

日蟾蜍它灵通过 PFKFB4 介导的 GSK-3 β /mTOR 信号通路诱导鼻咽癌细胞自噬

张乃宇¹, 慕岳峻², 孙 欣¹, 张雪峰³, 冯晓飞³, 熊雪梅¹, 林海燕¹, 毕思学^{1*}

1. 山东中医药大学中医学院, 山东 烟台 264003

2. 山东中医药大学附属烟台市中医医院, 山东 烟台 264000

3. 山东中医药大学烟台附属医院, 山东 烟台 264100

摘要: **目的** 研究日蟾蜍它灵(gamabufotalin, CS-6)对鼻咽癌细胞增殖的影响,从细胞周期阻滞和自噬探讨 CS-6 抑制鼻咽癌细胞增殖的机制。**方法** 通过 CCK-8 实验、克隆形成实验检测 CS-6 对 HK-1 和 5-8F 细胞的增殖抑制作用;使用流式细胞仪检测 CS-6 对 HK-1 和 5-8F 细胞周期分布和凋亡的影响;采用 Western blotting 检测细胞周期蛋白 B1(Cyclin B1)和周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin dependent protein kinase 1, CDK1)的表达;采用转录组测序技术筛选 CS-6 作用于细胞后的差异表达基因,IPA 软件分析差异表达基因的富集通路;采用透射电镜观察 CS-6 作用于细胞后自噬体的超微结构;采用 Western blotting 检测微管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、p62、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路相关蛋白表达;通过瞬时转染 mCherry-EGFP-LC3 质粒后,使用激光共聚焦显微镜观察 CS-6 作用于细胞后自噬通量的变化。为了研究 PFKFB4 在 CS-6 诱导鼻咽癌细胞增殖、周期阻滞及自噬中的作用, HK-1 和 5-8F 细胞转染 PFKFB4 质粒后,采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶-4(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4, PFKFB4)的表达,检测细胞存活率、集落形成、自噬通量、细胞周期和自噬相关蛋白表达的变化。体内建立鼻咽癌移植瘤小鼠模型,给予 CS-6 干预后,测定肿瘤体积和质量,采用苏木素-伊红染色观察肿瘤、肝、肾组织病理变化,采用免疫组化法检测肿瘤组织 Ki67 表达,采用 Western blotting 检测肿瘤组织中 LC3、p62、Cyclin B1、CDK1、p-mTOR、PFKFB4、p-GSK-3 β 蛋白表达。**结果** CS-6 作用于细胞 48 h 后,能够显著抑制 HK-1 和 5-8F 细胞的增殖($P<0.05$ 、 0.001),其半数抑制浓度分别为 8.684、14.320 nmol/L;CS-6 引起 HK-1 和 5-8F 细胞发生明显的 G₂/M 期阻滞($P<0.05$ 、 0.01),同时增加 Cyclin B1 和 CDK1 的蛋白表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001);CS-6 在 48 h 处理条件下未诱导 HK-1 和 5-8F 细胞发生凋亡。CS-6 显著降低 PFKFB4 的 mRNA 及蛋白表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),在细胞内观察到自噬典型的双层膜结构及自噬溶酶体,上调 LC3-II/I 以及下调 p62 的蛋白表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),促进自噬体与溶酶体的融合。过表达 PFKFB4 能部分逆转 CS-6 对细胞增殖的抑制以及对细胞周期、自噬相关蛋白表达的调控作用($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),并使自噬小体和溶酶体的融合受阻。CS-6 显著增加 p-GSK-3 β 表达并抑制 p-mTOR 的表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001);过表达 PFKFB4 可部分逆转 CS-6 对 p-GSK-3 β 和 p-mTOR 的调控作用($P<0.05$ 、 0.01)。体内实验中,CS-6 显著抑制荷瘤小鼠肿瘤生长($P<0.001$),诱导肿瘤组织发生病理损伤,抑制肿瘤细胞增殖($P<0.001$),上调肿瘤组织中 LC3-II/I、p-GSK3 β 表达并下调 p62 表达($P<0.001$),下调 p-mTOR、PFKFB4、Cyclin B1 和 CDK1 的蛋白表达($P<0.01$ 、 0.001),且对肝肾组织无影响。**结论** CS-6 通过下调 PFKFB4,进而调控 GSK-3 β /mTOR 信号通路,激活自噬及细胞周期过程,从而发挥抗鼻咽癌作用。

关键词: 鼻咽癌;日蟾蜍它灵;PFKFB4;细胞自噬;GSK-3 β /mTOR 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)19-7651-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.19.013

Gamabufotalin induces autophagy via PFKFB4-mediated GSK-3 β /mTOR signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells

ZHANG Naiyu¹, MU Yuejun², SUN Xin¹, ZHANG Xuefeng³, FENG Xiaofei³, XIONG Xuemei¹, LIN Haiyan¹, BI Sixue¹

收稿日期: 2026-02-19

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2024MH059);滨州医学院中医药学科融合科技计划专项项目(2024YYKJ12);国家自然科学基金青年基金项目(82104463);山东省自然科学基金青年基金项目(ZR202103060169)

作者简介: 张乃宇,女,硕士研究生,研究方向为中药抗肿瘤药理研究。E-mail: 1226984985@qq.com

***通信作者:** 毕思学,男,博士,硕士生导师,从事天然药物活性成分的分离纯化及其免疫抗肿瘤活性研究。E-mail: 120438702@qq.com

1. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong Medical and Pharmaceutical University, Yantai 264003, China
2. Yantai Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Shandong Medical and Pharmaceutical University, Yantai 264000, China
3. Yantai Affiliated Hospital of Shandong Medical and Pharmaceutical University, Yantai 264100, China

Abstract: Objective To study the effect of gamabufotalin (CS-6) on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells, and explore the mechanism by which CS-6 inhibits nasopharyngeal carcinoma cell proliferation through cell cycle arrest and autophagy. **Methods** The inhibitory effect of CS-6 on the proliferation of HK-1 and 5-8F cells was detected through CCK-8 assay and colony formation assay. Flow cytometry was used to detect the effect of CS-6 on the cell cycle distribution and apoptosis of HK-1 and 5-8F cells. Western blotting was used to detect the expressions of Cyclin B1 and cyclin dependent protein kinase 1 (CDK1). Transcriptome sequencing was used to screen for differentially expressed genes after CS-6 treatment, and IPA software was used to analyze the enrichment pathways of differentially expressed genes. The ultrastructure of autophagosomes after CS-6 acts on cells was observed using transmission electron microscopy. Western blotting was used to detect the expressions of microtubule associated protein light chain 3 (LC3), p62, and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway related proteins. After transient transfection of mCherry-EGFP-LC3 plasmid, the changes in autophagy flux of cells treated with CS-6 were observed using laser confocal microscopy. In order to investigate the effect of PFKFB4 on CS-6-induced proliferation, cell cycle arrest and autophagy of nasopharyngeal carcinoma cells, HK-1 and 5-8F cells were transfected with PFKFB4 plasmid, qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-4 (PFKFB4), as well as changes in cell survival rate, colony formation, autophagy flux, cell cycle and autophagy related protein expressions. A mouse model of nasopharyngeal carcinoma transplantation *in vivo* was established, after CS-6 administration, tumor volume and weight were measured, pathological changes in tumor, liver and kidney tissues were observed using hematoxylin-eosin staining, Ki67 expression in tumor tissues was detected using immunohistochemistry, LC3, p62, Cyclin B1, CDK1, p-mTOR, PFKFB4 and p-GSK-3 β protein expressions in tumor tissues were detected using Western blotting. **Results** After 48 h of treatment, CS-6 significantly inhibited the proliferation of HK-1 and 5-8F cells ($P < 0.05$, 0.001), with half-maximal inhibitory concentrations of 8.684 and 14.320 nmol/L, respectively. CS-6 caused significant G₂/M phase arrest in HK-1 and 5-8F cells ($P < 0.05$, 0.01), while increasing protein expressions of Cyclin B1 and CDK1 ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). CS-6 did not induce apoptosis in HK-1 and 5-8F cells under treatment conditions of 48 h. CS-6 significantly reduced the mRNA and protein expressions of PFKFB4 ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), typical double-membrane autophagosomes and autolysosomes were observed in the cells, CS-6 upregulated LC3-II/I and downregulated p62 protein expressions ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), promoted the fusion of autophagosomes and lysosomes. Overexpression of PFKFB4 could partially reverse the inhibitory effect of CS-6 on cell proliferation and regulate the expressions of cell cycle and autophagy related proteins ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), and inhibit the fusion of autophagosomes and lysosomes. CS-6 significantly increased the expression of p-GSK-3 β and inhibited the expression of p-mTOR ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). Overexpression of PFKFB4 could partially reverse the regulatory effects of CS-6 on p-GSK-3 β and p-mTOR ($P < 0.05$, 0.01). *In vivo*, CS-6 significantly inhibited tumor growth in tumor bearing mice ($P < 0.001$), induced pathological damage to tumor tissue, inhibited tumor cell proliferation ($P < 0.001$), upregulated LC3-II/I, p-GSK-3 β expressions and downregulated p62 expression in tumor tissue ($P < 0.001$), downregulated protein expressions of p-mTOR, PFKFB4, Cyclin B1 and CDK1 ($P < 0.01$, 0.001), and had no effect on liver and kidney tissues. **Conclusion** CS-6 exerts an anti-nasopharyngeal carcinoma effect by downregulating PFKFB4, thereby regulating GSK-3 β /mTOR signaling pathway and inducing autophagy and cell-cycle arrest.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; gamabufotalin; PFKFB4; autophagy; GSK-3 β /mTOR signaling pathway

鼻咽癌是一种发生在头颈部的恶性肿瘤^[1-3]。病变部位主要在鼻咽部的咽隐窝及顶后壁,位置非常隐匿^[4]。大量研究证实,鼻咽癌发生发展与 EB 病毒密切相关。临床上,患者常出现头痛、反复鼻出血、鼻塞、眼部异常及颈部淋巴结肿大等症状^[5-6]。鼻咽癌发病率存在显著地域差异,东亚及东南亚地区(尤其是中国南部)的发病率远高于全球其他区域^[7]。此

外,鼻咽癌的男性患者高于女性患者^[8]。由于早期症状缺乏特异性,多数患者确诊时已处于晚期。流行病学数据显示,鼻咽癌患者 5 年总体生存率约为 73.7%^[9]。目前,临床上针对鼻咽癌的治疗方法包括放化疗及免疫治疗等。早期鼻咽癌患者死亡率比较低,大部分通过放化疗即可达到较好的疗效;晚期鼻咽癌患者主要采用放化疗和药物治疗的综合治

疗手段,但是晚期鼻咽癌发展进程快,容易向周围组织侵袭及扩散甚至是远处转移,导致多数中晚期患者即使化疗后生存率也比较低。长期放化疗会造成患者免疫功能急剧下降,产生严重的不良反应,威胁着患者的生命健康^[10-11]。因此,寻找可以安全有效治疗鼻咽癌的药物是非常迫切的任务。

近几十年来,天然小分子药物因其低毒性、天然来源广泛及可扩展生产等特性,在抗肿瘤领域备受关注^[12-13]。日蟾蜍它灵(gamabufotalin, CS-6)作为从蟾酥中提取的小分子衍生物,因其代谢稳定性及微弱不良反应,在多种恶性肿瘤(包括肝细胞癌、骨肉瘤及胶质母细胞瘤)中展现出卓越的抗癌疗效^[14-16]。然而 CS-6 在鼻咽癌中的治疗作用尚未明确。细胞自噬作为维持细胞内稳态的关键机制,其调控机制尚需深入研究。6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶-4(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4, PFKFB4)是糖酵解过程中的关键限速酶,可调节果糖-2,6-二磷酸的水平^[17-18]。研究发现,PFKFB4 在多种癌症中(如口腔鳞状细胞癌和卵巢癌)均过度表达^[19-20],其表达水平上调与药物耐药性增强密切相关,HeLa 细胞实验已证实这一现象^[21]。除了在糖酵解通路中的作用外,PFKFB4 还参与大分子合成、细胞周期进程和细胞凋亡,因而成为潜在的治疗靶点^[22]。PFKFB4 还与调节细胞自噬有关^[23-24]。基于此,本研究拟探讨 CS-6 对鼻咽癌细胞的影响及作用机制,为鼻咽癌临床治疗方案的开发提供了新的理论依据和实验基础。

1 材料

1.1 细胞

人鼻咽癌 HK-1 细胞(批号 TW-CC8200)和 5-8F 细胞(批号 CL0011),分别购自上海通蔚张江细胞库和湖南丰晖生物科技有限公司;人肾上皮 293T 细胞(批号 CBP60439)购自南京科佰生物科技有限公司。

1.2 动物

24 只 SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠,4~6 周龄,体质量 20 g,购自山东朋悦实验动物科技有限公司,生产许可证号 SCXK(鲁)20220006,动物质量合格证号 NO.370726240101644726。动物饲养于滨州医学院动物实验中心的 SPF 级实验动物室屏障系统内,裸鼠提前在动物房饲养 1 周,以适应新环境。动物实验经滨州医学院动物伦理委员会批准(批准号 2024-L097)。

1.3 药品与试剂

CS-6(批号 HY-N0883,分子式为 $C_{24}H_{34}O_5$,相对分子质量 402.52,质量分数为 99.96%)购自美国 MedChemExpress 公司;胎牛血清(批号 KGA6006-50)购自江苏凯基生物科技有限公司;青霉素-链霉素混合物(批号 SV30010)购自美国 Hyclone 公司;胰蛋白酶消化液(批号 15400054)购自美国 Gibco 公司;4%多聚甲醛(批号 R22038)购自百灵威科技有限公司;1%结晶紫(批号 BL2248A)购自安徽 BIO-SHARP 公司;CCK-8 试剂盒(批号 CA1210)、DNA 含量检测试剂盒(批号 CA1510)、凋亡检测试剂盒(批号 CA1020)、高效 RIPA 组织裂解液(批号 R0010)、蛋白磷酸酶抑制剂(批号 P1260)、三羟甲基氨基甲烷(Tris,批号 T8060)、甘氨酸(批号 G8200)、10%十二烷基硫酸钠(SDS,批号 S8010)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 PC0020)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(批号 P1200)、聚山梨酯-20(批号 T8220)、5×蛋白上样缓冲液(批号 P1040)、DMEM 基础培养基(批号 11995)、RPMI 1640 基础培养基(批号 11875)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,批号 D8371)购自北京索莱宝生物科技有限公司;PVDF 膜(批号 88518)、Lipofectamine 3000(批号 18324012)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;ECL 化学发光显色液(批号 WBULS0100)购自美国 Millipore 公司;细胞周期蛋白 B1(Cyclin B1)抗体(批号 28603-1-AP)、周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin dependent protein kinase 1, CDK1)抗体(批号 19532-1-AP)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抗体(批号 66888-1-Ig)、p-mTOR 抗体(批号 67778-1-Ig)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)抗体(批号 82061-1-RR)、p-GSK-3 β 抗体(批号 14850-1-AP)、微管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)抗体(批号 14600-1-AP)购自美国 Proteintech 公司;mCherry-EGFP-LC3 质粒(批号 C3002)购自上海碧云天生物技术有限公司;质粒提取试剂盒(批号 DP103-02)购自天根生化科技(北京)有限公司;逆转录试剂盒(批号 639503)购自宝日医生物技术有限公司;PFKFB4、GAPDH 引物(批号 AB230515)购自上海艾博思生物技术有限公司;p62 抗体(批号 5114T)购自美国 CST 公司;PFKFB4 质粒(批号 FO156166)购自湖

南丰晖生物科技有限公司; PFKFB4 抗体(批号 GTX638208)购自美国 GeneTex 公司; Ki67 抗体(批号 GB111499)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 氨苄西林(批号 abs42013299)购自上海爱必信生物科技有限公司; 氯仿(批号 230413B1)、乙醇(批号 230901D1)购自西陇科学股份有限公司; 异丙醇(批号 20201018)购自烟台三和化学试剂化学有限公司。

1.4 仪器

Forma 3111 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DW-86L626 型超低温冰箱(海尔集团); Research plus 型移液器、5810R 型台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Infinite 200 pro 型全波长多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); WNE10 型电热水浴锅、UN30 型电热恒温干燥箱、Autoclave HVA 85 型高压蒸汽灭菌锅(德国 Memmert 公司); 1875H 型超声波震动清洗器(美国 Crest 公司); PURELAB Chorus 型超纯水仪器(日本松下电器); FACSCanto™ II 型流式细胞仪(美国 BD 公司); PowerPac Basic 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); DMi8 manual 型倒置荧光显微镜(德国莱卡公司); T1000 型摇床、VX200 型微型振荡器(德国 Merck Millipore 公司); LightCycler 96 型实时荧光定量 PCR(瑞士罗氏公司); Zeiss LSM880 型激光共聚焦显微镜(德国蔡司公司); JEM-1400 型透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 药物配制与细胞培养

CS-6 经超声辅助溶解于 DMSO 中,配制成 124 mmol/L 储备液,分装后于 -80 °C 避光保存。

HK-1 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青链霉素混合液的 DMEM 完全培养基,5-8F 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青链霉素混合液的 RPMI 1640 完全培养基,在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中常规培养。

2.2 细胞增殖测定

取对数生长期的 HK-1 或 5-8F 细胞,分别以 6×10^4 个/孔接种于 96 孔板,每孔 100 μ L 细胞悬液。细胞贴壁后,分别加入终浓度为 1、3、9、27、81 nmol/L 的 CS-6,作用 48 h。对照组加入不含药物的培养基,另设置不接种细胞不给药的空白孔。各组设 3 个复孔。每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,37 °C 避光孵育 2 h,使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 细胞克隆形成实验

取对数生长期的 HK-1 或 5-8F 细胞,分别以 500 个/孔接种于 6 孔板,每孔加入 2 mL 完全培养基,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。每 2 天更换 1 次培养基,待单个细胞形成肉眼可见的克隆团时(7~10 d),分别加入不同浓度的 CS-6 处理 48 h。HK-1 细胞的处理浓度为 3、9、27 nmol/L,5-8F 细胞的处理浓度为 7.5、15.0、30.0 nmol/L。处理结束后,弃去培养基,用 4%多聚甲醛固定 30 min,1%结晶紫染色 20 min,流动水缓慢洗去多余染料,室温晾干后拍照。使用 Image J 软件统计每个孔中的克隆数(≥ 50 个细胞计为 1 个克隆)。

2.4 细胞周期与凋亡分析

2.4.1 细胞周期检测 将 HK-1 和 5-8F 细胞分别以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板,贴壁后加入不同浓度 CS-6 处理 48 h。收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入 1 mL 预冷的 75%乙醇,于 4 °C 固定 4 h。1 500 r/min 离心 3 min,弃去乙醇,加入 100 μ L RNase A 溶液重悬,37 °C 水浴孵育 30 min。随后加入 400 μ L PI 染液混匀,4 °C 避光孵育 30 min,使用流式细胞仪在 488 nm 激发波长下检测细胞周期中 DNA 含量分布。

2.4.2 细胞凋亡检测 将 HK-1 和 5-8F 细胞分别以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板,贴壁后加入不同浓度 CS-6,处理 48 h。收集细胞,用预冷 PBS 洗涤 2 次,1 500 r/min 离心 3 min。将细胞重悬于 100 μ L Annexin V 结合缓冲液中,加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI,轻轻混匀,室温避光孵育 15 min。加入 400 μ L 预冷缓冲液,立即用流式细胞仪检测。使用 FlowJo 软件计算早期凋亡(Annexin V⁺/PI⁻)和晚期凋亡(Annexin V⁺/PI⁺)细胞比例。

2.5 Western blotting 检测相关蛋白表达

收集经 CS-6 处理后的细胞,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,每 10 min 振荡 1 次。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清,采用 BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,于 95 °C 加热 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经 10%~12% SDS-PAGE 电泳分离后,转移至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min; 加入一抗,于 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 40 min。TBST

洗膜 3 次后,使用 ECL 化学发光底物显影,凝胶成像系统采集图像。使用 Image J 软件定量分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参计算目的蛋白的相对表达量。

2.6 qRT-PCR 检测 *PFKFB4* mRNA 表达

收集经 CS-6 处理后的细胞,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, NanoDrop 2000 测定 RNA 浓度及纯度 (A_{260}/A_{280} 值为 1.8~2.0)。取 1 μ g 总 RNA,使用 PrimeScript RT 试剂盒逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,使用 SYBR Green 荧光染料在 LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增。引物序列: *PFKFB4* 上游引物 5'-TCCCCACGGGA-ATTGACAC-3',下游引物 5'-GGGCACACCAATC-CAGTTCA-3'; *GAPDH* 上游引物 5'-CATGAGAA-GTATGACAACAGCCT-3',下游引物 5'-AGTCCT-TCCACGATACCAAAGT-3'。以 *GAPDH* 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *PFKFB4* mRNA 相对表达量。

2.7 RNA 测序与生物信息学分析

HK-1 细胞经 9、27 nmol/L CS-6 处理 48 h 后,使用 Trizol 提取总 RNA。RNA 样品委托上海欧易生物医学科技有限公司进行转录组测序。以 FPKM>3 且 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC) >1 (即 FC>2 或 FC<0.5) 为标准筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。将 DEGs 导入 IPA 软件进行通路富集分析。通过 GEO 数据库 (GSE53819) 下载鼻咽癌相关表达谱数据集,比较 *PFKFB4* 在鼻咽癌组织与正常组织间的表达差异;利用 GEPIA2 在线工具 (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 分析 TCGA 数据库中 *PFKFB4* 在头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 及正常组织的表达水平。

2.8 质粒转染

将 *PFKFB4* 过表达质粒 (pcDNA3.1-PFKFB4) 与辅助质粒 pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2.G 按 4:2:1:1 的比例混合,使用 Lipofectamine 3000 共转染至 293T 细胞。转染后 48、72 h 分别收集细胞上清液,0.45 μ m 滤膜滤过后获得病毒液。将 HK-1 和 5-8F 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板,加入病毒液和聚凝胺 (终质量浓度 8 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 离心感染 (1 200 r/min, 90 min)。感染 48 h 后,更换含嘌呤霉素 (2 μ g/mL) 的新鲜培养基进行筛选,每 2 天换液 1 次,直至未转染细胞全部死亡。筛选后的细胞扩大培养,通过 Western blotting 检测 *PFKFB4* 蛋白表达水平以验证过表达效率。

2.9 透射电子显微镜观察细胞超微结构

将 HK-1 和 5-8F 细胞以 2×10^6 个/孔接种于 6 孔板,经 CS-6 处理 48 h 后,用 0.1%戊二醛在 4 $^{\circ}$ C 固定 2 h。PBS 洗涤 3 次,1%锇酸后固定 1 h,梯度乙醇脱水 (50%、70%、90%、100%乙醇各 15 min),通过环氧树脂包埋。超薄切片后,经 3%醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,使用透射电子显微镜观察并拍照。

2.10 免疫荧光染色检测自噬通量变化

将 HK-1 和 5-8F 细胞分别以 5×10^4 个/孔接种于共聚焦培养皿中,培养过夜。使用 Lipofectamine 3000 转染 mCherry-EGFP-LC3 质粒,转染 24 h 后加入 CS-6 处理 48 h。弃去培养基,PBS 洗涤 2 次,4%多聚甲醛固定 15 min。加入 Hoechst 33342 染色液,室温避光孵育 15 min。PBS 洗涤 3 次后,使用激光共聚焦显微镜观察自噬通量变化并拍照记录。

2.11 动物实验

2.11.1 动物造模、分组与给药 SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠饲养于恒温 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、恒湿 (50 $\pm$ 10) %、12 h 光/暗循环环境中,自由进食饮水。将 HK-1 细胞悬液以 5×10^7 个/mL 接种于裸鼠右侧背部皮下 (每只 100 μ L),待肿瘤体积达到 100 mm³ 时,将小鼠随机分为对照组和 CS-6 (5 mg/kg) 组,每组 6 只。CS-6 组 ip CS-6 (溶于含 5% DMSO 的生理盐水),对照组 ip 等体积含 5% DMSO 的生理盐水,每 2 天给药 1 次,共给药 7 次。每 2 天测量 1 次肿瘤长径 (L) 和短径 (W),计算肿瘤体积,同时称量小鼠体质量。

$$\text{肿瘤体积} = L \times W^2 \times 0.5$$

2.11.2 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 观察肿瘤及肝、肾组织病理变化 末次给药后次日处死小鼠,剥离肿瘤组织并称定质量,取肿瘤及肝、肾组织,置于 4%多聚甲醛溶液固定,经常规脱水、石蜡包埋、切片处理后,脱蜡,进行 HE 染色,脱水透明、中性树胶封片,于光学显微镜下观察组织病理形态改变。

2.11.3 免疫组化检测肿瘤组织 Ki67 表达 取肿瘤组织石蜡切片,经抗原修复后滴加 Ki67 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗孵育、DAB 显色、苏木素复染后脱水封片。每例肿瘤切片随机选取高倍视野,分别计数 Ki67 阳性细胞与总肿瘤细胞数,计算 Ki67 细胞增殖指数。

2.11.4 Western blotting 检测肿瘤组织相关蛋白表

达 取肿瘤组织,按“2.5”项下检测相关蛋白表达。

2.12 统计学分析

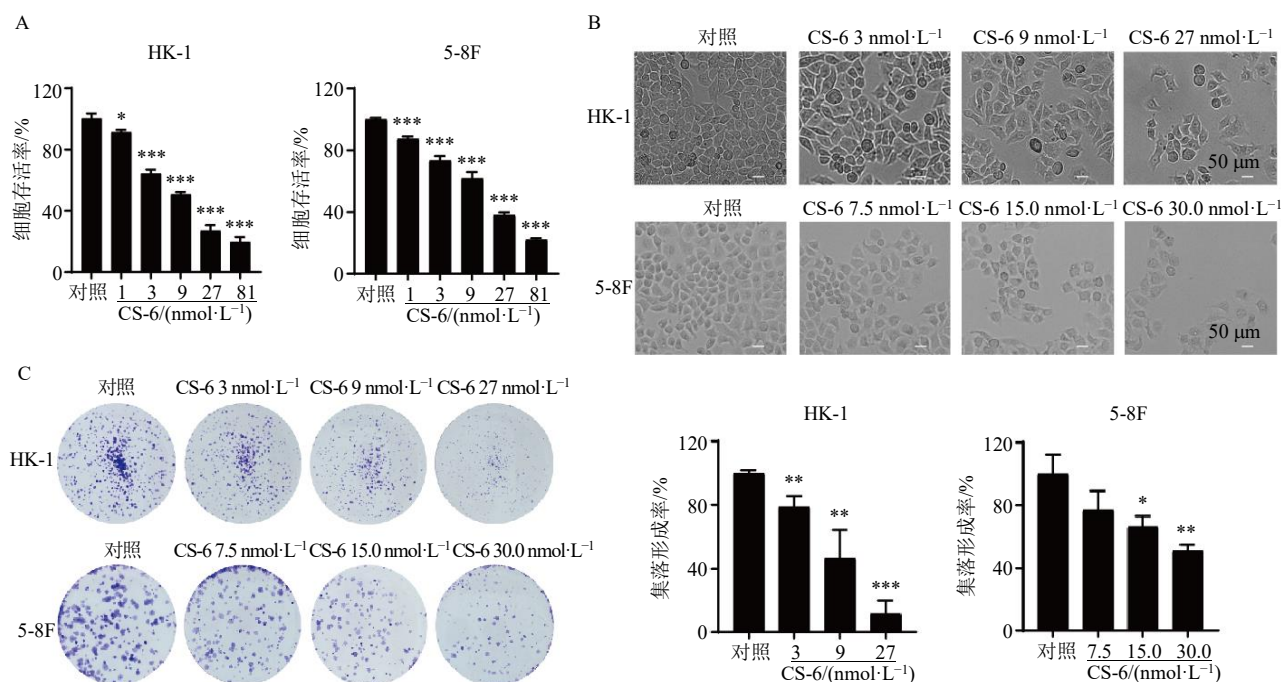
所有数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),后续两两比较采用 Tukey 检验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 CS-6 抑制鼻咽癌细胞增殖

如图 1-A 所示,CS-6 显著抑制 HK-1 和 5-8F 细

胞的增殖 ($P < 0.05$ 、 0.001),且抑制作用呈剂量相关性,其对 HK-1、5-8F 细胞的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 值分别为 8.684、14.320 nmol/L。如图 1-B 所示,CS-6 处理后,细胞形态由规则圆形转变为不规则形态。如图 1-C 所示,3、9、27 nmol/L CS-6 显著减少 HK-1 细胞的集落形成数量 ($P < 0.01$ 、 0.001),15.0、30.0 nmol/L CS-6 显著减少 5-8F 细胞的集落形成数量 ($P < 0.05$ 、 0.01),且呈剂量相关性。表明 CS-6 对鼻咽癌细胞增殖具有抑制作用。



A-CS-6 处理后鼻咽癌细胞存活率变化; B-CS-6 处理后鼻咽癌细胞形态观察 ($\times 200$); C-CS-6 处理后鼻咽癌细胞集落形成; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 2、3、5、8 同。

A-changes in survival rate of nasopharyngeal carcinoma cells after CS-6 treatment; B-morphological observation of nasopharyngeal carcinoma cells after CS-6 treatment ($\times 200$); C-colony formation of nasopharyngeal carcinoma cells after CS-6 treatment; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as figs. 2, 3, 5, 8.

图 1 CS-6 抑制鼻咽癌细胞增殖 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

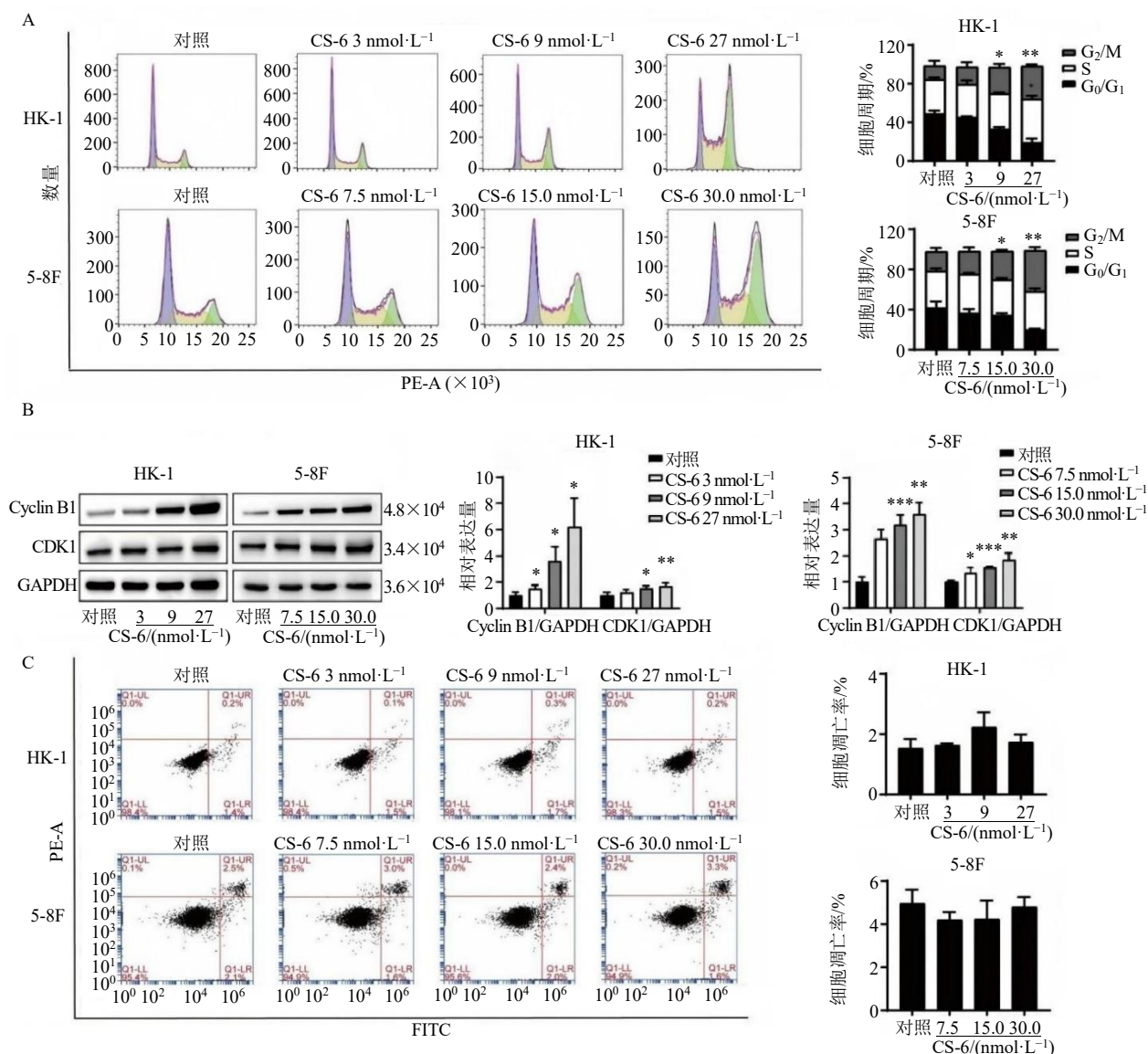
Fig. 1 CS-6 inhibits proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 CS-6 诱导鼻咽癌细胞 G₂/M 期阻滞而不诱导细胞凋亡

为了探究 CS-6 是否可以通过诱导细胞发生周期阻滞而抑制鼻咽癌细胞的增殖,通过流式细胞仪检测细胞周期的分布情况。如图 2-A 所示,随着 CS-6 给药浓度的增加, HK-1 和 5-8F 细胞在 G₂/M 期的细胞数目显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。进一步采用 Western blotting 检测 Cyclin B1 和 CDK1 的表达,如图 2-B 所示,随着 CS-6 给药浓度的增加, Cyclin B1 和 CDK1 的表达水平显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、

0.001)。以上结果表明, CS-6 能够诱导 HK-1 和 5-8F 细胞发生明显的 G₂/M 期阻滞而抑制鼻咽癌细胞的增殖。

为了探究 CS-6 是否能诱导 HK-1 和 5-8F 细胞发生凋亡,选用不同浓度的 CS-6 作用于 HK-1 和 5-8F 细胞 48 h,使用流式细胞仪检测不同凋亡时期的细胞比例,观察细胞的凋亡情况。如图 2-C 所示,随着 CS-6 浓度的增加, HK-1 和 5-8F 细胞的凋亡率并未显著升高,表明 CS-6 不能诱导 HK-1 和 5-8F 细胞发生凋亡。



A-CS-6 处理后鼻咽癌细胞周期分布; B-CS-6 处理后鼻咽癌细胞中 Cyclin B1 和 CDK1 的表达; C-CS-6 处理 48 h 后鼻咽癌细胞的凋亡情况。
A-cell cycle distribution of nasopharyngeal carcinoma cells after CS-6 treatment; B-expressions of Cyclin B1 and CDK1 in nasopharyngeal carcinoma cells treated with CS-6; C-apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells after 48 h of CS-6 treatment.

图 2 CS-6 诱导鼻咽癌细胞周期阻滞而不诱导细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

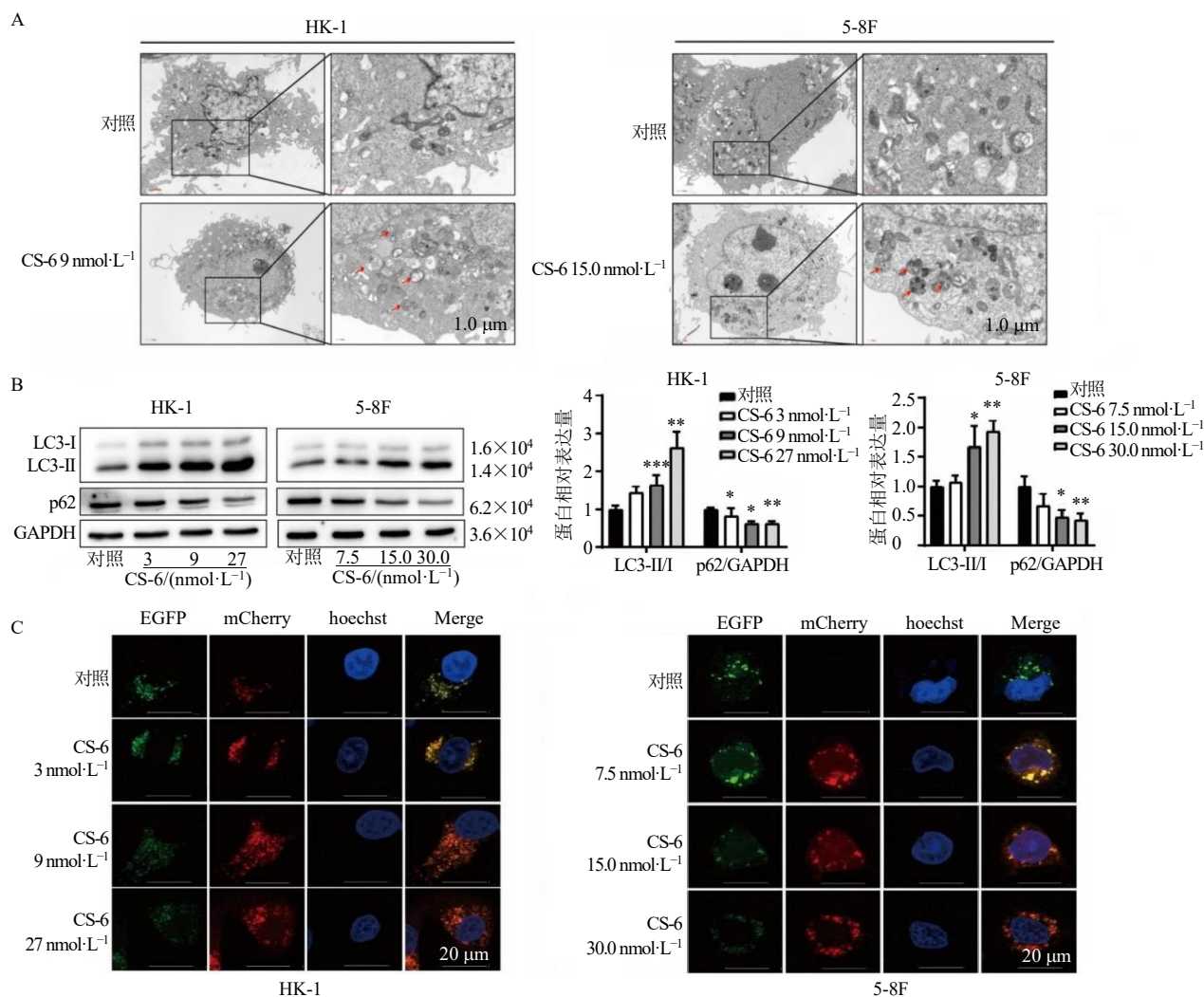
Fig. 2 CS-6 induces cell cycle arrest without inducing apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 CS-6 诱导鼻咽癌细胞自噬并提高自噬通量

为了探讨 CS-6 是否通过除周期阻滞外的其他机制抑制鼻咽癌细胞的增殖, 采用透射电子显微镜观察细胞自噬的超微结构。如图 3-A 所示, 与对照组相比, 给药组细胞内可以观察到明显的典型双层膜结构体以及自噬溶酶体, 表明 CS-6 能够诱导 HK-1 和 5-8F 细胞发生自噬。采用 Western blotting 检测自噬相关蛋白 LC3 和 p62 的表达情况, 结果如图 3-B 所示, 随着 CS-6 给药浓度的增加, LC3-II/I 值显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), p62 表达明显降低

($P < 0.05, 0.01$), 表明 CS-6 能够诱导 HK-1 和 5-8F 细胞发生自噬。

鉴于自噬激活具有促进死亡和存活的双重潜力^[25-26], 为了阐明其具体作用机制, 采用 mCherry-EGFP-LC3 双荧光探针实时监测自噬流, 该探针可在自噬结构上形成荧光斑点, 并在自噬溶酶体的酸性环境中发生 GFP 荧光淬灭, 而 mCherry 荧光则保持稳定, 从而通过红/绿荧光信号的变化来区分自噬阶段^[17]。在转染该质粒的鼻咽癌细胞中, 共聚焦显微镜 (图 3-C) 观察显示, 随着 CS-6 浓度升高, 红



A-透射电镜观察鼻咽癌细胞自噬小体形成 ($\times 10\,000$), 箭头指向自噬溶酶体; B-CS-6 处理后鼻咽癌细胞中 LC3 和 p62 蛋白的表达; C-CS-6 处理后鼻咽癌细胞自噬流变化 ($\times 1\,000$)。

A-observation of autophagosome formation in nasopharyngeal carcinoma cells using transmission electron microscopy ($\times 10\,000$), arrows pointing towards autolysosomes; B-expressions of LC3 and p62 proteins in nasopharyngeal carcinoma cells treated with CS-6; C-changes in autophagy flow of nasopharyngeal carcinoma cells after CS-6 treatment ($\times 1\,000$).

图 3 CS-6 诱导鼻咽癌细胞自噬并提高自噬通量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

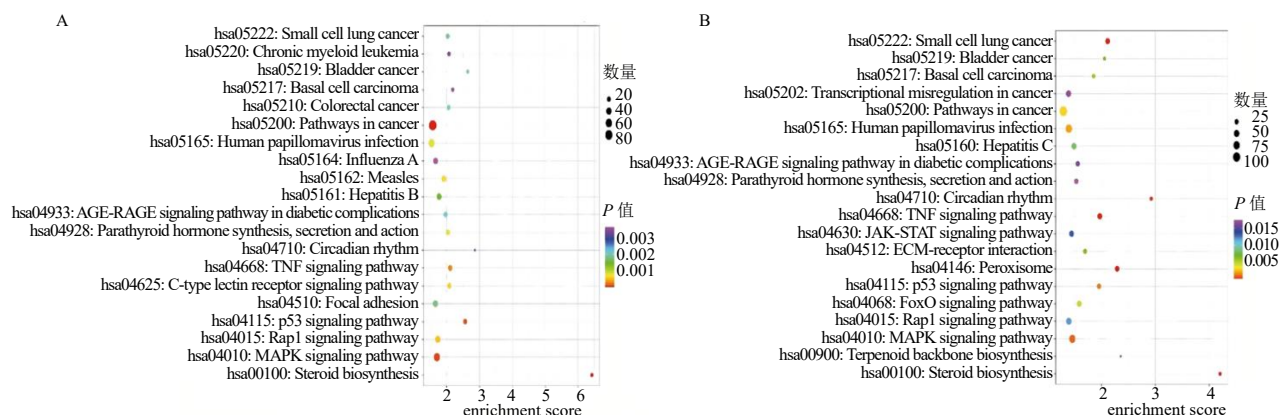
Fig. 3 CS-6 induces autophagy and increases autophagy flux in nasopharyngeal carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

色荧光增强而绿色荧光减弱, 表明自噬小体与溶酶体的融合正常且自噬通量增强。以上结果表明, CS-6 能够诱导鼻咽癌细胞发生自噬, 表现为自噬体形成、LC3-II/I 值升高、p62 降解, 且自噬流通畅, 即自噬体与溶酶体有效融合, 从而抑制细胞增殖。

3.4 CS-6 下调鼻咽癌细胞中 PFKFB4 的表达

为深入探究 CS-6 抑制鼻咽癌细胞增殖的分子机制, 采用 9、27 nmol/L 的 CS-6 处理 HK-1 细胞 48 h, 使用 Trizol 试剂提取 RNA 样本。转录组测序分析显示, DEGs 主要涉及癌症相关信号通路 (图 4)。基于 FPKM > 3 且 FC > 2 或 FC < 0.5 的标准筛

选出 246 个 DEGs。IPA 显示这些基因主要集中于 PFKFB4 通路 (图 5-A)。通过 GEO 数据库分析发现, PFKFB4 在鼻咽癌组织中显著过表达 ($P < 0.001$, 图 5-B), 表明 PFKFB4 可能参与鼻咽癌发生发展。利用 GEPIA2 平台对 TCGA 数据库进行分析, 同样发现 PFKFB4 在 HNSCC 中呈高表达 ($P < 0.05$, 图 5-C)。为进一步验证上述结果, 进行 qRT-PCR 和 Western blotting 分析, 结果证实 CS-6 显著降低了鼻咽癌细胞中 PFKFB4 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001, 图 5-D、E), 表明 CS-6 能够下调鼻咽癌细胞中 PFKFB4 的表达。

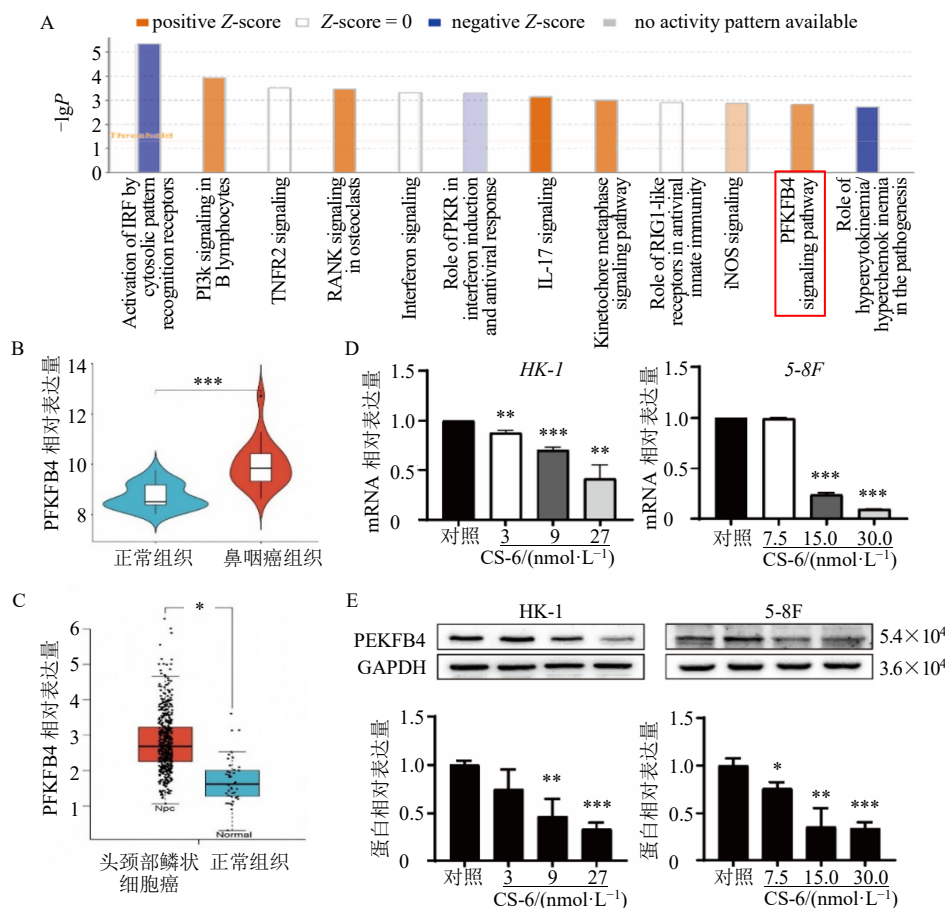


A-HK-1 细胞经 $9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CS-6 处理后, 前 20 位富集分析的 KEGG 气泡图; B-HK-1 细胞经 $27 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CS-6 处理后, 前 20 位富集分析的 KEGG 气泡图。

A-KEGG enrichment analysis of top 20 bubble plots after treatment of HK-1 cells with $9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CS-6; B-KEGG enrichment analysis of top 20 bubble plots after treatment of HK-1 cells with $27 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CS-6.

图 4 DEGs 的 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of DEGs



A-DEGs 的 IPA 结果; B-PFKFB4 在鼻咽癌细胞中的表达; C-PFKFB4 在头颈部鳞状细胞癌中的表达; D-CS-6 处理后鼻咽癌细胞中 *PFKFB4* 的 mRNA 表达水平; E-CS-6 处理后鼻咽癌细胞中 *PFKFB4* 的蛋白表达水平。

A-IPA results of DEGs; B-expression of *PFKFB4* in nasopharyngeal carcinoma cells; C-expression of *PFKFB4* in head and neck squamous cell carcinoma; D-mRNA expression level of *PFKFB4* in nasopharyngeal carcinoma cells treated with CS-6; E-protein expression level of *PFKFB4* in nasopharyngeal carcinoma cells treated with CS-6.

图 5 CS-6 下调鼻咽癌细胞中 *PFKFB4* 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 CS-6 downregulates expression of *PFKFB4* in nasopharyngeal carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 PFKFB4 在 CS-6 抑制鼻咽癌细胞增殖和阻滞细胞周期中的作用

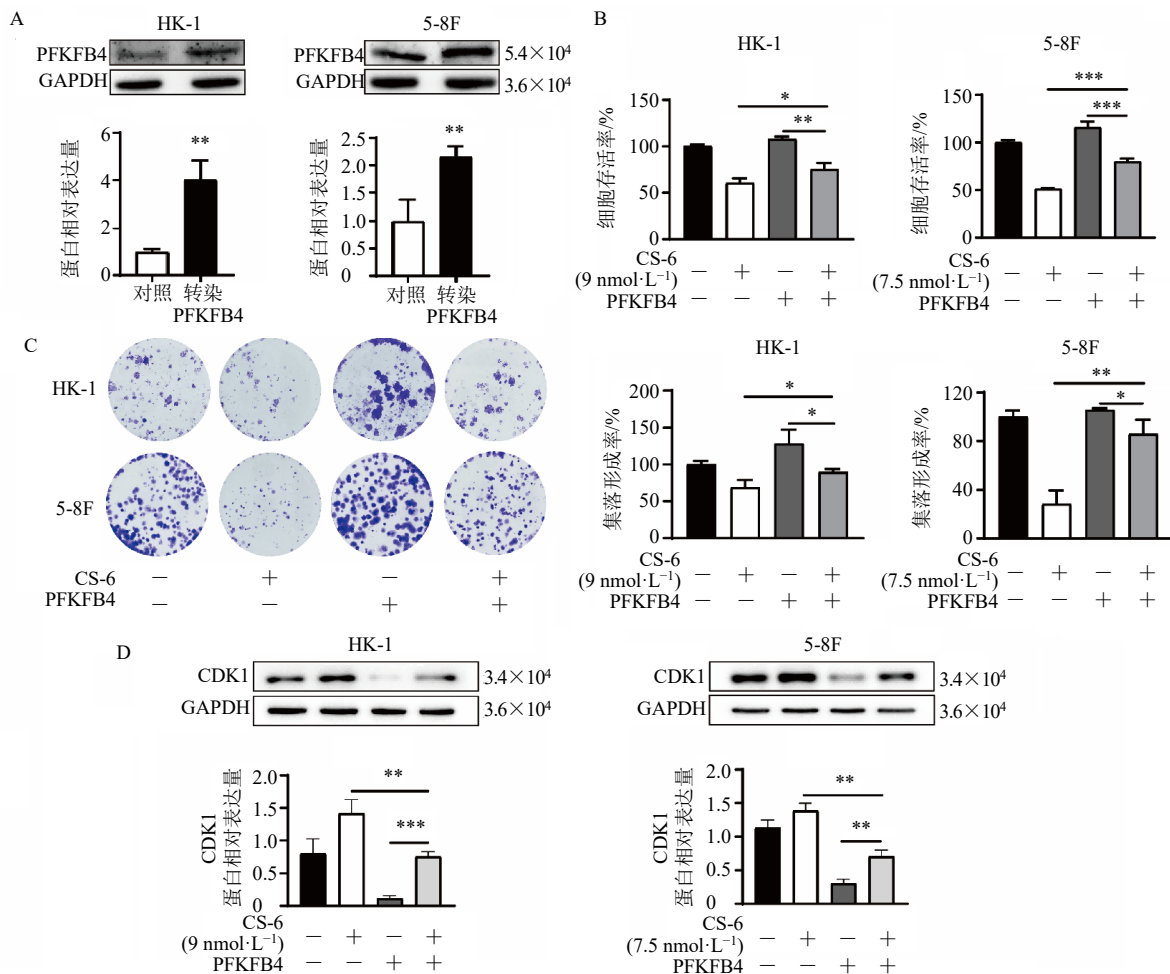
为验证 PFKFB4 在 CS-6 抑制鼻咽癌细胞增殖中的作用,鼻咽癌细胞转染 PFKFB4 质粒后,检测细胞存活率及集落形成数。结果显示,转染 PFKFB4 质粒后 HK-1 和 5-8F 细胞中 PFKFB4 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$, 图 6-A), PFKFB4 过表达部分逆转了 CS-6 对 HK-1 和 5-8F 细胞增殖的抑制作用 ($P < 0.05$ 、 0.001 , 图 6-B、C)。为考察 PFKFB4 在 CS-6 诱导 G_2/M 期阻滞中的作用,检测 CDK1 蛋白表达,结果显示,PFKFB4 过表达可抑制 CS-6 诱导的 HK-1 和 5-8F 细胞中 CDK1 蛋白表达下调 ($P < 0.01$ 、 0.001 , 图 6-D)。以上结果表明 CS-6 诱导的 PFKFB4

下调在 CS-6 诱导的鼻咽癌细胞 G_2/M 期阻滞和增殖抑制中发挥关键作用。

3.6 CS-6 通过 PFKFB4 介导的 GSK-3 β /mTOR 信号通路诱导鼻咽癌细胞自噬

如图 7-A 所示, PFKFB4 过表达可逆转 CS-6 对 HK-1 和 5-8F 细胞 LC3 和 p62 表达的调控作用 ($P < 0.01$)。如图 7-B 所示,过表达 PFKFB4 可抑制 CS-6 诱导的自噬小体和溶酶体的正常融合,导致自噬小体积聚。表明 CS-6 诱导的鼻咽癌细胞自噬依赖于 PFKFB4 的下调。

肿瘤细胞内存在多种触发自噬的信号通路, mTOR 信号通路在触发自噬过程中起着关键作用。作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, mTOR 与 GSK-3 β 在

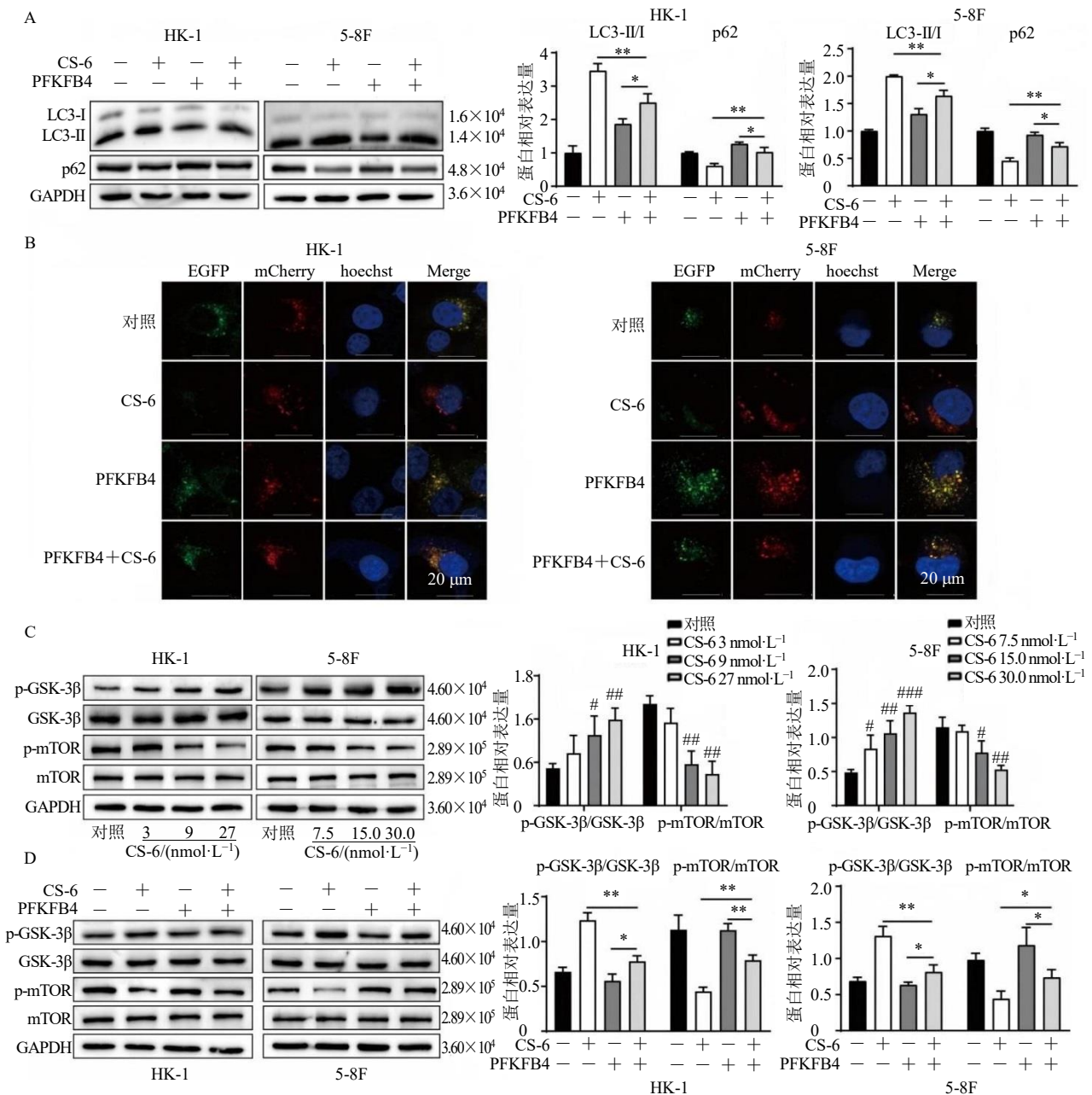


A-转染 PFKFB4 后鼻咽癌细胞中 PFKFB4 蛋白表达; B-转染 PFKFB4 后鼻咽癌细胞存活率; C-转染 PFKFB4 后鼻咽癌细胞集落形成; D-转染 PFKFB4 后鼻咽癌细胞中 CDK1 的表达; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-expression of PFKFB4 protein in nasopharyngeal carcinoma cells after transfection with PFKFB4; B-survival rate of nasopharyngeal carcinoma cells after transfection with PFKFB4; C-colony formation of nasopharyngeal carcinoma cells after transfection with PFKFB4; D-expression of CDK1 in nasopharyngeal carcinoma cells after transfection with PFKFB4; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

图 6 PFKFB4 在 CS-6 抑制鼻咽癌细胞增殖和阻滞细胞周期中的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of PFKFB4 in CS-6 inhibition of nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and cell cycle arrest ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A-转染 PFKFB4 后鼻咽癌细胞中 LC3 和 p62 蛋白的表达; B-转染 PFKFB4 后鼻咽癌细胞自噬流的变化 ($\times 1000$); C-CS-6 处理后鼻咽癌细胞中 GSK-3 β /mTOR 信号通路相关蛋白表达; D-转染 PFKFB4 后鼻咽癌细胞中 GSK-3 β /mTOR 信号通路相关蛋白表达; 与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$; 组间比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ 。

A-expression of LC3 and p62 proteins in nasopharyngeal carcinoma cells after transfection with PFKFB4; B-changes in autophagy flow of nasopharyngeal carcinoma cells after transfection with PFKFB4 ($\times 1000$); C-expressions of GSK-3 β /mTOR signaling pathway related proteins in nasopharyngeal carcinoma cells treated with CS-6; D-expressions of GSK-3 β /mTOR signaling pathway related proteins in nasopharyngeal carcinoma cells after transfection with PFKFB4; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs inter group.

图 7 CS-6 通过 PFKFB4 介导的 GSK-3 β /mTOR 信号通路诱导鼻咽癌细胞自噬 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 CS-6 induces autophagy in nasopharyngeal carcinoma cells through PFKFB4-mediated GSK-3 β /mTOR signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n=3$)

自噬调控中均具有重要功能^[27-28]。采用 Western blotting 检测自噬信号通路中相关蛋白的表达,结果显示,CS-6 呈剂量相关性下调 HK-1 和 5-8F 细胞

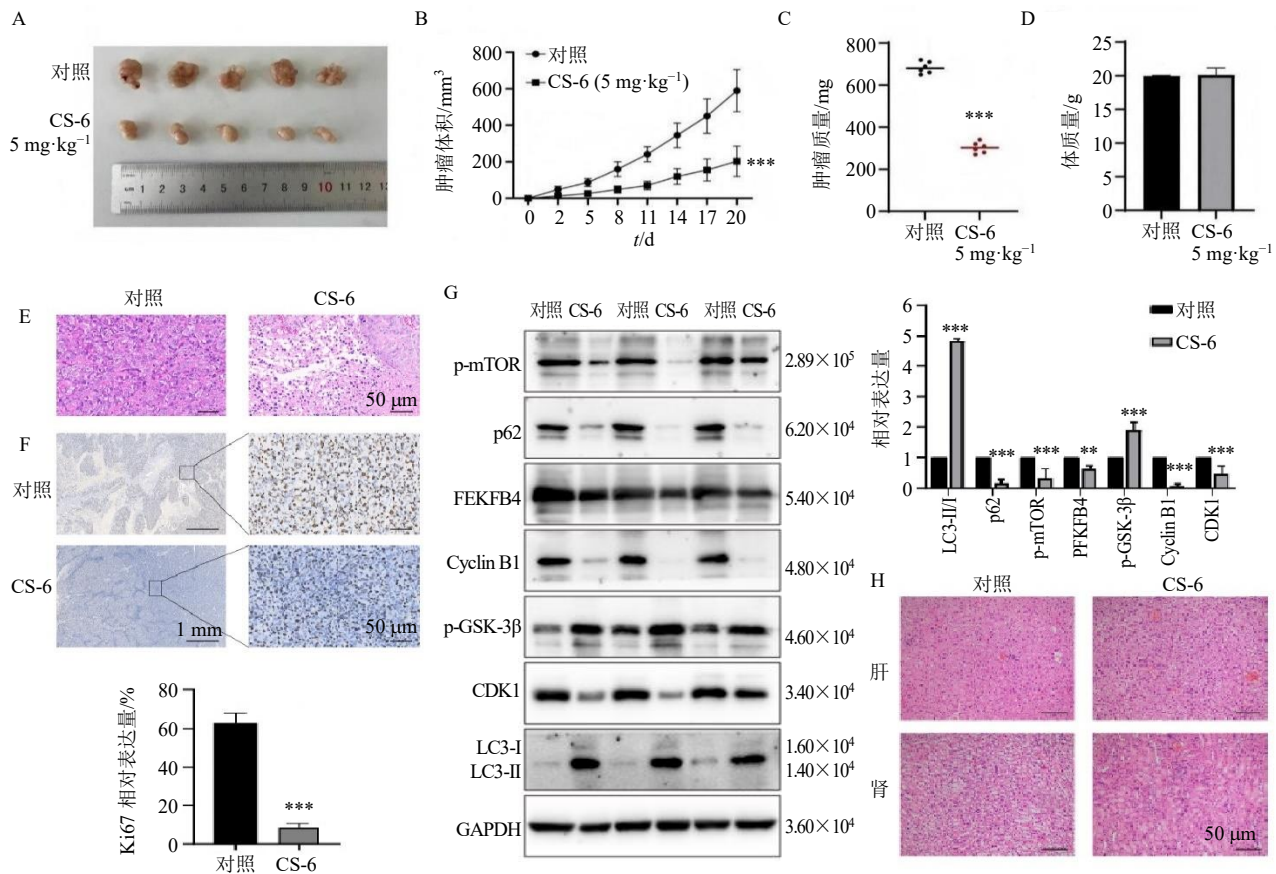
中 p-mTOR 的表达 ($P<0.05$ 、 0.01 , 图 7-C), 同时上调 p-GSK-3 β 的表达 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。表明 CS-6 可抑制 p-mTOR 蛋白表达并上调 p-GSK3 β

表达, 这可能与 CS-6 诱导的鼻咽癌细胞自噬反应有关。通过检测转染 PFKFB4 质粒后 HK-1 和 5-F8 细胞中自噬相关蛋白的表达, 探讨 PFKFB4 与 GSK-3 β /mTOR 通路的关联性。结果如图 7-D 所示, PFKFB4 的过表达部分逆转了 CS-6 对 p-GSK-3 β 和 p-mTOR 表达的调控作用 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明 PFKFB4 是 GSK-3 β 和 mTOR 的上游调节因子, CS-6 通过 PFKFB4 介导的 GSK-3 β /mTOR 信号通路诱导鼻咽癌细胞发生自噬。

3.7 CS-6 抑制荷瘤小鼠肿瘤生长并激活体内自噬通路

建立鼻咽癌小鼠移植瘤模型, 给予 CS-6 (5 mg/kg) 干预, 考察 CS-6 的体内抗肿瘤作用。如图 8-A~D 所示, 与对照组比较, CS-6 治疗显著抑制

了肿瘤生长, 表现为肿瘤体积和质量显著减少 ($P < 0.001$), 且未导致小鼠体重下降。HE 染色结果 (图 8-E) 显示, 对照组肿瘤细胞排列致密、异型性明显、坏死区域少见; CS-6 组肿瘤组织则出现大片片状坏死, 细胞排列紊乱, 核固缩、核碎裂增多, 并伴有炎症细胞浸润, 提示 CS-6 可诱导肿瘤组织发生明显病理损伤。Ki67 免疫组化染色结果 (图 8-F) 显示, 对照组肿瘤组织中 Ki67 阳性细胞比例高、分布广泛, 肿瘤细胞增殖活性旺盛; CS-6 组 Ki67 阳性细胞率显著降低 ($P < 0.001$), 与 CS-6 对肿瘤体积、肿瘤质量的抑制趋势一致, 证实 CS-6 可显著抑制肿瘤细胞增殖。Western blotting 图 8-G) 分析进一步表明, CS-6 可上调肿瘤组织中 LC3-II/I 值 ($P < 0.001$), 下调 p62 表达 ($P < 0.001$), 提示其能有效



A-各组小鼠肿瘤形态; B-各组小鼠肿瘤体积变化; C-各组小鼠肿瘤质量; D-各组小鼠体重; E-肿瘤组织 HE 染色 (×50); F-免疫组化检测肿瘤组织 Ki67 表达 (×4、×50); G-Western blotting 检测肿瘤组织中 LC3、p62、Cyclin B1、CDK1、p-mTOR、PFKFB4、p-GSK-3 β 蛋白表达; H-肝、肾组织 HE 染色 (×200)。

A-tumor morphology of mice in each group; B-changes in tumor volume of mice in each group; C-tumor weight of mice in each group; D-body weight of mice in each group; E-HE staining of tumor tissue (×50); F-Ki67 expression in tumor tissue detected by immunohistochemistry (×4, ×50); G-protein expressions of LC3, p62, Cyclin B1, CDK1, p-mTOR, PFKFB4 and p-GSK-3 β in tumor tissues detected by Western blotting; H-HE staining of liver and kidney tissues (×200)。

图 8 CS-6 抑制荷瘤小鼠肿瘤生长并激活体内自噬通路 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 8 CS-6 inhibits tumor growth in tumor bearing mice and activates autophagy pathway *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

激活体内自噬通路。同时,CS-6 显著降低了 p-mTOR 和 PFKFB4 的蛋白表达水平 ($P<0.01$ 、 0.001),并提高了 p-GSK3 β 的表达 ($P<0.001$)。此外,细胞周期相关蛋白 Cyclin B1 和 CDK1 的表达亦受到抑制 ($P<0.001$)。病理学评估显示,CS-6 治疗未对肝肾组织造成显著损伤(图 8-H),表明该剂量具有良好安全性。以上结果表明,CS-6 通过下调 PFKFB4,进而调控 GSK-3 β /mTOR 信号通路,激活自噬及细胞周期过程,从而在体内发挥抗鼻咽癌作用。

4 讨论

寻找有效且安全的鼻咽癌治疗方案始终面临挑战。因此,迫切需要找到更多能有效治疗鼻咽癌的新药。许多来源于中药的化合物在各种癌症类型中具有强大的抗肿瘤特性。CS-6 具有抗氧化、抗炎及抗癌等多种药理作用^[29-30]。本研究发现,CS-6 能有效抑制鼻咽癌细胞增殖,并使其细胞周期阻滞在 G₂/M 期。CS-6 处理后鼻咽癌细胞中 Cyclin B1 和 CDK1 表达水平下降,进一步证实了这一作用。PFKFB4 与肿瘤细胞存活密切相关,在口腔鳞状细胞癌和卵巢癌等多种肿瘤细胞中均呈高表达^[19-20]。此外,PFKFB4 还能参与调控细胞迁移侵袭、周期及凋亡^[31-33]。然而其在鼻咽癌细胞中的作用尚不明确。为此构建了 PFKFB4 高表达细胞模型,以验证 PFKFB4 是否参与 CS-6 诱导的鼻咽癌细胞周期阻滞。结果显示,PFKFB4 过表达可增强鼻咽癌细胞的存活率及克隆形成能力。以上发现揭示了 PFKFB4 在 CS-6 诱导鼻咽癌细胞 G₂/M 期阻滞过程中的关键作用。

自噬最初依赖于溶酶体的降解作用,广泛存在于真核细胞中^[34]。吞噬体通过吞噬受损的细胞器和蛋白质,维持自噬过程中细胞的稳态平衡^[35]。大量研究表明自噬在癌症治疗中具有关键作用,已成为潜在的抗癌策略^[36-38],且已发现多种通过诱导癌细胞自噬发挥抗肿瘤作用的药物^[39-40]。因此本研究探究 CS-6 是否通过诱导自噬抑制鼻咽癌细胞增殖,结果发现 CS-6 通过诱导自噬并增强自噬流抑制鼻咽癌细胞生长。PFKFB4 可调控自噬并促进自噬流^[41-42],另有研究表明 PFKFB4 通过与 Etk 相互作用阻断自噬流,从而增强非小细胞肺癌的药物耐受性^[43],因此下调 PFKFB4 可诱导自噬。本研究发现 PFKFB4 的过表达部分逆转了 CS-6 在鼻咽癌细胞中诱导的自噬,表明 PFKFB4 作为自噬调节因子在 CS-6 诱导的鼻咽癌细胞自噬中起着关键作用。

mTOR 信号通路参与多种生物学过程,包括代谢调节、凋亡和自噬的诱导,这些过程在许多疾病的发生发展中至关重要^[44-46]。同时,GSK-3 β 和 mTOR 是自噬的关键调控因子。GSK-3 β 作为 mTOR 的上游调控因子,其活性降低可抑制 mTOR 磷酸化,从而增强自噬流^[47-48]。GSK-3 β 含 2 个磷酸化位点:Ser9 位点磷酸化抑制其激酶活性,而 Tyr216 位点磷酸化则增强其激酶活性^[49-50]。本研究发现 CS-6 能够显著增加 p-GSK-3 β (Ser9) 的表达,从而抑制 GSK-3 β 活性,进而抑制 mTOR 磷酸化,诱导自噬发生。此外,近期研究表明 PFKFB4 是 GSK-3 β 的上游调控因子,能在胰腺癌中诱导生长抑制和凋亡^[32,38]。本研究进一步验证了 PFKFB4 与 GSK-3 β /mTOR 通路的调控关系,结果显示 PFKFB4 过表达可部分逆转 CS-6 诱导的 p-GSK-3 β 表达增加和 p-mTOR 表达减少。以上结果表明,CS-6 通过抑制鼻咽癌细胞中 PFKFB4 介导的 GSK-3 β /mTOR 通路来诱导自噬。

尽管本研究初步揭示了 CS-6 通过 PFKFB4/GSK-3 β /mTOR 信号轴诱导鼻咽癌细胞自噬的机制,但仍存在一定局限性,有待后续研究完善。如在通路验证方面,本研究采用过表达 PFKFB4 的策略间接证明其上游调控作用,但未采用特异性抑制剂或基因沉默技术干扰 GSK-3 β 以进一步验证上下游因果关系。未来将进行更深层次的研究,以更全面地阐明 PFKFB4/GSK-3 β /mTOR 信号轴在 CS-6 诱导自噬中的精确分子机制。

综上,本研究证实 CS-6 通过下调 PFKFB4 表达,进而抑制 GSK-3 β /mTOR 信号通路,诱导鼻咽癌细胞发生自噬,并导致 G₂/M 期细胞周期阻滞,从而有效抑制鼻咽癌细胞的增殖。体内实验进一步验证了 CS-6 的抗肿瘤作用及良好的安全性。本研究揭示了 CS-6 抗鼻咽癌的新机制,为 PFKFB4 作为鼻咽癌治疗靶点提供了理论支持,也为 CS-6 作为抗鼻咽癌候选药物的开发奠定了实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen Y P, Chan A T C, Le Q T, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2019, 394(10192): 64-80.
- [2] Carvajal F, Luyo G, Veloso J, *et al.* Advances in nasopharyngeal carcinoma treatment: Induction chemotherapy and concomitant radio-chemotherapy [J]. *Rev Med Chil*, 2023, 151(9): 1221-1232.

- [3] Lee H M, Okuda K S, González F E, *et al.* Current perspectives on nasopharyngeal carcinoma [M] // Rhim J S, Dritschilo A, Kremer R. *Human Cell Transformation*. Cham: Springer International Publishing, 2019: 11-34.
- [4] Su Z Y, Siak P Y, Lwin Y Y, *et al.* Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma: Current insights and future outlook [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2024, 43(3): 919-939.
- [5] Zeng C L, Qiao M C, Chen Y H, *et al.* EBV-positive glycoproteins associated with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 260: 155427.
- [6] Liu Q Q, Wang H Y, Chen Z, *et al.* Global, regional, and national epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in middle-aged and elderly patients from 1990 to 2021 [J]. *Ageing Res Rev*, 2025, 104: 102613.
- [7] Chua M L, Sun Y, Supiot S. Advances in nasopharyngeal carcinoma-“West meets East” [J]. *Br J Radiol*, 2019, 92(1102): 20199004.
- [8] Tang L L, Chen Y P, Chen C B, *et al.* The Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) clinical guidelines for the diagnosis and treatment of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Commun*, 2021, 41(11): 1195-1227.
- [9] Cai M Y, Wang Y F, Ma H R, *et al.* Advances and challenges in immunotherapy for locally advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2024, 131: 102840.
- [10] Juarez-Vignon Whaley J J, Afkhami M, Onyshchenko M, *et al.* Recurrent/metastatic nasopharyngeal carcinoma treatment from present to future: Where are we and where are we heading? [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2023, 24(9): 1138-1166.
- [11] Tang L L, Chen L, Xu G Q, *et al.* Reduced-volume radiotherapy versus conventional-volume radiotherapy after induction chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma: An open-label, noninferiority, multicenter, randomized phase 3 trial [J]. *CA Cancer J Clin*, 2025, 75(3): 203-215.
- [12] 安雪菁, 崔齐晓, 赵盈, 等. 蟾蜍它灵对人头颈部鳞状细胞癌的影响及作用机制 [J]. *中草药*, 2026, 57(4): 1325-1335.
- [13] Thompson H J, Lutsiv T. Natural products in precision oncology: Plant-based small molecule inhibitors of protein kinases for cancer chemoprevention [J]. *Nutrients*, 2023, 15(5): 1192.
- [14] Liu L, Shi D, Xia Z Y, *et al.* Gamabufotalin induces apoptosis and cytoprotective autophagy through the mTOR signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *J Nat Prod*, 2023, 86(4): 966-978.
- [15] Ma K, Zhang C, Li W Y. Gamabufotalin suppressed osteosarcoma stem cells through the TGF- β /periostin/PI3K/Akt pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 331: 109275.
- [16] Yuan B, Shimada R, Xu K, *et al.* Multiple cytotoxic effects of gamabufotalin against human glioblastoma cell line U-87 [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 314: 108849.
- [17] Kotowski K, Rosik J, Machaj F, *et al.* Role of PFKFB3 and PFKFB4 in cancer: Genetic basis, impact on disease development/progression, and potential as therapeutic targets [J]. *Cancers*, 2021, 13(4): 909.
- [18] Ros S, Flöter J, Kaymak I, *et al.* 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 is essential for p53-null cancer cells [J]. *Oncogene*, 2017, 36(23): 3287-3299.
- [19] Chen S T, Han J S, Wang W, *et al.* Expression and prognostic analysis of PFKFB4 in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cell Mol Biol*, 2024, 70(7): 193-199.
- [20] Zhou S, Liu Y, Zhang N, *et al.* Glycolytic enzyme PFKFB4 governs lipolysis by promoting *de novo* lipogenesis to drive the progression of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2025, 626: 217774.
- [21] Wang T, Wang X T, Zheng X L, *et al.* Overexpression of SLC2A1, ALDOC, and PFKFB4 in the glycolysis pathway drives strong drug resistance in 3D HeLa tumor cell spheroids [J]. *Biotechnol J*, 2024, 19(9): e2400163.
- [22] Liu Y Z, Shi Q L, Liu Y F, *et al.* Fibrillarin reprograms glucose metabolism by driving the enhancer-mediated transcription of PFKFB4 in liver cancer [J]. *Cancer Lett*, 2024, 602: 217190.
- [23] Zhang R Q, Zhang Q, Deng F, *et al.* Potential applications of PFKFB in cancer treatment strategies [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 320: 145860.
- [24] Jalal S, Zhang T, Deng J, *et al.* β -Elemene isopropanolamine derivative LXX-8250 induces apoptosis through impairing autophagic flux via PFKFB4 repression in melanoma cells [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 900973.
- [25] Schleicher S M, Moretti L, Varki V, *et al.* Progress in the unraveling of the endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway and cancer: Implications for future therapeutic approaches [J]. *Drug Resist Updat*, 2010, 13(3): 79-86.
- [26] Moosavi M A, Djavaheri-Mergny M. Exploring the complex link between autophagy, regulated cell death, and cell fate pathways in cancer pathogenesis and therapy [J]. *Cells*, 2023, 12(3): 498.
- [27] Wang Y H, Chen B C, Xiao M, *et al.* *Brucea javanica* oil emulsion promotes autophagy in ovarian cancer cells through the miR-8485/LAMTOR3/mTOR/ATG13 signaling axis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 935155.

- [28] Azoulay-Alfaguter I, Elya R, Avrahami L, *et al.* Combined regulation of mTORC1 and lysosomal acidification by GSK-3 suppresses autophagy and contributes to cancer cell growth [J]. *Oncogene*, 2015, 34(35): 4613-4623.
- [29] Fan J L, Liu B, Long Y, *et al.* Sequentially-targeted biomimetic nano drug system for triple-negative breast cancer ablation and lung metastasis inhibition [J]. *Acta Biomater*, 2020, 113: 554-569.
- [30] Yu Z L, Guo W, Ma X C, *et al.* Gamabufotalin, a bufadienolide compound from toad venom, suppresses COX-2 expression through targeting IKK β /NF- κ B signaling pathway in lung cancer cells [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(1): 203.
- [31] Gao R F, Liu Y H, Li D, *et al.* PFKFB4 promotes breast cancer metastasis via induction of hyaluronan production in a p38-dependent manner [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(6): 2108-2123.
- [32] Zhang P F, Tao W W, Lu C, *et al.* Bruceine A induces cell growth inhibition and apoptosis through PFKFB4/GSK3 β signaling in pancreatic cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 169: 105658.
- [33] Cai Y C, Yang H, Shan H B, *et al.* PFKFB4 overexpression facilitates proliferation by promoting the G₁/S transition and is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer [J]. *Dis Markers*, 2021, 2021: 8824589.
- [34] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [35] Liu X C, Meng L, Li X, *et al.* Regulation of FN1 degradation by the p62/SQSTM1-dependent autophagy-lysosome pathway in HNSCC [J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1): 34.
- [36] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: The p62/SQSTM1 paradigm [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 609-624.
- [37] Amaravadi R K, Kimmelman A C, Debnath J. Targeting autophagy in cancer: Recent advances and future directions [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(9): 1167-1181.
- [38] Mancinelli R, Carpino G, Petrunaro S, *et al.* Multifaceted roles of GSK-3 in cancer and autophagy-related diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 4629495.
- [39] Zhang Y J, Jiang L, Su P F, *et al.* Urolithin A suppresses tumor progression and induces autophagy in gastric cancer via the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2023, 84(2): 172-184.
- [40] Yang J L, Pi C C, Wang G H. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 699-707.
- [41] Strohecker A M, Joshi S, Possemato R, *et al.* Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel autophagy regulator by high content shRNA screening [J]. *Oncogene*, 2015, 34(45): 5662-5676.
- [42] Zhou Y, Fan Y F, Qiu B Z, *et al.* Effect of PFKFB4 on the prognosis and immune regulation of NSCLC and its mechanism [J]. *Int J Gen Med*, 2022, 15: 6341-6353.
- [43] Wang Q Y, Zeng F R, Sun Y Q, *et al.* Etk interaction with PFKFB4 modulates chemoresistance of small-cell lung cancer by regulating autophagy [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(4): 950-962.
- [44] Senapati P K, Mahapatra K K, Singh A, *et al.* mTOR inhibitors in targeting autophagy and autophagy-associated signaling for cancer cell death and therapy [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2025, 1880(3): 189342.
- [45] Li J Y, Zhang D, Wang S H, *et al.* Baicalein induces apoptosis by inhibiting the glutamine-mTOR metabolic pathway in lung cancer [J]. *J Adv Res*, 2025, 68: 341-357.
- [46] Hossain M T, Hossain M A. Targeting mTOR kinase for cancer treatment: A comprehensive review with clinical insights [J]. *Drug Dev Res*, 2025, 86(7): e70167.
- [47] Piazza F, Manni S, Tubi L Q, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 regulates multiple myeloma cell growth and bortezomib-induced cell death [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 526.
- [48] Li G Y, Wu F M, Lei F, *et al.* MARCH5 promotes cardiac hypertrophy by regulating Akt/mTOR/GSK-3 β /GATA4 signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2025, 29(15): e70735.
- [49] Park C H, Lee B H, Ahn S G, *et al.* Serine 9 and tyrosine 216 phosphorylation of GSK-3 β differentially regulates autophagy in acquired cadmium resistance [J]. *Toxicol Sci*, 2013, 135(2): 380-389.
- [50] Beurel E, Grieco S F, Jope R S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 148: 114-131.

[责任编辑 李亚楠]