DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.04.021

基于 miR－1/HIF－1α 轴研究六君子汤乙酸乙酯提取物调控食管癌细胞 TE－1 能量代谢的作用机制

陈星,周哲旭,尚艺婉,刘洋,刘娅茹,胡啸博,菅佳宁,肖小乔,陈玉龙
(河南中医药大学,河南省中医方证信号传导重点实验室,河南 郑州 450046)

摘要:目的 探索六君子汤乙酸乙酯提取物(EAELD)能否通过 miR－1/HIF－1α 轴调控食管癌细胞 TE－1 的能量代谢及其分子机制。方法 前期实验已建立稳定转染阻滞 miR－1 表达细胞株(IN)及空白对照(NC),采用 MTT 法得到 EAELD 对 NC 的半数抑制浓度(IC_{50})及 30% 抑制浓度(IC_{30}),将其作为六高、六低浓度分别作用于 IN 与 NC 进行对比。实时荧光定量 PCR(RT－qPCR)法检测 EAELD 对于 TE－1 细胞 miR－1、HIF－1α mRNA 的影响。双荧光素酶基因报告实验验证 miR－1、HIF－1α 靶向关系。然后将实验分组为 NC 组、六低组、六高组、IN＋六低组、IN＋六高组,Seahorse 能量代谢分析系统检测线粒体压力与糖酵解速率,蛋白免疫印迹法(WB)检测能量代谢相关分子蛋白表达水平变化。结果 MTT 结果显示 EAELD 能够显著抑制 NC 增殖能力,呈浓度梯度依赖,选取 20 μg/mL(IC_{30})、40 μg/mL(IC_{50})为低、高浓度组。RT－qPCR 结果显示 EAELD 高浓度组显著促进 miR－1 的基因表达($P<0.05$),HIF－1α 有下降趋势,差异无统计学意义。双荧光素酶基因报告实验显示与野生型(WT)＋阴性对照(mimics NC)组相比,WT＋mimics 荧光强度明显下降($P<0.05$),与突变型(MUT)＋ 阴性对照(mimics NC)组相比,MUT＋mimics 荧光强度无明显差别。将高、低浓度 EAELD 作用于 IN 时,MTT 结果显示与 NC 相比,EAELD 对于 IN 的抑制作用显著降低($P<0.05$)。Seahorse 能量代谢结果显示与 NC 组相比,EAELD 高、低浓度组均可以抑制线粒体耗氧与糖酵解的比值($P<0.01$,$P<0.05$)、糖酵解潜能($P<0.01$)、基础呼吸值、质子漏耗氧($P<0.01$,$P<0.05$)、线粒体最大耗氧能力、备用呼吸能力($P<0.01$),高浓度组可以抑制基础糖酵解、补偿糖酵解、非线粒体耗氧、ATP 合成耗氧($P<0.01$)。与 NC＋六低组相比,IN＋六低组的基础糖酵解、线粒体与基础糖酵解的比值、糖酵解潜能($P<0.05$)、ATP 合成耗氧($P<0.01$)显著升高;与 NC＋六高组相比,IN＋六高基础糖酵解、补偿糖酵解($P<0.05$)、基础呼吸能力、质子漏耗氧、线粒体最大耗氧量、非线粒体耗氧显著升高($P<0.01$)。WB 结果显示与 NC 相比,EAELD 高、低浓度组可以显著降低 HK2($P<0.01$)、GLUT1($P<0.05$、$P<0.01$)、MCT1($P<0.01$、$P<0.05$)蛋白相对表达量,高浓度组可以显著抑制 PKM2($P<0.05$)、MCT2、MCT4($P<0.01$)的蛋白相对表达量;与 NC＋六低组相比,IN＋六低组 HK2、GLUT1、PKM2($P<0.01$)、p－PKM2、MCT1、MCT2($P<0.05$)的表达明显升高,与 NC＋六高组相比,IN＋六高组可以显著促进 HK2、GLUT1、PKM2、MCT4 的表达($P<0.05$)。结论 六君子汤乙酸乙酯提取物可以通过下调能量代谢相关分子 GLUT1、PKM2、p－PKM2、HK2、MCT1、MCT2、MCT4 的蛋白表达抑制食管癌细胞 TE－1 的能量代谢,其部分机制与 miR－1/HIF－1α 轴有关。

关键词:六君子汤乙酸乙酯提取物;食管癌;能量代谢;miR－1/HIF－1α 轴;分子机制
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)04-0133-08

Mechanism of Ethyl Acetate Extract of Liujunzi Decoction(六君子汤) Regulating Energy Metabolism in Esophageal Cancer TE－1 Cells Based on miR－1/HIF－1α Axis

CHEN Xing,ZHOU Zhexu,SHANG Yiwan,LIU Yang,LIU Yaru,HU Xiaobo,JIAN Jianing,XIAO Xiaoqiao,CHEN Yulong
(Henan University of Chinese Medicine,Henan Provincial Key Laboratory of Prescription and Syndrome Signal Transduction, Zhengzhou 450046,Henan,China)

Abstract:*Objective* To explore whether ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction(EAELD) can regulate the energy metabolism of TE－1 of esophageal cancer cells via the microRNA－1(miR－1)/hypoxia inducible factor－1α(HIF－1α) axis. *Methods* Stable transfection blocking miR－1 expression cell lines(miR－1 inhibitor,IN) and blank controls(miR－1 NC,NC) have been established in the preliminary experiments. The half maximal inhibitory concentration(IC_{50}) and 30% inhibitory concentration(IC_{30}) of EAELD on NC were obtained using MTT assay,and were used as the Liujunzi Decoction high and low concentrations to compare their effects on IN and NC,respectively. The effect of EAELD on miR－1 and HIF－1α mRNA in TE－1 cells was measured by quantitative real－time PCR(RT－qPCR). Dual－luciferase gene reporter assay was used to validate the targe-

基金项目:国家自然科学基金项目(82074313)
作者简介:陈星(1996－),女,河南新乡人,硕士在读,研究方向:肿瘤的病机与防治。
通讯作者:陈玉龙(1972－),男,河南平舆人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治肿瘤。E-mail:cyl72621@163.com。

ting relationship of miR - 1 and HIF - 1α. Then the experiments were divided into NC, Liujunzi Decoction low concentration, Liujunzi Decoction high concentration, IN + Liujunzi Decoction low concentration and IN + Liujunzi Decoction high concentration groups. Seahorse energy metabolism analysis system detected the mitochondrial pressure and glycolysis rate, and the protein expression level was detected by Western Blot. *Results* MTT results showed that EAELD could significantly inhibit the proliferation of NC in a concentration gradient dependent manner. The low and high concentration groups were 20 μg/mL(IC_{30}) and 40 μg/mL(IC_{50}), respectively. The RT - qPCR results showed that the EAELD high concentration group significantly promoted the gene expression of miR - 1 ($P<0.05$) and HIF - 1α showed a downward trend, without statistically significant difference. Dual - luciferase gene reporter assay showed that the fluorescence intensity of wild type(WT) + mimics group was significantly lower than that of WT + negative control(mimics NC) group ($P<0.05$), and there was no significant difference in the fluorescence intensity of mutant(MUT) + mimics group compared with that of MUT + mimics NC group. When high and low concentrations of EAELD were applied to IN, the MTT results showed that compared with that of NC group, the inhibitory effect of EAELD on IN group was significantly reduced ($P<0.05$). Seahorse energy metabolism results showed that compared with those of NC group, the ratio of mitochondrial oxygen consumption to glycolysis ($P<0.01$, $P<0.05$), glycolytic potential ($P<0.01$), basal respiration value, proton leakage oxygen consumption ($P<0.01$, $P<0.05$), proton leakage oxygen consumption ($P<0.01$, $P<0.05$), mitochondrial maximum oxygen consumption capacity and spare respiratory capacity ($P<0.01$) were inhibited in the high and low concentration groups of Liujunzi Decoction. The high concentration group could inhibit basal glycolysis, compensate glycolysis, non - mitochondrial oxygen consumption and ATP synthesis oxygen consumption ($P<0.01$). Compared with those of NC + Liujunzi Decoction low concentration group, basal glycolysis, mitochondrial to basal glycolysis ratio, glycolytic potential ($P<0.05$) and oxygen consumption for ATP synthesis ($P<0.01$) were significantly increased in IN + Liujunzi Decoction low concentration group. Compared with those of NC + Liujunzi Decoction high concentration group, basal glycolysis, compensatory glycolysis ($P<0.05$), basal respiratory capacity, proton leakage oxygen consumption, maximum mitochondrial oxygen consumption and non - mitochondrial oxygen consumption ($P<0.01$) were significantly increased in IN + Liujunzi Decoction high concentration group. WB results showed that compared with NC group, EAELD high and low concentration groups significantly decreased the protein relative expression levels of HK2 ($P<0.01$), GLUT1 ($P<0.05$, $P<0.01$) and MCT1 ($P<0.01$, $P<0.05$). The relative protein expressions of PKM2 ($P<0.05$), MCT2 and MCT4 ($P<0.01$) in the high concentration of EAELD group were significantly decreased. Compared with those of NC + Liujunzi Decoction low concentration group, the expressions of HK2, GLUT1, PKM2 ($P<0.01$), p - PKM2, MCT1 and MCT2 ($P<0.05$) in IN + Liujunzi Decoction low concentration group were significantly increased. Compared with those of NC + Liujunzi Decoction high concentration group, the expressions of HK2, GLUT1, PKM2 ($P<0.01$), p - PKM2, MCT1 and MCT2 ($P<0.05$) in IN + Liujunzi Decoction low concentration group were significantly increased. IN + Liujunzi Decoction high concentration group could significantly promote the expressions of HK2, GLUT1, PKM2 and MCT4 ($P<0.05$). *Conclusion* EAELD can inhibit the energy metabolism of esophageal cancer cell line TE - 1 by down - regulating the expressions of GLUT1, PKM2, p - PKM2, HK2, MCT1, MCT2 and MCT4, and the mechanism is partly related to miR - 1/HIF - 1α axis.

Keywords: ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction(六君子汤); esophageal cancer; energy metabolism; miR - 1/HIF - 1α axis; molecular mechanism

根据 2020 年全球最新癌症统计调查发现，2020 年全球新发癌症病例达 1900 多万例，将近 1000 万人死于癌症，是全球最大死亡原因[1]。食管癌作为中国第四大与癌症有关的死亡原因，同时也是全球第六大癌症死亡原因[2]。由于早期食管癌患者并无任何特殊症状，导致其大多数发展较为迅速，直至晚期，此时治疗方案有限，治愈极低[3-4]。

通过对食管癌临床患者信息收集，发现食管癌临床常见证素主要有气虚、气郁、痰凝、血瘀等，证候以气虚证为主，与脾胃密切相关[5]。因此，在食管癌的治疗上应紧抓脾胃失调这一病机。六君子汤以补气健脾著称，主要用于治疗脾胃气虚夹痰湿证，这与食管癌的病机相契合。研究证明[6]加减六君子汤能够改善食管癌患者放化疗后的不良反应，提高生活质量，并且六君子汤可用于多种肿瘤，提高患者免疫力，提升临床治疗疗效[7-8]。不仅如此六君子汤乙酸乙酯提取物(EAELD)可抑制食管癌细胞的增殖、迁移与侵袭，抑制食管癌裸鼠移植瘤的生长[9-11]。前期实验也显示 EAELD 可以调控 AMPK/mTOR 信号通路影响食管癌细胞的能量代谢，增强顺铂的疗效，抑制食管癌细胞的生长[12]。

MicroRNA - 1(miR - 1)已经被证实在多种肿瘤中呈现低表达状态，包括食管癌[13]，可以直接通过多种途径抑制食管癌细胞的增殖、迁移、侵袭[14]。不仅如此，miR - 1 可通过失活 Smad3 和直接靶向 HIF - 1α，降低 HK2 和 MCT4 的表达，从而抑制肿瘤细胞有氧糖酵解和增殖[15]，直接参与肿瘤细胞的能量代谢，影响肿瘤进程。

因此，本实验在前期研究的基础上，首先验证 miR - 1、HIF - 1α 的靶向关系，以阻滞 miR - 1 表达的 TE - 1 细胞为研究对象，探究 EAELD 能否通过 miR - 1/HIF - 1α 轴影响食管癌细胞 TE - 1 的能量代谢及其分子机制，以期为六君子汤治疗食管癌的临床应用提供部分实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人食管癌 TE - 1 细胞感染慢病毒建立稳转 miR - 1 NC(NC)、miR - 1 inhibitor(IN)细胞株，NC 细胞作为 IN 细胞空白对照组，由课题组其他成员转染鉴定。人肾上皮细胞 293T 细

胞，由本实验室冻存、培养。

1.2 药物

六君子汤饮片购于河南中医药大学第一附属医院。

1.3 主要试剂

DMEM 高糖培养基（货号：12100）、胰蛋白酶 - EDTA 消化液（货号：T1300）、四甲基偶氮唑盐（MTT，货号：M8180）、RIPA（货号：R0010）、二甲基亚砜（货号：D8370，Solarbio 公司）、胎牛血清（Lonsera 公司，货号：A97E00G）、XF 糖酵解速率测定试剂盒（货号：10334 - 100）、水化液（货号：08418001）、XF96 孔细胞培养板（货号：101085 - 004）、基础检测培养基（货号：23217002）、XFp 细胞线粒体压力测试试剂盒（货号：103101 - 100，Agilent 公司）、兔抗人 PKM2 抗体（货号：4053s）、兔抗人 p - PKM2 抗体（货号：3827s）、兔抗人 HK2 抗体（货号：2867s）、兔抗人 α - TUBULIN 抗体（货号：2125S，CST 公司）、兔抗人 GLUT1 抗体（货号：YN4056）、兔抗人 MCT - 1 抗体（货号：ab179832）、兔抗人 MCT - 4 抗体（货号：ab234728，Immunoway 公司）、反转录试剂盒（Toyobo 公司，货号：117000）、2 × SYBR® Green（武汉 ABclonal 公司，货号：RM21203）、Lipofectamine 2000（美国 Thermo 公司，货号：2328448）、双荧光素酶检测试剂盒（Dual - Luciferase® Reporter Assay System，美国 Promega 公司，货号：E1910）、OPTI - MEM（美国 Thermo 公司，货号：2328448）。

1.4 主要仪器

酶标仪（BIO - TEK 公司，型号：ELx - 800），CO_2 培养箱（Thermo 公司，型号：371），超净工作台（苏净集团安泰公司，型号 37997），能量代谢分析系统（Agilent 公司，型号：Seahorse XFe96），倒置显微镜（Laica 公司，型号 DFC450C），荧光定量 PCR 仪（美国 ABI，型号 QuantStudioTM 6 Flex），荧光分光光度计（Thermo 公司，型号：NanoDrop One），电泳仪（BIO - RAD 公司，型号：PowerPac Basic），凝胶成像系统（BIO - RAD 公司，型号 Universal Hood Ⅱ）。

2 实验方法

2.1 细胞培养

NC、IN、293T 细胞是由含 10% 的胎牛血清与 90% DMEM 含双抗高糖培养基培养，置于含 CO_2 浓度 5%、37 ℃恒温培养箱中培养，2 d 换一次液，3 ~ 4 d，1∶3 ~ 1∶5 传代。

2.2 六君子汤乙酸乙酯部位提取

将六君子汤按照人参∶白术∶茯苓∶甘草∶陈皮∶半夏 = 1∶1.5∶1∶1∶1∶1.5 饮片打粉、称重，按照药粉∶75% 乙醇 = 1∶8 比例沸腾加热两次，分别为 1.5 h 和 1 h，将两次药液 8 层纱布过滤，静置过夜。将药液浓缩与生药的体积一致，将 2 倍体积的乙酸乙酯加入，混匀，分液漏斗进行萃取，萃取 8 次，收集萃取液，旋转蒸发仪回收乙酸乙酯，低温真空干燥机进行冷冻干燥。经质谱分析鉴定其共有 663 种物质，主要成分以 2 - 羟基肉桂酸、4 - 二羟基苯甲酸、5 - 羟基酸橙黄酮、草黄素 - 8 - C - 葡萄糖苷（金雀花素）、高车前素 - 8 - C - 葡萄糖苷等酚酸类、黄酮类为主。称取适量提取物，DMSO 溶解为 250 mg/mL，避光储存于 - 20 ℃，此为储存液。然后使用 DMEM 高糖培养基稀释为 2.5 mg/mL，此为工作液，供后续使用。

2.3 MTT 法检测不同浓度 EAELD 对 NC、IN 细胞增殖的影响

将对数生长期的 TE - 1 细胞以 1×10^4 个/孔，200 μL 体积种于 96 孔板，培养箱培养 24 h 后，弃去孔内旧的培养基，设置 0、10、20、40、60、80 μg/mL 的浓度使用 DMEM 高糖培养基进行加药处理，继续培养 48 h，抽掉孔内药液，90% DMEM + 10% MTT 溶液以每孔 100 μL 体积加入，放入培养箱 4 ~ 6 h，弃去孔内旧的液体，每孔加入 150 μL DMSO 溶液，摇床混匀，酶标仪 490 nm 检测吸光值，按照抑制率 = 1 - 用药组/空白对照组 × 100% 公式进行计算，SPSS 估测 IC_{30}、IC_{50} 应用于后续实验。

根据上述将六君子汤分为高、低浓度（六高、六低）两组，分别应用 NC、IN。MTT 法检测，IN 与 NC 相比，药物的抑制作用有无显著变化。

2.4 实时荧光定量 PCR 法（RT - qPCR）检测 EAELD 对于 TE - 1 细胞 miR - 1、HIF - 1α mRNA 的影响

TRIzol 法提取各组总 RNA，按照说明书进行逆转录，采用 SYBR Green 染料法以 10 μL 体系对 c - DNA 进行扩增，miR - 1 以 U6 为内参，HIF - 1α 以 β - actin 为内参，用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算各个样品中目的 mRNA 相对表达量。引物序列由 GENEWIZ 公司设计合成。见表 1。

表 1 引物序列

基因	序列 5′-3′
miR - 1 - RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACATACAT
miR - 1 - F	AAGCGCCTTGGAATGTAAAGAA
miR - 1 - R	GTCGTATCCAGTGCAGGGT
HIF - 1α - F	GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG
HIF - 1α - R	CCTTATCAAGATGCGAACTCACA
β - actin - F	ATTGCCGACAGGATGCAGAA
β - actin - R	GCTGATCCACATCTGCTGGAA
U6 - F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6 - R	AACGCTTCACGAATTTGCGT

2.5 双荧光素酶基因报告实验

首先通过 TargetScan 4.2 来预测 hsa - miR - 1 - 3p 的靶基因 HIF - 1α 及其结合位点，其靶点位置为 HIF - 1α 的 3′UTR 的 3466 ~ 3472 区。我们将 HIF - 1α 的序列由 TTCCA 突变为 AGATC，构建 pMIR - REPORT 荧光素酶载体，委托上海吉玛制药技术有限公司构建合成。转染质粒序列见表 2。

表 2 转染质粒序列

名称		序列 5′-3′
miR - 1 - 3p	正义	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
	反义	ACAUACUUCUUUACAUUCCAUU
Negative Control	正义	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反义	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

将处于对数生长期的 293T 细胞按照 8×10^3 个/孔种于 96 孔板，每组 3 个复孔，置于含 5% CO_2，37 ℃恒温培养箱中培养 24 h。吸去每孔内旧的培养基，沿孔壁加入 100 μL/孔 PBS 清洗细胞 1 次，抽出，每孔加入 50 μL 减血清培养基 OPTI - MEM，培养箱培养 1 h。分别转染野生型（WT）+ miR - 1 mimics、突变型（MUT）+ miR - 1 mimics、WT + miR - 1 NC、MUT + miR - 1 NC，其中 mimics、NC 孔内终浓度保证为 50 nmol/L，WT、MUT 每孔 0.2 μL、Lipofectamine 2000 每孔 0.25 μL。培养 6 h 后，将转染液抽取出来，每孔加入 100 μL 完全培养基，继续培养 42 h。按照双荧光素酶检测说明书，配置萤火虫与海肾检测试剂，上机检测。

2.6 Seahorse 能量代谢分析系统检测线粒体压力与糖酵解速率

分组为 NC 组、NC + 六低组、NC + 六高组、IN + 六低组、

IN + 六高组，接种于 Seahorse 96 孔板中，每孔细胞悬液 80 μL，每孔 8000 个细胞，每组 3 个复孔。置于 CO_2 培养箱中培养 24 h 后换液，根据 2.3 中 MTT 检测结果，选取 IC_{30}（20 μg/mL）作为低剂量组、IC_{50}（40 μg/mL）作为高剂量组，用 DMEM 配制六君子汤工作液，分别处理细胞，继续培养 48 h。按照说明书，检测各组细胞能量代谢情况。实验结果由 Wave 软件分析。

2.7 蛋白免疫印迹法（WB）检测能量代谢相关分子蛋白表达影响

分组同 2.6，加药培养 48 h 后，以 RIPA 裂解液：蛋白磷酸酶抑制剂：PMSF = 100 ∶ 1 ∶ 1 的比例，配制细胞裂解液混合物，每孔加入 130 μL 裂解细胞，BCA 蛋白浓度测定法测定各组蛋白浓度，98 ℃变性 8 min，取 20 μg 蛋白上样，用 10% SDS - PAGE 凝胶电泳，200 mA 转膜 60 min，5% 脱脂牛奶室温封闭 4 h，一抗（1 ∶ 1000）4 ℃ 孵育过夜，TBST 漂洗 3 次，二抗（1 ∶ 1000）室温孵育 1 h，再次漂洗 3 次，配制 ECL 发光显影液，显影拍照。以 α - 微管蛋白（α - Tublin）为内参，使用“ImageLab”分析每组条带的光密度值，以目的条带光密度值/内参条带光密度值，计算各组蛋白相对表达量。

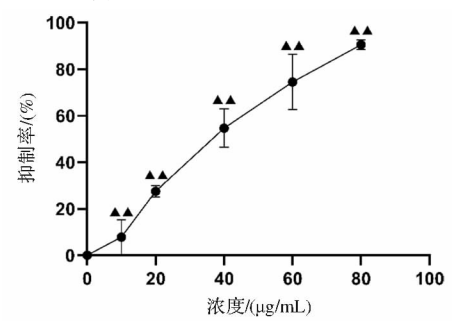
2.8 统计学分析

各实验组数据收集后采用 IBM SPSS Statistics 21 进行分析，每组实验至少重复 3 次。若数据符合正态分布并且方差齐，两组间对比采用独立样本 t 检验，若符合正态分布但是方差不齐，则采用 Dunnett T3 检验。若不符合正态分布，则采用非参数检验。柱状图使用 GraphPad Prism 8 绘制，当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 MTT 法检测 EAELD 对食管癌 TE - 1 细胞增殖的影响

MTT 结果显示与 NC 组相比，不同浓度的 EAELD 对 TE - 1 细胞的增殖均有抑制作用（$P < 0.01$），抑制作用随 EAELD 的升高而升高，见图 1。选取 20 μg/mL（IC_{30}）、40 μg/mL（IC_{50}）分别为低浓度组、高浓度组。



注：▲▲与 NC 组相比，$P < 0.01$。

图 1 EAELD 对食管癌 TE - 1 细胞增殖的影响

3.2 qPCR 法检测不同浓度 EAELD 对 TE - 1 细胞 miR - 1、HIF - 1α mRNA 的影响

如表 3 所示，与 NC 组相比，EAELD 高浓度组（六高）能够明显促进 miR - 1 mRNA 的表达（$P < 0.05$），低浓度组（六低）有升高趋势，差异无统计学意义。EAELD 对 HIF - 1α 的 mRNA 表达有抑制趋势，差异无统计学意义。后续选取阻滞 miR - 1 进行反向验证，做能量代谢检测。

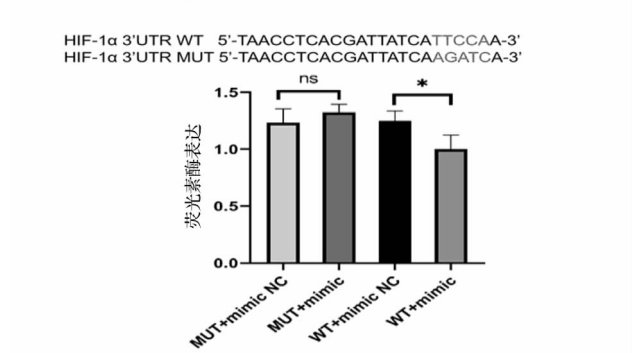
3.3 双荧光素酶基因报告实验验证 miR - 1 与 HIF - 1α 靶向关系

查阅文献及利用 TargetScan 4.2 来进行筛选发现，miR - 1 与 HIF - 1α 存在靶向关系，如图 2 所示，双荧光素酶基因报告实验结果显示，与 WT + 阴性对照（mimics NC）组相比，WT + mimics 荧光强度明显下降，差异具有统计学意义，与 MUT + 阴性对照（mimics NC）组相比，MUT + mimics 荧光强度无明显差别。表明 miR - 1 mimics 可以有效抑制 HIF - 1α 野生型荧光素酶活性，对于突变型 HIF - 1α 无明显影响，证实 HIF - 1α 为 miR - 1 的靶基因，且 miR - 1 主要是通过与 HIF - 1α 3′UTR 区域的结合来调控 HIF - 1α 的表达。

表 3 EAELD 对 TE - 1 细胞 miR - 1、HIF - 1α mRNA 的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	miR - 1	HIF - 1α
NC 组	3	1	1
六低组	3	1.63 ± 0.45	1.14 ± 0.25
六高组	3	2.81 ± 0.4[1)]	0.85 ± 0.06

注：1）与 NC 组相比，$P < 0.05$。



注：ns $P > 0.05$；* $P < 0.05$。

图 2 miR - 1 mimics/NC 对 HIF - 1α 野生型、突变型荧光素酶活性影响

3.4 MTT 法检测不同浓度的 EAELD 对于 NC、IN 细胞增殖的影响

在阻滞 miR - 1 的食管癌 TE - 1（IN）组加入相同浓度 EAELD 后，与空白对照组（NC）相比，EAELD 对细胞增殖的抑制作用仍随着药物浓度的升高而升高，而 IN 在相同 EAELD 浓度作用下，对细胞增殖的抑制作用低于空白对照组（$P < 0.05$）。表明在阻滞 miR - 1 的表达后，EAELD 对 TE - 1 细胞生长的抑制作用明显下降。见表 4。

表 4 EAELD 对于 NC、IN 细胞增殖的影响（$\bar{x} \pm s$）

浓度/（μg/mL）	n	抑制率/（%）	
		NC	IN
20	4	40.44 ± 3.81	23.46 ± 5.22[1)]
40	4	43.45 ± 5.49	33.60 ± 4.76[1)]

注：1）与 NC 组相比，$P < 0.05$。

表 5 EAELD 对食管癌 TE - 1 细胞糖酵解速率的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	基础糖酵解/（pmol/min）	线粒体耗氧与基础糖酵解比值	补偿糖酵解/（pmol/min）	糖酵解潜能/（pmol/min）
NC 组	4	466.35 ± 155.77	0.12 ± 0.03	684.48 ± 140.71	54.42 ± 5.92
六低组	4	372.18 ± 101.25	0.07 ± 0.01[1)]	476.58 ± 131.65	27.27 ± 9.57[2)]
六高组	4	180.78 ± 109.32[2)]	0.05 ± 0.03[2)]	195.13 ± 126.98[2)]	7.90 ± 5.28[2)]

注：1）与 NC 组相比，$P < 0.05$；2）与 NC 组相比，$P < 0.01$。

3.5 EAELD 对食管癌 TE - 1 细胞的能量代谢的影响

3.5.1 不同浓度 EAELD 对食管癌 TE - 1 细胞糖酵解速率的影响 与 NC 组相比，六高、六低组均可以抑制线粒体耗氧与

表 6 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞线粒体功能的影响($\bar{x} \pm s$) 单位:pmol/min

组别	n	基础呼吸值	质子漏耗氧	线粒体最大耗氧能力	备用呼吸能力	非线粒体耗氧	ATP 合成耗氧
NC 组	4	69.16 ± 13.79	65.51 ± 13.10	89.70 ± 16.68	20.53 ± 3.7	28.33 ± 3.59	3.65 ± 0.69
六低组	4	39.33 ± 16.84[1)]	37.72 ± 16.21[1)]	49.93 ± 20.64[2)]	10.60 ± 4.30[2)]	16.41 ± 3.38	1.60 ± 0.65
六高组	4	6.23 ± 6.84[2)]	6.41 ± 5.59[2)]	11.52 ± 9.82[2)]	5.28 ± 3.09[2)]	2.28 ± 3.83[2)]	0.44 ± 0.88[2)]

注:1)与 NC 组相比,$P < 0.05$;2)与 NC 组相比,$P < 0.01$。

表 7 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞能量代谢相关分子蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

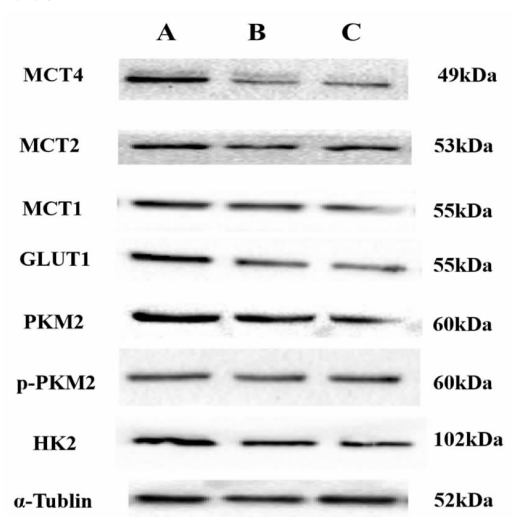
组别	n	HK2	GLUT1	PKM2	p－PKM2	MCT1	MCT2	MCT4
NC 组	3	0.93 ± 0.10	0.54 ± 0.03	0.96 ± 0.05	0.57 ± 0.05	0.68 ± 0.07	0.63 ± 0.02	0.39 ± 0.03
六低组	3	0.38 ± 0.18[2)]	0.33 ± 0.05[2)]	0.98 ± 0.15	0.41 ± 0.22	0.45 ± 0.09[1)]	0.30 ± 0.15	0.10 ± 0.14
六高组	3	0.13 ± 0.05[2)]	0.38 ± 0.10[1)]	0.75 ± 0.08[1)]	0.47 ± 0.02	0.21 ± 0.12[2)]	0.32 ± 0.02[2)]	0.14 ± 0.03[2)]

注:1)与 NC 组相比,$P < 0.05$;2)与 NC 组相比,$P < 0.01$。

糖酵解的比值($P < 0.01$,$P < 0.05$)、糖酵解潜能($P < 0.01$),六高组同样可以有效抑制基础糖酵解、补偿糖酵解($P < 0.01$)。见表 5、插页 XXIX 图 3。

3.5.2 不同浓度 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞线粒体功能的影响 与 NC 组相比,六低、六高组的基础呼吸值、质子漏耗氧、线粒体最大耗氧能力、备用呼吸能力、非线粒体耗氧、ATP 合成耗氧均随着用药浓度的增加而减少,除六低组非线粒体耗氧、ATP 合成耗氧外,差异均具有统计学意义。见表 6、插页 XXIX 图 4。

3.5.3 不同浓度 EAELD 对 TE－1 细胞能量代谢相关分子蛋白的影响 与 NC 组相比,六高、六低组的 HK2($P < 0.01$)、GLUT1($P < 0.05$、$P < 0.01$)、MCT1($P < 0.01$、$P < 0.05$),六高组的 PKM2($P < 0.05$)、MCT2、MCT4($P < 0.01$)的相对蛋白表达量显著降低。见表 7、图 5。



注:A. NC 组;B. 六低组;C. 六高组。

图 5 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞能量代谢相关分子蛋白的影响

3.6 阻滞 miR－1 后 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞能量代谢的影响

3.6.1 阻滞 miR－1 后 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞糖酵解速率的影响 与 NC＋六低组相比,IN＋六低组的基础糖酵解、线粒体与基础糖酵解的比值、糖酵解潜能显著升高($P < 0.05$),补偿糖酵解有升高趋势。与 NC＋六高组相比,IN＋六高组基础糖酵解、补偿糖酵解明显升高($P < 0.05$),糖酵解潜能有升高趋势。见表 8、插页 XXIX 图 6。

3.6.2 阻滞 miR－1 后 EAELD 对食管癌 TE－1 线粒体功能的影响 与 NC＋六低组相比,IN＋六高组的 ATP 合成耗氧量明显升高($P < 0.01$),基础呼吸能力、质子漏耗氧、线粒体最大耗氧能力、备用呼吸能力有升高趋势。与 NC＋六高组相比,IN＋六高组的基础呼吸能力、质子漏耗氧、线粒体最大耗氧量、非线粒体耗氧显著升高($P < 0.01$)。备用呼吸能力、ATP 合成耗氧有升高趋势。见表 9、插页 XXIX 图 7。

表 8 阻滞 miR－1 后 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞糖酵解速率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	基础糖酵解/(pmol/min)	线粒体耗氧与基础糖酵解比值	补偿糖酵解/(pmol/min)	糖酵解潜能/(pmol/min)
NC＋六低组	4	372.18 ± 101.25	0.07 ± 0.01	476.58 ± 131.65	77.13 ± 34.01
IN＋六低组	4	565.70 ± 120.83[3)]	0.09 ± 0.03[3)]	783.70 ± 145.56	169.07 ± 52.13[3)]
NC＋六高组	4	180.78 ± 109.32	0.05 ± 0.03	195.13 ± 126.98	6.45 ± 14.02
IN＋六高组	4	363.63 ± 54.99[5)]	0.04 ± 0.02	398.93 ± 82.96[5)]	20.45 ± 23.85

注:3)与 NC＋六低组相比,$P < 0.05$;5)与 NC＋六高组相比,$P < 0.05$。

3.6.3 阻滞 miR－1 后 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞能量代谢相关分子蛋白的影响 与 NC＋六低组相比,IN＋六低组 HK2、GLUT1、PKM2($P < 0.01$)、p－PKM2、MCT1、MCT2($P < 0.05$)的表达明显提高,MCT4 有升高趋势。与 NC＋六高组相比,IN＋六高组可以显著促进 HK2、GLUT1、PKM2、MCT4 的表达($P < 0.05$),p－PKM2、MCT1、MCT2 有升高趋势。见表 10、图 8、图 9。

4 讨论

食管癌在中医上属于“噎嗝”,病名首见于《黄帝内经》,病因较为复杂,主要与七情内伤、酒食不节、久病年老有关,致使气、痰、瘀交阻,津气耗伤,胃失通降而成。病位主在食道,属胃。脾胃为后天之本、气血生化之源,因此临床上多针对脾胃来进行食管癌治疗与术后恢复。六君子汤方中共有人参、白术、茯苓、甘草、陈皮、半夏 6 味药组成,四君子汤益气健脾和胃,加以陈皮、半夏,燥湿化痰、理气降逆,治疗由脾胃气虚引起的痰湿、呃逆等证,临床与实验研究表明其对食管癌的治疗与术后恢复也有很好疗效。本研究从食管癌病因病机入手,研究 EAELD 治疗食管癌的部分机制。基于前期 EAELD 对于食管癌细胞 EC9706 的能量代谢具有显著抑制作用的发现,进一步研究 EAELD 抑制能量代谢的分子机制与 miR－1/HIF－1α 轴的关系。

miR－1、HIF－1α 与肿瘤细胞的能量代谢关系密切。研究表明 miR－1 可通过直接靶向糖酵解和糖原形成的主要调

表 9 阻滞 miR－1 后 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞线粒体功能的影响($\bar{x} \pm s$) 单位:pmol/min

组别	n	基础呼吸值	质子漏耗氧	线粒体最大耗氧能力	备用呼吸能力	非线粒体耗氧	ATP 合成耗氧
NC＋六低组	4	39.33 ± 16.84	37.72 ± 16.21	49.93 ± 20.64	10.60 ± 4.30	16.41 ± 3.38	1.60 ± 0.65
IN＋六低组	4	61.48 ± 15.43	58.34 ± 14.42	76.60 ± 19.91	15.11 ± 4.61	23.43 ± 5.87	3.14 ± 1.06[3)]
NC＋六高组	4	6.23 ± 6.84	6.41 ± 5.59	11.52 ± 9.82	5.28 ± 3.09	2.28 ± 3.83	0.44 ± 0.88
IN＋六高组	4	22.27 ± 9.54[5)]	22.15 ± 8.14[5)]	34.38 ± 12.52[5)]	12.10 ± 4.83	10.41 ± 4.59[5)]	0.72 ± 1.04

注:3)与 NC＋六低组相比,$P<0.05$;5)与 NC＋六高组相比,$P<0.05$。

表 10 阻滞 miR－1 后 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞能量代谢相关分子蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HK2	GLUT1	PKM2	p－PKM2	MCT1	MCT2	MCT4
NC＋六低组	3	0.47 ± 0.18	0.37 ± 0.08	0.78 ± 0.12	0.11 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.21 ± 0.13	0.19 ± 0.33
IN＋六低组	3	1.09 ± 0.1[4)]	1.30 ± 0.16[4)]	1.49 ± 0.18[4)]	0.30 ± 0.10[3)]	1.00 ± 0.41[3)]	0.58 ± 0.14[3)]	0.39 ± 0.02
NC＋六高组	3	0.32 ± 0.09	0.53 ± 0.14	0.87 ± 0.13	0.40 ± 0.07	0.77 ± 0.14	0.27 ± 0.07	0.48 ± 0.18
IN＋六高组	3	0.60 ± 0.07[5)]	1.12 ± 0.23[5)]	1.27 ± 0.17[5)]	0.57 ± 0.12	1.19 ± 0.16	0.89 ± 0.41	0.82 ± 0.10[5)]

注:3)与 NC＋六低组相比,$P<0.05$;4)与 NC＋六低组相比,$P<0.01$;5)与 NC＋六高组相比,$P<0.05$。

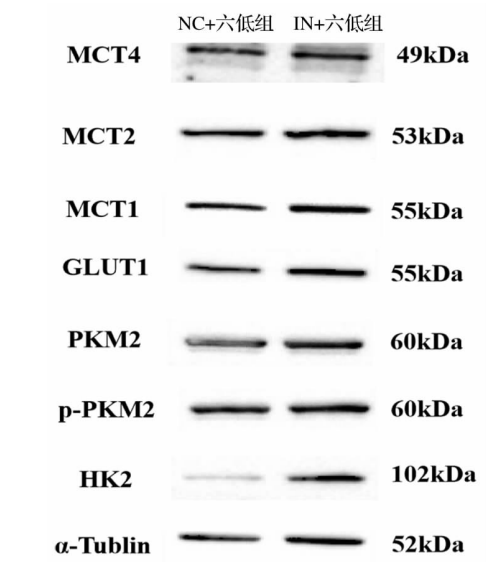


图 8 阻滞 miR－1 后 EAELD 低浓度对食管癌 TE－1 细胞能量代谢相关分子蛋白的影响

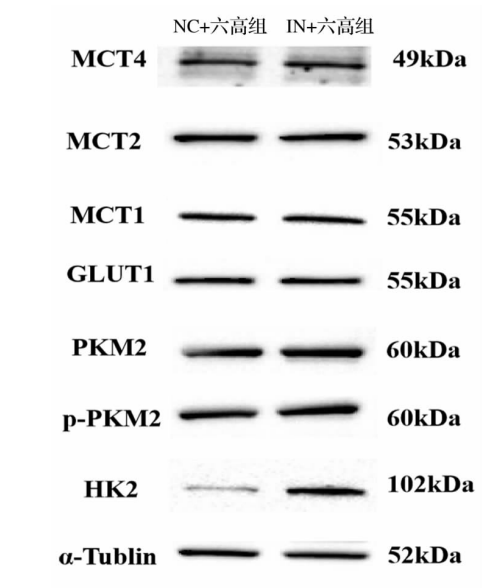


图 9 阻滞 miR－1 后 EAELD 高浓度对食管癌 TE－1 细胞能量代谢相关分子蛋白的影响

节剂雌激素相关受体 β(Errβ),来抑制心脏胎儿基因程序[16],也可调控 Smad3 介导的有氧糖酵解,从而使得大肠癌细胞的增殖被抑制[17]。HIF－1α 可通过调控 GLUT1、MCT1 来促进肿瘤细胞的糖酵解[18－19]。甚至 miR－1 可直接靶向 HIF－1α 表达促进肿瘤细胞的能量代谢[15]。MTT 结果显示不同浓度 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞的抑制作用呈剂量浓度依赖,并且可以促进 miR－1、抑制 HIF－1α 的基因表达,而荧光素酶基因检测实验也证实了 miR－1 与 HIF－1α 的靶向关系,且 miR－1 主要是通过与 HIF－1α 3′UTR 区域的结合来调控 HIF－1α 的表达,因此后续选取了阻滞 miR－1 进行 EAELD 的反向验证。

Seahorse 能量代谢分析系统可以根据培养基的 pH 值变化来判断细胞的代谢状态。当细胞进行糖酵解活动时,会产生大量乳酸,然后伴随着 H^+ 流出,当细胞发生氧化磷酸化反应时,会产生大量的 CO_2,二者均可导致细胞所处的培养基 pH 值发生变化,其中重点关注糖酵解测试的糖酵解潜能,线粒体压力测试中的备用呼吸能力。当选取 EAELD 高、低浓度分别作用于 NC 时,结果表明 EAELD 可以显著抑制肿瘤细胞的糖酵解与氧化磷酸化能力,而阻滞 miR－1 时,EAELD 的抑制作用有所下降。

GLUT1 作为有氧糖酵解的主要开关,可以加速有氧糖酵解,为原发肿瘤细胞向远处移动提供能量[20－22]。PKM2 可以将磷酸烯醇丙酮酸(PEP)转化为丙酮酸,是糖酵解的最后一步[23]。HK2 通过抑制葡萄糖 6－磷酸的负反馈来促进糖酵解,并通过增加 ATP,来促进有氧糖酵解、抑制细胞凋亡[24－25],是糖酵解的第一个限速酶。MCT1、MCT4 可以促进肿瘤细胞中的糖酵解产物乳酸的转运[26－28],MCT2 则对丙酮酸有着较高亲和力,可以通过调节肿瘤微环境,促进肿瘤细胞的高糖酵解通量[29－30],三者可以实现肿瘤细胞乳酸、丙酮酸的高效利用,促进肿瘤细胞的能量代谢[31]。WB 结果显示 EAELD 能够显著降低能量代谢相关分子 GLUT1、PKM2、p－PKM2、HK2、MCT1、MCT2、MCT4 的蛋白表达,抑制食管癌细胞 TE－1 的能量代谢。当阻滞 miR－1 时,EAELD 对于能量代谢相关蛋白的抑制作用明显减小,与能量代谢结果相一致,作用机制见插页 XXIX 图 10。

同时研究中发现 HIF－1α 的蛋白表达极低,经查阅相关资料,认为 HIF－1α 作为低氧因子,在常氧环境中几乎不表达,因此后续需要进一步在低氧环境下验证 miR－1 与 HIF－

1α 的靶向关系及 EAELD 抑制食管癌细胞 TE－1 的能量代谢的分子机制。

综上所述，EAELD 可以通过调控能量代谢相关分子 GLUT1、PKM2、p－PKM2、HK2、MCT1、MCT2、MCT4 的蛋白表达抑制食管癌细胞 TE－1 的能量代谢，其部分机制与 miR－1/HIF－1α 轴有关，但是 EAELD 影响能量代谢的其他途径及其作用机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209－249.

[2] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J, 2021, 134(7): 783－791.

[3] ARNOLD M, RUTHERFORD M J, BARDOT A, et al. Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high－income countries 1995－2014 (ICBP SURVMARK－2): a population－based study[J]. Lancet Oncol, 2019, 20(11): 1493－1505.

[4] ARNOLD M, ABNET C C, NEALE R E, et al. Global burden of 5 major types of gastrointestinal cancer[J]. Gastroenterology, 2020, 159(1): 335－349.

[5] 王茜. 食管癌中医证型及其分布规律的研究[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2019.

[6] 韩辰燕, 刘晓芯, 董昀, 等. 加味香砂六君子汤对食管癌新辅助放化疗患者胃肠道副作用及生活质量的影响[J]. 西部中医药, 2023, 36(1): 4－7.

[7] 刘云云, 王保军, 孙琪坤. 六君子汤加减治疗对肺脾气虚型非小细胞肺癌化疗患者免疫功能的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(12): 107－109.

[8] 杨宁娟, 殷常春, 潘守杰, 等. 化疗配合香砂平胃散合六君子汤治疗中晚期胃癌疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2018, 34(11): 1346－1347.

[9] 吴耀松, 尹素改, 任闪闪, 等. 六君子汤对食管癌 EC－9706 细胞株树突状细胞成熟的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(6): 508－512.

[10] 吴耀松, 金华彬, 陈玉龙, 等. 健脾和胃法对食管癌细胞株 EC9706 移植瘤生长的抑制作用[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8): 1836－1839.

[11] 吴耀松, 金华彬, 陈玉龙, 等. 健脾和胃法通过 IL－6/STAT3 信号通路对食管癌细胞株 EC9706 生长的干预作用[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(3): 1198－1201.

[12] 尚艺婉. 基于 AMPK/mTOR 研究健脾和胃法及代表方六君子汤增加顺铂对食管癌细胞 EC9706 疗效机制[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2019.

[13] HAN C, SHEN J K, HORNICEK F J, et al. Regulation of micro RNA－1(miR－1) expression in human cancer[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2017, 1860(2): 227－232.

[14] LIU W Z, LI M K, CHEN X M, et al. MicroRNA－1 suppresses proliferation, migration and invasion by targeting Notch2 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 5183.

[15] CAO L L, WANG M, DONG Y J, et al. Circular RNA circRNF20 promotes breast cancer tumorigenesis and Warburg effect through miR－487a/HIF－1α/HK2[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 145.

[16] XU W F, ZHANG Z J, ZOU K J, et al. MiR－1 suppresses tumor cell proliferation in colorectal cancer by inhibition of Smad3－mediated tumor glycolysis[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(5): e2761.

[17] LIAO Z C, WANG X J, LIANG H W, et al. MiR－1 suppresses the proliferation and promotes the apoptosis of esophageal carcinoma cells by targeting Src[J]. Cancer Med, 2017, 6(12): 2957－2965.

[18] CHIKAMOTO A, INOUE R, KOMOHARA Y, et al. Preoperative high maximum standardized uptake value in association with glucose transporter 1 predicts poor prognosis in pancreatic cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2017, 24(7): 2040－2046.

[19] KOCH A, EBERT E V, SEITZ T, et al. Characterization of glycolysis－related gene expression in malignant melanoma[J]. Pathol Res Pract, 2020, 216(1): 152752.

[20] GOOS J A, DE CUBA EM, COUPÉ V M, et al. Glucose transporter 1(SLC2A1) and vascular endothelial growth factor A(VEGFA) predict survival after resection of colorectal cancer liver metastasis[J]. Ann Surg, 2016, 263(1): 138－145.

[21] PAPAGEORGIS P, CHENG K, OZTURK S, et al. Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(3): 998－1008.

[22] LI W, WEI Z, LIU Y, et al. Increased 18F－FDG uptake and expression of Glut1 in the EMT transformed breast cancer cells induced by TGF－beta[J]. Neoplasma, 2010, 57(3): 234－240.

[23] LI T, HAN J B, JIA L J, et al. PKM2 coordinates glycolysis with mitochondrial fusion and oxidative phosphorylation[J]. Protein Cell, 2019, 10(8): 583－594.

[24] LU J R. The Warburg metabolism fuels tumor metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2019, 38(1－2): 157－164.

[25] AL－AZZAM N. Sirtuin 6 and metabolic genes interplay in Warburg effect in cancers[J]. J Clin Biochem Nutr, 2020, 66(3): 169－175.

[26] HASHIMOTO T, HUSSIEN R, BROOKS G A. Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 290(6): 1237－1244.

[27] NOOR S I, JAMALI S, AMES S, et al. A surface proton antenna in carbonic anhydrase II supports lactate transport in cancer cells[J]. Elife, 2018, 7: 35176.

[28] FORERO－QUINTERO L S, AMES S, SCHNEIDER H P, et al. Membrane－anchored carbonic anhydrase Ⅳ interacts with monocarboxylate transporters via their chaperones CD147 and GP70[J]. J Biol Chem, 2019, 294(2): 593－607.

[29] LIN R Y, VERA J C, CHAGANTI R S, et al. Human monocarboxylate transporter 2(MCT2) is a high affinity pyruvate transporter[J]. J Biol Chem, 1998, 273(44): 28959－28965.

[30] CARUSO J P, KOCH B J, BENSON P D, et al. pH, lactate, and hypoxia: reciprocity in regulating high－affinity monocarboxylate transporter expression in glioblastoma[J]. Neoplasia, 2017, 19(2): 121－134.

[31] ULLAH M S, DAVIES A J, HALESTRAP A P. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up－regulated by hypoxia through a HIF－1alpha－dependent mechanism[J]. J Biol Chem, 2006, 281(14): 9030－9037.

基于 miR－1/HIF－1α 轴研究六君子汤乙酸乙酯提取物调控食管癌细胞 TE－1 能量代谢的作用机制

（正文见 133－139 页）

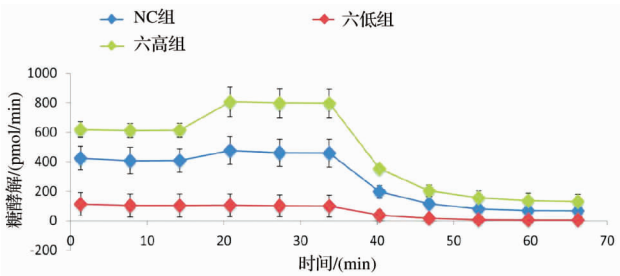


图 3 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞糖酵解速率影响的“海马”曲线

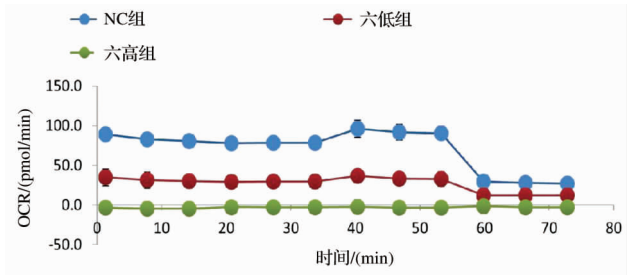


图 4 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞线粒体功能影响的“海马”曲线

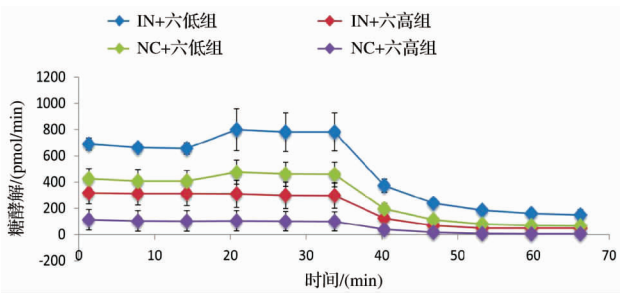


图 6 阻滞 miR－1 后 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞糖酵解速率影响的“海马”曲线

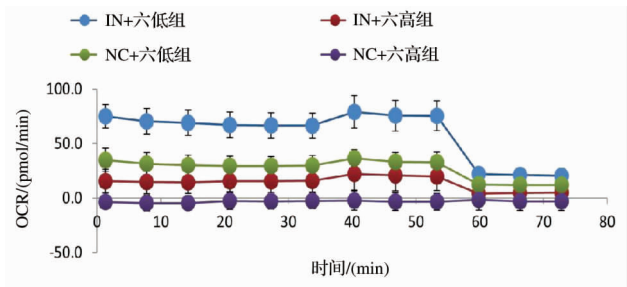


图 7 阻滞 miR－1 后 EAELD 对食管癌 TE－1 细胞线粒体功能影响的“海马”曲线

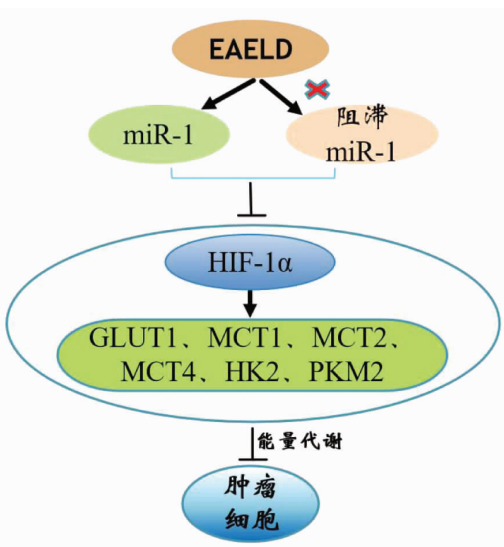


图 10 EAELD 抑制食管癌细胞能量代谢的机制