

• 药理与临床 •

基于 AMPK/mTOR 信号通路研究异常山碱对 EC9706 细胞能量代谢的调控机制

孟丹华, 尚艺婉, 武颖烁, 吴耀松, 刘 燕, 刘 俊, 李晨旭, 陈玉龙*

河南中医药大学 河南省方证信号传导重点实验室, 河南 郑州 450046

摘 要: **目的** 通过观察异常山碱对食管癌 EC9706 细胞的增殖、凋亡、周期、能量代谢及能量代谢通路相关蛋白表达的影响, 探讨其治疗食管癌的分子机制。**方法** 常规培养 ECC9706 细胞, 用 MTT 法检测细胞活性, 筛选药物浓度, 选择 1、2 $\mu\text{g/mL}$ 2 个质量浓度; 流式细胞术检测异常山碱对 EC9706 细胞凋亡、周期的影响, 能量代谢检测系统检测异常山碱对 EC9706 细胞能量代谢的影响, Western blotting 检测细胞中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (p-mTOR)、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶 (p-ACC)、腺苷磷酸激活蛋白激酶 (AMPK) 蛋白表达。**结果** 不同质量浓度异常山碱作用 48 h 后能有效抑制 EC9706 细胞增殖, 呈剂量依赖性 ($P < 0.01$), 可以将 EC9706 细胞阻滞于 S 期和 G₂/M 期 ($P < 0.05$), 有效促进细胞凋亡 ($P < 0.05$), 且明显抑制细胞糖酵解及线粒体代谢能力 ($P < 0.01$), 与对照组比较, 异常山碱组细胞 AMPK 蛋白表达水平上升, mTOR、p-mTOR、p-ACC 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。**结论** 异常山碱可能通过能量代谢调节 EC9706 细胞周期、凋亡, 抑制 EC9706 细胞增殖。

关键词: AMPK/mTOR 通路; 异常山碱; EC9706 细胞; 能量代谢; 增殖; 凋亡; 周期

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)17-4482-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.016

Isofebrifuzine regulates energy metabolism of EC9706 cells based on AMPK/mTOR signaling pathway

MENG Dan-hua, SHANG Yi-wan, WU Ying-shuo, WU Yao-song, LIU Yan, LIU Jun, LI Chen-xu, CHEN Yu-long

Henan Key Laboratory of Signal Transduction, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: objective To investigate the molecular mechanism of isofebrifuzine in the treatment of esophageal cancer by observing the effects of isofebrifuzine on proliferation, apoptosis, cycle, energy metabolism and protein expression related to energy metabolism pathway in EC9706 cells. **Methods** ECC9706 cells were routinely cultured, cell activity was detected by MTT method, drug concentration was screened, and two concentrations of 1 $\mu\text{g/mL}$ and 2 $\mu\text{g/mL}$ were selected, the effect of isofebrifuzine on apoptosis and cycle of esophageal cancer cells EC9706 was detected by flow cytometry. The effect of isofebrifuzine on energy metabolism of EC9706 cells was detected by energy metabolism detection system, and the protein expressions of mTOR, p-mTOR, p-ACC and AMPK in cells were detected by Western blotting. **Results** The proliferation of EC9706 cells was effectively inhibited in a dose-dependent manner ($P < 0.01$) after 48 h of treatment with different concentrations of isofebrifuzine, which could arrest EC9706 cells in S phase and G₂/M phase ($P < 0.05$), effectively promote cell apoptosis ($P < 0.05$), and significantly inhibit cell glycolysis and mitochondrial metabolism ($P < 0.01$). Compared with the control group, AMPK expression was increased and mTOR, p-mTOR, p-ACC expression was decreased in the treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** These results indicated that isofebrifuzine may regulate the cycle and apoptosis of EC9706 cells and inhibit the proliferation of EC9706 cells in esophageal cancer through energy metabolism.

Key words: AMPK/mTOR pathway; isofebrifuzine; EC9706 cells; energy metabolism; proliferation; apoptosis; cycle

收稿日期: 2020-01-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81173177); 国家自然科学基金面上项目 (81373535); 河南省高等学校重点科研项目 (19A3600-14)

作者简介: 孟丹华 (1994—), 女, 河南焦作人, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治肿瘤。

Tel: 15036084045 E-mail: 2830790468@qq.com

*通信作者 陈玉龙 (1972—), 男, 河南平舆人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中医药防治肿瘤研究。

Tel: (0371)65680206 E-mail: cyl72621@163.com

我国是食管癌的高发区,其发病率和死亡率居世界第1位,约占50%,且呈持续上升的趋势,给社会发展造成了极大的负担^[1-2]。临床食管癌的治疗主要采用手术与放化疗结合的综合治疗手段或单用放化疗,但有效率极低,且不良反应明显^[3]。食管癌在中医属于“噎膈”的范畴,中医药在食管癌的治疗中疗效确切^[4-5]。痰浊是食管癌的主要病理因素,治疗当化痰散结,常山 *Dichroa febrifuga* Lour. 有化痰的功效,可能通过化痰散结发挥抗肿瘤的作用^[6]。异常山碱是常山的喹啉酮类化合物,是常山的主要活性成分,主要用于家禽抗球虫病,具有较高的安全性和稳定性^[7]。研究发现此类化合物及其衍生物可以通过干预肿瘤细胞周期、抑制细胞增殖与侵袭、增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,治疗乳腺癌、结肠癌、胃肠癌等多种恶性肿瘤^[8-11]。为探索异常山碱抑制食管癌 EC9706 细胞增殖的分子机制,本实验通过分子生物检测技术观察异常山碱对食管癌 EC9706 细胞生长的影响及分子机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

EC9706 细胞由河南中医药大学分子生物实验中心提供,本实验室传代培养。

1.2 药物

异常山碱,购自成都德思特生物公司,质量分数(HPLC)≥98%,批号 DST170504-188。

1.3 试剂

DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶-EDTA 消化液、DNA 含量检测试剂盒(索莱宝公司);胎牛血清(Gemini 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)、RIPA 裂解液(Solarbio 公司);二甲基亚砜(DMSO, Amresco 公司);Annexin V-FITC/PI 细胞双染凋亡试剂盒(联科生物公司);糖酵解速率检测试剂盒、线粒体压力检测试剂盒(美国安捷伦公司);兔抗人腺苷磷酸激活蛋白激酶(AMPK)抗体、兔抗人哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抗体、兔抗人 p-mTOR 抗体、兔抗人磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶(p-ACC)抗体、兔抗人 β-actin 抗体、兔二抗、蛋白 Marker (Cell Signaling Technology 公司)。

1.4 仪器

170R 型 CO₂ 培养箱(德国 Eppendorf 公司);37997 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);DFC450C 型荧光倒置显微镜(德国 Laica 公

司);ELx-800 型酶标仪(Bio-Tek 公司);L530 型离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);FACSVantage SE 型流式细胞仪(美国 BD 公司);能量代谢检测系统(美国安捷伦公司);垂直电泳槽、垂直湿转膜槽、凝胶成像扫描仪(Bio-Rad 公司);高速台式离心机(Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 药物制备

用 DMSO 将异常山碱粉末配制成质量浓度为 1 mg/mL 的药物悬液。

2.2 细胞培养

EC9706 细胞用含 10%血清 DMEM 高糖培养基,置于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度的培养箱中常规培养,48 h 换液,2~3 d 传代 1 次。

2.3 异常山碱对 EC9706 细胞活性的影响

取对数生长期的 EC9706 细胞 200 μL 种入 96 孔板,每孔含有 1×10⁴ 个细胞,培养 24 h 后,分别加入 200 μL 终质量浓度为 0.75、1.50、3.00、6.00 μg/mL 的异常山碱溶液,对照孔仅加入完全培养基。孵育 48 h 后吸去上液,加入 50 μg/mL MTT 溶液 100 μL,培养 4 h 后吸去上液,加入 150 μL DMSO,脱色摇床振荡 10 min 后酶标仪检测 570、490 nm 处吸光度(A)值,计算各组细胞的增殖抑制率,并计算半数抑制浓度(IC₅₀)值。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / A_{\text{对照}}$$

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

EC9706 细胞以 4×10⁵ 个/mL 接种于 6 孔板中,每孔 2.5 mL,培养 24 h 后,分别加入终质量浓度为 1、2 μg/mL 的异常山碱溶液,培养 48 h 后,常规消化收集细胞,2 000 r/min 离心 5 min 收集细胞沉淀,用预冷的 PBS 洗 2 次,计数 5×10⁵ 个细胞于离心管中,离心除去上清。加入 500 μL 1×Binding Buffer 到离心管中重悬细胞,分别加入 5 μL Annexin-V 和 10 μL PI 染色,轻轻振荡混匀,室温避光孵育 10 min;使用流式细胞仪进行测试。

2.5 流式细胞术检测细胞周期

EC9706 细胞以 4×10⁵ 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,每孔 2.5 mL,培养 24 h,分别加入终质量浓度为 1、2 μg/mL 的异常山碱溶液,培养 48 h 后,常规消化收集细胞。2 000 r/min 离心 5 min 收集细胞沉淀,预冷的 PBS 洗细胞 2 次,计数 1×10⁶ 个细胞于离心管中,离心除去上清液,加入 2 mL 75%无水乙醇于 4 °C 冰箱固定过夜。离心,弃固定

液,用预冷 PBS 缓冲液洗 2 次,离心收集细胞。加入 100 μL RNA 裂解酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,后加入 400 μL PI 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,使用流式细胞仪检测。

2.6 能量代谢分析系统检测 EC9706 细胞能量代谢

EC9706 细胞种在 96 孔板中,每孔 8×10^3 个细胞,80 μL /孔。培养 24 h,分别加入终质量浓度为 1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的异常山碱溶液,培养 48 h 以后上机检测。上机前 1 d 水化探针,放入不含 CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,过夜。配制检测培养基,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。上机前 2 h,将探针板中的水换成 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过的水化液,再次放入不含 CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中。在上机前 1 h,用配制好的检测培养基清洗细胞 2 次。配制试剂盒中的药物,本实验包括糖酵解速率测试和线粒体压力测试,需要配制 2 个不同的试剂盒,配药完成后,探针板加药,上机检测。

2.7 统计学分析

统计学分析采用 SPSS 21.0 数据统计软件进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 异常山碱对 EC9706 细胞活性的影响

与对照组比较,各质量浓度的异常山碱组细胞的 A 值均减小。随着异常山碱质量浓度的升高,其对 EC9706 细胞活性的抑制作用增强 ($P < 0.01$,表 1)。根据 3 次实验所得抑制率,用 IBM SPSS 21.0 软件进行回归分析,可得出异常山碱作用于 EC9706 细

胞的 IC_{30} 值为 1.103 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IC_{50} 值为 2.417 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。基于以上实验结果,选用异常山碱 1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2 个质量浓度用于后续实验。

3.2 细胞形态学改变

显微镜下观察,正常 EC9706 细胞呈多边形贴壁生长,胞质饱满,典型的上皮细胞形态;随着异常山碱质量浓度的增加,细胞变圆、变小,贴壁细胞数目逐渐减少,细胞间隙增大,见图 1。

3.3 异常山碱对 EC9706 细胞凋亡的影响

异常山碱作用于 EC9706 细胞 48 h 后,与对照组比较,异常山碱组细胞凋亡率明显升高,低、高质量浓度差异显著 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

3.4 异常山碱对 EC9706 细胞周期的影响

异常山碱作用于 EC9706 细胞 48 h 后,与对照组

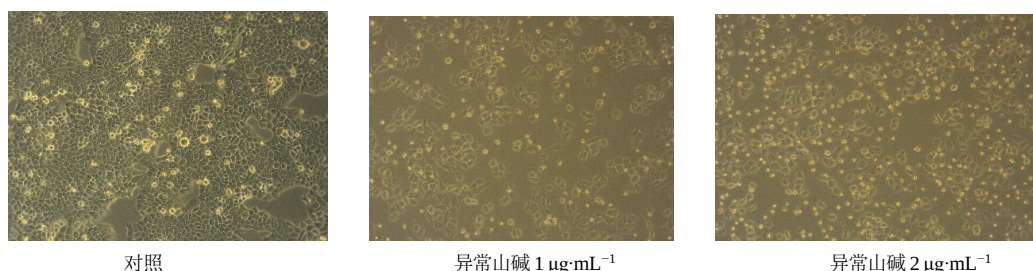
表 1 异常山碱对 EC9706 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of isofebrifuzine on activity of EC9706 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	A 值	抑制率/%
对照	—	2.1518 ± 0.0309	0
异常山碱	0.75	1.5445 ± 0.0555	27.73**
	1.50	1.3040 ± 0.0726	39.00**
	3.00	0.8345 ± 0.0276	60.95**
	6.00	0.2345 ± 0.0374	89.03**

与对照组比较: ** $P < 0.01$, 下表同

** $P < 0.01$ vs control group, same as below table



对照

异常山碱 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

异常山碱 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

图 1 异常山碱作用 48 h 后对 EC9706 细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of isofebrifuzine on morphology of EC9706 cells after 48 h

比较,异常山碱组 G_0/G_1 期细胞占比明显降低 ($P < 0.05$), S、 G_2/M 期细胞占比明显增高 ($P < 0.05$)。见图 2 和表 3。

3.5 异常山碱对 EC9706 能量代谢的影响

3.5.1 异常山碱对 EC9706 细胞糖酵解速率的影响 与对照组比较,异常山碱 1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均可降低 EC9706 细胞的补偿糖酵解速率、基础糖酵解速率,降低糖酵解潜能,抑制该细胞糖酵解能力 ($P < 0.01$),但低、高质量浓度无明显差异。见表 4 和图 3。

表 2 异常山碱对 EC9706 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of isofebrifuzine on apoptosis of EC9706 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	凋亡率/%
对照	—	12.25 ± 1.92
异常山碱	1	$26.67 \pm 5.03^*$
	2	$49.15 \pm 3.80^{*#}$

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与异常山碱 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$, 下表同

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs isofebrifuzine 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, same as below table

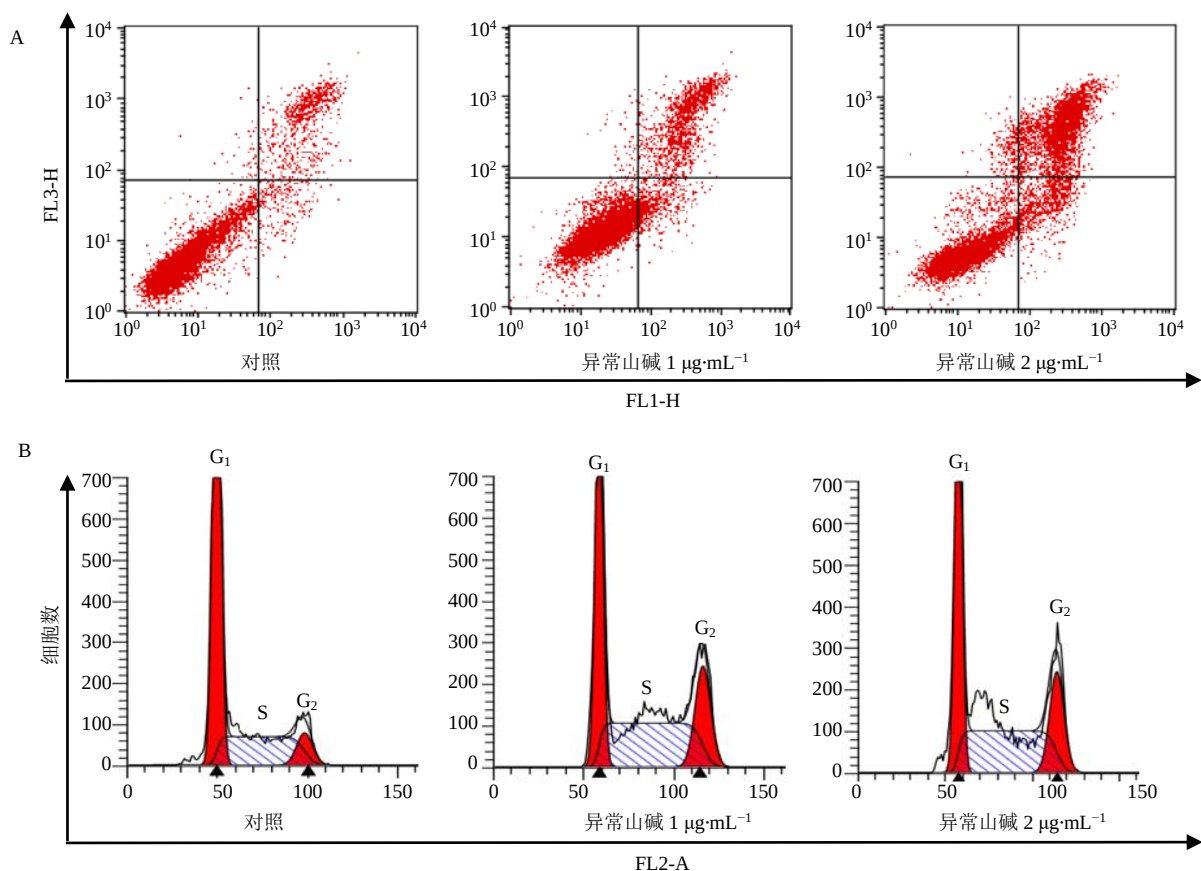


图 2 异常山碱对 EC9706 细胞凋亡 (A) 和细胞周期 (B) 的影响

Fig. 2 Effect of isofebrifuzine on apoptosis (A) and cell cycle (B) of EC9706 cells

表 3 异常山碱对 EC9706 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of isofebrifuzine on EC9706 cell cycle ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	占比/%		
		G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照	—	64.39 ± 0.68	28.71 ± 1.07	6.88 ± 0.67
异常山碱	1	41.61 ± 6.46*	40.23 ± 4.65*	18.15 ± 1.83*
	2	42.52 ± 2.38*	40.94 ± 0.96*	16.52 ± 3.12*

表 4 异常山碱对 EC9706 细胞糖酵解潜能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of isofebrifuzine on glycolysis potential of EC9706 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	补偿糖酵解速率/ ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$)	基础糖酵解速率/ ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$)	线粒体代谢与基础糖酵 解比值/%	糖酵解潜能/ ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$)
对照	—	879.4 ± 106.8	285.2 ± 34.2	0.41 ± 0.02	375.3 ± 65.2
异常山碱	1	266.4 ± 24.4**	154.8 ± 22.1**	0.29 ± 0.01	65.5 ± 8.9**
	2	107.4 ± 17.9**	115.8 ± 21.2**	0.50 ± 0.03	14.7 ± 8.1**

3.5.2 异常山碱对 EC9706 细胞线粒体压力的影响 与对照组比较, 异常山碱 1、2 $\mu\text{g/mL}$ 均可显著抑制 EC9706 细胞的线粒体呼吸能力, ATP 合成耗氧量 (ATP production)、线粒体最大耗氧能力 (maximal

respiration)、备用呼吸能力 (spare respiratory capacity)、基础呼吸值及非线粒体耗氧 (non-mitochondrial respiration) 均显著降低 ($P < 0.01$)。但低质量浓度组 and 高质量浓度组之间没有差异。见表 5 和图 4。

3.6 异常山碱对 EC9706 细胞 mTOR、p-mTOR、p-ACC、AMPK 蛋白表达的影响

与对照组比较, 异常山碱 1、2 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞

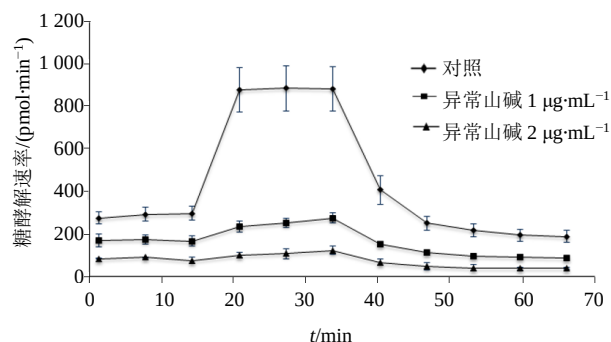


图3 异常山碱对 EC9706 细胞糖酵解潜能影响的“海马”曲线
Fig. 3 “Hippocampal” curve of effect of isofebrifuzine on glycolytic potential of EC9706 cells

表5 不同质量浓度异常山碱对 EC9706 细胞线粒体能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of different concentrations of isofebrifuzine on mitochondrial capacity of EC9706 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	ATP 合成耗氧量/ ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$)	线粒体最大耗氧能力/ ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$)	基础呼吸值/ ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$)	非线粒体耗氧/ ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$)	备用呼吸能力/ ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$)
对照	—	63.79 ± 11.59	143.60 ± 24.61	85.41 ± 17.63	51.25 ± 6.96	58.18 ± 10.32
异常山碱	1	$22.80 \pm 1.76^{**}$	$43.99 \pm 1.58^{**}$	$34.62 \pm 1.47^{**}$	$9.96 \pm 2.03^{**}$	$9.37 \pm 2.36^{**}$
	2	$7.70 \pm 2.78^{**}$	$16.85 \pm 6.68^{**}$	$11.12 \pm 4.84^{**}$	$13.98 \pm 1.64^{**}$	$5.73 \pm 1.98^{**}$

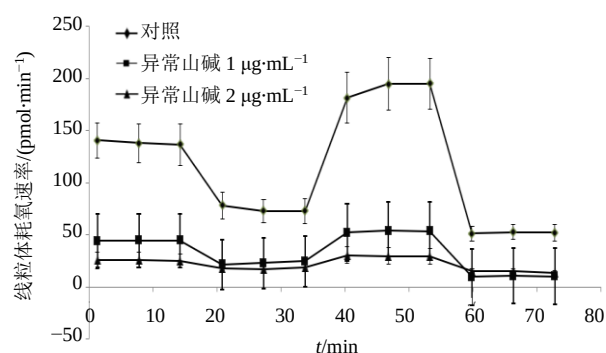


图4 异常山碱对 EC9706 细胞线粒体能力影响的“海马”曲线
Fig. 4 “Hippocampal” curve of effect of isofebrifuzine on mitochondrial capacity of EC9706 cells

表6 异常山碱对 AMPK/mTOR 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of isofebrifuzine on protein expression of AMPK/mTOR signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	蛋白相对表达量			
		AMPK	mTOR	p-mTOR	p-ACC
对照	—	0.71 ± 0.18	1.13 ± 0.19	1.07 ± 0.10	0.91 ± 0.25
异常山碱	1	$1.14 \pm 0.13^*$	$0.46 \pm 0.15^*$	$0.69 \pm 0.25^*$	$0.55 \pm 0.09^*$
	2	$1.51 \pm 0.13^*$	$0.37 \pm 0.18^*$	$0.43 \pm 0.12^*$	$0.33 \pm 0.09^*$

AMPK 蛋白表达水平显著升高, mTOR、p-mTOR、p-ACC 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 5 和表 6。

4 讨论

痰浊是食管癌的基本病机之一, 治疗当化痰去浊, 而中药常山有涌吐痰涎的功效, 可能通过化痰散结的方法治疗食管癌^[6]。目前中药的研究不仅局限于水煎剂, 具有安全性和稳定性的化合物在实验研究中广泛应用^[12]。异常山碱是常山中的喹诺酮类化合物, 是其主要活性成分, 具有较高的安全性和稳定性^[13]。研究发现此类化合物及其衍生物可以通过干预细胞信号转导通路、抑制肿瘤细胞活性、诱导肿瘤细胞凋亡、自噬等途径, 治疗膀胱癌、乳腺癌、胃肠癌、肺癌等多种恶性肿瘤疾病^[14-16]。为了进一步研究食管癌的有效治疗药物, 本研究选用异常

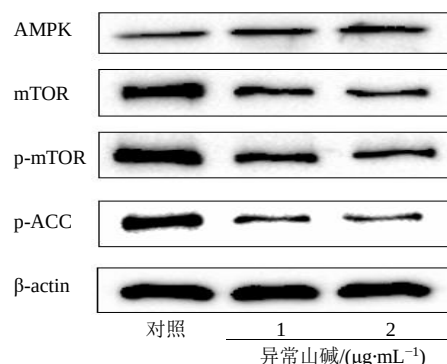


图5 异常山碱对 AMPK/mTOR 信号通路蛋白表达的影响
Fig. 5 Effect of isofebrifuzine on protein expression of AMPK/mTOR signaling pathway

山碱进行实验,利用 MTT 法检测异常山碱对食管癌 EC9706 细胞活性的影响。结果发现,药物对食管癌 EC9706 细胞的增殖有抑制作用,且呈剂量依赖性。

调控细胞周期是抑制肿瘤增殖的一个重要靶点,研究发现,诱导细胞周期停滞可以抑制食管癌细胞的增殖^[17-19]。基于此,提出异常山碱是否是通过调节 EC9706 细胞周期发挥抗食管癌的作用。为探索其分子机制,用流式细胞术检测异常山碱对 EC9706 细胞周期的影响,实验结果显示,用药组 S 期、G₂/M 期细胞比率较对照组升高,G₁ 期细胞比率较对照组降低。提示,异常山碱可以将细胞周期阻滞于 S 期及 G₂/M 期。抵抗细胞凋亡是肿瘤细胞的一大特征,检测异常山碱对 EC9706 细胞凋亡的影响是必要的^[20]。进一步用流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果显示,异常山碱作用后 EC9706 细胞的凋亡率明显高于对照组,且具有剂量依赖性。说明异常山碱可能影响肿瘤细胞的活性,将 EC9706 细胞阻滞于 S 期及 G₂/M 期,抑制细胞的增殖,进而诱导细胞程序性凋亡。

细胞代谢的重新编程是癌症的新标志,细胞能量代谢方式异常改变为肿瘤细胞的无限增殖等活动提供充足能量^[21],调控癌症细胞能量代谢可能是针对癌症的一种特异性治疗^[22]。许多肿瘤组织的葡萄糖摄取能力高于邻近的正常组织,调节肿瘤细胞糖酵解已经成为治疗肿瘤的一个重要靶点,而抑制线粒体呼吸链也是抗肿瘤的一个重要途径^[23-24]。阻断细胞能量代谢途径可能会影响细胞周期活动,从而抑制细胞增殖,并促进其凋亡,为进一步验证能量代谢与细胞周期、凋亡之间的关系,本实验通过检测糖酵解速率和线粒体压力探讨异常山碱对 EC9706 细胞能量代谢的影响。实验结果表明,异常山碱可以抑制 EC9706 细胞的糖酵解速率和线粒体的潜在呼吸能力。有研究表明,线粒体抑制剂可以抑制肿瘤细胞增殖,阻滞细胞周期、促进细胞凋亡^[25]。说明异常山碱可能通过干预细胞的糖酵解和线粒体功能,阻断细胞肿瘤细胞能量供应,诱导细胞周期停滞,抑制食管癌 EC9706 细胞增殖,进一步促进细胞凋亡。

AMPK 是能量稳态的中央调节器,不仅能引起急性代谢反应,还能通过调节特定的转录因子和辅激活因子,促进代谢的长期重新编程和适应^[26]。在缺乏能量的条件下,AMPK 可以被激活,并且进一步磷酸化下游信号分子,从而调节体内糖、脂肪、

胆固醇的代谢,参与调节多细胞功能^[27-28]。AMPK 在肿瘤细胞的能量代谢中起着重要作用,是目前治疗肿瘤的重要靶点^[29-30]。mTOR 和 ACC 是 AMPK 下游信号分子,在能量、激素等外界信号刺激下,可以调节机体的蛋白质、脂质合成及多细胞功能^[31-32]。AMPK 被激活后可以通过磷酸化 ACC 及 mTORC1 复合体上的 RAPTOR 而使 ACC 和 mTOR 失活,从而调节肿瘤细胞能量代谢,控制肿瘤细胞的生长、增殖、凋亡等活动^[33-34]。本实验结果显示,异常山碱能激活 AMPK,降低 mTOR、p-mTOR 以及 p-ACC 的表达。其中,p-ACC 表达水平下调与现有文献报道 AMPK 激活后上调 p-ACC 表达水平不一致,可能是在 EC9706 细胞系中异常山碱通过其他机制降低了 ACC 蛋白整体表达水平,导致其磷酸化水平降低。结果显示,异常山碱低、高浓度对 EC9706 细胞糖酵解速率、线粒体功能及相关信号分子蛋白表达的影响没有显著差异,表明异常山碱对 EC9706 细胞能量代谢功能具有较强的抑制作用,可能导致细胞糖酵解及细胞线粒体功能基本丧失。因此本实验提示异常山碱可能通过 AMPK/mTOR 信号通路调节食管癌 EC9706 细胞的能量代谢活动。其具体分子机制尚需进一步研究。

综上所述,异常山碱可以抑制食管癌 EC9706 细胞增殖,其机制可能是通过 AMPK/mTOR/ACC 信号通路阻断细胞能量代谢途径,将细胞阻滞于 S 期及 G₂/M 期,抑制其增殖,并且诱导 EC9706 细胞发生凋亡。关于异常山碱治疗食管癌的分子机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Malhotra G K, Yanala U, Ravipati A, et al. Global trends in esophageal cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2017, 115(5): 564-579.
- [3] Ancona E, Ruol A, Santi S, et al. Only pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy improves significantly the long term survival of patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma: Final report of a randomized, controlled trial of preoperative chemotherapy versus surgery alone [J]. *Cancer*, 2001, 91(11): 2165-2174.
- [4] Ying J, Zhang M, Qiu X, et al. The potential of herb medicines in the treatment of esophageal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 381-390.

- [5] Zhang Y S, Shen Q, Li J. Traditional Chinese medicine targeting apoptotic mechanisms for esophageal cancer therapy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(3): 295-302.
- [6] 何若瑜, 周 瑛, 吴勉华, 等. 基于周仲瑛辨治经验的食管癌病机要素数据分析 [J]. *中医杂志*, 2014, 55(2): 110-113.
- [7] 张 越, 社会茹, 王永国, 等. 常山碱和异常山碱的合成研究进展 [J]. *河北师范大学学报: 自然科学版*, 2008, 32(4): 510-516.
- [8] Xia X, Wang X, Zhang S, *et al.* miR-31 shuttled by halofuginone-induced exosomes suppresses MFC-7 cell proliferation by modulating the HDAC2/cell cycle signaling axis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18970-18984.
- [9] Chen G Q, Gong R H, Yang D J, *et al.* Halofuginone dually regulates autophagic flux through nutrient-sensing pathways in colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2789.
- [10] Pines M. Halofuginone for fibrosis, regeneration and cancer in the gastrointestinal tract [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(40): 14778-14786.
- [11] Xu J, Wu J B, Tang C K. Effect of isofebrifugine on the proliferation and invasion of human gastric cancer cells via MMP [J]. *Cell Mol Biol*, 2020, 66(1): 2325.
- [12] 崔姗姗, 高小玲, 王慧慧, 等. 六君子汤提取物抑制食管癌 EC9706 细胞增殖及其对信号转导和转录活化因子 3 信号通路的影响 [J]. *中国全科医学*, 2016, 19(24): 2948-2952.
- [13] 张继远, 刘梓晗, 刘晓谦, 等. 常山中常山碱和异常山碱的同步测定研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(9): 1711-1716.
- [14] 张金进, 常山碱类似物的合成研究 [D]. 广州: 广东工业大学, 2018.
- [15] Tsuchida K, Tsujita T, Hayashi M, *et al.* Halofuginone enhances the chemo-sensitivity of cancer cells by suppressing NRF2 accumulation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 103: 236-247.
- [16] Follo C, Vidoni C, Morani F, *et al.* Amino acid response by halofuginone in cancer cells triggers autophagy through proteasome degradation of mTOR [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 39.
- [17] Zhang J, Li S, Shang Z, *et al.* Targeting the overexpressed ROC1 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis in esophageal cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 29125-29137.
- [18] Lin J, Yang T, Peng Z, *et al.* SLC1A5 silencing inhibits esophageal cancer growth via cell cycle arrest and apoptosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(1): 397.
- [19] Li C, Zhou X, Wang Y, *et al.* miR210 regulates esophageal cancer cell proliferation by inducing G2/M phase cell cycle arrest through targeting PLK1 [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(4): 2099-2104.
- [20] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [21] Wei X, Mao T, Li S, *et al.* DT-13 inhibited the proliferation of colorectal cancer via glycolytic metabolism and AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 120-131.
- [22] Kim S Y. Targeting cancer energy metabolism: A potential systemic cure for cancer [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(2): 140-149.
- [23] Vander Heiden M G. Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(9): 671-684.
- [24] Roesch A, Vultur A, Bogeski I, *et al.* Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B (high) cells [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(6): 811-825.
- [25] Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, *et al.* Energy metabolism in tumor cells [J]. *Febs J*, 2007, 274(6): 1393-1418.
- [26] Caterina C, Marc F, Maria D, *et al.* AMPK promotes induction of the tumor suppressor FLCN through activation of TFEB independently of mTOR [J]. *Faseb J*, 2019, 33(11): 12374-12391.
- [27] Mao N, Tan R Z, Wang S Q, *et al.* Ginsenoside Rg₁ inhibits angiotensin II-induced podocyte autophagy via AMPK/mTOR/PI3K pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(8): 917-925.
- [28] Hardie D G. AMPK: Positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 1-7.
- [29] Marsin A S, Bouzin C, Bertrand L, *et al.* The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(34): 30778-30783.
- [30] Bungard D, Fuerth B J, Zeng P Y, *et al.* Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation [J]. *Science*, 2010, 329(5996): 1201-1205.
- [31] Albert V, Hall M N. mTOR signaling in cellular and organismal energetics [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 55-66.
- [32] Tang H, Li J, Liu X, *et al.* Down-regulation of HSP60 suppresses the proliferation of glioblastoma cells via the ROS/AMPK/mTOR pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28388.
- [33] Kang J I, Hong J Y, Lee H J, *et al.* Anti-tumor activity of yuanhuacine by regulating AMPK/mTOR signaling pathway and actin cytoskeleton organization in non-small cell lung cancer cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144368.
- [34] Leprore S, Kautbally S, Octave M, *et al.* AMPK-ACC signaling modulates platelet phospholipids and potentiates thrombus formation [J]. *Blood*, 2018, 132(11): 1180-1192.