

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.003

鸦胆子油乳剂对食管鳞状细胞癌 TE-1 细胞增殖、凋亡和自噬的影响及其可能的机制

付皓云,李嫚(湖北省肿瘤医院 中西医结合科,湖北 武汉 430079)

[摘要] **目的:**探讨鸦胆子油乳剂(BJOE)对食管鳞状细胞癌 TE-1 细胞增殖、凋亡和自噬的影响及其可能的机制。**方法:**按干预措施的不同,将 TE-1 细胞分为对照组、RAPA(自噬激动剂)组、740Y-P(PI3K 激活剂)组、BJOE 组、BJOE+RAPA 组和 BJOE+740Y-P 组。采用 FCM、克隆形成、Transwell 实验检测细胞凋亡、增殖、迁移和侵袭能力,qPCR 法检测细胞中 PI3K、Akt、mTOR、LC3 I、LC3 II、p62、Beclin 1、caspase-3 的 mRNA 表达,WB 法检测 PI3K、Akt、mTOR 及其磷酸化、LC3 II/I、p62、Beclin 1、caspase-3 的蛋白表达。**结果:**与对照组比较,RAPA 组和 BJOE 组细胞凋亡率均显著升高(均 $P<0.01$),细胞克隆形成率、迁移和侵袭能力均显著降低(均 $P<0.01$),细胞中 PI3K、Akt、mTOR 的 mRNA 和蛋白磷酸化水平均显著降低(均 $P<0.05$),p62 的 mRNA 和蛋白水平显著降低(均 $P<0.01$),LC3 II/I、Beclin 1 和 caspase-3 的 mRNA 和蛋白水平显著升高(均 $P<0.05$),740Y-P 组的结果则相反(均 $P<0.05$);与 RAPA 组或 740Y-P 组比较,BJOE+RAPA 组或 BJOE+740Y-P 组细胞凋亡率显著升高(均 $P<0.01$),克隆形成率、细胞侵袭和迁移能力显著降低(均 $P<0.01$),PI3K、Akt、mTOR 的 mRNA 和蛋白磷酸化水平均显著降低(均 $P<0.05$),p62 的 mRNA 和蛋白水平均显著降低(均 $P<0.05$),LC3 II/I、Beclin 1 和 caspase-3 mRNA 和蛋白水平显著升高(均 $P<0.05$)。**结论:**BJOE 显著抑制 TE-1 细胞增殖、迁移、侵袭并促进细胞凋亡与自噬,其机制可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活有关。

[关键词] 鸦胆子油乳剂;食管鳞状细胞癌;TE-1 细胞;增殖;凋亡;自噬;PI3K/Akt/mTOR 信号通路

[中图分类号] R735.1;R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)07-0560-08

Effects of brucea javanica oil emulsion on proliferation, apoptosis and autophagy of esophageal squamous cell carcinoma TE-1 cells and its possible mechanism

FU Haoyun, LI Man (Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of brucea javanica oil emulsion (BJOE) on proliferation, apoptosis and autophagy of esophageal squamous cell carcinoma TE-1 cells and the possible mechanism. **Methods:** According to the different interventions TE-1 cells were divided into control group, RAPA (autophagy agonist) group, 740Y-P (PI3K activator) group, BJOE group, BJOE+RAPA group and BJOE+740Y-P group. Cell apoptosis, proliferation, migration and invasion were detected by FCM, clonogenesis and Transwell assay; the mRNA expression of PI3K, Akt, mTOR, LC3 I, LC3 II, p62, Beclin 1 and caspase-3 in cells was detected by qPCR; and the protein expression levels of PI3K, Akt, mTOR and their phosphorylation as well as the protein expression of LC3 II/I, p62, Beclin1 and caspase-3 were detected by Western blotting. **Results:** Compared with the control group, RAPA group and BJOE group exhibited increased cell apoptosis rate (both $P<0.01$), reduced clone formation rate, cell invasion and migration ability (all $P<0.01$), decreased mRNA and protein phosphorylation levels of PI3K, Akt, mTOR (all $P<0.05$) as well as decreased mRNA and protein levels of p62 (all $P<0.01$), and increased mRNA and protein levels of LC3 II/I, Beclin 1 and caspase-3 (all $P<0.05$); however, the results of 740Y-P group were opposite (all $P<0.05$). Compared with RAPA group or 740Y-P group alone, BJOE+RAPA or BJOE+740Y-P group exhibited increased apoptosis rate ($P<0.01$), decreased clone formation rate, cell invasion and migration ability (all $P<0.01$), decreased mRNA and protein phosphorylation levels of PI3K, Akt, mTOR (all $P<0.05$) as well as decreased mRNA and protein levels of p62 (all $P<0.05$), and increased mRNA and protein levels of LC3 II/I, Beclin 1 and caspase-3 (all $P<0.05$). **Conclusion:** BJOE significantly inhibits the proliferation, invasion, migration and promotes apoptosis and autophagy of TE-1 cells, and the mechanism may be related to inhibition of the activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

[Key words] brucea javanica oil emulsion (BJOE); esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); TE-1 cell; proliferation; apoptosis; autophagy; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(7): 560-567. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.003]

[基金项目] 国家中医药管理局第七批全国名老中医药专家学术继承项目[No. 国中医药人教函(2022)76号]

[作者简介] 付皓云(1984—),女,硕士,住院医师,主要从事中西医结合治疗肿瘤的相关研究,E-mail: hbzlelion@163.com

[通信作者] 李嫚,E-mail: zlyy1249@163.com

食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 是较为常见的恶性肿瘤,其具有生长迅速、早期转移、对药物治疗反应低等特点^[1-2]。目前手术、放疗、化疗和联合治疗是 ESCC 的主要治疗方法^[3]。然而,由于早期 ESCC 的症状不典型,大多数患者在确诊时已出现远处转移,因而治疗效果欠佳^[4]。随着医学科学技术的发展,ESCC 患者的生存率有所提高,但长期预后仍然不理想。因此迫切需要寻找疗效高的药物,以有效提高临床治疗水平并降低其病死率。PI3K/Akt/mTOR 信号通路是生物体中重要的信号通路,研究结果^[5-7]显示,该信号通路的主要成分失调导致下游通路的异常激活,最终促进肿瘤的发生。自噬在细胞发育、增殖和肿瘤发生中起复杂的作用。研究^[8]表明,许多天然产物可靶向 PI3K/Akt/mTOR 通路介导细胞自噬,从而抑制肿瘤生长。鸦胆子油被广泛用于治疗肝癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌等的治疗^[9]。鸦胆子油乳剂 (brucea javanica oil emulsion, BJOE) 是鸦胆子油最常用的制剂^[10],BJOE 对 ESCC EC109 细胞增殖和凋亡具有剂量依赖性作用^[11],但其是否通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来影响 ESCC 细胞的增殖与凋亡尚无相关报道。因此,本研究基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,利用 BJOE 处理 ESCC TE-1 细胞,结合自噬激动剂 RAPA 和 PI3K 激活剂 740Y-P 探讨 BJOE 对 TE-1 细胞增殖、凋亡和自噬的作用及其机制,旨在为 BJOE 治疗 ESCC 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人 ESCC TE-1 细胞购自中国科学院上海细胞库。BJOE 购自广州白云山明兴制药有限公司。RPMI 1640 购自 Hyclone 公司,胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司,磷酸缓冲液(PBS)、0.25% 胰蛋白酶、CCK-8 试剂盒和瑞氏-吉姆萨复合染液、RIPA(强)组织细胞快速裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒、结晶紫染色液均购自 Solarbio 公司,RAPA、740Y-P 购自 MCE 公司,Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒、基质胶购自 BD 公司,TRIzol 购自 Ambion 公司,SYBR Green 染料购自 KAPA Biosystems 公司,PI3K、Akt、mTOR、LC3 II/I、p62、Beclin 1、caspase-3、GAPDH 抗体和山羊抗兔二抗均购自 Bioswamp 公司,p-PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 相关抗体购自 Abcam 公司。

1.2 细胞培养

将 TE-1 细胞用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,待细胞汇合度达 80% 时,按照 1:2 比例进行传代培养。

1.3 实验分组及处理

将对数生长期 TE-1 细胞分为对照组、RAPA 组、740Y-P 组、BJOE 组、BJOE+RAPA 组和 BJOE+740Y-P 组。RAPA 组加入 5 mmol/L RAPA^[12],740Y-P 组加入 30 μmol/L 740Y-P^[13],BJOE 组加入 40 μg/mL BJOE^[14],BJOE+RAPA 组加入 40 μg/mL BJOE 和 5 mmol/L RAPA, BJOE+740Y-P 组加入 40 μg/mL BJOE 和 30 μmol/L 740Y-P,对照组细胞不经 RAPA 或 740Y-P 处理,培养 48 h 后进行后续实验。

1.4 FCM 检测 TE-1 细胞的凋亡水平

收集各组细胞,加入 200 μL PBS 轻轻吹打混匀细胞,4 °C 离心 5 min,弃上清液后,加入 10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,轻轻混匀,4 °C 避光处理 30 min。加入 300 μL PBS,进行 FCM 检测,使用 NovoExpress 分析软件对细胞的凋亡情况进行分析。

1.5 克隆形成实验检测 TE-1 细胞的增殖能力

收集各组细胞,调整细胞悬液浓度,接种于 6 孔板(2×10⁵ 个/孔),置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。当培养板中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,PBS 清洗 2 次,加入 2 mL 4% 多聚甲醛 4 °C 固定细胞 15 min。弃去固定液,加入 1 mL 瑞氏-吉姆萨复合染液 20 min,流水缓慢洗去染色液。将平皿倒置拍照,计数克隆并计算克隆形成率。克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.6 Transwell 实验检测 TE-1 细胞的迁移和侵袭能力

进行细胞迁移、侵袭实验接种前需将 24 孔板和 Transwell 小室用 PBS 浸泡 5 min。进行细胞侵袭实验时需在上室中预铺 80 μL 基质胶,37 °C 培养箱中放置 30 min。以 1% FBS 的培养基重悬 TE-1 细胞,取 200 μL (1×10⁵ 个/mL) 接种到 Transwell 上室内,下室中加入 600 μL 10% FBS 的培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。弃去培养基,PBS 清洗后加入 1 mL 4% 多聚甲醛溶液,室温下固定 20 min。弃去固定液,加入 1 mL 0.5% 结晶紫溶液染色 30 min。用棉签擦去 Transwell 上室内未穿膜的细胞,置于光学显微镜下(×200)观察、统计穿膜细胞数。

1.7 qPCR 法检测 TE-1 细胞中 PI3K/AKT/mTOR 通路、自噬和凋亡相关 mRNA 的表达

收集各组 TE-1 细胞,加入 1 mL TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA,按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明方法逆转录获得 cDNA,qPCR 法检测 PI3K、Akt、mTOR、LC3 II/I、p62、Beclin 1 和 caspase-3 的表达水平。qPCR 引物由武汉天一华煜基因科技有限公司合成,序列见表 1。qPCR 反应条件:95 °C 3 min,95 °C 5 s、56 °C 10 s、72 °C 25 s,共 40 个循环。依据 Ct 值计算 2^{-ΔΔCt},以 GAPDH 为内参基因计算各目的

基因 mRNA 的相对表达量。

表1 qPCR引物序列

基因	引物序列(5'-3')
PI3K	F: AGTAGGCAACCGTGAAG R: ATTTGGAGGATAGACATACATT
Akt	F: CACACCACCTGACCAAGATG R: GCACCCGAGAAATAAAAACC
mTOR	F: TACGCTGTCATCCCTTTATCG R: TCTTCTTCTTCTCCCTGTAGTCC
LC3 II	F: CAGCACAGCATGGTGAGTG R: TTTCTGGGAGGCGTAGAC
LC3 I	F: GCATCCAACCAAAATCCC R: TGTGTCCGTTACCAACAG
P62	F: AAGAGAAAAAGAGTGCCG R: TCAGACAGGTGCCCGA
Beclin 1	F: CGTCCAACAACAGCACC R: GAATCTGCGAGAGACACCA
Caspase-3	F: GGTTTCATCCAGTCGCTTT R: ATTCTGTTGCCACCTTTC
GAPDH	F: GGGAAACTGTGGCGTGAT R: GAGTGGGTGTCGCTGTTGA

1.8 WB法检测TE-1细胞的中PI3K/AKT/mTOR通路、自噬和凋亡相关蛋白的表达

取出各组TE-1细胞,弃去培养液加入适量预冷PBS洗涤后,加入含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液在4℃下充分裂解细胞,以12 000×g离心10 min,取上清液进行蛋白质定量。取20 μg蛋白进行10% SDS-PAGE,将蛋白质转至PVDF膜上,于5%脱脂奶粉中室温封闭2 h,分别加入1:1 000稀释的PI3K、Akt、mTOR、p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、LC3 II/I、p62、Beclin 1、caspase-3和GAPDH一抗,-4℃冰箱中过夜。次日,PBST洗涤3次后加入山羊抗兔二抗(1:20 000),室温处理1 h。加入ECL化学发光试剂显色,用凝胶成像系统采集图像,以Image J软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.9 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BJOE及RAPA和740Y-P对TE-1细胞凋亡的影响

FCM检测结果(图1A)显示,与对照组比较,RAPA组和BJOE组TE-1细胞凋亡率显著升高(均

$P < 0.01$),740Y-P组细胞凋亡率显著降低($P < 0.01$);分别与RAPA组或740Y-P组比较,BJOE+RAPA组或BJOE+740Y-P组细胞凋亡率均显著升高(均 $P < 0.01$)。qPCR和WB实验结果(图1B、1C)显示,与对照组比较,RAPA组和BJOE组细胞中caspase-3的mRNA和蛋白表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$),740Y-P组细胞中caspase-3的mRNA和蛋白表达水平均显著降低(均 $P < 0.01$)。与RAPA组或740Y-P组比较,BJOE+RAPA组或BJOE+740Y-P组细胞中caspase-3的mRNA和蛋白表达均显著增加(均 $P < 0.01$)。结果表明,BJOE和RAPA能够促进TE-1细胞凋亡,740Y-P能够抑制TE-1细胞凋亡,且BJOE能够进一步增强RAPA对TE-1细胞凋亡的影响,并逆转740Y-P对TE-1细胞凋亡的影响。

2.2 BJOE及RAPA和740Y-P对TE-1细胞克隆形成的影响

克隆形成实验结果(图2)显示,与对照组比较,RAPA组和BJOE组TE-1细胞克隆形成率均显著降低(均 $P < 0.01$),740Y-P组细胞克隆形成率显著升高($P < 0.01$);与RAPA组或740Y-P组比较,BJOE+RAPA组或BJOE+740Y-P组细胞克隆形成率均显著降低(均 $P < 0.01$)。结果表明,BJOE和RAPA能够抑制TE-1细胞增殖,740Y-P能够促进TE-1细胞增殖,且BJOE能够进一步增强RAPA对TE-1细胞增殖的影响,并逆转740Y-P对TE-1细胞增殖的促进作用。

2.3 BJOE及RAPA和740Y-P对TE-1细胞迁移与侵袭的影响

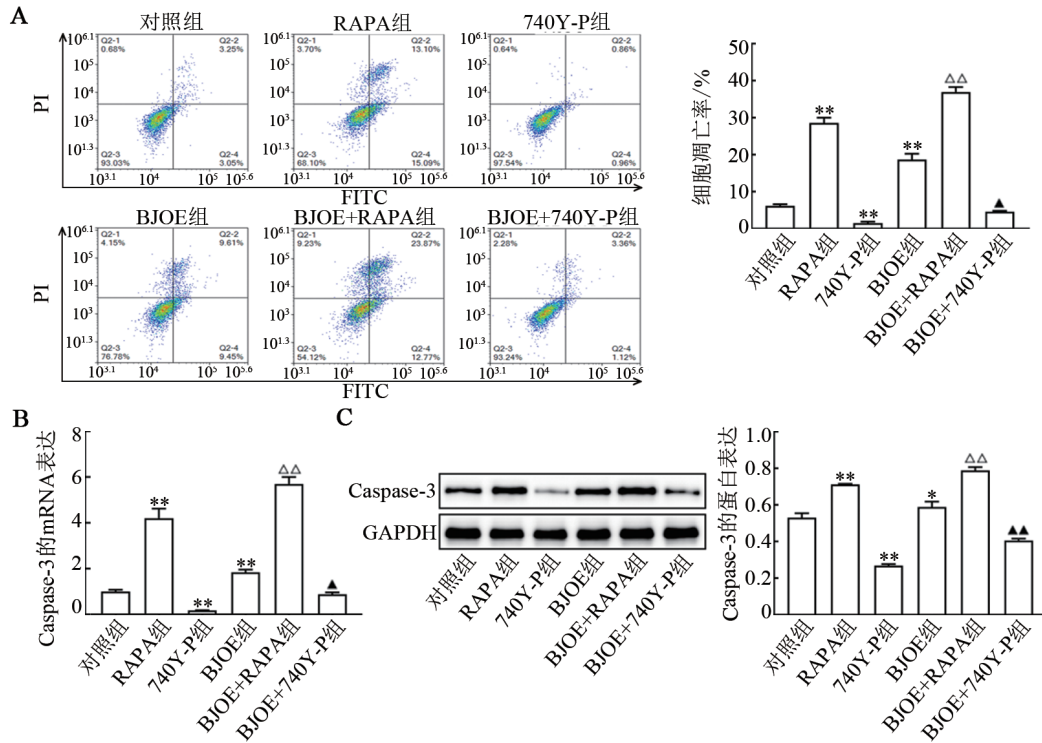
Transwell实验结果(图3)显示,与对照组比较,RAPA组和BJOE组TE-1细胞迁移和侵袭数均显著减少(均 $P < 0.01$),740Y-P组细胞迁移和侵袭数显著增多(均 $P < 0.01$)。与RAPA组或740Y-P组相比,BJOE+RAPA组或BJOE+740Y-P组细胞迁移和侵袭数均显著减少($P < 0.01$)。结果表明,BJOE和RAPA能够抑制TE-1细胞迁移与侵袭,740Y-P能够促进TE-1细胞迁移与侵袭,且BJOE能够进一步增强RAPA对TE-1细胞迁移与侵袭的抑制作用,并逆转740Y-P对TE-1细胞迁移与侵袭的影响。

2.4 BJOE及RAPA和740Y-P对PI3K/Akt/mTOR信号通路激活的影响

qPCR(图4A)和WB法(图4B)检测结果显示,与对照组比较,RAPA组和BJOE组TE-1细胞中PI3K、Akt、mTOR的mRNA和蛋白磷酸化水平均显著降低(均 $P < 0.05$),740Y-P组的结果与之相反。与RAPA组或740Y-P组相比,BJOE+RAPA组或BJOE+740Y-P组细胞中PI3K、Akt、mTOR的mRNA和蛋白磷酸化水平均显著降低(均 $P < 0.05$)。结果表明,BJOE和

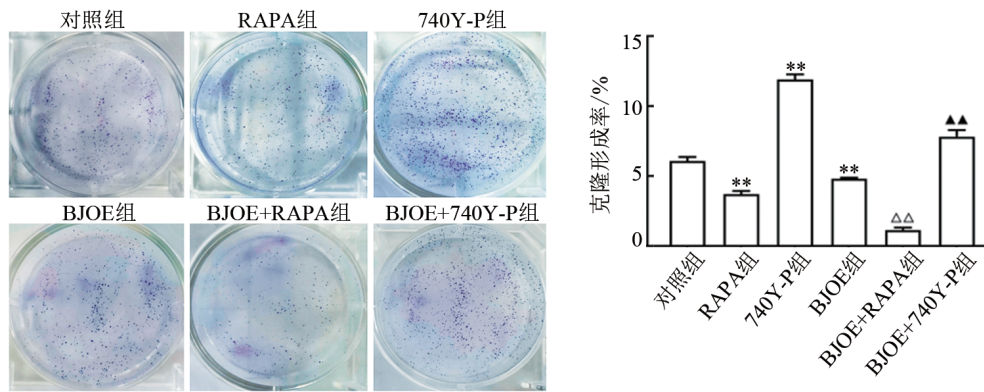
RAPA 能够抑制 TE-1 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活, 740Y-P 能够促进 TE-1 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活, 且 BJOE 能够进一步增强

RAPA 对 TE-1 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的抑制作用, 并逆转 740Y-P 对 TE-1 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活的促进作用。



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 RAPA 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 740Y-P 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 1 各组细胞凋亡率(A)和 caspase-3 的 mRNA(B)和蛋白(C)表达水平比较



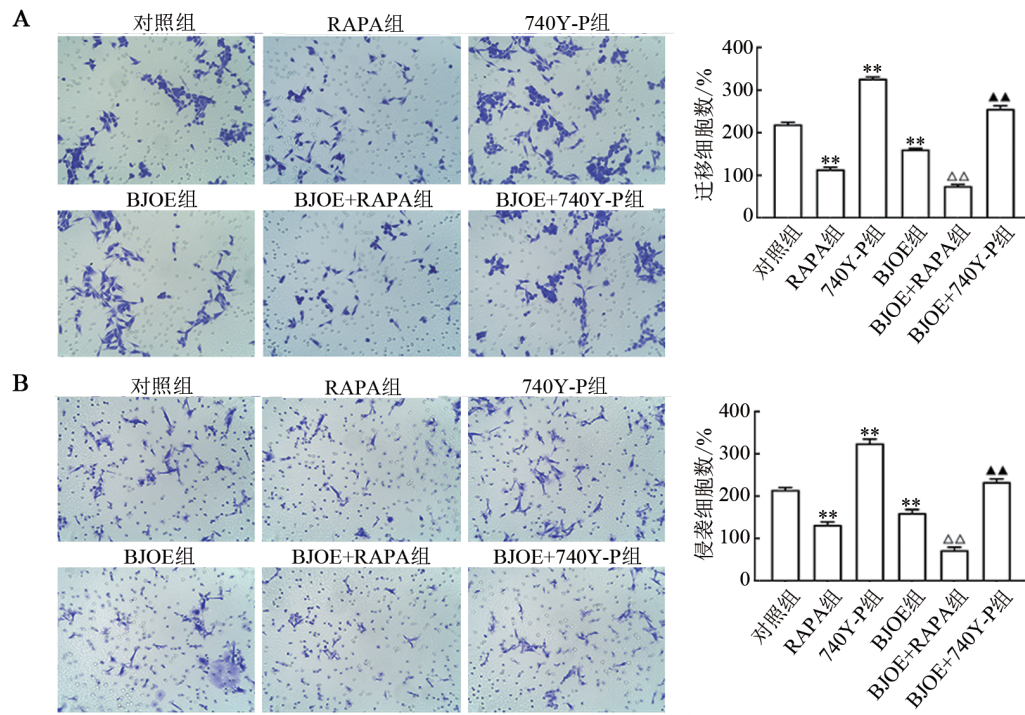
与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 RAPA 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 740Y-P 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 2 各组细胞克隆形成率比较

2.5 BJOE 及 RAPA 和 740Y-P 对 TE-1 细胞自噬相关基因和蛋白表达的影响

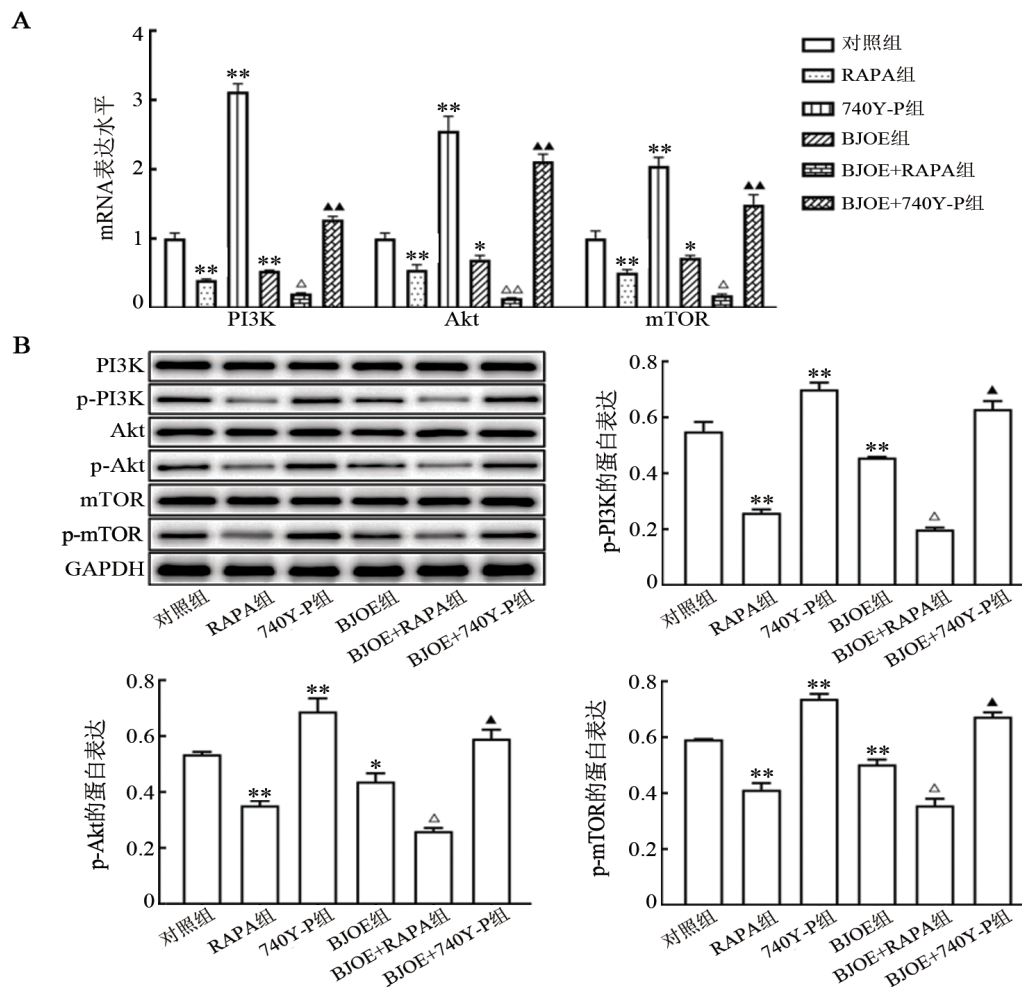
qPCR(图 5A)和 WB 法(图 5B)检测结果显示, 与对照组比较, RAPA 组和 BJOE 组 TE-1 细胞中 p62 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.01$), LC3 II/I、Beclin 1 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$), 740Y-P 组的结果与之相反(均 $P < 0.05$)。与 RAPA 组

或 740Y-P 组比较, BJOE+RAPA 组或 BJOE+740Y-P 组细胞中 p62 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.01$), LC3 II/I、Beclin 1 的 mRNA 和蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$)。结果表明, BJOE 和 RAPA 能够促进 TE-1 细胞自噬, 740Y-P 能够抑制 TE-1 细胞自噬, 且 BJOE 能够进一步增强 RAPA 对 TE-1 细胞自噬的促进作用, 并逆转 740Y-P 对 TE-1 细胞自噬的抑制作用。



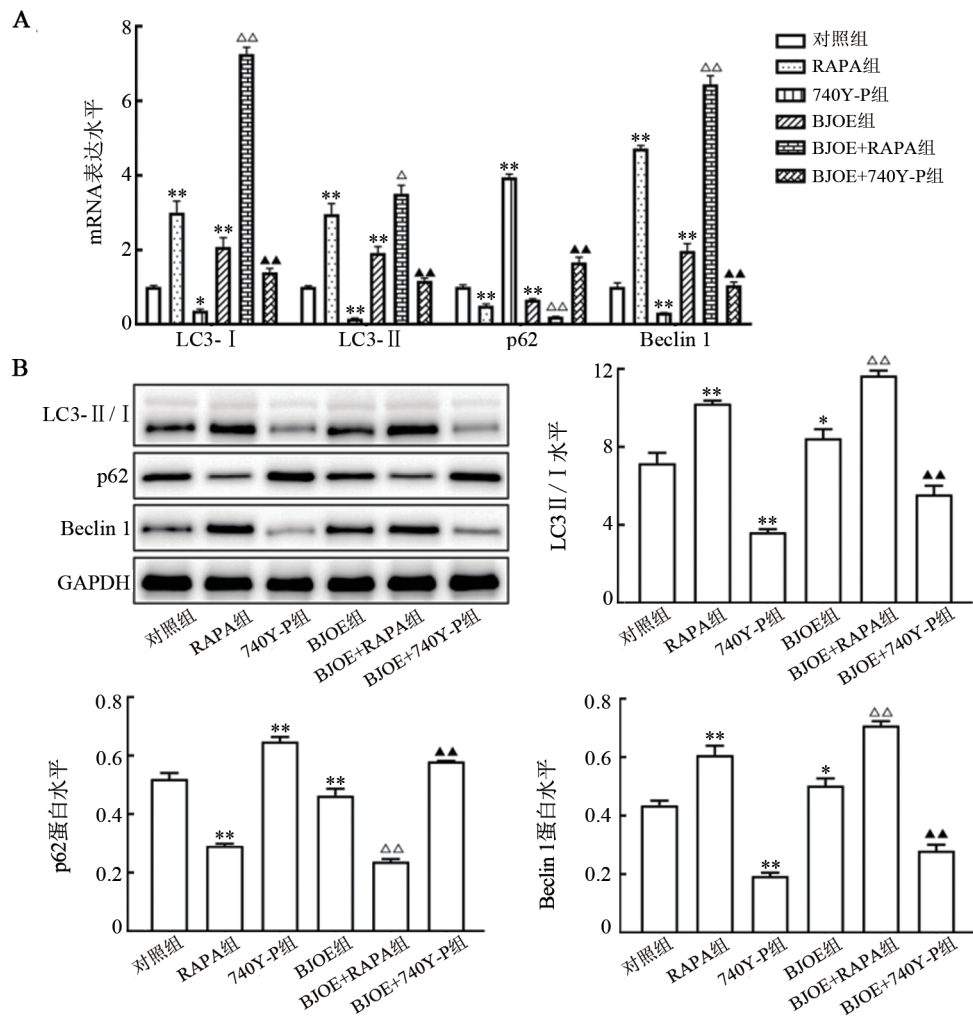
与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与RAPA组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与740Y-P组比较, ^{△△} $P < 0.01$ 。

图3 BJOE及RAPA和740Y-P对细胞迁移(A)和侵袭(B)的影响(结晶紫染色, ×200)



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与RAPA组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与740Y-P组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。

图4 各组细胞中PI3K、Akt、mTOR的mRNA(A)和蛋白磷酸化(B)水平比较



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 RAPA 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 740Y-P 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图5 各组细胞中自噬相关基因(A)和蛋白(B)表达水平比较

3 讨论

ESCC 是食管癌的一种主要组织病理学亚型, 手术切除是 ESCC 的重要治疗手段, 术后放疗是降低 ESCC 复发风险的主要方法, 然而, 较大比例的 ESCC 产生了放疗抵抗^[15], 从而导致肿瘤局部未控或复发、转移。BJOE 具有抗真菌、抗氧化、抗炎和抗癌等生物活性, 能抑制癌细胞的生长和迁移能力, 可作为 ESCC 潜在的治疗药物^[16]。本研究结果显示, BJOE 能够促进 TE-1 细胞凋亡, 并抑制细胞增殖、迁移和侵袭, 提示 BJOE 具有抑制 ESCC 的作用, 与前期研究结果^[11]一致。

细胞凋亡被认为是受外在或内在细胞凋亡机制调控的各种细胞病理过程的重要组成部分^[17]。Caspase 家族是凋亡过程中的半胱氨酸蛋白酶, 其中 caspase-3 是凋亡级联中最关键的凋亡蛋白酶, 一旦激活就会发生下游级联反应使凋亡发生^[18]。有研究^[19]发现, BJOE 在宫颈癌 SiHa 细胞中表现出显著的细胞毒性作用, 并诱导细胞凋亡。本实验结果显示,

BJOE 可提高 caspase-3 蛋白表达水平。自噬可以调节细胞凋亡, 包括有丝分裂、自噬以及 Beclin 1 与抗凋亡家族成员之间的相互作用。当自噬体与溶酶体融合时, 自噬体内的 LC3 II 会降解其内容物, 因此, LC3 可以作为自噬的标志物^[20]。此外, LC3 在细胞自噬和凋亡之间的相互作用中起关键作用^[21]。有研究^[22]发现, BJOE 可诱导非小细胞肺癌 A549 细胞自噬, 抑制细胞增殖和迁移。本实验结果显示, BJOE 显著提高 LC3 II/I 和 Beclin 1 表达水平, 表明 BJOE 能诱导细胞自噬。

越来越多的研究证据^[23-25]表明, PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与许多肿瘤细胞(如结直肠癌、乳腺癌和 ESCC 等)的增殖与存活过程。本研究结果显示, BJOE 能够抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活, 表明 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在自噬中起着关键的调控作用。在生理条件下, 生长因子和细胞因子通过激活 PI3K 和磷酸化 Akt, 然后激活 mTOR, 活化的 mTOR 通过磷酸化下游因子促进蛋白质合成并抑制自噬^[26]。为进一步明确 BJOE 通过调控 ESCC 细胞

PI3K/Akt/mTOR 通路诱导自噬的机制, 本研究使用自噬激动剂 RAPA 和 PI3K 激活剂 740Y-P 处理 TE-1 细胞, 结果显示, 与 RAPA 或 740Y-P 组比较, BJOE+RAPA 组或 BJOE+740Y-P 组 TE-1 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 通路的激活均受到抑制, 且细胞中 LC3 II/I 和 Beclin 1 表达水平也显著升高, 提示 BJOE 能够通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活 TE-1 细胞自噬, 并促进细胞凋亡。

综上所述, BJOE 可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导 ESCC TE-1 细胞自噬, 并促进细胞凋亡, 抑制细胞增殖、迁移和侵袭, 为 BJOE 治疗 ESCC 提供了实验依据。

[参考文献]

- 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. DOI: 10.3322/caac.21492.
- 尹情, 韩俊淑, 董稚明, 等. miR-452-5p 靶向 SOX7 促进食管癌 KYSE-150 细胞增殖、侵袭及 EMT[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(4): 294-300. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.004.
- GRABOWSKA W, SIKORA E, BIELAK-ZMIJEWSKA A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process[J]. *Biogerontology*, 2017, 18(4): 447-476. DOI: 10.1007/s10522-017-9685-9.
- HUANG F L, YU S J. Esophageal cancer: risk factors, genetic association, and treatment[J]. *Asian J Surg*, 2018, 41(3): 210-215 [2023-05-08]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.asjsur.2016.10.005>. DOI: 10.1016/j.asjsur.2016.10.005.
- 王欢, 万佳, 施明, 等. 细胞角蛋白13通过PTEN抑制PI3K/AKT/mTOR通路增强鼻咽癌HNE1细胞放疗敏感性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(1): 31-36. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.01.005.
- LUO Q, DU R J, LIU W T, *et al.* PI3K/Akt/mTOR signaling pathway: role in esophageal squamous cell carcinoma, regulatory mechanisms and opportunities for targeted therapy[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 852383[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8980269/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.852383.
- 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, 12: 7637-7647. DOI: 10.2147/OTT.S205457.
- XU Z R, HAN X, OU D M, *et al.* Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2): 575-587. DOI: 10.1007/s00253-019-10257-8.
- PAN L, CHIN Y W, CHAI H B, *et al.* Bioactivity-guided isolation of cytotoxic constituents of *Brucea javanica* collected in Vietnam [J/OL]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(6): 2219-2224[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2683946/>. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.10.076.
- CUI Y X, WU Z M, LIU X X, *et al.* Preparation, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of liposomes containing *Brucea javanica* oil[J/OL]. *AAPS PharmSciTech*, 2010, 11(2): 878-884[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2902340/>. DOI: 10.1208/s12249-010-9454-4.
- 罗卫民, 郭家龙, 刘华, 等. BJO 对 EC109 细胞增殖和凋亡作用的研究[J]. *中国社区医师*, 2015, 31(7): 6-7. DOI: 10.3969/j.issn.1007-614x.2015.7.2.
- YANG X Q, LU Q Y, XU Y F, *et al.* Clinicopathologic significance of CXCR4 expressions in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(1): 152787[2023-05-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31859114/>. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152787.
- GUAN H, PIAO H, QIAN Z Q, *et al.* 5-Hexanedione induces autophagic death of VSC4.1 cells via a PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(10): 1993-2005. DOI: 10.1039/c7mb00001d.
- QIU Z H, ZHANG W W, ZHANG H H, *et al.* *Brucea javanica* oil emulsion improves the effect of radiotherapy on esophageal cancer cells by inhibiting cyclin D1-CDK4/6 axis[J/OL]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(20): 2463-2472[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6543247/>. DOI: 10.3748/wjg.v25.i20.2463.
- HAMAMOTO Y, MURAKAMI K, KATO K, *et al.* Management of elderly patients with esophageal squamous cell cancer[J/OL]. *Jpn J Clin Oncol*, 2022, 52(8): 816-824[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9354502/>. DOI: 10.1093/jjco/hyac067.
- CHEN J X, CHEN S Q, YANG X B, *et al.* Efficacy and safety of *Brucea javanica* oil emulsion injection as adjuvant therapy for cancer: an overview of systematic reviews and meta-analyses[J/OL]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154141[2023-05-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35598523/>. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154141.
- CHEN K L, ZHU P F, CHEN W H, *et al.* Melatonin inhibits proliferation, migration, and invasion by inducing ROS-mediated apoptosis via suppression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in gallbladder cancer cells[J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(18): 22502-22515[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8507264/>. DOI: 10.18632/aging.203561.
- HUI B N, PAN S P, CHE S M, *et al.* Silencing UHRF1 enhances radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J/OL]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 4841-4852[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8232844/>. DOI: 10.2147/CMAR.S311192.
- YE L, ZHAO J F, WANG Y M, *et al.* *Brucea javanica* oil emulsion suppresses tumor growth in human cervical cancer cells through inhibition of the E6 oncogene and induction of apoptosis[J/OL]. *Transl Cancer Res*, 2020, 9(2): 918-929[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8797272/>. DOI: 10.21037/ter.2019.12.62.
- WANG W W, CHEN L X, ZHU W J, *et al.* miR-4486 reverses cisplatin-resistance of colon cancer cells via targeting ATG7 to inhibiting autophagy[J/OL]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6): 1465[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8561764/>. DOI: 10.3892/etm.2021.10900.
- NOGUCHI M, HIRATA N, TANAKA T, *et al.* Autophagy as a modulator of cell death machinery[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 517[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7343815/>. DOI: 10.1038/s41419-020-2724-5.

- [22] 朱湘亮, 潘频华. 鸦胆子油乳剂对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖、迁移和自噬的影响及机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2018, 43(11): 1202-1208. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2018.11.006.
- [23] LIAO H L, ZHANG L, LU S M, *et al.* KIF3C promotes proliferation, migration, and invasion in colorectal cancer via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J/OL]. *Front Genet*, 2022, 13: 848926[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9257096/>. DOI: 10.3389/fgene.2022.848926.
- [24] ZHU K R, WU Y Q, HE P, *et al.* PI3K/AKT/mTOR-targeted therapy for breast cancer[J]. *Cells*, 2022, 11(16): 2508[2023-05-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36010585/>. DOI: 10.3390/cells11162508.
- [25] XU W, WANG Z Q, ZHANG Z, *et al.* PIK3CB promotes oesophageal cancer proliferation through the PI3K/AKT/mTOR signalling axis[J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(9): 1399-1408. DOI: 10.1002/cbin.11847.
- [26] JIANG F Y, LI S, JIANG Y, *et al.* Fluorofenidone attenuates paraquat-induced pulmonary fibrosis by regulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and autophagy[J/OL]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 405[2023-05-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8025463/>. DOI: 10.3892/mmr.2021.12044.

[收稿日期] 2023-05-10

[修回日期] 2023-06-09

[本文编辑] 党瑞山, 沈志超