

陈星, 娄翔宇, 尚艺婉, 等. 六君子汤乙酸乙酯提取物干预 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞能量代谢的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 17-24.

Chen X, Lou XY, Shang YW, et al. Mechanism of ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction in the energy metabolism of EC9706 cells in CAF-conditioned medium [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 17-24.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.003

# 六君子汤乙酸乙酯提取物干预 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞能量代谢的机制研究

陈星<sup>1</sup>, 娄翔宇<sup>1</sup>, 尚艺婉<sup>1</sup>, 周哲旭<sup>1</sup>, 刘洋<sup>1</sup>, 刘娅茹<sup>1</sup>, 胡啸博<sup>1</sup>, 陈玉龙<sup>2\*</sup>

(1.河南中医药大学, 郑州 450046; 2.河南省中医方证信号传导重点实验室, 郑州 450046)

**【摘要】** 目的 探索六君子汤乙酸乙酯提取物(EAELD)对癌相关成纤维细胞(CAFs)条件培养基下食管癌 EC9706 细胞能量代谢影响的分子机制。方法 噻唑蓝(MTT)法检测 EAELD 对 EC9706 增殖活性的影响;比色法检测 EAELD 对 CAFs 条件培养基(CAFM)下 EC9706 细胞上清中乳酸及葡萄糖含量的影响; Seahorse 能量代谢分析系统检测 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢的影响;实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)、蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 EAELD 对能量代谢相关分子 mRNA 及蛋白表达的影响。结果 与 DMEM 相比,除 10 μg/mL 组外,EAELD 对 EC9706 细胞增殖活性均有明显抑制作用( $P < 0.05$ ),选取抑制浓度( $IC_{50}$ ) 25 μg/mL,半抑制浓度( $IC_{50}$ ) 40 μg/mL,作为低、高剂量组进行后续实验。在 CAFM 培养的 EC9706 细胞各组中,EAELD 低、高剂量组都能显著降低非线粒体耗氧、基础呼吸值、最大呼吸值、合成 ATP 耗氧量、备用呼吸能力、基础糖酵解、补偿糖酵解、糖酵解潜能( $P < 0.01$ ),减少 EC9706 细胞上清乳酸含量( $P < 0.01$ ),下调 GLUT1 的 mRNA 表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),下调 p-PKM2、HK2、PKM2、MCT1 蛋白表达( $P < 0.01$ );EAELD 高剂量组能够下调 EC9706 细胞的线粒体耗氧与基础糖酵解比值( $P < 0.05$ ),减少 EC9706 细胞葡萄糖摄取( $P < 0.05$ ),下调 p-PKM2、GLUT1 的蛋白表达( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );EAELD 低剂量组能够下调 MCT1 的 mRNA 表达( $P < 0.05$ )。结论 六君子汤乙酸乙酯提取物能够干预 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞的能量代谢,其机制可能与 EAELD 调控 HK2、PKM2、GLUT1、MCT1、MCT4 的 mRNA 和蛋白表达相关。

**【关键词】** 癌相关成纤维细胞;条件培养基;六君子汤乙酸乙酯提取物;能量代谢;食管癌

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2023)11-0017-08

## Mechanism of ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction in the energy metabolism of EC9706 cells in CAF-conditioned medium

CHEN Xing<sup>1</sup>, LOU Xiangyu<sup>1</sup>, SHANG Yiwan<sup>1</sup>, ZHOU Zhexu<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, LIU Yaru<sup>1</sup>, HU Xiaobo<sup>1</sup>, CHEN Yulong<sup>2\*</sup>

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Henan Provincial Key Laboratory of Prescription and Syndrome Signal Transduction, Zhengzhou 450046)

**【Abstract】** **Objective** To explore the molecular mechanism of ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction (EAELD) on energy metabolism in esophageal cancer EC9706 cells in conditioned medium from cancer-associated fibroblasts (CAF). **Methods** Methyl thiazol tetrazolium assays were used to assess the effect of EAELD on EC9706 cell proliferation. The effects of EAELD on lactate and glucose in the culture supernatant of EC9706 cells in CAF-conditioned medium were assessed by colorimetry. A seahorse system for energy metabolism analysis was used to assess the effect of EAELD on energy metabolism of EC9706 cells in CAF-conditioned medium. Real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blot were used to measure mRNA and protein expression of energy metabolism-related molecules. **Results**

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(82074313)。

**【作者简介】** 陈星(1996—),女,硕士研究生,研究方向:肿瘤的病机与防治。E-mail: 1183761889@qq.com

**【通信作者】** 陈玉龙(1972—),男,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治肿瘤机制。E-mail: cyl72621@163.com

Compared with DMEM, except for the 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group, EAELD had a significant inhibitory effect on EC9706 cell proliferation ( $P < 0.05$ ). The 30% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{30}$ ) of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and half inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were selected as low and high doses for subsequent experiments. In EC9706 cells cultured in CAFM, both low and high dose EAELD groups had significantly reduced non-mitochondrial oxygen consumption, basal respiration, maximum respiration, oxygen consumption of ATP synthesis, spare respiration capacity, basal glycolysis, compensative glycolysis, and glycolysis potential ( $P < 0.01$ ). Lactate content of EC9706 cells was decreased ( $P < 0.01$ ), mRNA expression of GLUT1 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) was downregulated, and protein expression of p-PKM2, HK2, PKM2 and MCT1 was downregulated ( $P < 0.01$ ). The high dose EAELD group had downregulated mitochondrial oxygen consumption and basal respiration. The glycolytic ratio of ( $P < 0.05$ ) and glucose uptake of EC9706 cells were reduced ( $P < 0.05$ ) and protein expression of p-PKM2 and GLUT1 was downregulated ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). The low dose group of EAELD had downregulated mRNA expression of MCT1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** EAELD interferes with the energy metabolism of EC9706 cells in CAF-conditioned medium, and its mechanism may be related to regulation of HK2, PKM2, GLUT1, MCT1 and MCT4 mRNA and protein expression.

**【Keywords】** cancer-associated fibroblasts; conditioned medium; ethyl acetate extract of Liuqunzi Decoction; energy metabolism; esophageal cancer

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

食管癌(esophageal carcinoma, EC)是常见的消化道恶性肿瘤之一,根据 2020 年中国癌症调查报告显示,食管癌是发病率排名第六位的恶性肿瘤<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 18%左右<sup>[2-4]</sup>。

肿瘤细胞的生长与肿瘤微环境中存在的癌相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)关系密切。在肿瘤微环境中,CAFs 是肿瘤微环境中含量最丰富的细胞,可为肿瘤细胞提供各种能量物质,促进肿瘤细胞生长、增殖<sup>[5-7]</sup>。因此,CAFs 对肿瘤细胞的能量代谢有着重要作用。

前期研究发现六君子汤乙酸乙酯提取物(ethyl acetate extract of Liuqunzi Decoction, EAELD)可以通过调节 AMPK/mTOR 通路影响 EC9706 细胞的能量代谢,抑制该细胞的活性,并增强化疗药顺铂对 EC9706 细胞的疗效<sup>[8]</sup>,且 70%~80%细胞融合度的 CAFM,含量为 60%时能够明显促进 EC9706 细胞的能量代谢,因此,本研究拟通过 CAFs 与 EC9706 细胞体外间接共培养,探讨 EAELD 是否通过干预 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞的能量代谢,进而影响肿瘤细胞的增殖,为六君子汤的临床应用提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

人食管鳞癌 EC9706 细胞,由河南中医药大学分子生物中心提供,本实验室传代培养。人癌相关成纤维细胞(CAFs),由课题组分离并鉴定。

### 1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基(货号:12100)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(货号:T1300)、噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 货号:M8180)(Solarbio 公司);胎牛血清(Lonsera 公司,货号:A97E00G);二甲基亚砜(DMSO, Amresco 公司,货号:D8370);乳酸测试盒(南京建成生物工程研究所,货号:A019-2-1);葡萄糖比色法测试盒(Elibscience 公司,货号:E-BC-K234-M);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 M2 型丙酮酸激酶抗体(Pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2, 货号:4053s);兔抗人 p-PKM2 抗体(货号:3827s)、兔抗人己糖激酶 2 抗体(Hexokinase 2, HK2, 货号:2867s)、兔抗人  $\alpha$ -微管蛋白抗体( $\alpha$ -Tubulin, 货号:2125s)(CST 公司)、兔抗人葡萄糖转运蛋白 1 抗体(Glucose transporter 1, GLUT1, 货号:YN4056)、兔抗人单羧酸转运体-1 抗体(monocarboxylic acid transporter 1, MCT1, 货号:ab179832)、兔抗人 MCT4 抗体(Monocarboxylic acid transporter 4, 货号:ab234728)(Immunoway 公司);反转录试剂盒(Toyobo 公司,货号:117000);2 $\times$  SYBR<sup>®</sup> Green(武汉 ABclonal 公司,货号:RM21203)。

酶标仪(BIO-TEK 公司,型号:ELx-800);CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 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(美国 Agilent 公司,型号:Seahorse XFe96);倒置显微镜(德国 Laica 公司,型号:DFC450C);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,型号:QuantStudio™ 6 Flex);荧光分光光度计(美国 Thermo 公司,型号:NanoDrop One);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:PowerPac Basic);凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:Universal Hood II)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 六君子汤乙酸乙酯部位提取

六君子汤组成参照《医学正传》,按照人参:白术:茯苓:甘草:陈皮:半夏=1:1.5:1:1:1:1.5 打成粗粉混匀,以 M(药物重量):V(70%乙醇体积)=1:8 比例混匀于圆底烧瓶内,设置加热温度为 50℃,煮沸 1.5 h 后,8 层纱布过滤药渣,重复两次。将药液静置过夜后进行浓缩,浓缩体积大约与生药总重量相当,浓缩液与乙酸乙酯体积比为 2:1 进行萃取,萃取 6 次,合并萃取液,过滤,旋转蒸发仪回收乙酸乙酯后,水浴锅浓缩,低温真空干燥,称重,为 EAELD。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。

#### 1.3.2 细胞的传代与培养

EC9706 细胞与 CAFs 均采用由 10% 的胎牛血清和 90% DMEM 含双抗的高糖培养基配制成的完全培养基进行培养,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,待细胞融合度达 80%~90% 进行 1:3~1:5 传代。

#### 1.3.3 条件培养基的制备

取对数生长期的 CAFs 细胞,根据实验所需的细胞数,用 8 mL 完全培养基重悬,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中,培养 24 h 后,使细胞融合度达 70%~80%,1 mL PBS 洗涤后,依次加入 10 mL 不含胎牛血清的 DMEM 含双抗高糖培养基,继续培养 48 h 后,收集培养基为 CAFM, -20℃ 保存 1 周, -80℃ 长期保存。

#### 1.3.4 MTT 法检测 EAELD 对 EC9706 细胞增殖的影响

取对数生长期的 EC9706 细胞,每孔  $1 \times 10^4$  个接种于 96 孔板里,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h,用不含胎牛血清的 DMEM 含双抗高糖培养基,将 EAELD 工作液配制为不同浓度(0、10、20、40、60、80 μg/mL),置于 CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养 48 h。按照

DMEM:5 mg/mL MTT=9:1,每孔 100 μL 加入 MTT 工作液,4 h 后,每孔加入 150 μL 的 DMSO,酶标仪检测 570 nm 波长下各孔吸光值,计算各组药物抑制率,选取 IC<sub>30</sub>、IC<sub>50</sub> 为后续实验用药,实验重复 3 次。药物抑制率=(空白对照组 OD 值-用药组 OD 值)/空白对照组 OD 值×100%

#### 1.3.5 能量代谢分析系统检测 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢的影响

取对数生长期的 EC9706 细胞,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<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后,根据 1.3.4 中 MTT 检测结果加药,选取浓度为 25 μg/mL 作为低剂量组、40 μg/mL 作为高剂量组,用条件培养基配制 EAELD 工作液,分别处理细胞,继续培养 48 h。不添加 EAELD 的计作 CAFM 组。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。

#### 1.3.6 比色法检测 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞上清乳酸含量及葡萄糖摄取量

取对数生长期的 EC9706 细胞,按照一定数量接种于 6 孔板中,培养 24 h 后加药(分组同 1.3.5),继续培养 48 h 后,收集细胞上清,1500 r/min,5 min 离心,PBS 稀释 3~5 倍。按说明书要求进行检测,并测定条件培养基中乳酸、葡萄糖的浓度,计算加药培养后培养基中乳酸、葡萄糖含量的变化。

#### 1.3.7 RT-qPCR 法检测 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子 mRNA 表达的影响

细胞分组同(1.3.5),用 TRIzol 提取总 RNA,超微量分光光度计测定总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处 A 值,计算 RNA 浓度,以 10 μL 体系进行反转录,再以 10 μL 体系对 c-DNA 进行扩增,以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算各个样品中目的 mRNA 相对表达量。引物由郑州点睛公司设计合成,序列见表 1。

#### 1.3.8 Western blot 法检测 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子蛋白表达的影响

细胞分组同(1.3.5),以 RIPA 裂解液:蛋白磷酸酶抑制剂:蛋白酶抑制剂=100:1:1 的比例,配制细胞裂解液混合物,每孔加入 100 μL 裂解细胞,按 BCA 试剂盒说明测定蛋白浓度,98℃ 变性 8 min,取 20 μg 蛋白上样,用 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜 75 min,5% 脱脂牛奶室温封闭 4 h,一抗 HK2、PKM2、p-PKM2、GLUT1、MCT1、α-

Tubulin 按照 1 : 1000 比例稀释, MCT4 按照 1 : 3000 比例稀释, 孵育 4℃ 过夜, TBST 漂洗 3 次, 二抗按照 1 : 1000 比例稀释, 室温孵育 1 h, 再次漂洗 3 次, 配制 ECL 发光显影液, 上机检测, 显影拍照。以  $\alpha$ -Tubulin 为内参, 使用“Image Lab”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。

#### 1.4 统计学方法

每组实验重复 3 次, 数据采用 IBM SPSS 21.0 软件进行分析, 结果采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )进行描述。若结果符合正态分布且方差齐, 两组之间对比采用独立样本 *t* 检验; 多组之间比较则采用单因素方差分析, 两两对比以 LSD 为统计依据。若符合正态分布, 方差不齐, 以 Dunnett *T3* 为统计依据。若不符合正态分布, 则选择非参数检验。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EAELD 对食管癌 EC9706 细胞增殖的影响

与 DMEM 组相比, 除 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组外, 不同浓度

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	序列 Sequence
hGLUT1-F	5'-ATTGGCTCCGGTATCGTCAAC-3'
hGLUT1-R	5'-GCTCAGATAGGACATCCAGGGTA-3'
hHK2-F	5'-GGCACAGACATCATTATGGGTC-3'
hHK2-R	5'-GATGCAGACTGTGCGTGG-3'
hPKM2-F	5'-ATGTCGAAGCCCCATAGTGAA-3'
hPKM2-R	5'-TGGGTGGTGAATCAATGTCCA-3'
h $\beta$ -Actin-F	5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3'
h $\beta$ -Actin-R	5'-GCTGATCCACATCTGTGGAA-3'
hMCT1-F	5'-GGTGGAGGTCCTATCAGCAGT-3'
hMCT1-R	5'-CAGAAAGAAGCTGCAATCAAGC-3'
hMCT4-F	5'-AGGTATCCTTGAGACGGTCCAG-3'
hMCT4-R	5'-CAAGCAGTTAGTGATGCCG-3'

表 2 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞线粒体能力的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effects of EAELD of soup on mitochondrial capacity of EC9706 cells under CAFM

线粒体压力指标 (pmol/min) Mitochondrial pressure index	EAELD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	0	25	40
非线粒体耗氧 Non-mitochondrial oxygen consumption	77.80 $\pm$ 10.44	40.80 $\pm$ 4.84**	17.00 $\pm$ 3.03**
基础呼吸值 Basal respiration value	115.40 $\pm$ 6.89	61.00 $\pm$ 10.85**	24.72 $\pm$ 1.68**
最大呼吸值 Maximum respiration value	162.26 $\pm$ 9.81	79.94 $\pm$ 10.44**	34.69 $\pm$ 3.28**
合成 ATP 耗氧量 Oxygen consumption of ATP synthesis	11.16 $\pm$ 2.15	5.41 $\pm$ 2.3**	1.59 $\pm$ 2.15**
备用呼吸能力 Spare respiration capacity	46.86 $\pm$ 9.23	18.94 $\pm$ 3.27**	9.97 $\pm$ 3.33**

注: 与 CAFM 组相比, \*\* $P<0.01$ 。

Note. Compared with CAFM group, \*\* $P<0.01$ .

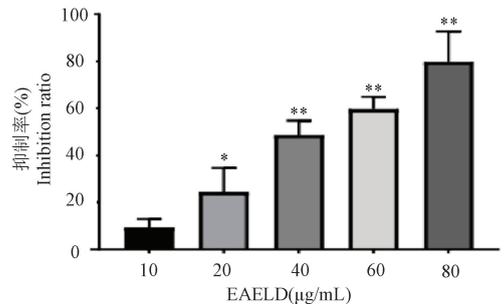
的 EAELD 对 EC9706 细胞的增殖均有抑制作用( $P<0.05$ ), 抑制率随 EAELD 浓度的升高而升高, 选取 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  分别为低浓度组、高浓度组。见图 1。

### 2.2 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢的影响

与 CAFM 组相比, EAELD 低剂量组和高剂量组都能够显著降低非线粒体耗氧、基础呼吸值、最大呼吸值、合成 ATP 耗氧量、备用呼吸能力、基础糖酵解、补偿糖酵解、糖酵解潜能( $P<0.01$ ), EAELD 高剂量组能够下调 EC9706 细胞的线粒体耗氧与基础糖酵解比值( $P<0.05$ )。见表 2、表 3, 图 2。

### 2.3 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞上清乳酸含量及葡萄糖摄取量的影响

与 CAFM 组相比, EAELD 高剂量组能够减少 CAFM 培养的 EC9706 细胞葡萄糖摄取( $P<0.05$ ), EAELD 低剂量组和高剂量组均能减少 CAFM 培养的 EC9706 细胞上清乳酸含量( $P<0.01$ )。见图 3。



注: 与 DMEM 组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

图 1 EAELD 对 EC9706 细胞增殖的影响( $n=3$ )

Note. Compared with DMEM group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

Figure 1 Effects of EAELD on EC9706 cell proliferation

### 2.4 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子 mRNA 表达的影响

与 CAFM 组相比,EAELD 的低剂量组和高剂量组都能够下调 GLUT1 的 mRNA 表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );EAELD 低剂量组能够下调 MCT1 的 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 3 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞糖酵解能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effects of EAELD on the glycolytic capacity of EC9706 cells under CAFM

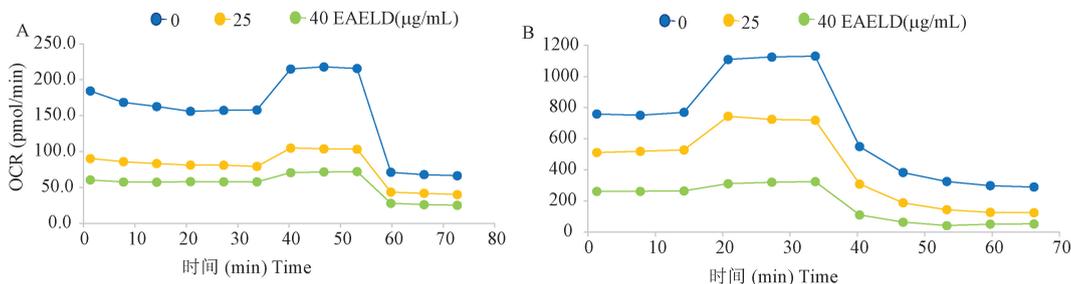
糖酵解指标 (pmol/min) Indicators of glycolysis	EAELD ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	0	25	40
基础糖酵解 Basal glycolysis	789.72 $\pm$ 146.04	410.18 $\pm$ 148.77**	311.11 $\pm$ 75.93**
补偿糖酵解 Compensative glycolysis	1274.88 $\pm$ 197.67	678.48 $\pm$ 169.42**	424.26 $\pm$ 129.51**
线粒体耗氧与基础;糖酵解比值 $\Delta$ Mitochondrial oxygen consumption and basal use; glycolytic ratio $\Delta$	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.02**
糖酵解潜能 Glycolytic potential	378.41 $\pm$ 73.27	210.1 $\pm$ 44.33**	88.03 $\pm$ 44.38**

注:  $\Delta$  表示该比值无单位。与 CAFM 组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。

Note.  $\Delta$  indicates the ratio has no unit. Compared with CAFM group, \*\*  $P < 0.01$ .

### 2.5 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子蛋白表达的影响

与 CAFM 组相比,EAELD 低剂量和高剂量组能够下调 p-PKM2、HK2、PKM2、MCT1 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ),EAELD 高剂量组能够下调 p-PKM2、GLUT1 的蛋白表达 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。见表 5,图 4。

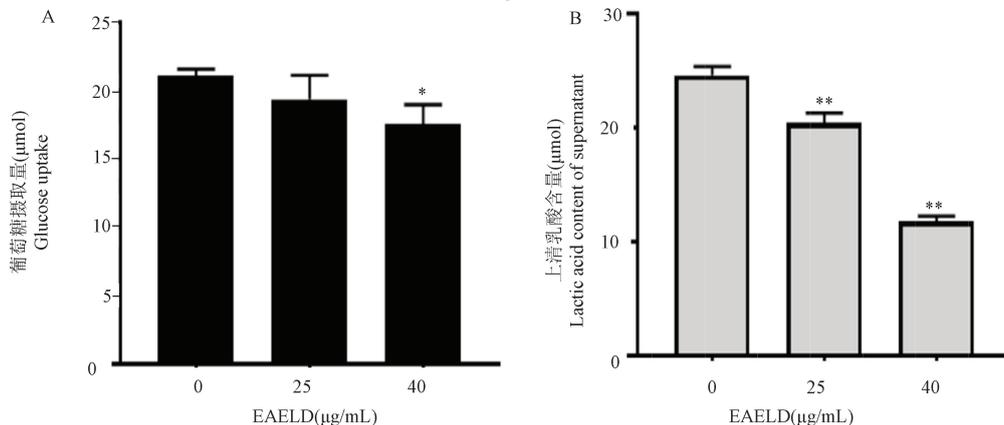


注: A: 线粒体呼吸能力; B: 糖酵解速率。

图 2 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞线粒体呼吸能力和糖酵解速率影响的“海马”曲线

Note. A, Mitochondrial respiratory capacity. B, Glycolysis rate.

Figure 2 “Hippocampus” curve of the effect of EAELD on mitochondrial respiratory capacity and glycolysis rate of EC9706 cells under CAFM



注: A: 葡萄糖摄取量; B: 上清乳酸含量。与 CAFM 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 3 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞代谢物质的影响 ( $n = 3$ )

Note. A, Glucose uptake. B, Lactic acid content of supernatant. Compared with CAFM group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 3 Effects of EAELD on the metabolism of EC9706 cells under CAFM

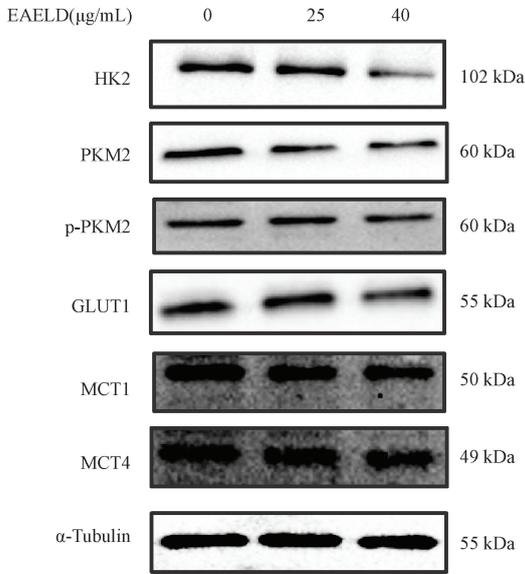


图 4 EAELD 对 CAFM 中 EC9706 能量代谢相关分子蛋白的影响

Figure 4 Effects of EAELD on molecular proteins related to EC9706 energy metabolism in CAFM

表 4 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effects of EAELD on mRNA expression related to energy metabolism in EC9706 cells under CAFM

mRNA 名称 mRNA name	EAELD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	0	25	40
HK2	1	0.85±0.06	1.45±0.4
PKM2	1	0.82±0.21	0.9±0.18
GLUT1	1	0.71±0.15*	0.64±0.07**
MCT1	1	0.72±0.16*	0.99±0.14
MCT4	1	1.04±0.28	0.96±0.27

注:与 CAFM 组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

Note. Compared with CAFM group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

表 5 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effects of EAELD on molecular protein expression related to energy metabolism in EC9706 cells under CAFM

蛋白名称 Protein name	EAELD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	0	25	40
p-PKM2	0.31±0.06	0.31±0.01	0.2±0.03**
HK2	1.74±0.52	0.86±0.17**	0.8±0.33**
PKM2	1.42±0.29	0.71±0.25**	0.42±0.2**
GLUT1	0.65±0.12	0.51±0.1	0.39±0.13*
MCT1	0.47±0.03	0.28±0.06**	0.23±0.08**
MCT4	0.1±0.02	0.15±0.03	0.16±0.04

注:与 CAFM 组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

Note. Compared with CAFM group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

### 3 讨论

食管癌属于中医学“噎膈”病的范畴。食管癌的发生与脾胃功能异常有着密切联系,正如《灵枢·四时气》曰:“饮食不下,膈塞不通,邪在胃脘”<sup>[9]</sup>。脾胃失调是其主要病机,健脾和胃法是治疗“脾胃失调”这一病机的常用方法,也是食管癌的常用治法之一,其代表方为六君子汤,该方出自《医学正传》,由人参、白术、茯苓、甘草、陈皮、半夏,六味药物组成,全方共奏益气健脾、燥湿化痰之效,是治疗食管癌的常用方药,临床应用发现六君子汤具有抗肿瘤、对放疗化疗增效减毒、调节恶性肿瘤患者免疫功能等作用<sup>[10]</sup>。

肿瘤细胞与 CAFs 细胞的能量交互,是在单羧酸转运蛋白(MCTs)的作用下,肿瘤细胞与 CAFs 之间实现了乳酸、丙酮酸的高效利用<sup>[11-13]</sup>,前期研究发现随着 EAELD 浓度的增加,对 EC9706 的抑制率也随之增加,并且调节 AMPK/mTOR 通路影响 EC9706 细胞的能量代谢<sup>[8]</sup>,其次发现 70%~80% 细胞融合度的 CAFs 条件培养基在 60% 的浓度时对 EC9706 的增殖作用最明显,基于此,本研究以 CAFs 条件培养基培养的 EC9706 细胞为对象,研究 EAELD 能否干预其能量代谢。

首先采用 Seahorse 能量代谢分析系统检测 EAELD 对 CAFs 条件培养基下的 EC9706 细胞能量代谢的影响。结果显示 EAELD 的低剂量组和高剂量组均可以明显抑制在 CAFM 中的 EC9706 细胞糖酵解能力和线粒体呼吸能力。由于糖酵解利用 1 分子葡萄糖可生成 2 分子的三磷酸腺苷(ATP),因此癌细胞需要增加葡萄糖的摄取来维持高水平的糖酵解,而 EAELD 可以减少 CAFM 培养的 EC9706 细胞的葡萄糖的摄取与上清中乳酸的含量。

GLUT1 是转运葡萄糖的关键蛋白, GLUT1 顺浓度梯度将葡萄糖转运至细胞内,为肿瘤细胞提供代谢原料<sup>[14]</sup>。HK2、PKM2 作为糖酵解限速酶, HK2 能够与线粒体外膜的电压依赖性阴离子选择性通道蛋白 1(VDAC1)相互作用并结合,促进 ATP 合成相关酶的激活,增强 ATP 的产生、促进糖酵解、抑制细胞凋亡,为肿瘤细胞提供合成大分子的碳源<sup>[15-17]</sup>。PKM2 是糖酵解过程的最后一个限速酶,可将磷酸烯醇式丙酮酸快速转化为丙酮酸、加快糖酵解速率、产生更多的 ATP<sup>[18-21]</sup>。PKM2 的翻译后修饰影响着 PKM2 的活性, PKM2 的酪氨酸残基 105

(Y105) 被磷酸化后,能够促进 PKM2 二聚体的形成,抑制四聚体活性,增加肿瘤细胞的生物合成,以促进肿瘤细胞的增殖<sup>[22-23]</sup>。MCTs 能够催化 L-乳酸、丙酮酸等单羧酸盐和酮体跨质膜的质子连接转运,在肿瘤代谢中起着至关重要的作用<sup>[24-25]</sup>,其中 MCT1 根据细胞内外的主要底物浓度以及跨质膜的 pH 梯度,进行 L-乳酸在质膜上的转运,而 MCT4 在糖酵解活跃的组织中表达更多,主要作用是从细胞中排出乳酸<sup>[24,26]</sup>, CAFs 与肿瘤细胞之间可通过 MCT1、MCT4 实现乳酸的高效利用,促进糖酵解与氧化磷酸化能力的增强,促进肿瘤细胞的代谢与增殖<sup>[27-28]</sup>。研究结果显示,EAELD 能够下调 GLUT1、MCT1 的 mRNA 表达,降低 GLUT1、HK2、PKM2、MCT1、p-PKM2 蛋白的表达,因此 EAELD 能够通过调控 GLUT1、HK2、PKM2、MCT1 分子,抑制 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞的能量代谢。

此外,研究中发现 MCT1、HK2、PKM2 mRNA 的水平随着 EAELD 浓度的浓度升高而升高,其原因可能是 MCT1 对乳酸亲和力高于 MCT4,MCT4 在低氧条件下更为活跃,在缺少 MCT4 的细胞中,MCT1 根据细胞内外乳酸水平,决定乳酸进出细胞<sup>[29-30]</sup>,由此推测在常氧环境中,EC9706 细胞主要由 MCT1 实现乳酸的转运。由于肿瘤细胞的代谢途径会随环境变化而变化,有研究表明:血清饥饿后,人胶质瘤细胞 U251 的氧化磷酸化水平会增加,糖酵解能力被抑制<sup>[31]</sup>,因此推测肿瘤细胞在血清饥饿与 EAELD 的干预下,其代谢方式主要为糖酵解,MCT1 的表达升高用于转运乳酸。而 HK2、PKM2 虽然有升高趋势,但是并无统计学差异,其次从 mRNA 到蛋白,中间受较多因素的调控,其中翻译效率、蛋白质的降解都会影响最终蛋白的表达,具体机制尚不明确,将进行进一步验证。

综上所述,EAELD 能够干预 CAFM 下 EC9706 细胞的能量代谢的影响,其机制与其能够调控 HK2、PKM2、GLUT1、MCT1、MCT4 的 mRNA 和蛋白表达相关。然而 EAELD 调控能量代谢相关通路的机制有待进一步深入研究。

#### 参考文献:

[ 1 ] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.

[ 2 ] GBD Oesophageal Cancer Collaborators. The global, regional,

and national burden of oesophageal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(6): 582-597.

[ 3 ] Li T, Chen S, Zhang Z, et al. Chemotherapy plus radiotherapy versus radiotherapy in patients with small cell carcinoma of the esophagus: a SEER database analysis [J]. *Cancer Control*, 2021, 28: 1073274821989321.

[ 4 ] Tay SW, Li JW, Fock KM. Diet and cancer of the esophagus and stomach [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2021, 37(2): 158-163.

[ 5 ] Roy A, Bera S. CAF cellular glycolysis: linking cancer cells with the microenvironment [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 8503-8514.

[ 6 ] Higashino N, Koma YI, Hosono M, et al. Fibroblast activation protein-positive fibroblasts promote tumor progression through secretion of CCL2 and interleukin-6 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Lab Invest*, 2019, 99(6): 777-792.

[ 7 ] Tian B, Chen X, Zhang H, et al. Urokinase plasminogen activator secreted by cancer-associated fibroblasts induces tumor progression via PI3K/AKT and ERK signaling in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 42300-42313.

[ 8 ] 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.

[ 9 ] 佚名(战国). 黄帝内经灵枢 [M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2019.

[ 10 ] 孟丹华, 李晨旭, 尚艺婉, 等. 六君子汤治疗恶性肿瘤的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(1): 172-174.

[ 11 ] Draoui N, Feron O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments [J]. *Dis Model Mech*, 2011, 4(6): 727-732.

[ 12 ] Wanandi SI, Ningsih SS, Asikin H, et al. Metabolic interplay between tumour cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) under hypoxia versus normoxia [J]. *Malays J Med Sci*, 2018, 25(3): 7-16.

[ 13 ] Lin RY, Vera JC, Chaganti RS, et al. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(44): 28959-28965.

[ 14 ] Deng Y, Zou J, Deng T, et al. Clinicopathological and prognostic significance of GLUT1 in breast cancer: a meta-analysis [J]. *Medicine*, 2018, 97(48): e12961.

[ 15 ] Xu S, Herschman HR. A tumor agnostic therapeutic strategy for hexokinase 1-null/hexokinase 2-positive cancers [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(23): 5907-5914.

[ 16 ] Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the Warburg Effect and a pivotal target for effective therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2009, 19(1): 17-24.

[ 17 ] Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers'

- most common phenotypes, the “Warburg Effect”, i. e., elevated glycolysis in the presence of oxygen [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2007, 39(3): 211-222.
- [18] Anastasiou D, Yu Y, Israelsen WJ, et al. Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis [J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(10): 839-847.
- [19] Azoitei N, Becher A, Steinestel K, et al. PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 $\alpha$  through NF- $\kappa$ B activation [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15: 3.
- [20] van Niekerk G, Engelbrecht AM. Role of PKM2 in directing the metabolic fate of glucose in cancer: a potential therapeutic target [J]. *Cell Oncol*, 2018, 41(4): 343-351.
- [21] Wong N, Ojo D, Yan J, et al. PKM2 contributes to cancer metabolism [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2 Pt A): 184-191.
- [22] Hitosugi T, Kang S, Vander Heiden MG, et al. Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth [J]. *Sci Signal*, 2009, 2(97): ra73.
- [23] Wang P, Sun C, Zhu T, et al. Structural insight into mechanisms for dynamic regulation of PKM2 [J]. *Protein Cell*, 2015, 6(4): 275-287.
- [24] Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family-structure and functional characterization [J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(1): 1-9.
- [25] 白日兰, 白玲, 李薇, 等. 乳酸及其转运蛋白对肿瘤和免疫的影响及相关治疗进展 [J]. *肿瘤代谢与营养电子杂志*, 2021, 8(3): 245-250.
- [26] Sáenz-de-Santa-María I, Bernardo-Castañeira C, Secades P, et al. Clinically relevant HIF-1 $\alpha$ -dependent metabolic reprogramming in oropharyngeal squamous cell carcinomas includes coordinated activation of CAIX and the miR-210/ISCU signaling axis, but not MCT1 and MCT4 upregulation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8): 13730-13746.
- [27] Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(12): 3930-3942.
- [28] Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate [J]. *Nature*, 2017, 551(7678): 115-118.
- [29] Halestrap AP. Monocarboxylic acid transport [J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(4): 1611-1643.
- [30] 王先知, 张配, 崇殿龙, 等. MCT1 抑制剂 AZD3965 增强肝癌细胞对表柔比星敏感性的作用 [J]. *山西医科大学学报*, 2018, 49(10): 1170-1174.
- [31] Liu Z, Sun Y, Tan S, et al. Nutrient deprivation-related OXPHOS/glycolysis interconversion via HIF-1 $\alpha$ /C-MYC pathway in U251 cells [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(5): 6661-6671.

[收稿日期]2022-11-25

## “实验动物伦理与福利”专题征稿启事

生命科学研究的飞速发展、与国内外合作交流的日益频繁,使得实验动物福利伦理的重要性日益凸显。为进一步学习、发展我国对实验动物伦理与福利相关内容的建设,《中国比较医学杂志》特组织专题、发起征稿,从不同角度对“实验动物伦理与福利”进行深入研究与探讨。诚挚欢迎国内外专家学者投稿。

### 一、征稿主题

实验动物伦理与福利

### 二、稿件形式

综述、专家观点

### 三、投稿须知

投稿请访问《中国比较医学杂志》网站 (<http://zgsydw.cnjournals.com/zgbjyxzz/home>), 遵循正常稿件提交程序,并在备注栏中填写“实验动物伦理与福利专题”。基于作者研究工作的严谨科学报告,稿件将按照常规论文要求进行同行评审。

本专题来稿一律走绿色通道,快审、快编校、快数字出版。发表周期一般控制在 2~3 个月。

如果您有其它问题,请与编辑部联系 010-67779337。