

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202625111

· 论 著 ·

基于网络药理学与体外实验探讨香荆芥酚诱导鼻咽癌细胞凋亡和周期阻滞的作用机制

谢卓良, 徐玮, 赵锐, 刘海

(川北医学院附属医院 耳鼻咽喉头颈外科, 四川 南充 637000)

摘要: **目的** 探讨香荆芥酚(CV)对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖、凋亡及周期的影响,并探索 CV 诱导 CNE2 细胞凋亡和周期阻滞的潜在机制。**方法** 运用网络药理学预测 CV 作用于鼻咽癌的潜在靶点,利用 R 软件对潜在靶点进行基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,使用 CB-Dock2 平台将 CV 与靶点蛋白进行分子对接,使用 Gromacs 2022.3 软件将 CV 与靶点蛋白进行分子动力学模拟。通过集落形成实验和流式细胞术检测 CV 对 CNE2 细胞增殖、凋亡及周期的影响,通过 Western blot 法检测 CV 对 CNE2 细胞内相关蛋白表达的影响。**结果** 经网络药理学预测,CV 作用于鼻咽癌存在 137 个共有靶点,KEGG 富集分析结果显示 CV 作用于鼻咽癌可能涉及磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 等信号通路;分子对接结果显示 PI3K、AKT、磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 α (PIK3CA)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、半胱天冬酶-3(Caspase-3)、周期蛋白依赖性激酶 2(CDK2)与 CV 具有较好的结合亲和力。分子动力学模拟进一步表明 CV 与 CDK2 结合较稳定。与对照组比较,经 CV 作用后的 CNE2 细胞增殖能力降低,细胞凋亡能力增加,细胞周期 G0/G1 期延长,PIK3CA、p-PI3K、p-AKT、Bcl-2 和 CDK2 蛋白表达均明显降低,Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和 Caspase-3 蛋白表达均明显升高,差异均具有统计学意义(P 均 <0.05)。**结论** CV 抑制 CNE2 细胞增殖,并诱导细胞凋亡和阻滞细胞周期于 G0/G1 期。CV 诱导 CNE2 细胞凋亡和周期阻滞可能与 PI3K/AKT 信号通路相关的 PIK3CA、p-PI3K、p-AKT、Bcl-2、CDK2 蛋白表达降低及 Bax、Caspase-3 蛋白表达升高有关。

关键词: 鼻咽癌;香荆芥酚;网络药理学;分子对接;凋亡;周期;PI3K/AKT

中图分类号:R739.63

Exploration on the mechanisms of carvacrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in nasopharyngeal carcinoma cells based on network pharmacology and in vitro experiments

XIE Zhuoliang, XU Wei, ZHAO Rui, LIU Hai

(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of carvacrol (CV) on the proliferation, apoptosis, and cell cycle of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells, and to explore the potential mechanisms underlying CV-induced apoptosis and cell cycle arrest in CNE2 cells. **Methods** Network pharmacology was used to predict the potential targets of CV in nasopharyngeal carcinoma. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed on these potential targets using R software. Molecular docking between CV and target proteins was conducted using the CB-Dock2 platform, and molecular dynamics simulations of CV and target proteins were performed using Gromacs 2022.3 software. Colony formation assays and flow cytometry were used to assess the effects of CV on the proliferation, apoptosis, and cell cycle. Western blotting was employed to examine the impact of CV on protein expression in CNE2 cells. **Results** Network pharmacology predictions indicated that CV affected nasopharyngeal carcinoma through 137 common targets. KEGG pathway enrichment analysis suggested that CV might involve several signaling pathways, including phosphoinositide

基金项目:四川省医学科研课题计划(S19055);博士科研启动基金项目(CBY22-QDA07)。

第一作者简介:谢卓良,男,硕士,住院医师。

通信作者简介:刘海,男,博士,教授。

3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT). Molecular docking results revealed that PI3K, AKT, PIK3CA, Bcl-2, Caspase-3, and CDK2 exhibited strong binding affinities with CV. Molecular dynamics simulations further demonstrated that CV formed a stable binding with CDK2. Compared with the control group, the proliferative capacity of CNE2 cells after CV treatment decreased, the apoptosis ability increased, the G0/G1 phase of the cell cycle was prolonged, and the expressions of PIK3CA, p-PI3K, p-AKT, Bcl-2, and CDK2 proteins all significantly decreased, while the protein expressions of Bax and Caspase-3 significantly increased. All the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** CV inhibits the proliferation of CNE2 cells, induces apoptosis, and blocks the cell cycle at the G0/G1 phase. The apoptosis and cell cycle arrest induced by CV in CNE2 cells may be associated with the decreased expressions of PIK3CA, p-PI3K, p-AKT, Bcl-2, and CDK2 proteins, as well as the increased expressions of Bax and Caspase-3 proteins, which are related to the PI3K/AKT signaling pathway.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma; Carvacrol; Network pharmacology; Molecular docking; Apoptosis; Cycle; PI3K/AKT

鼻咽癌是常见的头颈部恶性肿瘤之一,其发病与 Epstein-Barr 病毒感染和生活环境等相关^[1-2],全球接近一半的鼻咽癌新病例发生在我国^[3]。鼻咽癌早期症状不典型,大多数鼻咽癌患者在初次诊断时已处于晚期^[4]。随着联合放/化疗在晚期鼻咽癌治疗中的应用,患者 5 年生存率得到了提高,但其产生的严重不良反应及耐药性,常导致患者生活质量严重下降甚至治疗失败^[5]。近年来,许多天然植物化学物质已被证实在多种癌症的治疗中具有较强的治疗效果和较小的副作用^[6]。香荆芥酚(carvacrol, CV)又称香芹酚,是一种天然单萜酚类化合物,存在于许多天然植物中,广泛应用于抗炎、抗肿瘤及抗氧化等领域^[7]。有研究证实,CV 对多种恶性肿瘤有抑制作用,如乳腺癌^[8]、口腔癌^[9]、骨肉瘤^[10]等,其主要作用机制为诱导肿瘤细胞凋亡和周期阻滞,与多种信号通路有关。但目前 CV 对鼻咽癌的作用尚不清楚。本研究以人低分化鼻咽癌 CNE2 细胞为实验对象,探讨 CV 对 CNE2 细胞增殖、凋亡和周期的影响,同时结合网络药理学等方法探索 CV 诱导 CNE2 细胞凋亡和周期阻滞的可能作用机制,为鼻咽癌的治疗提供新的思路及理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人鼻咽癌细胞 CNE2 细胞株购自湖南丰晖公司;CV(货号:B21365)购自上海源叶公司;青霉素-链霉素双抗、RPMI-1640、磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA) 抗体购自武汉博士德公司;胎牛血清购自浙江天杭公司;结晶紫、多聚甲醛购自北京索

莱宝公司;细胞凋亡试剂盒购自江苏凯基公司;细胞周期试剂盒购自 Elabscience 公司;磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphorylated phosphoinositide 3-kinase, p-PI3K) 抗体、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-AKT) 抗体、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 抗体、胱天蛋白酶-3 (cysteine-aspartic acid protease 3, Caspase-3) 抗体、细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase 2, CDK2) 抗体和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自杭州华安公司。

1.2 方法

1.2.1 获取 CV 潜在作用靶点 从 PubChem 数据库获取 CV 结构信息,将其导入 Swiss Target Prediction、TCMSP、TCMIP、CTD、SEA 和 SuperPred 数据库获取 CV 靶点,并用 Uniprot 数据库统一成基因名,合并去重获得 CV 潜在作用靶点。

1.2.2 鼻咽癌潜在靶点的获取 以“Nasopharyngeal Carcinoma”为关键词,通过 GeneCards、CTD、OMIM 数据库对鼻咽癌靶点进行筛选,其中 CTD 数据库以 Inference score $\geq$ 平均值 (5.209) 作为筛选条件,合并去重获得鼻咽癌可能作用靶点。利用 Venny 将 CV 和鼻咽癌靶点取交集。

1.2.3 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络筛选核心靶点与通路富集分析 将交集靶点导入 STRING 数据库分析。以“Minimum Required Interaction Score ≥ 0.4 ”作为筛选条件,下载并保存 PPI 网络图和 TSV 格式文件,导入 Cytoscape 3.9.0 软件进行可视化处理。利用 Network Analyzer 插件对拓扑参数进行分析,以节点度、介数中心性、紧密中心性的平均值作为筛选条

件,获得核心靶点。利用 R 软件的“Cluster Profiler”包对交集靶点进行基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。

1.2.4 分子对接 使用 CB-Dock2 平台进行分子对接^[11]。从 PubChem 数据库获取 CV 的 3D 结构,导入 CB-Dock2 平台添加电荷和氢原子。从 PDB 数据库中下载得到靶点蛋白的晶体结构,导入 CB-Dock2 平台删除所有水分子并添加氢原子。计算结合能。运用 PLIP 和 PyMol v2.6 软件对 CV 与靶点蛋白相互作用进行可视化处理,绘制三维图。使用 PyMol v2.6 软件的“Align”命令计算 CV 相对蛋白共晶配体的均方根偏差。

1.2.5 分子动力学模拟 运用 Gromacs 2022.3 软件进行 100 ns 的分子动力学模拟^[12],小分子配体预处理使用 AmberTools22 添加 GAFF 力场,使用 Gaussian 16W 加氢和计算 RESP 电势,在静态温度 26.85 °C 和常压下,以 Amber99sb-ildn 为力场,以 TIP3P 水模型为溶剂,添加 Na⁺中和模拟系统的总电荷。进行 10 万步等温等容系统平衡和等温等压系统平衡计算。运行分子动力学模拟程序。使用该软件内置工具计算配体的均方根偏差、均方根涨落、回转半径和结合自由能^[13]等参数。

1.2.6 细胞培养 CNE2 细胞株接种于含有 1% 双抗和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液中,置于 37 °C、5% CO₂ 湿润培养箱中培养。

1.2.7 集落形成实验检测细胞增殖能力 细胞分为 4 组:未经 CV 处理的对照组(0 μg/mL CV 组)、30 μg/mL CV 实验组、40 μg/mL CV 实验组、50 μg/mL CV 实验组。用含 0、30、40、50 μg/mL CV 的完全培养液处理 48 h,更换为不含 CV 的完全培养液继续培养,直到出现肉眼可见的细胞集落,终止培养。多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 20 min, PBS 洗涤后自然晾干,相机拍照。用 Image J 软件处理图片,计算克隆团数。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡能力 收集细胞,加入 100 μL Binding Buffer,混匀,加入 2.5 μL Annexin V-APC 和 2.5 μL 7-ADD 染色,室温避光 10 min 后再次加入 Binding Buffer 400 μL,立即上机检测。

1.2.9 流式细胞术检测细胞周期 收集细胞,加入 0.3 mL 的 PBS 和 1.2 mL 的无水乙醇,混匀后置于 20 °C 冰箱过夜。加入 RNase A Reagent 0.1 mL,37 °C 水浴 30 min 后加入 0.4 mL 碘化丙啶染色液,避光 30 min 后上机检测。

1.2.10 Western blot 法检测细胞内与细胞凋亡及周期相关蛋白的表达水平 提取各组蛋白,加入 Buffer 混匀,100 °C 加热 10 min 获得样品。依次进行上样、电泳、转膜、封闭、TBST 洗涤,孵育一抗后在 4 °C 冰箱内过夜。再次 TBST 清洗后孵育二抗 1 h,洗涤后显影曝光,图片存档,用 Image J 软件分析灰度值。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,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,用 LSD 法进行事后检验。采用 GraphPad Prism 9.1.0 绘制统计图。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CV 抗鼻咽癌的潜在作用靶点

获得 222 个 CV 潜在作用靶点和 7 407 个鼻咽癌潜在作用靶点。运用 Venny 在线软件将 CV 靶点与鼻咽癌靶点取交集,获得 137 个交集靶点(图 1)。

2.2 构建 PPI 网络获取核心靶点与 KEGG 通路富集分析结果

CV 抗鼻咽癌 PPI 网络见图 2,涉及 132 个蛋白节点和 1205 条相互作用连线。以高于节点度(均值 18.258)、介数中心性(均值 0.009 46)、紧密中心性(均值 0.465)的平均值作为筛选条件,获得 24 个核心靶点(图 3)。KEGG 通路富集分析,共获得 151 条信号通路,根据 P 值取前 20 条绘图(图 4),主要涉及磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等通路。

2.3 分子对接结果

为了预测 CV 对 PI3K/AKT 通路的作用,且 *PIK3CA* 是 PI3K/AKT 通路上游的关键基因^[14], Bcl-2、Caspase-3 及 CDK2 分别是细胞凋亡和周期进程中的关键因子^[15-16],故选择 PI3K、AKT、*PIK3CA*、Bcl-2、Caspase-3、CDK2 与 CV 进行分子对接,结果见表 1 和图 5。一般认为结合能小于 -5 Kcal/mol 表明配受体结合较稳定^[17],提示以上靶点蛋白与 CV 具有较好的结合亲和力。

一般认为均方根偏差 $\leq 2.0 \text{ \AA}$,证明对接方法可靠^[18]。Bcl-2 的均方根偏差 $> 2.0 \text{ \AA}$,表明对接相对不可靠,可能与小分子的结构较为简单有关。

表 1 分子对接结果

靶点蛋白	PDB ID	共晶体配体 ID	对接口袋中心坐标(x,y,z)	对接口大小(x,y,z)	结合能(Kcal/mol)	均方根偏差(Å)
PI3K	4OYS	1TT	16,-19,-24	17,26,17	-6.5	1.67
AKT	3O96	IQO	5,-7,13	35,35,31	-6.8	1.60
PIK3CA	7JIU	VBS	-14,10,26	17,25,28	-5.9	1.48
Bcl-2	4LXD	1XV	28,28,5	17,17,17	-5.9	5.53
Caspase-3	3DEK	RXD	-39,16,-17	17,17,17	-5.2	NA
CDK2	1AQ1	STU	-1,27,13	24,25,23	-7.0	1.83

注:PI3K(磷脂酰肌醇 3 激酶);AKT(蛋白激酶 B);PIK3CA(磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 α);Bcl-2(B 淋巴细胞瘤-2);Caspase-3(半胱天冬酶-3);CDK2(周期蛋白依赖性激酶 2)。下同。

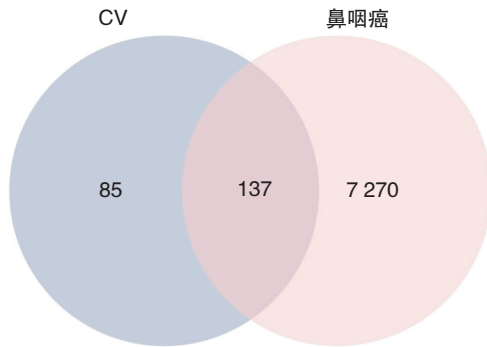


图 1 CV 与鼻咽癌交集靶点 注:CV(香荆芥酚)。下同。

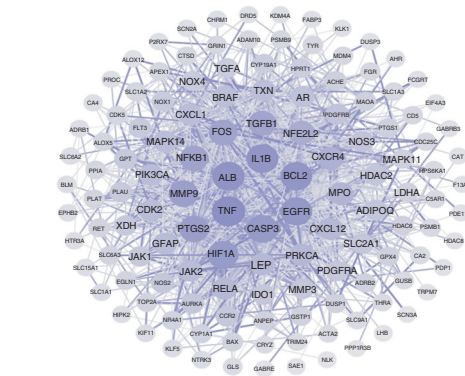


图 2 PPI 网络图 注:PPI(蛋白质-蛋白质相互作用)。

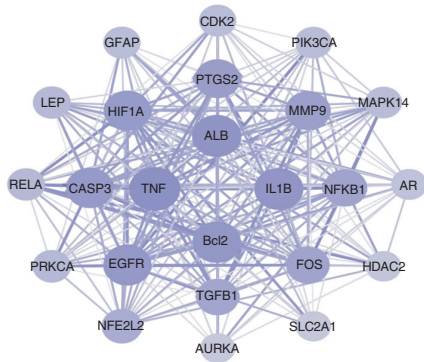


图 3 CV 抗鼻咽癌核心靶点

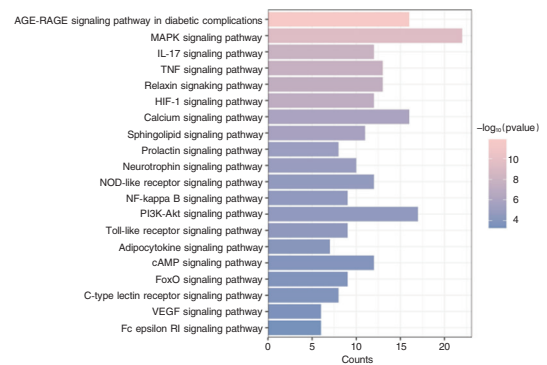


图 4 KEGG 通路富集分析 注:KEGG(基因组百科全书)。

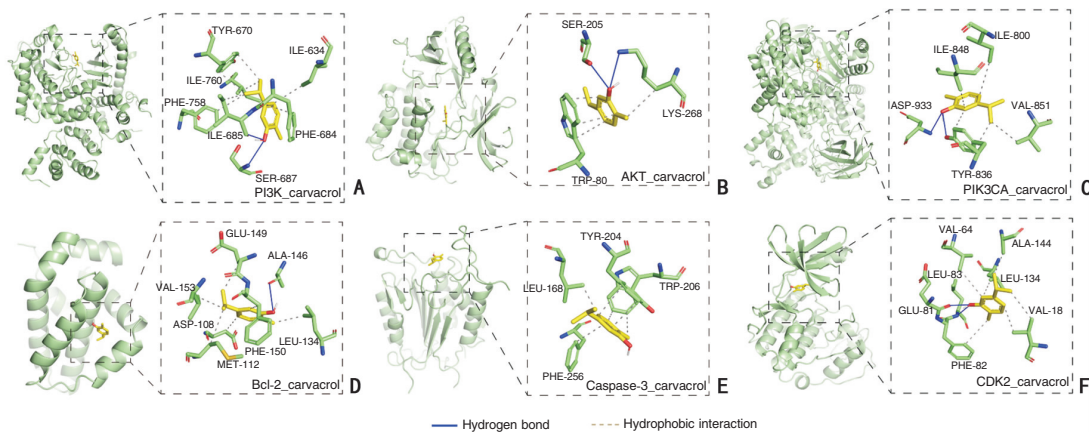


图 5 CV 与不同靶点蛋白的分子对接图 A:PI3K 与 CV 对接图;B:AKT 与 CV 对接图;C:PIK3CA 与 CV 对接图;D:Bcl-2 与 CV 对接图;E:Caspase-3 与 CV 对接图;F:CDK2 与 CV 对接图

Caspase-3 的均方根偏差标记为 NA(不可用),可能是没有合适的实验构象可供比较。PI3K、AKT、PIK3CA、CDK2 的均方根差均 $\leq 2.0 \text{ \AA}$,表明对接可靠。

2.4 分子动力学模拟

对“2.3”结果中与 CV 结合最好且有继续研究意义的受体蛋白 CDK2 进行分子动力学模拟。均方根偏差反映蛋白质构象的波动程度,图 6A 显示 20 ns 以后,均方根偏差值趋于稳定。均方根涨落反映氨基酸残基的波动,图 6B 显示整体结构相对稳定。氢键数量反映结合强度,图 6C 显示数量较稳定,约 2 个氢键。回转半径常用于量化体系的整体扩张或收缩,图 6D 显示回转半径值大部分时间保持相对稳定。溶剂可及表面积反映分子与溶剂的相互作用,图 6E 显示溶剂可及表面积值相对稳定。图 6F 显示总结合自由能为 -26.50 kcal/mol ,静电势能为 -14.21 kcal/mol ,范德华力和静电势能在 CV 与 CDK2 的结合中起主导作用。由此说明, CV 与 CDK2 的结合较稳定。

2.5 CV 对 CNE2 细胞增殖能力的影响

集落形成实验结果显示(图 7),实验组(30、40、50 $\mu\text{g/mL}$ CV 组)细胞克隆数分别为 $172.33 \pm$

5.03 、 129.00 ± 10.00 、 66.33 ± 11.68 ,低于对照组的 216.67 ± 14.64 ,差异具有统计学意义($F = 103.6$, $P < 0.001$)。提示 CV 能抑制 CNE2 细胞增殖。

2.6 CV 对 CNE2 细胞凋亡诱导的影响

流式细胞实验结果显示(图 8),实验组(30、40、50 $\mu\text{g/mL}$ CV 组)细胞总凋亡率为 $(13.96 \pm 1.88)\%$ 、 $(21.77 \pm 1.85)\%$ 、 $(30.04 \pm 0.58)\%$,显著高于对照组的 $(8.33 \pm 1.74)\%$,差异具有统计学意义($F = 104.2$, $P < 0.01$),提示 CV 可诱导 CNE2 细胞凋亡。

2.7 CV 对 CNE2 细胞周期阻滞的影响

细胞周期实验结果显示(图 9、表 2),与对照组比较,实验组(30、40、50 $\mu\text{g/mL}$ CV 组)细胞 G0/G1 期延长(由 49.80% 升高至 66.03%)、S 期缩短、G2/M 期缩短,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),提示 CV 可使 CNE2 细胞明显阻滞在 G0/G1 期。

2.8 CV 对 CNE2 细胞凋亡、周期相关蛋白表达的影响

Western blot 实验结果显示(图 10、表 3),与对照组比较,30、40、50 $\mu\text{g/mL}$ CV 处理的实验组细胞 p-PI3K、PIK3CA、p-AKT、Bcl-2 和 CDK2 蛋白表达量减少,Bax 和 Caspase-3 蛋白表达量增加,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

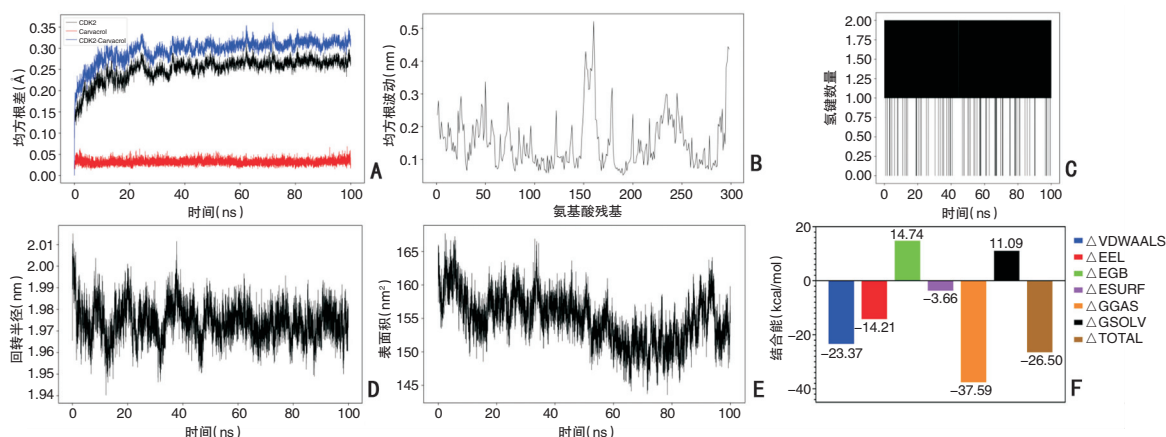


图 6 分子动力学模拟结果 A:均方根差曲线;B:氨基酸残基曲线;C:氢键数量;D:回转半径曲线;E:溶剂可及表面积曲线;F:配受体结合能 注: Δ VDWAALS(范德华力); Δ EEL(静电势能); Δ EGB(极性溶剂化能); Δ ESURF(非极性溶剂化能); Δ GGAS(表示气相总自由能); Δ GSOLV(溶剂化能); Δ TOTAL(总结合自由能)。

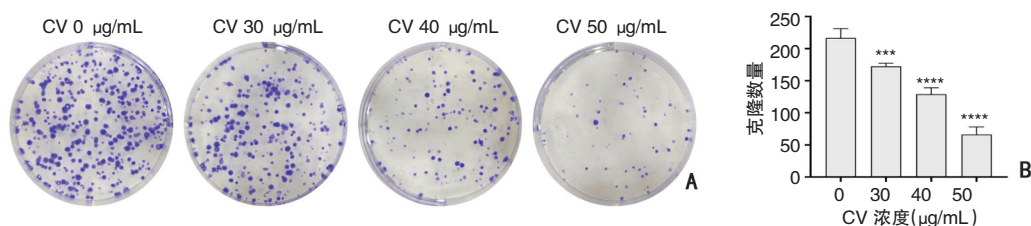


图 7 不同浓度 CV 对 CNE2 细胞处理 48 h 增殖能力的影响 A:培养皿所见;B:柱状图 (** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)

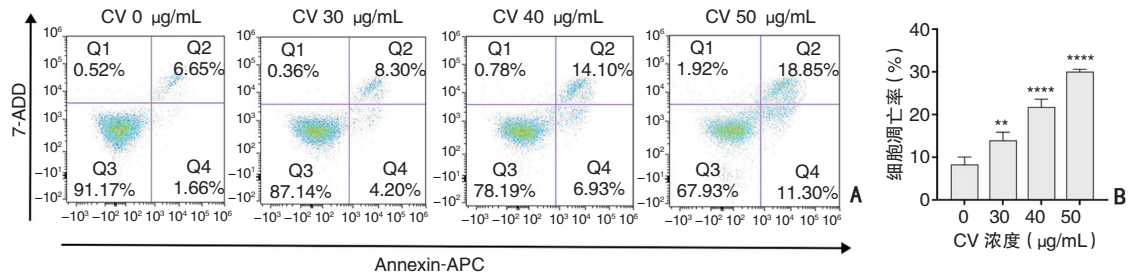


图 8 CV 对 CNE2 细胞处理 48 h 凋亡诱导的影响 A:散点图;B:柱状图 (** $P<0.01$, **** $P<0.0001$)

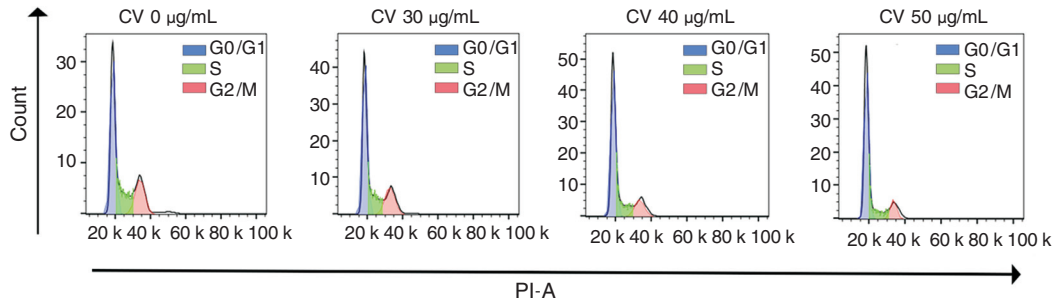


图 9 不同浓度 CV 对 CNE2 细胞处理 48 h 周期阻滞的影响

表 2 不同浓度 CV 对 CNE2 细胞处理 48 h 周期阻滞的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

类别	对照组	30 $\mu\text{g/mL}$ CV 组	40 $\mu\text{g/mL}$ CV 组	50 $\mu\text{g/mL}$ CV 组	F
G0/G1	49.80 $\pm$ 0.98	55.30 $\pm$ 0.79 ****	61.20 $\pm$ 0.36 ****	66.03 $\pm$ 1.57 ****	142.4
S	23.37 $\pm$ 1.33	20.87 $\pm$ 0.86 *	19.03 $\pm$ 0.55 **	15.53 $\pm$ 1.80 ****	21.5
G2/M	22.93 $\pm$ 0.47	19.83 $\pm$ 0.95 **	15.73 $\pm$ 0.59 ****	12.50 $\pm$ 1.73 ****	56.1

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

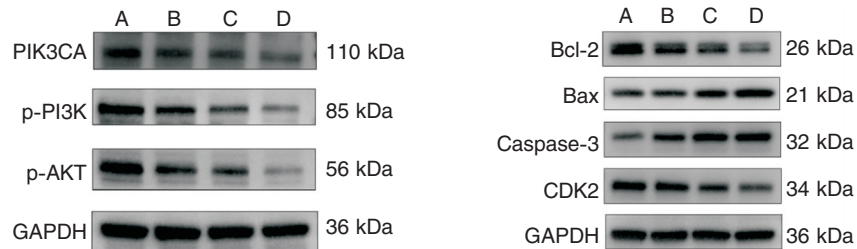


图 10 不同浓度 CV 对 CNE2 细胞内与细胞凋亡及周期相关蛋白表达水平的影响 A: CV 0 $\mu\text{g/mL}$ 组; B: CV 30 $\mu\text{g/mL}$ 组; C: CV 40 $\mu\text{g/mL}$ 组; D: CV 50 $\mu\text{g/mL}$ 组

表 3 不同浓度 CV 对 CNE2 细胞内与细胞凋亡及周期相关蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

类别	对照组	30 $\mu\text{g/mL}$ CV 组	40 $\mu\text{g/mL}$ CV 组	50 $\mu\text{g/mL}$ CV 组	F
p-PI3K/GAPDH	1.01 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.04 ****	0.48 $\pm$ 0.05 ****	0.34 $\pm$ 0.08 ****	84.4
PIK3CA/GAPDH	0.97 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.03 ****	0.63 $\pm$ 0.02 ****	0.43 $\pm$ 0.06 ****	86.5
p-AKT/GAPDH	1.03 $\pm$ 0.06	0.69 $\pm$ 0.09 ***	0.46 $\pm$ 0.09 ****	0.23 $\pm$ 0.02 ****	65.2
Bcl-2/GAPDH	1.09 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.07 **	0.74 $\pm$ 0.03 ****	0.57 $\pm$ 0.02 ****	65.5
Bax/GAPDH	0.59 $\pm$ 0.05	0.73 $\pm$ 0.06 *	0.92 $\pm$ 0.07 ****	1.12 $\pm$ 0.05 ****	50.5
Caspase-3/GAPDH	0.37 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.10 ***	1.04 $\pm$ 0.05 ****	1.21 $\pm$ 0.06 ****	91.2
CDK2/GAPDH	1.11 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.06 *	0.71 $\pm$ 0.06 ****	0.70 $\pm$ 0.06 ****	39.3

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

3 讨论

寻找一种副作用小且具有潜在临床疗效的药物对鼻咽癌的治疗至关重要。CV 常作为食品中的调味或防腐成分^[19],不仅被认为是可以安全食用的,还可能是一种有效抗癌和能降低化疗药物不良反应的天然物质。Yousef 等^[20]研究发现,CV 联合索拉非尼对晚期肝细胞癌的大鼠治疗 6 周,可大幅降低索拉非尼对大鼠的心脏和肝脏毒性,并增强索拉非尼对肝癌的治疗效果。目前没有关于 CV 对鼻咽癌作用的研究报道,这让我们对这种天然化合物的研究产生了浓厚兴趣。

本研究通过网络药理学对 CV 抗鼻咽癌的靶点进行预测,筛选得到 24 个核心靶点。在 KEGG 通路富集分析中,CV 对鼻咽癌的作用可能发生在 PI3K/AKT 等信号通路。分子对接结果显示,CV 与 PI3K、AKT、PIK3CA、Bcl-2、Caspase-3 和 CDK2 的结合能均小于 -5 Kcal/mol。分子动力学模拟表明,CV 能有效适应 CDK2 的动态结构变化,并可通过氢键等强相互作用实现较高的稳定性。以上结果为进一步探索 CV 对鼻咽癌细胞凋亡和周期的作用机制提供了指导和依据。细胞凋亡是一种细胞应对损伤和衰老的自主程序性死亡过程,肿瘤细胞可以免于死亡而进一步增殖,通常可通过诱导癌细胞凋亡达到癌症治疗目的^[21]。Bax 和 Bcl-2 已被证明是调控细胞死亡和细胞存活稳态的重要调节蛋白,Bax 异常升高可以启动细胞程序性死亡,Bcl-2 则阻止凋亡信号的激活从而保护线粒体膜不受破坏,调节细胞存活功能,Bax/Bcl-2 比值升高,可激活凋亡关键执行蛋白 Caspase-3,诱导肿瘤细胞凋亡^[15]。流式细胞术结果显示,与对照组相比,实验组细胞凋亡率明显增加($P<0.05$)。为进一步探究 CV 的促凋亡作用,在分子对接结果指导下,通过 Western blot 检测,实验组细胞较对照组细胞内的 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达增加,而 Bcl-2 蛋白表达减少($P<0.05$),这说明 CV 对肿瘤细胞的杀伤作用可能与凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达升高、Bcl-2 表达降低有关。细胞周期包括 G0/G1、S、G2/M 等基本调控点,其中 CDK2 等蛋白在调控肿瘤细胞周期中发挥着重要作用^[16]。流式细胞术结果显示,与对照组相比,实验组细胞周期明显阻滞在 G0/G1 期(由 49.80% 升高至 66.03%, $P<0.05$),从而抑制细胞增殖。为进一步探索 CV 阻滞周期的机制,本研究采用分子对接技术揭示 CV

与 CDK2 具有较好的结合亲和力,分子动力学模拟进一步证实 CV 与 CDK2 的结合具有较高稳定性。用 Western blot 法检测,实验组细胞较对照组细胞 CDK2 蛋白表达明显减少($P<0.05$),说明 CV 阻滞 CNE2 细胞周期于 G0/G1 期可能和 CDK2 表达降低有关。

PI3K/AKT 信号通路过度活化与鼻咽癌的发生发展密切相关^[22]。本研究分子对接结果显示,CV 分别与 PI3K、AKT、PIK3CA 具有较好的结合亲和力。PIK3CA 是编码 PI3K p110 α 的细胞癌基因,PIK3CA 异常突变能活化 PI3K,进而活化 AKT^[14]。活化的 AKT 可通过磷酸化直接或间接激活下游调控因子(如 Bcl-2、CDK2 等),从而调控细胞凋亡和周期进程^[23]。Western blot 实验结果显示,与对照组相比,实验组 CNE2 细胞内的 PIK3CA、p-PI3K、p-AKT 蛋白表达均降低($P<0.05$),提示 CV 对 CNE2 细胞凋亡和周期的调控可能与 PIK3CA、p-PI3K、p-AKT 蛋白表达降低有关。

综上所述,本研究证实了 CV 诱导 CNE2 细胞凋亡和周期阻滞可能与 PI3K/AKT 信号通路相关的 PIK3CA、p-PI3K、p-AKT、Bcl-2、CDK2 蛋白表达降低及 Bax、Caspase-3 蛋白表达升高有关,并为 CV 治疗鼻咽癌的实验研究提供了依据和参考,提示 CV 可能是一种有潜在价值的抗鼻咽癌天然化合物。但本研究未验证其他 KEGG 富集通路,如 MAPK 等通路,未在多株鼻咽癌细胞中进行实验,故需在后续研究中加以完善。

参考文献:

- [1] Yuan Y, Ye F, Wu JH, et al. Early screening of nasopharyngeal carcinoma[J]. Head Neck, 2023, 45(10): 2700-2709.
- [2] 王艳丽,李钦,秦娜娜,等. EB 病毒抗体联合检测在临沂地区鼻咽癌筛查中的应用研究[J]. 中国耳鼻喉咽喉颅底外科杂志, 2023, 29(6): 11-15.
- [3] Han B, Zheng R, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53.
- [4] Huang H, Yao Y, Deng X, et al. Immunotherapy for nasopharyngeal carcinoma: Current status and prospects (Review)[J]. Int J Oncol, 2023, 63(2): 97.
- [5] 谢民强. 鼻咽癌治疗研究进展[J]. 中国耳鼻喉咽喉颅底外科杂志, 2023, 29(6): 1-10.
- [6] Naeem A, Hu P, Yang M, et al. Natural products as anticancer agents: Current status and future perspectives [J]. Molecules, 2022, 27(23): 8367.
- [7] Friedman M. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils

- produced by aromatic plants and spices[J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(31): 7652–7670.
- [8] Mari A, Mani G, Nagabhishek SN, et al. Carvacrol promotes cell cycle arrest and apoptosis through PI3K/AKT signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells[J]. Chin J Integr Med, 2021, 27(9): 680–687.
- [9] Liu H, Xu X, Wu R, et al. Antitumor squamous cell carcinoma effects of carvacrol via inhibiting inflammation, proliferation, and migration related to Nf2/Keap1 pathway[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6616547.
- [10] Zhang S, He L, Shang J, et al. Carvacrol suppresses human osteosarcoma cells via the Wnt/ β -Catenin signaling pathway[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2022, 22(9): 1714–1722.
- [11] Liu Y, Yang X, Gan J, et al. CB-Dock2: improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(W1): W159–W164.
- [12] Pronk S, Páll S, Schulz R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit[J]. Bioinformatics, 2013, 29(7): 845–854.
- [13] Elekofehinti OO, Iwaloye O, Josiah SS, et al. Molecular docking studies, molecular dynamics and ADME/tox reveal therapeutic potentials of STOCK1N-69160 against papain-like protease of SARS-CoV-2[J]. Mol Divers, 2021, 25(3): 1761–1773.
- [14] 郑丹, 鲍蕾蕾, 卞俊. 靶向 PIK3CA 突变的抗肿瘤药物研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(2): 175–182.
- [15] Permatasari HK, Wewengkang DS, Tertiana NI, et al. Anti-cancer properties of *Caulerpa racemosa* by altering expression of Bcl-2, BAX, cleaved caspase 3 and apoptosis in HeLa cancer cell culture[J]. Front Oncol, 2022, 12: 964816–964827.
- [16] 李亚威, 穆立芹, 刘世君, 等. 乙酰紫草素对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡及周期的影响[J]. 中成药, 2023, 45(6): 2028–2032.
- [17] Huang X, Rehman HM, Szöllösi AG, et al. Network pharmacology-based approach combined with bioinformatic analytics to elucidate the potential of curcumin against hepatocellular carcinoma[J]. Genes (Basel), 2022, 13(4): 653.
- [18] Cheng T, Li X, Li Y, et al. Comparative assessment of scoring functions on a diverse test set[J]. J Chem Inf Model, 2009, 49(4): 1079–1093.
- [19] Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2015, 55(3): 304–318.
- [20] Yousef EH, Abo El-Magd NF, El Gayar AM. Carvacrol enhances anti-tumor activity and mitigates cardiotoxicity of sorafenib in thioacetamide-induced hepatocellular carcinoma model through inhibiting TRPM7[J]. Life Sci, 2023, 324: 121735.
- [21] Morana O, Wood W, Gregory CD. The apoptosis paradox in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1328.
- [22] Fan X, Xie X, Yang M, et al. YBX3 mediates the metastasis of nasopharyngeal carcinoma via PI3K/AKT signaling[J]. Front Oncol, 2021, 11: 617621.
- [23] Kalous J, Aleshkina D, Anger M. A role of PI3K/Akt signaling in oocyte maturation and early embryo development[J]. Cells, 2023, 12(14): 1830.
- (收稿日期: 2025-03-13)
- 本文引用格式:** 谢卓良, 徐玮, 赵锐, 等. 基于网络药理学与体外实验探讨香荆芥酚诱导鼻咽癌细胞凋亡和周期阻滞的作用机制[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2026, 32(3): 53–60. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202625111
- Cite this article as:** XIE Zhuoliang, XU Wei, ZHAO Rui, et al. Exploration on the mechanisms of carvacrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in nasopharyngeal carcinoma cells based on network pharmacology and in vitro experiments[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2026, 32(3): 53–60. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202625111