

引用:张振悍,郭建鑫,张晨辰,周露,李金歌,崔子悦,吴忠冰,李晶.绞股蓝水提物调控SRPX2/PI3K/Akt通路抑制食管癌细胞增殖、迁移和侵袭[J].中医药导报,2026,32(3):6-11.

绞股蓝水提物调控SRPX2/PI3K/Akt通路抑制食管癌细胞增殖、迁移和侵袭*

张振悍¹,郭建鑫¹,张晨辰¹,周露¹,李金歌¹,崔子悦¹,吴忠冰¹,李晶^{1,2}
(1.河北医科大学中西医结合学院,河北石家庄 050017;
2.河北医科大学第四医院,河北石家庄 050019)

[摘要] 目的:探究绞股蓝(GpM)水提物对食管癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其作用机制。方法:制备不同浓度的GpM水提物药液,通过细胞计数试剂盒-8(CCK-8)实验检测GpM水提物对人源食管癌细胞KYSE-150、Eca-109和人永生上皮细胞NE-1增殖能力的影响;通过细胞克隆形成实验检测GpM水提物对人源食管癌细胞克隆形成能力的影响;通过细胞划痕愈合实验检测GpM水提物对食管癌细胞迁移能力的影响;通过Transwell实验检测GpM水提物对食管癌细胞迁移和侵袭能力的影响;通过蛋白质印迹(Western blotting)法检测GpM水提物作用后各组SRPX2/PI3K/Akt信号通路关键蛋白(SRPX2、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt)的表达。结果:CCK-8实验结果显示,GpM水提物可显著抑制食管癌细胞增殖[KYSE-150:48 h $F_{(4,10)}=49.96, P<0.001$;3.2 mg/mL(42.63±5.20)%, $P<0.001$ 。Eca-109:48 h $F_{(4,10)}=28.53, P<0.001$;3.2 mg/mL(38.27±6.70)%, $P<0.001$],但对正常食管细胞NE-1活力的影响较弱[48 h 3.2 mg/mL处理组细胞活力保持(57.16±1.94)%]。细胞克隆形成实验证实,1.6 mg/mL GpM水提物可以显著抑制克隆形成[KYSE-150: $F_{(2,6)}=225.20, P<0.001$;(87±2)个, $P<0.001$ 。Eca-109: $F_{(2,6)}=61.64, P<0.001$;(106±25)个, $P<0.001$]。细胞划痕愈合实验表明,1.6 mg/mL GpM水提物能显著抑制细胞迁移[KYSE-150: $F_{(2,6)}=51.84, P<0.001$;(14.96±0.31)%, $P<0.001$ 。Eca-109: $F_{(2,6)}=24.63, P=0.001$;(7.33±3.51)%, $P=0.001$]。Transwell实验则进一步证实,该浓度GpM水提物既可抑制细胞迁移[KYSE-150: $F_{(2,6)}=15.31, P=0.004$;(2 121±227)个, $P=0.003$],也能抑制细胞侵袭[Eca-109: $F_{(2,6)}=6.02, P=0.037$;(474±101)个, $P=0.026$]。Western blotting分析进一步揭示,1.6 mg/mL GpM水提物可有效下调SRPX2/PI3K/Akt信号通路活性[KYSE-150 SRPX2: $F_{(2,6)}=517.00, P<0.001$;(0.06±0.03), $P<0.001$ 。Eca-109 p-Akt/Akt: $F_{(2,6)}=16.27, P=0.004$;(0.63±0.08), $P=0.002$]。结论:GpM水提物能够抑制食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并伴随SRPX2/PI3K/Akt通路关键蛋白表达的改变。

[关键词] 食管癌;绞股蓝;SRPX2/PI3K/Akt通路;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2026)03-0006-06

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2026.03.002

The Water Extract of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino Inhibits the Proliferation, Migration, and Invasion of Esophageal Cancer Cells by Regulating the SRPX2/PI3K/Akt Pathway

ZHANG Zhenhan¹, GUO Jianxin¹, ZHANG Chenchen¹, ZHOU Lu¹, LI Jinge¹, CUI Ziyue¹, WU Zhongbing¹, LI Jing²
(1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang Hebei 050017, China;
2. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang Hebei 050019, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect and mechanism of the water extract of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (GpM) on the proliferation, migration, and invasion of esophageal cancer cells. Methods: Different concentrations of GpM water extract were prepared. The Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the effect of GpM water extract on the proliferation of human esophageal cancer cell lines KYSE-150, Eca-109, and human immortalized esophageal epithelial cell line NE-1. The effect of GpM water extract on the colony

*基金项目:国家自然科学基金项目(82274593);河北省中医药管理局项目(2024110);河北省自然科学基金项目(H2023206137);河北省高等学校科学技术研究项目(BJK2024113);河北医科大学2022年大学生创新性实验计划(USIP2023219)
通信作者:李晶,女,主任医师,教授,研究方向为中医、中西医结合防治肿瘤

formation ability of human esophageal cancer cells was detected by a colony formation assay. The effect of GpM water extract on the migration ability of esophageal cancer cells was detected by a wound healing assay. The effects of GpM water extract on the migration and invasion abilities of esophageal cancer cells were detected by Transwell assays. Western blotting was used to detect the expression of key proteins (SRPX2, PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt) in the SRPX2/PI3K/Akt signaling pathway in each group after treatment with GpM water extract. Results: CCK-8 assay results showed that the GpM water extract significantly inhibited the proliferation of esophageal cancer cells [KYSE-150: 48 h $F_{(4,10)}=49.96$, $P<0.001$; at 3.2 mg/mL, cell viability was $(42.63\pm 5.20)\%$, $P<0.001$. Eca-109: 48 h $F_{(4,10)}=28.53$, $P<0.001$; at 3.2 mg/mL, cell viability was $(38.27\pm 6.70)\%$, $P<0.001$], but had a weaker effect on the viability of normal esophageal NE-1 cells [at 48 h, cell viability in the 3.2 mg/mL treatment group remained at $(57.16\pm 1.94)\%$]. The colony formation assay confirmed that 1.6 mg/mL GpM water extract significantly inhibited colony formation [KYSE-150: $F_{(2,6)}=225$, $P<0.001$; colony number was (87 ± 2) , $P<0.001$. Eca-109: $F_{(2,6)}=61.64$, $P<0.001$; colony number was (106 ± 25) , $P<0.001$]. The wound healing assay showed that 1.6 mg/mL GpM water extract significantly inhibited cell migration [KYSE-150: $F_{(2,6)}=51.84$, $P<0.001$; migration rate was $(14.96\pm 0.31)\%$, $P<0.001$. Eca-109: $F_{(2,6)}=24.63$, $P=0.001$; migration rate was $(7.33\pm 3.51)\%$, $P=0.001$]. The Transwell assay further confirmed that this concentration of GpM water extract inhibited both migration [KYSE-150: $F_{(2,6)}=15.31$, $P=0.004$; migrated cell number was $(2\ 121\pm 227)$, $P=0.003$] and invasion [Eca-109: $F_{(2,6)}=6.02$, $P=0.037$; invasive cell number was (474 ± 101) , $P=0.026$]. Western blotting analysis further revealed that 1.6 mg/mL GpM water extract effectively downregulated the activity of the SRPX2/PI3K/Akt signaling pathway (KYSE-150 SRPX2 protein expression: $F_{(2,6)}=517$, $P<0.001$; expression level was (0.06 ± 0.03) , $P<0.001$. Eca-109 p-Akt/Akt ratio: $F_{(2,6)}=16.27$, $P=0.004$; ratio was (0.63 ± 0.08) , $P=0.002$). Conclusion: GpM water extract can inhibit the proliferation, migration, and invasion of esophageal cancer cells, which is accompanied by changes in the expression of key proteins of the SRPX2/PI3K/Akt pathway.

[Keywords] esophageal cancer; *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; SRPX2/PI3K/Akt pathway; cell proliferation; cell migration; cell invasion

食管癌是临床常见的恶性肿瘤,已经严重威胁人类健康,常常发现时便为晚期,故而错失手术机会。尽管食管癌患者可以进行放疗或免疫治疗^[1],但仍要面对高昂的治疗费用和治疗副作用。中医药参与食管癌的治疗可以达到减毒增效、提高患者生活质量和延长患者带瘤生存期等目的^[2],为治疗食管癌提供了更多应对策略。

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, GpM)又名七叶胆,多年生攀援草本,药用部位为葫芦科植物绞股蓝的全草。绞股蓝味苦、性寒,归肺、脾、肾经,具有益气健脾、清热解毒、生津止渴、化痰止咳的功效。GpM对多种恶性肿瘤^[3-7]均有明显疗效,但GpM对食管癌的作用及具体机制鲜有报道。

硫酸软骨素蛋白聚糖(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs)是肿瘤相关的蛋白聚糖,存在于细胞表面和结缔组织中,可参与血管形成、炎症反应和肿瘤发生等生物过程^[8-10]。磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路在人类多种癌症中经常被激活,在调节细胞增殖和凋亡中起核心作用^[11]。本课题组前期研究曾将绞股蓝和食管癌共同靶点进行KEGG通路富集分析,得到的结果显示GpM可能通过多种途径发挥治疗食管癌的作用^[12],其中这些治疗靶点主要集中在PI3K/Akt信号传导通路和肿瘤相关蛋白聚糖。含sushi重复的蛋白X连锁2(sushi repeat-containing protein, X-linked 2, SRPX2)是一种重要的CSPGs,而且与多种癌症^[13-15]的发生发展以及预后相关。目前,

越来越多的研究表明,SRPX2是PI3K/Akt信号通路的上游分子,且在肿瘤的发生和发展过程中发挥重要作用^[14-15]。但SRPX2/PI3K/Akt信号通路在GpM防治食管癌中作用的研究却未见报道。

本研究以人源食管癌细胞KYSE-150和Eca-109为研究对象,通过CCK-8、细胞克隆形成、细胞划痕愈合和Transwell等实验观察GpM对食管癌细胞增殖、迁移和侵袭等细胞功能的影响,并采用蛋白质印迹法验证GpM抗食管癌的具体机制,以期为临床上推广使用GpM治疗食管癌提供有力的支持。

1 材料与与方法

1.1 人源食管癌细胞系和人永生食管上皮细胞

人源食管癌细胞系KYSE-150、Eca-109和人永生食管上皮细胞NE-1均来自中国科学院上海细胞生物研究所,两种食管癌细胞均在含有1%青-链霉素、庆大霉素和10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的Roswell Park Memorial Institute-1640培养基(RPMI-1640)中培养,NE-1细胞在含有20%胎牛血清的DMEM完全培养基(VivaCell)中培养,培养条件要求37℃和5%的CO₂、湿度饱和,贴壁后传代培养以便进行后续实验。

1.2 GpM水提物药液的制备

制备GpM水提物冻干粉。GpM 100 g,购自北京同仁堂药店(批号:1603107768)。纯水浸泡GpM 30 min后加水没过药物一横指,煎煮2次。将煎煮的药液合并过滤并浓缩至100 mL,然后将药液转移至无菌培养皿内,密封置于-80℃冰箱中冷冻24 h后,用液氮冷冻干燥干燥

液,待药液干燥后收集并密封药物冻干粉(约5 g),置于-80℃冰箱中储存。将冻干粉根据不同实验需求用含10%和不含FBS的完全培养基配制相应质量浓度的药液,0.22 μm微孔滤膜除菌后,将其放入4℃冰箱储存备用。

1.3 主要试剂 CCK-8试剂盒(深圳市瑞帕特科技有限公司,批号:RK1028-500T);Phospho-PI3K p85 alpha (Tyr607)抗体(Affinity公司,批号:AF3241);SRPX2抗体(批号:GB113423-100)、PI3K抗体(批号:GB11525-100);Akt抗体(批号:GB15689-100)、p-Akt抗体(批号:GB150002-100)、RIPA裂解液(批号:G2002-30ML)、苯甲基磺酰氨(PMSF)(批号:G2008-1ML)、磷酸化蛋白酶抑制剂(批号:G2007-1ML)、5×蛋白上样缓冲液(批号:G2075-1ML)、10% PAGE彩色(红色)凝胶超快速配制试剂盒(批号:G2043-50T)、SWE快速高分辨电泳缓冲液(干粉)(批号:G2081-1L)、免冰浴快速转膜缓冲液(干粉)(批号:G2028-1L)、Tris缓冲盐水(TBS,粉末)(批号:G0001-2L)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;T-ween20(北京索莱宝科技有限公司,批号:9005-64-5);超敏ECL化学发光底物(MCE公司,批号:HY-K1005-100 mL);β-肌动蛋白(β-actin)抗体(武汉爱博泰克生物有限公司,批号:AC026);基质胶(Matrigel)(上海艾比瓦生物科技有限公司,批号:0827045);胰蛋白酶-EDTA(0.25%),含酚红(Gibco公司,批号:25200056)。

1.4 主要仪器 超净工作台(型号:Protect-2FD-S)、恒温水箱(型号:Fisher Scientific 205)、恒温金属浴(型号:LS-D202)均购自美国默飞世尔科技公司;4℃冰箱(型号:BCD-278KACB)、-20℃低温冰箱(型号:HYCD-282C)及-80℃超低温冰箱(型号:DW-86L388J)均购自海尔公司;细胞培养箱[香港力康生物医疗科技控股有限公司,型号:HF90(HT)];倒置显微镜(徕卡公司,型号:LEICA DMIL);离心机(美国赛默飞世尔科技公司,型号:Thermo 5425R);涡旋振荡器(北京大龙兴创实验仪器有限公司,型号:MX-S);制冰机(北京德天佑发展有限公司,型号:DTY-ZBJ-20)

1.5 细胞增殖实验 将KYSE-150、Eca-109和NE-1细胞分别以 2×10^3 个/孔的密度接种到96孔板中,每组设4个复孔。在37℃条件下培养24 h后,用含不同浓度GpM水提物的完全培养基(0.0 mg/mL、0.8 mg/mL、1.6 mg/mL、3.2 mg/mL、6.4 mg/mL)分别培养24 h、48 h、72 h。然后吸出旧培养基并在每个孔中加入100 μL含10% CCK-8试剂的培养基,在37℃条件下再培养2 h。最后,用酶标仪测量在450 nm下每个孔中的吸光密度(OD)值。

1.6 细胞克隆形成实验 将对数生长期的KYSE-150和Eca-109细胞分别以700个细胞每孔的密度接种到6孔培养板上,待细胞完全贴壁后用PBS清洗,再用0.0 mg/mL、0.8 mg/mL、1.6 mg/mL等浓度的GpM水提取物含药血清继续培养细胞到14 d或绝大多数单个克隆中细胞数大于50个,中途每隔3 d更换一次具有相应浓度GpM水提取物的新鲜培养基并观察细胞状态。克隆完成后用PBS洗涤,弃掉洗涤液后在每孔加入1 mL 4%多聚甲醛固定细胞15 min并用PBS洗涤2次,然后每孔加入1 mL 0.1%结晶紫染液染细胞15 min;最后用PBS洗涤细胞3次后晾干,再分别对整个6孔板及每个培养孔进行拍照,并通过ImageJ对细

胞集落进行计数。

1.7 细胞划痕愈合实验 将对数生长期的KYSE-150和Eca-109细胞分别以每孔 6×10^4 个的密度接种到6孔培养板上,待细胞贴壁完全后,用200 μL移液器吸头在每孔划痕,再用0.0 mg/mL、0.8 mg/mL、1.6 mg/mL等浓度的不含血清GpM水提取物培养基分别处理细胞0 h、24 h后置于倒置显微镜下拍照,观察划痕愈合情况,最后通过ImageJ软件测量划痕处的面积变化并计算划痕愈合率。

1.8 细胞侵袭实验 利用Transwell实验检测药物处理后食管癌细胞的迁移和侵袭能力,用基质胶进行细胞侵袭实验;或不使用基质胶进行细胞迁移实验。将对数生长期的KYSE-150和Eca-109细胞以每孔 2×10^5 个/mL的密度用含有不同浓度GpM水提取物(0.0 mg/mL、0.8 mg/mL、1.6 mg/mL)的无血清培养基重悬,并接种到Transwell小室的上室,每孔加入200 μL细胞悬液。下室加入500 μL的含10%胎牛血清的完全培养基。培养24 h后,用棉签擦拭上室细胞,之后用PBS清洗小室。迁移或侵袭的细胞用4%多聚甲醛溶液在24孔板内固定15 min后用PBS清洗,然后在0.1%结晶紫溶液里染色15 min后用PBS洗涤3遍。晾干后在倒置显微镜下放大200倍拍照,使用ImageJ软件计数。

1.9 蛋白质免疫印迹实验 用不同浓度的GpM水提取物(0 mg/mL、0.8 mg/mL、1.6 mg/mL)处理KYSE-150和Eca-109细胞24 h,然后用细胞刮刀刮下用RIPA裂解液裂解的细胞,离心后提取细胞总蛋白,并用BCA法测定浓度。将蛋白样品(每孔30 μg)在SDS-PAGE凝胶(10%)上浓缩分离并转移到0.45 μm的PVDF膜上。然后将膜放入5%脱脂奶粉中封闭2 h,再与TBST中的一抗(1:1 500)存放在4℃冰箱中过夜孵育。第2天回收一抗并洗膜后与HRP结合的二抗(1:10 000)再孵育1.5 h洗膜。最后,通过ECL发光试剂盒和X射线曝光,以对不同蛋白质的表达量进行可视化分析,并用ImageJ软件量化。其中β-actin被用作内参蛋白作为对照。

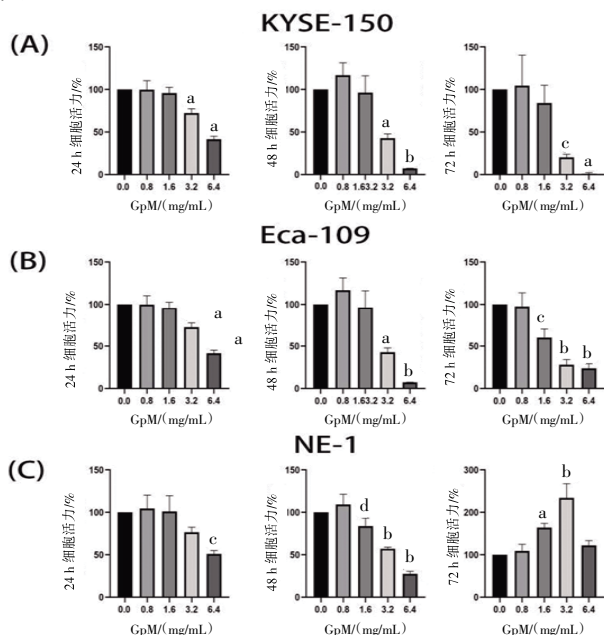
1.10 统计学方法 本实验数据采用GraphPad Prism8.0进行分析处理,计量资料以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组比较采用Turkey法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GpM水提取物对食管癌细胞增殖能力的影响 CCK-8实验显示,GpM水提取物能够抑制食管癌细胞增殖,但对正常细胞NE-1影响较弱。在KYSE-150细胞中,48 h处理组间差异显著[$F_{(4,10)}=49.96, P < 0.001$],3.2 mg/mL浓度下使细胞活力降至(42.63±5.20)%($P < 0.001$),6.4 mg/mL浓度下降至(7.15±0.27)%($P < 0.001$),且3.2 mg/mL浓度抑制作用随时间延长至72 h更为明显[(20.15±3.62)%, $P=0.001$]。在Eca-109细胞中,48 h组间差异同样显著[$F_{(4,12)}=28.53, P < 0.001$],3.2 mg/mL与6.4 mg/mL浓度能显著抑制细胞活力($P < 0.001$),72 h抑制效果持续增强。在NE-1正常细胞中,48 h虽也存有组间差异[$F_{(4,11)}=87.95, P < 0.001$],但3.2 mg/mL浓度处理后的细胞活力[(57.16±1.94)%, $P < 0.001$]高于同期食管癌细胞水平。(见图1)

此外,0.8 mg/mL与1.6 mg/mL在24 h对两种食管癌细胞活力均无显著影响[如KYSE-150细胞在0.8 mg/mL时:(99.95±

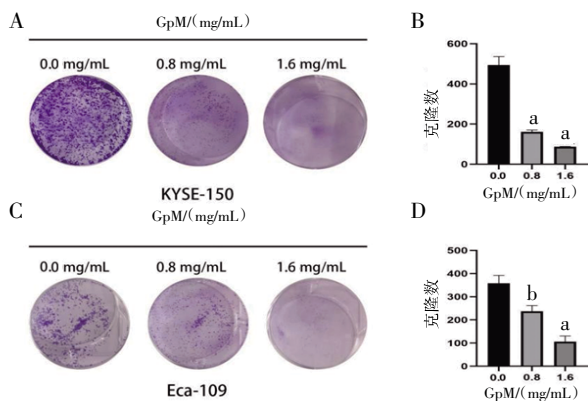
10.33)% , $P>0.999$] , 故选用这两种浓度研究药物非细胞毒性效应。



注:A.采用不同浓度GpM水提取物处理KYSE-150细胞24 h、48 h、72 h后检测细胞活力;B.采用不同浓度GpM水提取物处理Eca-109细胞24 h、48 h、72 h后检测细胞活力;C.采用不同浓度GpM水提取物处理NE-1细胞24 h、48 h、72 h后检测细胞活力。与对照组比较,^a $P<0.001$,^b $P<0.0001$,^c $P<0.01$,^d $P<0.05$ 。

图1 GpM水提取物对食管癌细胞增殖的抑制作用

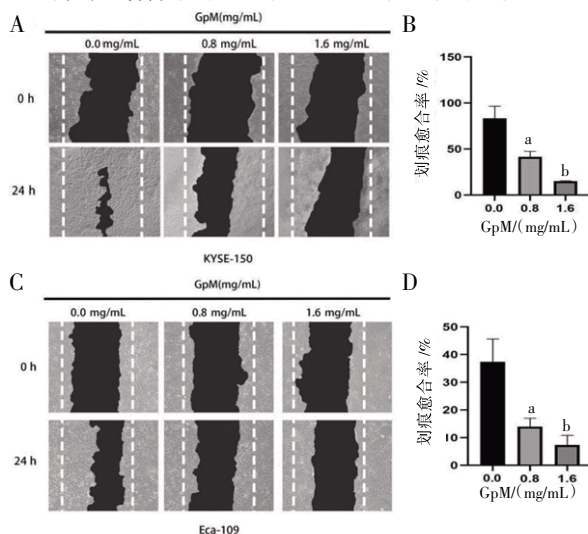
2.2 GpM水提取物对食管癌细胞克隆形成能力的影响 细胞克隆形成实验结果显示,GpM水提取物可显著抑制食管癌细胞的克隆形成能力。在KYSE-150细胞中,各浓度组间差异显著 [$F_{(2,6)}=225.20, P<0.001$],与对照组(494±42)个克隆相比,0.8 mg/mL GpM水提取物可使细胞克隆数量显著减少至(161±10) ($P<0.001$),1.6 mg/mL处理组的细胞克隆数进一步降至(87±2) ($P<0.001$)。在Eca-109细胞中同样观察到显著的抑制效应 [$F_{(2,6)}=61.64, P<0.001$],0.8 mg/mL与1.6 mg/mL GpM水提取物分别将细胞克隆数抑制至(237±25) ($P=0.003$)与(106±25) ($P<0.001$),均显著低于对照组(359±34)。(见图2)



注:A-B.经指定浓度GpM水提取物处理的KYSE-150细胞克隆形成情况及统计结果;C-D.经指定浓度GpM水提取物处理的Eca-109细胞克隆形成情况及统计结果。与对照组(0.0 mg/mL)比较,^a $P<0.0001$,^b $P<0.01$ 。

图2 GpM水提取物对食管癌细胞克隆形成的抑制作用

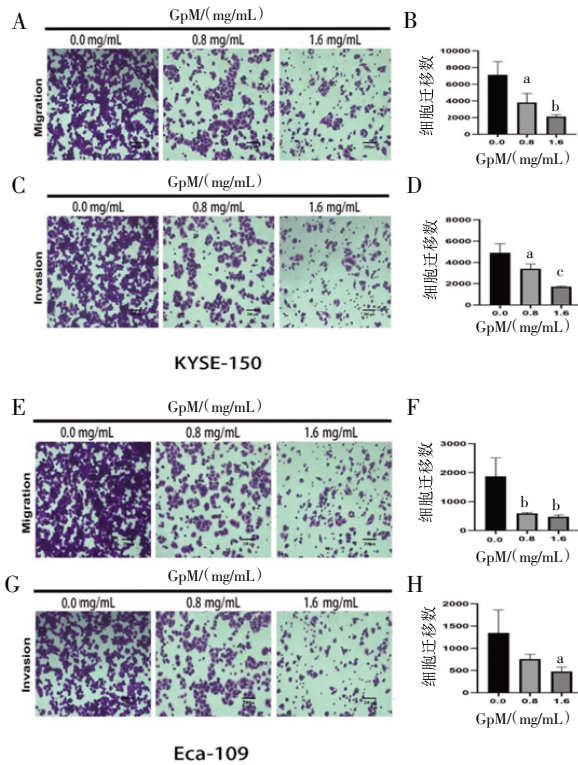
2.3 GpM水提取物对食管癌细胞迁移能力的影响 细胞划痕实验结果显示,GpM水提取物能够显著抑制食管癌细胞的迁移能力。在KYSE-150细胞中,各浓度组间差异显著 [$F_{(2,6)}=51.84, P<0.001$],与对照组[划痕愈合率(83.48±13.08)%]比较,0.8 mg/mL GpM水提取物能使愈合率显著降至(41.58±6.01)% ($P=0.002$),而1.6 mg/mL处理组的愈合率进一步降至(14.96±0.31)% ($P<0.001$)。在Eca-109细胞中同样观察到显著的迁移抑制 [$F_{(2,6)}=24.63, P=0.001$],0.8 mg/mL和1.6 mg/mL GpM水提取物分别将愈合率抑制至(14.00±3.00)% ($P=0.004$)与(7.33±3.51)% ($P=0.001$),均显著低于对照组(37.33±8.33)%。(见图3)



注:A-B.划痕试验结果显示经指定浓度GpM水提取物处理24 h的KYSE-150细胞迁移能力及实验统计结果;C-D.划痕试验结果显示经指定浓度GpM水提取物处理24 h的Eca-109细胞迁移能力及实验统计结果。与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.001$ 。

图3 GpM水提取物对食管癌细胞迁移的抑制作用

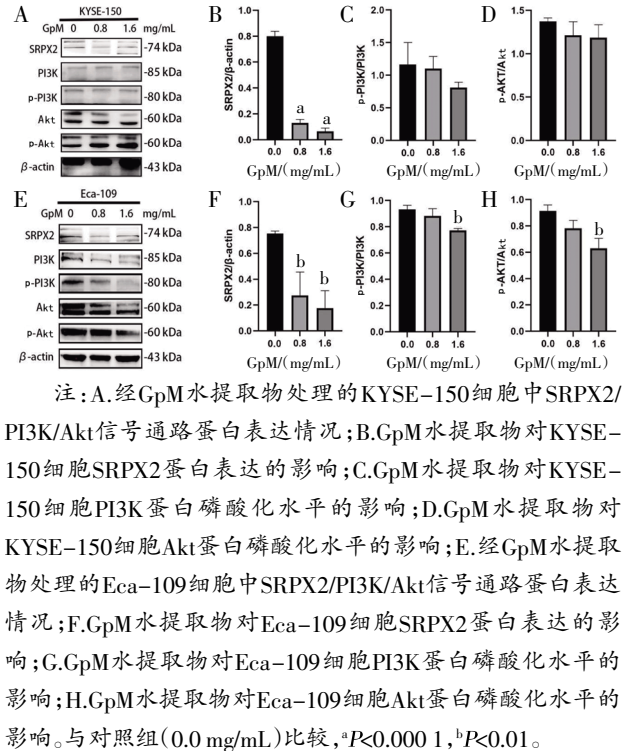
2.4 GpM水提取物对食管癌细胞迁移和侵袭能力的影响 Transwell实验结果显示,GpM水提取物能显著抑制食管癌细胞的迁移与侵袭能力。在细胞迁移实验中,KYSE-150细胞各浓度组间差异显著 [$F_{(2,6)}=15.31, P=0.004$],与对照组[(7 131±1602)个细胞]相比,0.8 mg/mL与1.6 mg/mL GpM水提取物分别使跨膜细胞数量显著减少至(3 803±1 097) ($P=0.020$)与(2 121±227) ($P=0.003$)。在Eca-109细胞中同样观察到显著的迁移抑制 [$F_{(2,6)}=13.08, P=0.007$],0.8 mg/mL与1.6 mg/mL处理组的跨膜细胞数 [(592±33), $P=0.001$; (472±64), $P=0.007$]均显著低于对照组(1 871±639)。在细胞侵袭实验中,KYSE-150细胞中组间差异显著 [$F_{(2,6)}=24.39, P=0.001$],与对照组(4 905±851)相比,0.8 mg/mL与1.6 mg/mL均可显著减少跨膜细胞数 [(3 395±459), $P=0.029$; (1 715±72), $P=0.001$]。Eca-109细胞中组间差异具有统计学意义 [$F_{(2,6)}=6.02, P=0.037$],与对照组(1 343±521)相比,0.8 mg/mL组[(754±110), $P=0.104$]和1.6 mg/mL组[(474±101), $P=0.026$]GpM水提取物均能减少跨膜细胞数。(见图4)



注:A-D.经指定浓度GpM水提取物处理24 h的KYSE-150细胞迁移、侵袭能力及统计结果;E-H.经指定浓度GpM水提取物处理24 h的Eca-109细胞迁移、侵袭能力及统计结果。与对照组(0.0 mg/mL)比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$,^c $P<0.001$ 。

图4 GpM水提取物对食管癌细胞迁移、侵袭的抑制作用

2.5 GpM水提取物对SRPX2/PI3K/Akt信号通路的影响 GpM水提取物能下调SRPX2/PI3K/Akt通路中关键蛋白的表达及磷酸化水平。在KYSE-150细胞中,GpM水提取物对SRPX2蛋白的表达具有显著抑制作用[$F_{2,6}=517.00, P<0.001$]。与对照组(0.80±0.04)相比,0.8 mg/mL处理能将其表达量显著降至(0.13±0.03) ($P<0.001$),1.6 mg/mL处理能将其表达量显著降至(0.06±0.03) ($P<0.001$)。同时,p-PI3K/PI3K[对照组:(1.17±0.33);0.8 mg/mL:(1.10±0.19), $P=0.916$;1.6 mg/mL:(0.81±0.08), $P=0.171$]与p-Akt/Akt[对照组:(1.37±0.04);0.8 mg/mL:(1.21±0.16), $P=0.278$;1.6 mg/mL:(1.19±0.15), $P=0.194$]的比例在数值上也有所下降,但组间差异无统计学意义(分别为 $P=0.203$ 与 $P=0.222$)。在Eca-109细胞中,GpM水提取物对SRPX2蛋白的表达具有显著抑制作用[$F_{2,6}=21.69, P=0.002$]。与对照组(0.75±0.02)相比,0.8 mg/mL处理能将其表达量显著降至(0.21±0.15), ($P=0.003$),1.6 mg/mL处理能将其表达量显著降至(0.14±0.15), ($P=0.002$)。同时显著下调了p-PI3K/PI3K[$F_{2,6}=14.48, P=0.005$]与p-Akt/Akt[$F_{2,6}=16.27, P=0.004$]的比例。其中,1.6 mg/mL的GpM水提取物能显著抑制两种磷酸化比例[p-PI3K/PI3K:(0.77±0.01), $P=0.003$;p-Akt/Akt:(0.63±0.08), $P=0.002$],而0.8 mg/mL的抑制作用未达显著水平(分别为 $P=0.243$ 与 $P=0.065$)。(见图5)



注:A.经GpM水提取物处理的KYSE-150细胞中SRPX2/PI3K/Akt信号通路蛋白表达情况;B.GpM水提取物对KYSE-150细胞SRPX2蛋白表达的影响;C.GpM水提取物对KYSE-150细胞PI3K蛋白磷酸化水平的影响;D.GpM水提取物对KYSE-150细胞Akt蛋白磷酸化水平的影响;E.经GpM水提取物处理的Eca-109细胞中SRPX2/PI3K/Akt信号通路蛋白表达情况;F.GpM水提取物对Eca-109细胞SRPX2蛋白表达的影响;G.GpM水提取物对Eca-109细胞PI3K蛋白磷酸化水平的影响;H.GpM水提取物对Eca-109细胞Akt蛋白磷酸化水平的影响。与对照组(0.0 mg/mL)比较,^a $P<0.0001$,^b $P<0.01$ 。

图5 GpM水提取物对食管癌细胞SRPX2/PI3K/Akt信号通路关键蛋白表达及磷酸化水平的影响

3 讨论

食管癌作为一种临床常见的恶性肿瘤,手术切除是首选方法,但术后仍然有近一半的患者出现局部复发和远处转移^[16]。即使有新辅助治疗、免疫治疗等新型治疗方法出现,食管癌患者的预后仍然不容乐观。因此,寻求一种治疗食管癌的有效方法具有重要意义。

GpM能够通过多种途径对恶性肿瘤^[17-20]发挥治疗作用。食管癌的核心病机为“血液衰耗,胃脘干槁”,阴液过度消耗的人体环境为食管癌的发生发展提供了温床,可通过“甘润濡养”法治疗^[21]。GpM始载于《救荒本草》,《临床中药词典》记载其可“化痰止咳,健脾理气,益气活血,生津止渴,解毒利湿。”其能够通过促进人体津液的产生进而改善患者“胃脘干槁”的肿瘤内环境。同时GpM具有的解毒功效对食管癌能够产生直接的杀伤作用从而达到抑制食管癌的效果。本研究结果表明,GpM水提取物能够有效抑制人源食管癌细胞KYSE-150和Eca-109的增殖,并且能够降低这两种细胞的迁移和侵袭能力,提示GpM水提取物可能通过这些途径发挥抗食管癌作用。

在恶性肿瘤中,SRPX2可作为一种重要的上游分子影响PI3K/Akt信号轴,能够促进食管癌细胞的增殖并正向调节食管癌细胞的迁移和侵袭能力,在癌症的发生发展过程中具有重要意义。本研究发现,GpM水提取物可以降低KYSE-150和Eca-109细胞中SRPX2、PI3K、p-PI3K、Akt和p-Akt的蛋白表达,同时能够降低两株细胞中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白的相对表达比例,这证明GpM水提取物可以抑制SRPX2的表达以降低PI3K和Akt蛋白磷酸化水平,表明GpM水提取物能够通过调节SRPX2/PI3K/Akt通路治疗食管癌。

综上所述,GpM水提取物可调控PI3K/Akt信号通路下调疏

酸软骨素蛋白聚糖SRPX2的表达进而减少PI3K与Akt的磷酸化,从而抑制食管癌细胞KYSE-150和Eca-109的增殖、迁移和侵袭。同时,我们的研究也证明GpM水提物对正常食管上皮细胞无毒性,可为GpM广泛应用于食管癌的临床治疗提供证据。但本研究仅初步探索了GpM水提物通过SRPX2/PI3K/Akt通路对食管癌的抑制作用,未深入探究GpM水提物对SRPX2/PI3K/Akt通路的具体作用环节,有待后续深入研究。

参考文献

- [1] 王程浩,韩泳涛.2020年中国临床肿瘤学会《食管癌诊疗指南》解读[J].肿瘤预防与治疗,2020,33(4):285-290.
- [2] 吴成亚,冯颖,李杰.基于循证医学的中医药治疗食管癌作用特点研究概述[J].山东中医杂志,2016,35(12):1092-1095.
- [3] 杨册.绞股蓝化学成分分离及其对SGC-7901细胞的抑制作用[D].北京:中央民族大学,2021.
- [4] ZHANG T, GU H W, GAO J X, et al. Ethanol supernatant extracts of *Gynura procumbens* could treat nanodiethylnitrosamine-induced mouse liver cancer by interfering with inflammatory factors for the tumor microenvironment[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 285: 114917.
- [5] TAN H Y, ZHANG M, WU X J, et al. New anti-proliferative triterpenes from hydrolyzate of total *Gynostemma pentaphyllum* saponins induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells[J]. *Phytochem Lett*, 2021, 46: 166-171.
- [6] ZU M L, DUAN Y, XIE J B, et al. Gypenoside LI arrests the cell cycle of breast cancer in G0/G1 phase by down-regulating E2F1[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 273: 114017.
- [7] 谭先胜,李锴男,苗亚军.绞股蓝皂苷通过上调sTim-3/Tim-3比率抑制非小细胞肺癌细胞免疫逃逸因子的表达[J].免疫学杂志,2021,37(6):520-527.
- [8] 司雨,房俊强,高向东,等.硫酸软骨素蛋白聚糖的研究进展[J].药学进展,2023,47(2):125-134.
- [9] 江红,黄艳丽,邢辉,等.miR-515-5p通过调控硫酸软骨素蛋白聚糖4表达对卵巢癌A2780细胞增殖和转移的影响及其机制[J].解剖学报,2022,53(1):42-49.
- [10] 李司懿.胶质瘢痕中硫酸软骨素蛋白聚糖通过p38MAPK通路调控脑膜成纤维细胞的迁移[D].广州:南方医科大学,2019.
- [11] KATSO R, OKKENHAUG K, AHMADI K, et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: Implications for development, homeostasis, and cancer[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 615-675.
- [12] GUO J X, WU Z B, CHANG X Y, et al. Network pharmacology analysis and in vitro validation of the active ingredients and potential mechanisms of *Gynostemma pentaphyllum* Against esophageal cancer[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2025, 28(3):500-513.
- [13] 周跃.ECM蛋白SRPX2对结肠癌SW480细胞生物学行为的影响[D].兰州:兰州大学,2015.
- [14] ZHAO J, XU J, ZHANG R. SRPX2 regulates colon cancer cell metabolism by miR-192/215 via PI3K-Akt[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(2):483-490.
- [15] GAO Z Y, WU J S, WU X, et al. SRPX2 boosts pancreatic cancer chemoresistance by activating PI3K/AKT axis[J]. *Open Med (Wars)*, 2020, 15(1):1072-1082.
- [16] 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.
- [17] 刘慧.壮药国虾薄(绞股蓝)的皂苷成分及其抑制透明肾细胞癌增殖的作用研究[D].北京:中央民族大学,2021.
- [18] 刘艳菊,刘景超,王永飞,等.绞股蓝多糖对MFC胃癌荷瘤小鼠肿瘤生长抑制及免疫调节作用[J].中成药,2019,41(12):2876-2881.
- [19] 邓芙蓉,王翰林,谢佩佩,等.绞股蓝皂苷对人胃癌细胞增殖和凋亡的影响及作用机制[J].中国药理学通报,2023,39(4):646-652.
- [20] TAN H Y, ZHANG M, XU L, et al. Gypensapogenin H suppresses tumor growth and cell migration in triple-negative breast cancer by regulating PI3K/AKT/NF- κ B/MMP-9 signaling pathway[J]. *Bioorg Chem*, 2022, 126: 105913.
- [21] 李晶,孔令洋.以“甘润濡养”法论治食管癌之探析[J].中医肿瘤学杂志,2022,4(1):49-53.

(收稿日期:2025-06-06 编辑:罗英姣)