

基于 Fas/FasL 信号通路探究雷帕霉素对食管癌裸鼠瘤体抑制及放疗增敏的作用机制

金元元, 孟德胜*, 刘雅恬

江苏省肿瘤医院, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 探究雷帕霉素通过 Fas/FasL 信号通路治疗食管癌及放疗增敏的具体机制。**方法** 采用 CCK-8 和流式细胞分析评价 ECA109 细胞的凋亡能力。采用 ECA109 sc 构建食管癌小鼠瘤体模型。将 C57BL/6J 小鼠分为对照组、放射组 (4 Gy ^{137}Cs γ 射线)、雷帕霉素 (雷帕霉素 1.5 mg/kg) 组、放射+雷帕霉素 (4 Gy ^{137}Cs γ 射线+雷帕霉素 1.5 mg/kg) 组。收集并记录各组小鼠的肿瘤体积及质量、肿瘤抑瘤率及增殖系数, 放疗及雷帕霉素对其的增敏影响。采用酶联免疫吸附试剂盒评估肿瘤组织中半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 水平。苏木素-伊红 (HE) 染色观察小鼠食管癌的病理影响。Western blotting 评估 Fas/FasL 信号通路的激活情况。**结果** 与放射组相比, 放射+雷帕霉素组小鼠肿瘤体积、质量显著减小 ($P<0.001$)。与放射组相比, 放射+雷帕霉素组的抑瘤率及生长延迟时间 (TGD) 显著升高, 肿瘤 3 倍倍增时间 (TGT3) 显著延长 ($P<0.05$)。放射+雷帕霉素组出现大量肿瘤细胞崩解, 间质水肿更明显。与放射组比较, 放射+雷帕霉素组 Bcl-2 表达水平显著降低, Bax、Caspase-3 表达水平显著升高 ($P<0.001$)。与放射组比较, 放射+雷帕霉素组 ECA109 细胞活力显著降低 ($P<0.001$)。Fas 及 FasL 的表达在细胞中被抑制后, ECA109 细胞活力显著增加, ECA109 细胞凋亡率显著降低 ($P<0.001$)。与放射组相比, 放射+雷帕霉素组中 Fas 和 FasL 蛋白相对表达量显著升高 ($P<0.001$)。**结论** 雷帕霉素通过 Fas/FasL 信号通路抑制食管癌肿瘤的进展, 该过程能有效地促进食管癌小鼠的放疗增敏。

关键词: 雷帕霉素; 食管癌; 放疗增敏; Fas/FasL 信号通路; 半胱氨酸蛋白酶 3; B 淋巴细胞瘤-2; Bcl-2 相关 X 蛋白

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)01-0015-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.01.003

Effect of rapamycin on inhibiting esophageal cancer tumor in mice and sensitizing radiotherapy based on Fas/FasL signaling pathway

JIN Yuanyuan, MENG Desheng, LIU Yatian

Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To explore the specific mechanisms of rapamycin treating esophageal cancer, and sensitizing radiotherapy through the Fas/FasL signaling pathway. **Methods** The apoptosis ability of ECA109 cells was evaluated using CCK-8 and flow cytometry. The ECA109 mouse model of esophageal cancer was established using ECA109. C57BL/6J mice were divided into control group, radiation group (4 Gy ^{137}Cs γ rays), rapamycin group (rapamycin 1.5 mg/kg), and radiation + rapamycin (4 Gy ^{137}Cs γ rays + rapamycin 1.5 mg/kg). The tumor volume and mass, tumor inhibition rate and growth coefficient, the sensitization effect of radiotherapy and rapamycin were recorded. ELISA kits were used to assess levels of Caspase-3, Bcl-2, and Bax in the tumor. Histological changes in the esophageal cancer of mice were observed using HE staining. Western blotting analysis was performed to evaluate the activation of the Fas/FasL signaling pathway. **Results** Compared with the radiation group, the tumor volume and mass in the radiation + rapamycin group were significantly reduced ($P<0.001$). Compared with the radiation group, the tumor inhibition rate and TGD in the radiotherapy + rapamycin group were significantly increased, and the TGT3 was significantly prolonged ($P<0.05$). In the radiotherapy + rapamycin group, a large number of tumor cells disintegrated, and interstitial edema was more obvious. Compared with the radiation group, the expression levels of Bcl-2 in the radiation + rapamycin group were significantly decreased, while the expression levels of

收稿日期: 2024-09-12

基金项目: 江苏省卫生计生委科研课题项目 (H2017036)

作者简介: 金元元, 女, 研究方向为放射治疗技术。E-mail: fnvz66@sina.com

*通信作者: 孟德胜, 男, 硕士, 研究方向为放射治疗技术。

Bax and Caspase-3 were significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the radiation group, ECA109 cell viability was significantly decreased in the radiation + rapamycin group ($P < 0.001$). After the expression of Fas and FasL was inhibited, the viability of ECA109 cells was significantly increased, and the apoptosis rate of ECA109 cells was significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with the radiation group, the relative expressions of Fas and FasL proteins in the radiation + rapamycin group were significantly increased ($P < 0.001$). **Conclusion** Rapamycin inhibits the progression of esophageal cancer tumor through the Fas/FasL signaling pathway, which effectively promotes the sensitization of esophageal cancer mice to radiotherapy.

Key words: rapamycin; esophageal cancer; radiotherapy sensitization; Fas/FasL signaling pathway; Caspase-3; Bcl-2; Bax

在最新的数据中,食管癌为全球癌症死亡率排名的第 7 位^[1]。在中国,食管癌每年的新增病例为 24.6 万例(第 6 位),年新增死亡率为 18.8 万例(第 4 位)^[2]。由于我国的特殊生活习惯和饮食情况,近几年来食管癌发病率依旧持续上升。常规的治疗食管癌方式为手术切除,但中晚期食管癌患者病灶转移,常规的治疗方式无法完全治愈。放疗和化疗也是食管癌的主要治疗方法。然而,由于食管癌的恶性发展是一个多因素、多阶段、长期的病理变化过程,目前的治疗手段依旧存在预后差、易复发等治疗难点^[3]。因此,探究新方案极为迫切。

放射治疗是一种精准且有效的癌症治疗方法,它能利用高能放射线引发电离作用,深入肿瘤细胞内部,破坏其 DNA 结构。这一过程使得肿瘤细胞的复制和生长能力受损,最终导致细胞死亡^[4]。放射治疗治疗的关键在于利用了正常细胞与肿瘤细胞在放射线照射下修复损伤的差异性。在确保正常细胞不受伤害的前提下,通过精确控制放射线的剂量和照射时间,最大程度地消灭肿瘤细胞,以达到治疗癌症的目的。临床研究表明,放射治疗的使用在提高癌症患者的无进展及总生存期显示出了极大的优势^[5]。放射治疗被认为能通过抑制食管癌的局部复发和改善局部控制等来补充手术切除的不足。然而,食管癌对于放射治疗的敏感性随着治疗深入降低,其放疗耐受性也会普遍产生^[6]。这让放射治疗成为目前食管癌治疗所面临的新挑战。因此,结合食管癌的代谢特点来探索放射治疗的增敏方案,这对于改善食管癌患者的治疗具有重要的临床意义。

雷帕霉素是一种被美国食品药品监督管理局批准应用于多种肿瘤的大环内酯类化合物的免疫抑制剂。雷帕霉素自 1975 年的吸水链霉素中发现。雷帕霉素被认为通过抑制白细胞介素(IL)-2、IL-4 和 IL-15 等因子来阻碍关键免疫细胞^[7]。该过程抑制多种肿瘤的进展,如膀胱癌和大肠癌等^[8-9]。雷帕霉素通过下调 GP73mTOR/ GP73 通路抑制氧化偶氮甲

烷(AOM)联合葡聚糖硫酸钠(DSS)模型诱导的结直肠癌进展^[10]。Fas/FasL 信号通路属于肿瘤细胞经典死亡受体途径。Fas 与 FasL 均表达于细胞表面。当 Fas 与 FasL 交联后,复合体与 FAS 相关死亡结构域(FADD)衔接。FADD 招募半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-8 并产生凋亡信号^[11]。该过程激活 Caspase-3、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)等凋亡因子,促进癌细胞凋亡。然而,Fas/FasL 信号通路是否在食管癌中参与雷帕霉素促进的放射治疗治疗尚不可知。雷帕霉素作为一种具有潜力的抗肿瘤药物,通过抑制 mTOR 通路和调节 Fas/FasL 信号通路,可能为食管癌的治疗提供新的途径。进一步研究雷帕霉素对食管癌的具体作用机制,以及其在放疗增敏方面的作用,有望为食管癌患者带来新的治疗希望,提高治疗效果和生存率。因此,本研究探讨了食管癌中雷帕霉素的应用对放射治疗的影响作用及机制。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

雷帕霉素购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,质量分数 $\geq 98\%$,货号 S115842。Invitrogen™ Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent(上海伟进生物科技有限公司,货号 11668-019)。CCK-8 法检测试剂盒(安徽佰欧晶医学科技有限公司,货号 RK001099)。CX005S AnnexinV-EGFP/PI 凋亡检测试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司,货号 CX005S)。Caspase-3、Bcl-2、Bax ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,货号 CSB-E08857r、CSB-E08855m、CSB-EL002573RA)。苏木精-伊红染色液(北京雷根生物技术有限公司,货号 DH0006)。RIPA 缓冲裂解液(沈阳万类生物科技有限公司,货号 WLA016a)。PVDF 膜(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号 E-BC-R266)。抗 Fas、抗 FasL、抗 β -肌动蛋白抗体(Abcam 公司,货号 ab133619、ab302905、ab115777)。TRIzol 试剂(上海研卉生物科技有限公司,货号 15596026)。反

转录试剂盒（江苏麦格生物科技有限公司，货号 K16225）。qRT-PCR 试剂盒（上海连桥生物科技有限公司，货号 11745500）。Fas、FasL、GADPH 引物设计并购买自金斯瑞生物科技有限公司。过表达 Fas、小干扰 RNA FasL (si-FasL) 及其阴性对照 (ov-NC) 购自 GenePharma（中国上海）。

1.2 仪器

Multiskan FC 酶标仪、ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪购于赛默飞世尔科技公司。FACSVERSE 流式细胞仪购于碧迪医疗器械有限公司。BX51 型光学显微镜购于奥林巴斯。DHG-9240A 电热鼓风干燥箱购于上海一恒科学仪器有限公司。HZP-150 全温培养振荡器购于上海精宏实验设备有限公司。1DYCP/DYY-1 水平/垂直电泳仪及转膜仪购于拓赫机电科技有限公司。

1.3 实验动物

C57BL/6J 小鼠，4~5 周龄，体质量 18~20 g，购自常州卡文斯实验动物有限公司，生产许可证 SCXK(苏)2021-0013。所有小鼠在温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的房间中饲养，相对湿度设定为 45%~55%。保证自由进食水以及 12 h 的交替照明，适应性喂养 1 周后正式进行实验。

1.4 实验细胞

ECA109 细胞系购于丰辉生物科技有限公司。

2 实验方法

2.1 裸鼠模型建立、分组及给药

采用标准饲料，保证自由进食水以及 12 h 的交替照明，适应性喂养 1 周。所有实验程序均经南京医科大学动物伦理委员会批准（审批号 2024-0019）。将处于对数生长期的食管癌 ECA109 细胞经胰蛋白酶消化，离心去上清，用无血清培养液离心洗涤 2 次，制备成 1×10^7 个/mL 细胞悬液。于每只裸鼠左后腿两侧 sc 200 μL 细胞悬液 (2×10^6 个细胞)。

裸鼠接种食管癌细胞后 2 周形成肿瘤，当肿瘤长径达到 3 mm 时将小鼠随机分为对照组、放射组、雷帕霉素组、放射+雷帕霉素组，每组 6 只小鼠。对照组小鼠注射生理盐水，放射组采用 4 Gy ^{137}Cs γ 射线照射源局部照射瘤体^[12]，雷帕霉素组 ip 雷帕霉素 1.5 mg/kg^[13]，放射+雷帕霉素组采用 4 Gy ^{137}Cs γ 射线照射源局部照射瘤体后，ip 雷帕霉素 1.5 mg/kg。记录 8、16、24、32 d 肿瘤的最短径及最长径。32 d 后小鼠麻醉剂处死，收集肿瘤用于后续研究。

2.2 肿瘤评价

2.2.1 小鼠增敏系数评价 测量并记录了 8、16、24、32 d 小鼠肿瘤的最短径及最长径。

2.2.2 小鼠生长抑制率评价 参考了文献报道方法^[14]计算肿瘤 3 倍倍增时间 (TGT3)、肿瘤体积 (V)、生长延迟时间 (TGD)、雷帕霉素的增敏系数 (EF) 和生长抑制率 (TGI)。

$$\text{TGD} = \text{TGT3}_{\text{治疗}} - \text{TGT3}_{\text{对照}}$$

$$\text{EF} = \text{TGD}_{\text{放射治疗+雷帕霉素}} - \text{TGD}_{\text{放射治疗}}$$

$$\text{TGI} = (V_{\text{对照}} - V_{\text{放射治疗+雷帕霉素}}) / V_{\text{放射治疗}}$$

2.3 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达分析

ELISA 试剂盒检测肿瘤内样品的 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达水平。根据试剂盒说明，样本与 HRP 亲和素使用底物 TMB 进行显色。酶标仪检测吸光度 ($A_{450\text{ nm}}$) 值。

2.4 苏木素-伊红 (HE) 染色检测

使用 HE 法固定瘤体组织，石蜡包埋并切成 5 μm 。HE 用于切片染色。用 BX51 型光学显微镜观察角质层的厚度。

2.5 Western blotting 检测

RIPA 缓冲裂解液用于裂解细胞和组织。将总蛋白转移到 SDS-PAGE 膜，恒压电泳分离 (120 min)。分离后转移 PVDF 膜。膜与一抗在 4°C 下孵育 12 h。二抗孵育 2 h。用增强化学发光法观察蛋白质。

2.6 细胞转染

ECA109 细胞株分为对照组、放射组、雷帕霉素组、放射+雷帕霉素组、放射+雷帕霉素+阴性对照组、放射+雷帕霉素+si-Fas 组、放射+雷帕霉素+ov-Fas+si-FasL 组。对照组正常培养，放射组采用 4.0 Gy γ 射线照射细胞，雷帕霉素组细胞经 5 $\mu\text{mol/L}$ 雷帕霉素处理；阴性对照组、si-Fas 组及 ov-Fas 组均按照 Lipofectamine 2000 说明书转染 ov-NC、si-FasL 及 ov-Fas。在室温下孵育 5 min。混合稀释的 DNA 和稀释的 Lipofectamine 2000（总体积 100 μL ）。轻轻混匀并在室温下孵育 20 min（溶液可能变得浑浊）。将 100 μL 复合物添加至含有细胞和培养基的各孔中。通过来回摇动平板轻轻混匀。在进行转基因表达检测前，在二氧化碳培养箱中于 37°C 下孵育细胞 18~48 h。

2.7 CCK-8 检测细胞活力

细胞接种于 96 孔板中 (24~72 h 培养)。待细胞密度约为 4.5×10^4 个细胞/mL，将转染的 ECA109 细胞系与 10 μL CCK-8 溶液 (Beyotime) 在含有 FBS

的 100 μ L DMEM 培养基中孵育, 测量 $A_{450\text{ nm}}$ 。

2.8 流式细胞术检测各组细胞凋亡

PBS 洗涤 ECA109 细胞, 加入 100 μ L 悬浮液。细胞液内添加 5 μ L 膜联蛋白 V/eGFP 混合, 孵育 5 min, 避光。最后, 添加 10 μ L PI 和 400 μ L PBS 入样品, FACSVERSE 流式细胞仪分析。Flowjo 软件用于数据采集和分析。

2.9 qRT-PCR 检测 Fas 及 FasL 相对表达

取处理好的细胞进一步裂解, 移除裂解液, 采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 反转录合成 cDNA, qRT-PCR 反应条件遵循制造商说明。引物合成于金斯瑞生物科技有限公司(中国南京), qRT-PCR 引物详细信息见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR Primer Sequences

引物名称	引物序列
Fas 正向	3'-TTGCTGCCATCTGGTAGTGTG-5'
Fas 反向	3'-TGGTGCAGTGAATGCTCGAAG-5'
FasL 正向	3'-TGCCCTGGTAGGATTGGGC-5'
FasL 反向	3'-GCTGGTAGACTCTCGGAGTTC-5'
GAPDH 正向	3'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-5'
GAPDH 反向	3'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-5'

2.10 统计学处理

使用 SPSS 16.0 软件进行数据分析。数据以至少 3 个独立重复的 $\bar{x} \pm s$ 表示。单因素方差分析计算各组之间的统计学差异。

3 结果

3.1 雷帕霉素对食管癌的抑制作用

如图 1、2 所示, 对照组小鼠的肿瘤体积、质量大; 放射组和雷帕霉素组小鼠的肿瘤体积、质量显著小于对照组 ($P < 0.01$ 、 0.001); 放射+雷帕霉素组小鼠肿瘤体积、质量显著小于放射组 ($P < 0.001$)。

研究记录了 8、16、24、32 d 不同小鼠的肿瘤体积变化, 见表 2 所示。16 d 时, 各治疗组肿瘤体积显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。24、32 d 时, 放射+雷帕霉素组小鼠的肿瘤体积显著低于放射组 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2 雷帕霉素对小鼠肿瘤抑瘤率及增殖系数变化的影响

如表 3、4 所示, 与对照组相比, 放射组、雷帕霉素 TGT3 显著延长 ($P < 0.05$)。与放射组相比, 放射+雷帕霉素组的抑瘤率及 TGD 显著升高,

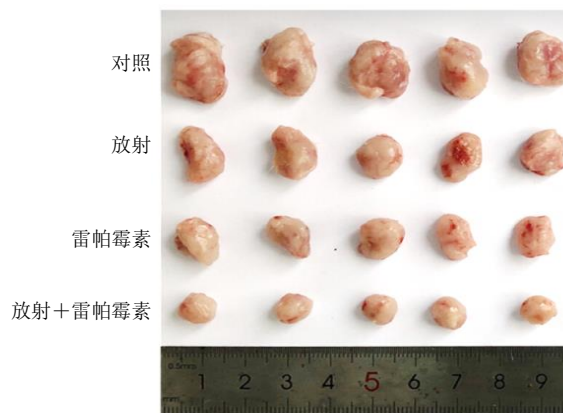
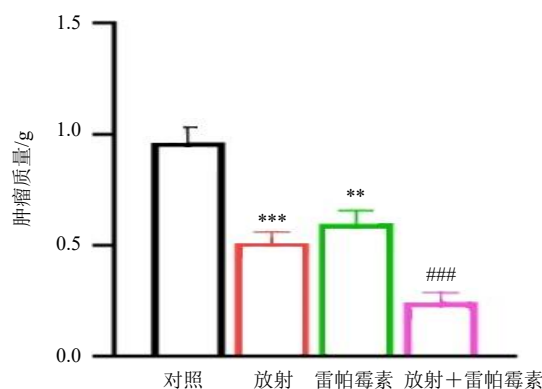


图 1 小鼠肿瘤体积变化 ($n = 5$)

Fig. 1 Changes in tumor volume in mice ($n = 5$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与放射组比较: ### $P < 0.001$ 。
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs radiation group.

图 2 小鼠肿瘤质量变化 ($n = 5$)

Fig. 2 Changes in tumor mass in mice ($n = 5$)

TGT3 显著延长 ($P < 0.05$)。放射+雷帕霉素组小鼠的 EF 为 1.37, 提示雷帕霉素提高了肿瘤小鼠的放射治疗增敏作用。

3.3 雷帕霉素对小鼠肿瘤病理学的影响

HE 染色表明, 对照组肿瘤部分的细胞排列出现显著紊乱, 细胞的大小不均匀。染色后, 细胞的颜色深浅不同。此外, 该区域基层及鳞状上皮细胞出现显著且不同程度的增生, 同时, 大量炎细胞浸润于间质, 伴随肉眼可见的肿块。相较于对照组, 放射组和雷帕霉素组肿瘤细胞可见坏死, 间质出现水肿, 炎症细胞浸润低, 增生情况少。放射+雷帕霉素组出现大量肿瘤细胞崩解, 间质水肿更明显, 见图 3。

3.4 雷帕霉素对凋亡因子的影响

如图 4 所示, 与对照组相比, 放射组和雷帕霉

表 2 不同治疗时间小鼠肿瘤体积 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Tumor volumes of mice with different treatment durations ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	肿瘤体积/mm ³			
		8 d	16 d	24 d	32 d
对照	—	163.21 ± 11.25	195.57 ± 10.62	639.45 ± 13.73	1 204.79 ± 15.38
放射	4 Gy	167.76 ± 15.55	179.31 ± 12.32*	265.78 ± 14.57**	459.91 ± 14.12***
雷帕霉素	1.5 mg·kg ⁻¹	164.69 ± 17.53	177.68 ± 7.86*	207.61 ± 8.87***	397.63 ± 11.48***
放射+雷帕霉素	4 Gy+1.5 mg·kg ⁻¹	165.11 ± 12.93	173.47 ± 16.60*	181.21 ± 14.65*#	214.13 ± 12.67*##

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与放射组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs radiation group.

表 3 雷帕霉素对小鼠抑瘤率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of rapamycin on the tumor inhibition rate in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	抑瘤率/%
对照	—	—
放射	4 Gy	46.88
雷帕霉素	1.5 mg·kg ⁻¹	47.92
放射+雷帕霉素	4 Gy+1.5 mg·kg ⁻¹	75.00#

与放射组比较: # $P < 0.05$ 。

$P < 0.05$ vs radiation group.

表 4 雷帕霉素对小鼠肿瘤增敏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects of rapamycin on sensitization coefficients in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	TGT3/d	TGD/d	EF
对照	—	20.28 ± 1.15	—	—
放射	4 Gy	29.83 ± 2.31*	9.55	—
雷帕霉素	1.5 mg·kg ⁻¹	28.26 ± 1.98*	7.98	—
放射+雷帕霉素	4 Gy+1.5 mg·kg ⁻¹	33.37 ± 3.27#	13.09#	1.37

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与放射组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs radiation group.

素组 Bcl-2 表达水平显著降低, Bax、Caspase-3 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。与放射组比较, 放射+雷帕霉素组 Bcl-2 表达水平显著降低, Bax、Caspase-3 表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。结果表明, 雷帕霉素干预后的放射治疗促进了小鼠肿瘤细胞因子的凋亡。

3.5 雷帕霉素通过 Fas/FasL 信号通路对细胞凋亡的影响

如图 5A 所示, qRT-PCR 检测的结果表明 si-Fas 组中 Fas mRNA 表达水平显著低于阴性对照组。ov-Fas+si-FasL 组中 Fas mRNA 表达水平显著高于阴

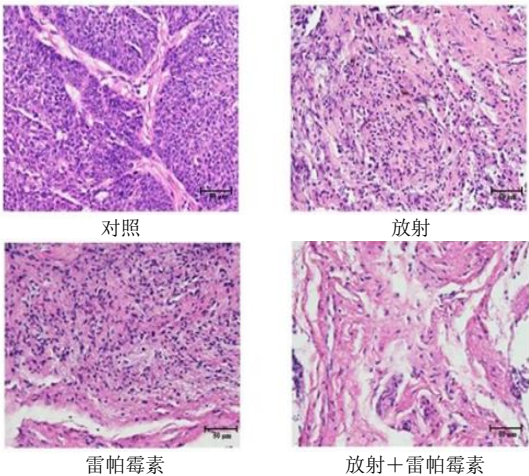


图 3 雷帕霉素对小鼠病理学影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

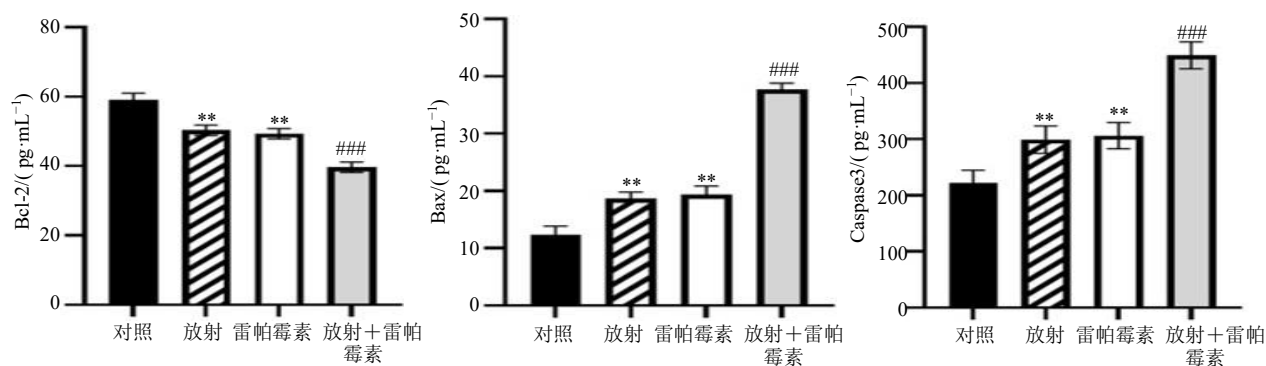
Fig. 3 Effects of rapamycin on the pathology in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

性对照组($P < 0.001$)。这表明本研究成功构建了 Fas 低表达及 Fas 高表达的 ECA109 细胞系。如图 5B 所示, qRT-PCR 检测的结果表明 ov-Fas+si-FasL 组中 FasL mRNA 表达水平显著低于阴性对照组 ($P < 0.001$)。这表明成功构建了 FasL 低表达的 ECA109 细胞系。

CCK-8 检测表明, 雷帕霉素组和放射组的 ECA109 细胞活力显著小于对照组 ($P < 0.01$ 、 0.001)。放射+雷帕霉素组 ECA109 细胞活力显著低于放射组 ($P < 0.001$)。然而, Fas 及 FasL 表达在细胞中被抑制后, ECA109 细胞活力显著增加 (图 5C), ECA109 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.001$) (图 5D)。表明雷帕霉素的应用促进放射治疗后 ECA109 细胞的凋亡能力的增加, 该过程与 Fas/FasL 信号通路有关。

3.6 雷帕霉素对 Fas/FasL 信号通路的影响

如图 6 所示, 与对照组相比, 雷帕霉素组和放

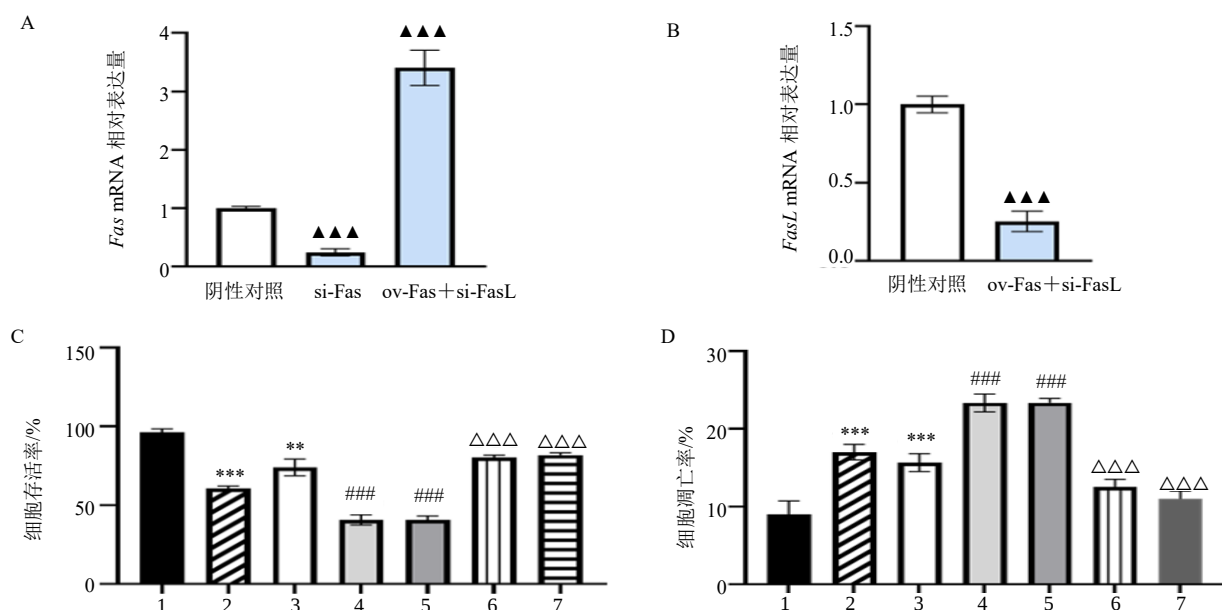


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与放射组比较: ### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs radiation group.

图 4 雷帕霉素对凋亡因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Effects of rapamycin on apoptosis factors ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



A-Fas mRNA 表达水平, B-FasL mRNA 表达水平, C- CCK-8 检测细胞活力, D-细胞的凋亡率。1-对照, 2-放射, 3-雷帕霉素, 4-放射+雷帕霉素, 5-放射+雷帕霉素+阴性对照, 6-放射+雷帕霉素+si-Fas, 7-放射+雷帕霉素+ov-Fas+si-FasL。与阴性对照组比较: ▲▲▲ $P < 0.001$; 与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与放射组比较: ### $P < 0.001$; 与放射+雷帕霉素+阴性对照组比较: △△△ $P < 0.001$ 。

A-Fas mRNA expression level, B-FasL mRNA expression level, C-CCK-8 detection of cell viability, D-cell apoptosis rate. 1-control, 2-radiation, 3-rapamycin, 4-radiation + rapamycin, 5-radiation + rapamycin + negative control, 6-radiation + rapamycin + si-Fas, 7-radiation + rapamycin + ov-Fas + si-FasL. ▲▲▲ $P < 0.001$ vs negative control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs radiation group; △△△ $P < 0.001$ vs -radiation + rapamycin + negative control group.

图 5 雷帕霉素通过 Fas/FasL 对 ECA109 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

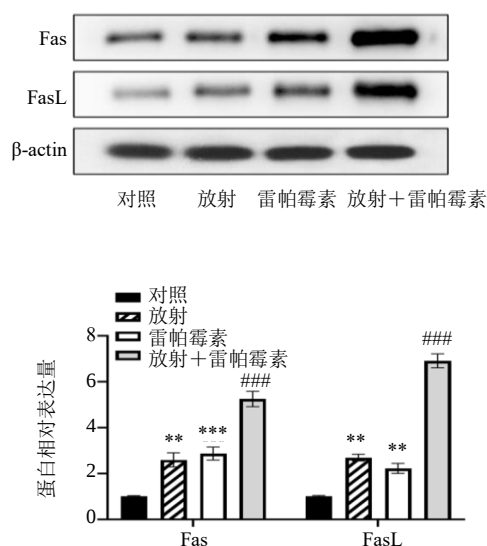
Fig. 5 Effects of rapamycin on apoptosis of ECA109 cell line through Fas/FasL ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

射组中 Fas 和 FasL 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与放射组相比, 放射+雷帕霉素组中 Fas 和 FasL 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.001$)。表明雷帕霉素介导 Fas/FasL 信号通路抑制食管癌进展及放射治疗增敏的作用。

4 讨论

食管癌是一种严重威胁消化道健康的恶性肿

瘤。放疗是一种局部肿瘤的治疗方案, 肿瘤的放疗及其参与的综合治疗取得了显著的进步。结合临床研究表明, 放疗在多种癌症及肿瘤的各个分期的治疗中发挥了重要的作用, 如肝细胞癌、宫颈癌和口腔癌等^[15]。但单独的放射治疗对晚期癌症患者肿瘤的发展的缓解能力远低于放射治疗与化疗结合的方案。本研究旨在探索雷帕霉素在食管癌的放射治



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与放射组比较: #### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; #### $P < 0.001$ vs radiation group.

图 6 雷帕霉素对 Fas/FasL 通路的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Effect of the Fas/FasL pathway by rapamycin ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

疗中的具体应用及机制。

本文研究结果显示,放射+雷帕霉素可显著抑制食管癌瘤体体积,并可通过调节 Caspase-3、Bax 及 Bcl-2 表达而发挥细胞促凋亡作用。表明雷帕霉素能够提高人食管癌细胞的放射敏感性可能与其可以提高凋亡促进蛋白 Caspase-3、Bax 表达,降低凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达,增加食管癌细胞的凋亡率密切相关^[16]。且雷帕霉素在食管癌中能够通过抑制癌细胞中 mTOR 的表达,靶向阻断 mTOR 信号转导通路,达到治疗肿瘤的目的^[17]。

Fas/FasL 信号通路属于肿瘤细胞的经典的死亡受体途径。该通路影响多种肿瘤的进展, Wu 等^[18]证实了 Fas/FasL 信号通路与食管癌患者预后情况相关。纪昕等^[19]的研究证实了 Fas/FasL 信号通路的激活诱导裸鼠食管癌细胞的凋亡。本研究也通过转染 Fas/FasL 类似物或抑制物证实了通过调节 Fas/FasL 可影响肿瘤细胞凋亡及活性。并进一步探索了该机制在食管癌进展的变化,认为 Fas/FasL 信号通路抑制了食管癌裸鼠瘤体的进展。齐峰等^[20-21]的研究证实了在子宫内腺癌及睾丸癌中 Fas/FasL 信号通路的变化与其肿瘤进展及放射治疗增敏相关。

根据 ELISA 的检测结果,推测雷帕霉素与放射治疗的联合作用正是通过 Fas/FasL 信号通路抑制食管癌发展,这一过程影响肿瘤放射治疗增敏的程

度。放疗通过破坏肿瘤细胞的 DNA 来诱导其凋亡,而雷帕霉素则通过激活 Fas/FasL 信号通路来进一步放大这种凋亡效应。

总之,本研究表明在裸鼠模型上雷帕霉素与放射治疗的联合方案具有抑制食管癌进展及促进放疗增敏的作用。该过程主要是通过 Fas/FasL 信号通路促进细胞凋亡所实现的,为放射治疗的联合治疗提供了新的见解,也为食管癌的临床治疗方案提供了新的线索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Eisner D C. Esophageal cancer: Treatment advances and need for screening [J]. *JAAPA*, 2024, 37(4): 19-24.
- [2] 王静静, 付亚如, 刘军清, 等. 中国人群食管癌主要危险因素 Meta 分析 [J]. *临床心身疾病杂志*, 2024, 30(3): 115-122.
- [3] 沈文斌, 高红梅, 许金蕊, 等. 肿瘤局部相关因素对 N0 期食管癌 IMRT 预后影响 [J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2020, 29(2): 96-101.
- [4] Alfouzan A F. Radiation therapy in head and neck cancer [J]. *Saudi Med J*, 2021, 42(3): 247-254.
- [5] Henschke C I, Yip R, Sun Q, *et al*. Prospective cohort study to compare long-term lung cancer-specific and all-cause survival of clinical early stage (T1a-b; ≤ 20 mm) NSCLC treated by stereotactic body radiation therapy and surgery [J]. *J Thorac Oncol*, 2024, 19(3): 476-490.
- [6] 齐会丽, 李兴荣, 刘红玉, 等. 放疗剂量和肿瘤体积对接受根治性放化疗临床无转移食管鳞癌患者预后的影响 [J]. *川北医学院学报*, 2024, 39(11): 1462-1467.
- [7] 丁欢欢, 姜先梅, 刘红梅, 等. 藤黄酸和雷帕霉素共载脂质体的制备及协同抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(9): 2896-2911.
- [8] Svatek R S, Ji N N, de Leon E, *et al*. Rapamycin prevents surgery-induced immune dysfunction in patients with bladder cancer [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(3): 466-475.
- [9] 李博, 李春生, 张凯, 等. 磷酸肌醇 3 激酶及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路联合抑制对大肠癌细胞生长的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(3): 570.
- [10] 张梦迪, 王亚南, 李杰, 等. 雷帕霉素下调 mTOR-GP73 通路抑制结直肠癌进程 [J]. *基础医学与临床*, 2020, 40(7): 934-939.
- [11] 朱垠, 郑浩轩. Fas/FasL 信号通路对大肠癌恶性生物学特性的影响 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2020, 25(8): 989-992.
- [12] 于静萍, 孙志强, 倪新初, 等. 沙利度胺联合照射对人

- 食管癌裸鼠移植瘤生长和肿瘤血管生成的影响 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2013, 33(6): 584-587.
- [13] 侯桂琴, 范天黎, 王莉莉, 等. 雷帕霉素对食管鳞癌裸鼠移植瘤生长及 mTOR/p70S6K 信号通路的影响 [J]. 肿瘤, 2009, 29(6): 559-562.
- [14] 吕心明, 徐金芬, 闫呈新, 等. 黄芪多糖联合放疗对小鼠 H22 肝癌移植瘤的放射增敏及免疫功能的影响 [J]. 云南中医学院学报, 2017, 40(6): 9-13.
- [15] 蔡明, 李量. 尼妥珠单抗联合同步放化疗治疗局部晚期食管癌的疗效观察 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2023, 28(5): 631-634.
- [16] 刘桂荣, 康亚辉, 马建新, 等. 热疗和热疗联合放疗对人食管癌 ECA109 细胞凋亡的影响 [J]. 检验医学与临床, 2015, 12(5): 646-648.
- [17] 王贵琴, 张威, 陈玉, 等. 雷帕霉素对食管癌 EC1 细胞 mTOR 表达及细胞生长与凋亡的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2010, 45(5): 709-712.
- [18] Wu G Z, Pan C X, Jiang D, *et al.* Clinicopathological significance of Fas and Fas ligand expressions in esophageal cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(9): 2865-2871.
- [19] 纪昕, 王崇, 李洁, 等. 淫羊藿苷通过增强 Fas-FasL 表达活性诱导裸鼠食管癌细胞凋亡 [J]. 重庆医学, 2016, 45(12): 1608-1611.
- [20] 齐峰, 满淑红, 王执勇. P53、Fas、FasL 在子宫内膜癌放射治疗前后的表达及意义 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(10): 57-58.
- [21] Köberle B, Usanova S, Piec-Staffa A, *et al.* Strong apoptotic response of testis tumor cells following cisplatin treatment [J]. *Int Urol Nephrol*, 2024, 56(3): 1007-1017.

【责任编辑 高源】