using photo-absorptive minerals and femto-second lasers; the case of dental enamel [J]. *Acta Biomater*, 2018, 71: 86–95.
- [9] Sun M, Wu N, Chen H. Laser-assisted rapid mineralization of human tooth enamel [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9611.
- [10] Han M, Li Q L, Cao Y, et al. *In vivo* remineralization of dentin using an agarose hydrogel biomimetic mineralization system [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41955.

[11] Thula T T, Rodriguez D E, Lee M H, et al. *In vitro* mineralization of dense collagen substrates: a biomimetic approach toward the development of bone-graft materials [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(8): 3158–69.

- [12] 余金兰, 夏荣, 刘春, 等. Er, Cr: YSGG 激光清除 SLA 钛表面牙龈卟啉单胞菌生物膜 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(10): 1531–4.
- [13] Qi Y, Ye Z, Fok A, et al. Effects of molecular weight and concentration of poly(acrylic acid) on biomimetic mineralization of collagen [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4(8): 2758–66.
- [14] Zhou Z, Zhang L, Li J, et al. Polyelectrolyte-calcium complexes as a pre-precursor induce biomimetic mineralization of collagen [J]. *Nanoscale*, 2021, 13(2): 953–67.

Er, Cr: YSGG laser accelerated dentin mineralization

Chen Baishun, Xia Rong, Yu Jinlan

(Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To study the effect of Er, Cr: YSGG laser on the mineralization of dentin collagen fiber, accelerate the mineralization process and shorten the mineralization time. **Methods** Human health third molars were selected to remove the teeth of the tooth enamel, degenerate the teeth, leave the dentin collagen fiber web, place the degenerative collagen fiber in the configured re-mineral fluid. Using Er, Cr: YSGG, the teeth before and after the test were used to analyze the surface morphology using SEM scanning electron microscopy, and the EDS X-ray energy spectrum was analyzed by the distribution of calcium phosphorus. **Results** Er, Cr: YSGG laser irradiation laser irradiated tooth in the teeth, new minerals were generated, which covered the inner wall of the teeth, the calcium phosphorus element was enriched in the inner wall of the teeth. **Conclusion** YSGG laser can help dentin collagen fibers mineralized in mineralization fluid, form new minerals. This method can shorten the mineralization time of dentin collagen fibers in mineralization fluid, which is the re-ore.

Key words Er, Cr: YSGG; dentin; collagen fiber; mineralization