

桃叶珊瑚苷调节RhoA/ROCK信号通路对食管癌 细胞放疗敏感性的影响

宋玉玲¹ 汪学昌¹ 金曼² 杨世荣^{1*}¹青海省第五人民医院, 放疗中心, 西宁 810000;²青海省第五人民医院, 肿瘤内科, 西宁 810000)

摘要 该文探讨了桃叶珊瑚苷(AU)对食管癌细胞(EC9706细胞)放疗敏感性以及对Ras同源基因家族蛋白A/Rho相关卷曲螺旋结合蛋白激酶(RhoA/ROCK)信号通路的影响。使用浓度为0、25、50、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$ 的AU处理EC9706细胞24 h后, 采用CCK-8法检测细胞存活率, 筛选AU的最佳作用浓度, 进行后续实验。将EC9706细胞分为5组: 对照组(Control组)、放疗组(6Gy组)、AU组、AU+6Gy组、AU+6Gy+RhoA激活剂组(AU+6Gy+Naciclazine组)。克隆形成实验和Edu检测细胞的增殖情况; 流式细胞术检测细胞的凋亡情况; 酶联免疫吸附测定(ELISA)技术对细胞培养液上清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-2(IL-2)的含量进行检测; 鬼笔环肽染色法观察细胞骨架; Western blot法检测细胞中B细胞淋巴瘤蛋白-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、上皮钙黏素(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、RhoA、ROCK蛋白水平; 构建食管癌移植瘤模型, 测量肿瘤的质量和体积, Western blot检测肿瘤组织的RhoA、ROCK蛋白水平。与0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, 25~125 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的AU可以降低EC906细胞的活力, 选择100 $\mu\text{mol/L}$ 的AU进行后续实验。与Control组比较, 6Gy、AU组细胞克隆形成数和Edu阳性率, TNF- α 、Bcl-2、N-cadherin、RhoA、ROCK蛋白水平明显降低, 细胞凋亡率, IFN- γ 、Bax、E-cadherin、IL-2水平以及F-actin荧光强度明显升高($P<0.05$); AU+6Gy组相比6Gy、AU组, 细胞克隆形成数和Edu阳性率, TNF- α 、Bcl-2、N-cadherin、RhoA、ROCK蛋白水平明显降低, 而细胞凋亡率, Bax、E-cadherin、IFN- γ 、IL-2水平以及F-actin荧光强度明显升高($P<0.05$); 与AU+6Gy组比较, AU+6Gy+Naciclazine组细胞克隆形成数和Edu阳性率, TNF- α 、Bcl-2、N-cadherin、E-cadherin、RhoA、ROCK蛋白水平明显升高, 细胞凋亡率, Bax、IFN- γ 、IL-2水平以及F-actin荧光强度降低($P<0.05$)。裸鼠移植瘤实验表明, 与Control组比较, 6Gy、AU组裸鼠质量和体积以及RhoA和ROCK蛋白水平明显降低($P<0.05$); AU+6Gy组相比6Gy、AU组, 裸鼠质量和体积以及RhoA和ROCK蛋白水平明显降低($P<0.05$)。AU可能通过抑制RhoA/ROCK通路的信号转导增强食管癌细胞放疗敏感性。

关键词 桃叶珊瑚苷; RhoA/ROCK通路; 食管癌; 放疗敏感性

Effect of Aucubin on Radiotherapy Sensitivity of Esophageal Cancer Cells by Regulating RhoA/ROCK Signaling Pathway

SONG Yuling¹, WANG Xuechang¹, JIN Man², YANG Shirong^{1*}¹Radiation Therapy Center, Qinghai Fifth People's Hospital, Xining 810000, China;²Department of Oncology, Qinghai Fifth People's Hospital, Xining 810000, China)

收稿日期: 2025-03-18

接受日期: 2025-05-13

*通信作者。Tel: 14797006365, E-mail: ysr1114@126.com

Received: March 18, 2025

Accepted: May 13, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-14797006365, E-mail: ysr1114@126.com

Abstract This article investigated the effect of AU (aucubin) on the radiotherapy sensitivity of esophageal cancer cells (EC9706 cells) and its effect on RhoA/ROCK (Ras homolog gene family member A/Rho-associated with curly helix binding protein kinase) signaling pathway. EC9706 cells were treated with aucubin at concentrations of 0, 25, 50, 75, 100, and 125 $\mu\text{mol/L}$ for 24 hours, and the cell survival rate was measured by CCK-8 assay. The optimal concentration of aucubin was screened for subsequent experiments. EC9706 cells were grouped: Control group; radiotherapy group (6Gy group); AU group; AU+6Gy group; AU+6Gy+RhoA activator group (AU+6Gy+Naciclasine group). Cloning formation experiments and Edu assay were used to detect cell proliferation. Flow cytometry was used to test cell apoptosis. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) was used to measure TNF- α (tumor necrosis factor- α), IFN- γ (interferon- γ), and IL-2 (interleukin-2) in the supernatant of cell culture medium. The phalloidin staining method was used to observe the cytoskeleton. Western blot method was used to test the level of Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), Bax (Bcl-2 associated X protein), E-cadherin, N-cadherin, RhoA and ROCK proteins in cells. The esophageal cancer transplant tumor model was constructed, and the mass and volume of the tumor were measured. Western blot was used to test RhoA and ROCK proteins in tumor tissue. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$, AU at concentrations of 25-125 $\mu\text{mol/L}$ could reduce the viability of EC906 cells. Therefore, 100 $\mu\text{mol/L}$ AU was selected for subsequent experiments. Compared with the Control group, the 6Gy and AU groups had greatly lower cell clone formation number, Edu positivity rate, the level of TNF- α , Bcl-2, N-cadherin, RhoA, and ROCK proteins, while had higher cell apoptosis rate, and the levels of IFN- γ , Bax, E-cadherin, and IL-2, as well as the fluorescence intensity of F-actin ($P<0.05$). Compared with the 6Gy and AU groups, the AU+6Gy group showed manifestly lower cell clone formation number, Edu positivity rate, and the levels of TNF- α , Bcl-2, N-cadherin, RhoA, and ROCK proteins, and had greatly higher cell apoptosis rate, and the levels of IFN- γ , Bax, E-cadherin, and IL-2, as well as the fluorescence intensity of F-actin ($P<0.05$). Compared with the AU+6Gy group, the AU+6Gy+Naciclasine group showed manifestly higher cell clone formation number, Edu positivity rate, and levels of TNF- α , Bcl-2, N-cadherin RhoA, and ROCK proteins, while had lower cell apoptosis rate, and the levels of IFN- γ , Bax, E-cadherin, and IL-2, as well as the fluorescence intensity of F-actin ($P<0.05$). The nude mice transplant tumor experiment showed that compared with the Control group, the weight and volume of the nude mice and the protein levels of RhoA and ROCK in the 6Gy and AU groups were significantly decreased ($P<0.05$); compared with the 6Gy and AU groups, the weight and volume of the nude mice and the protein levels of RhoA and ROCK in the AU 6Gy group were significantly decreased ($P<0.05$). AU may enhance the radiotherapy sensitivity of esophageal cancer cells by inhibiting the signal transduction of RhoA/ROCK pathway.

Keywords aucubin; RhoA/ROCK pathway; esophageal cancer; radiotherapy sensitivity

食管癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一, 对患者的健康和生命构成严重威胁^[1], 在我国, 食管癌的主要类型为鳞状细胞癌^[2]。食管癌发病早期无明显特异性, 已经确诊多为中晚期, 失去手术机会^[3]。放射治疗是中晚期食管癌的关键治疗方法, 然而, 放疗抵抗现象显著降低了治疗的效果。鉴于此, 深入探索食管癌的放疗抵抗分子机制, 寻找放疗敏感性相关药物, 有望提高食管癌治疗效果。

桃叶珊瑚苷(aucubin, AU)属于环烯醚萜类化合物, 于自然界许多植物中广泛分布, 具有清湿热、止痛、降压、护肝、抗炎、抗癌、神经保护、骨骼保

护等生物学作用^[4]。梅凡等^[5]研究发现AU可以抑制肺癌细胞的增殖、迁移、侵袭, 促进细胞凋亡, 抑制肺癌的发生发展过程。但是AU在食管癌放疗中的作用及机制尚不清楚。

Ras同源基因家族蛋白A(Ras homolog gene family member A, RhoA)/Rho相关卷曲螺旋结合蛋白激酶(Rho-associated with curly helix binding protein kinase, ROCK)信号通路是影响肿瘤转移的重要信号通路^[6]。RhoA是Rho GTPase家族的一员, 被公认为是致癌基因, 在细胞调节过程中有重要的作用, 可以促进各种肿瘤细胞的生长增殖、侵袭、黏附。RhoA激活

其下游分子ROCK后可以促进肿瘤细胞, 包括肝癌、食管癌等细胞的增殖、迁移^[7]。宋鸣等^[8]研究发现, AU可以抑制胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭、EMT以及VM形成过程, 这可能是通过阻断RhoA/ROCK信号通路实现的。然而, AU能否通过调控RhoA/ROCK信号通路对食管癌细胞增殖、迁移、凋亡、炎症等产生作用目前还没有实验证明。因此, 本研究探讨AU调节RhoA/ROCK信号通路对食管癌细胞放疗敏感性的影响, 以期治疗食管癌提供新的方法和思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

AU(纯度>99.49%)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号: HY-K1073)、CCK-8试剂盒(货号: HY-K0301)购自MedChemExpress公司; 食管癌细胞系EC9706来自于美国ATCC; RhoA信号通路激活剂Naciclasing(纯度>98%)购自北京百奥莱博科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(货号: JL10208)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)(货号: JL14113)、干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ)(货号: JL12152)、ELISA试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司; B细胞淋巴瘤蛋白-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(货号: 3498)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)(货号: 2772)、上皮钙黏素(E-cadherin)(货号: 3195)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)(货号: 4061)、RhoA(货号: 2117)、ROCK(货号: 4035)一抗购自美国CST公司; GAPDH(货号: ab9484)及羊抗兔IgG二抗(货号: ab6721)购自英国Abcam公司。

1.2 细胞和动物

取出冻存的EC9706细胞置于37℃温水浴中90 s快速复苏, 经过4℃、1 000 r/min离心5 min后, 收集上清液, 用RPMI-1640完全培养基(10% FBS和1%双抗)重悬细胞, 将重悬的细胞均匀铺到T75培养瓶中, 所有培养瓶置于37℃恒温、5% CO₂箱中培养, 每48 h换液, 在显微镜下观察细胞贴壁率到90%以上时, 用胰酶消化细胞(37℃、3 min)进行细胞的传代培养, 以备后续实验。

5周龄SPF级BALB/c裸鼠24只, 体质量16~18 g, 购自泰安鸿菲尔生物科技有限公司[SCXK(鲁) 2024 0006]。本研究经青海省第五人民医院动物伦理委员会批准进行, 伦理批号: 202403017。

1.3 CCK-8法检测细胞增殖

将对数生长期的EC9706细胞, 按照每孔 5×10^4 个细胞的密度接种到96孔培养板内, 用不同浓度(0、25、50、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$)^[9]的AU处理24 h, 每组6个复孔, 每孔中加入20 μL 的CCK-8溶液, 继续培养4 h, 终止反应, 在450 nm的波长光下测定各组细胞的吸光度值, 计算细胞的增殖活性, 筛选最佳的AU作用浓度。

此外, 另取细胞, 分别接受不同放射剂量(0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy、10 Gy)的6MV-X射线(剂量率5 Gy/min, 照射野 $40 \times 40 \text{ cm}^2$, 源靶距100 cm, 225 kV, 照射距离30 cm)照射, 24 h后进行CCK-8实验, 计算细胞增殖抑制率, 筛选最佳放疗剂量。

1.4 细胞分组及处理

取处于对数生长期的EC9706细胞, 分为以下5组: 对照组(Control组)、放疗组(6Gy组)、AU组、AU+6Gy组、AU+6Gy+RhoA激活剂组(AU+6Gy+Naciclasing组)。Control组不处理; 6Gy组采用6 Gy的6MV-X射线照射EC9706细胞24 h^[9]; AU组使用100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的AU处理EC9706细胞24 h; AU+6Gy组先用浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 的AU处理EC9706细胞24 h, 再用6 Gy的6MV-X射线照射EC9706细胞; AU+6Gy+Naciclasing组用100 $\mu\text{mol/L}$ 的AU和30 $\mu\text{mol/L}$ 的Naciclasing处理EC9706细胞, 再用6 Gy的6MV-X射线照射EC9706细胞。各组EC9706细胞共同培养24 h。

1.5 平板克隆实验

取对数生长期的EC9706细胞(1×10^6 /孔)接种于6孔板中, 按照1.4的分组分别处理各组细胞, 培养2周后, 收集各组细胞。用4%多聚甲醛室温固定10 min, PBS洗涤后, 再用0.1%的结晶紫染液在室温下对各组细胞染色20 min, 洗涤风干后在显微镜下观察各组EC9706细胞克隆情况。

1.6 Edu法检测细胞增殖

取对数生长期的EC9706细胞(1×10^6 /孔)接种于6孔板, 按照1.4的处理方法培养24 h后, 加入Edu溶液在37℃下共同孵育2 h, PBS洗涤, 4%多聚甲醛室温固定15 min; PBS洗涤, 0.1% TritonX-100室温孵育20 min; PBS洗涤, 每孔加入500 μL 点击(Click)反应液混合均匀, 室温下避光孵育30 min; PBS洗涤, 每孔加入500 μL DAPI染细胞核, 室温下避光孵育15 min。PBS清洗后, 采用共聚焦显微镜观察样本并拍照记

录, 计算Edu阳性细胞的比率。

1.7 细胞凋亡实验

取对数生长期的EC9706细胞(1×10^6 /孔)接种于6孔板, 按照1.4的分组方案, 对各组细胞处理24 h, 收集各组细胞并通过4 °C、1 000 r/min离心5 min去除上清, PBS对细胞洗涤2次, 每次洗涤后都离心(4 °C、1 000 r/min离心5 min)去除上清液。用500 μ L 1 $\times$ 膜联蛋白结合缓冲液(1 $\times$ Annexin binding buffer)重悬细胞, 向悬液中加入5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI混合均匀, 避光条件下室温孵育15 min。采用流式细胞仪对各组EC9706细胞进行荧光检测, 评估其凋亡率。

1.8 炎症因子水平检测

取对数生长期的EC9706细胞(1×10^6 /孔)接种于6孔板, 按照1.4的分组方案, 对各组细胞进行24 h的处理, 收集各组细胞的上清液, 依照ELISA试剂盒说明书进行检测。测定各组细胞上清液中的TNF- α 、IL-2、INF- γ 的含量。

1.9 鬼笔环肽染色法观察细胞骨架

取对数生长期的EC9706细胞(1×10^6 /孔)接种于6孔板, 按照1.4的分组方案, 对各组细胞进行24 h的处理后收集, 室温下4%多聚甲醛固定10 min, 室温透化10 min(0.1 %的TritonX-100), 鬼笔环肽室温染色10 min, PI室温复染5 min, 荧光显微镜下观察各组细胞染色情况。

1.10 Western blot检测RhoA、ROCK蛋白水平

取对数生长期的EC9706细胞(1×10^6 /孔)接种于6孔板, 按照1.4的分组方案, 对各组细胞进行24 h处理, 对各组细胞进行刮取收集, 细胞用预冷的PBS清洗3次, 每次均在4 °C、1 000 r/min下离心5 min去上清, 用预冷的RIPA强裂解液重悬细胞沉淀, 4 °C裂解30 min, 提取各组细胞总蛋白。蛋白浓度试剂盒对各组蛋白进行浓度测定。以40 μ g的上样量通过SDS凝胶电泳分离蛋白条带, 将目标蛋白转移到PVDF膜上, 5%牛血清白蛋白室温封闭2 h。TBST洗膜, 膜与Bax、Bcl-2、E-cadherin、N-cadherin、RhoA、ROCK一抗(均1:1 000)在4 °C条件下过夜孵育, 室温孵育二抗(1:10 000)1 h。避光条件下用ECL发光液对膜显影, ImageJ软件分析蛋白灰度值。

1.11 裸鼠移植瘤实验

通过皮下注射的方式将0.2 mL的EC7906细胞悬液(5×10^7 /mL)接种到裸鼠腹部, 建立食管癌细胞移

植瘤模型。将裸鼠随机分为4组: Control组、6Gy组、AU组、AU+6Gy组, 每组6只。Control组注射等量的生理盐水; 6Gy组接受放疗, 剂量6 Gy/d, 连续3天^[9]; AU组注射AU药物, 每天5 mg/kg^[10]; AU+6Gy组同时接受放疗和AU药物, 与注射6Gy组和AU组处理方法相同。经过4周的处理后, 处死所有的裸鼠, 对肿瘤的体积和质量进行测量, 评估不同处理方式对肿瘤生长的影响。Western blot法检测肿瘤组织中RhoA和ROCK蛋白的表达水平。

1.12 统计学分析

本研究的统计数据用SPSS 25.0统计学软件分析处理。计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间的差异比较用单因素方差分析, 组内两两比较采用SNK-*q*检验。当 $P < 0.05$ 时, 判定差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AU对EC9706细胞活力的影响

与0 μ mol/L的AU比较, AU为25、50、75、100、125 μ mol/L浓度范围内均可显著降低EC9706细胞的活力($P < 0.05$)。当AU浓度增高至125 μ mol/L时, 细胞活力相较于100 μ mol/L却有所提高。因此, 选择100 μ mol/L作为处理细胞的AU浓度。见表1。

与0 Gy照射比较, 在2、4、6、8、10 Gy照射后EC9706细胞增殖抑制率显著升高($P < 0.05$), IC_{50} 为7.20 Gy, 因此选择6 Gy放疗剂量进行后续实验。见表2。

2.2 AU对EC9706细胞增殖的影响

与Control组比, 6Gy组、AU组的EC9706细胞克隆形成数和Edu阳性率降低($P < 0.05$); 与6Gy和AU组比, AU+6Gy组的EC9706细胞克隆形成数和Edu阳性率显著降低($P < 0.05$); 与AU+6Gy组比较, AU+6Gy+Naciclasine组的EC9706细胞克隆形成数和Edu阳性率升高($P < 0.05$)。见图1、图2和表3。

2.3 AU对EC9706细胞凋亡的影响

与Control组比较, 6Gy组、AU组的EC9706细胞凋亡率、Bax蛋白表达水平显著升高, Bcl-2蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$); AU+6Gy组的EC9706细胞凋亡率、Bax蛋白表达水平显著高于6Gy组和AU组, Bcl-2蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$); 与AU+6Gy组比较, AU+6Gy+Naciclasine组的EC9706细胞凋亡率、Bax蛋白表达水平显著降低, Bcl-2蛋白表达水

平显著升高($P<0.05$)。见图3、图4和表4。

2.4 AU对EC9706细胞中炎症因子的影响

相较于Control组, 6Gy、AU组 EC9706细胞中 TNF- α 水平降低, 而INF- γ 、IL-2水平升高($P<0.05$); 与

6Gy和AU组比, AU+6Gy组 EC9706细胞中 TNF- α 水平显著下降, INF- γ 、IL-2水平显著升高($P<0.05$); 与AU+6Gy组比, AU+6Gy+Nacilcalsine组 EC9706细胞中 TNF- α 水平升高, INF- γ 、IL-2水平降低($P<0.05$)。见表5。

表1 AU对EC9706细胞活力的影响

Table 1 The effect of AU on the viability of EC9706 cells

组别 Group	细胞存活率/% Cell survival rate /%
0 $\mu\text{mol/L}$ AU	100.00 $\pm$ 0.00
25 $\mu\text{mol/L}$ AU	94.14 $\pm$ 4.25*
50 $\mu\text{mol/L}$ AU	87.06 $\pm$ 3.71*
75 $\mu\text{mol/L}$ AU	80.67 $\pm$ 1.24*
100 $\mu\text{mol/L}$ AU	70.99 $\pm$ 1.36*
125 $\mu\text{mol/L}$ AU	75.09 $\pm$ 1.01*

* $P<0.05$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ AU相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ AU. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

表2 射线剂量对EC9706细胞活力的影响

Table 2 The effect of radiation dose on the viability of EC9706 cells

射线剂量/Gy Radiation dose /Gy	细胞增殖抑制率/% Cell proliferation inhibition rate /%
0	0.00 $\pm$ 0.00
2	10.89 $\pm$ 8.16*
4	22.64 $\pm$ 2.02*
6	41.48 $\pm$ 3.74*
8	55.83 $\pm$ 5.04*
10	64.88 $\pm$ 5.84*

* $P<0.05$, 与0 Gy相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with 0 Gy. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

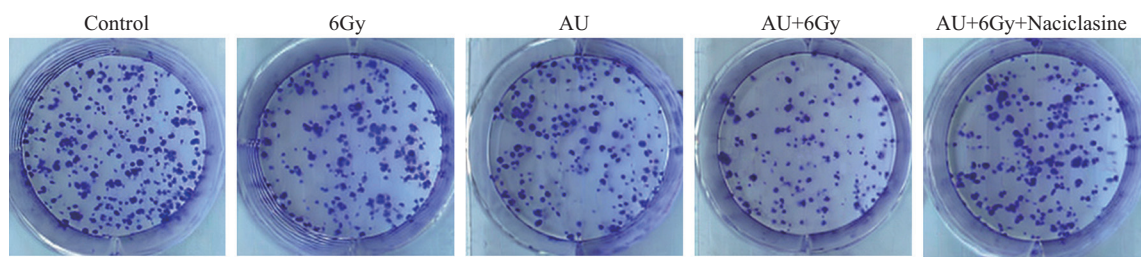


图1 克隆形成实验检测AU对EC9706细胞增殖的影响

Fig.1 The clone formation experiment was used to detect the effect of AU on the proliferation of EC9706 cells

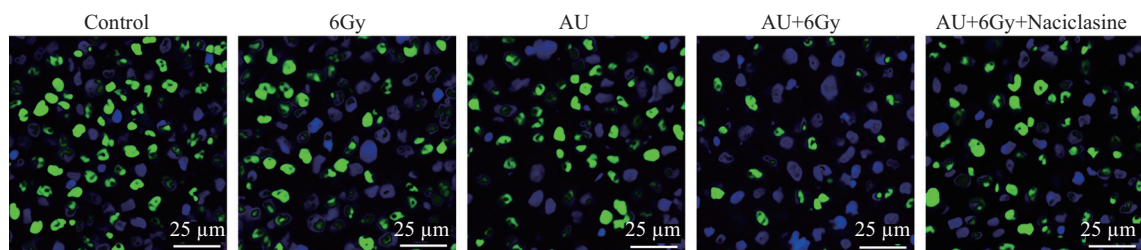


图2 Edu检测AU对EC9706细胞增殖的影响

Fig.2 Edu assay was used to detect the effect of AU on the proliferation of EC9706 cells

表3 AU对EC7906细胞增殖的影响

Table 3 The effect of AU on the proliferation of EC7906 cells

组别 Group	Edu阳性率/% Edu positive rate /%	克隆形成数 Number of clone formation
Control	52.10±5.16	151.05±15.16
6Gy	38.95±4.31*	83.49±8.08*
AU	43.46±4.02*	94.32±9.17*
AU+6Gy	21.32±3.06 [#] &	62.08±6.20 [#] &
AU+6Gy+Nacilaslaine	37.12±3.15 [@]	109.09±10.56 [@]

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与6Gy组相比; [&] $P<0.05$, 与AU组相比; [@] $P<0.05$, 与AU+6Gy组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the 6Gy group; [&] $P<0.05$ compared with the AU group; [@] $P<0.05$ compared with the AU+6Gy group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

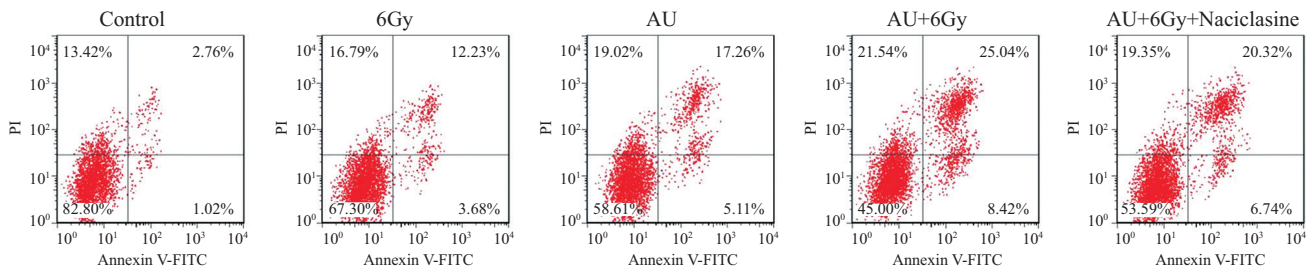
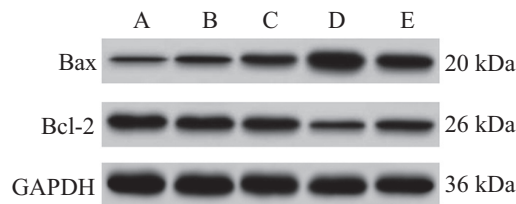


图3 流式细胞仪检测AU对EC7906细胞凋亡的影响

Fig.3 Flow cytometry was used to investigate the effect of AU on apoptosis of EC7906 cells



A: Control组; B: 6Gy组; C: AU组; D: AU+6Gy组; E: AU+6Gy+Nacilaslaine组。

A: Control group; B: 6Gy group; C: AU group; D: AU+6Gy group; E: AU+6Gy+Nacilaslaine group.

图4 AU对EC7906细胞Bax、Bcl-2蛋白表达的影响

Fig.4 The influence of AU on the expression of Bax and Bcl-2 proteins in EC7906 cells

表4 AU对EC7906细胞凋亡的影响

Table 4 The effect of AU on apoptosis of EC7906 cells

组别 Group	凋亡率/% Apoptosis rate /%	Bax	Bcl-2
Control	3.78±0.86	0.28±0.04	0.87±0.07
6Gy	15.91±1.11*	0.47±0.05*	0.70±0.07*
AU	22.37±3.52*	0.62±0.05*	0.65±0.06*
AU+6Gy	33.46±2.16 [#] &	1.05±0.08 [#] &	0.32±0.05 [#] &
AU+6Gy+Nacilaslaine	27.06±1.15 [@]	0.83±0.06 [@]	0.51±0.04 [@]

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与6Gy组相比; [&] $P<0.05$, 与AU组相比; [@] $P<0.05$, 与AU+6Gy组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the 6Gy group; [&] $P<0.05$ compared with the AU group; [@] $P<0.05$ compared with the AU+6Gy group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

2.5 AU对EC9706细胞中E-cadherin、N-cadherin蛋白表达的影响

相较于Control组, 6Gy、AU组 EC9706细胞中 E-cadherin表达水平显著升高, N-cadherin水平显著降低 ($P<0.05$); 与 6G、AU组比, AU+6Gy组 EC9706细胞中 E-cadherin表达水平显著升高, N-cadherin水平显著降低 ($P<0.05$); 与 AU+6Gy组比, AU+6Gy+Naciclasine组 EC9706细胞中 E-cadherin表达水平显著降低, N-cadherin水平显著升高($P<0.05$)。见图5和表6。

2.6 AU对EC9706细胞骨架的影响

相较于Control组, 6Gy、AU组EC9706细胞中F-

actin荧光强度显著升高 ($P<0.05$); 与 6Gy和AU组比, AU+6Gy组 EC9706细胞中 F-actin荧光强度显著升高 ($P<0.05$); 与 AU+6Gy组比, AU+6Gy+Naciclasine组 EC9706细胞中 F-actin荧光强度显著降低 ($P<0.05$)。见图6和表7。

2.7 AU对EC9706细胞中RhoA、ROCK蛋白表达的影响

相较于Control组, 6Gy、AU组 EC9706细胞中 RhoA、ROCK蛋白表达水平减少 ($P<0.05$); 与 6Gy、AU组比, AU+6Gy组 EC9706细胞中 RhoA、ROCK蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与 AU+6Gy组比较, AU+6Gy+Naciclasine组 EC9706细胞中 RhoA、

表5 AU对EC9706细胞中TNF- α 、INF- γ 、IL-2水平的影响
Table 5 The effect of AU on the levels of TNF- α , INF- γ , and IL-2 in EC9706 cells

组别 Group	TNF- α /pg·mL ⁻¹	INF- γ /pg·mL ⁻¹	IL-2 /pg·mL ⁻¹
Control	155.95±10.14	125.12±5.45	38.01±2.49
6Gy	89.13±7.42*	174.59±7.68*	77.74±5.7*
AU	117.67±6.04*	149.91±6.13*	60.87±3.42*
AU+6Gy	75.37±4.52 [#] &	195.04±9.04 [#] &	86.43±6.12 [#] &
AU+6Gy+Naciclasine	85.06±6.45 [@]	182.49±9.68 [@]	76.92±5.12 [@]

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与6Gy组相比; ^{*} $P<0.05$, 与AU组相比; [@] $P<0.05$, 与AU+6Gy组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the 6Gy group; ^{*} $P<0.05$ compared with the AU group; [@] $P<0.05$ compared with the AU+6Gy group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.



A: Control组; B: 6Gy组; C: AU组; D: AU+6Gy组; E: AU+6Gy+Naciclasine组。
A: Control group; B: 6Gy group; C: AU group; D: AU+6Gy group; E: AU+6Gy+Naciclasine group.

图5 AU对EC9706细胞RhoA、ROCK蛋白表达的影响

Fig.5 The effect of AU on the expression of RhoA and ROCK proteins in EC7906 cells

表6 AU对EC9706细胞中E-cadherin、N-cadherin蛋白表达的影响
Table 6 The influence of AU on the protein expression of E-cadherin and N-cadherin in EC9706 cells

组别 Group	E-cadherin	N-cadherin
Control	0.41±0.05	1.04±0.10
6Gy	0.58±0.05*	0.77±0.08*
AU	0.66±0.07*	0.68±0.07*
AU+6Gy	0.98±0.09 [#] &	0.39±0.03 [#] &
AU+6Gy+Naciclasine	0.64±0.06 [@]	0.70±0.06 [@]

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与6Gy组相比; ^{*} $P<0.05$, 与AU组相比; [@] $P<0.05$, 与AU+6Gy组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the 6Gy group; ^{*} $P<0.05$ compared with the AU group; [@] $P<0.05$ compared with the AU+6Gy group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

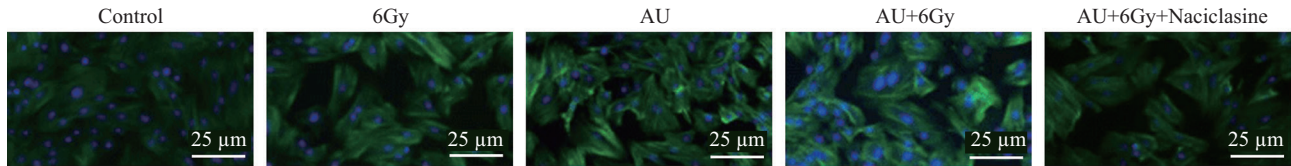


图6 鬼笔环肽染色测定EC9706细胞骨架损伤情况

Fig.6 Phalloidin staining was used to determine the damage to the cytoskeleton of EC9706 cells

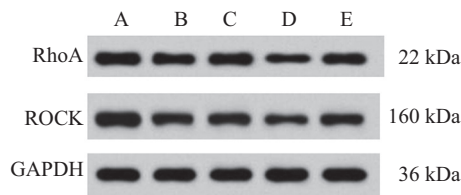
表7 AU对EC9706细胞骨架损伤的影响

Table 7 The effect of AU on the cell cytoskeleton damage of EC9706 cells

组别 Group	F-actin荧光强度 Fluorescence intensity of F-actin
Control	23.14±2.08
6Gy	35.16±3.25*
AU	40.27±3.83*
AU+6Gy	56.28±4.67 ^{#&}
AU+6Gy+Nacilaslaine	25.39±2.06 [@]

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与6Gy组相比; [&] $P<0.05$, 与AU组相比; [@] $P<0.05$, 与AU+6Gy组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the 6Gy group; [&] $P<0.05$ compared with the AU group; [@] $P<0.05$ compared with the AU+6Gy group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.



A: Control组; B: 6Gy组; C: AU组; D: AU+6Gy组; E: AU+6Gy+Nacilaslaine组。

A: Control group; B: 6Gy group; C: AU group; D: AU+6Gy group; E: AU+6Gy+Nacilaslaine group.

图7 AU对EC7906细胞RhoA、ROCK蛋白表达的影响

Fig.7 The effect of AU on the expression levels of RhoA and ROCK proteins in EC7906 cells

表8 AU对EC7906细胞RhoA、ROCK蛋白表达水平的影响

Table 8 The effect of AU on the expression levels of RhoA and ROCK proteins in EC7906 cells

组别 Group	RhoA	ROCK
Control	1.08±0.07	1.36±0.08
6Gy	0.76±0.03*	0.94±0.06*
AU	0.83±0.04*	1.03±0.08*
AU+6Gy	0.63±0.02 ^{#&}	0.50±0.03 ^{#&}
AU+6Gy+Nacilaslaine	0.71±0.01 [@]	0.91±0.02 [@]

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与6Gy组相比; [&] $P<0.05$, 与AU组相比; [@] $P<0.05$, 与AU+6Gy组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

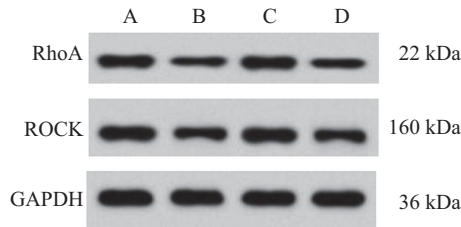
* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the 6Gy group; [&] $P<0.05$ compared with the AU group; [@] $P<0.05$ compared with the AU+6Gy group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

ROCK蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。见图7和表8。

2.8 AU对移植瘤生长和RhoA、ROCK蛋白表达的影响

与Control组相比较, 6Gy、AU组瘤体质量和

体积均减小, 且RhoA、ROCK蛋白表达水平显著降低($P<0.05$); 与6Gy和AU组相比较, AU+6Gy组瘤体质量和体积均减小, 且RhoA、ROCK蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。见图8、表9、图9和表10。



A: Control组; B: 6Gy组; C: AU组; D: AU+6Gy组。
A: Control group; B: 6Gy group; C: AU group; D: AU+6Gy group.

图8 AU对移植瘤RhoA、ROCK蛋白表达的影响

Fig.8 The influence of AU on the expression of RhoA and ROCK proteins in transplanted tumors

表9 AU对移植瘤RhoA、ROCK蛋白表达的影响

Table 9 The effect of AU on the expression levels of RhoA and ROCK proteins in transplanted tumors

组别 Group	RhoA	ROCK
Control	0.87±0.06	1.15±0.09
6Gy	0.51±0.05*	0.73±0.04*
AU	0.64±0.04*	0.99±0.06*
AU+6Gy	0.35±0.02 ^{#&}	0.61±0.03 ^{#&}

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与6Gy组相比; [&] $P<0.05$, 与AU组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the 6Gy group; [&] $P<0.05$ compared with the AU group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

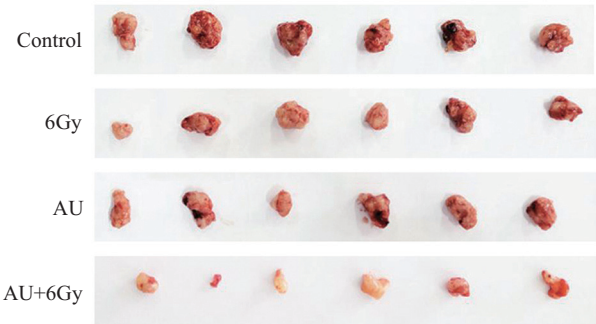


图9 各组移植瘤大小情况

Fig.9 The sizes of the transplanted tumors in each group

表10 AU对移植瘤质量和体积的影响

Table 10 The effects of AU on the quality and volume of transplanted tumors

组别 Group	移植瘤质量/g Quality of transplanted tumor /g	移植瘤体积/mm ³ Volume of transplanted tumor /mm ³
Control	1.34±0.10	170.20±9.53
6Gy	0.86±0.06*	126.09±4.45*
AU	1.15±0.07*	145.38±5.01*
AU+6Gy	0.72±0.03 ^{#&}	107.35±4.35 ^{#&}

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与6Gy组相比; [&] $P<0.05$, 与AU组相比。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。
* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the 6Gy group; [&] $P<0.05$ compared with the AU group. $n=6$, $\bar{x}\pm s$.

3 讨论

食管癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 在全球范围内发病率和死亡率出现显著的地理差异, 亚

洲地区尤为显著, 发病率相对较高, 据统计, 每年新增的食道癌病例, 有半数发生在中国, 中国中北部以及中国广东是高发区^[11-12]。手术切除是治疗早期患

者的手段,对于中晚期患者采用放疗的方法。放疗抗拒是制约放疗疗效的关键,因此增强食管癌放疗敏感性是目前研究的重点^[13]。

AU是一种具有高活性的化合物,属于环烯醚萜类,在许多传统药材如车前草、玄参、地黄等中广泛存在,在细胞氧化、增殖、凋亡、转移过程中发挥作用,具有抗炎、抗氧化、抗衰老、抗纤维化、抗癌等广泛的有益药理作用^[14-16]。据报道,AU具有高效、低毒的特性,展现出二次低伤害的潜力,通过触发癌细胞的凋亡机制来遏制肿瘤的生长,减轻癌症引发的炎症损伤,被视为一种具有广泛应用前景的治疗癌症候选药物^[17-18]。有研究表明,AU能通过阻断PD-1/PD-L1信号通路,抑制肺癌细胞的增殖、迁移,促进肺癌细胞凋亡,增强肺癌细胞的放疗敏感性,抑制肺癌的进展^[19]。闫本纯等^[19]研究证明,AU可通过阻断Akt/MDM2/p53通路,抑制前列腺癌细胞的增殖、迁移,促进其凋亡。对前列腺癌发挥抗肿瘤的作用。然而,AU在食管癌细胞中的有益作用还有待探索。在本研究中,我们发现使用AU和放疗共同处理食管癌细胞能够有效地抑制食管癌细胞的增殖,TNF- α 、Bcl-2、N-cadherin水平的降低,促进细胞的凋亡,IFN- γ 、IL-2、Bax、E-cadherin水平以及F-actin荧光强度的升高,比单独使用放疗或AU处理细胞更有疗效,这表明AU与放疗协同治疗食管癌,AU可以增强食管癌细胞的放疗敏感性,减少炎症反应以及抑制间质转化进程。裸鼠移植瘤实验结果表明,AU与放疗协同治疗可以减缓肿瘤(包括质量和体积)的生长,比单独使用放疗或AU处理组织疗效更显著,表明AU可能会增强食管癌细胞的放疗敏感性。

RhoA/ROCK信号通路参与多种疾病的发生发展过程,特别是肿瘤的发展与转移^[20]。RhoA是Ras超家族成员之一,激活RhoA可激活其下游分子,从而影响细胞的增殖与迁移^[21]。ROCK是RhoA下游关键靶基因,激活ROCK可磷酸化胞内肌球蛋白,促进细胞的侵袭与迁移。有研究证明,AU可能通过抑制RhoA/ROCK信号通路相关蛋白的表达,从而抑制胶质母细胞瘤细胞的活性、侵袭、间质转化过程,减少移植瘤的体积和质量,并诱导癌细胞凋亡^[8]。这些发现进一步揭示了RhoA/ROCK通路相关蛋白的激活可能会诱发肿瘤的发生与发展。因此,对食管癌细胞中的RhoA/ROCK通路进行针对性阻断,有望

成为治疗食管癌的关键手段。根据本研究结果,与单独使用AU或放疗相比,两者联合使用可以进一步降低RhoA、ROCK的蛋白表达水平,而RhoA的激活剂Naciclasine可以逆转AU对食管癌细胞抑制增殖和促进凋亡的作用;裸鼠移植瘤实验也表明,AU联合放疗处理小鼠,RhoA、ROCK的蛋白表达水平进一步被抑制;推测可能AU通过抑制RhoA/ROCK通路相关蛋白的表达增强对食管癌细胞放疗敏感性的作用。

综上所述,与单独使用放疗处理细胞相比,AU与放疗的联合使用进一步抑制了食管癌细胞的增殖、迁移,同时促进了细胞的凋亡,表明了AU可能增强食管癌细胞的放疗敏感性,减轻放疗抵抗,同时我们初步分析了在此过程中AU对RhoA/ROCK通路相关蛋白的表达产生的抑制情况。本研究为食管癌的治疗领域提供了新的线索,然而,关于AU对除EC7906细胞以外其他细胞的影响,以及药物与RhoA/ROCK通路之间具体的相互作用机制,还需开展更深入的研究工作。

参考文献 (References)

- [1] HUANG P, SUN L Y, ZHANG Y Q. A hopeful natural product, pristimerin, induces apoptosis, cell cycle arrest, and autophagy in esophageal cancer cells [J]. Anal Cell Pathol, 2019, 2019: 6127169.
- [2] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. Chin Med J, 2022, 135(5): 584-90.
- [3] LI P, JING J, LI R, et al. Upper gastrointestinal cancer in China: spatial epidemiologic evidence from screening areas [J]. Cancer Prev Res, 2020, 13(11): 935-46.
- [4] SHAO M, KUANG Z, WANG W, et al. Aucubin exerts anticancer activity in breast cancer and regulates intestinal microbiota [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 4534411.
- [5] 梅凡, 姚峰, 朱磊, 等. 桃叶珊瑚苷对肺癌细胞增殖、侵袭的抑制作用及对TGF- β 1/SOX7通路的影响[J]. 湖北中医药大学学报(MEI F, YAO F, ZHU L, et al. Inhibitory effect of aucubin on the proliferation and invasion of lung cancer cells and its effect on TGF- β 1/SOX7 pathway [J]. Journal of Hubei University of Chinese Medicine), 2021, 23(4): 10-4.
- [6] 刘丽, 王哲近, 潘邦伦, 等. GCNT3通过PI3K/Akt/mTOR和RhoA/ROCK/Cofilin途径促进肝癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. 中国生物化学与分子生物学报(LIU L, WANG Z J, PAN B L, et al. GCNT3 promotes proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells via PI3K/AKT/mTOR and RhoA/ROCK/Cofilin pathways [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology), 2023, 39(4): 562-72.
- [7] ZHOU Q Y, GUI S Y, ZHANG P, et al. Upregulation of miR-345-5p suppresses cell growth of lung adenocarcinoma by regulating

- ras homolog family member A (RhoA) and Rho/Rho associated protein kinase (Rho/ROCK) pathway [J]. *Chin Med J*, 2021, 134(21): 2619-28.
- [8] 宋鸣, 周昕, 刘俊, 等. 桃叶珊瑚苷调控RhoA/ROCK信号通路对胃癌MGC803细胞上皮间质转化和血管生成拟态的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志* (SONG M, ZHOU X, LIU J, et al. Effects of aucubin on epithelial mesenchymal transition and vasculogenic mimicry in gastric cancer MGC803 cells by regulating the RhoA/ROCK signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*), 2024, 31(4): 365-70.
- [9] LIU N, WANG Y A, SUN Y, et al. Inhibition of Aurora A enhances radiosensitivity in selected lung cancer cell lines [J]. *Respir Res*, 2019, 20(1): 230.
- [10] 贺介甫, 杜钢, 周福星, 等. 桃叶珊瑚苷通过调节PD-1/PD-L1信号通路介导的免疫逃逸对肺癌细胞放疗敏感性的影响[J]. *国际检验医学杂志* (HE J F, DU G, ZHOU F X, et al. Effect of Aucubin on the radiosensitivity of lung cancer cells by regulating the immune escape mediated by PD-1/PD-L1 signaling pathway [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*), 2024, 45(12): 1435-41.
- [11] WANG P, YANG Z, YE T, et al. lncTUG1/miR-144-3p affect the radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma by competitively regulating c-MET [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 7.
- [12] QIU M J, YANG S L, WANG M M, et al. Prognostic evaluation of esophageal cancer patients with stages I-III [J]. *Aging*, 2020, 12(14): 14736-53.
- [13] YANG X X, MA M, SANG M X, et al. Knockdown of FAM83D enhances radiosensitivity in coordination with irradiation by inhibiting EMT via the Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway in human esophageal cancer cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 4665-78.
- [14] ZENG X, GUO F, OUYANG D. A review of the pharmacology and toxicology of aucubin [J]. *Fitoterapia*, 2020, 140: 104443.
- [15] KARTINI K, IRAWAN M A, SETIAWAN F, et al. Characteristics, isolation methods, and biological properties of Aucubin [J]. *Molecules*, 2023, 28(10): 4154-64.
- [16] WANG X, XIE Z, LOU Z, et al. Regulation of the PTEN/PI3K/Akt pathway in RCC using the active compounds of natural products *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(5): 766.
- [17] LI Y C, HAO J C, SHANG B, et al. Neuroprotective effects of aucubin on hydrogen peroxide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5 Y cells via the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Phyto-medicine*, 2021, 87: 153577.
- [18] ABRAMOFF B, CALDERA F E. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 293-311.
- [19] 闫本纯, 何春艳, 李宏伟, 等. 桃叶珊瑚苷对前列腺癌的抑制作用及机制的体内外研究[J]. *中国药房* (YAN B C, HE C Y, LI H W, et al. *In vivo* and *in vitro* study on the inhibitory effects and mechanism of aucubin on prostate cancer [J]. *China Pharmacy*), 2024, 35(13): 1618-23.
- [20] 严铃铃, 冯晓云, 马庆霞. VEGF联合TRAP1、CEA在食管癌患者肿瘤转移、分化、临床分期中的临床价值[J]. *国际检验医学杂志* (YAN L L, FENG X Y, MA Q X. The clinical value of VEGF combined with TRAP1 and CEA in tumor metastasis, differentiation and clinical staging of esophageal cancer patients [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*), 2023, 44(18): 2301-4.
- [21] LIU D, XIA A D, WU L P, et al. IGF2BP2 promotes gastric cancer progression by regulating the IGF1R-RhoA-ROCK signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2022, 94: 110313.