

叶酸对 N - 甲基 - N' - 硝基 - N - 亚硝基胍致食管上皮 - 间质转化保护作用的机制研究

付雪妮¹, 彭才婷¹, 任奕慧¹, 梁媛¹, 程遂志¹, 聂玉红¹, 巫唐辉¹,
余佳¹, 陈泓晓¹, 高怡², 刘振中¹

1. 川北医学院公共卫生学院, 四川南充 637000; 2. 山西医科大学公共卫生学院

摘要:目的 探究叶酸对 N - 甲基 - N' - 硝基 - N - 亚硝基胍(MNNG)诱导的食管上皮 - 间质转化(epithelial - mesenchymal transition, EMT)的保护作用及机制。方法 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、叶酸低、中、高剂量组(1.25, 2.5, 5 mg/kg), 对照组给予 10 mL/kg 生理盐水, 其他组均给予 25 mg/kg MNNG, 均以自由饮水的方式进行给药, 每天 1 次, 持续造模 12 周。给药 12 周后, 免疫组化观察 E - 钙粘蛋白(E - cadherin)、N - 钙粘蛋白(N - cadherin)蛋白表达; Western blot 法检测 E - 钙粘蛋白(E - cadherin)、紧密连接蛋白(ZO - 1)、N - 钙粘蛋白(N - cadherin)、波形蛋白(Vimentin)蛋白表达。体外用(0.1, 0.2, 0.4 μg/mL)浓度叶酸干预 MNNG(20 μmol/L)染毒 24 h 后的人食管永生化上皮细胞(Het - 1A)细胞, 采用 RT - qPCR 法检测 E - cadherin、ZO - 1、N - cadherin、Vimentin mRNA 及 TGF - β、Wnt/β - catenin、JAK/STAT3 信号通路 mRNA 的转录水平; Western blot 法检测 E - cadherin、ZO - 1、N - cadherin、Vimentin 蛋白表达。结果 与模型组相比, 叶酸能够改善 MNNG 所致大鼠食管黏膜上皮癌前病变, 上调 E - cadherin 蛋白表达($F = 90.3, P < 0.001$)、ZO - 1 蛋白表达($F = 188.9, P < 0.001$), 下调 N - cadherin 蛋白表达($F = 68.9, P < 0.001$)、Vimentin 蛋白表达($F = 82.6, P < 0.001$)。细胞 Western blot 结果显示, 与对照组相比, 模型组细胞 E - cadherin、ZO - 1 蛋白表达降低, 分别降至对照组的 63.7% (95% CI: 0.589 ~ 0.675, $P < 0.001$)、57.1% (95% CI: 0.494 ~ 0.706, $P < 0.001$)。细胞 RT - qPCR 结果显示, 与模型组相比, 叶酸干预组 E - cadherin mRNA 表达量增加($F = 8.5, P = 0.007$)、ZO - 1 mRNA 表达量增加($F = 31.5, P < 0.001$), N - cadherin mRNA 表达量降低($F = 34.1, P < 0.001$)、Vimentin mRNA 表达量降低($F = 17.8, P < 0.001$)。细胞 RT - qPCR 证实, MNNG 可以促进 TGF - β 信号通路、Wnt/β - catenin 信号通路、JAK/STAT3 信号通路关键 mRNA 的转录, 激活其下游转录因子 snail、ZEB1 mRNA 转录, 而叶酸可拮抗该过程。结论 叶酸对 MNNG 诱导的食管上皮 - 间质转化有一定的保护能力, 这可能与抑制 JAK/STAT3 信号通路的激活相关。

关键词:食管癌; 上皮 - 间质转化; 叶酸; N - 甲基 - N' - 硝基 - N - 亚硝基胍; JAK/STAT3 信号通路

中图分类号: R114 文献标志码: A 文章编号: 1003 - 8507(2025)10 - 1775 - 07

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202411292

The protective effect of folic acid esophageal epithelial mesenchymal transition induced by N - methyl - N' - nitro - n - nitroguanidine

FU Xue - ni*, PENG Cai - ting, REN Yi - hui, LIANG Yuan, CHENG Sui - zhi, NIE Yu - hong,
WU Tang - hui, YU Jia, CHEN Hong - xiao, GAO Yi, LIU Zhen - zhong

* School of Public Health, North Sichuan Medical University, Nanchong, Sichuan 637000, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of folic acid on the epithelial - mesenchymal transition (EMT) induced by N - methyl - N' - nitro - n - nitroguanidine (MNNG) and its signaling mechanism. **Methods** SD rats were randomly divided into blank group, model group, low - dose, medium - dose and high - dose folate groups (1.25, 2.5, 5 mg/kg), control group was given 10 mL/kg normal saline, and other groups were given 25 mg/kg MNNG. All were administered with free drinking water once a day for 12 weeks. After 12 weeks, the expression of E - cadherin and N - cadherin protein was observed by immunohistochemistry. The expressions of E - cadherin, ZO - 1, N - cadherin and Vimentin were detected by

基金项目: 四川省卫生健康委员会科研项目(19PJ199); 川北医学院博士科研基金项目(CBY17 - QD06); 大学生创新创业训练计划项目(202310634009, S202410634066)

作者简介: 付雪妮(2003—), 女, 本科在读, 研究方向: 卫生毒理学

通信作者: 刘振中, E - mail: liuzhenzhong2004@163.com

Western blot. In vitro (0.1, 0.2, 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the concentration of folic acid was treated with 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MNNG for 24 h, and the mRNA transcription levels of E-cadherin, ZO-1, N-cadherin, Vimentin, TGF- β , Wnt/ β -catenin, JAK/STAT 3 signaling pathways were detected by RT-qPCR. The expressions of E-cadherin, ZO-1, N-cadherin and Vimentin were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, folic acid could improve the precancerous lesions caused by MNNG, up-regulate the expression of E-cadherin ($F=90.3, P<0.001$) and ZO-1 protein ($F=188.9, P<0.001$), and down-regulate the expression of N-cadherin ($F=68.9, P<0.001$) and Vimentin protein ($F=82.6, P<0.001$). The results of cell Western blot showed that compared with the control group, the expression levels of E-cadherin and ZO-1 were decreased, decreasing to 63.7% (95% CI: 0.589-0.675, $P<0.001$) and 57.1% (95% CI: 0.494-0.706, $P<0.001$) of the control group. Cell RT-qPCR results showed that compared with the model group, E-cadherin mRNA levels were increased ($F=8.5, P=0.007$), the expression of ZO-1 mRNA increased ($F=31.5, P<0.0001$), N-cadherin mRNA levels were decreased ($F=34.1, P<0.001$), and the expression of Vimentin mRNA decreased ($F=17.8, P<0.001$). Cell RT-qPCR confirmed that MNNG can promote the transcription of key mRNA in TGF- β signaling pathway, Wnt/ β -Catenin signaling pathway, and JAK/STAT 3 signaling pathway. The downstream transcription factors snail and ZEB1 mRNA transcription were activated, while folic acid could antagonize the process. **Conclusion** Folic acid has certain protective ability against MNNG induced esophageal epithelial-mesenchymal transformation, which may be related to inhibiting the activation of JAK/STAT3 signaling pathway.

Keywords: Esophageal cancer; EMT; Folic acid; MNNG; JAK/STAT3 signaling pathway

食管癌(Esophageal cancer, EC)是全球第11大最常见的癌症,也是第7大癌症死亡原因,其发生率、致死率和组织病理学在地理区域上存在显著差异^[1]。在食管癌高发地区,饮食中的亚硝酸盐含量明显增高,与患病率呈明显正相关^[2]。食管癌的生存率较低,五年生存率仅为20%~35%。大多数食管癌病例往往是在晚期被诊断,因此治疗选择有限^[3-4]。上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是一个细胞过程,在这个过程中,上皮细胞失去一些上皮特征,获得了间充质表型以及迁移和侵入周围组织的能力,被认为是器官纤维化和癌症进展和转移的关键驱动因素^[5]。EMT受众多信号分子交互调控,其中TGF- β 、Wnt/ β -catenin、JAK/STAT3等信号通路及其下游转录因子均在该过程中发挥重要作用^[6-7]。

甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)是一种人工合成的亚硝胺类化合物,可模拟从腌制和熏制食品等食物中摄入过量硝酸盐的影响^[8]。MNNG具有很强的诱变能力,可引起DNA链上的碱基烷基化并产生致癌性,能诱发大鼠胃癌、食管癌和结直肠癌等多种癌症^[9]。叶酸(Folic acid, FA)是一种水溶性B族维生素,主要存在于绿叶蔬菜、豆类、谷物^[10]。众多的流行病学研究资料均表明,叶酸缺乏会增加人群肿瘤发病风险^[11]。针对食管,叶酸的摄入与食管癌患病风险呈负相关^[12]。目前,叶酸对N-亚硝基化合物致食管EMT保护作用的研究较少,具体机制尚未完全明确。本实验通过建立体内外叶酸干预MNNG致食管上皮-间质转化模型,研究MNNG的诱变作用和叶酸的保护作用机制,为叶酸干预亚硝胺类环境致癌物致食管上皮-间质转化的作用机制提供

理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雌性SD大鼠30只,体重(180 \pm 20)g, SPF级,由川北医学院实验动物中心提供。动物生产证号:SCXK(川)-2018-18,使用证号:SYXK(川)-076。饲养于川北医学院实验动物中心SPF级动物饲养间,12小时光照/黑夜循环,相对恒温(25 $^{\circ}\text{C}$),恒湿(75%)。动物实验经川北医学院动物实验伦理委员会批准(Appl. No. 02/2022)。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 人食管永生生化上皮细胞Het-1A(上海名劲生物科技有限公司),MNNG(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),叶酸(北京索莱宝科技有限公司),DMSO(北京索莱宝科技有限公司),1%细胞生长因子、1%双抗(美国Sciencell研究实验室),CCK-8试剂、EDU染色试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、1%PMSF、1%磷酸酶抑制剂、HRP标记山羊抗兔IgG、HRP标记山羊抗小鼠IgG(碧云天公司),Trizol试剂盒(美国Thermo Fisher公司),ECL发光试剂(上海七海复泰生物科技有限公司),兔N-cadherin、Vimentin、ZO-1多克隆抗体(proteintech公司)。

1.2.2 仪器 酶标仪(美国Thermo Fisher公司),实时荧光定量PCR仪(伯乐生命医学产品上海有限公司),基因扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司),高速微量冷冻离心机(青岛海特生物医疗有限公司),一体式化学发光成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及给药 将30只SPF级雌性SD

大鼠适应性饲养 1 周后,按大鼠体重随机分为 5 组,每组 6 只,分别为对照组,模型组,叶酸低、中、高剂量组,动物均采用自由饮水的方式给药,每天 1 次。第 1 周,三个叶酸组动物分别给予 1.25、2.5 和 5 mg/kg 叶酸饮水处理 12 h,其他组别动物给予生理盐水;从第 2 周开始,模型组和叶酸低、中、高剂量组按 25 mg/kg 剂量给予动物 MNNG 饮水 12 h,随后叶酸低、中、高剂量组分别给予 1.25、2.5 和 5 mg/kg 叶酸饮水 12 h,模型组和对照组给予动物含有 DMSO 生理盐水。定期记录大鼠的体重、饮水量、进食量的变化。给药 12 周后,处死大鼠,收集食管组织。

1.3.2 细胞培养及与干预措施 常规复苏人食管永生化上皮细胞 Het-1A 后,将细胞用鼠尾胶原蛋白 I 包被培养在含 98% Bronchial Epithelial Cell Medium、1% 细胞生长因子及 1% 双抗的培养液中,当细胞生长至培养皿面积的 80% 时,消化细胞,按照 1:2 分皿传代。向空白对照组中加入单纯培养基;叶酸阳性对照组加入 0.4 μg/mL 叶酸;模型组加入 20 μmol/L MNNG;叶酸不同剂量均先使用 20 μmol/L MNNG 染毒后,吸弃染毒培养液,加入 0.1、0.2、0.4 μg/mL 叶酸继续培养,收集细胞进行相关实验指标检测。

1.3.3 MNNG 工作液配制方法 ①150 μg/mL 的 MNNG:取用 30 mg 的 MNNG 粉末,加入 DMSO 溶液 4 mL,使其充分溶解,后将其稀释为 150 μg/mL 的 MNNG,供大鼠自由饮用。②20 μmol/L 的 MNNG:取 4.4 g 的 MNNG 粉末,加入 DMSO 溶液 30 mL,使其充

分溶解,制成 1 mol/L 的 MNNG 母液,分装后 -20 °C 避光保存。临用时将 MNNG 储备液稀释为 20 μmol/L MNNG,用于细胞实验。

1.3.4 叶酸工作液配制方法 ① 0.75、1.5、3 μg/mL 的叶酸溶液:取 0.6 mg 叶酸粉末,加入生理盐水 100 mL,使其充分溶解,制成 6 μg/mL 的叶酸溶液。临用时将其稀释为 0.75、1.5、3 μg/mL 的叶酸溶液,供大鼠自由饮用。② 0.1、0.2、0.4 μg/mL 的叶酸溶液:取 10 mg 叶酸粉末,加入生理盐水 100 mL,使其充分溶解,制成 100 μg/mL 的叶酸储备液,分装后 -80 °C 避光保存。临用时将叶酸储备液稀释为 0.1、0.2、0.4 μg/mL 叶酸溶液,用于细胞实验。

1.3.5 免疫组化分析 采用免疫组化观察食管组织 E-cadherin、N-cadherin 表达。经脱蜡、修复后,滴加山羊血清室温封闭 20 min,滴加一抗(E-cadherin 1:100、N-cadherin 1:100),4 °C 过夜。PBS 洗涤后加入相应二抗(山羊抗兔 IgG 1:200),37 °C 孵育 30 min 后,DAB 室温显色。苏木素复染 3 min,梯度脱水、透明、封片。

1.3.6 RT-qPCR 检测相关 mRNA 转录水平 使用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,以 GAPDH 为内参,基于 SYBR Green 的实时 PCR 以确定 mRNA 的相对表达量,进行后续实时定量 PCR 反应。所有实时反应均使用 BIO-RAD CFX96 Real-Time System 进行,相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算。

表 1 PCR 所用引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR

名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
GAPDH1	AGAAGGCTGGGGCTCATTTC	AGGGGCCATCCACAGTCTTC
Ecadherin1	ATTTTTCCTCCGACACCCGAT	TCCCAGGCGTAGACCAAGA
N-cadherin	CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC	GTAGGATCTCCGCCACTGATTC
ZO-1	GTCCAGAATCTCGAAAAGTGCC	CTTTCAGCGCACCATACCAACC
Vimentin	AGGCCAAAGCAGGAGTCCACTGA	ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT
SMAD2	CGTCCATCTTGCCATTCACG	CTCAAGCTCATCTAATCGTCCTG
SMAD3	CCATCTCCTACTACGAGCTGAA	CACTGCTGCATTCCGTGTGAC
snail	CGAACTGGACACACATACAGTG	CTGAGGATCTCTGTTGTGGT
β-catenin	AAAGCGGCTGTTAGTCACTGG	CGAGTCATTGCATACTGTCCAT
JAK	AAGTGGAAACGCGAGAAGAACC	CTCGTGCAGCTTTGTCTFTGAG
ZEB1	GATGATGAATGCGAGTGCAGATGC	ACAGCAGTGTCTTGTGTGTGT
TGF-β	TACCTGAACCCGTGTGCTCTC	GTFGCTGAGGTATCGCCAGGAA
STAT3	CTTTGAGACCGAGGTGTATCACC	GGTCAGCATGTTGTACCACAGG

1.3.7 Western blot 检测相关蛋白表达水平 洗涤和收集不同干预剂量培养的细胞和大鼠食管组织,裂解、离心、取上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度测定,制备 10% SDS-PAGE 凝胶后,加入蛋白样品、转膜、封闭。按各抗体说明书稀释抗体后,

一抗 4 °C 孵育过夜,洗脱 3 次,二抗室温孵育 1 h,洗脱 3 次,使用 ECL 发光试剂检测目的蛋白,利用 Image J 软件分析灰度值。

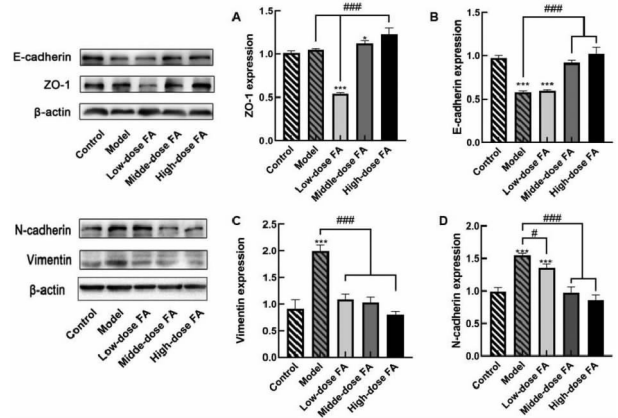
1.3.8 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计分析。先对各组数据进行方差分析,组间比较用

LSD 法,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。用 Graphpad Prism 9 绘图软件进行绘图。

2 结果

2.1 叶酸干预对 MNNG 致大鼠食管上皮细胞 EMT 相关蛋白的影响 给予大鼠 MNNG 暴露及叶酸干预后,与对照组相比,模型组 E-cadherin 蛋白表达下降 40.8% (95% CI: 0.345 ~ 0.469, $P < 0.001$),与模型组相比,上皮表型标记蛋白 E-cadherin 表达回升 ($F = 90.3, P < 0.001$)、ZO-1 表达回升 ($F = 188.9, P < 0.001$)。在 MNNG 暴露后,间质表型标记蛋白 Vimentin 表达水平增加 119.5% (95% CI: -1.303 ~ -0.867, $P < 0.001$)、N-cadherin 表达水平增加 55.7% (95% CI: -0.671 ~ -0.435, $P < 0.001$)。给予叶酸干预后,Vimentin 蛋白表达水平明显下降 ($F = 82.6, P < 0.001$)、N-cadherin 蛋白表达水平明显下降 ($F = 68.9, P < 0.001$)。图 1C、D 表明,随着叶酸浓度增加,Vimentin、N-cadherin 蛋白表达呈下降趋势。

2.2 叶酸干预 MNNG 致大鼠食管免疫组化结果 E-cadherin 阳性表达为细胞膜呈棕黄色着色。与对照组相比, MNNG 染毒组后,组织中蛋白表达量降低 95.6% (95% CI: 4.967 ~ 8.139, $P < 0.001$),与模型组相比,叶酸剂量组蛋白表达量出现回升,组间比较差

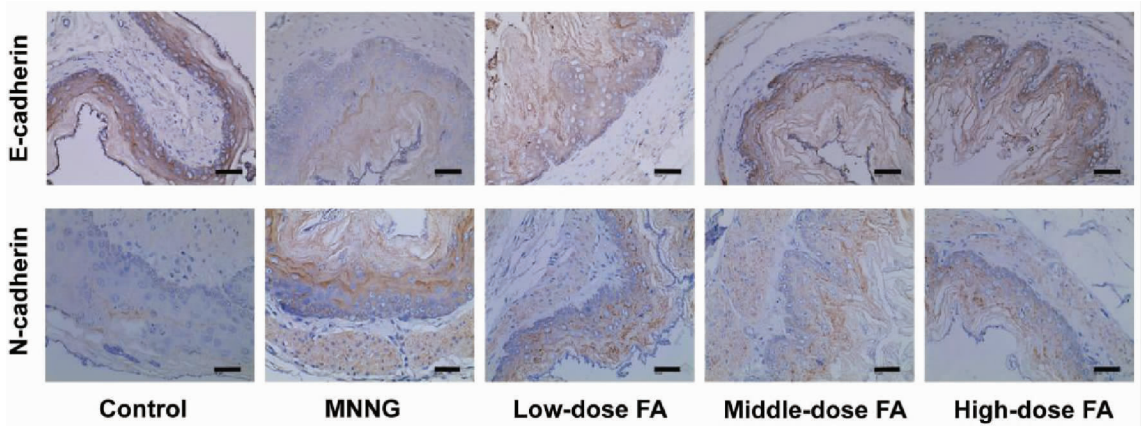


注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,与对照组相比。# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$,与模型组相比。

图 1 叶酸干预对 MNNG 致大鼠食管组织中 EMT 相关蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of folic acid intervention on the expression of EMT-related proteins in esophageal tissues of MNNG infected rats

异有统计学意义 ($F = 45.9, P < 0.001$) N-cadherin 阳性信号定位于细胞质,呈黄色或棕黄色颗粒,其在正常食管粘膜组织中仅轻微表达,而在模型组中呈强阳性,随着叶酸干预剂量的提高,叶酸低、中、高剂量组的表达依次降低 ($F = 29.6, P < 0.001$) 见图 2。



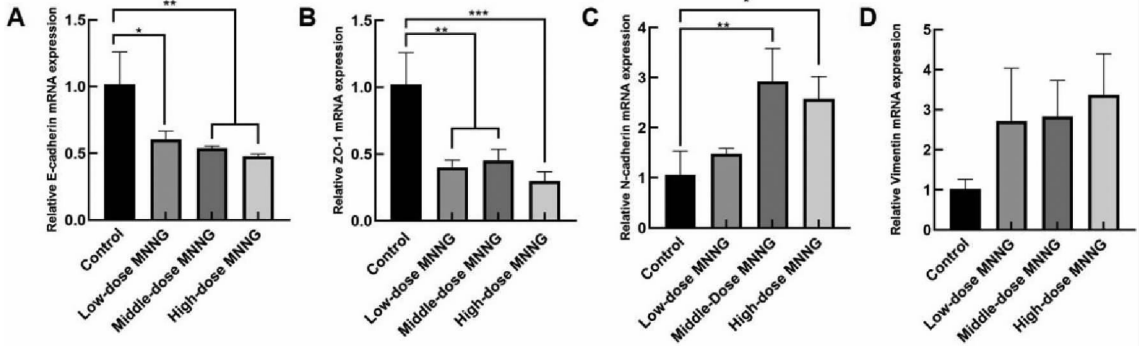
注:比例尺:40 μm 。

图 2 E-钙粘蛋白和 N-钙粘蛋白在大鼠食管组织中的表达

Fig. 2 Expression of E-cadherin and N-cadherin in esophageal tissues of rats

2.3 MNNG 对 EMT 相关蛋白 mRNA 的影响 通过 RT-qPCR 检测 Het-1A 细胞在 MNNG 染毒后 EMT 相关 mRNA 转录水平的变化。与对照组相比,E-cadherin mRNA 表达量下降 ($F = 11.4, P = 0.003$)、ZO-1 mRNA 表达量下降 ($F = 17.6, P < 0.001$)、N-cadherin mRNA 表达量增加 ($F = 10.8, P = 0.003$)、

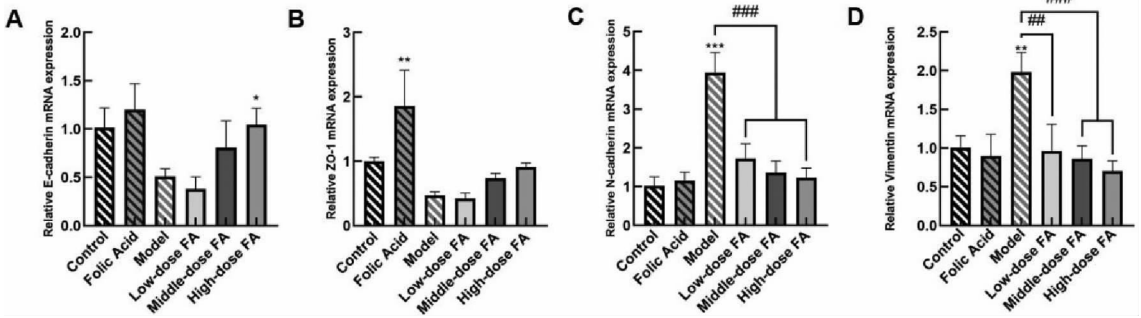
Vimentin mRNA 表达量增加 ($F = 29.3, P < 0.001$),见图 3。加入叶酸进行干预后,E-cadherin mRNA 表达量增加 ($F = 8.5, P = 0.007$)、ZO-1 mRNA 表达量增加 ($F = 31.5, P < 0.001$)、N-cadherin mRNA 表达量显著降低 ($F = 34.1, P < 0.001$)、Vimentin mRNA 表达量显著降低 ($F = 17.8, P < 0.001$),见图 4。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比。

图 3 MNNG 暴露后细胞中 EMT 相关 mRNA 的转录水平

Fig. 3 Transcription levels of EMT-related mRNA after MNNG exposure in cells



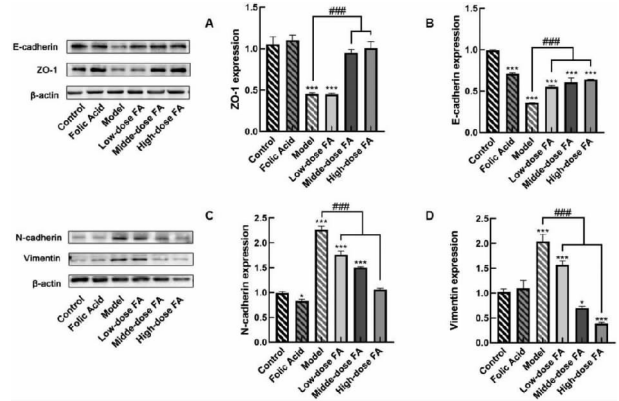
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比。# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 与模型组相比。

图 4 叶酸干预 MNNG 染毒后 EMT 相关 mRNA 转录水平

Fig. 4 Folic acid intervenes the mRNA transcription level of EMT-related genes after MNNG exposure

2.4 叶酸干预对 MNNG 致 Het-1A 细胞 EMT 相关蛋白的影响 给予 Het-1A 细胞 MNNG 暴露及叶酸干预后,与对照组相比,模型组上皮标志蛋白 E-cadherin 表达下降 63.7% (95% CI: 0.589 ~ 0.675, $P < 0.001$)、ZO-1 表达下降 57.1% (95% CI: 0.494 ~ 0.706, $P < 0.001$)。与模型组相比, E-cadherin、ZO-1 表达均上升,且随叶酸浓度的增加, E-cadherin、ZO-1 蛋白表达量呈升高趋势, 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 叶酸下最高增加 78.1% (95% CI: -0.342 ~ -0.238, $P < 0.001$)、123.3% (95% CI: -0.662 ~ -0.451, $P < 0.001$), 见图 5A、B。在 MNNG 暴露后,间质标志蛋白 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平增加,分别增加 128.1% (95% CI: -1.363 ~ -1.183, $P < 0.001$)、99.9% (95% CI: -1.165 ~ -0.873, $P < 0.001$)。给予叶酸干预后, N-cadherin 蛋白表达下降 ($F = 267.8, P < 0.001$)、Vimentin 蛋白表达下降 ($F = 250.9, P < 0.001$), 且随叶酸浓度的增加呈下降趋势, 见图 5。

2.5 叶酸干预对 MNNG 致 Het-1A 细胞 EMT 相关通路及转录因子的影响 给予 Het-1A 细胞 MNNG 染毒 24 h 后, Smad3 mRNA 表达无明显变化, JAK、STAT3、TGF- β 、Smad2、 β -catenin、ZEB1 mRNA 的

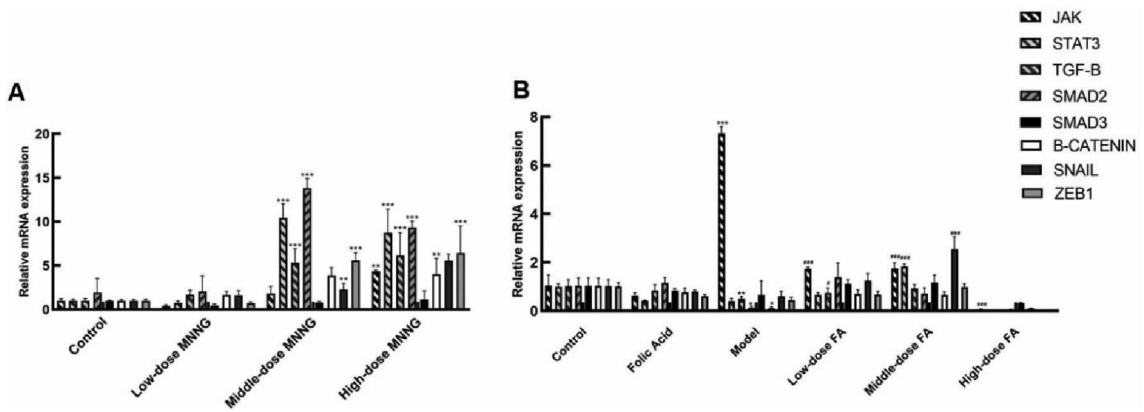


注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比。# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 与模型组相比。

图 5 Het-1A 细胞中 EMT 相关蛋白的表达水平

Fig. 5 Expression levels of EMT-related proteins in Het-1A cells

表达出现明显上升, 见图 6A。在给予叶酸干预的实验中, 与空白组相比, JAK mRNA 表达量出现明显上升 592.6% (95% CI: -6.869 ~ -5.676, $P < 0.001$)、与模型组相比, JAK mRNA 表达量出现明显下降 ($F = 841.1, P < 0.001$), 且随叶酸浓度的增加呈下降趋势, 其余与 EMT 相关信号通路及转录因子的 mRNA 变化不明显, 见图 6。



注:A 为 MNNG 暴露致 Het-1A 细胞 EMT 相关通路及转录因子的影响。B 为叶酸干预致 Het-1A 细胞 EMT 相关通路及转录因子的影响。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,与对照组相比。# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$,与模型组相比。

图 6 EMT 相关信号通路中关键 mRNA 的转录水平

Fig. 6 Transcription levels of key mRNAs in EMT-related signaling pathways

3 讨论

我国食管癌高发于为河北、河南、山西、福建、四川,其中以河南林州、河北磁县、河北涉县、四川盐亭尤甚^[13]。食管癌的发生是一种多基因、多因素参与,多阶段进行的一个复杂过程,主要是由食管上皮细胞的异常生长引起的^[14]。MNNG 作为 N-亚硝基化合物,具有很强的致癌作用,可能会诱发食管癌的发生。上皮-间质转化(EMT)是癌细胞侵袭和转移的根源。本研究通过体内和体外实验发现,MNNG 可以使食管上皮细胞的 E-cadherin、ZO-1 的表达下降,Vimentin、N-cadherin 的表达上升,这表明 MNNG 可以诱导食管上皮-间质转化的发生,与 Zhang 等研究结果一致^[15]。

叶酸(Folic Acid, FA)是一种由对氨基苯甲酸的芳香蝶啶环和谷氨酸残基组成的水溶性 B 族维生素,主要存在于蔬菜和水果中。Xiao 等人通过对 492293 人的大型队列研究后发现,低剂量叶酸摄入与食管鳞状细胞癌的发生风险呈明显正相关^[16]。本研究体内动物实验表明,叶酸干预后,E-cadherin、ZO-1 蛋白表达上升,N-cadherin、Vimentin 蛋白表达下降,这说明叶酸可以有效减缓 MNNG 导致的食管上皮-间质转化。与此同时,我们用 Het-1A 细胞做了体外实验,也发现叶酸对 MNNG 导致的食管上皮-间质转化有保护作用。其他研究证明,叶酸还可以抑制宫颈癌 Siha 细胞和肝细胞 EMT 的发生,进而抑制宫颈癌和肝癌的发生和发展^[17-18]。

JAK/STAT 信号通路作为经典的致癌信号通路,参与癌细胞的生长、迁移、分化和凋亡^[19]。谭豆豆的研究表明干扰 STAT3 可使食管癌细胞周期阻滞在 S 期,使细胞凋亡率增加,抑制细胞的增殖,迁移和侵

袭^[20]。在本实验中我们发现,给予细胞 MNNG 染毒后,TGF- β , Wnt/ β -catenin, JAK/STAT3 信号通路的激活均出现激活。给予叶酸干预之后,JAK 的 mRNA 在转录水平的变化最为明显。这表明 JAK 通路在叶酸保护 MNNG 诱发食管-上皮间质转化的过程中作用最为关键,这种变化将会成为下一步实验所关注的重点。转录因子 snail、ZEB1 表达也均出现上升。但上述过程在蛋白的表达情况未做探索,这可能在蛋白翻译和修饰过程中涉及的一些表观调控机制在本研究未被阐明。目前,本研究中叶酸调节 JAK/STAT3 信号通路的具体机制处于初步探索阶段,具体的作用和调控方式需要进一步验证。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- 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 - A Cancer Journal for Clinicians, 2024, 74(3): 229-263.
- Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, et al. Progress in the pretreatment and analysis of N-nitrosamines: an update since 2010 [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(21): 3626-3660.
- Kelly RJ. Emerging multimodality approaches to treat localized esophageal cancer [J]. Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN, 2019, 17(8): 1009-1014.
- Morgan E, Soerjomataram I, Runggay 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.
- Fontana R, Mestre-Farrera A, Yang J. Update on epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression [J]. Annual Review of Pathology, 2024, 19: 133-156.
- Bai YP, Sha JJ, Kanno T. The role of Carcinogenesis-Related biomarkers in the Wnt pathway and their effects on Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in oral squamous cell carcinoma

- [J]. *Cancers*, 2020, 12(3): 555.
- [7] Inui N, Sakai S, Kitagawa M. Molecular pathogenesis of pulmonary fibrosis, with focus on pathways related to TGF- β and the Ubiquitin-Proteasome pathway [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 6107.
- [8] Wang RX, Zhao YD, Zhou L, et al. Costunolide ameliorates MNNG-induced chronic atrophic gastritis through inhibiting oxidative stress and DNA damage via activation of Nr2 [J]. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155581.
- [9] Tong YL, Wang RL, Liu X, et al. Zuojin pill ameliorates chronic atrophic gastritis induced by MNNG through TGF- β /PI3K/Akt axis [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 271: 113893.
- [10] Ratajczak AE, Szymczak-Tomczak A, Rychter AM, et al. Does folic acid protect patients with inflammatory bowel disease from complications? [J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 4036.
- [11] Qin XH, Shen L, Zhang R, et al. Effect of folic acid supplementation on cancer risk among adults with hypertension in China: A randomized clinical trial [J]. *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*, 2017, 141(4): 837-847.
- [12] Dong Y, Yi X, Yujie Z, et al. Relationship between the Methylation of Folic Acid metabolism-related genes and the incidence and prognosis of esophageal cancer among ethnic Kazakhs [J]. *Journal of Cancer*, 2018, 9(16): 2865-2875.
- [13] 杨欢, 孙宛怡, 王建炳, 等. 中国食管癌病因学、筛查及早期诊断研究进展 [J]. *肿瘤防治研究*, 2022, 49(3): 169-175.
- Yang H, Sun WY, Wang JB, et al. Research progress of etiology, screening and early diagnosis of esophageal cancer in China [J]. *Cancer Research on Prevention and Treatment*, 2022, 49(3): 169-175. (In Chinese)
- [14] 张慧霞, 韩菲, 李旭峰, 等. 叶酸和维生素 A 在 MNNG 致哈萨克族食管上皮细胞恶变中肿瘤相关基因表达的干预研究 [J]. *现代预防医学*, 2019, 46(14): 2612-2616.
- Zhang HX, Han F, Li XF, et al. Intervention effect of folic acid and vitamin A on the expression of tumor-associated gene in MNNG induced Kazakh esophageal epithelial cell [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2019, 46(14): 2612-2616. (In Chinese)
- [15] Zhang Y, Ma Y, Zhao C, et al. Synergistic carcinogenesis of HPV18 and MNNG in Het-1A cells through p62-KEAP1-NRF2 and PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 6352876.
- [16] Xiao Q, Freedman ND, Ren J, et al. Intakes of folate, methionine, vitamin B6, and vitamin B12 with risk of esophageal and gastric cancer in a large cohort study [J]. *British Journal of Cancer*, 2014, 110(5): 1328-1333.
- [17] 杨树星. 叶酸诱导 EMT 在宫颈癌细胞中的作用研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2019.
- Yang SX. The role of folic acid-induced EMT in cervical cancer cells [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2019. (In Chinese)
- [18] 朱晓婷. 叶酸在肝癌发生发展过程中的防护作用及其分子机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- Zhu XT. A study on the role of folic acid in hepatocellular carcinoma prevention and its molecular mechanisms [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2013. (In Chinese)
- [19] 屈杭帅, 田雄, 潘怡晓, 等. CDK8 通过 JAK2/STAT3/EMT 途径促进食管鳞状细胞癌的细胞增殖、迁移和侵袭 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2024, 51(12): 3238-3252.
- Qu HS, Tian X, Pan YX, et al. CDK8 promotes the proliferation, migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma through JAK2/STAT3/EMT pathway [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2024, 51(12): 3238-3252. (In Chinese)
- [20] 谭豆豆. JAK2/STAT3 信号通路的调控对食管癌侵袭转移作用的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2019.
- Tan DD. The regulation of JAK2/STAT3 signaling pathway on invasion and metastasis of esophageal cancer [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2019. (In Chinese)

收稿日期: 2024-11-14

(上接第 1747 页)

- [18] 杨苏瑞, 张驰, 李哲林, 等. 老年营养风险指数与社区老年人全因死亡风险的相关性研究 [J]. *中华老年医学杂志*, 2024, 43(8): 1059-1064.
- Yang SR, Zhang C, Li ZL, et al. Associations of the geriatric nutritional risk index (GNRI) and all-cause mortality risk in community-dwelling older adults [J]. *Chinese Journal of Geriatrics*, 2024, 43(8): 1059-1064. (In Chinese)
- [19] 于冬妮, 邱蕾, 齐海梅, 等. 增龄对老年男性营养和免疫功能的影响 [J]. *中华老年医学杂志*, 2022, 41(5): 565-569.
- Yu DN, Qiu L, Qi HM, et al. Effects of aging on nutrition and immune function among elderly men [J]. *Chinese Journal of Geriatrics*, 2022, 41(5): 565-569. (In Chinese)
- [20] 毛拥军, 吴剑卿, 刘龚翔, 等. 老年人营养不良防控干预中国专家共识 (2022) [J]. *中华老年医学杂志*, 2022, 41(7): 749-759.
- Mao YJ, Wu JQ, Liu GX, et al. Chinese expert consensus on prevention and intervention for the elderly with malnutrition (2022) [J]. *Chinese Journal of Geriatrics*, 2022, 41(7): 749-759. (In Chinese)
- [21] 汪芳, 陈洁, 陈敏, 等. 老年心力衰竭患者血清免疫球蛋白水平与病情程度及营养指标的相关性研究 [J]. *中国医师进修杂志*, 2023, 46(1): 24-29.
- Wang F, Chen J, Chen M, et al. Correlation of serum immunoglobulins levels with disease severity and nutritional indexes in elderly patients with heart failure [J]. *Chinese Journal of Postgraduates of Medicine*, 2023, 46(1): 24-29. (In Chinese)
- [22] Batko K, Sączek A, Banaszkiwicz M, et al. Comprehensive assessment of cardiovascular-kidney-metabolic (CKM) syndrome: Novel tools for assessment of cardiovascular risk and kidney outcomes in long-term kidney transplant patients [J]. *Kardiologia Polska*, 2024, 82(7/8): 760-770.
- [23] Huo X, Wu M, Gao D, et al. Geriatric nutrition risk index in the prediction of all-cause and cardiovascular mortality in elderly hypertensive population: NHANES 1999-2016 [J]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2023, 10: 1203130.
- [24] Li Y, Shen J, Hou XL, et al. Geriatric nutritional risk index predicts all-cause mortality in the oldest-old patients with acute coronary syndrome: A 10-year cohort study [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10: 1129978.
- [25] Xing LZ, Xiong JC, Hu QY, et al. Comparative analysis of four nutritional scores in predicting adverse outcomes in biopsy-confirmed diabetic kidney disease [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2024, 11: 1352030.

收稿日期: 2024-12-13