

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.07.007

· 基础研究 ·

川楝素经 AKT/mTOR 通路下调 HIF1A 表达抑制食管鳞状细胞癌 KYSE150 细胞的恶性生物学行为

楚月明^{1,2}, 朱茂菲^{1,2}, 蒋杭遇³, 袁强¹, 李兴^{1,2}, 刘康⁴, 李林^{1,5} (1. 川北医学院第二临床医学院 药学部, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院 药学院, 四川 南充 637000; 3. 川北医学院附属医院, 四川 南充 637000; 4. 川北医学院第二临床医学院 组织工程与干细胞研究所, 四川 南充 637000; 5. 四川省南充市个体化药物治疗重点实验室, 四川 南充 637000)

[摘要] **目的:** 探讨川楝素(TSN)对食管鳞状细胞癌(ESCC) KYSE150细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响及其分子机制。**方法:** 通过CCK-8法、克隆形成和EdU实验检测不同浓度TSN(0.062 5、0.125、0.25 $\mu\text{mol/L}$)对KYSE150细胞增殖的影响, 流式细胞术、划痕实验和Transwell实验检测TSN对KYSE150细胞凋亡、迁移和侵袭的影响。通过GEPIA数据库数据分析食管癌组织中低氧诱导因子1 α (HIF1A)的表达, qPCR法检测人食管上皮细胞Het-1A和KYSE150细胞, 以及TSN处理的各组KYSE150细胞中HIF1A mRNA的表达水平。WB法检测TSN对HIF1A的上游信号通路AKT/mTOR和下游与细胞迁移、侵袭和凋亡相关蛋白表达的影响。**结果:** 经不同浓度TSN处理后, KYSE150细胞的增殖、迁移和侵袭能力均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。HIF1A mRNA在KYSE150细胞中呈高表达($P < 0.05$), TSN处理后KYSE150细胞中HIF1A mRNA表达显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。TSN能够显著抑制KYSE150细胞中HIF1A及其上游通路关键蛋白p-AKT、p-mTOR及下游迁移、侵袭和凋亡相关蛋白N-cadherin、vimentin、Bcl-2、caspase-3的表达均显著下调, E-cadherin表达上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** TSN通过AKT/mTOR信号通路下调HIF1A表达, 从而抑制KYSE150细胞增殖、迁移、侵袭并诱导细胞凋亡。

[关键词] 川楝素; 低氧诱导因子1 α ; 食管鳞状细胞癌; KYSE150细胞; 增殖; 迁移; 侵袭; AKT/mTOR通路
[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)07-0723-08

Toosendanin inhibits the malignant biological behaviors of esophageal squamous cell carcinoma KYSE150 cells by downregulating HIF1A expression via the AKT/mTOR pathway

CHU Yue-ming^{1,2}, ZHU Mao-fei^{1,2}, JIANG Hang-yu³, YUAN Qiang¹, LI Xing^{1,2}, LIU Kang⁴, LI Lin^{1,5} (1. Department of Pharmacy, The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China; 2. School of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China; 3. Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China; 4. Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China; 5. Nanchong Key Laboratory of Individualized Drug Therapy, Nanchong 637000, Sichuan, China;)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of toosendanin (TSN) on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) KYSE150 cells, and to elucidate its underlying molecular mechanisms. **Methods:** CCK-8 assay, colony formation assay, and EdU assay were used to assess the effects of varying TSN concentrations (0.062 5, 0.125, and 0.25 $\mu\text{mol/L}$) on KYSE150 cell proliferation. The impacts of TSN on the apoptosis, migration, and invasion of KYSE150 cells were evaluated using flow cytometry, wound healing assay, and Transwell chamber assay, respectively. The expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1A) in esophageal cancer tissues was analyzed using the GEPIA database. qPCR was used to detect the expression level of HIF1A mRNA in human esophageal epithelial Het-1A and KYSE150 cells, and in TSN-treated KYSE150 cells. Western blot (WB) was performed to detect the effects of TSN on the upstream signaling pathway AKT/mTOR of HIF1A and the expression of

[基金项目] 南充市2023年市级科技研发计划专项(No. 23JCYPJT0026)

[作者简介] 楚月明(2000—), 女, 硕士, 主要从事小分子药物抗食管癌生物治疗研究

[通信作者] 李林(扫码获取作者联系方式)



downstream proteins related to cell migration, invasion, and apoptosis. **Results:** TSN of varying concentrations significantly inhibited proliferation, migration, and invasion of KYSE150 cells and promoted apoptosis in a dose-dependent manner ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). HIF1A mRNA was highly expressed in KYSE150 cells, and its expression was significantly downregulated after TSN treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). TSN markedly downregulated the expression of HIF1A and key upstream signaling proteins p-AKT and p-mTOR. In addition, TSN significantly suppressed the expression of downstream proteins associated with cell migration, invasion, and apoptosis, including N-cadherin, vimentin, Bcl-2, and caspase-3, while upregulating the expression of E-cadherin ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** TSN inhibits the proliferation, migration, and invasion, and induces apoptosis in ESCC KYSE150 cells by down-regulating HIF1A expression through suppression of the AKT/mTOR signaling pathway.

[Key words] toosendanin (TSN); hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1A); esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); KYSE150 cell; proliferation; migration; invasion; AKT/mTOR pathway

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(7): 723-730. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.07.007]

食管癌是全球第六大致死性恶性肿瘤,其中食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)约占90%,尤其是在中国和其他东亚国家^[1]。ESCC因其发病隐匿、预后差,以及易耐药等带来了严重的疾病负担和社会负担^[2-3]。因此,亟待寻找具有更好疗效的新型药物和有效的治疗方式。低氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF1A)是一种转录激活因子,是mTOR的下游转录因子,能够促进肿瘤细胞增殖、侵袭和肿瘤进展^[4]。HIF1A可诱导上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),这是肿瘤转移的关键过程。研究^[5-6]显示,HIF1A与ESCC的发生发展和预后密切相关,已经成为ESCC潜在的治疗靶点。川楝素(toosendanin, TSN)是一种从药材川楝子中纯化的三萜类化合物。现代药效学研究^[7-8]表明,TSN具有很强的药理活性,不仅包括抗肿瘤、抗病毒和抗寄生虫等多种作用,此外,TSN还能通过诱导肿瘤细胞凋亡,抑制其增殖、迁移、侵袭等途径,影响多种肿瘤的发生发展。有研究^[9-10]验证了TSN能够通过AKT/mTOR信号通路诱导胰腺癌细胞凋亡。然而,TSN能否通过调控AKT/mTOR信号通路抑制HIF1A影响ESCC细胞的恶性生物学行为,目前尚不清楚。本研究深入探讨TSN对ESCC细胞KYSE150增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响及其潜在的分子机制,旨在为临床运用TSN治疗ESCC提供理论基础和治疗策略。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物及主要试剂

人ESCC细胞KYSE150和人食管上皮细胞Het-1A购自中国科学院细胞库。TSN(纯度 $\geq 98\%$)购自MCE公司。RPMI 1640培养基、0.25%胰蛋白酶和胎牛血清购自美国Invitrogen公司,CCK-8和Annexin V-FITC/PI检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司,RNA提取试剂、逆转录试剂盒和SYBR Green Master Mix均购自南京诺唯赞生物有限

公司,EdU增殖、BCA蛋白定量检测试剂盒和DMSO购自北京索莱宝科技有限公司,Bcl-2、caspase-3、N-cadherin、vimentin、p-AKT、AKT、p-mTOR、mTOR、 β -actin、GAPDH一抗和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG均购自杭州华安生物技术有限公司,HIF1A、E-cadherin一抗购自安诺伦北京生物科技有限公司,SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、通用型抗体稀释液、增强型RIPA裂解缓冲液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和双色预染marker均购自上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.2 细胞培养、TSN处理及分组

正常食管上皮细胞Het-1A用含有10%胎牛血清的BEGM Bullet Kit培养基中培养,KYSE150细胞用含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养,然后在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。

本研究根据TSN理化性质采用DMSO为溶剂来配制TSN。参照MCE公司说明书,加入适量的DMSO配制20 mmol/L的TSN母液。为研究TSN对ESCC KYSE150细胞恶性生物学行为的影响,将对数生长期的KYSE150细胞随机分为4组:对照组(不含TSN的常规培养组)、0.062 5 μ mol/L TSN组、0.125 μ mol/L TSN组、0.25 μ mol/L TSN组。

1.3 CCK-8法检测TSN对KYSE150细胞活力的影响

将KYSE150细胞以 6×10^3 个/孔接种于96孔板,待细胞完全贴壁,用含有不同浓度TSN(0.062 5、0.125、0.25、0.5、1.0 μ mol/L)的培养基分别处理24、48、72 h;另外,设置对照组和不含TSN的培养基与不含细胞为空白对照组。每孔加入10 μ L CCK-8试剂、培养箱中避光处理1 h,采用酶标仪检测在450 nm处各孔细胞的光密度(D)值,以 D 值表示细胞活力。按照公式“细胞存活率=(实验组 D 值-空白对照 D 值)/(对照组 D 值-空白对照 D 值) $\times 100\%$ ”计算细胞存活率。

1.4 克隆形成实验检测TSN对KYSE150细胞克隆形成的影响

取对数生长期的KYSE150细胞,以每孔 1×10^3

个细胞密度接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,将各组细胞分别处理 48 h 后,换为不含 TSN 的正常培养基继续培养 7 d。后用 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min,结晶紫染色后,显微镜下观察并拍照,计数 50 个以上细胞的集落。按照公式“克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%”计算细胞克隆形成率。

1.5 EdU 实验检测 TSN 对 KYSE150 细胞增殖的影响

将 KYSE150 细胞以每孔 5×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板上,待细胞贴壁后,将各组细胞分别处理 48 h。将 EdU 试剂以 1:500 比例稀释在培养基中,再与等体积的原有培养基混合后,继续培养 6 h。加入 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min,经甘氨酸处理,PBS 清洗,并用 0.1% Triton X-100 通透细胞,每孔中加入 200 μ L 反应液,加入 Hoechst 染色细胞核,PBS 清洗后,在荧光显微镜下观察并拍照。按照公式“EdU 阳性细胞率=(EdU 阳性细胞数/Hoechst 阳性细胞总数)×100%”计算 EdU 阳性细胞率。

1.6 流式细胞术检测 TSN 对 KYSE150 细胞凋亡的影响

将 KYSE150 细胞以 5×10^5 个接种到 6 孔板中,细胞贴壁后,将各组细胞分别处理 48 h。收集细胞,用 PBS 清洗 2 次,用 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒,避光加入 5 μ L FITC 和 PI 染料室温染色 15 min 后,加入 400 μ L 上样缓冲液并混匀,最后,上流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

1.7 划痕愈合实验检测 TSN 对 KYSE150 细胞迁移的影响

将 5×10^5 个 KYSE150 细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,用 200 μ L 移液器吸头尖在孔板中划痕,并在孔板底部标记。随后,将细胞置于含 2% 胎牛血清的培养基中培养,将各组细胞分别处理 24 和 48 h,显微镜下拍照后,使用 Image J 8.0 软件计算划痕迁移率。按照公式“划痕愈合率=(初始划痕面积-最终划痕面积)/初始划痕面积×100%”计算细胞划痕愈合率。

1.8 Transwell 实验检测 TSN 对 KYSE150 细胞迁移及侵袭的影响

在 Transwell 小室中进行侵袭与迁移实验。侵袭实验时,先用无血清培养基稀释的基质胶铺于小室,迁移实验则不需预铺基质胶。将 Transwell 小室置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 2 h。将密度为 6×10^4 个/孔的 KYSE150 细胞悬液与 200 μ L 无血清培养基混合后加入小室上室中,下室加入 600 μ L 含 15% 胎牛血清的培养基。在培养箱中培养 48 h 后,弃去培养基,加入 4% 多聚甲醛溶液固定细胞,擦去上室未迁移或侵袭的细胞,PBS 清洗后结晶紫染色。最后,在显微镜下拍照,使用 Image J 8.0 软件对迁移与侵袭细胞进行计数。

1.9 qPCR 法检测 TSN 对 KYSE150 细胞 HIF1A mRNA 表达的影响

用 RNA 提取试剂盒抽提各组 KYSE150 细胞总 RNA,后逆转录为 cDNA。将逆转录后的 cDNA 进行 qPCR 扩增,以 GAPDH 为内参,检测 HIF1A mRNA 表达水平。引物序列:HIF1A 正向引物为 5'-GAACGT CGAAAAGAAAAGTCTCG-3',反向引物为 5'-CCT TATCAAGATGCGAACTCACA-3';GAPDH 正向引物为 5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCA-3',反向引物为 5'-GTCATGAGTCCTTCCACGATA CC-3'。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s,共计 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因 mRNA 的相对表达量。

1.10 WB 法检测 TSN 对 KYSE150 细胞中 EMT 和凋亡相关蛋白表达的影响

将 KYSE150 细胞以每孔 5×10^5 个接种到 6 孔板中,待细胞贴壁后,将各组细胞分别处理 48 h。弃去培养基,收集细胞,配置细胞裂解液,超声裂解 1 min,离心,取上清液,加入上样缓冲液混匀,100 $^{\circ}$ C 加热 5 min。进行 SDS-PAGE 分离蛋白质,半干转膜 30 min,在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h,加入 HIF1A (1:1 000)、E-cadherin (1:5 000)、N-cadherin (1:1 000)、vimentin (1:10 000)、caspase-3 (1:2 000)、Bcl-2 (1:5 000)、p-AKT (1:5 000)、AKT (1:5 000)、p-mTOR (1:5 000)、mTOR (1:5 000)、 β -actin (1:60 000)、GAPDH (1:10 000) 一抗,4 $^{\circ}$ C 下处理过夜。次日,洗膜后,加入稀释比例为 1:10 000 的 HRP 标记山羊抗兔 IgG,室温下反应 1 h,采用 ECL 化学发光液显色,采用 Image J 图像分析软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.11 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析。呈正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

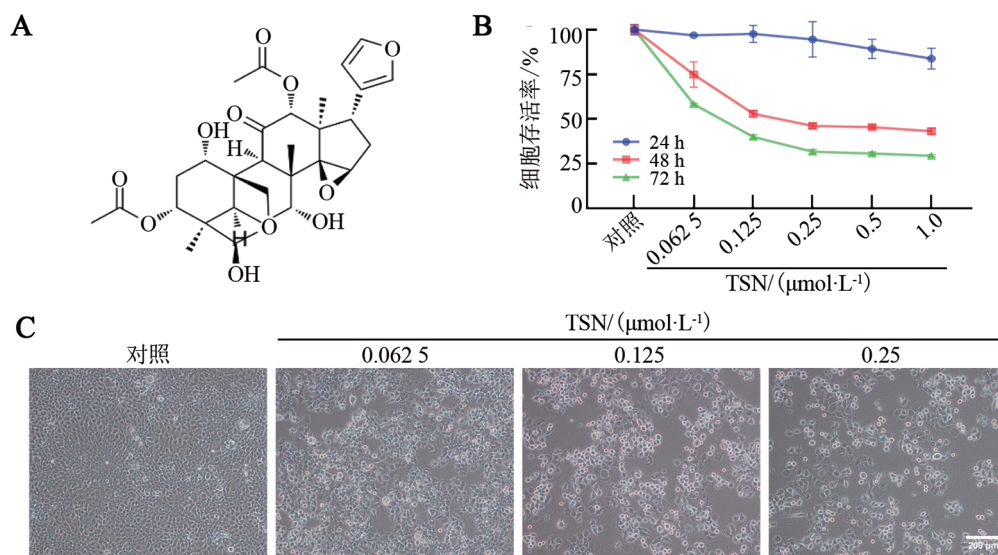
2 结果

2.1 TSN 显著抑制 KYSE150 细胞活力

TSN 的化学结构式如图 1A 所示。用不同浓度的 TSN 处理 KYSE150 细胞 24、48、72 h 后,CCK-8 法检测结果(图 1B)显示,TSN 显著抑制 KYSE150 细胞的细胞活力,TSN 干预 24、48 和 72 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 4.48、0.28 和 0.07 μ mol/L。因此,选取终浓度分别为 0.062 5、0.125、0.25 μ mol/L 的 TSN 处理 KYSE150 细胞 48 h 后,进行后续实验。在光学显微

镜下观察,经TSN处理后的KYSE150细胞呈现出细胞数量明显减少、细胞质皱缩、贴壁性差、细胞碎片

增加等现象(图1C),表明TSN能够显著抑制KYSE150细胞的增殖活力。



A: TSN 的结构式; B: CCK-8 法检测 KYSE150 细胞活力; C: 光学显微镜观察 KYSE150 细胞形态变化。

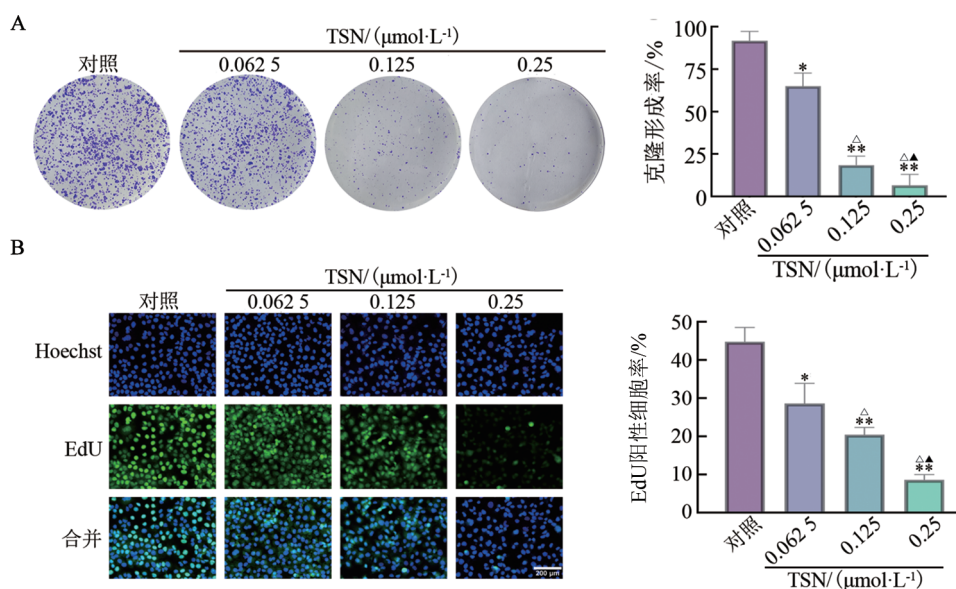
图1 不同浓度 TSN 对 KYSE150 细胞存活率和细胞形态的影响

2.2 TSN 显著抑制 KYSE150 细胞的增殖能力

克隆形成实验检测结果(图2A)表明,与对照组相比,0.0625、0.125、0.25 $\mu\text{mol/L}$ TSN 组 KYSE150 细胞的克隆形成能力均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。EdU 实验结果(图2B)显示,TSN 能够显著降低 KYSE150 细胞的 EdU 阳性率($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明,TSN 能够显著抑制 KYSE150 细胞的增殖能力。

2.3 TSN 诱导 KYSE150 细胞凋亡

TSN 处理 48 h 后,流式细胞术检测结果(图3A)显示,与对照组相比,0.0625、0.125、0.25 $\mu\text{mol/L}$ TSN 组 KYSE150 细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其促凋亡作用呈现明显的浓度依赖性($P < 0.05$)。结果表明,TSN 能显著诱导 KYSE150 细胞凋亡。



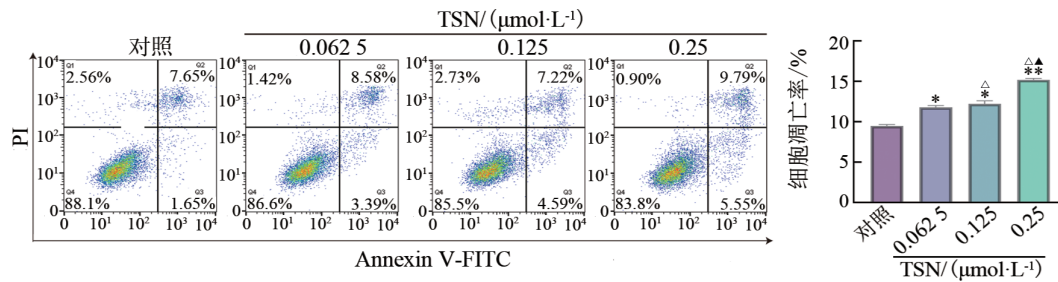
A: 克隆形成实验检测 KYSE150 细胞的克隆形成能力; B: EdU 实验检测 TSN 处理 48 h 后 KYSE150 细胞增殖能力。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与 0.0625 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $\Delta P < 0.05$; 与 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图2 不同浓度 TSN 对 KYSE150 细胞增殖的影响

2.4 TSN 可抑制 KYSE150 细胞的迁移和侵袭能力

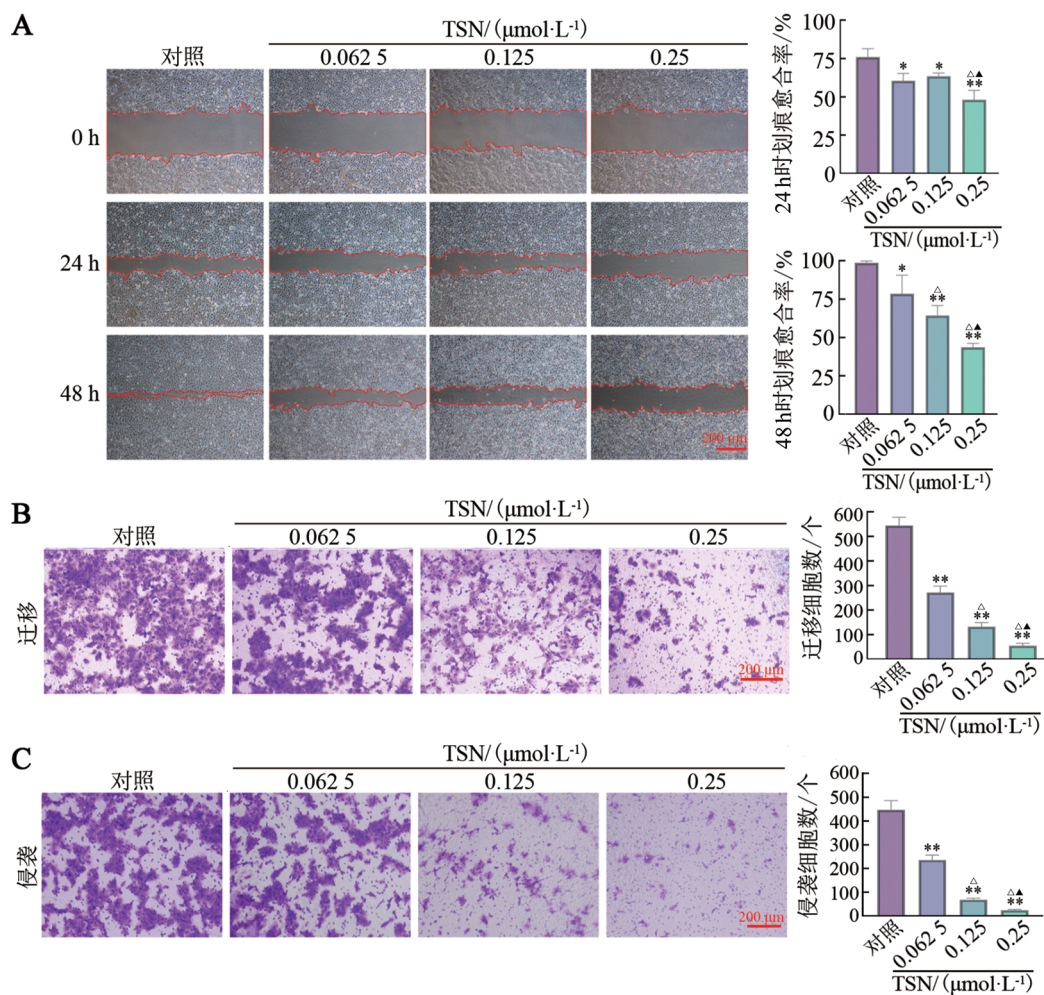
划痕愈合实验结果(图 4A)显示,与对照组相比,0.062 5、0.125、0.25 $\mu\text{mol/L}$ TSN 组 KYSE150 细胞划痕愈合率均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其在 48 h 抑制效果随着药物浓度的升高而增加($P < 0.05$)。

Transwell 实验结果(图 4B、C)显示,与对照组比,TSN 能够显著降低 KYSE150 细胞的迁移和侵袭能力(均 $P < 0.01$)。实验结果表明,TSN 可以抑制 KYSE150 细胞的迁移和侵袭能力。



与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与 0.062 5 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $\Delta P < 0.05$; 与 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 3 流式细胞术检测 TSN 对 KYSE150 细胞凋亡的影响



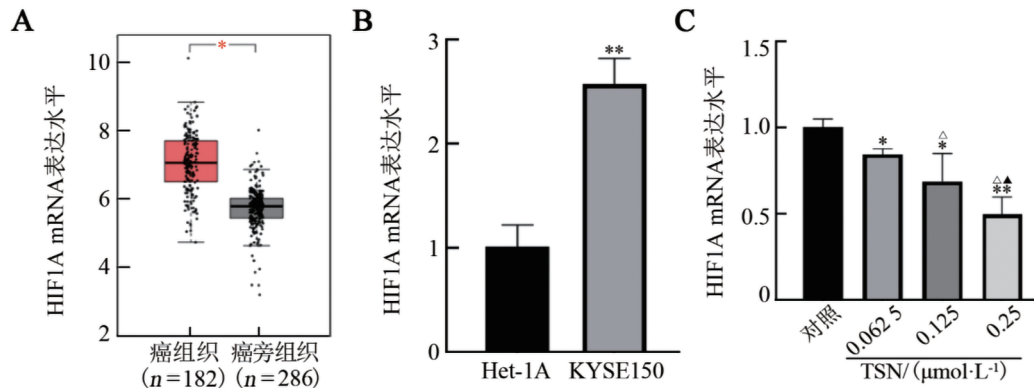
A: 划痕实验检测细胞迁移能力; B、C: Transwell 实验检测细胞的迁移(B)和侵袭(C)能力。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与 0.062 5 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $\Delta P < 0.05$; 与 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 4 TSN 抑制 KYSE150 细胞的迁移及侵袭能力

2.5 HIF1A mRNA 在食管癌组织中呈高表达, TSN 能够下调 KYSE150 细胞中 HIF1A 表达水平

通过 GEPIA 数据库预测 HIF1A 在食管癌和癌旁组织组织中的差异表达, 结果(图 5A)显示, 在食管癌组织中 HIF1A mRNA 表达水平显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。qPCR 法验证结果(图 5B)显示,

KYSE150 细胞中 HIF1A mRNA 表达水平显著高于 Het-1A 细胞 ($P < 0.01$); TSN 呈浓度依赖性地降低 KYSE150 细胞中 HIF1A mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 5C)。结果表明, HIF1A mRNA 在食管癌组织和细胞中均呈高表达状态; TSN 能够调控 ESCC 细胞中 HIF1A 的表达。



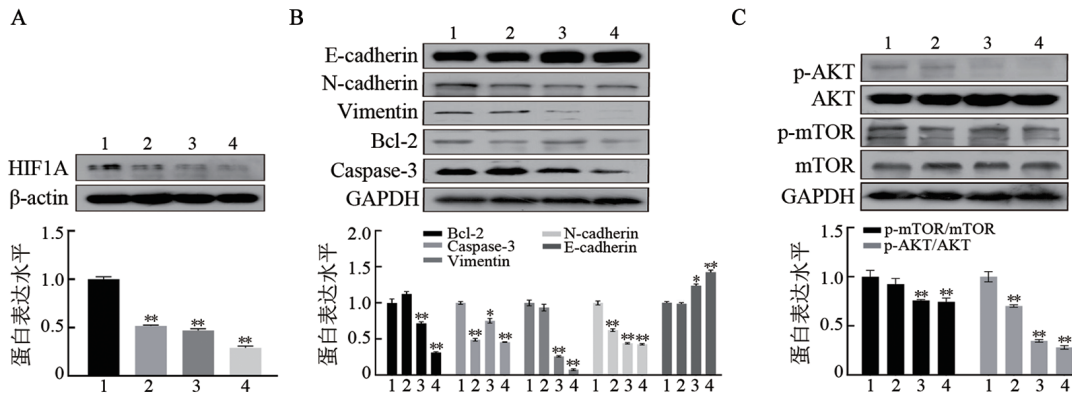
A: GEPIA 数据库分析食管癌组织与癌旁组织中 HIF1A mRNA 表达水平; B: qPCR 法检测 KYSE150 细胞和 Het-1A 细胞中 HIF1A mRNA 表达水平; C: 不同浓度 TSN 处理组 KYSE150 细胞中 HIF1A mRNA 的表达水平。与 Het-1A 细胞或对照组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与 0.0625 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$; 与 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图 5 HIF1A mRNA 在食管癌中呈高表达且 TSN 抑制 HIF1A 在 KYSE150 细胞中的表达

2.6 TSN 通过抑制 AKT/mTOR 通路下调 HIF1A 表达, 进而抑制下游 EMT 及凋亡相关蛋白的表达

WB 法检测结果(图 6A)显示, 与对照组相比, 0.0625、0.125、0.25 $\mu\text{mol/L}$ TSN 组 KYSE150 细胞中 HIF1A 的蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.01$)。进一步评估 TSN 对 KYSE150 细胞中的 EMT、凋亡和 AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响, 结果发现, 与对照组相比, TSN 处理组细胞中 E-cadherin 表

达显著上调, N-cadherin、vimentin、Bcl-2、caspase-3 表达均显著下调(图 6B, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); AKT/mTOR 信号通路相关蛋白及 p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 比值均显著下降(图 6C, 均 $P < 0.01$)。结果表明, TSN 能够显著抑制 HIF1A 蛋白的表达, 并通过调节 KYSE150 细胞中的 EMT 过程、促进细胞凋亡以及抑制 AKT/mTOR 信号通路来发挥其生物学效应。



1: 对照组; 2: 0.0625 $\mu\text{mol/L}$ TSN 组; 3: 0.125 $\mu\text{mol/L}$ TSN 组; 4: 0.25 $\mu\text{mol/L}$ TSN 组。

A: WB 法检测 TSN 处理各组细胞中 HIF1A 蛋白表达水平; B: WB 法检测 TSN 处理各组细胞中 HIF1A 影响的凋亡、迁移和侵袭相关蛋白的表达; C: WB 法验证 HIF1A 上游通路中关键蛋白的表达水平。与对照组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图 6 TSN 通过阻滞 AKT/mTOR 信号通路下调 HIF1A 抑制下游 EMT 及凋亡相关蛋白的表达

3 讨论

食管癌是一种病死率高、预后较差的恶性肿瘤, 患者 5 年生存率低于 25%^[11-12]。目前, 食管癌的根治性治疗手段仍以化疗联合手术治疗为主, 但仍有 40%~60% 早期 ESCC 患者术后出现复发和转移^[13-14]。缺氧是实体瘤的常见特征, 可促进侵袭性、转移性和耐药性特征的发展^[15]。研究^[16-17]表明, HIF1A 涉及肿瘤细胞增殖和凋亡及肿瘤生长与转移等多个方面, 且与肿瘤患者的肿瘤转移增加和预后不良有关。因此, 亟待寻找新的治疗策略和候选药物。TSN 能够通过影响 AKT/GSK-3 β / β -catenin 诱导细胞凋亡并抑制结肠癌细胞的增殖, 其还通过调控 AKT/mTOR 信号转导抑制胰腺癌细胞的增殖和 EMT 过程^[9, 18]。然而, 关于 TSN 对 ESCC 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭中的机制尚未明了。因此, 本研究首先通过体外实验验证了 TSN 能够下调 HIF1A mRNA 水平, 然后对 KYSE150 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭及其相关机制进行了研究, 结果表明, TSN 能抑制 KYSE150 细胞的增殖并诱导细胞凋亡, 其机制主要与通过 AKT/mTOR 信号通路下调 HIF1A 的表达有关。

由于缺氧是一种常见现象, 通常与肿瘤的发生、进展、转移和预后有关, 是实体瘤的关键指标, HIF1A 作为缺氧的关键标志物, 可促进 EMT 进程^[19]。本研究通过 TCGA 数据库预测发现, HIF1A 在食管癌组织中呈高表达, 通过 qPCR 法实验证实了 HIF1A 在 KYSE150 细胞中高表达。其次, 经不同浓度的 TSN 处理后, qPCR 法检测结果发现, TSN 能够有效下调 KYSE150 细胞中 HIF1A mRNA 的表达水平。为进一步探究 TSN 对 ESCC 细胞的生物学功能的影响, 本研究采用 TSN 处理 KYSE150 细胞后, 发现随着 TSN 处理时间和浓度的增加, KYSE150 细胞存活率及增殖能力均显著降低。

长期以来, 诱导和促进细胞凋亡被认为是抗肿瘤的重要机制之一。在肿瘤细胞中, caspase 级联反应是细胞凋亡过程的关键步骤, 其启动受到抗凋亡因子 Bcl-2 调节, 启动性 caspase 被激活后调控下游执行性 caspase-3 进而引起凋亡反应^[20-21]。流式细胞术检测结果发现, 经不同浓度 TSN 处理后, KYSE150 细胞凋亡率呈浓度依赖性增加, 细胞中 Bcl-2 蛋白表达量减少, caspase-3 活化增加, 促进细胞凋亡。EMT 存在于大多数实体瘤中, HIF1A 可促进 EMT 的发生, 与肿瘤细胞迁移和侵袭能力密切相关^[19]。划痕和 Transwell 实验检测结果发现, 经不同浓度 TSN 处理后, KYSE150 细胞的迁移和侵袭能力均显著降低, 细胞中 EMT 标志物表达变化为: E-cadherin 的表达增

加, 而 N-cadherin 和 vimentin 表达减少。AKT/mTOR 信号通路在正常细胞生理过程中发挥关键作用, 同时在多种类型肿瘤中该通路的异常激活对细胞凋亡、化疗耐药性及转移过程产生重要影响^[22-23]。经 TSN 处理后, KYSE150 细胞中激活的 p-AKT 和 p-mTOR 蛋白水平显著下降, AKT/mTOR 信号通路受到抑制, 进而诱导 KYSE150 细胞凋亡并抑制细胞增殖、迁移和侵袭。

综上所述, 本研究揭示了 TSN 通过 AKT/mTOR 信号通路下调 HIF1A 表达, 抑制 KYSE150 细胞的增殖、迁移和侵袭并诱导凋亡的初步分子机制, 为 TSN 在 ESCC 治疗中的应用提供了有力的证据。然而, 本研究仍存在一定局限性。例如: 尚未建立完善的动物模型实验来进一步验证 TSN 在体内的作用; 未采用激活剂激活 AKT/mTOR 信号通路来进一步验证 TSN 的调控机制。因此, 未来的研究应完善 TSN 在动物模型中的疗效和进一步证实其对 AKT/mTOR 信号通路及 HIF1A 的调控作用, 从而使研究结果更具说服力, 为 TSN 临床应用奠定坚实的基础。

[参考文献]

- [1] CHEN R, ZHENG R S, ZHANG S W, *et al.* Patterns and trends in esophageal cancer incidence and mortality in China: an analysis based on cancer registry data[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2023, 3(1): 21-27. DOI:10.1016/j.jncc.2023.01.002.
- [2] SHEIKH M, ROSHANDEL G, MCCORMACK V, *et al.* Current status and future prospects for esophageal cancer[J/OL]. *Cancers*, 2023, 15(3): 765[2024-10-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36765722/>. DOI:10.3390/cancers15030765.
- [3] DEBOEVER N, JONES C M, YAMASHITA K, *et al.* Advances in diagnosis and management of cancer of the esophagus[J/OL]. *BMJ*, 2024, 385: e074962[2024-10-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38830686/>. DOI:10.1136/bmj-2023-074962.
- [4] LIU D F, LUO X Y, XIE M, *et al.* HNRNPC downregulation inhibits IL-6/STAT3-mediated HCC metastasis by decreasing HIF1A expression [J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(10): 3347-3361. DOI:10.1111/cas.15494.
- [5] TANG K, TOYOZUMI T, MURAKAMI K, *et al.* HIF-1 α stimulates the progression of oesophageal squamous cell carcinoma by activating the Wnt/ β -catenin signalling pathway[J]. *Br J Cancer*, 2022, 127(3): 474-487. DOI:10.1038/s41416-022-01825-3.
- [6] GUO D L, JIN J, LIU J H, *et al.* Baicalein inhibits the progression and promotes radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma by targeting HIF-1A[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 2423-2436. DOI:10.2147/DDDT.S370114.
- [7] HU M H, XU M, CHEN Y C, *et al.* Therapeutic potential of toosendanin: Novel applications of an old ascaris repellent as a drug candidate[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167: 115541[2024-10-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37738795/>. DOI:10.1016/j.biopha.2023.115541.
- [8] ZHANG J N, YANG F, MEI X Y, *et al.* Toosendanin and isotoosendanin suppress triple-negative breast cancer growth via inducing necrosis,

- apoptosis and autophagy[J/OL]. *Chem Biol Interact*, 2022, 351: 109739 [2024-10-07]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000927972100377X?via%3Dihub>. DOI:10.1016/j.cbi.2021.109739.
- [9] PEI Z, FU W, WANG G P. A natural product toosendanin inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in pancreatic cancer *via* deactivating Akt/mTOR signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 493(1): 455-460. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.08.170.
- [10] LORUSSO P M. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway in solid tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(31): 3803-3815. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.0018.
- [11] KELLY R J. Emerging multimodality approaches to treat localized esophageal cancer[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2019, 17(8): 1009-1014. DOI:10.6004/jnccn.2019.7337.
- [12] WANG L, LIU H J, LIU Y Q, *et al*. Potential markers of cancer stem-like cells in ESCC: a review of the current knowledge[J/OL]. *Front Oncol*, 2024, 13: 13248198[2024-10-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38239657/>. DOI:10.3389/fonc.2023.1324819.
- [13] GAVIN A T, FRANCISCI S, FOSCHI R, *et al*. Oesophageal cancer survival in Europe: a EURO CARE-4 study[J]. *Cancer Epidemiol*, 2012, 36(6): 505-512. DOI:10.1016/j.canep.2012.07.009.
- [14] HOU H F, MENG Z X, ZHAO X, *et al*. Survival of esophageal cancer in China: a pooled analysis on hospital-based studies from 2000 to 2018 [J/OL]. *Front Oncol*, 2019, 9: 5488[2024-10-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31316913/>. DOI:10.3389/fonc.2019.00548.
- [15] WANG G L, SEMENZA G L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(3): 1230-1237. DOI:10.1074/jbc.270.3.1230.
- [16] BARSOUM I B, KOTI M, ROBERT SIEMENS D, *et al*. Mechanisms of hypoxia-mediated immune escape in cancer[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(24): 7185-7190. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2598.
- [17] MA Z W, WANG L Z, CHENG J T, *et al*. Targeting hypoxia-inducible factor-1-mediated metastasis for cancer therapy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 34(18): 1484-1497. DOI:10.1089/ars.2019.7935.
- [18] WANG G, FENG C C, CHU S J, *et al*. Toosendanin inhibits growth and induces apoptosis in colorectal cancer cells through suppression of AKT/GSK-3 β -catenin pathway[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5): 1767-1774. DOI:10.3892/ijo.2015.3157.
- [19] SCHITO L, SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factors: master regulators of cancer progression[J]. *Trends Cancer*, 2016, 2(12): 758-770. DOI:10.1016/j.trecan.2016.10.016.
- [20] ANTONSSON B, CONTI F, CIAVATTA A, *et al*. Inhibition of bax channel-forming activity by Bcl-2[J]. *Science*, 1997, 277(5324): 370-372. DOI:10.1126/science.277.5324.370.
- [21] ESKANDARI E, EAVES C J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis[J/OL]. *J Cell Biol*, 2022, 221(6): e2022011598[2024-10-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35551578/>. DOI:10.1083/jcb.202201159.
- [22] GLAVIANO A, FOO A S C, LAM H Y, *et al*. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer [J/OL]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 138[2024-10-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37596643/>. DOI:10.1186/s12943-023-01827-6.
- [23] 何锋, 狐鸣, 冯世林, 等. 银杏内酯B通过阻抑PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制胃癌HGC-27细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(10): 874-880. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.10.004.

[收稿日期] 2024-10-08

[修回日期] 2025-06-14

[本文编辑] 党瑞山