

南蛇藤提取物联合 miR-302 通过 PI3K/Akt 信号通路调控食管癌细胞增殖、侵袭和迁移的研究

于耀洋¹, 赵佳², 李向楠²

1. 驻马店市中心医院 胸外科, 河南 驻马店 463000

2. 郑州大学第一附属医院 胸外科, 河南 郑州 450000

摘要:目的 探讨南蛇藤提取物(COE)联合 miR-302 对人食管癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响及对 PI3K/Akt 信号通路的调控作用。方法 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测人正常食管上皮细胞 Het-1A 及不同食管癌细胞株中 miR-302 表达情况。将 miR-302 mimic 和阴性对照 mimic control 转染至人食管癌 TE-1 细胞中, qRT-PCR 检测质粒转染后 TE-1 细胞中 miR-302 的表达情况。单独或联合使用 COE 作用 TE-1 细胞, CCK-8 实验检测 TE-1 细胞增殖情况, Transwell 实验检测 TE-1 细胞侵袭和迁移能力, Western blotting 分析 PI3K/Akt 信号通路中相关蛋白表达情况。结果 食管癌细胞株中 miR-302 的表达明显低于正常食管上皮细胞 ($P < 0.05$)。转染 miR-302 mimic 能够有效提高 TE-1 细胞中 miR-302 的表达 ($P < 0.05$)。单独使用 COE 或过表达 miR-302 可抑制食管癌 TE-1 细胞增殖、侵袭和迁移 ($P < 0.05$), 下调 PI3K 和 p-Akt 蛋白表达; 二者联合使用对 TE-1 细胞增殖、侵袭和迁移抑制及对 PI3K 和 p-Akt 蛋白表达下调作用更显著 ($P < 0.05$)。结论 COE 联合 miR-302 可协同抑制食管癌 TE-1 细胞增殖、侵袭和迁移, 其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活有关。

关键词: 南蛇藤提取物; miR-302; 食管癌细胞; 增殖; 侵袭; 迁移; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)10-2371-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.017

Celastrus orbiculatus extracts combined with miR-302 regulates proliferation, invasion and migration of esophageal cancer cells via PI3K/Akt signaling pathway

YU Yao-yang¹, ZHAO Jia², LI Xiang-nan²

1. Department of Thoracic Surgery, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

2. Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of the combination of *Celastrus orbiculatus* extracts and miR-302 on proliferation, invasion and migration of human esophageal cancer cells and the regulation of PI3K/Akt signaling pathway. **Methods** Quantitative RT-PCR was used to detect the expression of miR-302 in human normal esophageal epithelial cells Het-1A and different esophageal cancer cell lines. The miR-302 mimic and negative control mimic control were transfected into human esophageal cancer TE-1 cells, and qPCR was used to detect the expression of miR-302 in TE-1 cells after plasmid transfection. TE-1 cells were treated with *C. orbiculatus* extracts alone and combination treatment. The proliferation of TE-1 cells was detected by CCK-8 assay. The invasion and migration of TE-1 cells were detected by Transwell assay. Western blot analysis of the expression of related protein in the PI3K/Akt signaling pathway was carried out. **Results** The expression of miR-302 in esophageal cancer cell lines was significantly lower than that in esophageal epithelial cells ($P < 0.05$). Transfection of miR-302 mimic could effectively increase the expression of miR-302 in TE-1 cells ($P < 0.05$). The use of *C. orbiculatus* extracts alone or overexpression of miR-302 inhibited proliferation, invasion and migration of esophageal cancer TE-1 cells ($P < 0.05$), down-regulated PI3K and p-Akt protein expression; Combination treatment had more significant effect on inhibiting proliferation, invasion and migration of TE-1 cells and down-regulating protein expression of PI3K and p-Akt ($P < 0.05$). **Conclusion** *Celastrus orbiculatus* extracts combined with miR-302 can synergistically inhibit the proliferation, invasion, and migration of esophageal cancer TE-1 cells, and its mechanism may be related to the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway activation.

Key words: *Celastrus orbiculatus* extracts; miR-302; esophageal cancer cells; proliferation; invasion; migration; PI3K/Akt signaling pathway

收稿日期: 2019-01-25

作者简介: 于耀洋 (1979—), 男, 本科, 学士学位, 主治医师, 研究方向为胸外科相关疾病的诊治。E-mail: ltl511771@163.com

食管癌是世界上 6 种最常见的恶性肿瘤之一，男性发病率高于女性^[1]。大部分食管癌患者被确诊时已为晚期，且预后不良，5 年生存率低于 10%^[2]。目前治疗食管癌的主要手段是手术辅以放疗和化疗，但其治疗效果不佳，且放化疗的毒副作用增加了患者的痛苦^[3]。因此探究新的治疗方法或药物提高食管癌的治疗效果显得尤为重要。南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb. 是我国传统中药，其属于卫矛科南蛇藤属植物，具有广泛的消肿止痛、祛风活血和解毒的功效。近年来实验研究^[4-6]发现，南蛇藤提取物 (*Celastrus orbiculatus* extracts, COE) 对胃癌、胶质母细胞瘤、肺癌等多种肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移具有抑制作用，发挥抗肿瘤作用，成为具有良好应用前景的抗肿瘤药物之一。微小 RNA (micro RNA, miRNA) 是一类高度保守的、小的非编码 RNA 分子，其通过 mRNA 降解或通过非翻译区的不完全配对来调节基因表达。miR-302 在食管癌组织中的表达显著低于其癌旁正常组织，在食管癌中能够发挥抑癌基因的作用^[7]。本研究将 COE 联合 miR-302 共同作用于人食管癌 TE-1 细胞，探究其对 TE-1 细胞增殖、侵袭和迁移的影响，并进一步研究其作用机制，以期为中药联合分子靶向治疗食管癌的方法提供实验依据。

1 材料

南蛇藤为广州致信药业股份有限公司产品 (批号 070512)，经郑州大学第一附属医院药学部费红副主任药师鉴定为卫矛科南蛇藤属植物南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb.；人食管癌细胞 TE-1、TE-10、Eca-109、EC9706 和人正常食管上皮细胞 Het-1A 为中国科学院上海细胞库产品；RPMI 1640 培养基为美国 Gibco 公司产品；胎牛血清为美国 HyClone 公司产品；胰蛋白酶为杭州四季青生物工程材料有限公司产品；Lipofectamine 2000 转染试剂为美国 Invitrogen 公司产品；CCK-8 试剂、二甲基亚砜为美国 Sigma 公司产品；Trizol 试剂为北京天根生化科技有限公司产品；引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成；miR-302 mimic 和 mimic control 均为广州市锐博生物科技有限公司产品；逆转录试剂盒及 SYBR Green PCR Master Mix 实时荧光定量 PCR 试剂盒均为大连宝生物工程有限公司；Transwell 小室为美国 Corning 公司产品；Matrigel 基质胶为美国 BD 公司产品；鼠抗人 PI3K 抗体、鼠抗人 p-Akt 抗体、鼠抗人 Akt 抗体、鼠抗人 GAPDH

抗体及山羊抗体、IgG 均为美国 Abcam 公司产品。

2 方法

2.1 COE 的制备

COE 的制备参考文献方法^[8-9]，制得的 COE 中主要有效成分是南蛇藤总萜类化合物，质量分数为 63.2%。COE 加入少量二甲基亚砜助溶，4 ℃ 冰箱保存，使用时以培养基稀释至 140 μg/mL (根据预试验结果筛选药物质量浓度和作用时间) 的工作液，滤过除菌。

2.2 细胞培养

人食管癌细胞 TE-1、TE-10、Eca-109、EC9706 和人正常食管上皮细胞 Het-1A 均培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中，置入 37 ℃ 恒温培养箱，培养条件设置为饱和湿度、5% CO₂，待细胞生长汇合度达 90% 以上时，用胰蛋白酶进行消化传代，实验均取对数增殖期细胞。

2.3 转染 miR-302 mimic 至食管癌 TE-1 细胞

将对数生长期的食管癌 TE-1 细胞接种到 6 孔板中，接种密度为 5×10^5 个/孔，于 37 ℃ 培养箱过夜培养，当细胞生长密度达 50%~60% 时，参照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书分别将 miR-302 mimic 或阴性对照 mimic control 转染到 TE-1 细胞，分别记为 miR-302 组和 NC 组，不做转染处理的 TE-1 细胞记为空白对照组，转染后继续在 37 ℃ 培养箱中培养，进行相应指标检测。

2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 TE-1 细胞中 miR-302 表达水平

分别收集人食管癌细胞 TE-1、TE-10、Eca-109、EC9706、Het-1A 及转染 48 h 后空白对照组、NC 组和 miR-302 组 TE-1 细胞，分别收集细胞并以 Trizol 法提取总 RNA，检测 RNA 的纯度和浓度后，选取合格的 RNA 进行反转录，按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA，使用 SYBR Green PCR Master Mix 检测试剂盒进行 PCR 扩增，其中以 β-actin 为内参，β-actin 上游引物：5'-ACCGAGCG-CGGCTACAG-3'；下游引物：5'-CTTAATGTCACG-CACGATTTCC-3'；miR-302 上游引物：5'-CGTGGATGTACTTGCTTTGAA-3'；下游引物：5'-TCACCAAACATGGAAGCAC-3'。扩增结束后分析熔解曲线并计算 C_t 值，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 TE-1 细胞中 miR-302 相对表达水平。

2.5 CCK-8 法检测 TE-1 细胞增殖能力

将 NC 组和 miR-302 组 TE-1 细胞接种至 96 孔

板中,每孔接种 1×10^4 个,实验设置 NC 组、miR-302 组、NC+COE 组、miR-302+COE 组,其中 NC+COE 组和 miR-302+COE 组以 $140 \mu\text{g/mL}$ 的 COE 干预细胞,各组细胞于 24、48、72 h 以 CCK-8 法检测细胞增殖情况,在各时间点向每孔细胞中加入 $20 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液,轻轻混匀,于 37°C 培养箱孵育 3 h,使用酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度 (A) 值,计算细胞存活率。前期预试验检测了未转染的正常细胞及 NC 组细胞的存活率,结果发现 2 组细胞存活率差异无显著差别,因此此处以 NC 组细胞存活率为 100%。

细胞存活率 = 实验组 A 值 / NC 组 A 值

2.6 Transwell 实验检测 TE-1 细胞侵袭和迁移能力

在 Transwell 小室的上室内添加无血清培养基稀释的 Matrigel 基质胶,置 37°C 培养箱孵育 4 h 待基质胶凝固。NC 组和 miR-302 组 TE-1 细胞转染 24 h 后,以无血清的培养基饥饿培养 6 h,以胰蛋白酶消化,重悬细胞制成 5×10^5 个/mL 细胞悬液。将 Matrigel 包被好的 Transwell 小室放入 24 孔板中,取 $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液接种到 24 孔板的 Transwell 小室的上室,NC 组和 miR-302 组下室加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 $600 \mu\text{L}$,NC+COE 组和 miR-302+COE 组下室加入含 10% 胎牛血清及终质量浓度为 $140 \mu\text{g/mL}$ COE 的 RPMI 1640 培养基 $600 \mu\text{L}$,将 Transwell 小室置 37°C 培养箱继续培养 48 h。取出小室,以多聚甲醛固定 5 min,结晶紫染色 10 min,用棉签拭去上室细胞,在显微镜下随机选取 5 个视野观察,计数穿过基底膜的细胞数,实验重复 3 次,取均值。Transwell 迁移实验不以 Matrigel 基质胶包被,其余均同 Transwell 侵袭实验。

2.7 Western blotting 检测 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达水平

TE-1 细胞分组和处理同“2.5”项,处理 48 h 后分别收集各组细胞,加入蛋白裂解液提取细胞中总蛋白,在蛋白样品中加入适量上样缓冲液加热变性,取等量变性蛋白,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白分离后将其转移至硝酸纤维素膜上,在 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h,分别加入一抗,其中 PI3K 一抗 1:800 稀释,p-Akt 一抗 1:800 稀释,Akt 一抗 1:800 稀释, 4°C 孵育过夜,再加入 1:2 000 稀释的二抗,室温孵育 2 h,以 ECL 化学发光,在凝胶成像系统中成像拍照,使用 Image J 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 进行标定,计算各组 TE-1

细胞中 PI3K、p-Akt 和 Akt 相对表达水平。

2.8 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,两两组间多重比较采用 SNK- q 检验分析。

3 结果

3.1 miR-302 在食管癌细胞中的表达水平

通过 qRT-PCR 法检测 miR-302 在不同细胞中的表达水平,筛选合适的食管癌细胞株,结果显示,miR-302 在人食管癌细胞 TE-1、TE-10、Eca-109、EC9706 中的表达显著低于在人正常食管上皮细胞 Het-1A 中的表达水平 ($P < 0.05$),其中在食管癌 TE-1 细胞中的表达最低,因此选取 TE-1 细胞进行后续实验。见表 1。

3.2 转染 miR-302 mimic 后食管癌 TE-1 细胞中 miR-302 的表达

qRT-PCR 检测转染 miR-302 mimic 质粒后食管癌 TE-1 细胞中 miR-302 的表达变化,结果见表 2,miR-302 组 TE-1 细胞中 miR-302 的表达显著高于空白对照组和 NC 组 ($P < 0.05$),空白对照组和 NC 组比较,miR-302 的表达水平差异不显著 ($P >$

表 1 miR-302 在 Het-1A 细胞和 4 株食管癌细胞株中的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Expression of miR-302 in Het-1A cells and four esophageal cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞株	miR-302 相对表达量
Het-1A	1.00 ± 0.09
TE-1	$0.24 \pm 0.03^*$
TE-10	$0.51 \pm 0.05^*$
Eca-109	$0.43 \pm 0.04^*$
EC9706	$0.38 \pm 0.04^*$

与 Het-1A 细胞株比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs Het-1A cells

表 2 转染 miR-302 mimic 对 TE-1 细胞中 miR-302 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of transfection of miR-302 mimic on expression of miR-302 in TE-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	miR-302 相对表达量
空白对照	1.00 ± 0.10
NC	1.04 ± 0.09
miR-302	$3.11 \pm 0.32^*$

与空白对照组比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs blank control group

0.05)。表明转染 miR-302 mimic 能够有效上调食管癌 TE-1 细胞中 miR-302 的表达。

3.3 COE 联合 miR-302 对食管癌 TE-1 细胞增殖的影响

采用质量浓度为 140 $\mu\text{g/mL}$ 的 COE 干预转染 miR-302 mimic 或阴性对照的 TE-1 细胞, CCK-8 实验分析细胞增殖能力变化, 结果见表 3, miR-302 组、NC+COE 组和 miR-302+COE 组 TE-1 细胞存活率显著低于 NC 组 ($P<0.05$), 其中 miR-302+COE 组细胞存活率最低 ($P<0.05$)。表明 COE 及过表达 miR-302 均能够抑制 TE-1 细胞增殖, 且二

者联合使用对 TE-1 细胞增殖抑制作用更显著。

3.4 COE 联合 miR-302 对食管癌 TE-1 细胞侵袭和迁移的影响

Transwell 实验检测各处理组 TE-1 细胞侵袭和迁移能力, 结果显示, miR-302 组、NC+COE 组和 miR-302+COE 组侵袭和迁移细胞数比 NC 组显著减少 ($P<0.05$), 其中 miR-302+COE 组侵袭和迁移细胞数最少 ($P<0.05$)。结果见图 1 和表 4。表明 COE 及过表达 miR-302 均能够明显抑制 TE-1 细胞侵袭和迁移, 且二者联合使用对 TE-1 细胞侵袭和迁移抑制作用更明显。

表 3 COE 联合 miR-302 对 TE-1 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of COE combined with miR-302 on proliferation of TE-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
NC	100	100	100
miR-302	78.68 $\pm$ 5.64*	60.37 $\pm$ 4.53*	52.18 $\pm$ 4.02*
NC+COE	80.24 $\pm$ 5.69*	61.22 $\pm$ 4.28*	52.29 $\pm$ 4.11*
miR-302+COE	55.91 $\pm$ 4.88*&#	42.18 $\pm$ 3.74*&#	33.26 $\pm$ 3.52*&#

与 NC 组比较: * $P<0.05$; 与 miR-302 组比较: & $P<0.05$; 与 NC+COE 组比较: # $P<0.05$, 下同

* $P<0.05$ vs NC group; & $P<0.05$ vs miR-302 group; # $P<0.05$ vs NC + COE group, same as below

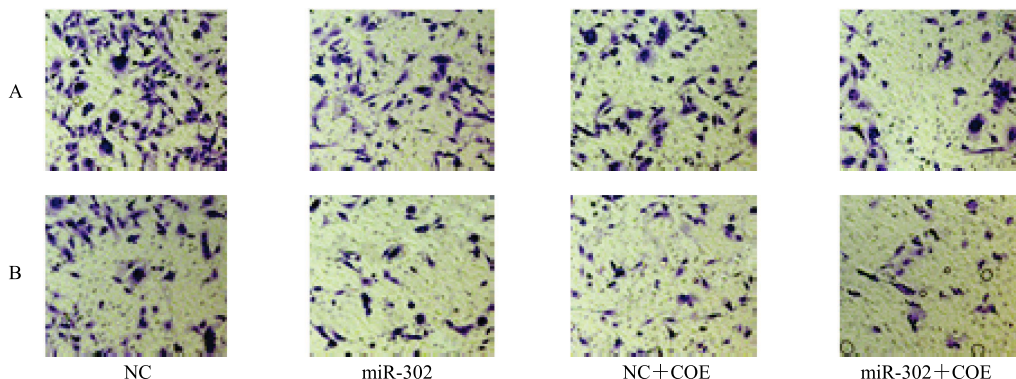


图 1 COE 联合 miR-302 对 TE-1 细胞侵袭 (A) 和迁移 (B) 的影响

Fig. 1 Effect of COE combined with miR-302 on invasion (A) and migration (B) of TE-1 cells

表 4 COE 联合 miR-302 对 TE-1 细胞侵袭和迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of COE combined with miR-302 on invasion and migration of TE-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	侵袭细胞数	迁移细胞数
NC	54.60 $\pm$ 6.12	76.78 $\pm$ 8.25
miR-302	36.12 $\pm$ 4.08*	50.45 $\pm$ 6.26*
NC+COE	35.26 $\pm$ 3.86*	48.88 $\pm$ 5.96*
miR-302+COE	19.69 $\pm$ 2.05*&#	26.52 $\pm$ 3.29*&#

3.5 COE 联合 miR-302 对 PI3K/Akt 信号通路的调控作用

Western blotting 检测各组食管癌 TE-1 细胞中 PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达情况, 结果见图 2 和表 5。miR-302 组、NC+COE 组和 miR-302+COE 组 TE-1 细胞中 PI3K 和 p-Akt 蛋白表达显著低于 NC 组 ($P<0.05$), miR-302+COE 组 PI3K 和 p-Akt 蛋白表达最低 ($P<0.05$), Akt 蛋白表达水平在各组间差异不显著 ($P>0.05$)。表明 COE 及过表达 miR-302 均能够抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化, 且二者联合使

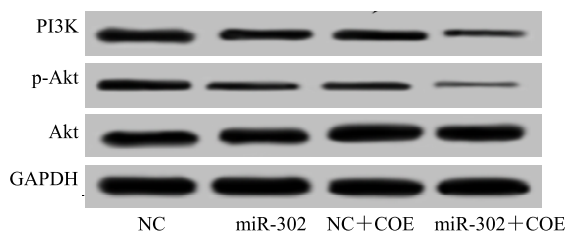


图 2 Western blotting 检测 TE-1 细胞中 PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达水平

Fig. 2 Protein expression levels of PI3K, p-Akt, and Akt in TE-1 cells detected by Western blotting

表 5 各组 TE-1 细胞中 PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Comparison of protein expression levels of PI3K, p-Akt, and Akt in TE-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	蛋白相对表达量		
	PI3K	p-Akt	Akt
NC	0.48 ± 0.05	0.31 ± 0.03	0.87 ± 0.09
miR-302	$0.34 \pm 0.03^*$	$0.21 \pm 0.02^*$	0.86 ± 0.08
NC+COE	$0.32 \pm 0.03^*$	$0.20 \pm 0.02^*$	0.86 ± 0.09
miR-302+COE	$0.10 \pm 0.01^{* \& \#}$	$0.04 \pm 0.01^{* \& \#}$	0.88 ± 0.10

寻找低毒或无毒高效药物以及采用多种方式共同抑制食管癌细胞增殖、侵袭和迁移对食管癌的治疗具有十分重要的临床意义。近年来,采用传统中药联合 miRNA 用于抗肿瘤的治疗取得了一定的进展,亦受到广大学者的关注。南蛇藤分布较广泛,其根、藤茎、叶和果均可入药,药性辛温,小毒,具有活血、解毒、祛风、消肿等功能。近期研究^[13]发现,南蛇藤还具有抗炎镇痛及抗肿瘤的作用。因此,对南蛇藤抗肿瘤的研究能够产生巨大的社会和经济效益。研究^[14]显示,南蛇藤提取物能够诱导食管癌细胞周期阻滞和细胞凋亡。为降低南蛇藤提取物对细胞的作用浓度,增强其抗肿瘤效果,联合 miRNA 干扰可能是一种新的研究思路。最近的数据表明,异常的 miRNA 表达通常参与癌症的发展,包括食管癌在内的各种癌症从发病到转移^[15-16]。Wang 等^[17]研究显示,miR-302 在食管癌中表达上调可抑制细胞增殖和侵袭。因此本实验联合使用 COE 和 miR-302,观察对食管癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响,并探讨其作用机制。

本实验体外转染 miR-302 mimic 至食管癌 TE-1 细胞,联合 COE 共同作用 TE-1 细胞,探讨二者联合作用效果。实验首先检测了 miR-302 在食管癌细胞中的表达情况,结果发现 miR-302 在食管癌细胞中的表达显著低于正常食管上皮细胞,因此本实验选取表达水平最低的食管癌 TE-1 细胞进行转染实

验。转染 miR-302 mimic 后 TE-1 细胞中 miR-302 的表达明显升高,且转染阴性对照 (NC) 和空白对照组细胞中 miR-302 的表达无显著差异,因此 NC 组细胞进行后续实验。COE 单独使用或联合转染的细胞,CCK-8 和 Transwell 实验结果显示,单独使用 COE 或过表达 miR-302 均可抑制 TE-1 细胞增殖、侵袭和迁移,且二者联合使用效果强于单一因素作用。提示 COE 联合 miR-302 能够协同抑制食管癌 TE-1 细胞增殖、侵袭和迁移。PI3K/Akt 信号通路参与细胞生长、代谢、增殖、葡萄糖稳态和囊泡运输的调节。PI3K/Akt 信号通路成分的表达失调与人类癌症的发生和发展密切相关。例如,p-Akt 在体外促进细胞增殖和存活,并且在前列腺癌进展中起重要作用^[18]。此外,p-Akt 的过表达促进食管癌细胞系 ECA-109 的增殖和肿瘤发生^[19]。本实验通过 Western blotting 检测 TE-1 细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达,结果发现无论单因素还是联合使用 PI3K 和 p-Akt 的表达均显著被抑制,且联合使用被抑制程度更高,而 Akt 蛋白表达无明显改变。表明 COE 或/和过表达 miR-302 可抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活。这与以往 COE 或 miR-302 通过 PI3K/Akt 信号通路影响肿瘤细胞生物学行为的研究一致^[20-23]。有研究^[20]表明,COE 能够通过调控 maspin 表达诱导人胃癌细胞凋亡,抑制细胞侵袭和迁移的能力,该过程与 PI3K/Akt/mTOR 信号转导途

4 讨论

食管癌是全球常见的癌症,也是全球癌症相关死亡的第 6 大原因。除常规手术和化疗外,尽管已开发出生物靶向药物,但食管癌的预后仍然较差,患者生存率仍在 10%~25%^[10]。目前研究^[11-12]表明,食管癌的发病和进展均与多细胞因子异常表达有关,因此,单一靶向因子或单用药难以产生良好的抗癌功效。并且,目前常规使用的化疗药物多为细胞毒性药物,对患者产生较大的毒副作用。因此

径的活化有关。Yang 等^[21]研究显示, COE 通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导结肠癌 HT-29 细胞自噬和凋亡。Wei 等^[22]指出, miR-302 的上调通过调节 PI3K/Akt 信号通路抑制结直肠癌细胞的增殖和侵袭。Xia 等^[23]研究显示, miR-302 通过 PI3K/Akt 信号通路抑制食管癌细胞的增殖。

由于 COE 和 miR-302 均能够通过 PI3K/Akt 信号通路调控肿瘤细胞生物学行为, 故而本实验将二者联合研究, 结果显示, COE 联合 miR-302 对食管癌 TE-1 细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用具有协同作用, 这种作用可能是通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活来实现, 但具体作用机制尚需后续实验深入探究。

参考文献

- [1] Di P B, Bronson N W, Diggs B S, *et al.* The global burden of esophageal cancer: A disability-adjusted life-year approach [J]. *World J Surg*, 2016, 40(2): 395-401.
- [2] Couch G, Redman J E, Wernisch L, *et al.* The discovery and validation of biomarkers for the diagnosis of esophageal squamous dysplasia and squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Prev Res*, 2016, 9(7): 558-566.
- [3] Sohda M, Kuwano H. Current status and future prospects for esophageal cancer treatment [J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 23(1): 1-11.
- [4] Zhu Y, Liu Y, Qian Y, *et al.* Antimetastatic effects of *Celastrus orbiculatus* on human gastric adenocarcinoma by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and NF- κ B/snail signaling pathway [J]. *Int Cancer Ther*, 2015, 14(3): 271-281.
- [5] Gu H, Feng J, Wang H, *et al.* *Celastrus orbiculatus* extract inhibits the migration and invasion of human glioblastoma cells *in vitro* [J]. *Bmc Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 387-345.
- [6] 曾晓刚, 葛明建. ATG5 敲低后抑制人肺癌细胞 H1299 自噬并增强南蛇藤素诱导的细胞凋亡 [J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(4): 531-536.
- [7] Tabrizi M, Khalili M, Vasei M, *et al.* Evaluating the miR-302b and miR-145 expression in formalin-fixed paraffin-embedded samples of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Arch Iran Med*, 2015, 18(3): 173-178.
- [8] 金 凤, 刘延庆, 钱亚云, 等. 南蛇藤提取物对人食管鳞癌 TE-8 细胞凋亡的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8): 3474-3477.
- [9] 王海波, 顾 昊, 赵雪煜, 等. 南蛇藤提取物通过调控基质金属蛋白酶组及其抑制因子抑制人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭转移的研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(8): 1345-1350.
- [10] Cellini F, Ramella S, Ciresa M, *et al.* Role of induction therapy in esophageal cancer [J]. *Rays*, 2016, 30(4): 329-333.
- [11] Dai F, Mei L, Meng S, *et al.* The global expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Genomics*, 2017, 109(3/4): 241-250.
- [12] Bhushan A, Singh A, Kapur S, *et al.* Identification and validation of fibroblast growth factor 12 gene as a novel potential biomarker in esophageal cancer using cancer genomic datasets [J]. *OMICS*, 2017, 21(10): 616-631.
- [13] Zhou J, Han N, Lv G, *et al.* Two new β -dihydroagarofuran sesquiterpenes from *Celastrus orbiculatus* Thunb and their anti-proliferative activity [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 948-958.
- [14] Jin F, Zhu G, Li D, *et al.* *Celastrus orbiculatus* extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human esophageal squamous carcinoma ECA-109 cells *in vitro* via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 1591-1599.
- [15] Bonci D, Coppola V, Patrizii M, *et al.* A microRNA code for prostate cancer metastasis [J]. *Oncogene*, 2016, 35(9): 1180-1192.
- [16] Fong L Y, Taccioli C, Jing R, *et al.* MicroRNA dysregulation and esophageal cancer development depend on the extent of zinc dietary deficiency [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 10723-10738.
- [17] Wang N, Zhang Z, Lv J. Fentanyl inhibits proliferation and invasion via enhancing miR-302b expression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1): 459-466.
- [18] Das T P, Suman S, Alattasi H, *et al.* Inhibition of AKT promotes FOXO3a-dependent apoptosis in prostate cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(2): e2111.
- [19] Liu R, Gu J, Jiang P, *et al.* DNMT1-microRNA126 epigenetic circuit contributes to esophageal squamous cell carcinoma growth via ADAM9-EGFR-AKT signaling [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(4): 854-63.
- [20] Qian Y, Lu S, Shi Y, *et al.* *Celastrus orbiculatus* extracts induce apoptosis and inhibit invasion by targeting the maspin gene in human gastric adenocarcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1): 243-249.
- [21] Yang L, Liu Y, Wang M, *et al.* *Celastrus orbiculatus* extract triggers apoptosis and autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition in human colorectal cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3771-3778.
- [22] Wei Z J, Tao M L, Zhang W, *et al.* Up-regulation of microRNA-302a inhibited the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by regulation of the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 8(5): 4481-4491.
- [23] Xia D, Tian S, Chen Z, *et al.* miR302a inhibits the proliferation of esophageal cancer cells through the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 3937-3943.