DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250908.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1089.R.20250908.1014.002

没食子酸对人食管鳞癌KYSE-30细胞的体外抑制作用及其机制

符 艳[1,2],宋 涛[1,2],白双琴[1,2],任艳利[1,2]✉
(1.伊犁师范大学生物科学与技术学院,新疆 伊宁 835000;2.新疆薰衣草资源保护与利用重点实验室,新疆 伊宁 835000)

[摘要] **目的**:探究天然多酚类化合物没食子酸(gallic acid, GA)对人食管鳞癌KYSE-30细胞的抑制作用及其潜在作用机制。**方法**:采用MTT法检测0、100、200、300、400和500 μmol/L GA处理KYSE-30细胞24和48 h后的细胞活力,其中0 μmol/L GA为对照组。根据MTT实验结果、细胞形态学观察、细胞凋亡、细胞周期、划痕愈合及集落形成实验设置对照组和GA低、中、高浓度组(100、300、500 μmol/L);活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测和Western blot实验设置对照组以及100、200、300、400、500 μmol/L GA处理组。运用倒置荧光显微镜观察GA作用后KYSE-30细胞的形态变化;借助流式细胞术分析细胞凋亡率和细胞周期分布;通过划痕愈合实验评估细胞迁移能力;利用集落形成实验验证GA对细胞克隆增殖的影响;使用DCFH-DA荧光探针法检测细胞内ROS水平;最后通过Western blot检测促凋亡蛋白活化型胱天蛋白酶3(cleaved caspase-3)、活化型胱天蛋白酶-9(cleaved caspase-9)和Bcl-2相关X蛋白(Bax),抗凋亡蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)以及细胞周期蛋白(Cyclin D1、Cyclin D3)的表达量变化。**结果**:MTT结果显示,GA可明显抑制细胞增殖($P<0.05$),且具有明显的剂量与时间依赖特性,其24和48 h的IC_{50}分别为282.85和233.97 μmol/L。倒置荧光显微镜下观察发现,与对照组相比,GA处理组细胞出现皱缩、排列松散,且贴壁细胞数量明显减少。流式细胞术检测显示,随着GA浓度增加,细胞凋亡率逐步上升($P<0.05$),且细胞周期阻滞于G_0/G_1期(G_0/G_1期细胞比例增加,S期与G_2/M期减少,$P<0.05$)。划痕愈合实验结果显示,100~500 μmol/L GA可使细胞相对愈合率从85.77%降至12.35%($P<0.001$),迁移抑制作用呈剂量依赖性。集落形成实验证实,GA浓度升高导致集落形成率明显下降($P<0.05$)。DCFH-DA荧光探针检测表明,GA处理后细胞内ROS水平明显升高($P<0.05$),且与GA浓度呈正相关。Western blot检测结果显示,促凋亡蛋白Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达上调($P<0.05$),抗凋亡蛋白Bcl-2及细胞周期蛋白Cyclin D1、Cyclin D3表达下调($P<0.05$),且蛋白表达变化均呈现剂量依赖性。**结论**:GA可抑制人食管鳞癌KYSE-30细胞的增殖、迁移及克隆形成,诱导细胞凋亡和G_0/G_1期阻滞,其作用可能与促进ROS生成、调节凋亡相关蛋白以及下调Cyclin D1和Cyclin D3表达有关。本研究提示GA在食管癌治疗领域具有潜在应用价值,有望成为新型治疗药物。

[关键词] 没食子酸;食管鳞癌;活性氧;细胞凋亡;KYSE-30细胞
[中图分类号] R285 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)21-1630-11

Inhibitory effects of gallic acid on human esophageal cancer squamous cell carcinoma KYSE-30 cells *in vitro* and its mechanism

FU Yan[1,2], SONG Tao[1,2], BAI Shuangqin[1,2], REN Yanli[1,2]✉
(1. *College of Biological Sciences and Technology, Yili Normal University, Yining* 835000, *China*; 2. *Xinjiang Key Laboratory for Conservation and Utilization of Lavender Resources, Yining* 835000, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Special Project for Improving the Comprehensive Discipline Strength of Yili Normal University* (*22XKZY15*)
[*Author*]: *FU Yan*, *E-mail*: 1654837048@*qq.com*.
[*Correspondence to*]: *REN Yanli*, *Associate Professor*, *E-mail*: 864672445@*qq.com*.
Received: 2025-06-13 *Revised*: 2025-09-02 *JHMU*, 2026;32(21):1630-1640

[基金项目] 伊犁师范大学提升学科综合实力专项项目(22XKZY15)
[作者简介] 符艳,E-mail:1654837048@qq.com。
[通讯作者] 任艳利,副教授,E-mail:864672445@qq.com。
[收稿日期] 2025-06-13 [修回日期] 2025-09-02 网络出版时间:2025-09-08 12:43:32

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To investigate the inhibitory effects of gallic acid (GA), a naturally occurring polyphenolic compound, on human esophageal squamous cell carcinoma KYSE-30 cells and explore its potential mechanisms of action. **Methods**: The MTT assay was used to assess the viability of KYSE-30 cells treated with 0, 100, 200, 300, 400, or 500 μmol/L GA for 24 and 48 h, with 0 μmol/L GA serving as the control. Based on the MTT assay results, a control group and low-, medium-, and high-concentration GA groups (100, 300, and 500 μmol/L, respectively) were established for morphological observation, apoptosis, cell-cycle, wound-healing, and colony-formation assays. For reactive oxygen species (ROS) measurement and Western blot, a control group and five GA treatment groups (100, 200, 300, 400, and 500 μmol/L) were established. Morphological changes in GA-treated KYSE-30 cells were observed using an inverted fluorescence microscope. Cell apoptosis and cell-cycle distribution were analyzed by flow cytometry. Cell migration and clonogenic capacity were evaluated using wound-healing and colony-formation assays, respectively. Intracellular ROS levels were measured using the DCFH-DA fluorescent probe. Western blot was performed to determine changes in the expression levels of the pro-apoptotic proteins cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, and Bcl-2-associated X protein (Bax), the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and the cell-cycle-related proteins Cyclin D1 and Cyclin D3. **Results**: MTT results showed that GA significantly inhibited cell proliferation in a dose-and time-dependent manner($P<0.05$). The IC_{50} values of GA at 24 and 48 h were 282.85 and 233.97 μmol/L, respectively. Observation under an inverted fluorescence microscope revealed that compared to the control group, cells in the GA treatment group exhibited shrinkage, loose arrangement, and a significant reduction in the number of adherent cells. Flow cytometry analysis showed that with increasing GA concentration, the cell apoptosis rate gradually increased($P<0.05$), and the cell cycle was arrested at the G_0/G_1 phase (with increased proportion of cells in G_0/G_1 phase and decreased proportions in S and G_2/M phases, $P<0.05$). The scratch wound healing assay results showed that 100–500 μmol/L GA reduced the relative cell healing rate from 85.77% to 12.35%($P<0.001$), and the migration inhibition was dose-dependent. The colony formation assay confirmed that the colony formation rate decreased significantly with the increase in GA concentration ($P<0.05$). DCFH-DA fluorescence probe detection demonstrated that the intracellular ROS level increased significantly after GA treatment and was positively correlated with the GA concentration ($P<0.05$). Western blot results showed that the expression levels of pro-apoptotic proteins Bax, cleaved caspase-3, and cleaved caspase-9 were upregulated ($P<0.05$), while the expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-2 and cell cycle proteins Cyclin D1 and Cyclin D3 were downregulated ($P<0.05$), and these changes in the expression levels of apoptosis-related proteins exhibited a certain dose dependence. **Conclusion**: GA inhibits the proliferation, migration, and colony-forming capacity of human esophageal squamous cell carcinoma KYSE-30 cells while inducing apoptosis and G_0/G_1-phase cell-cycle arrest. These effects may be associated with increased ROS generation, modulation of apoptosis-related protein expression, and downregulation of Cyclin D1 and Cyclin D3. These findings provide experimental evidence supporting the further evaluation of GA as a potential therapeutic candidate for esophageal squamous cell carcinoma.

[Key words] Gallic acid; Esophageal squamous cell carcinoma; Reactive oxygen species; Cell apoptosis; KYSE-30 cells

食管癌(esophageal cancer,EC)是全球高负担较重的消化道恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均居较高水平,是癌症研究领域的重点与难点[1]。从组织学角度划分,食管癌主要包含食管腺癌(esophageal adenocarcinoma,EAC)与食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)这2种亚型,在所有病例中,ESCC占据了主导地位。流行病学显示,食管癌发病具有明显的地域聚集性和种族差异,在东亚、中亚及非洲部分地区尤为高发[2,3]。我国作为高发国家,面临严峻疾病负担,给患者家庭和社会医疗体系带来沉重压力[4,5]。由于早期症状隐匿且缺乏特异性诊断标志物,不少患者确诊时已处于中晚期,常伴局部浸润或远处转移,极大限制了治疗选择并导致预后不良[6,7]。当前手术、放疗、化疗、靶向治疗和免疫治疗等多种治疗手段常因患者产生耐药性、难以耐受毒副作用,或肿瘤侵袭转移特性显著,难以实现理想疗效[8,9]。因此,迫切需要探索新的治疗靶点,研发安全有效的抗癌药物,以提升食管癌整体治疗水平。

天然产物凭借独特的结构多样性和丰富的生物活性,在抗癌药物研发领域占据重要地位,成为创新药物的重要源泉[10-12]。多酚类化合物作为其中重要分支,凭借抗氧化、抗炎及抗增殖等多重生物活性,在癌症防治领域展现出独特价值[13]。没食子酸(gallic acid,GA)作为广泛存在于茶叶、坚果等多种植物中的天然多酚类化合物,不仅在传统医学中用于抗炎、抗菌、抗氧化等治疗[14-17],近年来其在肿瘤防治方面的潜在价值也日益受到关注。

大量研究表明,GA在多种恶性肿瘤中表现出明显的抗肿瘤活性,其作用机制涉及调控细胞周期、诱导凋亡、抑制转移关键通路及增敏化疗药物等多重途径。在乳腺癌研究中,GA可通过激活

p38 MAPK通路上调p21/p27表达，诱导三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞G_1期阻滞与凋亡[18]；同时通过抑制EGFR/Src/Akt/Erk信号轴，阻断MCF-7细胞中MMP-9介导的转移潜能[19]。在肺癌领域，GA不仅通过PI3K/Akt通路诱导A549细胞周期阻滞与凋亡[20]，还能加速EGFR突变型NSCLC细胞中EGFR蛋白降解，克服靶向治疗耐药[21]，并通过活性氧（reactive oxygen species，ROS）依赖性线粒体凋亡途径增强顺铂对小细胞肺癌H446细胞的杀伤效果[22]。在消化道肿瘤中，GA可诱导胃癌细胞凋亡[23]，并通过抑制Src/EGFR磷酸化及ROS依赖性凋亡通路抑制结肠癌细胞增殖与存活[24,25]。此外，GA还被证实可诱导肝癌细胞铁死亡[26]，并克服卵巢癌细胞对顺铂的耐药性[27]。GA分别与铂类化疗药物顺铂或降糖药二甲双胍联用时可明显增强抗肿瘤作用[28,29]。这些研究提示，GA可能通过多靶点协同作用发挥抗癌功效。然而，在食管癌研究领域中GA的作用机制仍有待深入探索。尽管前期研究已证实其对TE-1细胞具有增殖抑制和促凋亡作用[30]，但鉴于食管癌细胞系存在明显异质性，不同细胞对GA的响应机制可能存在差异，针对经典人食管鳞癌细胞系KYSE-30的多维度、ROS机制研究尚不明确。

基于上述研究基础，本研究以人食管鳞癌KYSE-30细胞为对象，采用多种层面探究GA的作用机制。主要通过四甲基噻唑蓝（MTT）法、划痕愈合实验、集落形成实验、流式细胞术及2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）探针，分别检测GA对细胞增殖、迁移、克隆增殖、凋亡、周期及ROS水平的影响，结合Western blot分析凋亡与周期相关蛋白表达，系统探讨GA抑制人食管鳞癌细胞的作用机制。研究不仅为天然药物靶点发现提供理论支撑，更有望挖掘其临床转化潜力，为食管癌辅助治疗或联合用药方案开发提供新思路。本研究假设，GA可通过诱导细胞周期阻滞、激活凋亡相关信号通路及调控活性氧水平，从而抑制人食管鳞癌KYSE-30细胞的增殖、迁移及集落形成能力，且这些作用可能与相关蛋白的表达变化密切相关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品 GA通过从植物大花红景天中提取纯化得到[30]。

1.1.2 试剂 本研究主要试剂包括：RPMI Medium Modified培养基购自美国Cytiva公司；胎牛血清和胰蛋白酶购自美国HyClone公司；Ham′s F-12基础培养基和磷酸盐缓冲液购自武汉普诺赛生命科技有限公司；Sequi-Blot™ PVDF膜购自美国Bio-Rad公司；Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期与凋亡检测试剂盒、MTT试剂、结晶紫染色液、ROS荧光探针（DCFH-DA）试剂盒、BeyoECL Plus（超敏ECL化学发光试剂盒）和PMSF Solution（100 mmol/L）购自上海碧云天生物技术有限公司；高效RIPA裂解液（组织/细胞）和二甲基亚砜（DMSO）购自北京索莱宝科技有限公司；兔源Cyclin D3、Bcl-2和Bax抗体购自美国Proteintech Group公司；鼠源Cyclin D1、cleaved caspase-9和Actin抗体，兔源cleaved caspase-3抗体购自上海碧云天生物技术有限公司；辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG（H+L）、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG（H+L）和BeyoColor™彩色预染蛋白分子量标准（15～120 kD）购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.1.3 仪器 本研究主要仪器包括：5910R-冷冻离心机和Galaxy 170S型恒温二氧化碳（CO_2）细胞培养箱（德国Eppendorf公司）；CytoFLEX S流式细胞仪（美国Beckman Coulter公司）；Ti-s型倒置荧光显微镜（日本Nikon公司）；Mini-PROTEAN® Tetra电泳槽和转膜仪（美国Bio-Rad公司）；力辰WB系列恒温水浴锅（上海力辰仪器科技有限公司）；Secura电子天平（德国Sartorius集团公司）；SX-500型高压灭菌锅[天美仪拓实验室设备（上海）有限公司]；Thermo Scientific™ 1500系列生物安全柜和Multiskan™ FC酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）等。

1.1.4 细胞 人食管鳞癌细胞KYSE-30购自武汉普诺赛生物科技有限公司，批号为CL-0231。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人食管鳞癌KYSE-30细胞用含有10%胎牛血清（FBS）、1%青霉素-链霉素双抗、2 mmol/L *L*-谷氨酰胺（*L*-Glutamine）的混合培养基（RPMI 1640与Ham′s F-12按1∶1体积比配制），于37 ℃、5% CO_2培养箱中贴壁培养。待细胞贴壁生长到培养瓶底部的70%～80%时，传代培养，进行后续实验。

1.2.2 MTT法检测细胞增殖 采用MTT比色法评估GA对KYSE-30细胞的增殖抑制效应。取处于对数生长期的KYSE-30细胞，经胰蛋白酶消化，制备成单细胞悬液，以每孔1×10^4个细胞接种于96孔细胞培养板，每孔100 μL。待细胞贴壁融合度达80%～90%时进行药物干预，实验组分别加入100 μL浓度梯度为100、200、300、400及500 μmol/L的GA溶液，对照（N）组添加等体积完全培养基，空白组仅含培养基，各处理组均设6个复孔，每组做3个重复。继续培养24和48 h后，每孔添加20 μL

MTT溶液(5 mg/mL),避光孵育3 h诱导甲瓒晶体生成。弃去培养上清后,每孔加入200 μL DMSO,室温振荡10 min促使晶体完全溶解,使用酶标仪于570 nm波长处测定吸光度值。并按公式:细胞存活率(%)=(给药组吸光度-空白组吸光度)/(对照组吸光度-空白组吸光度)×100%,计算出细胞存活率。

1.2.3 细胞形态学观察 取对数生长期的KYSE-30细胞用胰酶消化后离心收集细胞。将收集到的细胞用RPMI-1640完全培养基重悬后,用血细胞计数板计数,以每孔1×10^4个细胞接种于96孔板中,每孔100 μL,待细胞长满后给药。给药组加入100 μL浓度梯度为100、300和500 μmol/L的GA,对照组加入培养基,继续培养24 h后,在倒置荧光显微镜下观察细胞形态变化并拍照记录。

1.2.4 细胞凋亡的检测 采用Annexin V-FITC/PI染色,流式细胞术检测KYSE-30细胞凋亡情况。取对数期生长的KYSE-30细胞,将其胰蛋白酶化,制备成细胞悬液,取2 mL接种于6孔板中,每孔大约含有1×10^6个细胞,待细胞贴壁后给药。给药组加入2 mL浓度为100、300、500 μmol/L的GA,对照组加入相同体积的培养基,每组做3个重复。继续培养24 h后,用PBS清洗,收集细胞,在室温避光下,用Annexin Ⅴ-FITC和PI染料染色15 min,用流式细胞仪检测。

1.2.5 细胞周期的检测 采用碘化丙啶染色,流式细胞术检测KYSE-30细胞周期的不同阶段。取对数期生长的KYSE-30细胞,给药组加入浓度为100、300和500 μmol/L的GA,对照组加入相同体积的培养基,每组做3个重复。继续培养24 h后,用PBS清洗,收集细胞,将细胞在含0.1%柠檬酸钠的50 μg/mL碘化丙啶和0.1% Triton X-100中重悬,室温避光孵育20 min后,用流式细胞仪检测。

1.2.6 划痕愈合实验 用划痕愈合实验来检测细胞迁移能力。取对数期生长的KYSE-30细胞,将其用胰蛋白酶消化,制备成细胞悬液,取2 mL接种于6孔板中,每孔大约含有1×10^6个细胞。待细胞长满后,用枪头小心在皿底刮去细胞,形成笔直的划痕。给药组加入2 mL浓度为100、300和500 μmol/L的GA,对照组加入2 mL的培养基,每组做3个重复。培养0、4、12、24 h时拍照观察,并用ImageJ 1.8.0软件分析划痕面积并按公式:相对划痕愈合率(%)=(0 h时划痕面积-24 h时划痕面积)/0 h时划痕面积×100%,计算24 h时的相对划痕愈合率。

1.2.7 集落形成实验 取对数生长期的KYSE-30细胞用胰酶消化后离心收集细胞。将收集到的细胞用RPMI-1640完全培养基重悬后,用血细胞计数板计数,以每孔1×10^3个细胞接种于6孔板中,每孔2 mL。培养48 h后分为给药组和对照组,分别加入不同浓度的GA和培养基作为给药组和对照组,给药总浓度为100、300、500 μmol/L,每孔2 mL,每组3个复孔。培养24 h后更换不含药物的完全培养基继续培养10~14 d,培养期间每3天换液1次。待镜下观察到有集落形成后,用PBS洗涤2次,加入4%多聚甲醛固定30 min,PBS冲洗2次,加入400 μL结晶紫染色液染色15 min,用PBS洗去浮色,待晾干后拍照记录,最后采用ImageJ 1.8.0软件进行集落数量分析。集落形成相对数量(%)=(实验组集落数量/对照组集落数量)×100%。

1.2.8 DCFH-DA荧光探针法检测ROS水平 高灵敏度的探针DCFH-DA,通常用于检测细胞内ROS。DCFH-DA可以很容易地扩散到细胞内,并在细胞内水解形成DCFH,无荧光的DCFH在ROS的作用下形成有荧光的DCF。取对数生长期的KYSE-30细胞,将其胰蛋白酶化,制备成细胞悬液,取2 mL接种于6孔板中,每孔大约含有1×10^6个细胞,待细胞长满后给药。给药组设置100、200、300、400和500 μmol/L GA 5个浓度,各组分别加入2 mL相应浓度的GA培养液;对照组加入2 mL培养基,每组做3个重复。继续培养24 h后,收集细胞,加入稀释好的DCFH-DA,在37 ℃培养箱中孵育30 min,孵育完成后用无血清培养基清洗,用流式细胞仪检测,利用FITC通道检测各孔的荧光强度,通过ModfitLT 5软件分析其平均荧光强度并绘图。

1.2.9 Western blot检测蛋白表达 采用Western blot法对细胞凋亡及周期相关蛋白cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、Bcl-2、Bax、Cyclin D1、Cyclin D3进行检测。取对数期生长的KYSE-30细胞,将其胰蛋白酶化,制备成细胞悬液,取2 mL接种于6孔板中,每孔大约含有1×10^6个细胞,待细胞长满后给药。给药组加入2 mL浓度梯度为100、200、300、400和500 μmol/L的GA,对照组加入2 mL培养基,每组做3个重复。继续培养24 h后,用含有苯甲基磺酰氟(PMSF)的RIPA裂解液提取蛋白。用BCA法检测蛋白浓度,归一化定量处理,加入蛋白上样缓冲液煮沸5 min变性。取适量变性蛋白进行12%的SDS-PAGE电泳,然后转移到PVDF膜上,在5%的脱脂牛奶中进行封闭,按照一定比例加入内参蛋白Actin和各细胞凋亡相关蛋白的一抗,在4 ℃低温下孵育过夜后,用TBST清洗3~5次,按照一定比例加入相应的二抗,孵育2 h后,用TBST

清洗3次，加入适量化学发光底物（ECL），在化学发光凝胶成像系统中检测，使用ImageJ 1.8.0软件对条带进行灰度分析。

1.3　统计学处理

利用Excel 2024整理数据，采用SPSS 22.0软件进行统计学分析，利用Graphpad Prism 10.1.2绘图。计量数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），每组实验都重复3次，$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　GA明显抑制KYSE-30细胞活力

MTT实验结果显示，经不同浓度GA（100～500 μmol/L）处理KYSE-30细胞24及48 h后的增殖情况发现，细胞活力呈现明显的浓度-时间依赖性下降趋势（$P<0.05$），计算其24 h时GA的半数抑制浓度（IC_{50}）为282.85 μmol/L，48 h时IC_{50}降低至233.97 μmol/L，这表明延长作用时间可增强GA对食管鳞癌细胞的增殖抑制效能。见图1。

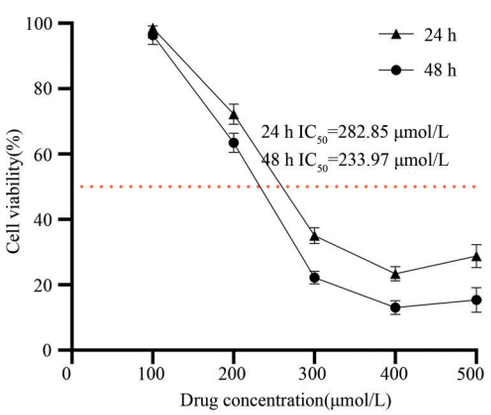


图1　不同浓度GA作用于KYSE-30细胞24和48 h时后的细胞存活率

Fig 1　Cell viability of KYSE-30 cells treated with different concentrations of GA for 24 and 48 h

2.2　GA对KYSE-30细胞形态的影响

通过倒置荧光显微镜观察GA处理24 h后的细胞形态，结果显示：对照组细胞形态规则，贴壁状态良好且细胞间连接紧密；与对照组相比，100、300、500 μmol/L GA处理的实验组细胞均出现形态改变，且随着GA浓度的增加，细胞逐渐呈现皱缩、排列稀疏的现象，同时细胞贴壁数量明显减少。见图2。

2.3　GA对KYSE-30细胞凋亡的影响

流式细胞术实验结果显示，与对照组相比，100 μmol/L GA处理组已出现凋亡趋势（$P<0.05$），而300、500 μmol/L处理组的凋亡率与对照组相比呈现明显差异（$P<0.001$）。结果表明GA可促进细胞凋亡，且在一定范围内呈现剂量依赖性。见图3、4。

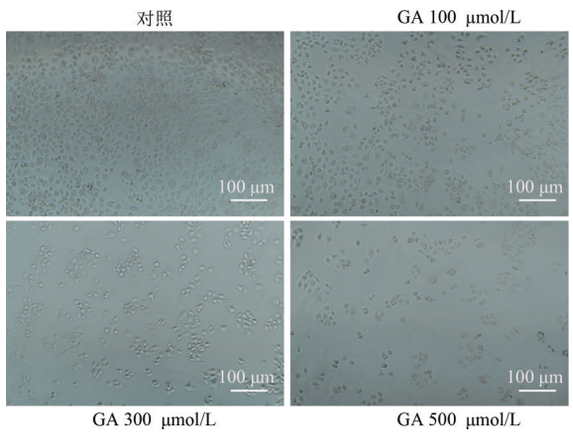


图2　不同浓度GA作用于KYSE-30细胞24 h后的细胞形态学变化（100×）

Fig 2　Morphological changes of KYSE-30 cells after treatment with different concentrations of GA for 24 hours (100×)

2.4　GA对KYSE-30细胞周期的影响

流式细胞术实验结果显示，与对照组相比，各GA处理组呈现明显的细胞周期阻滞特征：G_0/G_1期细胞比例明显增加（$P<0.05$），而S期和G_2/M期细胞比例明显减少（$P<0.05$）。结果表明，GA可通过诱导细胞周期阻滞于G_0/G_1期，抑制KYSE-30细胞进入S期，进而发挥抑制细胞增殖的作用。见图5、6。

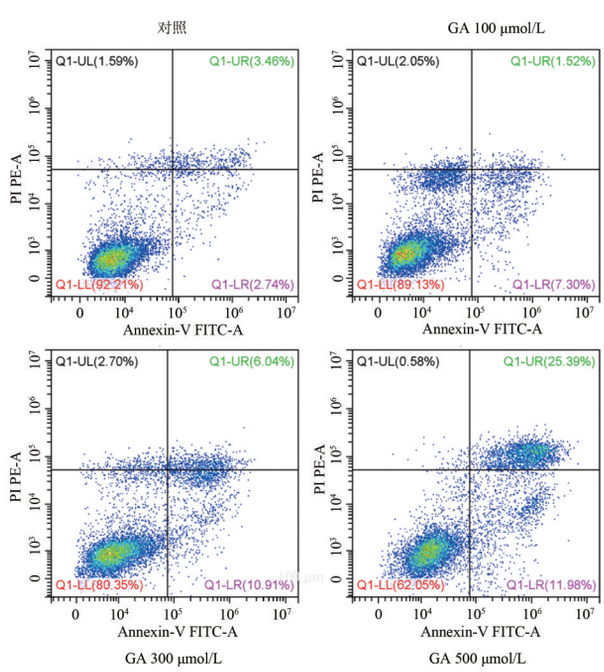
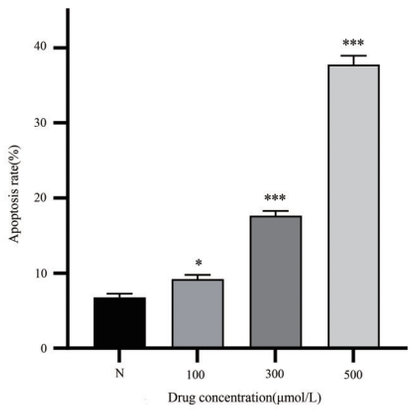


图3　不同浓度GA作用于KYSE-30细胞的细胞凋亡流式图

Fig 3　Flow cytometry plots of apoptosis in KYSE-30 cells treated with different concentrations of GA



N:对照组;与对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{***}P<0.001$

图4　不同浓度GA作用于KYSE-30细胞的细胞凋亡率的影响

Fig 4　Effect of different concentrations of GA on the apoptosis rate of KYSE-30 cells

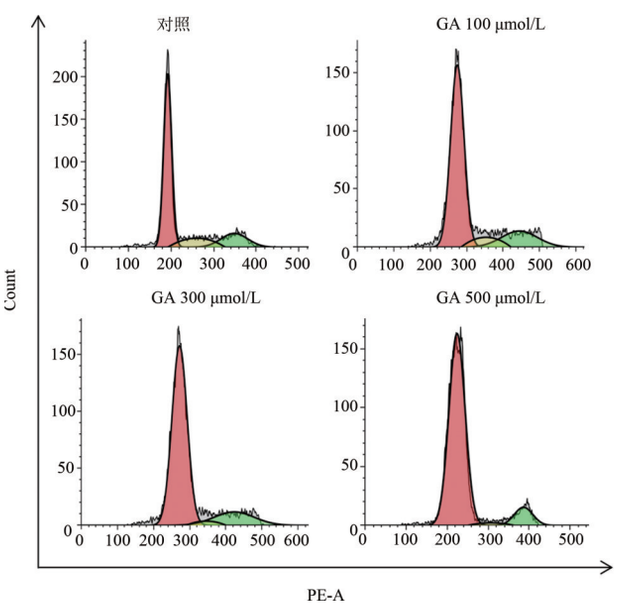


图5　不同浓度GA作用于KYSE-30细胞的细胞周期分布图

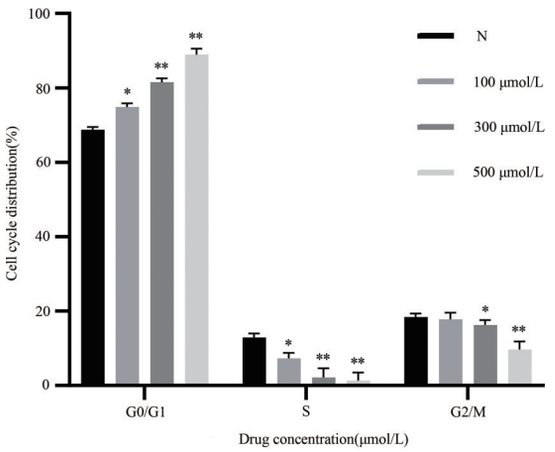
Fig 5　Cell cycle distribution plots of KYSE-30 cells treated with different concentrations of GA

2.5　GA对KYSE-30细胞迁移能力的影响

划痕愈合实验结果显示,对照组细胞在24 h内的划痕愈合率高达85.77%,而经100～500 μmol/L GA处理后,细胞迁移能力受到明显抑制。其中,500 μmol/L GA处理组的划痕愈合率仅为12.35%,与对照组相比差异具有高度统计学意义($P<0.001$),结果表明,GA对细胞迁移的抑制效果随浓度增加呈梯度增强态势,呈现明显的剂量依赖性。见图7、8。

2.6　GA对KYSE-30细胞增殖能力的影响

集落形成实验结果显示,在培养10 d后,对照组可形成肉眼可见的大量集落,而实验组中随着GA浓度的递增,集落数量呈现明显递减趋势($P<0.05$)。结果表明GA可有效抑制人食管鳞癌细胞KYSE-30的克隆形成能力,进一步证明了GA对食管鳞癌细胞增殖的抑制效应。见图9、10。



N:对照组;与对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

图6　不同浓度GA作用于KYSE-30细胞的细胞周期不同阶段的细胞数

Fig 6　Number of cells in different phases of the cell cycle in KYSE-30 cells treated with different concentrations of GA

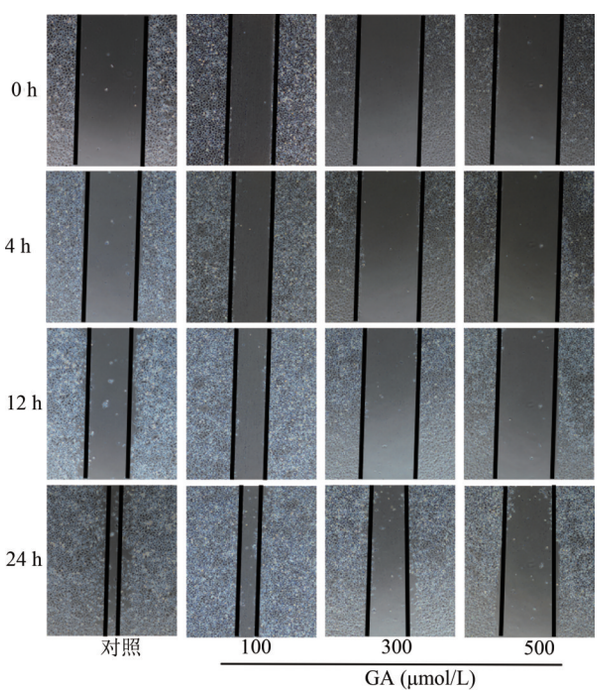
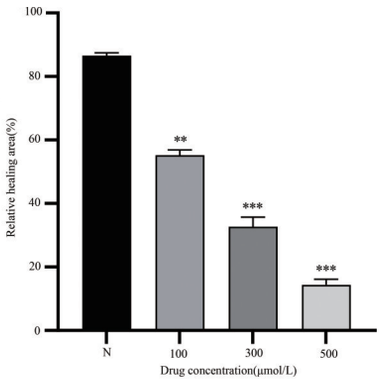


图7　不同浓度GA作用于KYSE-30细胞的划痕面积图

Fig 7　Scratch area map of KYSE-30 cells treated by GA at different concentrations

2.7　GA对KYSE-30细胞内ROS水平的影响

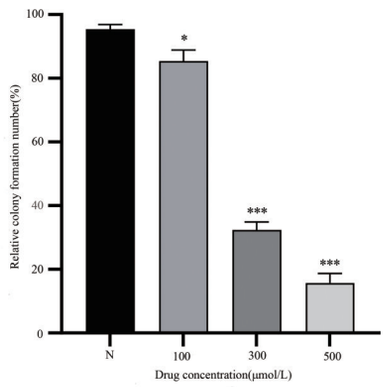
借助DCFH-DA荧光探针技术对细胞内ROS水平进行检测,结果显示,GA处理可明显提升细胞内ROS含量($P<0.05$)。与对照组细胞的ROS荧光强度相比,随着GA浓度从100 μmol/L递增至500 μmol/L,ROS荧光强度逐步上升,呈现出典型的剂量依赖性变化,结果表明GA能够诱导细胞内ROS生成,进而影响细胞内氧化还原平衡。见图11、12。



N：对照组；与对照组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

图8　不同浓度GA对KYSE-30细胞相对划痕愈合率的影响

Fig 8　Effects of different concentrations of GA on the relative scratch healing rate of KYSE-30 cells



N：对照组；与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$

图9　不同浓度GA对KYSE-30细胞集落形成能力的影响

Fig 9　Effect of GA at different concentrations on the colony formation ability of KYSE-30 cells

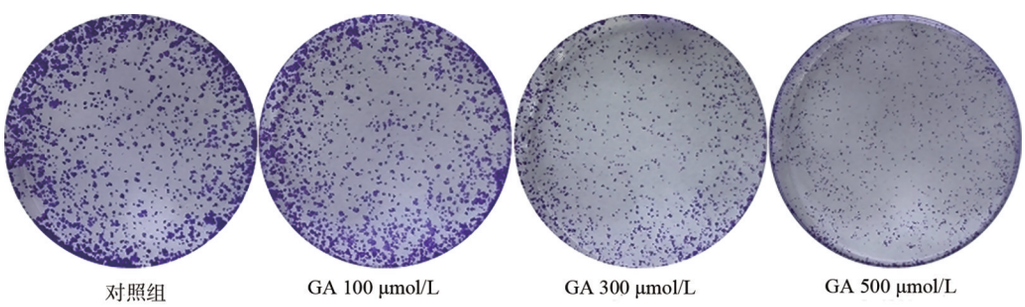


图10　不同浓度GA作用于KYSE-30细胞的集落形成图

Fig 10　Colony formation assay images of KYSE-30 cells treated with different concentrations

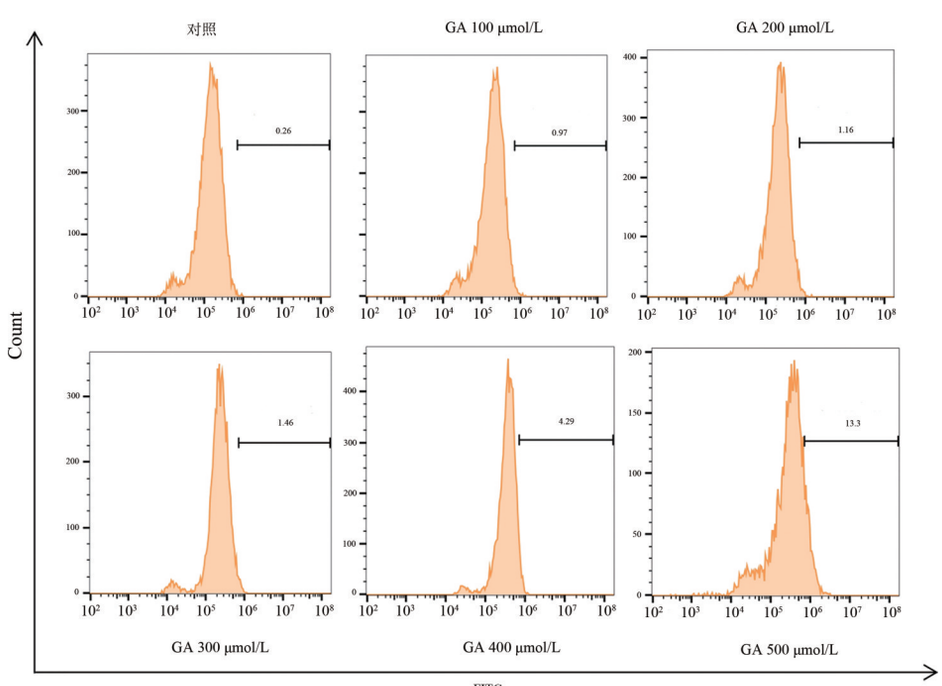


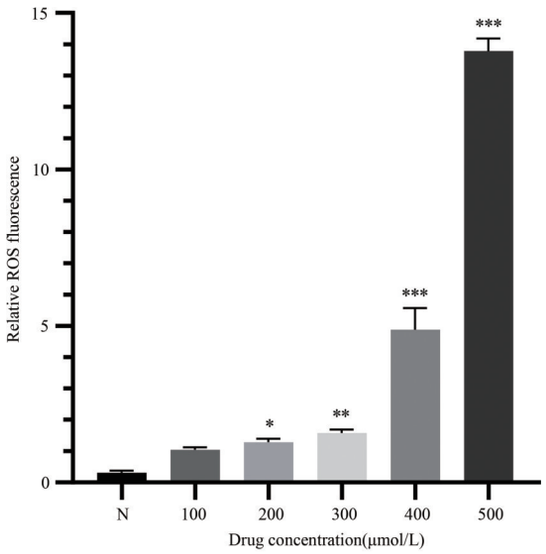
图11　不同浓度GA作用于KYSE-30细胞的ROS荧光强度流式检测结果图

Fig 11　Flow cytometry results of ROS fluorescence intensity in KYSE-30 cells treated with different concentrations of GA

2.8　GA对KYSE-30细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot实验结果显示，随着GA浓度增加，高剂量组500 μmol/L促凋亡蛋白Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9的表达量呈剂量依赖性上调（$P<0.001$），而抗凋亡蛋白Bcl-2及细胞周期蛋白Cyclin D1、Cyclin D3的表达水平则明显下调（$P<$

0.001),结果表明GA可明显调节相关蛋白的表达水平。见图13、14。



N:对照组;与对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$

图12　不同浓度GA对KYSE-30细胞ROS产生水平的影响

Fig 12　Effects of different concentrations of GA on ROS production in KYSE-30 cells

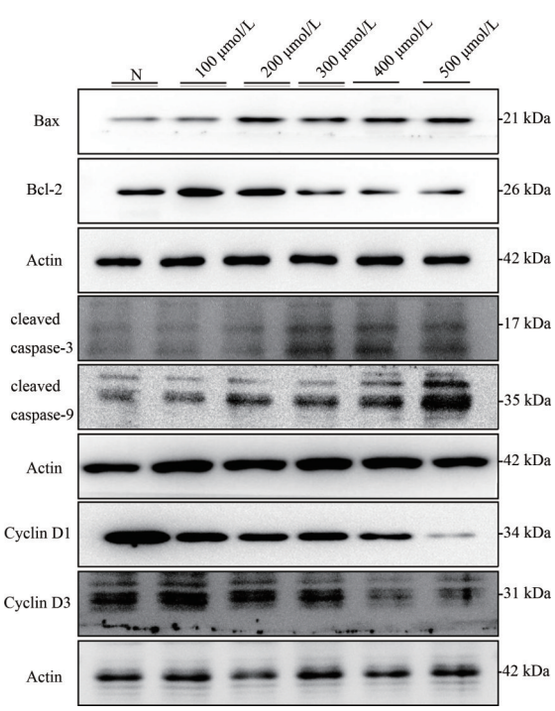
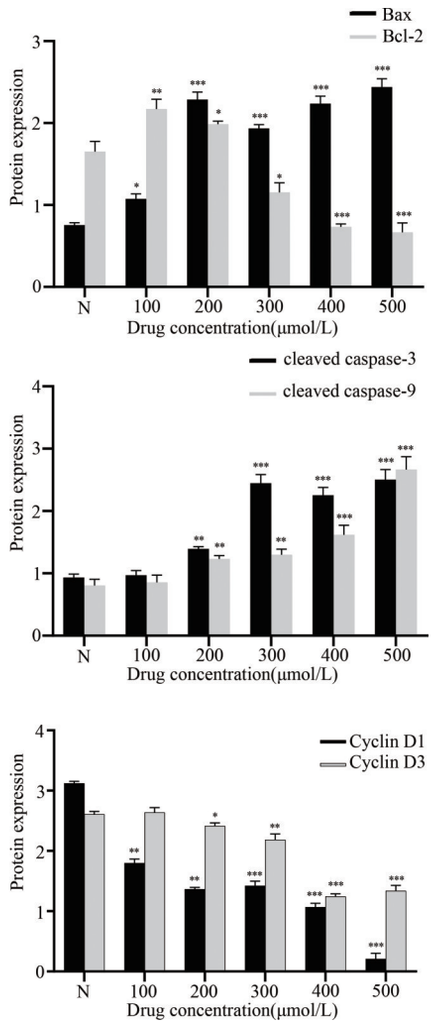


图13　不同浓度GA对KYSE-30细胞Bcl-2、Bax、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、Cyclin D1、Cyclin D3蛋白表达影响的电泳图

Fig 13　Electrophoretic images of the effects of GA on the expression of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, Cyclin D1 and Cyclin D3 in KYSE-30 cells



N:对照组;与对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$

图14　不同浓度GA对KYSE-30细胞相关凋亡蛋白表达水平的影响

Fig 14　Effect of GA at different concentrations on expression levels of apoptosis-related proteins in KYSE-30 cells

3　讨论

食管癌作为全球高致死性恶性肿瘤,其临床治疗因早期筛查率不足、肿瘤侵袭特性显著及化疗耐药等问题面临严峻挑战[1,5]。本研究发现天然多酚类化合物GA对人食管鳞癌KYSE-30细胞具有多重抑制效应,其机制可能与ROS介导的caspase凋亡通路激活及细胞周期阻滞相关。这一结果与GA在其他肿瘤中的作用模式存在共性,同时也揭示了其在食管鳞癌中的独特调控特征。

GA作为广泛存在于天然植物中的多酚类化合物,近年来在肿瘤防治领域的研究备受关注。已有研究表明,GA在多种肿瘤细胞中展现出抑制增殖、诱导凋亡等抗癌特性[13]。例如,Lee等[18]发现GA可通过激活p38 MAPK通路诱导乳腺癌MDA-MB-

231细胞G1期阻滞并促进凋亡；吴昊等[30]证实GA对人食管鳞癌TE-1细胞的增殖抑制呈时间-剂量依赖性，其机制与本研究中KYSE-30细胞的响应具有一致性，进一步支持GA在食管鳞癌中的潜在治疗价值。本研究中，GA对KYSE-30细胞的24和48 h IC_{50}分别为282.85和233.97 μmol/L，与报道的TE-1细胞的IC_{50}[(281.22±26.81) μmol/L，24 h]和[(220.90±31.15)μmol/L，48 h]总体接近，表明GA对两种人食管鳞癌细胞系均具有时间和浓度依赖性的抑制作用[30]。

在肿瘤细胞调控机制中，ROS扮演着关键角色[31,32]。本研究结果显示，GA处理后KYSE-30细胞内ROS水平呈剂量依赖性升高，同时促凋亡蛋白Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9表达明显上调，抗凋亡蛋白Bcl-2的表达则明显下调。这一结果与Wang等[22]在小细胞肺癌H446细胞中观察到的ROS依赖性线粒体凋亡途径一致，也与Subramanian等[24]在结肠癌HCT-15细胞中发现的ROS升高、线粒体膜电位下降及细胞凋亡现象相吻合。此外，Tsai等[23]报道GA可诱导人胃腺癌细胞凋亡，与本研究观察到的促凋亡效应一致，暗示GA可能在不同消化道肿瘤细胞中具有促凋亡作用。

细胞周期蛋白(Cyclin)及其依赖性激酶(CDK)是调控细胞周期进程的核心分子[33,34]。本研究借助流式细胞术检测发现，随着GA浓度的增加，KYSE-30细胞中处于G_1期的细胞比例明显增加，S期和G_2/M期的细胞比例则相应减少，出现了明显的G_1期阻滞现象。这一结果直接证明了GA对KYSE-30细胞周期的干扰作用，与Cyclin D1、Cyclin D3表达下调的结果相互印证。Cyclin D1和Cyclin D3是促使细胞从G_1期进入S期的重要蛋白，它们与CDK4/6结合形成复合物后，会使视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)磷酸化，进而释放转录因子E2F，启动与DNA合成相关的基因表达[35]。GA处理后Cyclin D1、Cyclin D3的表达下调，可能削弱Cyclin D-CDK4/6复合物活性并降低Rb磷酸化水平，从而阻碍细胞由G_1期向S期转换，促进G_0/G_1期阻滞。Choi等[36]发现，GA可抑制HDAC8及部分Ⅱ类组蛋白去乙酰化酶(HDAC)活性，提示HDAC相关表观遗传调控可能参与GA的作用，但其与Cyclin D1、Cyclin D3表达下调之间的关系仍需进一步验证。综上，GA对KYSE-30细胞周期进程的调控可能是其抑制细胞增殖的重要机制之一。

细胞迁移是肿瘤转移的关键步骤[37]。本研究证实，100～500 μmol/L GA可使KYSE-30细胞划痕愈合率从85.77%降至12.35%，提示GA可能呈剂量依赖性抑制细胞迁移。这一效应可能与GA下调基质金属蛋白酶(如MMP-9)的表达相关，也可能涉及对EGFR/Src/Akt信号轴的抑制，该通路在肿瘤细胞迁移中起重要作用[19,25]。

本研究证实，GA可明显抑制人食管鳞癌KYSE-30细胞的增殖、迁移及克隆形成，并诱导细胞凋亡和G_0/G_1期阻滞。上述作用可能与促进ROS生成、上调Bax、cleaved caspase-9和cleaved caspase-3表达，以及下调Bcl-2、Cyclin D1和Cyclin D3表达有关。但本研究仅基于体外细胞模型，尚缺乏体内实验及原代细胞验证，GA的治疗潜力仍需通过后续动物实验及相关研究进一步评估。

作者贡献度说明：

符艳：细胞实验、指标检测、数据分析、文章绘图及撰写论文；任艳利：实验方案设计、论文指导与审校；宋涛：细胞培养、细胞处理、数据筛选；白双琴：细胞实验、样本收集。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

2 Abnet CC, Arnold M, Wei WQ. Epidemiology of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Gastroenterology, 2018, 154(2): 360-373.

3 Morgan E, Soerjomataram I, Rumgay H, et al. The global landscape of esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma incidence and mortality in 2020 and projections to 2040: New estimates from GLOBOCAN 2020[J]. Gastroenterology, 2022, 163(3): 649-658, e2.

4 Chen R, Zheng R, Zhang S, et al. Patterns and trends in esophageal cancer incidence and mortality in China: An analysis based on cancer registry data[J]. J Natl Cancer Cent, 2023, 3(1): 21-27.

5 赫捷，陈万青，李兆申，等. 中国食管癌筛查与早诊早治指南(2022，北京)[J]. 中国肿瘤，2022，31(6)：401-436.
He J, Chen WQ, Li ZS, et al. China guideline for the screening, early detection and early treatment of esophageal cancer (2022, Beijing)[J]. China Cancer, 2022, 31(6): 401-436.

6 Sheikh M, Roshandel G, McCormack V, et al. Current status and future prospects for esophageal cancer[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(3):765.

7 He H, Chen N, Hou Y, et al. Trends in the incidence and survival of patients with esophageal cancer: A SEER database analysis[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(5): 1121-1128.

8 Obermannová R, Alsina M, Cervantes A, et al. Oesophageal cancer: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2022, 33(10): 992-1004.

9 Uhlenhopp DJ, Then EO, Sunkara T, et al. Epidemiology of esophageal cancer: Update in global trends, etiology and risk factors[J]. Clin J Gastroenterol, 2020, 13(6): 1010-1021.

10 Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, et al. Natural products in drug discovery: Advances and opportunities[J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(3): 200-216.

11 Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. J Nat Prod, 2020, 83(3): 770-803.

12 Nuzzo G, Senese G, Gallo C, et al. Antitumor potential of immunomodulatory natural products[J]. Mar Drugs, 2022, 20(6): 386.

13 Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: Molecular rival of cancer[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2013, 35(3): 473-485.

14 Bai J, Zhang Y, Tang C, et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110985.

15 Hadidi M, Liñán-Atero R, Tarahi M, et al. The potential health benefits of gallic acid: Therapeutic and food applications[J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13(8): 1001.

16 Khoshi MA, Keyvani-Ghamsari S, Khorsandi K. Gallic acid synergistically enhances the antibacterial activity of azithromycin in MRSA[J]. Int Microbiol, 2025, 28(4): 829-836.

17 Kahkeshani N, Farzaei F, Fotouhi M, et al. Pharmacological effects of gallic acid in health and disease: A mechanistic review[J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(3): 225-237.

18 Lee HL, Lin CS, Kao SH, et al. Gallic acid induces G1 phase arrest and apoptosis of triple-negative breast cancer cell MDA-MB-231 *via* p38 mitogen-activated protein kinase /p21/p27 axis[J]. Anti-Cancer Drugs, 2017, 28(10): 1150-1156.

19 Chen YJ, Lin KN, Jhang LM, et al. Gallic acid abolishes the EGFR/Src/Akt/Erk-mediated expression of matrix metalloproteinase-9 in MCF-7 breast cancer cells[J]. Chem Biol Interact, 2016, 252: 131-140.

20 Ko EB, Jang YG, Kim CW, et al. Gallic acid hindered lung cancer progression by inducing cell cycle arrest and apoptosis in A549 lung cancer cells *via* PI3K/Akt pathway[J]. Biomol Ther (Seoul), 2022, 30(2): 151-161.

21 Nam B, Rho JK, Shin DM, et al. Gallic acid induces apoptosis in EGFR-mutant non-small cell lung cancers by accelerating EGFR turnover[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(19): 4571-4575.

22 Wang R, Ma L, Weng D, et al. Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in human small cell lung cancer H446 cell line *via* the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 35(5): 3075-3083.

23 Tsai CL, Chiu YM, Ho TY, et al. Gallic acid induces apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells[J]. Anticancer Res, 2018, 38(4): 2057-2067.

24 Subramanian AP, Jaganathan SK, Mandal M, et al. Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(15): 3952-3961.

25 Lin X, Wang G, Liu P, et al. Gallic acid suppresses colon cancer proliferation by inhibiting SRC and EGFR phosphorylation[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(6): 638.

26 Xie J, Wang H, Xie W, et al. Gallic acid promotes ferroptosis in hepatocellular carcinoma *via* inactivating Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2024, 397(4): 2437-2445.

27 Al Balushi N, Hassan SI, Abdullah N, et al. Addition of gallic acid overcomes resistance to cisplatin in ovarian cancer cell lines[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2022, 23(8): 2661-2669.

28 Shruthi S, Mumbrekar KD, Rao BSS, et al. Gallic acid: A polyphenolic compound potentiates the therapeutic efficacy of cisplatin in human breast cancer cells[J]. Toxicol Res (Camb), 2023, 12(4): 544-550.

29 Haghshenas M, Firouzabadi N, Akbarizadeh AR, et al. Combination of metformin and gallic acid induces autophagy and apoptosis in human breast cancer cells[J]. Res Pharm Sci, 2023, 18(6): 663-675.

30 吴昊, 努兰·拜都拉, 刘琳玉, 等. 没食子酸对人食管癌TE-1细胞的体外抑制作用及其机制[J]. 中国药房, 2022, 33(12):1448-1454.
Wu H, Nuran BDL, Liu LY, et al. Inhibitory effects of gallic acid on human esophageal cancer TE-1 cells *in vitro* and its mechanism[J]. China Pharm, 2022, 33(12): 1448-1454.

31 Dickinson BC, Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses[J]. Nat Chem Biol, 2011, 7(8): 504-511.

32 Soundararajan L, Warrier S, Dharmarajan A, et al. Predominant factors influencing reactive oxygen species in cancer stem cells[J]. J Cell Biochem, 2024, 125 (1): 3-21.

33 García-Vázquez N, González-Robles TJ, Lane E, et al. Stabilization of GTSE1 by cyclin D1-CDK4/6-mediated phosphorylation promotes cell proliferation with implications for cancer prognosis [J]. eLife, 2025, 13: RP101075.

34 李雪华, 孙继红, 孙建国.细胞周期蛋白依赖性激酶家族的研究进展[J].药学进展, 2025, 49(1): 60-68.
Li XH, Sun JH, Sun JG. Research progress of cyclin-dependent kinase family[J]. Prog Pharm Sci, 2025, 49 (1): 60-68.

35 Rickheim DG, Nelsen CJ, Fassett JT, et al. Differential regulation of cyclins D1 and D3 in hepatocyte proliferation[J]. Hepatology, 2002, 36(1): 30-38.

36 Choi SY, Kee HJ, Jin L, et al. Inhibition of class Ⅱ a histone deacetylase activity by gallic acid, sulforaphane, TMP269, and panobinostat[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 145-154.

37 Chastney MR, Kaivola J, Leppänen VM, et al. The role and regulation of integrins in cell migration and invasion[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2025, 26 (2):147-167.

［本文编辑］ 朱金月

(上接第1629页)

24 Tao L, Liu H, Gong Y. Role and mechanism of the Th17/Treg cell balance in the development and progression of insulin resistance[J]. Mol Cell Biochem, 2019, 459(1-2):183-188.

25 Ma M, Wang M, Xu F, et al. The imbalance in Th17 and Treg cells in polycystic ovarian syndrome patients with autoimmune thyroiditis[J]. Immunol Invest, 2022, 51(5):1170-1181.

26 Chang Q, Yin D, Li H, et al. HDAC6-specific inhibitor alleviates Hashimoto's thyroiditis through inhibition of Th17 cell differentiation[J]. Mol Immunol, 2022, 149: 39-47.

27 Sun H, Lee HS, Kim SH, et al. IL-2 can signal *via* chemokine receptors to promote regulatory T cells' suppressive function[J]. Cell Rep, 2023, 42(8): 112996.

28 Pham D, Silberger DJ, Nguyen KN, et al. Batf stabilizes Th17 cell development *via* impaired Stat5 recruitment of Ets1-Runx1 complexes[J]. Embo J, 2023, 42(8): e109803.

29 Jones N, Vincent EE, Cronin JG, et al. Akt and STAT5 mediate naïve human $CD4^+$ T-cell early metabolic response to TCR stimulation[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2042.

［本文编辑］ 朱金月