DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.01.018

小檗碱基于AMPK/mTOR通路对EC9706细胞能量代谢的影响

刘洋,陈星,周哲旭,刘娅茹,胡啸博,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 通过观察小檗碱对EC9706细胞能量代谢及相关通路的影响从而探究其机制。方法 常规培养细胞,MTT法筛药,选择15、30 μg/mL两个质量浓度,通过流式细胞术检测细胞周期、凋亡水平,能量代谢分析系统检测细胞糖酵解潜能及线粒体呼吸能力,蛋白质印迹实验探究细胞中p-AMPK/AMPK及下游p-mTOR/mTOR蛋白表达水平变化,通过荧光实时定量PCR(quantitative real-time PCR,qPCR)在基因水平上验证AMPK及下游mTOR的表达水平。结果 小檗碱能够明显抑制EC9706细胞增殖($P<0.01$),促进EC9706细胞凋亡($P<0.05$),与对照组相比,小檗碱加药组G0/G1期明显降低($P<0.05$),S期占比明显升高($P<0.01$)。小檗碱能够抑制EC9706细胞的糖酵解潜能及线粒体呼吸能力($P<0.01$)且具有浓度依赖性。小檗碱能够促进p-AMPK/AMPK($P<0.01$)并抑制p-mTOR/mTOR蛋白表达($P<0.05$)。在基因水平上,小檗碱促进了AMPK表达($P<0.05$),同时促进了mTOR的表达($P<0.01$)。结论 小檗碱可以通过能量代谢途径抑制食管癌EC9706细胞的增殖,促进食管癌细胞凋亡并阻碍其分裂。

关键词:小檗碱;能量代谢;AMPK/mTOR通路;增殖;周期;凋亡
中图分类号:R282.71 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)01-0097-07

Effect of Berberine on Energy Metabolism in EC9706 Cells Based on AMPK/mTOR Pathway

LIU Yang, CHEN Xing, ZHOU Zhexu, LIU Yaru, HU Xiaobo, CHEN Yulong
(Henan Key Laboratory of Signal Transduction, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China)

Abstract: *Objective* To investigate the mechanism of berberine on energy metabolism and related pathways in EC9706 cells. *Method* The cells were routinely cultured, MTT screened, and two mass concentrations of 15 μg/mL and 30 μg/mL were selected. The cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry, the glycolytic potential and mitochondrial respiratory capacity were detected by energy metabolism analysis system, and the changes in the expression of phosphorylated adenylate activated protein kinase(p-AMPK)/adenylate activated protein kinase(AMPK) and the downstream phosphorylated mammalian target of rapamycin(p-mTOR)/mammalian target of rapamycin(mTOR) proteins were explored by Western Blotting. The expression levels of AMPK and downstream mTOR were verified at the gene level by quantitative real-time PCR(qPCR). *Results* Berberine significantly inhibited the proliferation of EC9706 cells($P<0.01$) and promoted the apoptosis of EC9706 cells($P<0.05$). Compared with the control group, berberine and drug group showed a significant decrease in the G0/G1 phase($P<0.05$), and a significant increase in the proportion of S phase($P<0.01$). Berberine inhibited the glycolytic potentia and mitochondrial respiration of EC9706 cells($P<0.01$) in a concentration-dependent manner, and berberine promoted p-AMPK/AMPK($P<0.01$) and inhibited the expression of p-mTOR/mTOR protein($P<0.05$). At the gene level, berberine promoted AMPK expression($P<0.05$) as well as mTOR expression($P<0.01$). *Conclusion* Berberine can inhibit the proliferation of oesophageal cancer EC9706 cells through energy metabolic pathway, promote apoptosis of oesophageal cancer cells and hinder their division.

Keywords: berberine; energy metabolism; AMPK/mTOR pathway; proliferation; cycle; apoptosis

食管癌世界范围内居癌症发病第8位,是中国地区高发肿瘤之一,2020年中国新增食管癌死亡病例人数占全球死亡病例的50%以上,在中国发病率存在明显地区差异及性别差异[1]。发病主要以鳞癌为主[2],中国中北部为世界范围内食管鳞癌高发地区之一[3],近年来中国对食管鳞癌的研究进展产生了较大影响[4-5]。

食管癌中医的病因病机与痰、气、瘀、热相关[6],从经典验方到单味中药再到有效成分的研究都有一定的理论临床基础,亟待长足发展。

小檗碱作为一种广泛使用的生物活性剂已证实了对肿瘤的抑制作用[7],在微观水平对肿瘤细胞的研究有了明确进展。已证实小檗碱能够诱导肿瘤细胞凋亡、促进细胞周期停滞、触

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81873285,82074313,82274438)
作者简介:刘洋(1993-),女,河南洛阳人,博士在读,研究方向:肿瘤中医方证。
通讯作者:陈玉龙(1973-),男,河南平舆人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:肿瘤中医方证。E-mail:cyl72621@163.com。

发或者抑制细胞自噬[8]。能量代谢作为肿瘤相关热点方向被广泛研究[9],与食管癌患者生存预后及临床疗效具有显著相关性,有良好的临床应用前景[10]。本实验从细胞水平证明了小檗碱对食管癌 EC9706 细胞周期、凋亡、能量代谢及相关通路的影响。

1 材料

1.1 细胞

人食管鳞癌 EC9706 细胞由河南中医药大学分子生物实验中心提供。

1.2 药品与试剂

小檗碱购于成都乐天美医药有限公司,批号:DST-DY002801;二甲双胍,Sigma,批号:STBB0847V;兔单克隆抗体 P-AMPK,CST,货号:D4D6D;兔单克隆抗体 AMPK,CST,货号:D63G4;兔单克隆抗体 P-mTOR,CST,货号:D9C2;兔单克隆抗体 mTOR,CST,货号:7C10;兔单克隆抗体 β-Actin,CST,货号:13E5;XF 糖酵解测定试剂盒,Seahorse,批号:16671064;XF 线粒体压力测试试剂盒,Seahorse,批号:16814026;水化液,Agilent,货号:100840-100;基础检测培养基,批号:23217002;葡萄糖,批号:SLBW5196;L-谷氨酰胺,批号:1917006;丙酮酸钠,批号:SL-BX1167;Annexin V FITC/PI Apoptosis 凋亡试剂盒,联科生物,批号:A20455;Cell Cycle Staining Kit 细胞周期检测试剂盒,联科生物,批号:A21132,反转录试剂盒,日本 TOYOBO,批号:FSQ-101,2×Universal SYBR green,ABclonal,批号 962103G1433,TRIZOL,Ambion,批号:257407。

1.3 仪器

CO_2 培养箱,德国 Eppendorf;超净工作台,苏净集团安泰;荧光倒置显微镜,德国 Laica;低速离心机,美国 Thermo;高速台式离心机,德国 Eppendorf;酶标仪,美国 BIO-TE;FACS Vantage SE 型流式细胞仪,美国 BD;XFe96 能量代谢分析系统,美国安捷伦;垂直电泳槽、垂直湿转膜槽、凝胶成像扫描仪,美国 Bio-Rad;QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR 仪,美国 ThermoFisher。

2 方法

2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养 EC9706 细胞,置于 5% CO_2、37 ℃饱和湿度的培养箱中常规培养,48 h 换液,2~3 d 传代 1 次。

2.2 药物制备

用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)将小檗碱单体配制成质量浓度为 40 mg·mL^{-1}的药物悬液。用 DMEM 将二甲双胍配置成 1 mol·L^{-1}母液。

2.3 MTT 法检测小檗碱对 EC9706 细胞增殖的影响

取对数生长期 EC9706 细胞,在 96 孔板中加入每孔 200 μL、1×10^4 个细胞的细胞悬液。24 h 后分别加入 200 μL 一定浓度(0、12.5、25、50、75、100、150 μg·mL^{-1})的小檗碱溶液,于 CO_2 培养箱中 37 ℃孵育 48 h 后 MTT 法,酶标仪检测 490 nm 吸收光值(OD 值),计算各组细胞抑制率进行统计学分析。

抑制率:抑制率(%)=(对照组 OD 值-给药组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。

2.4 流式细胞术检测小檗碱对 EC9706 细胞凋亡的影响

取对数生长期 EC9706 细胞以每孔 3×10^5 的密度接种于 6 孔板中,于 CO_2 培养箱中培养 24 h 后弃上清,分别加入含浓度为 15、30 μg·mL^{-1}小檗碱的完培,继续培养 48 h,使用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,200 μL 血清终止消化,预冷的 PBS 洗涤 2 次。使用 500 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μL An-nexin V-FITC 及 10 μL PI 染色,混匀后避光室温孵育 10 min 后流式细胞仪检测细胞凋亡。

2.5 流式细胞术检测小檗碱对 EC9706 细胞周期的影响

细胞培养同 2.4,收集上清,使用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,200 μL 血清终止消化,常规离心细胞,预冷的 PBS 洗 2 次。加入 1 mL DNA Staining Solution 和 10 μL Permeabilization Solution,涡旋振荡 5~10 s 混匀。室温避光孵育 30 min 后流式细胞仪检测细胞周期。

2.6 XFe 96 能量代谢分析系统检测小檗碱及二甲双胍对 EC9706 细胞糖酵解和线粒体呼吸能力的影响

取对数生长期 EC9706 细胞以每孔 80 μL,8×10^4 个细胞的密度接种于 SeahorseXF96 细胞培养板中,于 CO_2 培养箱中培养 24 h 后分别加入含有浓度为 15 μg·mL^{-1}和 30 μg·mL^{-1}小檗碱的完培,于 37 ℃ CO_2 培养箱中培养 48 h 后在能量代谢分析系统检测细胞糖酵解能力和线粒体呼吸能力。上机前一天水化探针,放入 37 ℃恒温培养箱中,上机前 2 h,换水化液入探针板中,放入 37 ℃恒温培养箱备用,上机前 1 h 将细胞培养板用检测培养基清洗两次,分别配置检测糖酵解速率和线粒体压力试剂盒中包含的药品,按次序加入探针板微孔中,上机检测细胞糖酵解潜能以及备用呼吸能力。

2.7 蛋白免疫印迹法检测小檗碱对 EC9706 细胞 P-AMPK、AMPK、P-mTOR、mTOR 表达的影响

取对数生长期 EC9706 细胞以每孔 3×10^5 的密度接种于 6 孔板中,于 CO_2 培养箱中培养 24 h 后,加入含浓度为 15、30 μg·mL^{-1}小檗碱、20 mmol·L^{-1}二甲双胍的完培,48 h 后置于冰上加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,将样本进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转模,封闭,分别加入一抗,P-AMPK(1∶1000)、AMPK(1∶1000)、P-mTOR(1∶1000)、mTOR(1∶1000)、β-actin(1∶1000)洗膜后加入对应二抗稀释液(1∶10 000),凝胶成像系统显影,应用 Image J 软件分析图像灰度值。

2.8 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)法检测小檗碱对 EC9706 细胞 AMPK、mTOR 表达水平的影响

细胞培养同 2.4,TRIzol 法提取各组样本总 RNA,根据反转录试剂盒操作步骤将 RNA 反转录为 cDNA,每组样本每个待测基因设 3 个附孔,按照 universal SYBR green fast qPCR Mix 试剂说明书,设定 95 ℃ 3 min,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,为 1 个循环,共 40 个循环,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析相对表达定量对各基因进行检测,引物序列见表 1,由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 24.0 进行数据分析,若数据符合正态分布及方差齐性,采用单因素方差分析,组间比较用 LSD 检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 进行描述统计。若符合正态分布但方差不齐,用 Dunnett T3 检验。若不符合正态分布,用非参数检验。$P < 0.05$ 表示数据有统计学意义。

表 1 引物序列

引物	序列(5′-3′)	长度/(bp)
AMPK	F:TTGAAACCTGAAAATGTCCTGCT	113
	R:GGTGAGCCACAACTTGTTCTT	
mTOR	F:TCCGAGAGATGAGTCAAGAGG	141
	R:CACCTTCCACTCCTATGAGGC	
β-actin	F:ATTGCCGACAGGATGCAGAA	150
	R:GCTGATCCACATCTGCTGGAA	

3 结果

3.1 小檗碱对 EC9706 细胞活性的影响

MTT 法检测,通过 SPSS 24.0 对数据进行统计学分析,与对照组相比,小檗碱加药组对 EC9706 增殖有明显的抑制作用($P<0.01$),且随浓度增高抑制率上升。取 IC_{30} 15 μg·mL^{-1}、IC_{50} 30 μg·mL^{-1}进行后续试验。见表 2。

表 2 小檗碱对 EC9706 细胞活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	浓度/(μg·mL^{-1})	抑制率/(%)
对照组	3	0	0
小檗碱加药组	3	12.5	27.70±6.76**
	3	25	50.25±9.02**
	3	50	61.98±2.40**
	3	75	69.87±0.84**
	3	100	76.85±2.14**
	3	150	95.47±4.21**

注:**与对照组比较,$P<0.01$。

3.2 流式细胞仪检测小檗碱对 EC9706 细胞凋亡的影响

与对照组比较,小檗碱加药组明显诱导了细胞凋亡($P<0.05$),15 μg·mL^{-1}与 30 μg·mL^{-1}浓度的小檗碱对细胞凋亡的影响差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3、插页Ⅻ图 1。

3.3 流式细胞仪检测小檗碱对 EC9706 细胞周期的影响

与对照组比较,小檗碱加药组 G0/G1($P<0.05$)以及 S 期细胞明显增加($P<0.01$),小檗碱不同浓度之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4、插页Ⅻ图 2。

表 3 小檗碱对 EC9706 细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	浓度/(μg·mL^{-1})	凋亡率/(%)
对照组	3	-	4.46±0.57
小檗碱低浓度组	3	15	11.91±1.95*
小檗碱高浓度组	3	30	18.38±2.76*△

注:*与对照组比较,$P<0.05$;△与小檗碱低浓度组比较,$P<0.05$。

表 4 小檗碱对 EC9706 细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	占比/(%)		
		G0/G1 期	S 期	G2/M 期
对照组	3	65.26±4.58	18.93±0.33	15.81±4.69
小檗碱低浓度组	3	58.86±1.66	30.84±3.66**	10.30±3.12
小檗碱高浓度组	3	54.57±4.34*	28.27±2.59*	17.16±6.87

注:*与对照组比较,$P<0.05$;**与对照组比较,$P<0.01$。

3.4 小檗碱对 EC9706 细胞能量代谢的影响

3.4.1 小檗碱对 EC9706 细胞糖酵解速率的影响 与对照组相比,小檗碱 15 μg·mL^{-1}与 30 μg·mL^{-1}浓度组的基础糖酵解、代偿糖酵解、线粒体代谢率与基础糖酵解比值、糖酵解潜能均降低($P<0.01$),小檗碱不同浓度给药组在代偿糖酵解能力上差异存在显著统计学意义($P<0.01$)。见表 5、插页Ⅻ图 3。

3.4.2 小檗碱对 EC9706 细胞线粒体压力的影响 与对照组相比,小檗碱 15 μg·mL^{-1}与 30 μg·mL^{-1}浓度组的非线粒体耗氧、基础呼吸、备用呼吸能力、最大耗氧量、ATP 合成耗氧量均降低($P<0.01$),且小檗碱不同浓度给药组之间差异存在统计学意义($P<0.05$)。见表 6、插页Ⅻ图 4。

3.5 小檗碱对 EC9706 细胞 mTOR、p-mTOR、AMPK、p-AMPK 蛋白表达的影响

与对照组比较,小檗碱低、高浓度组 AMPK、p-AMPK 蛋白表达水平显著升高,mTOR、p-mTOR、表达水平降低。见表 7、图 5。

表 5 小檗碱对 EC9706 细胞糖酵解的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	浓度/(μg·mL^{-1})	基础糖酵解/(pmol·min^{-1})	代偿性糖酵解/(pmol·min^{-1})	线粒体代谢率与基础糖酵解比值/(%)	糖酵解潜能/(pmol·min^{-1})
对照组	3	-	1 045.67±73.14	1 342.08±77.53	0.080±0.010	209.65±7.87
小檗碱低浓度组	3	15	977.79±31.13	1 041.05±40.68**	0.010±0.002**	51.21±11.54**
小檗碱高浓度组	3	30	496.30±70.79**△△	511.39±78.99**△△	0.006±0.002**△△	11.90±8.54**△△

注:**与对照组比较,$P<0.01$;△△与小檗碱低浓度组比较,$P<0.01$。

表 6 小檗碱对 EC9706 细胞线粒体压力的影响($\bar{x}\pm s$) 单位:pmol·min^{-1}

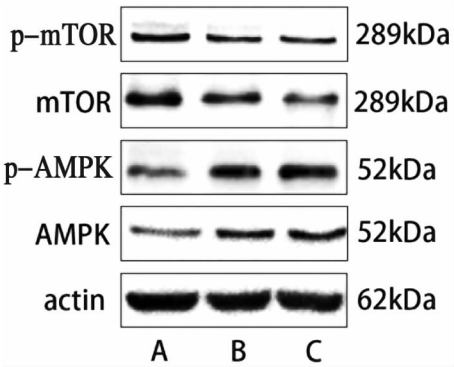
组别	n	浓度/(μg·mL^{-1})	非线粒体耗氧	基础呼吸	备用呼吸能力	最大耗氧量	ATP 合成耗氧量
对照组	3	-	315.29±10.68	137.08±10.94	32.25±6.05	169.33±14.36	18.31±3.39
小檗碱低浓度组	3	15	130.27±1.15**	21.58±4.24**	13.43±1.95**	35.00±6.12**	0.74±0.68**
小檗碱高浓度组	3	30	37.83±19.07**△	4.79±2.09**△	0.70±0.39**△	5.49±2.21**△	1.30±0.72**△

注:**与对照组比较,$P<0.01$;△与小檗碱低浓度组比较,$P<0.05$。

表 7 小檗碱对 EC9706 细胞 p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	浓度/(μg·mL^{-1})	p-AMPK	AMPK	p-mTOR	mTOR
对照组	3	-	1	1	1	1
小檗碱低浓度组	3	15	2.37±0.60**	2.33±0.65**	0.640±0.13*	0.85±0.08
小檗碱高浓度组	3	30	2.34±0.40**	2.35±0.39**	0.666±0.18*	0.44±0.22**

注:*与对照组比较,$P<0.05$,**与对照组比较,$P<0.01$。



注:A 对照组;B 小檗碱低浓度组;C 小檗碱高浓度组。

图 5 小檗碱对 EC9706 细胞 mTOR、p-mTOR、AMPK、p-AMPK 蛋白表达的影响

3.6 小檗碱对 EC9706 细胞 AMPK、mTOR 基因表达的影响

与对照组比较,小檗碱加药组 AMPK 及 mTOR 基因表达均显著增高。见表 8。

表 8 小檗碱对 EC9706 细胞 AMPK、mTOR 基因表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	浓度/($\mu g \cdot mL^{-1}$)	AMPK	mTOR
对照组	3	-	1	1
小檗碱低浓度组	3	15	1.19 ± 0.08	5.48 ± 0.89 *
小檗碱高浓度组	3	30	1.76 ± 0.14 *	7.61 ± 1.43 * *

注:* 与对照组相比,$P<0.05$;* * 与对照组相比,$P<0.01$。

4 讨论

噎膈为“风、痨、鼓、膈”四大顽疾之一,最早见于《素问·至真要大论篇》曰:“食饮不下,鬲咽不通”,《素问·评热病论篇》,描述其症状表现为“食不下”,其辨证分型不乏阴津液亏虚,夹燥夹火,阴阳失调之象[11]。对噎膈的认识从病因病机到理法方药发展出了完整的辨证治疗体系。小檗碱为黄连主要成分,黄连是泻心汤重要药物组成,为历代医家治疗噎膈的常用方剂[12-14],常为半夏黄连合用,寒热并用,共奏辛开苦降之功,多见于痰热、热痞等证型,与行气药同用可恢复脾胃气机升降。

小檗碱作为抗肿瘤有效生物成分,在动物模型以及细胞实验中得到了充分证实[15]。有研究表明小檗碱可能通过调节细胞周期和细胞自噬,促进细胞凋亡来抑制细胞增殖[16]。通过抑制上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT),影响细胞迁移通路相关蛋白的表达来抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。此外,随着 miRNA 的研究不断深入,发现小檗碱通过与其相互作用能够抑制肿瘤细胞端粒酶活性从而抑制肿瘤细胞增殖[17]。

本实验选取 EC9706 细胞探究小檗碱对食管癌的影响,通过 MTT 法发现小檗碱对 EC9706 细胞增殖有抑制作用,设置浓度梯度证实了其有明确的剂量依赖性,其差异存在统计学意义,说明小檗碱是 EC9706 细胞生长的有效抑制剂。与对照组相比,小檗碱 15、30 $\mu g \cdot mL$ 浓度细胞凋亡率明显高于对照组,表明小檗碱可促进细胞凋亡,且随着药物浓度增加,细胞凋亡率增高,凋亡是肿瘤细胞死亡的主要机制,与对照组比较,小檗碱能够促进食管癌 EC9706 细胞凋亡,效果呈浓度依赖性,差异具有统计学意义。

癌症是一组细胞持续过度分裂的疾病[18]。传统认为癌细胞的周期相关位点发生了突变使得其不受细胞周期进程的控制,通过干扰细胞周期控制的癌症相关突变,使其持续在细胞周期中循环,模拟了癌细胞的旺盛分裂。然而近期研究发现,癌细胞退出周期进程的相关基因损害导致了其持续不断地分裂。深入研究肿瘤细胞周期具有广泛的临床前景。有研究表明细胞周期调节与细胞的合成代谢和分解代谢相关,对 CDK 相关的周期蛋白及抑制蛋白的研究证实了细胞周期调节因子可以控制维持细胞存活所需的代谢修饰,参与细胞周期相关分子和糖酵解、氧化磷酸化、线粒体调控之间的多重联系[19-20]。与常规培养的 EC9706 相比,小檗碱加药组 S 期细胞比例增高,G0/G1 期细胞比例降低,且差异具有统计学意义,说明细胞分裂阻滞在 S 期,小檗碱通过抑制 EC9706 细胞周期从而抑制细胞增殖。通过流式细胞术检测细胞凋亡,发现小檗碱能够通过诱导细胞凋亡抑制细胞增殖,且具有浓度依赖性,证实小檗碱能够抑制食管癌 EC9706 细胞分裂、促进其凋亡。

我们采用了 Seahorse 能量代谢分析仪器验证了小檗碱对 EC9706 细胞能量代谢的影响,加入相关试剂后检测细胞耗氧率(O_2 consumption rate,OCR)和胞外酸化率(extracellular acidification rate,ECAR)来表征细胞能量代谢。OCR 研究线粒体氧化磷酸化功能时先测定正常状态下的基础呼吸,通过加入寡霉素抑制 ATP 合成酶,OCR 显著下降,仅余下质子渗漏造成的耗氧率。降低部分即为氧化磷酸化的耗氧率。加入解偶联剂线粒体氧化磷酸化特异性抑制剂羰基氰-对-三氟甲氧基苯腙(carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone,FCCP)后,电子传递失去质子梯度的约束,以最大速率进行。所以 OCR 急剧升高,达到最大耗氧量。此值与基础呼吸之差,称为呼吸潜力。最后加入电子传递抑制剂鱼藤酮和抗霉素 A 混合物完全抑制电子传递,耗氧率降至最低。细胞的糖酵解潜能是先通过细胞耗氧量计算二氧化碳产出,除去线粒体酸化对细胞 pH 值的影响,计算出细胞糖酵解速率。加入寡霉素后,线粒体呼吸被抑制,完全采用乳酸发酵供能,产酸增加,细胞达到糖酵解最大容量,与基础糖酵解以及线粒体氧化磷酸化之差代表了细胞的酵解能力。最后加入 2-脱氧-D-葡萄糖(2-deoxy-D-glucose,2-DG),作为己糖激酶的竞争性抑制剂阻断糖酵解,曲线回归基础值。同时测定小檗碱给药组对于细胞的糖酵解潜能以及线粒体呼吸效率均有明显抑制作用,且具有明显的浓度依赖性。肿瘤细胞通过有氧糖酵解为其供能,促癌信号加速了细胞的糖酵解活动,肿瘤细胞的糖酵解能力一定程度上反映了细胞的恶性程度[21]。有研究表明,通过回顾生物信息线粒体相关研究的最新进展,发现线粒体核糖体控制的氧化磷酸化相关蛋白与癌症患者预后密切相关,或能作为潜在的肿瘤标志物[22]。

AMPK 是细胞能量代谢相关的核心分子,当细胞的 ATP 水平下降、ADP 以及 AMP 水平上升时,细胞内的 AMPK 被激活促进 ATP 的产生,同时抑制其消耗,维持了细胞内能量代谢的平衡。AMPK 激活是通过它的 α 亚基上的 T172 位点发生磷酸化介导的。这种发生磷酸化的 AMPK 被称作 p-AMPK。AMPK 能够促进葡萄糖的摄取和利用,促进脂肪酸的氧化代谢,以及体内多种蛋白质的降解,当细胞内能量代谢水平下降

时,被激活的 AMPK 通过上述途径促进能量的生成,抑制其降解从而维持能量平衡。除了 AMPK 的经典途径,最近研究中发现了包括 AMPK 感知葡萄糖、糖原或脂肪酸可用性的途径以及可以感知溶酶体和核 DNA 的损伤[23]。AMPK 下游 mTOR 与 AMPK 同为细胞能量代谢的核心分子,mTOR 信号转导异常与代谢紊乱有关[24],mTOR 参与了细胞增殖、代谢调节、生长、增殖、分化等多种过程,氨基酸、脂肪酸、脂质、核苷酸以及葡萄糖的代谢均受 mTOR 调节[25]。mTOR 的活性主要由 mTORC1 和 mTORC2 两个复合物调节,其活性受到多种信号因子的影响,包括氧浓度、细胞营养状态以及细胞应激反应等。当细胞中 ATP 产生降低的时候,会激活能量响应调节子 AMPK,AMPK 可以磷酸化并激活复合物 TSC 从而间接抑制 mTORC1。同时 AMPK 也可以直接磷酸化 mTORC1 的 Raptor 来直接抑制 mTORC1,相反的是,mTORC1 直接磷酸化 AMPK 的催化亚基 a1 或 a2,减少 AMPK 活化环中的 Thr172 磷酸化,限制 AMPK 活性,AMPK 和 mTORC1 是相互拮抗的[26]。小檗碱能够抑制细胞的能量代谢,使 AMPK 过表达且激活其磷酸化位点高表达 p-AMPK,从而抑制下游 mTOR 分子及其磷酸化,减少细胞的能量消耗[27]。然而,PCR 结果显示 AMPK 以及下游 mTOR mRNA 表达量均增高,或由于上游 AMPK mRNA 及蛋白过表达后导致下游 mTOR 蛋白及其磷酸化蛋白表达量降低,从而导致 mTOR mRNA 产生了负反馈调节。

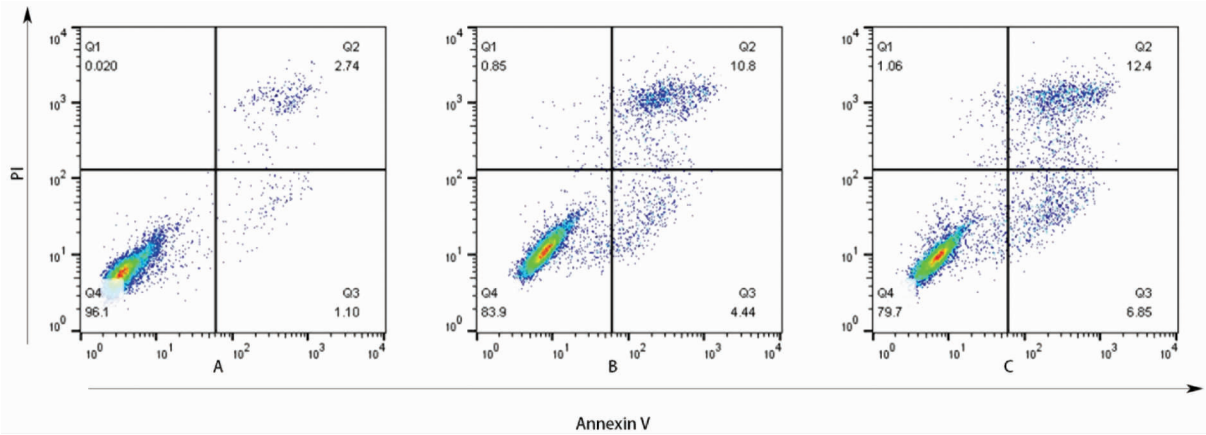
综上所述,小檗碱能够抑制 EC9706 细胞的增殖,诱导细胞凋亡,将细胞周期阻滞于 S 期,并且抑制细胞的能量代谢,作用呈现浓度依赖性,小檗碱可以通过 AMPK/mTOR 途径抑制肿瘤细胞,具体分子机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-13.
[2] 赫捷, 陈万青, 李兆申, 等. 中国食管癌筛查与早诊早治指南[J]. 中国肿瘤, 2022, 31(6): 401-436.
[3] THRIFT A P. Global burden and epidemiology of Barrett oesophagus and oesophageal cancer[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(6): 432-443.
[4] ZHANG Z, LENG Z, FANG K, et al. Global research trend of esophageal squamous cell carcinoma from 2012 to 2022: a bibliometric analysis[J]. Front Oncol, 2022, 12: 977935.
[5] LU Z H, CHEN Y, LIU D, et al. The landscape of cancer research and cancer care in China[J]. Nat Med, 2023, 29(12): 3022-3032.
[6] 苏菲,贾立群,程志强,等.中医药干预食管癌前病变转癌相关研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(9):242-247.
[7] RAUF A, ABU-IZNEID T, KHALIL A A, et al. Berberine as a potential anticancer agent: a comprehensive review[J]. Molecules, 2021, 26(23): 7368.
[8] SAMADI P, SARVARIAN P, GHOLIPOUR E, et al. Berberine: a novel therapeutic strategy for cancer[J]. IUBMB Life, 2020, 72(10): 2065-2079.
[9] FINLEY L W S. What is cancer metabolism? [J]. Cell, 2023, 186(8): 1670-1688.
[10] ZHENG W F, CHEN C Y, YU J H, et al. An energy metabolism-based eight-gene signature correlates with the clinical outcome of esophagus carcinoma[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 345.
[11] 陈玉龙, 张瑞, 郑玉玲. 食管癌辨治学术思想及经验撷英[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(2): 835-838.
[12] 李佳. 基于数据挖掘的噎膈病病因病机及用药规律研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
[13] 刘锋.《伤寒论》方剂对食管癌 TE-1、EC-1、EC109、EC9706 细胞生物学特性影响的研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2018.
[14] 陈心恬, 高静东. 基于数据挖掘技术及医案分析的叶天士治噎膈用药规律研究[J]. 国际中医中药杂志, 2020, 42(5): 481-485.
[15] LIU H T, ZHANG Q, LOU Q Q, et al. Differential analysis of lncRNA, miRNA and mRNA expression profiles and the prognostic value of lncRNA in esophageal cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2020, 26(2): 1029-1039.
[16] WANG Y, LIU Y F, DU X Y, et al. The anti-cancer mechanisms of berberine: a review[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 695-702.
[17] XIONG R G, HUANG S Y, WU S X, et al. Anticancer effects and mechanisms of berberine from medicinal herbs: an update review[J]. Molecules, 2022, 27(14): 4523.
[18] MATTHEWS H K, BERTOLI C, DE BRUIN R A M. Cell cycle control in cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(1): 74-88.
[19] LEAL-ESTEBAN LUCIA C, FAJAS L L. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 2020, 1866(5): 165715.
[20] HSU C C, PENG D, CAI Z, et al. AMPK signaling and its targeting in cancer progression and treatment[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 52-68.
[21] PAUL S, GHOSH S, KUMAR S. Tumor glycolysis, an essential sweet tooth of tumor cells[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86(pt 3): 1216-1230.
[22] BAO S, WANG X, LI M, et al. Potential of mitochondrial ribosomal genes as cancer biomarkers demonstrated by bioinformatics results[J]. Front Oncol, 2022, 12: 835549.
[23] STEINBERG G R, HARDIE D G. New insights into activation and function of the AMPK[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(4): 255-272.
[24] BASNET R, BAHADUR BASNET B, GUPTA R, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway-a potential target for cancer intervention: a short overview[J]. Curr Mol Pharmacol, 2024, 17(1): e310323215268.
[25] FAN H, WU Y, YU S, et al. Critical role of mTOR in regulating aerobic glycolysis in carcinogenesis (Review)[J]. Int J Oncol, 2021, 58(1): 9-19.
[26] BATTAGLIONI S, BENJAMIN D, WÄLCHLI M, et al. mTOR substrate phosphorylation in growth control[J]. Cell, 2022, 185(11): 1814-1836.
[27] XU J, JI J, YAN X H. Cross-talk between AMPK and mTOR in regulating energy balance[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2012, 52(5): 373-381.

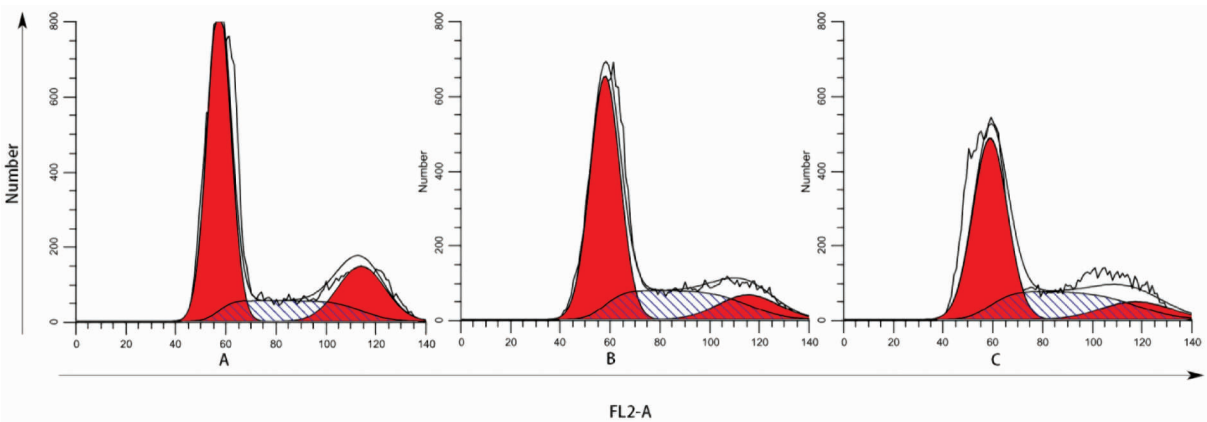
小檗碱基于 AMPK/mTOR 通路对 EC9706 细胞能量代谢的影响

（正文见 97－101 页）



注：A 对照组；B 小檗碱低浓度组；C 小檗碱高浓度组。

图 1　小檗碱对 EC9706 细胞凋亡的影响



注：A 对照组；B 小檗碱低浓度组；C 小檗碱高浓度组。

图 2　小檗碱对 EC9706 细胞周期的影响

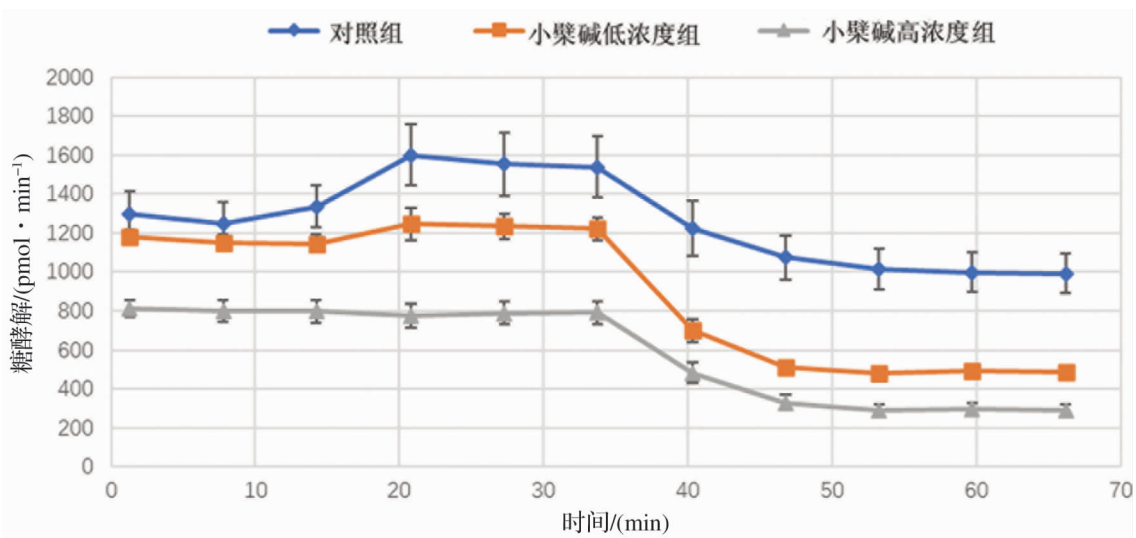


图 3　小檗碱对 EC9706 细胞糖酵解的影响

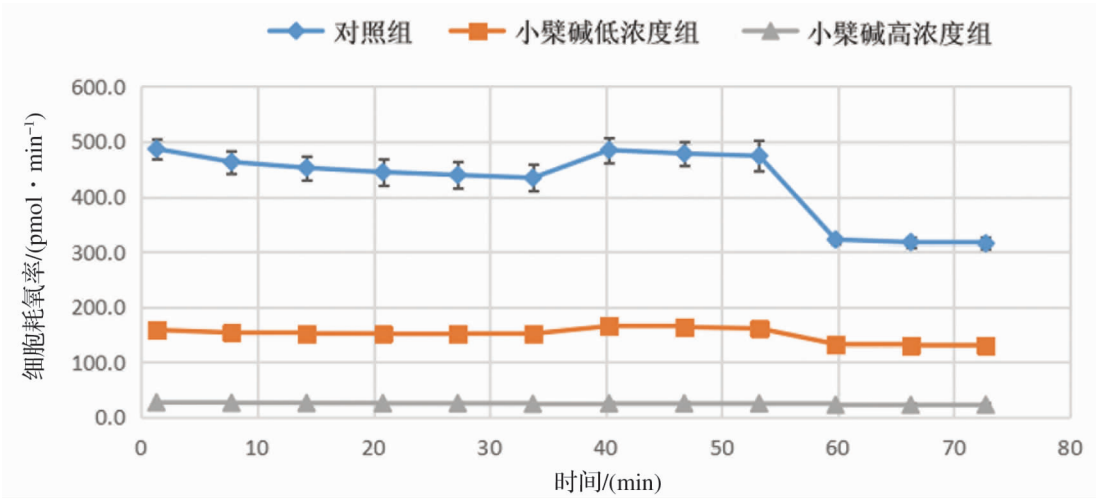
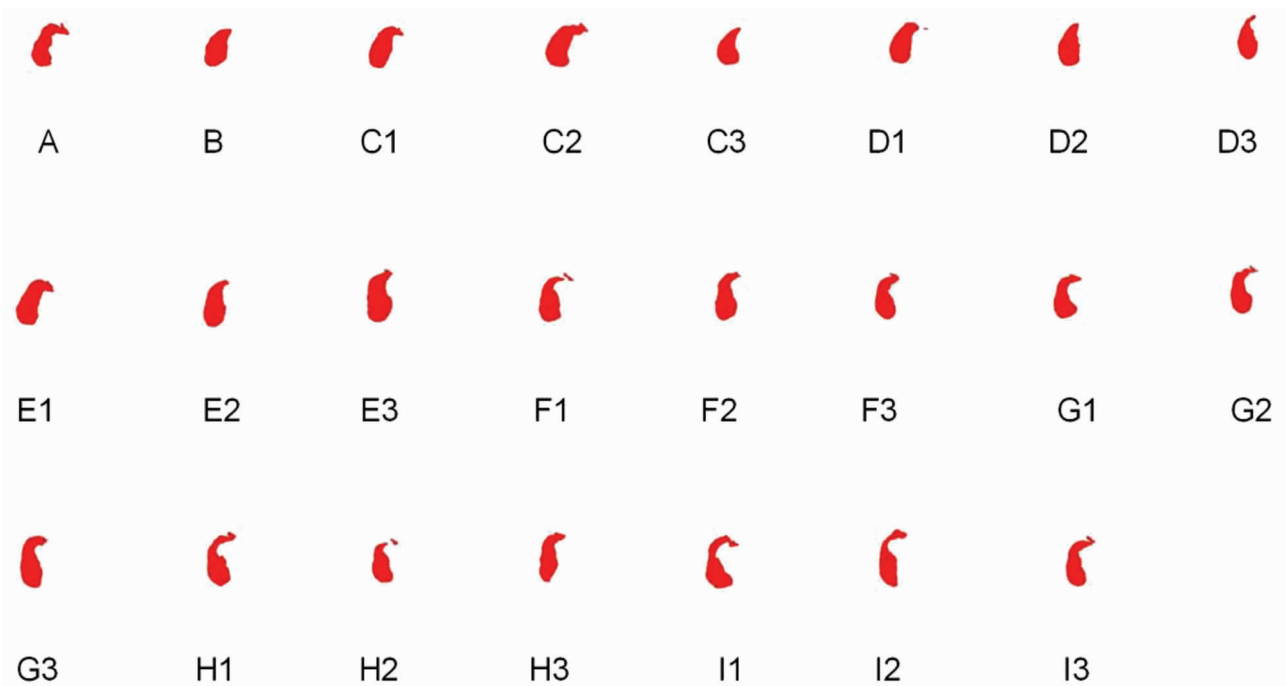


图 4 小檗碱对 EC9706 细胞线粒体压力的影响

不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼模型的急性毒性及肝肾损伤

(正文见 247 – 252 页)



注:A. 空白组;B. 对乙酰氨基酚组;C1 ~ C3. sp 低、中、高剂量组(0.012、0.024、0.030 g · L^{-1});D1 ~ D3. pz1 低、中、高剂量组(0.014、0.025、0.033 g · L^{-1});E1 ~ E3. pz2 低、中、高剂量组(0.015、0.033、0.040 g · L^{-1});F1 ~ F3. pz3 低、中、高剂量组(0.016、0.038、0.047 g · L^{-1});G1 ~ G3. pz4 低、中、高剂量组(0.024、0.036、0.041 g · L^{-1});H1 ~ H3. pz5 低、中、高剂量组(0.024、0.036、0.043 g · L^{-1});I1 ~ I3. pz6 低、中、高剂量组(0.025、0.039、0.046 g · L^{-1})。

图 2 不同炮制程度栀子水提物对斑马鱼肝脏荧光面积的影响