论著·基础医学

小分子化合物yxx1121通过靶向降解CALR抑制EGFR/STAT3/PI3K/AKT信号级联并激活CASP9通路发挥抗胃癌作用

汪莉娜[1,2],吴春梅[1],李清丰[1],杨祷煜青[1],郑峻松[1],李露露[1],缪洪明[2] 陆军军医大学(第三军医大学):[1]药学与检验医学系临床检验与野战检验教研室,[2]高原军事医学系病理生理学教研室,重庆

[摘要] **目的** 胃癌是全球第五大常见恶性肿瘤,我国疾病负担尤为突出。发现新的致病驱动因子及其抑制剂对推动胃癌的精准治疗至关重要。本研究拟探究在钙稳态、蛋白质折叠和免疫反应等多种细胞过程中发挥关键作用的钙网蛋白(calreticulin,CALR)在胃癌中的功能及分子机制,并筛选靶向CALR的小分子化合物,评价其抗胃癌作用。**方法** ①通过慢病毒在胃癌细胞中敲低/过表达CALR,并通过Edu实验、流式细胞术、裸鼠移植瘤实验分析CALR在体内外对胃癌细胞增殖、凋亡及周期的影响;②通过转录组测序、RT-qPCR、Western blotting实验及流式细胞术分析CALR调控胃癌细胞增殖的机制;③通过CCK-8、SPR、分子动力学、分子对接、细胞热转移实验筛选并验证候选小分子化合物与CALR的靶向关系;④通过RT-qPCR、Western blotting、CHX、体内外实验、HE染色、血细胞及生化指标分析候选小分子化合物对CALR的降解机制、胃癌细胞增殖能力及毒性作用。**结果** ①Edu结果显示CALR的表达显著影响胃癌细胞的增殖($P<0.05$),流式细胞术分析显示抑制CALR表达可显著促进胃癌细胞凋亡能力($P<0.05$)。②机制研究表明,CALR通过协同调节CASP9凋亡通路以及磷酸化依赖性的致癌信号级联(EGFR/STAT3/PI3K/AKT),发挥凋亡调控功能,在CALR敲低模型中,使用CASP9抑制剂可显著抑制MGC-803细胞凋亡($P<0.05$)及cleaved-CASP9的表达。③小分子化合物yxx1121主要通过溶酶体途径靶向CALR蛋白降解,在CALR过表达的胃癌细胞中,该抑制剂在体内外模型中均表现出低毒性且有效的增殖抑制作用($P<0.05$)。**结论** CALR在胃癌中表达上调并促进细胞增殖,其机制涉及EGFR/STAT3/PI3K/AKT信号级联及CASP9凋亡通路;新型小分子化合物yxx1121可通过溶酶体途径靶向降解CALR,抑制上述致癌信号级联,从而发挥抗胃癌作用。

[关键词] 胃癌;靶向治疗;CALR;小分子化合物

[中图法分类号] R735.5;R914.4;R979.19 [文献标志码] A

Small-molecule compound yxx1121 exerts anti-gastric cancer effects by targeting CALR degradation to inhibit the EGFR/STAT3/PI3K/AKT signaling cascade and activate the CASP9 pathway

Wang Lina[1,2], Wu Chunmei[1], Li Qingfeng[1], Yang Yiyuqing[1], Zheng Junsong[1], Li Lulu[1], Miao Hongming[2]
[1]Department of Clinical and Military Laboratory Medicine, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, [2]Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** Gastric cancer (GC) is the fifth most common malignancy worldwide, and the

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82003109);陆军军医大学本科生科研培育项目(2024XBK21)

[通信作者] 缪洪明,E-mail:hongmingmiao@sina.com
李露露,E-mail:lululilululi@163.com

2097-0927/Copyright © 2026, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:汪莉娜,吴春梅,李清丰,等. 小分子化合物yxx1121通过靶向降解CALR抑制EGFR/STAT3/PI3K/AKT信号级联并激活CASP9通路发挥抗胃癌作用[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(19):2704-2718. DOI:10.16016/j.2097-0927.202607065.

Citation: Wang L N, Wu C M, Li Q F, *et al*. Small-molecule compound yxx1121 exerts anti-gastric cancer effects by targeting CALR degradation to inhibit the EGFR/STAT3/PI3K/AKT signaling cascade and activate the CASP9 pathway[J]. J Army Med Univ, 2026, 48(19): 2704-2718. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202607065.

disease burden is particularly prominent in China. Identifying novel pathogenic drivers and their inhibitors is crucial for advancing precision treatment of GC. This study aimed to investigate the function and molecular mechanisms of calreticulin (CALR), which plays key roles in multiple cellular processes such as calcium homeostasis, protein folding, and immune responses, in GC, and to screen small-molecule compounds targeting CALR and evaluate their anti-GC effects. **Methods** ①CALR was knocked down or overexpressed in GC cells *via* lentivirus, and the effects of CALR on GC cell proliferation, apoptosis, and cell cycle *in vitro* and *in vivo* were analyzed by EdU assay, flow cytometry, and xenograft tumor model in nude mice; ②The mechanism by which CALR regulates the proliferation of GC cells using transcriptome sequencing, RT-qPCR, Western blotting, and flow cytometry; ③ Candidate small-molecule compounds targeting CALR were screened and validated by CCK-8 assay, surface plasmon resonance (SPR), molecular dynamics, molecular docking, and cellular thermal shift assay; ④ To clarify the degradation mechanism of the candidate small-molecule compounds, its inhibitory effect on gastric cancer cell proliferation, and its toxicity were analyzed by RT-qPCR, Western blotting, cycloheximide (CHX) chase assay, *in vitro* and *in vivo* experiments, HE staining, and blood cells and biochemical indicators. **Results** ①EdU assay showed that CALR expression significantly affected the proliferation of GC cells ($P<0.05$). Flow cytometry analysis revealed that inhibition of CALR expression significantly promoted apoptosis in GC cells ($P<0.05$); ② Mechanistic studies demonstrated that CALR regulated apoptosis by synergistically modulating the caspase 9 (CASP9) apoptotic pathway and phosphorylation-dependent oncogenic signaling cascades (EGFR/STAT3/PI3K/AKT). In CALR-knockdown model, treatment with a CASP9 inhibitor significantly suppressed apoptosis ($P<0.05$) and cleaved-CASP9 expression in MGC-803 cells; ③ The small-molecule compound yxx1121 primarily targeted CALR protein degradation *via* the lysosomal pathway, and this inhibitor exhibited low toxicity and effective proliferation inhibition in CALR-overexpressing GC cells *in vitro* and *in vivo* ($P<0.05$). **Conclusion** CALR is upregulated in gastric cancer and promotes cell proliferation, and its mechanism involves the EGFR/STAT3/PI3K/AKT signaling cascade and the CASP9 apoptotic pathway. The novel small-molecule compound yxx1121 can target CALR for degradation through the lysosomal pathway, inhibit the above oncogenic signaling cascades, and thereby exert anti-GC effects.

[**Key words**] gastric cancer; targeted therapy; CALR; small-molecule drugs

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82003109), and the Scientific Research Cultivation Project for Undergraduates of Army Medical University (2024XBK21). Corresponding authors: Miao Hongming, E-mail: hongmingmiao@sina.com; Li Lulu, E-mail: lululilululi@163.com

胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均位居世界前列。我国疾病负担尤为突出,胃癌发病率居恶性肿瘤第五位、死亡率第三位[1-3]。尽管近年来在胃癌的早期筛查、诊断和治疗方面取得了显著进展,但在预防和控制方面仍面临诸多挑战,在中国胃癌高风险地区,老年人群的生存率仍呈下降趋势[4]。此外,胃癌的分子异质性和耐药机制进一步增加了治疗的复杂性。因此,阐明胃癌的发生与发展机制,使胃癌的治疗方案更加个性化,对提高患者的生存率和生活质量具有重要意义。钙网蛋白(calreticulin,CALR)最初被鉴定为内质网中的钙结合蛋白[5],在细胞功能中发挥关键作用、具有多种功能,包括钙稳态、蛋白质折叠以及免疫反应等[6]。近年来,CALR在癌症和免疫学领域受到了广泛关注,作为免疫原性细胞死亡的重要分子,当其转运至细胞表面时,会发出“吞噬我”的信号,促进树突状细胞对凋亡细胞的吞噬,并启动抗肿瘤免疫反应[7]。已有研究表明,CALR可能是免疫检查点的潜在共调节因子,同时也是与肿瘤微环境相关的生物标志物[8]。这些证据使CALR成为癌症免疫治疗中一种潜在的生物标志物和治疗靶点。此外,CALR在肿瘤发生和进展过程中的信号转导机制中也发挥着重要作用。在食管癌中,CALR可通过STAT5A通路上调神经基质蛋白-1,或调控STAT3-CTTN-Akt信号轴,从而影响食管癌细胞的侵袭性、转移潜能以及抗凋亡能力[9]。在胰腺癌中,CALR通过调控整合素/EGFR-ERK/MAPK信号级联促进肿瘤转

移[10]。在胃癌中,陈等研究人员发现,CALR在胃癌中显著过表达,并与淋巴结转移、浸润及预后密切相关[11]。此外,CALR与血管内皮生长因子A(Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGF-A)的表达呈高度相关性,CALR可通过ARE序列与血管内皮生长因子-A形成复合物,并调控VEGF-A mRNA的稳定性,从而影响血管生成,进而调节胃癌的发生和进展[12]。同时,本课题组先前的研究表明[13],CALR通过G9a介导E-钙黏蛋白启动子区域对H3K9进行二甲基化,从而增强胃癌的转移;且CALR表达与胃癌肿瘤大小显著相关:肿瘤大小<5 cm组的CALR免疫组化评分为(5.00±4.94)分,而肿瘤≥5 cm组则为(9.00±3.99)分。鉴于CALR与胃癌的生长和转移密切相关,且尚未报道针对CALR的靶向治疗策略,同时已有部分研究显示CALR可作为癌症的标志物和治疗靶点[14],因此,本研究旨在深入探究CALR调控胃癌进展的机制,并探索基于CALR的潜在靶向治疗策略。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

AGS、MGC-803、SGC-7901细胞购自北京北纳创联生物技术研究院,分别用DMEM/F-12(Gibco, USA)、DMEM(Gibco, USA)、RPMI 1640(Gibco, USA)培养基培养,所有培养基均加入10%FBS(Procell, China)。所有细胞均置于37 ℃、5%CO_2的培养箱中培养。

1.2 CALR敲低/过表达稳转细胞株构建及转录组测序

该实验详细步骤参见本课题组已发表文献[13]。首先基于CALR在不同胃癌细胞系中的表达水平,选择MGC-803、AGS细胞构建CALR稳定敲除株、SGC-7901细胞构建CALR稳定过表达株。用于CALR过表达的慢病毒载体及其相应的阴性对照(negative control, NC)购自苏州吉玛基因股份有限公司。根据厂家说明,SGC-7901细胞分别感染LV18-Puro-CALR或LV18-Puro-NC慢病毒,感染浓度为100感染复数(multiplicity of infection, MOI)。用于人CALR敲低及其阴性对照的慢病毒载体购自汉恒生物科技(上海)有限公司。MGC-803和AGS细胞按照供应商推荐的方法转导HBLV-Luc-Puro-shCALR或HBLV-Luc-Puro-NC慢病毒,感染浓度为50/100 MOI。随后,所有感染细胞均用嘌呤霉素(1 μg/mL)筛选2周,以建立稳转细胞系,检测上述胃癌细胞系中CALR敲低/过表达效率,取有效稳转细胞系及其对照组总RNA 3 μg进行测序文库构建、转录组测序及生物信息学分析,此部分实验由北京诺禾致源科技股份有限公司负责实施。

1.3 Western blotting检测CALR及EGFR/STAT3/PI3K/AKT/CASP9通路相关蛋白表达与磷酸化水平

首先配置蛋白裂解液(1 mL RIPA buffer + 2 μL磷酸酶和蛋白酶抑制剂),RIPA buffer购自Thermo Fisher Scientific Inc,磷酸酶蛋白酶抑制剂购自上海碧云天生物技术股份有限公司;而后收集细胞用冰的PBS洗1~2次,向其中加入对应体积的蛋白裂解液冰上裂解30 min,高速离心5 min,收取上清;使用BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, USA)试剂盒测蛋白浓度;每组取40 μg蛋白样品进行经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,以恒定电流200 mA转移90 min至PVDF膜;将膜用5%脱脂牛奶封闭,TBST缓冲液洗涤,随后在4 ℃下与以下一抗孵育过夜:STAT3、p-STAT3、EGFR、p-EGFR、c-Myc、CDK4、AKT、p-AKT、CASP9、cleaved CASP9、BCL2、BCLXL抗体购买于Cell Signaling Technology,GAPDH、CALR、vinculin抗体购买于Abcam,其中vinculin和GAPDH作为内参;膜经过TBST洗涤3次后,室温下与HRP标记的二抗(ZSGB-BIO,中国)孵育1 h。使用SuperSignal™ West Atto超敏显色底物(Thermo Fisher,美国)检测蛋白信号,并通过ChemiDoc™ MP成像系统(Bio-Rad,美国)进行可视化。Western blotting数据采用Image Lab软件进行定量分析。需要注意的是,为减少管家蛋白整体变化带来的偏差,目标蛋白被与同一膜上大小匹配的内参对照进行归一化处理。

1.4 流式细胞术检测CALR敲低/过表达后胃癌细胞周期与凋亡

采用Annexin V-FITC/PI双染法流式细胞术分析凋亡。将MGC-803和SGC-7901细胞以5×10^5个/孔的密度接种于6孔板中,在37 ℃、5% CO_2条件下培养24 h。处理后,收集附着细胞和游离细胞,并用冰PBS洗涤2次。随后将细胞重悬于100 μL 1×结合缓冲液中,浓度为1×10^6个/mL,加入2 μL Annexin V-FITC和2 μL碘化丙啶(propidium iodide,PI)(碧云天,中国),在暗处孵育15 min。通过流式细胞分析仪(BD Biosciences,美国)测定凋亡率,并使用FlowJo v10软件(Tree Star,美国)进行数据分析。实验重复3次(n=3),以确保统计学可靠性。

1.5 CCK-8检测yxx1121对胃癌细胞活力的影响

将对数期生长的目的细胞及对照细胞分别以5 000个/孔的浓度接种于96孔板中,每孔培养基总体积为100 μL,在目的孔周围加100 μL/孔的无菌PBS,以防止培养过程中培养基蒸发。达到培养目的时间

后向每个孔中加入10 μL CCK-8溶液及90 μL对应培养基(Dojindo,日本),置于37℃下孵育1 h,直至出现橙色。使用酶标仪(BioRad,美国)在450 nm处测定吸光度。

1.6 Edu染色检测CALR及yxx1121对胃癌细胞增殖的影响

将对数期的细胞以每孔1×10^{5}个细胞的密度接种于含无菌盖玻片的24孔板中,培养24 h。随后将细胞与含50 μmol/L EdU的培养基(RIB-BIO,中国)孵育2 h。经PBS洗涤后,用4%多聚甲醛在室温下固定30 min。接着,在脱色摇床上用2 mg/mL甘氨酸处理样本,再用0.5% Triton X-100在PBS中渗透10 min。之后加入500 μL点击反应溶液,孵育30 min。细胞核用DAPI进行染色,计算EdU/DAPI阳性率。使用荧光显微镜(尼康,日本)采集并观察图像。

1.7 RT-qPCR检测CALR及增殖/凋亡相关基因mRNA表达

将AGS、MGC-803和SGC-7901细胞分别接种于12孔板中,过夜培养。随后使用Takara试剂(#9109)提取总RNA,并通过逆转录试剂(Takara,#RR037A)合成cDNA。接着采用SYBR® Green实时荧光定量PCR混合液(Toyobo,#QPK201)及目标基因的特异性引物进行RT-qPCR检测。所有操作均按照制造商说明书执行。每个样本被分装至96孔板的三个孔中,并使用实时荧光定量PCR仪(BioRad,美国)进行分析。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量。引物序列:*CALR*,(上游)5′-CAGACTCCAAGCCTGAGGAC-3′和(下游)5′-CCTCCTCTTTGCGTTTCTTG-3′;*Caspase9*,(上游)5′-GACCGGAAACACCCAGACCAGTGGA-3′和(下游)5′-GCAGTGGCCACAGGGCTCCAT-3′;*BCL-2*,(上游)5′-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC-3′和(下游)5′-TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC-3′;*BCL-XL*,(上游)5′-GGGAGCTGGTGGTTGACTTT-3′和(下游)5′-CAGTGGCTCCATTCACCGC-3′;*CDK4*,(上游)5′-CTACAGCTACCAGATGGCACTTAC-3′和(下游)5′-CAAAGATACAGCCAACACTCCACA-3′;c-Myc,(上游)5′-CCCCTACCCTCTCAACGACA-3′和(下游)5′-CTTCTTGTTCCTCCTCAGAGTCG-3′;*CyclinD1*,(上游)5′-CGATGCCAACCTCCTCAACGA-3′和(下游)5′-TCGCAGACCTCCAGCATCCA-3′。

1.8 SPR检测yxx1121与CALR的结合亲和力

实验由上海陶素生化科技有限公司完成,详细操作步骤参见文献[15]。实验分为蛋白质偶联和CALR蛋白与化合物相互作用检测2部分。CALR蛋白偶联条件为:在pH=5.0乙酸钠缓冲液中,蛋白浓度约500 μg/mL,芯片激活时间420 s,阻断时间420 s。化合物检测条件为:样品注入时间60 s,解离时间90 s。

1.9 细胞热转移实验(cellular thermal shift assay,CETSA)检测yxx1121与CALR的结合

yxx1121与靶标蛋白CALR识别和热移位评估具体方法参考文献[16]。首先第一天将胃癌细胞以1.5×10^{5}个/孔的密度接种于6孔板,第二天,将细胞分为对照组和yxx1121组:yxx1121组用6 μmol/L yxx1121处理12 h,对照组给予等体积DMSO处理。处理结束后,将细胞置于冰上,用含蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解30 min。裂解液于4℃、12 000 ×g离心15 min,收集上清液,将蛋白浓度调整为2 mg/mL,并按每管40 μL分装。各分装样品分别于不同温度(35~60℃)下加热5 min,以诱导热变性。随后,样品于1 500 ×g离心30 min,取上清液进行Western blotting分析。分子对接和分子动力学实验由重庆柏欧尼生物技术有限公司完成,使用Vina对接软件,将配体与受体设计为半柔性结构[17-18]。使用AlphaFold预测的结构(UniProt ID:P27797)作为初始结构[19]将一个16×16×16 Å的网格围绕预测口袋的质心进行定位。穷尽性参数设置为40,能量范围设为5 kcal/mol,最多可生成10种构象。选择能量最低、构象排名最高的对接复合物进行进一步研究。通过Discovery Studio Visualizer和Pymol对计算所得结果进行了分析。复杂模型的分子动力学模拟由重庆柏欧尼生物技术有限公司使用基于对接几何结构的GROMACS-2022软件包完成[20~22]。

1.10 放线菌酮法追踪实验检测yxx1121对CALR蛋白稳定性的影响

首先将提前一天种植好的胃癌细胞从培养箱取出,每孔加入6 μmol/L yxx1121处理24 h。随后,用含有50 μg/mL放线菌酮的完整新鲜培养基替换原培养基,以抑制新合成蛋白质的产生。添加放线菌酮后,在指定时间点(0、4、6和8 h)收获细胞并用冰PBS洗涤,而后在冰上使用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解。离心后收集总蛋白提取物,并采用BCA法进行定量。等量的蛋白质经Western blotting分析,使用Image lab软件测定目标蛋白对应的条带强度,并将其与0 h的值进行归一化。

1.11 yxx1121处理后血细胞与肝肾功能检测

小鼠经过眼眶采血后,收集血清,随后送于陆军军医大学第一附属医院检验科检测红细胞、白细胞、

血红蛋白、肌酐、ALP、AST、ALT。

1.12 裸鼠皮下移植瘤实验检测yxx1121对胃癌细胞成瘤能力及体内毒性的影响

①皮下移植瘤模型构建:从北京维通利华实验动物技术公司购入6至8周龄的BABL/c裸鼠,随机分为4组(n=7)。每组皮下注射1×10^6个细胞:稳定敲除CALR的MGC-803细胞、过表达CALR的SGC-7901细胞及其相应的对照细胞。4周后颈椎脱臼处死小鼠,测量肿瘤体积和体质量以评估生长情况。②yxx1121体内毒性分析:对于皮下携带肿瘤的小鼠(n=3),将yxx1121稀释于2%DMSO+40%PEG300+2%Tween 80+56%PBS溶液中,采用腹腔注射方式,每3天一次,剂量为30 mg/kg,持续39 d。动物实验已获得陆军军医大学伦理委员会批准(AMUWEC2020991)。所有肿瘤测量值均控制在伦理批准的阈值范围内。

1.13 HE染色观察yxx1121对主要脏器组织病理改变的影响

小鼠颈椎脱臼处死后靶器官被取出,用预冷的PBS彻底冲洗,并用滤纸吸干表面水分。随后将组织置于4%多聚甲醛溶液中固定超过24 h。固定后,组织被包埋于石蜡中并切片。脱蜡与再水化后,切片依次用苏木精染色15 min,以蒸馏水冲洗,再用伊红染色7 min并再次用蒸馏水冲洗。最后,切片进行脱水、透明和装片。染色完成后,在光学显微镜下观察切片,并拍摄数字图像。

1.14 统计学分析

利用GraphPad Prism 10.0软件进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较通过独立样本t检验,单因素多组资料通过单因素方差分析。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CALR上调促进胃癌细胞增殖能力

鉴于前期研究显示CALR表达与胃癌患者肿瘤大小显著相关,本研究进一步探讨CALR对胃癌细胞增殖的调控作用。Edu实验结果显示,敲除CALR可显著抑制胃癌细胞增殖,过表达CALR则显著促进胃癌细胞增殖(图1A~C,P<0.05)。裸鼠移植瘤实验显示,敲除CALR后肿瘤体积显著减小,过表达CALR组肿瘤体积较对照组明显增大(图1D、E,P<0.05)。以上结果表明,CALR可促进胃癌细胞增殖。

2.2 下调CALR可导致胃癌细胞周期阻滞进而促进胃癌细胞凋亡

进一步检测其对细胞周期和凋亡的影响。流式细胞术结果显示,敲低CALR后,MGC-803细胞凋亡率显著升高(P<0.05);AGS细胞中,shCALR-1组凋亡率显著升高(P<0.01),shCALR-2组凋亡率虽有所升高,但差异无统计学意义;过表达CALR则抑制胃癌细胞凋亡(P<0.05,图2A~F)。细胞周期分析显示,敲低CALR后,MGC-803和AGS细胞G1期比例升高、S期比例降低(图2G~J);过表达CALR后,G1期比例降低、S期比例升高(图2K、L)。上述结果表明,CALR敲低可诱导胃癌细胞G1期阻滞,抑制其进入S期,并促进细胞凋亡,从而抑制增殖。

2.3 CALR通过EGFR/STAT3/PI3K/AKT及CASP9信号通路调控胃癌细胞增殖

为了探究CALR调控胃癌细胞增殖的具体机制,首先对过表达CALR的胃癌细胞及其对照组进行了转录组测序分析,结果显示,当CALR上调时共有721个基因上调、801个基因下调(图3A)。KEGG通路分析显示,差异基因的上调与PI3K-Akt信号通路相关(图3B)。进一步对受CALR过表达影响的多个增殖和凋亡相关基因进行了分析(图3C),并通过Western blotting和RT-qPCR实验验证了上述分子(CASP9/c-Myc/CDK4/BCL2/BCL-XL/cyclin D1)的变化。结果显示,在CALR敲低模型中,CASP9的mRNA和蛋白水平均显著上调,而在CALR过表达模型中则明显下调(图3D);在CALR敲低模型中,c-Myc、p-EGFR、p-STAT3、p-PI3K和p-AKT蛋白水平显著降低,而CALR过表达模型中这些信号分子则显著升高(图3D、E)。更重要的是,在CALR敲低模型中,使用CASP9抑制剂可显著抑制胃癌细胞的凋亡(P<0.05,图3F、G)以及cleaved CASP9的表达(图3H)。上述结果表明,CALR可能通过影响CASP9和c-Myc的表达水平,以及EGFR、STAT3、PI3K和AKT的磷酸化,来调控胃癌细胞的增殖。

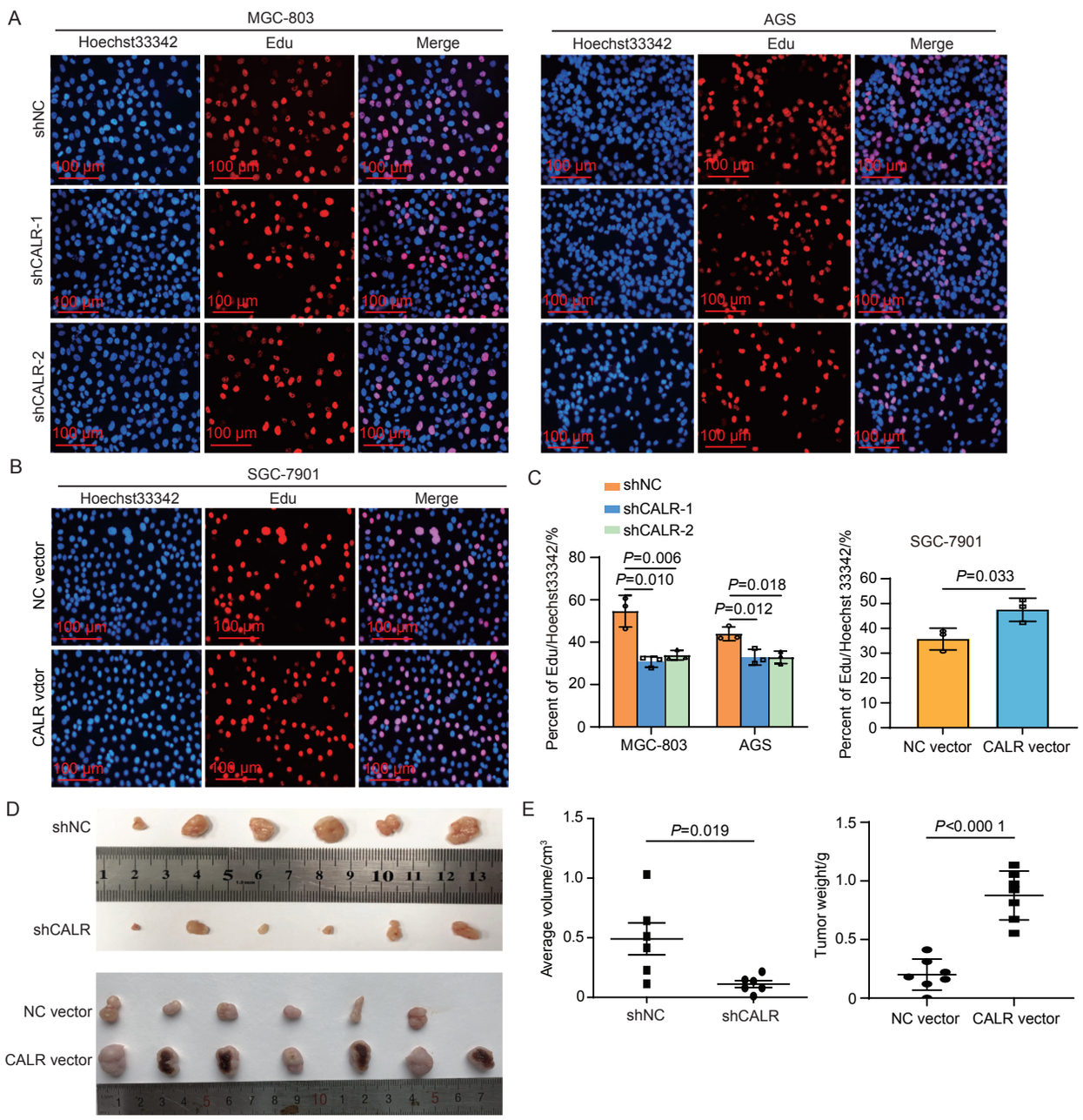
2.4 靶向CALR的小分子筛选

以上研究结果表明,CALR在体内外均促进胃癌细胞增殖,凸显了其作为新型致癌驱动因子的作用。然而,迄今为止尚未有针对CALR的治疗药物。因此,利用自建小分子化合物库在CALR非过表达和过表达模型中进行了比较筛选,以识别可调节CALR活性的化合物。比较分析显示,在过表达模型中,yxx1121显著抑制胃癌细胞增殖,此外,SPR结果显示yxx1121表现出更高的结合亲和力(KD=4.96×10^{-6} mol/L,图4A)。为阐明其相互作用机制,进一步对CALR-yxx1121复合物进行了分子对接及分子动力学模拟分析(图4B~G)。进一步,细胞热转移实验也表明yxx1121能够与CALR蛋白结合(图4H)。同时测定yxx1121在胃

癌细胞和正常细胞(HUVEC和GES-1)中的IC_{50}值,结果显示,正常细胞组的IC_{50}值高于胃癌细胞组(图4I、J)。这些结果表明,yxx1121是一种潜在的靶向CALR的小分子化合物。

2.5　yxx1121通过溶酶体/晚期自噬途径靶向降解CALR蛋白

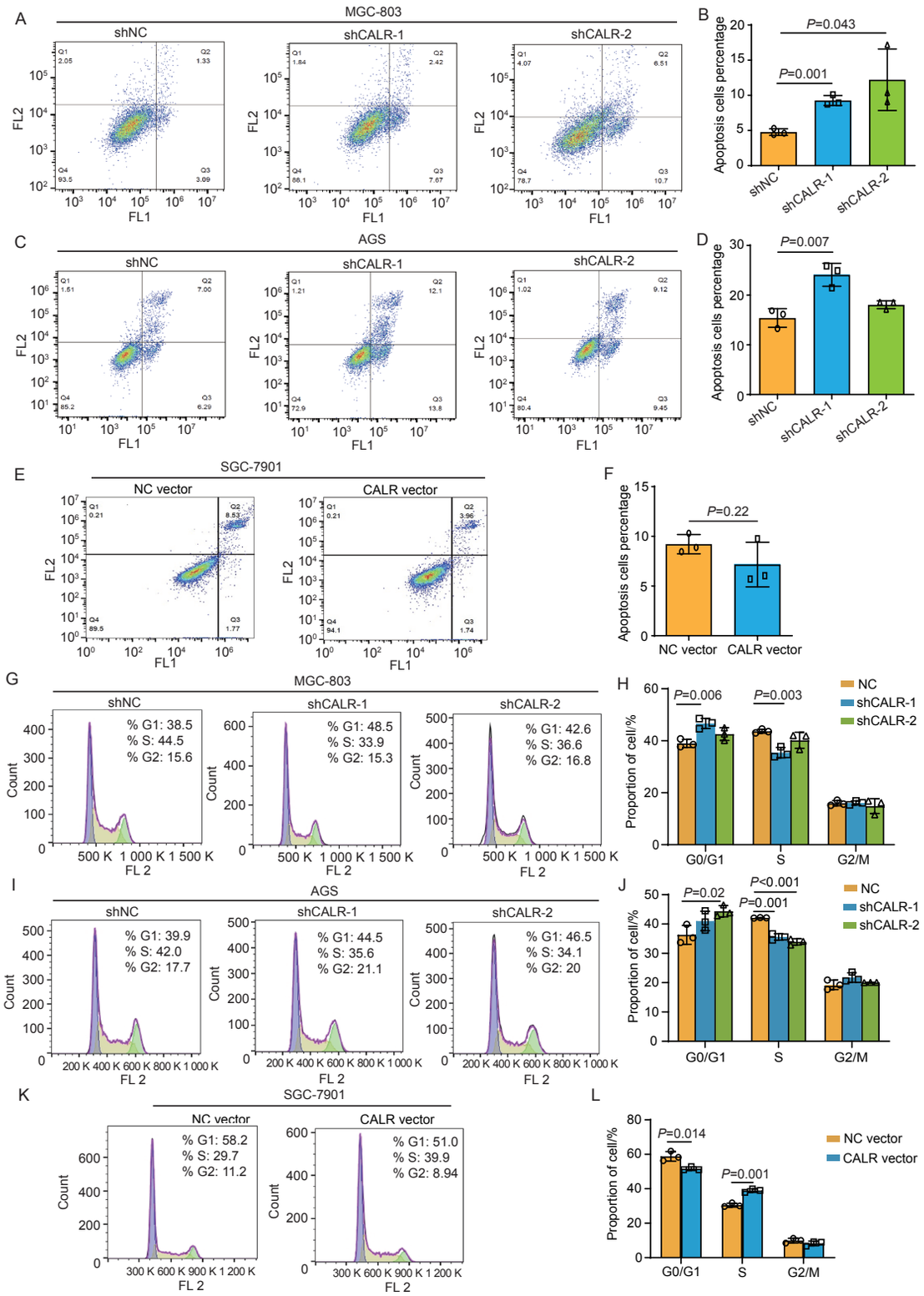
RT-qPCR显示,在yxx1121处理24 h后,与对照组相比,CALR敲低细胞和CALR过表达细胞中的CALR mRNA水平显著升高($P<0.05$,图5A),Western blotting显示CALR蛋白水平则明显降低($P<0.05$,图5B)。mRNA上调与蛋白下降之间的这种明显差异表明,yxx1121可能在转录后水平特异性地调控CALR,其机制可能涉及蛋白质失稳或翻译抑制。因此,进行放线菌酮实验,结果表明,在过表达组中,yxx1121处理后



A: Representative images of EdU assay in CALR-knockdown GC cells; B: Representative images of Edu assay in CALR-overexpressing GC cells; C: Statistical analysis of EdU-positive cells; D: Gross morphology of subcutaneous xenografts in nude mice; E: Statistical analysis of tumor volume and tumor weight

图1　CALR对胃癌细胞增殖能力的影响

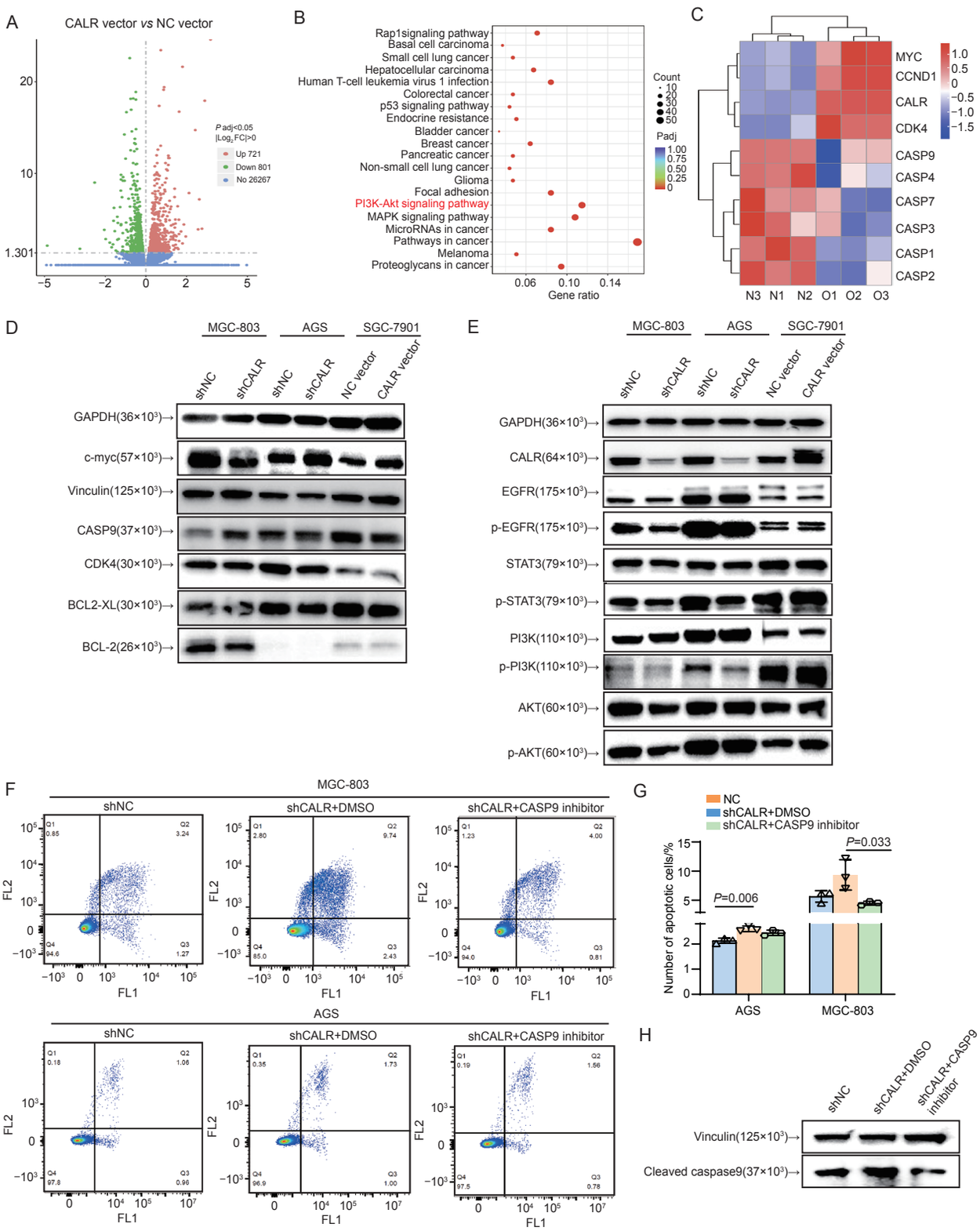
Figure 1　Effects of calreticulin (CALR) on proliferation of gastric cancer (GC) cells



A and B: Representative flow cytometry plots (A) and statistical analysis (B) of apoptosis in MGC-803 cells after CALR knockdown; C and D: Representative flow cytometry plots (C) and statistical analysis (D) of apoptosis in AGS cells after CALR knockdown; E and F: Representative flow cytometry plots (E) and statistical analysis (F) of apoptosis in SGC-7901 cells after CALR overexpression; G and H: Representative flow cytometry plots (G) and statistical analysis (H) of cell cycle distribution in MGC-803 cells after CALR knockdown; I and J: Representative flow cytometry plots (I) and statistical analysis (J) of cell cycle distribution in AGS cells after CALR knockdown; K and L: Representative flow cytometry plots (K) and statistical analysis (L) of cell cycle distribution in SGC-7901 cells after CALR overexpression

图2 CALR对胃癌细胞周期及凋亡的影响

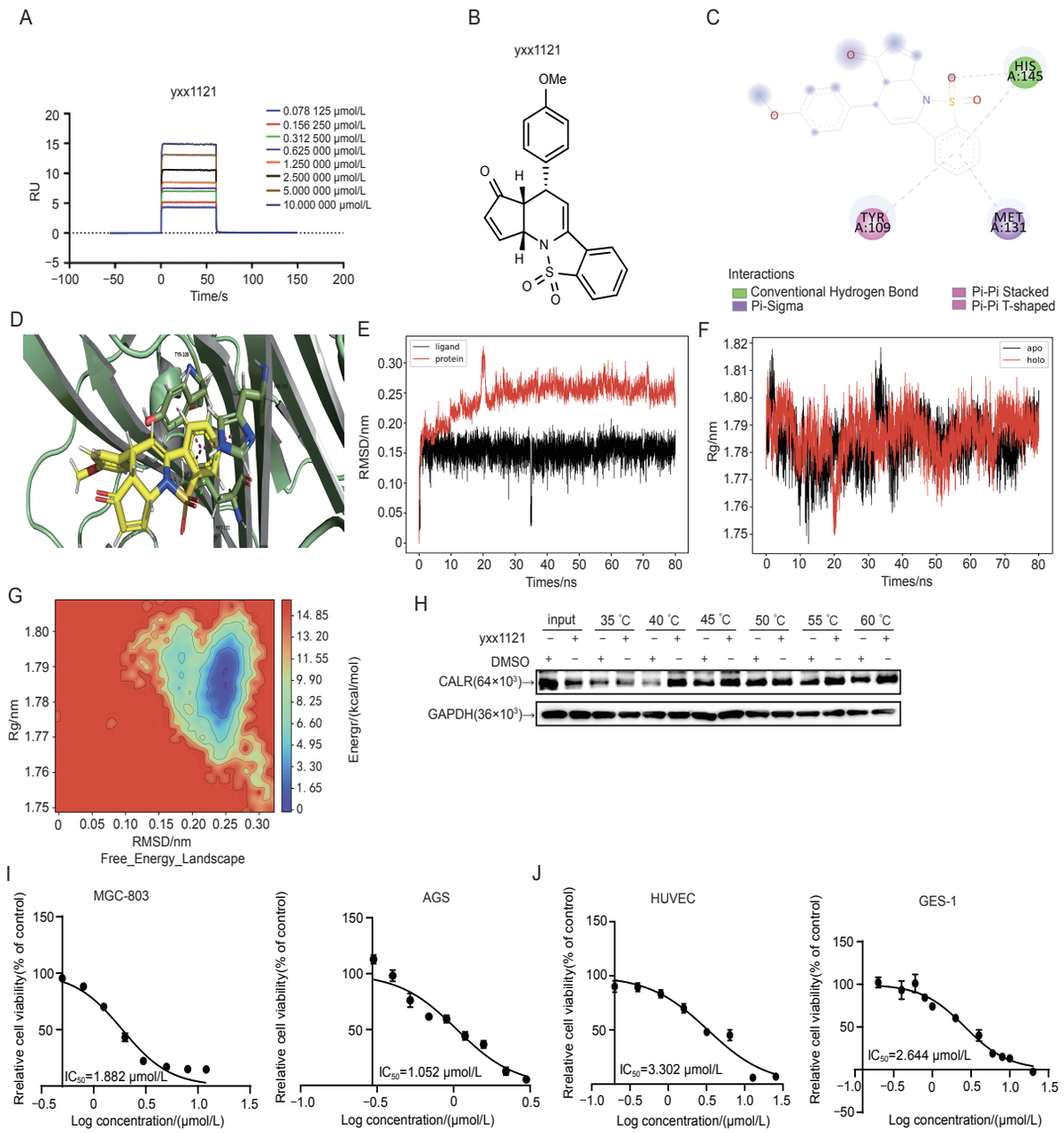
Figure 2 Impact of CALR on the cell cycle and apoptosis in GC cells



A to C: Transcriptome sequencing analysis of CALR-overexpressing GC cells, including volcano plot (A), KEGG pathway enrichment (B), and heatmap (C); D and E: Western blotting of apoptosis-related molecules (D) and signaling pathway molecules (E); F and G: Representative flow cytometry plots (F) and statistical analysis (G) of apoptosis in CALR-knockdown GC cells treated with CASP9 inhibitor; H: Western blotting analysis of cleaved CASP9 expression in CALR-knockdown GC cells treated with CASP9 inhibitor

图3 CALR通过磷酸化激酶/CASP9网络调控胃癌细胞增殖

Figure 3 CALR regulates the proliferation of GC cells *via* CASP9/phospho-kinase networks



A: Determination of the interaction between CALR protein and compound yxx1121 by surface plasmon resonance (SPR) assay; B: Structure of yxx1121; C: 2D interaction diagram between yxx1121 and CALR protein; D: 3D interaction diagram between yxx1121 and CALR protein; E: Variation of root mean square deviation (RMSD) values of CALR and small molecules with time; F: Change in radius of gyration (Rg) value of CALR over time in pure protein system and complex system; G: Free energy landscape map with RMSD and Rg as transverse and longitudinal coordinates in complex system; H: Cells were incubated with yxx1121 or DMSO for 12 h, and cellular thermal shift assay (CETSA) analyzed the thermal stabilization of CALR protein at different temperatures; I: The IC_{50} of yxx1121 in GC cells; J: The IC_{50} of yxx1121 in normal cells

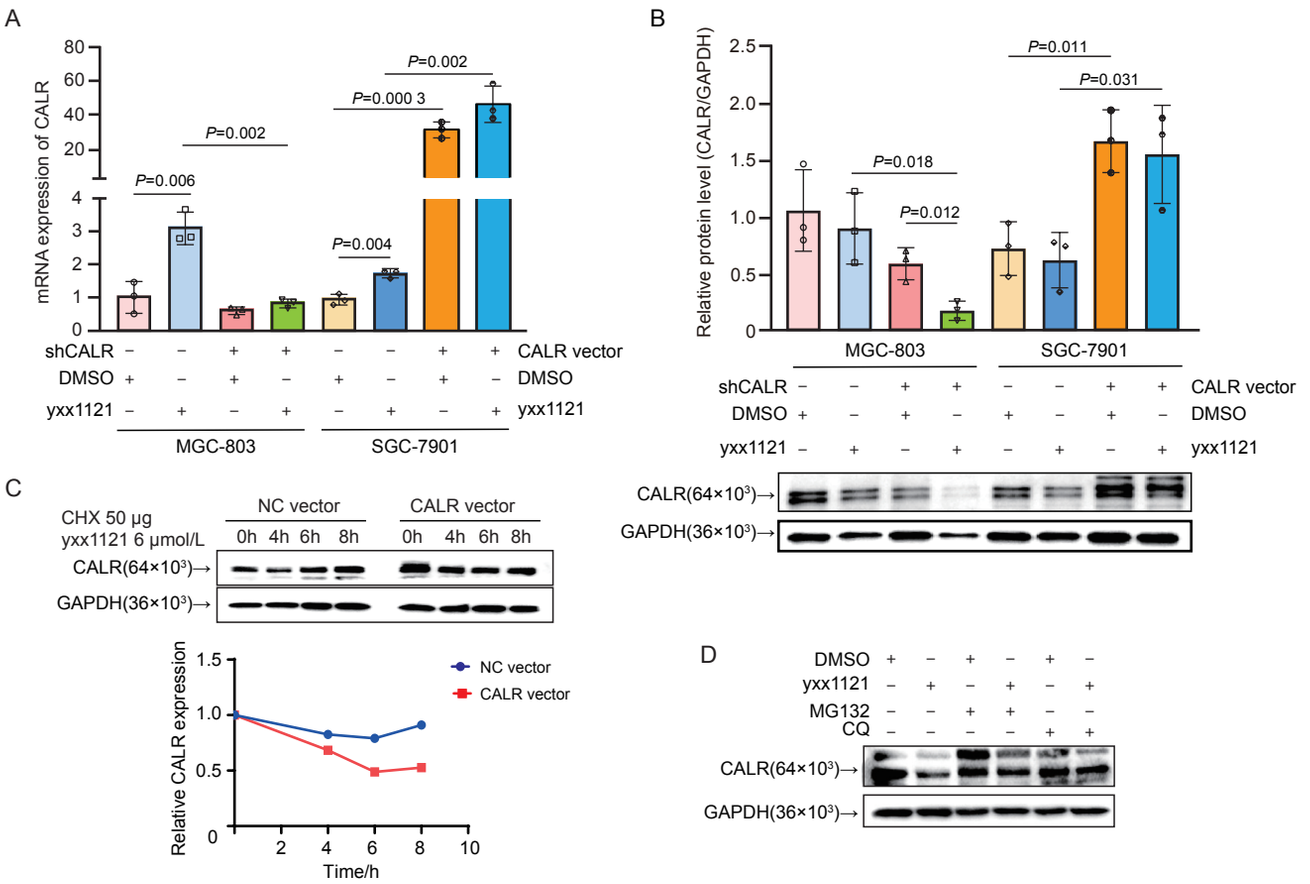
图4 靶向CALR小分子药物筛选

Figure 4 Screening of CALR-targeting small molecules

CALR蛋白降解速度比对照组更快(图5C)。同时通过溶酶体/晚期自噬抑制剂(氯喹,CQ)、蛋白酶体抑制剂(MG132)处理后发现yxx1121主要通过溶酶体降解通路影响CALR蛋白的稳定性(图5D)。结果表明,yxx1121通过溶酶体/晚期自噬途径靶向降解CALR蛋白。

2.6 yxx1121对胃癌细胞增殖调控作用依赖于CALR

本研究进一步通过体内外实验证明了yxx1121对胃癌细胞增殖调控作用依赖于CALR。体外Edu实验结果显示,与对照组相比,yxx1121在CALR过表达细胞中的抗增殖效果更显著(73.5% *vs* 52.7%,$P<0.05$),



A: RT-PCR analysis of CALR mRNA expression in CALR-knockdown (MGC-803) or CALR-overexpressing (SGC-7901) GC cells after treatment with yxx1121 (10 μmol/L) for 24 h; B: Grayscale quantification and Western blotting of CALR protein expression in CALR-knockdown (MGC-803) or CALR-overexpressing (SGC-7901) GC cells after treatment with yxx1121 (10 μmol/L) for 24 h; C: Effect of yxx1121 on CALR protein stability in CALR-overexpressing GC cells; D: Analysis of the effect of yxx1121 on CALR degradation pathways. MG132 represents a proteasome pathway inhibitor and CQ represents a lysosomal pathway inhibitor

图5 yxx1121对CALR mRNA及蛋白水平的影响

Figure 5 Effects of yxx1121 on mRNA and protein expression of CALR

而在CALR敲除细胞中效果较弱(33.5% *vs* 27.6%, $P<0.05$,图6A、B)。体内通过将yxx1121(30 mg/kg)应用于CALR过表达的BALB/c裸鼠异种移植胃癌模型(图6C),结果显示,yxx1121显著抑制了因CALR过表达引起的胃癌细胞增殖,其抑制效果强于非过表达组(图6D、E)。以上结果提示,yxx1121对胃癌细胞增殖调控作用依赖于CALR。

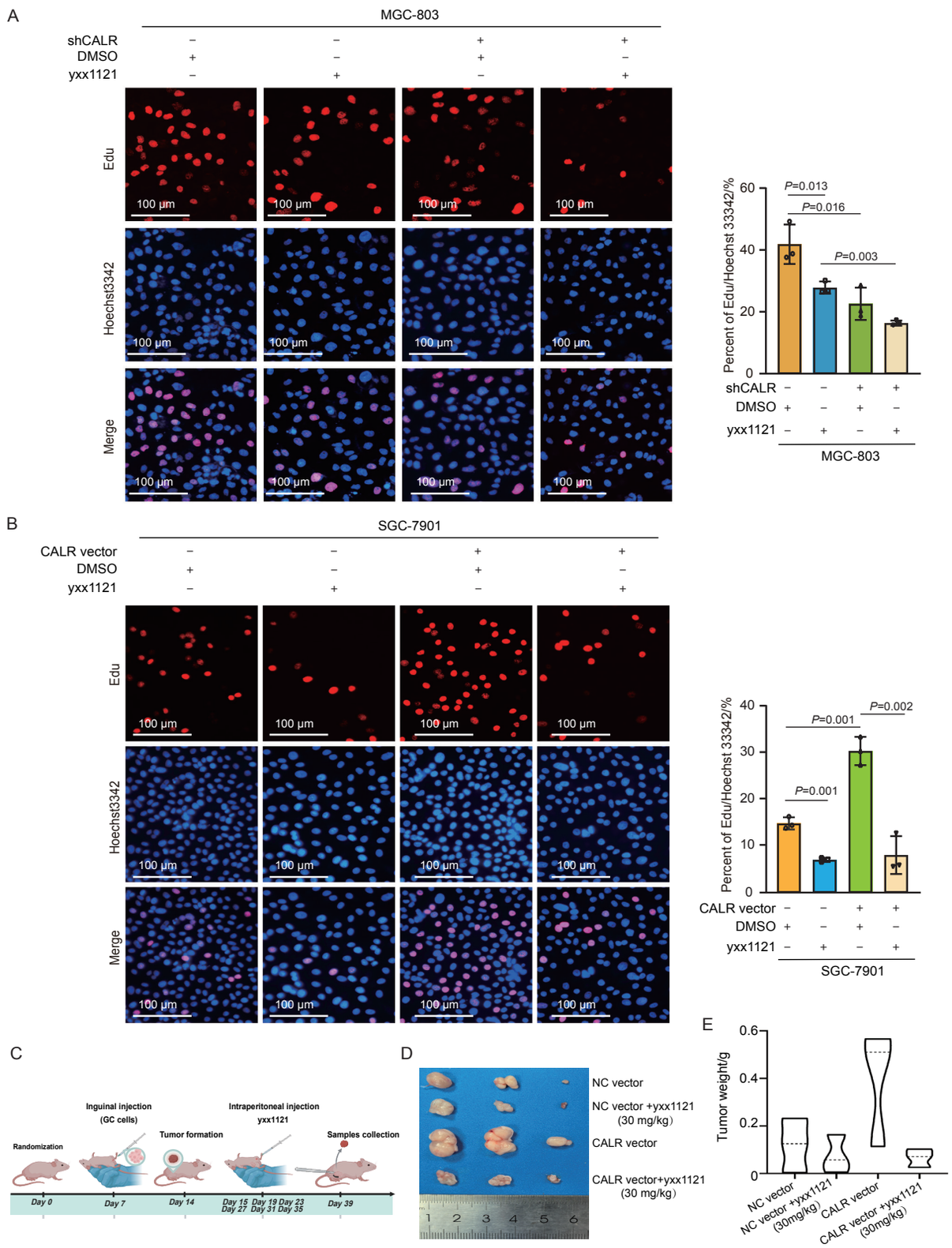
2.7 yxx1121在体内抑制胃癌细胞增殖未表现出毒性

进一步通过血细胞(图7A)、肝肾功能(图7B)以及主要器官(心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏)的HE染色结果(图7C)分析yxx1121的毒性作用,结果显示,对照组与yxx1121(30 mg/kg)组之间器官结构或血细胞无显著差异,说明化合物yxx1121具有良好的生物安全性。综上所述,这些结果表明,yxx1121通过靶向降解CALR蛋白来抑制胃癌进展,且未表现出明显毒性,为胃癌治疗提供了一种潜在的治疗策略。

3 讨论

胃癌是一种常见且致命的恶性肿瘤,与传统的手术治疗相比,基于胃癌分子亚型的靶向治疗(即针对特定驱动基因或通路)以及免疫检查点抑制剂的应用,改变了晚期胃癌患者的治疗格局[23-25]。联合靶向治疗与免疫治疗的策略显著改善了晚期患者预后。因此,该疾病治疗的进步需要发现新的治疗靶点。

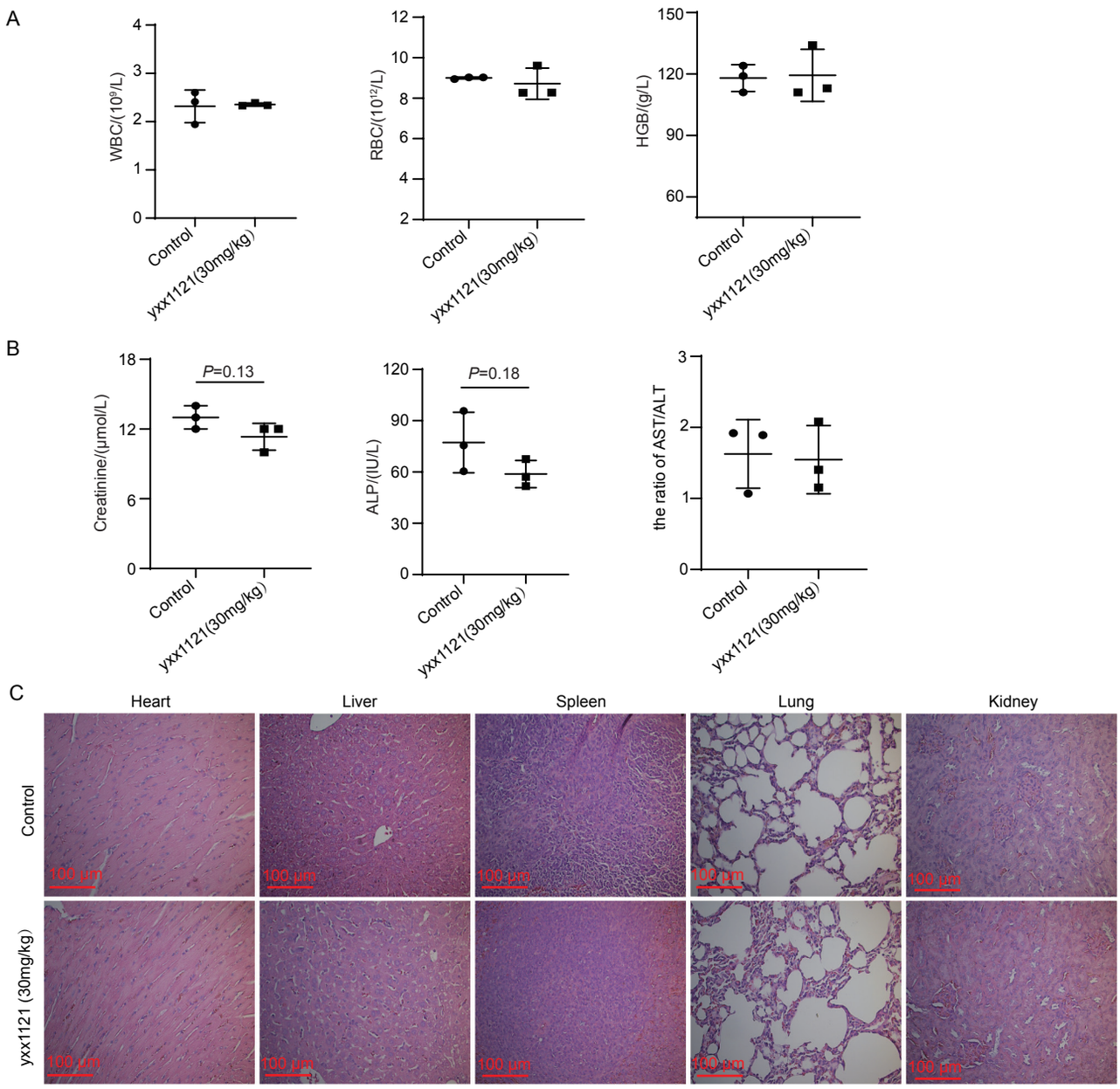
CALR主要是一种内质网伴侣蛋白,但也定位在其他细胞器中。早期研究发现,突变的CALR可与血小板生成素受体髓系增殖性白血病蛋白发生病理结合,从而激活JAK/STAT信号通路,促进髓系增殖性肿瘤(myeloproliferative neoplasms, MPNs)的发生[26]。然



A: Representative images and statistical analysis of Edu-positive cells in CALR-knockdown (MGC-803) GC cells after treatment with yxx1121 (10 μmol/L) for 24 h; B: Representative images and statistical analysis of Edu-positive cells in CALR-overexpressing (SGC-7901) GC cells after treatment with yxx1121 (10 μmol/L) for 24 h; C: Schematic of the *in vivo* efficacy protocol for yxx1121 treatment using subcutaneous xenograft tumor models; D: Gross images of xenograft tumors from different treatment groups; E: Statistical analysis of tumor volume or tumor weight in different treatment groups

图6 yxx1121对胃癌细胞增殖调控作用依赖于CALR

Figure 6 Regulatory effect of yxx1121 on the proliferation of GC cells is dependent on CALR



A: WBC, RBC and HGB levels in BALB/c nude mice treated with yxx1121 (30 mg/kg) and controls; B: Creatinine, ALP, ALT and AST levels in BALB/c nude mice treated with yxx1121 (30 mg/kg) and controls; C: Representative images of HE staining of the heart, liver, spleen, lungs and kidneys treated with yxx1121 (30 mg/kg)

图7 yxx1121在体内抑制胃癌细胞增殖的毒性分析

Figure 7 Toxicity analysis of yxx1121 in inhibiting the proliferation of gastric cancer cells *in vivo*

而,近期研究表明,CALR不仅在MPNs中起重要作用,在多种癌症及其他疾病中也发挥着关键作用。例如,在肾透明细胞癌中,CALR的表达水平与类粘蛋白1(orosomucoid 1, ORM1)介导的肿瘤进展相关[27]。CALR表达升高可能促进肿瘤增殖和血管生成,同时也是浸润性乳腺癌中与肿瘤微环境及临床预后相关的免疫检查点核心调控因子和生物标志物[8,28]。此外,癌细胞在免疫诱导性细胞死亡过程中会暴露其表面的CALR,从而促进吞噬细胞摄取细胞残骸,最终帮助抗癌免疫的启动[7]。本课题组此前已证实,CALR在胃癌中高表达,并通过G9a介导的E-钙黏蛋白启动子区域H3K9甲基化来增强GC的转移能力[13]。在本研究中,我们通过体内和体外模型发现CALR的表达显著影响胃癌细胞的增殖和凋亡能力。机制研究揭示了CALR通过协同调节CASP9凋亡通路以及依赖磷酸化的致癌信号级联(EGFR/STAT3/PI3K/AKT)发挥

其凋亡调控功能。在CALR敲除模型中,应用CASP9抑制剂显著抑制了细胞凋亡以及cleaved-CASP9的表达。EGFR/PI3K/AKT和STAT3信号通路在调控细胞周期进程和细胞存活方面起着重要作用[29-30]。CASP9是上述信号通路中的下游关键靶基因[31-32]。本课题组研究显示,在CALR敲除模型中,CASP9的mRNA和蛋白水平均显著上调,而在CALR过表达模型中则明显下调。这些结果表明,CALR可通过依赖磷酸化作用的致癌信号级联(EGFR/STAT3/PI3K/AKT)来调节CASP9的表达,从而抑制胃癌细胞的凋亡并促进其增殖(图8)。然而,CALR调控下游分子磷酸化作用的具体机制仍需进一步阐明。此外,本研究发现,尽管在不同胃癌细胞(MGC-803和AGS)中敲除CALR会导致其增殖和凋亡能力发生显著变化,但机制研究显示候选分子的表达在不同细胞系之间存在不一致的趋势。因此,在该示意图模型中,我们整合了所有受CALR影响的潜在相关分子。

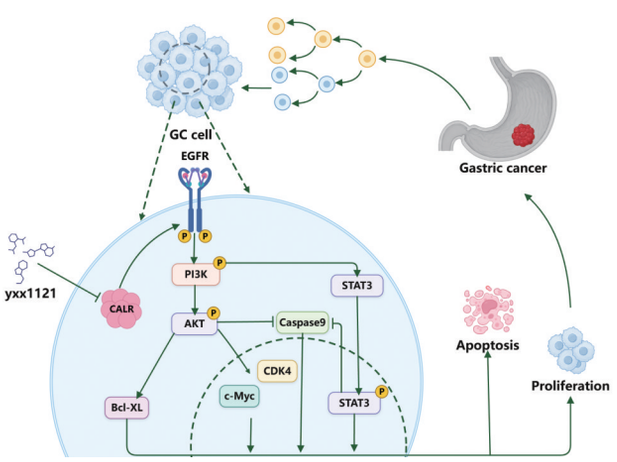


图8 小分子化合物yxx1121抑制CALR调控胃癌细胞增殖机制示意图

Figure 8 Schematic diagram illustrating the mechanism by which the small molecule compound yxx1121 inhibits the regulation of gastric cancer cell proliferation by CALR

鉴于CALR在胃癌发病机制和进展中的关键作用,其有望成为胃癌的一种新型治疗靶点。然而,目前针对CALR的靶向治疗主要集中在治疗CALR突变方面。研究表明,Janus激酶2(Janus kinase 2,JAK2)抑制剂(如鲁索替尼)对携带CALR突变的多发性骨髓瘤患者有效,而与抗PD-1抗体或肽类抑制剂联合使用可能进一步增强疗效[33]。此外,基于单克隆抗体的针对CALR突变的治疗也显示出潜力。相比之下,能够降解CALR表达的抑制剂研究仍处于初级阶段。在本研究中,通过分子对接及分子动力学、细胞热转移实验、SPR分析、CALR干扰或过表达细胞株回复实验及蛋白降解途径分析发现小分子化合物yxx1121主要通过溶酶体途径促进CALR蛋白降解,从而影响胃癌细胞的增殖,但本研究缺乏yxx1121对CALR mRNA稳定性或翻译效率的进一步验证,后续需运用RNA pull-down、RIP等实验详细揭示mRNA稳定性或RNA-蛋白互作等转录后调控的分子细节,使研究内容更完善;同时在分子动力学实验中发现yxx1121在与靶蛋白CALR表现出瞬时且可逆的结合行为:在0~80 ns期间配体稳定占据结合口袋,约80 ns后发生自发解离,随后又反复重新进入并结合该位点,因此后续还需进一步优化该小分子。最后,该研究通过体外细胞实验及体内动物实验证实,yxx1121在体外和体内均能有效抑制胃癌细胞的增殖,且无明显毒性,这一发现为CALR过度表达的胃癌患者提供了精准靶向治疗的新方向,但本研究中毒性实验为初步评价、样本量有限,后续将扩大队列并补充系统的毒代动力学研究以全面评估其安全性。

本研究不仅阐明了CALR在胃癌发病机制中的调控作用,还表明yxx1121具有潜在的CALR靶向治疗价值。

致谢 本研究所使用的小分子化合物来源于四川大学药学院陈应春教授课题组,其合成与表征已发表于先前的研究中[34],图8通过BioRender.li,l.(2025)https://BioRender.com/wsxb7bv创建

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

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. DOI: 10.3322/caac.21834.

[2] 王斌, 王涛. 胃癌的科学预防、早期诊断与精准治疗[J]. 陆军军医大学学报, 2025, 47(5): 385-395. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202501072.
Wang B, Wang T. Effective prevention, early diagnosis and precise treatment of gastric cancer[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(5): 385-395. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202501072.

[3] 彭紫依, 张永超, 刘振昆, 等. 胃癌异质性转录元程序相关的微环境空间互作单元及临床意义分析[J]. 陆军军医大学学报, 2026, 48(3): 272-282. DOI: 10.16016/j.2097-

0927.202512013.
Peng Z Y, Zhang Y C, Liu Z K, *et al*. Spatial profiling of gastric cancer reveals distinct transcriptional meta-programs driving immunosuppressive microenvironment [J]. J Army Med Univ, 2026, 48(3): 272-282. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202512013.

[4] Niu P H, Zhang F, Ma D Y, *et al*. Trends of older gastric cancer incidence, mortality, and survival in the highest gastric cancer risk area in China: 2010–2019 and prediction to 2024[J]. BMC Public Heal, 2024, 24(1): 2449. DOI: 10.1186/s12889-024-19944-2.

[5] Coppolino M G, Dedhar S. Calreticulin[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1998, 30(5): 553-558. DOI: 10.1016/S1357-2725(97)00153-2.

[6] Teng C Y, Chang S L, van Oers M M, *et al*. Enhanced protein secretion from insect cells by co-expression of the chaperone calreticulin and translation initiation factor eIF4E [J]. Mol Biotechnol, 2013, 54(1): 68-78. DOI: 10.1007/s12033-012-9545-4.

[7] Fucikova J, Spisek R, Kroemer G, *et al*. Calreticulin and cancer[J]. Cell Res, 2021, 31(1): 5-16. DOI: 10.1038/s41422-020-0383-9.

[8] Lin J L, Chen Y W, Zhang Z X, *et al*. Calreticulin, a potential coregulator of immune checkpoints and biomarker associated with tumor microenvironment and clinical prognostic significance in breast invasive carcinoma [J]. Environ Toxicol, 2024, 39(5): 2717-2731. DOI: 10.1002/tox.24120.

[9] Shi F, Shang L, Pan B Q, *et al*. Calreticulin promotes migration and invasion of esophageal cancer cells by upregulating neuropilin-1 expression *via* STAT5A [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(23): 6153-6162. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-14-0583.

[10] Sheng W W, Chen C P, Dong M, *et al*. Calreticulin promotes EGF-induced EMT in pancreatic cancer cells *via* Integrin/EGFR-ERK/MAPK signaling pathway [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3147. DOI: 10.1038/cddis.2017.547.

[11] Chen C N, Chang C C, Su T E, *et al*. Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16(2): 524-533. DOI: 10.1245/s10434-008-0243-1.

[12] Lee P C, Chiang J C, Chen C Y, *et al*. Calreticulin regulates vascular endothelial growth factor-a mRNA stability in gastric cancer cells[J]. PLoS One, 2019, 14(11): e0225107. DOI: 10.1371/journal.pone.0225107.

[13] Wang L N, Chen J, Zuo Q F, *et al*. Calreticulin enhances gastric cancer metastasis by dimethylating H3K9 in the E-cadherin promoter region mediating by G9a [J]. Oncogenesis, 2022, 11: 29. DOI: 10.1038/s41389-022-00405-7.

[14] Zhang M L, Xiao J, Liu J R, *et al*. Calreticulin as a marker and therapeutic target for cancer[J]. Clin Exp Med, 2023, 23(5): 1393-1404. DOI: 10.1007/s10238-022-00937-7.

[15] Ma T, Tian X, Zhang B D, *et al*. Low-dose metformin targets the lysosomal AMPK pathway through PEN2 [J]. Nature, 2022, 603(7899): 159-165. DOI: 10.1038/s41586-022-04431-8.

[16] Mao L F, Lu J Y, Yang Q J, *et al*. Bilirubin targeting WNK1 to alleviate NLRP3-mediated neuroinflammation[J]. Adv Sci, 2025, 12(29): 2407349. DOI: 10.1002/advs.202407349.

[17] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455-461. DOI: 10.1002/jcc.21334.

[18] Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack A F, *et al*. AutoDock vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and Python bindings[J]. J Chem Inf Model, 2021, 61(8): 3891-3898. DOI: 10.1021/acs.jcim.1c00203.

[19] Abramson J, Adler J, Dunger J, *et al*. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3[J]. Nature, 2024, 630(8016): 493-500. DOI: 10.1038/s41586-024-07487-w.

[20] Hornak V, Abel R, Okur A, *et al*. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters[J]. Proteins, 2006, 65(3): 712-725. DOI: 10.1002/prot.21123.

[21] Srinivasan J, Miller J, Kollman P A, *et al*. Continuum solvent studies of the stability of RNA hairpin loops and helices[J]. J Biomol Struct Dyn, 1998, 16(3): 671-682. DOI: 10.1080/07391102.1998.10508279.

[22] Kollman P A, Massova I, Reyes C, *et al*. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models[J]. Acc Chem Res, 2000, 33(12): 889-897. DOI: 10.1021/ar000033j.

[23] Guan W L, He Y, Xu R H. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives [J]. J Hematol Oncol, 2023, 16(1): 57. DOI: 10.1186/s13045-023-01451-3.

[24] Smyth E C, Nilsson M, Grabsch H I, *et al*. Gastric cancer [J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31288-5.

[25] Joshi S S, Badgwell B D. Current treatment and recent progress in gastric cancer[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71

(3): 264-279. DOI:10.3322/caac.21657.

[26] Nangalia J, Massie C E, Baxter E J, *et al*. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2[J]. N Engl J Med, 2013, 369(25): 2391-2405. DOI:10.1056/NEJMoa1312542.

[27] Yu G, Gao J, Hu W F, *et al*. ORM1 promotes tumor progression of kidney renal clear cell carcinoma (KIRC) through CALR-mediated apoptosis[J]. Sci Rep, 2023, 13: 15687. DOI:10.1038/s41598-023-42962-w.

[28] Liu X X, Xie P L, Hao N, *et al*. HIF-1-regulated expression of calreticulin promotes breast tumorigenesis and progression through Wnt/{β}-catenin pathway activation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(44): e2109144118. DOI:10.1073/pnas.2109144118.

[29] Yang R, Zhang G H, Meng Z, *et al*. Glutamate dehydrogenase 1-catalytic glutaminolysis feedback activates EGFR/PI3K/AKT pathway and reprograms glioblastoma metabolism[J]. Neuro-Oncology, 2025, 27(3): 668-681. DOI:10.1093/neuonc/noae222.

[30] Bi J, Wu Z H, Zhang X, *et al*. TMEM25 inhibits monomeric EGFR-mediated STAT3 activation in basal state to suppress triple-negative breast cancer progression[J]. Nat Commun, 2023, 14: 2342. DOI: 10.1038/s41467-023-38115-2.

[31] Jeong S J, Dasgupta A, Jung K J, *et al*. PI3K/AKT inhibition induces caspase-dependent apoptosis in HTLV-1-transformed cells[J]. Virology, 2008, 370(2): 264-272. DOI:10.1016/j.virol.2007.09.003.

[32] Leinninger G M, Backus C, Uhler M D, *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt effectors mediate insulin-like growth factor-I neuroprotection in dorsal root ganglia neurons[J]. FASEB J, 2004, 18(13): 1544-1546. DOI:10.1096/fj.04-1581fje.

[33] Gunawan A, Harrington P, Garcia-Curto N, *et al*. Ruxolitinib for the treatment of essential thrombocythemia [J]. HemaSphere, 2018, 2(4): e56. DOI: 10.1097/hs9.0000000000000056.

[34] Yang X X, Yan R J, Ran G Y, *et al*. π-lewis-base-catalyzed asymmetric vinylogous umpolung reactions of cyclopentadienones and tropone[J]. Angew Chem Int Ed, 2021, 60(51): 26762-26768. DOI: 10.1002/anie.202111708.

(收稿:2026-07-16;修回:2026-08-19)

(编辑 严 涵)