

· 经典名方 ·

## 启膈散对人食管癌 EC9706 细胞增殖、凋亡及 miR-133a/Akt/mTOR 信号通路的影响

高小玲, 刘陆, 李墨颜, 李艳坤, 王蕊, 陈玉龙, 崔姗姗\*  
(河南中医药大学, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:观察启膈散对 EC9706 细胞增殖、凋亡的影响和对微 RNA-133a(miR-133a)/蛋白激酶 B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路的影响。方法:采用乙酸乙酯法提取启膈散有效部位;噻唑蓝(MTT)比色法筛选启膈散细胞用药剂量及检测启膈散对 EC9706 细胞增殖的影响;流式细胞仪检测启膈散对 EC9706 细胞凋亡的影响;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测启膈散对 miR-133a 及胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R)mRNA 表达的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测启膈散对 miR-133a/Akt/mTOR 通路靶蛋白 Akt, mTOR 的表达。结果:与空白组比较,启膈散可抑制 EC9706 细胞的增殖( $P<0.01$ ),并呈剂量依赖性,筛选 30% 抑制浓度( $IC_{30}$ ) $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和半抑制浓度( $IC_{50}$ ) $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  进行后续实验;与空白组比较,抑制剂组、抑制剂+启膈散组均可抑制 EC9706 细胞增殖( $P<0.01$ ),筛选抑制剂  $0.25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  进行后续实验;与空白组比较,启膈散  $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组可明显促进 EC9706 细胞晚期凋亡率及总凋亡率( $P<0.05$ ),启膈散  $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组可促进 EC9706 细胞晚期凋亡率( $P<0.05$ ),与 Akt/mTOR 抑制剂联合用药后,可协同增效。与空白组比较,各组均能提高 miR-133a 表达( $P<0.05$ ),其中抑制剂与中药抑制剂+启膈散组促进作用明显。与空白组比较,各组均能够均可明显降低 Akt, mTOR 蛋白表达( $P<0.05$ ),与单独用药比较,抑制剂与中药联合应用组 Akt, mTOR 的蛋白表达有所降低。结论:启膈散能够抑制食管癌 EC9706 细胞的生长,促进 EC9706 细胞的凋亡,其抑制机制可能与调控 miR-133a 的表达,影响其下游 Akt/mTOR 信号通路有关。

**[关键词]** 启膈散; EC9706 细胞; 增殖; 凋亡; 微 RNA-133a(miR-133a)/蛋白激酶 B(Akt)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)22-0001-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212226

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210927.2031.001.html>

[网络出版日期] 2021-09-28 18:45

### Effect of Qigesan on Proliferation, Apoptosis and miR-133a/Akt/mTOR Signaling Pathway of Esophageal Cancer EC9706 Cells

GAO Xiao-ling, LIU Lu, LI Mo-yan, LI Yan-kun, WANG Rui, CHEN Yu-long, CUI Shan-shan\*  
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Qigesan on the proliferation and apoptosis of the human esophageal cancer cell EC9706, and the effect on miR-133a/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Method:** The effective constituent of Qigesan was extracted by ethyl acetate. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay was used to determine the dosage of Qigesan on cells and to detect the effect of Qigesan on the proliferation of EC9706 cells. The effect of Qigesan on apoptosis of EC9706 cells was detected by flow cytometry. The effect of Qigesan on miR-133a and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) mRNA expression was detected by Real-time quantitative polymerase chain

[收稿日期] 20210820(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81803981);河南省高等学校青年骨干教师培养项目(2018GGJS084)

[第一作者] 高小玲, 博士, 副教授, 从事肿瘤病机与防治研究, E-mail: gxling2005@163.com

[通信作者] \* 崔姗姗, 教授, 从事中医藏象学及肿瘤病机与防治研究, E-mail: sscui13@163.com

reaction (Real-time PCR). The protein expression of Akt and mTOR in EC9706 cells was detected by Western blot. **Result:** Qigesan can inhibit the proliferation of EC9706 cells in a dose-dependent manner ( $P < 0.01$ ). Inhibitory concentrations 30% inhibition concentration ( $IC_{30}$ )  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and median inhibition concentration ( $IC_{50}$ )  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  were selected for follow-up experiments. Compared with the blank group, both the inhibitor group and the combination drug group can inhibit the proliferation of EC9706 cells ( $P < 0.01$ ). The inhibitor at  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  was selected for subsequent experiments. Compared with the blank group, Qigesan  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  dose group could significantly promote the late apoptosis rate and total apoptosis rate of EC9706 cells ( $P < 0.05$ ), and the  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  dose group could significantly promote the late apoptosis rate of EC9706 cells ( $P < 0.05$ ), which shows synergistic effect after concomitant use with Akt/mTOR inhibitor ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank control group, each group can effectively increase expression of miR-133a ( $P < 0.05$ ). The combination of inhibitor and traditional Chinese medicine (TCM) has obvious promotion effect. Compared with blank control group, the expressions of Akt and mTOR were significantly decreased in each group ( $P < 0.05$ ). Compared with single medication, the expressions of Akt and mTOR were decreased in combination of inhibitor and TCM group. **Conclusion:** Qigesan can inhibit the growth of EC9706 cells and promote apoptosis, and its inhibitory mechanism may be related to the Akt/mTOR signaling pathway by regulating the expression of miR-133a.

**[Keywords]** Qigesan; EC9706 cell; proliferation; apoptosis; miR-133a/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway

食管癌是发病死亡率较高的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率在全球居第7位和第6位,且预后不佳<sup>[1]</sup>。尽管随着医疗水平的发展和进步,食管癌的五年生存率有了一定提升,但仅仅维持在30%左右<sup>[2]</sup>。因此,深入研究食管癌发生发展分子机制,能够为食管癌的治疗提供新思路及新靶点。微RNA-133a(miR-133a)是本研究前期采用基因芯片分析临床食管癌组织和正常组织间的差异基因之一,其在食管鳞状细胞癌组织中表达下降<sup>[3]</sup>,并与其预后直接相关<sup>[4]</sup>。磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路是癌症经典信号通路,其通路相关蛋白在食管癌组织中呈高表达状态<sup>[5-6]</sup>。胰岛素样生长因子1受体(IGF-1R)是miR-133a的下游靶基因之一<sup>[7]</sup>,在多数类型肿瘤中过表达,与肿瘤细胞的凋亡、转化、浸润性生长及远处转移有关<sup>[8-9]</sup>。IGF-1R与其配体结合引起该受体酪氨酸及丝氨酸残基自动磷酸化,进一步激活PI3K/Akt,活化的Akt通过磷酸化作用激活或抑制其下游分子进而调节细胞的增殖、分化、凋亡以及迁移等<sup>[10]</sup>。

启膈散记载于《医学心悟》,为治疗噎膈之名方。《中医内科学》等书收录本方为治疗食管癌(噎膈)首选方剂<sup>[11]</sup>。作为行气化痰法治疗食管癌代表方剂,在临床上辅助或单独使用均取得较好疗效<sup>[12]</sup>。启膈散联合化疗治疗中晚期食管癌疗效确切,而且能减少化疗药物带来的不良反应<sup>[13]</sup>,可降

低食管癌根治术后患者的复发转移率,延长无病生存时间,提高生存质量<sup>[14]</sup>。在前期研究的基础上,本研究拟采用PI3K/Akt/mTOR抑制剂BEZ235,研究启膈散对EC9706细胞增殖、凋亡和miR-133a/PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响,研究行气化痰法代表方启膈散对其干预作用,加深对中医对食管癌病机及治疗的认识,为临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 药物** 启膈散组方:丹参-沙参-川贝母-茯苓-砂仁-郁金9:9:4.5:3:1.5:1.2。药材均购自郑州瑞龙制药公司,由河南中医药大学中药学宋宁副教授鉴定均为正品。根据前期实验结果,启膈散乙酸乙酯提取部位对肿瘤细胞的抑制作用最佳。按照按药材-乙醇1:8加入70%乙醇,加热至沸腾,保持微沸1.5h,煎煮2次后合并滤液,取上清液负压抽滤。按照1:2加入乙酸乙酯,摇匀静置,收集上层药液。反复萃取至上层颜色接近透明后,将收集的乙酸乙酯药液进行旋蒸,真空干燥箱中干燥。得药膏10.01g,出膏率为0.72%。使用时采用二甲基亚砜(DMSO)溶解,使其质量浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**1.2 细胞** 人食管癌EC9706细胞株由河南省方证信号传导重点实验室惠赠,细胞株用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,于 $37^\circ\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ 培养箱内进行常规培养,细胞密度达到80%时,以0.25%胰酶1:3传代,细胞传至第4~5代冻存备用,实验取对数生长期细胞。

**1.3 试剂** 分析纯乙酸乙酯(天津致远有限公司,批号 YSYZ-500); RPMI 1640 培养基,胰蛋白酶-EDTA 消化液,噻唑蓝(MTT)(索莱宝公司,批号分别为 20180222, 20171225, 6041051); 胎牛血清(美国 Gemini 公司,批号 A97E00G); 二甲基亚砜(DMSO, 美国 Amresco 公司,批号 1121E0312); PI3K/Akt/mTOR 抑制剂(BEZ235)(美国 MCE 公司,批号 29566); TRIzol 总 RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 284911); TUREscript 1<sup>st</sup> Stand cDNA SYNTHESIS Kit 反转录试剂盒(北京艾德莱生物公司,批号 20191210); Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞双染凋亡检测试剂盒(杭州联科生物技术有限公司,批号 70-AT101-100); Akt 抗体(英国 Abcam 公司,批号 ab179463); mTOR, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 Q13131, P04406); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(博士德生物,批号 14L16B46)。

**1.4 仪器** FACS Vantage SE 型流式细胞仪(美国 BD 公司); 371 型 CO<sub>2</sub> 培养箱, Heraeus Labofuge 400 型低速离心机(美国 Thermo 公司); AxioCam 105 color 型倒置相差显微镜(德国 Zeiss 公司); analytikjena-qTOWER2.2 型荧光定量 PCR 仪(德国耶拿公司); 422Electro-Eluter 型垂直电泳槽, ELx-800 型酶标仪, Gel Doc XR 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 MTT 比色法检测细胞活性** 取对数生长期的 EC9706 细胞,以 1×10<sup>4</sup> 个/孔接种于 96 孔板中,置于细胞培养箱中培养 24 h,吸走旧培养液,加入启膈散 25, 50, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup> 进行量效筛选(相当于生药量 138.89 mg·L<sup>-1</sup>); BEZ235(1, 0.5, 0.25 μmol·L<sup>-1</sup>), BEZ235+启膈散抑制剂+启膈散组(0.25 μmol·L<sup>-1</sup>+80 mg·L<sup>-1</sup>; 0.25 μmol·L<sup>-1</sup>+40 mg·L<sup>-1</sup>), 每组设 3 个复孔。加药 48 h 后吸出旧液,按 9:1 用 RPMI 1640 培养基稀释 MTT 储存液,MTT 终质量浓度为 0.5 g·L<sup>-1</sup>,继续培养 4 h,吸出 MTT 工作液,加入 DMSO 150 μL,酶标仪 570 nm 检测吸光度 A,设空白组细胞存活率为 100%,计算各组抑制率。抑制率=(1-A<sub>药物组</sub>/A<sub>空白组</sub>)×100%。

**2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率** 取对数生长的 EC9706 细胞,以 3×10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h,根据细胞增殖结果,启膈散取近 30% 抑制浓度(IC<sub>30</sub>)和半抑制浓度(IC<sub>50</sub>),分别为 40, 80 mg·L<sup>-1</sup>;

BEZ235 取近 IC<sub>40</sub>,为 0.25 μmol·L<sup>-1</sup>;抑制剂+启膈散组取 0.25 μmol·L<sup>-1</sup>+80 mg·L<sup>-1</sup>; 0.25 μmol·L<sup>-1</sup>+40 mg·L<sup>-1</sup>。加药培养 48 h,收集培养液,加入不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化并收集细胞,用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次并收集,加入缓冲液 500 μL 重悬细胞,每管加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI 10 μL,室温避光孵育 5 min,流式细胞仪检测凋亡细胞。

**2.3 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测启膈散对食管癌 EC9706 细胞 miR-133a, IGF-1R mRNA 表达的影响** 加药 48 h,提取各组细胞样品总 RNA,按照反转录试剂盒合成 cDNA。配制反转录体系总体积 20 μL 进行反转录反应,25 °C 温浴 10 min,42 °C 温浴 50 min,65 °C 加热 15 min 终止反应,根据目的基因将反转录 cDNA 进行稀释。PCR 反应条件:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 39 个循环。结果以 GAPDH 及 U6 为内参,利用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 公式计算各个样品中目的基因相对表达量。引物由杭州联川生物技术股份有限公司设计合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
U6	上游 CTCGCTTCGGCAGCACATATACT	96
	下游 ACGCTTCACGAATTTGCGTGTG	
miR-133a-3p	上游 CAATGGTCCCCTTCAACCAG	75
	下游 CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT	
GAPDH	上游 CGGAGTCAACGGATTTGGTC	87
	下游 CGGTGCCATGGAATTTGCCA	
IGF-1R	上游 CTGACCTCTGTACCTCTCC	77
	下游 CATCGGCTTCTCTCCAT	

**2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定启膈散对 EC9706 细胞 Akt, mTOR 蛋白表达的影响** 细胞分组及培养同 2.2 项。提取细胞总蛋白,在冰上用裂解提取各组总蛋白。二辛可酸(BCA)法测定样本蛋白浓度。加入 5×蛋白上样缓冲液按比例混合样品,100 °C 加热 5 min 变性,进行聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,转膜,Tris 碱缓冲液(TBST)配置的 5% 牛奶封闭 1 h,添加一抗(1:1 000),室温摇床封闭 1 h,4 °C 冰箱孵育过夜,次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。添加二抗(1:5 000)孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加入 ECL 超敏发光液,

化学发光成像系统免疫发光仪器中,用 Image Lab 显影成像并统计条带灰度值。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学检验,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。符合正态分布及方差齐时,进行单因素方差分析,方差齐性使用 LSD 法检验,方差不齐使用 Tamhane's  $T_2$  法,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 启膈散对食管鳞癌 EC9706 细胞增殖的影响

与空白组比较,启膈散乙酸乙酯提取部位可抑制人食管癌鳞癌 EC9706 细胞的增殖,随剂量的增大抑制率逐渐上升 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),呈浓度依赖性。 $IC_{50}$  为  $81.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $IC_{30}$  为  $42.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。后续实验选用  $80, 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  作为启膈散组高、低质量浓度组。见表 2。

表 2 启膈散对 EC9706 细胞的增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

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

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率/%
空白		1.745±0.138	
	25	1.480±0.143 <sup>1)</sup>	15.34±4.42 <sup>1)</sup>
启膈散	50	1.155±0.052 <sup>2)</sup>	34.13±3.28 <sup>2)</sup>
	100	0.367±0.175 <sup>2)</sup>	79.42±6.30 <sup>2)</sup>
	200	0.137±0.024 <sup>2)</sup>	92.16±5.59 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

与空白组比较,抑制剂组、抑制剂+启膈散组对人食管癌鳞癌 EC9706 细胞生长有明显抑制作用 ( $P < 0.01$ ),并呈现一定的量效关系。抑制剂  $IC_{40}$  为  $0.24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,考虑到对细胞状态的影响,后续选用  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作为抑制剂使用浓度。见表 3。

表 4 启膈散对 EC9706 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

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

组别	浓度	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
空白		0.96±0.25	3.15±0.21	4.12±0.36
抑制剂	$0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.79±0.23	5.48±0.72 <sup>1)</sup>	6.27±0.50
启膈散	$80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.63±0.33	6.43±0.36 <sup>1)</sup>	7.07±0.13 <sup>1)</sup>
	$40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.94±0.21	4.08±0.62 <sup>1)</sup>	5.02±0.43
抑制剂+启膈散	$0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.85±1.23	17.08±0.12 <sup>1,2,3)</sup>	18.93±1.19 <sup>1,2,3)</sup>
	$0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.11±0.37	6.14±0.26 <sup>1,2)</sup>	7.25±0.31 <sup>1,2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与启膈散组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与抑制剂组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

**3.3 启膈散对食管癌 EC9706 细胞 miR-133a, IGF-1R 表达的影响** 与空白组比较,启膈散  $80, 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组、抑制剂组及抑制剂+启膈散组作用于

表 3 启膈散联合 PI3K/Akt 抑制剂对人食管癌细胞 EC9706 增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Qigesan combined with PI3K/Akt inhibitor on proliferation of human esophageal cancer cell EC9706 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度	A	抑制率/%
空白		1.557±0.249	
抑制剂	$0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.863±0.055 <sup>1)</sup>	41.71±2.18 <sup>1)</sup>
	$0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.713±0.075 <sup>1)</sup>	44.19±4.01 <sup>1)</sup>
	$1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.701±0.051 <sup>1)</sup>	47.23±6.54 <sup>1)</sup>
抑制剂+启膈散	$0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.944±0.052 <sup>1)</sup>	38.35±3.72 <sup>1)</sup>
	$0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.844±0.101 <sup>1)</sup>	45.42±5.24 <sup>1)</sup>
	$0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.909±0.066 <sup>1)</sup>	40.77±3.95 <sup>1)</sup>
	$0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.736±0.126 <sup>1)</sup>	52.79±4.12 <sup>1)</sup>
	$1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.751±0.072 <sup>1)</sup>	49.74±7.41 <sup>1)</sup>
	$1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.523±0.001 <sup>1)</sup>	65.51±5.55 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2 启膈散对 EC9706 细胞凋亡的影响** 与空白组比较,启膈散、抑制剂组及抑制剂+启膈散组均能够增加晚期凋亡率 ( $P < 0.05$ );启膈散  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组、抑制剂+启膈散组均能增加食管癌 EC9706 细胞的总凋亡率 ( $P < 0.05$ )。与同浓度启膈散比较,联合应药启膈散高、低浓度组均能增加食管癌 EC9706 细胞的晚期凋亡与总凋亡率 ( $P < 0.05$ )。与抑制剂组比较,联合用药启膈散  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组能够增加食管癌 EC9706 细胞的晚期凋亡与总凋亡率 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

食管癌 EC9706 细胞 48 h,均能够有效提高 miR-133a 的表达 ( $P < 0.05$ );与单用抑制剂组比较,联合用药启膈散  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组,能够进一步促进 miR-133a

的表达( $P<0.05$ )。与空白组比较,各组药物作用于EC9706细胞48 h,在一定程度上可促进IGF-1R mRNA的表达。见表5。

表5 启膈散对食管癌EC9706细胞miR-133a,IGF-1R表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Qigesan on expression of miR-133a in esophageal cancer EC9706 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度	miR-133a	IGF-1R
空白		1.21±0.24	1.07±0.07
抑制	0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.80±0.23 <sup>1)</sup>	1.58±0.21
启膈散	40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.78±0.28 <sup>1)</sup>	1.30±0.25
	80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2.35±0.38 <sup>1)</sup>	1.23±0.07
抑制剂+启膈散	0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2.15±0.13 <sup>1)</sup>	1.52±0.43
	0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2.63±0.19 <sup>1,2)</sup>	2.84±0.27

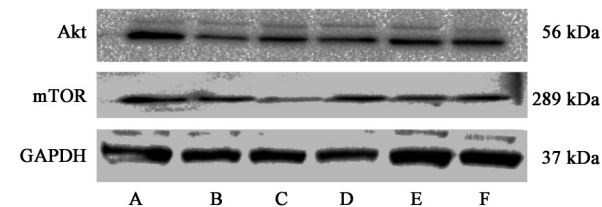
注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ;与抑制剂组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ (表6同)。

**3.4 启膈散对EC9706细胞Akt, mTOR蛋白表达的影响** 与空白组比较,启膈散组,抑制剂组及抑制剂+启膈散组作用于EC9706细胞48 h, Akt, mTOR蛋白表达均明显下降( $P<0.05$ )。见表6,图1。

表6 启膈散对EC9706细胞Akt, mTOR蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of Qigesan on expression of Akt and mTOR protein in EC9706 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度	Akt/GAPDH	mTOR/GAPDH
空白		1.08±0.06	2.62±0.32
抑制剂	0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.52±0.13 <sup>1)</sup>	0.941±0.30 <sup>1)</sup>
启膈散	40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.73±0.12 <sup>1)</sup>	0.98±0.23 <sup>1)</sup>
	80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.44±0.19 <sup>1)</sup>	0.77±0.27 <sup>1)</sup>
抑制剂+启膈散	0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.55±0.12 <sup>1)</sup>	0.61±0.12 <sup>1)</sup>
	0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.57±0.03 <sup>1)</sup>	0.63±0.11 <sup>1)</sup>



A. 空白组; B. 抑制剂+启膈散(0.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )组; C. 抑制剂+启膈散(0.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )组; D-E. 启膈散40, 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; F. 抑制剂0.25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图1 各组细胞Akt, mTOR蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Akt and mTOR protein expression in EC9706 cells of each group

#### 4 讨论

我国是食管癌发病率及病死率最高的国家,在全国恶性肿瘤死亡率排在第4位。目前常见治疗食管癌的有效方法是进行外科手术及放疗化疗,比较于手术治疗、放疗化疗的严重副作用、易出现耐药性及并发症<sup>[15]</sup>,中药治疗食管癌,具有耐受性高,能够减轻放、化疗副作用等优势。启膈散为临床治疗或者辅助治疗食管癌的常用方。方中丹参活血化瘀,沙参养阴润燥,川贝母化痰散结,茯苓、砂仁健脾祛湿,郁金行气化痰,诸药合用共奏行气化痰、润燥祛痰功效。该方能够行气化痰,活血润燥,治疗或辅助治疗食管癌疗效明确,因此,进一步深入研究其治疗机制,具有重要意义。

miR-133a是本研究前期基因芯片所筛选出的食管癌患者正常组织和癌变组织的重要差异基因,其在食管癌组织和血液中低表达。IGF-1R是miR-133a下游靶基因之一,前期实验结果表明,启膈散可以下调其表达,并对其下游PI3K信号通路有明确抑制作用<sup>[16]</sup>。因此,启膈散可能通过调节miR-133aAkt/mTOR信号通路进而影响食管癌肿瘤细胞生长、凋亡、周期及迁移等。

本实验采用抑制剂BEZ235进行实验,作为PI3K/Akt/mTOR各种抑制剂中机制明确、效果良好的抑制剂,其在致癌物诱导的动物模型、人食道鳞状细胞癌细胞系和异种移植小鼠模型中都起到了抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,从而诱导细胞周期停滞的作用<sup>[6]</sup>。与空白组比较,启膈散与BEZ235抑制剂均能够抑制食管癌EC9706细胞的增殖,但抑制剂+启膈散组对食管癌细胞EC9706抑制作用并未明显提高,提示抑制剂+启膈散组可能出现了竞争抑制作用。与空白组比较,启膈散80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,抑制剂+启膈散组对EC9706细胞晚期凋亡具有促进作用,而对于EC9706细胞的早期凋亡均无明显差异,可能是由于早期凋亡过程较短暂,随着药物浓度的增加及时间的推移,可加速细胞的凋亡。PCR结果显示,与空白组比较,各组均能够有效促进miR-133a表达;与抑制剂组比较,抑制剂+启膈散组可起到增效作用。与空白组比较,启膈散80, 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,抑制剂组及抑制剂+启膈散组对IGF-1R mRNA表达起到了不同程度的促进作用。这与前期本研究的预期结果并不完全一致。有研究表明,PI3K/Akt/mTOR的抑制会诱导IGF-1R的代偿表达和若干的酪氨酸激酶受体(RTK)活化。在使用Akt抑制剂后导致体外和体内RTK的反馈上调和激

活,包括IGF-1R,InsR,HER3和FGFR<sup>[17]</sup>。并且在抑制mTOR的表达后,能够激活FOXO功能,同样会诱导IGF-1R胰岛素受体和其他受体的表达和活性<sup>[18]</sup>。在临床前列腺癌组织中已经发现,miR-133a通过直接靶向多种细胞因子受体,包括EGFR,FGFR1,IGF-1R和MET等抑制PI3K/Akt信号传导,从而抑制前列腺癌的骨转移<sup>[19]</sup>。说明在IGF-1R外,miR-133a还可能调控其他靶基因作用于食管癌细胞PI3K/Akt/mTOR信号通路。本研究后续将进一步研究。结果显示,与空白组比较,各组均能够降低Akt,mTOR的蛋白表达。与启膈散组、抑制剂在比较,抑制剂+启膈散组对Akt,mTOR的蛋白表达下调作用呈竞争抑制效应。进一步说明启膈散可能通过PI3K/Akt/mTOR信号通路对食管癌细胞的生长起到调控作用。

综上,启膈散抑制食管癌细胞EC9706生长的机制可能促进miR-133a的表达,抑制PI3K/Akt/mTOR通路的蛋白有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.

[2] ZENG H, CHEN W, ZHENG R, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5): 555-567.

[3] 吴耀松,陈玉龙,尹素改,等. 结合基因芯片表达谱研究miRNAs在食管鳞癌中的作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(36): 3687-3691.

[4] NOHATAA N, HANAZAWA T, ENOKIDA H, et al. microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(1): 9-21.

[5] GUANEN Q, JUNJIE S, BAOLIN W, et al. MiR-214 promotes cell metastasis and inhibites apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.

[6] SHI N, YU H, CHEN T. Inhibition of esophageal cancer growth through the suppression of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 17(12): 7637-7647.

[7] LU L, LIU T, GAO J, et al. Aberrant methylation of microRNA-193b in human Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(1): 283-288.

[8] CHEN G, FANG T, HUANG Z, et al. MicroRNA-133a inhibits osteosarcoma cells proliferation and invasion via targeting IGF-1R [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(2): 598-608.

[9] ZHANG W, LIU K, LIU S, et al. MicroRNA-133a functions as a tumor suppressor by targeting IGF-1R in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12): 9779-9788.

[10] SOLOMON-ZEMLER R, SARFSTEIN R, WERNER H. Nuclear insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) displays proliferative and regulatory activities in non-malignant cells [J]. *PLoS One*, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0185164.

[11] 周仲瑛. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 225-226.

[12] 司富春, 陈玉龙, 徐晓宇, 等. 古代中医文献对食管癌的认识 [J]. *河南中医*, 2005, 25(6): 77-79.

[13] 杨国武. 启膈散加减联合化疗治疗中晚期食管癌临床观察 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2011, 18(3): 77-78.

[14] 张玉双, 高静, 史会娟, 等. 加味启膈散对食管癌根治术后患者复发转移及生存质量的影响 [J]. *中国全科医学*, 2018, 21(10): 1239-1243.

[15] KATO H, NAKAJIMA M. Treatments for esophageal cancer: a review [J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 61(6): 330-335.

[16] 司富春. 启膈散、沙参麦冬汤、通幽汤和补气运脾汤对hEGF刺激的人食管癌EC9706细胞生长信号转导的调节 [J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(28): 2956-2965.

[17] CHANDARLAPATY S, SAWAI A, SCALTRITI M, et al. Akt inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(1): 58-71.

[18] MENG X, DONG X, WANG W, et al. Natural borneol enhances paclitaxel-induced apoptosis of ESCC cells by inactivation of the PI3K/Akt [J]. *J Food Sci*, 2018, 83(5): 1436-1443.

[19] TANG Y B, PAN J C, HUANG S A, et al. Downregulation of miR-133a-3p promotes prostate cancer bone metastasis via activating PI3K/Akt signaling [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, doi: 10.1186/s13046-018-0813-4.

[责任编辑 张丰丰]