

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research

西达本胺抑制食管鳞癌细胞侵袭和上皮间质转化的研究

Research on chidamide suppressing invasion and epithelial – mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma

冯 博¹, 陈伟霞¹, 许彦超¹,
曹家瑞², 马纯政¹(1. 河南省中医院 肿瘤科, 河南 郑州 450003; 2.
河南中医药大学 研究生院, 河南 郑州 450003)FENG Bo¹, CHEN Wei – xia¹,
XU Yan – chao¹, CAO Jia – rui²,
MA Chun – zheng¹

(1. Department of Oncology, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, Henan Province, China; 2 Graduate School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, Henan Province, China)

基金项目: 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)基金资助项目(232102310126)

作者简介: 冯博(1989 –), 女, 博士, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究

通信作者: 马纯政, 主任医师, 博士生导师
MP: 18939255962
E – mail: mchzh666@126.com

摘要:目的 探究西达本胺(CHI)通过长链非编码RNA(LncRNA)VPS9D1 – AS1抑制食管鳞癌细胞侵袭和上皮间质转化的机制。方法 取人正常食管上皮细胞设为HEEC组(HEEC细胞正常培养不做任何处理), 将人食管鳞癌细胞KYSE – 450细胞分为KYSE – 450组(正常培养)、CHI组(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI处理48 h)、CHI + oe – NC组(转染oe – NC, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI处理48 h)、CHI + oe – LncRNA VPS9D1 – AS1组(转染oe – LncRNA VPS9D1 – AS1, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI处理48 h)。用荧光原位杂交检测细胞中LncRNA VPS9D1 – AS1的阳性表达, 用Transwell检测细胞的侵袭能力, 用蛋白质印迹检测上皮间质转化与有丝分裂原活化蛋白激酶(MEK)/细胞外信号相关蛋白激酶(ERK)信号通路相关蛋白相对表达水平。结果 HEEC组、KYSE – 450组和CHI组的LncRNA VPS9D1 – AS1阳性表达水平分别为 1.00 ± 0.06 、 4.58 ± 0.84 和 1.93 ± 0.37 , KYSE – 450组与HEEC组相比、CHI组与KYSE – 450组相比, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。KYSE – 450组、CHI组、CHI + oe – NC组和CHI + oe – LncRNA VPS9D1 – AS1组的细胞侵袭个数分别为(89.57 ± 15.61)、(22.49 ± 5.18)、(27.04 ± 5.95)和(57.82 ± 10.73)个, N – 钙黏蛋白(N – cadherin)蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.07 、 0.52 ± 0.12 、 0.59 ± 0.09 和 0.91 ± 0.16 , E – 钙黏蛋白(E – cadherin)蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 1.81 ± 0.35 、 1.79 ± 0.30 和 1.24 ± 0.22 , MEK1蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 0.64 ± 0.11 、 0.69 ± 0.13 和 0.93 ± 0.17 , p – ERK1/ERK1水平分别为 1.00 ± 0.05 、 0.61 ± 0.07 、 0.55 ± 0.10 和 0.95 ± 0.15 , p – ERK2/ERK2水平分别为 1.00 ± 0.12 、 0.43 ± 0.09 、 0.42 ± 0.08 和 0.89 ± 0.14 , CHI组的上述指标与KYSE – 450组相比、CHI + oe – LncRNA VPS9D1 – AS1组的上述指标与CHI + oe – NC组相比, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 CHI可以抑制食管鳞癌细胞侵袭和上皮间质转化, 这可能与CHI下调LncRNA VPS9D1 – AS1抑制MEK/ERK信号通路激活有关。

关键词: 西达本胺; 食管鳞癌; 上皮间质转化; N – 钙黏蛋白; 有丝分裂原活化蛋白激酶

DOI: 10.13699/j.cnki.1001 – 6821.2025.09.007

中图分类号: R979.1 文献标志码: A

文章编号: 1001 – 6821(2025)09 – 1236 – 06

Abstract: Objective To explore the mechanism of inhibiting invasion and epithelial mesenchymal transformation of esophageal squamous cell carcinoma cells by chidamide (CHI) through long noncoding RNA (LncRNA) VPS9D1 – AS1. **Methods** Human normal esophageal epithelial cells (HEEC) group (HEEC were cultured normally without any treatment), human esophageal squamous cell carcinoma KYSE – 450

cells were divided into KYSE - 450 group (normal culture), CHI group (treated with $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI for 48 h), CHI + oe - NC group (transfected with oe - NC, treated with $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI for 48 h), CHI + oe - LncRNA VPS9D1 - AS1 group (transfected with oe - LncRNA VPS9D1 - AS1, treated with $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI for 48 h). The positive expression of *LncRNA VPS9D1 - AS1* in the cells was detected by fluorescence in situ hybridization, the invasion ability of the cells was detected by Transwell, and the epithelial mesenchymal transformation and mitogen - activated protein kinase (MEK)/extracellular signal - related protein kinase (ERK) signaling pathway related protein expression levels were detected by protein Western blot. **Results** The positive expression levels of *LncRNA VPS9D1 - AS1* in HEEC group, KYSE - 450 group and CHI group were 1.00 ± 0.06 , 4.58 ± 0.84 and 1.93 ± 0.37 , respectively. Compared with HEEC group and KYSE - 450 group, compared with CHI group and KYSE - 450 group, the positive expression levels of *LncRNA VPS9D1 - AS1* were significantly different ($P < 0.05$). The invasion numbers of cells in KYSE - 450 group, CHI group, CHI + oe - NC group, CHI + oe - LncRNA VPS9D1 - AS1 group were 89.57 ± 15.61 , 22.49 ± 5.18 , 27.04 ± 5.95 and 57.82 ± 10.73 , respectively; the relative expression levels of N - cadherin were 1.00 ± 0.07 , 0.52 ± 0.12 , 0.59 ± 0.09 and 0.91 ± 0.16 , respectively; the relative expression levels of E - cadherin were 1.00 ± 0.11 , 1.81 ± 0.35 , 1.79 ± 0.30 and 1.24 ± 0.22 , respectively; the relative expression levels of MEK1 were 1.00 ± 0.08 , 0.64 ± 0.11 , 0.69 ± 0.13 and 0.93 ± 0.17 , respectively; p - ERK1/ERK1 levels were 1.00 ± 0.05 , 0.61 ± 0.07 , 0.55 ± 0.10 and 0.95 ± 0.15 , respectively; p - ERK2/ERK2 levels were 1.00 ± 0.12 , 0.43 ± 0.09 , 0.42 ± 0.08 and 0.89 ± 0.14 , respectively. Compared between KYSE - 450 group and CHI group, between CHI + oe - LncRNA VPS9D1 - AS1 group and CHI + oe - NC group, there were statistical significance in the levels of the above indexes ($P < 0.05$). **Conclusion** CHI can inhibit esophageal squamous cell invasion and epithelial mesenchymal transformation, which may be related to the inhibition of MEK/ERK signaling pathway activation by *LncRNA VPS9D1 - AS1* down - regulated by CHI.

Key words: chidamide; esophageal squamous cell carcinoma; epithelial mesenchymal transformation; N - cadherin; mitogen - activated protein kinase

食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是食管癌最常见的亚型,发病率具有地域差异。研究表明,ESCC 发生与遗传、饮食习惯(如高温饮食)、环境暴露(如饮酒)等多种因素有关,并且早期症状具有非特异性,多数患者诊断时已处于疾病晚期,导致治疗预后差^[1],因此探讨 ESCC 的分子机制并寻找有效的治疗靶点具有重要的临床意义。上皮间质转化使细胞表型改变为侵袭性,增强了细胞迁移能力,与肿瘤的发生、发展有关^[2]。西达本胺(chidamide, CHI)为新型组蛋白去乙酰化酶抑制药,是一种新型抗肿瘤药物。研究表明,CHI 可以抑制三阴性乳腺癌小鼠肿瘤细胞上皮间质转化,阻滞细胞周期,并诱导细胞凋亡^[3]。高曼棋等^[4]研究表明,CHI 可以抑制 ESCC 细胞增殖,诱导细胞凋亡,抑制血管形成,但其对 ESCC 上皮间质转化的影响研究较少。长链非编码 RNA(long noncoding RNA, LncRNA)在肿瘤细胞生物行为中扮演着重要角色,介导食管癌在内的多种恶性肿瘤的发生与发展,是肿瘤诊断、治疗和预后评估的新型生物标志物^[5]。基于此,本研究拟探究 CHI 对 ESCC 侵袭和上皮间质转化的影响,并结合

LncRNA探究其机制。

材料与方法

1 材料

细胞 人食管鳞癌细胞(KYSE - 150、KYSE - 450、KYSE - 510),均购自思泰默(上海)生物科技有限公司;人正常食管上皮细胞(human normalesophageal epithelial cells, HEEC),购自厦门逸漠生物科技有限公司。

药品与试剂 西达本胺片,规格:每片 5 mg,批号:20230213,批准文号:国药准字 H20140129,深圳微芯药业有限责任公司生产。罗斯威尔公园纪念研究所 1640 培养基(Roswell Park Memorial Institute 1640, RPMI 1640)、汉姆氏营养混合物 F - 12(Ham's Nutrient Mixture F - 12, Ham's F - 12)、杜尔贝科改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基、Lipofectamine 3000 转染试剂,均为美国赛默飞公司生产;荧光原位杂交试剂盒,上海吉玛制药技术有限公司生产;细胞小室、细胞裂解液、胰蛋

白酶消化液、二喹啉甲酸法蛋白浓度测定试剂盒、细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒, 均为上海碧云天生物技术有限公司生产; 兔抗 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 抗体、兔抗 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 抗体、兔抗细胞外信号相关蛋白激酶 (extracellular signal-related protein kinase, ERK) 1 抗体、兔抗有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MEK) 1 抗体、兔抗磷酸化-ERK1 (phospho-ERK1, p-ERK1) 抗体、兔抗 p-ERK2 抗体、兔抗 ERK2 抗体、辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔抗体, 均为英国 Abcam 公司生产。

仪器 GelDoc Go 凝胶成像仪、CFX384 Touch 荧光定量聚合酶链反应仪, 均为美国 Bio-Rad 公司产品; BZ-X 荧光显微镜, 基恩士(中国)有限公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[6]

KYSE-150、KYSE-450、KYSE-510 细胞用 RPMI 1640: Ham's F-12 (1:1) 培养基培养, HEEC 细胞用 DMEM 培养基培养, 培养基均含 10% 胎牛血清和 1% 双抗, 细胞均置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 CCK-8 法检测不同浓度下 CHI 处理 48 h 后 KYSE-450 的细胞活力^[7]

取对数生长期的 KYSE-450 细胞消化、重悬, 重新培养至贴壁后添加不同浓度 (0、2.5、5.0、10.0、20.0 和 40.0 μmol·L⁻¹) CHI 处理 48 h, 然后按照试剂盒说明书加入工作液, 在酶标仪下检测光密度值, 并计算细胞存活率。

2.3 细胞转染、细胞分组与给药方法

将 KYSE-450 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞生长至融合度 75% 左右时进行转染, 用 Lipofectamine 3000 转染试剂将 LncRNA VPS9D1-AS1 过表达 (oe-LncRNA VPS9D1-AS1) 及阴性对照 (oe-NC) 质粒分别转染至 KYSE-450 细胞。转染 48 h 后, 检测转染效率, 并收集细胞用于后续实验。

HEEC 组: HEEC 细胞正常培养不做任何处理; KYSE-450 组: KYSE-450 细胞正常培养不做任何处理; CHI 组: 20 μmol·L⁻¹ CHI 处理 KYSE-450 细胞 48 h; CHI+oe-NC 组: KYSE-450 细胞转染 oe-NC, 并用 20 μmol·L⁻¹ CHI 处理 48 h; CHI+oe-LncRNA VPS9D1-AS1 组: KYSE-450 细胞转染 oe-LncRNA VPS9D1-AS1, 并用 20 μmol·L⁻¹ CHI 处理 48 h。

2.4 荧光原位杂交法检测细胞中的 LncRNA VPS9D1-AS1 的阳性表达情况^[8]

将细胞用 4% 多聚甲醛固定, 然后按照试剂盒说

明书进行变性、杂交、信号放大, 封片后用荧光显微镜进行观察。LncRNA VPS9D1-AS1 探针序列为 5'-DIG-CCUACCGCCGCAUUUCCC-DIG-3'。

2.5 Transwell 实验法检测细胞的侵袭能力^[8]

制备单细胞悬液, 将基质胶稀释后预涂于侵袭小室, 孵育 2 h。将单细胞悬液加入 24 孔板, 下室加入 DMEM 培养液, 孵育 24 h。用乙醇固定滤膜, 结晶紫染色, 橡胶封片, 在显微镜下观察并计数。

2.6 蛋白质印迹法检测蛋白相对表达水平^[6]

收集各组细胞, 裂解提取细胞总蛋白, 用二喹啉甲酸法进行蛋白定量。取蛋白样品进行上样、电泳、转膜、封闭。加入兔抗 N-cadherin 抗体、兔抗 E-cadherin 抗体、兔抗 ERK1 抗体、兔抗 p-ERK1 抗体、兔抗 p-ERK2 抗体、兔抗 ERK2 抗体、兔抗 MEK1 抗体, 所有抗体均 1:1 000 稀释, 孵育过夜 (4℃), 洗膜, 加入辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔抗体 (1:2 000), 孵育 1 h (室温), 洗膜, 滴加显色液, 在成像仪下拍照。

2.7 逆转录实时荧光定量聚合酶链反应检测 LncRNA VPS9D1-AS1、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 2、MMP9、MMP14、钙黏蛋白 1 (cadherin1, CDH1)、CDH2、紧密连接蛋白 (tight junction protein, TJP) 1、促丝裂原活化蛋白激酶 1 (dual specificity mitogen-activated protein kinase1, MAP2K1)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和 MAPK3 mRNA 相对表达水平^[8]

收集各组细胞, 根据试剂盒说明书进行总 RNA 提取和反转录扩增, 然后进行荧光定量, 分析 mRNA 相对表达水平。引物序列由上海吉玛基因有限公司提供。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较用独立样本 *t* 检验。

结 果

1 LncRNA VPS9D1-AS1 在各组细胞中的表达

HEEC、KYSE-150、KYSE-450 和 KYSE-510 细胞中 LncRNA VPS9D1-AS1 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.06 、 1.67 ± 0.31 、 2.28 ± 0.54 和 1.83 ± 0.37 , KYSE-150、KYSE-450、KYSE-510 细胞中 LncRNA VPS9D1-AS1 相对表达水平与 HEEC 细胞比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。其中,

KYSE-450细胞差异最显著,故用 KYSE-450 细胞进行后续实验。

2 CHI 对食管鳞癌细胞活力的影响

0、2.5、5.0、10.0、20.0 和 40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI 处理后, KYSE-450 细胞存活率分别为 $(100.00 \pm 3.03)\%$ 、 $(93.57 \pm 10.61)\%$ 、 $(84.27 \pm 9.35)\%$ 、 $(73.16 \pm 7.59)\%$ 、 $(58.78 \pm 6.93)\%$ 和 $(29.11 \pm 4.54)\%$, 与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比, 5.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI 处理后, KYSE-450 细胞存活率均显著下降 (均 $P < 0.05$)。CHI 的半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC_{50}) 值为 22.59 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 因此后续实验选用 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI 处理 KYSE-450 细胞。

3 CHI 调控 *LncRNA VPS9D1-AS1* 的表达水平

KYSE-450 组给予正常培养不做任何处理; CHI 组给予 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI 处理 KYSE-450 细胞 48 h; CHI + oe - NC 组转染 oe - NC, 并用 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI 处理 48 h; CHI + oe - *LncRNA VPS9D1-AS1* 组转染 oe - *LncRNA VPS9D1-AS1*, 并用 20.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI 处理 48 h。

HEEC 组、KYSE-450 组和 CHI 组中 *LncRNA VPS9D1-AS1* 阳性表达水平分别为 1.00 ± 0.06 、 4.58 ± 0.84 和 1.93 ± 0.37 , KYSE-450 组与 HEEC 组相比、CHI 组与 KYSE-450 组相比, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

4 CHI 通过 *LncRNA VPS9D1-AS1* 抑制 KYSE-450 侵袭能力

KYSE-450 组、CHI 组、CHI + oe - NC 组和 CHI + oe - *LncRNA VPS9D1-AS1* 组的 *MMP2* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.07 、 0.39 ± 0.06 、 0.44 ± 0.09 和 0.85 ± 0.15 , *MMP9* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 0.53 ± 0.10 、 0.50 ± 0.08 和 0.91 ± 0.17 , *MMP14* mRNA 相对表达水平分别为

1.00 ± 0.06 、 0.43 ± 0.08 、 0.42 ± 0.07 和 0.92 ± 0.16 , 细胞侵袭个数分别为 (89.57 ± 15.61) 、 (22.49 ± 5.18) 、 (27.04 ± 5.95) 和 (57.82 ± 10.73) 个, CHI 组与 KYSE-450 组相比、CHI + oe - *LncRNA VPS9D1-AS1* 组与 CHI + oe - NC 组相比, *MMP2*、*MMP9*、*MMP14* mRNA 相对表达水平和细胞侵袭个数在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), CHI + oe - NC 组的 *MMP2*、*MMP9*、*MMP14* mRNA 相对表达水平和细胞侵袭个数与 CHI 组相比, 在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。结果见图 1。

5 CHI 通过 *LncRNA VPS9D1-AS1* 抑制 KYSE-450 上皮间质转化

KYSE-450 组、CHI 组、CHI + oe - NC 组和 CHI + oe - *LncRNA VPS9D1-AS1* 组的 *CDH1* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.05 、 2.18 ± 0.42 、 2.11 ± 0.39 和 1.24 ± 0.23 , *CDH2* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 0.48 ± 0.08 、 0.46 ± 0.09 和 0.87 ± 0.13 , *TJP1* mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.09 、 1.94 ± 0.38 、 1.99 ± 0.40 和 1.33 ± 0.27 , N - cadherin 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.07 、 0.52 ± 0.12 、 0.59 ± 0.09 和 0.91 ± 0.16 , E - cadherin 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 1.81 ± 0.35 、 1.79 ± 0.30 和 1.24 ± 0.22 , CHI 组与 KYSE-450 组相比、CHI + oe - *LncRNA VPS9D1-AS1* 组与 CHI + oe - NC 组相比, *CDH1*、*CDH2*、*TJP1* mRNA 相对表达水平和 N - cadherin、E - cadherin 蛋白相对表达水平在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), CHI + oe - NC 组与 CHI 组相比, *CDH1*、*CDH2*、*TJP1* mRNA 相对表达水平和 N - cadherin、E - cadherin 蛋白相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。结果见图 2。

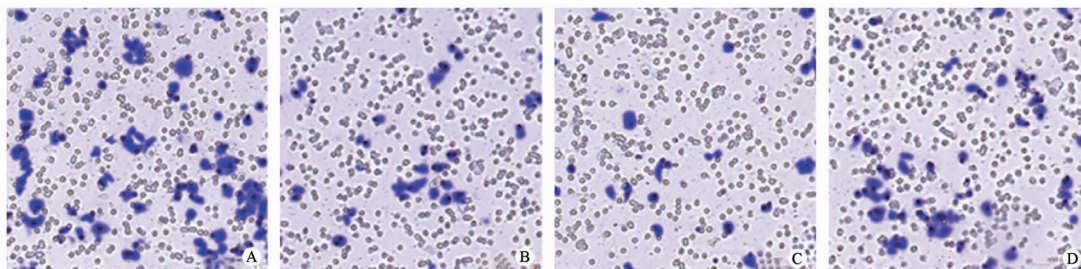


图 1 各组细胞的侵袭能力的比较 ($\times 100$)

Figure 1 Comparison of invasive ability of each cell group ($\times 100$)

A: KYSE-450 group, KYSE-450 cells were cultured normally without any treatment; B: CHI group, KYSE-450 cells were treated with 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI for 48 h; C: CHI + oe - NC group, KYSE-450 cells were transfected with oe - NC and treated with 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI for 48 h; D: CHI + oe - *LncRNA VPS9D1-AS1* group, KYSE-450 cells were transfected with oe - *LncRNA VPS9D1-AS1* and treated with 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHI for 48 h.

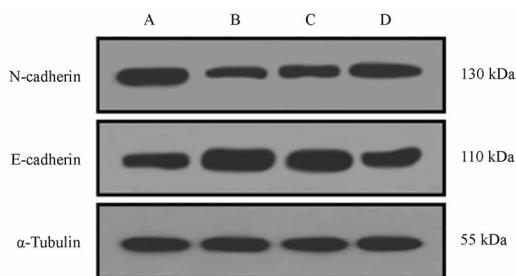


图2 用蛋白质印迹法检测各组细胞上皮间质转化相关蛋白水平

Figure 2 The levels of epithelial mesenchymal transformation related proteins were detected by Western blot

A - D refer to figure 1.

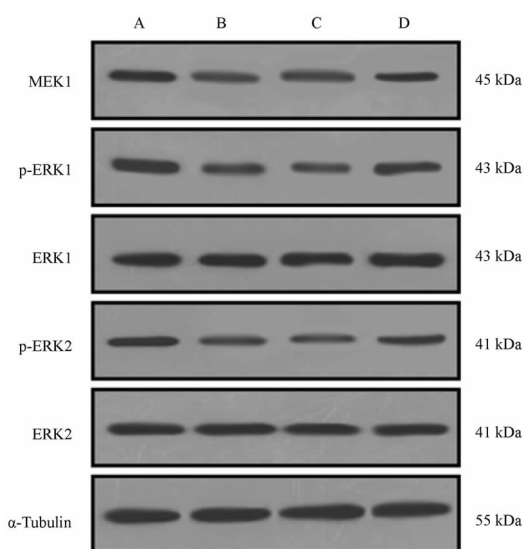


图3 蛋白质印迹检测各组细胞中细胞外信号相关蛋白激酶(ERK)1、磷酸化-ERK1(p-ERK1)、p-ERK2、ERK2和有丝分裂原活化蛋白激酶(MEK)1的蛋白相对表达水平

Figure 3 The protein relative expression levels of extracellular signal-related protein kinase (ERK) 1, phospho-ERK (p-ERK) 1, ERK2, p-ERK2 and mitogen-activated protein kinase (MEK) 1 in cells of each group were detected by Western blot

A - D refer to figure 1.

6 CHI 通过 *LncRNA VPS9D1-AS1* 调控 MEK/ERK 信号通路相关基因和蛋白相对表达水平

如图3所示: KYSE-450组、CHI组、CHI + oe-NC组、CHI + oe-*LncRNA VPS9D1-AS1*组的*MAP2K1* mRNA相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11 、 0.55 ± 0.09 、 0.56 ± 0.12 和 0.82 ± 0.18 , *MAPK1* mRNA相对表达水平分别为 1.00 ± 0.06 、 0.43 ± 0.08 、 0.40 ± 0.05 和 0.92 ± 0.16 , *MAPK3* mRNA相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 0.47 ± 0.06 、 0.50 ± 0.09 和 0.87 ± 0.15 , MEK1蛋白相对表达水平分别为

1.00 ± 0.08 、 0.64 ± 0.11 、 0.69 ± 0.13 和 0.93 ± 0.17 , p -ERK1/ERK1水平分别为 1.00 ± 0.05 、 0.61 ± 0.07 、 0.55 ± 0.10 和 0.95 ± 0.15 , p -ERK2/ERK2水平分别为 1.00 ± 0.12 、 0.43 ± 0.09 、 0.42 ± 0.08 和 0.89 ± 0.14 , CHI组与 KYSE-450组相比, CHI + oe-*LncRNA VPS9D1-AS1*组与 CHI + oe-NC组相比, *MAP2K1*、*MAPK1*、*MAPK3* mRNA相对表达水平和 MEK1、 p -ERK2/ERK2、 p -ERK2/ERK2蛋白相对表达水平,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); CHI + oe-NC组的上述指标与 CHI组相比,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

讨 论

ESCC是我国较为常见的消化系统恶性肿瘤,患者被确诊时往往已是晚期且已转移,因此治疗困难,预后不佳。近年来,随着分子生物学和肿瘤学研究的深入,越来越多的研究聚焦于寻找新的治疗靶点和药物。CHI是我国自主研发合成的新型抗肿瘤药物,具有广谱抗肿瘤作用^[9]。目前,CHI临床上已经用于治疗多种恶性肿瘤,如难治性皮肤T细胞淋巴瘤^[10]、乳腺癌^[11]、白血病^[12]等,显示出较好的治疗效果,但CHI在ESCC治疗中的作用及其机制尚未完全阐明。在本研究中,CHI处理可抑制KYSE-450侵袭能力和上皮间质转化,这说明CHI也可能具有抗ESCC作用。*LncRNA*与肿瘤发生、进展密切相关。*LncRNA LINC00261*可以促进胃癌细胞增殖、侵袭,并且促进上皮间质转化,与胃癌进展有关^[13]。在本研究中, KYSE-450细胞中*LncRNA VPS9D1-AS1*的阳性表达显著升高,CHI处理使其降低,这提示CHI可能通过调控*LncRNA VPS9D1-AS1*表达发挥抗ESCC作用。MA等^[14]研究发现,*LncRNA VPS9D1-AS1*表达在ESCC患者体内升高,且其表达水平与患者不良预后有关,这与本研究的结果是类似的。

癌细胞侵袭能力增强使肿瘤发生转移的可能性增大,不利于患者治疗。肿瘤细胞的侵袭和转移是导致癌症患者死亡的主要原因之一。MMPs与肿瘤细胞侵袭、转移关系密切。研究表明,异丙酚可能通过抑制MMP-9表达来抑制肝癌细胞侵袭及迁移^[15],辣椒素通过抑制MMP-2、MMP-9蛋白表达,实现对结肠癌细胞侵袭、迁移的抑制^[16]。在本研究中,CHI处理使KYSE-450细胞中*MMP2*、*MMP9*、*MMP14* mRNA相对表达水平均显著降低,细胞侵袭个数显著减少,而*LncRNA VPS9D1-AS1*过表达可以减弱CHI

的抑制作用,这说明 CHI 通过抑制 *LncRNA VPS9D1 - AS1* 来抑制癌细胞侵袭。上皮间质转化会增强肿瘤细胞转移和侵袭的能力,增加对化疗药物的耐受性,不利于患者治疗及治疗预后^[17]。石雅馨等^[18]研究发现,重楼皂苷 VII 可以上调子宫腺肌病异位内膜细胞 CDH1、下调 CDH2,调控上皮间质转化进程从而抑制细胞的迁移和侵袭。在本研究中,CHI 处理使 *CDH1*、*TJP1* mRNA 和 E-cadherin 蛋白相对表达水平均显著升高、*CDH2* mRNA 和 N-cadherin 蛋白相对表达水平均显著降低,而 *LncRNA VPS9D1 - AS1* 过表达可以减弱 CHI 的上述作用,这说明 CHI 通过抑制 *LncRNA VPS9D1 - AS1* 来抑制癌细胞上皮间质转化。MEK/ERK 信号通路参与调控多种细胞的增殖、迁移、侵袭等行为,在肿瘤细胞的发生发展中发挥重要作用。杨谦等^[19]研究发现,胡黄连苷 II 可能通过抑制 MEK/ERK 信号通路来发挥抗食管癌作用,其调节癌细胞周期使细胞增殖及侵袭减少,凋亡增多。在本研究中,CHI 处理使 KYSE-450 细胞 MEK/ERK 信号通路相关基因和蛋白水平下调,而过表达 *LncRNA VPS9D1 - AS1* 可以减弱 CHI 处理的下调作用,这表明 CHI 的抗癌作用可能与下调 *LncRNA VPS9D1 - AS1* 来抑制 MEK/ERK 信号通路激活有关。上述发现揭示了 CHI 在 ESCC 中的抗肿瘤作用及其分子机制,为 CHI 在 ESCC 治疗中的应用提供了理论依据。然而,本研究仍存在一些局限性。首先,所有实验均在体外进行,未来需要进一步开展动物实验以验证 CHI 的体内抗肿瘤效果。其次,*LncRNA VPS9D1 - AS1* 在 ESCC 中的具体作用机制仍需进一步探讨。

本研究提示:CHI 可以抑制食管鳞癌细胞侵袭和上皮间质转化,这可能与 CHI 下调 *LncRNA VPS9D1 - AS1* 抑制 MEK/ERK 信号通路激活有关。

参考文献:

- [1] 崔百强,白向豆,苟云久. 泛素偶联酶 2C 对食管鳞癌 KYSE-30 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(5): 659—663.
- [2] 秦玉萍,曹通,许颖,等. 敲低 *lncRNA CACNA1C - AS2* 促进上皮间质转化增强人食管癌细胞的增殖、侵袭和迁移[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2023,39(3): 249—257.
- [3] 任雪,陈倩影,张浩,等. 西达本胺对小鼠三阴性乳腺癌 4T-1 细胞增殖及上皮间质转化的影响[J]. 中国新药杂志,2021,30(23): 2215—2224.
- [4] 高曼棋,赵宝生,杨文倩,等. 西达本胺对食管鳞癌细胞的抗肿瘤作用及机制[J]. 南方医科大学学报,2023,43(11): 1926—1934.
- [5] 彭孟凡,李鸣,苗晋鑫,等. *LncRNA* 在食管癌中的双重调控机制及其临床价值[J]. 中国比较医学杂志,2022,32(11): 121—127.
- [6] 张洁. 番茄碱通过 AMPK/COX-2 通路调控食管癌细胞凋亡的机制研究[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(16): 2348—2352.
- [7] 王璐,王杰,陈腾,等. 淫羊藿苷激活内质网应激对人结肠癌细胞的凋亡作用[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(21): 3106—3110.
- [8] 武文娟,李波,吕海宏,等. 槲皮素通过调控 GAS5/miR-18b-5p 轴抑制神经内分泌肿瘤细胞活性的研究[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(10): 1429—1433.
- [9] 刘谦,瞿菲,李薇. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂在乳腺癌的治疗进展[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2024,44(2): 281—286.
- [10] 王冠钰,王艺萌,张春雷. 西达本胺联合传统药物治疗复发/难治性皮肤 T 细胞淋巴瘤 2 例[J]. 中国皮肤性病学杂志,2024,38(9): 1000—1006.
- [11] 熊戴群,刘少龙,叶欣华. 西达本胺联合吉西他滨三线治疗晚期三阴性乳腺癌[J]. 中国新药与临床杂志,2020,39(7): 425—428.
- [12] XI M, GUO S, BAYIN C, et al. Chidamide inhibits the NOTCH1-MYC signaling axis in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Front Med*, 2022, 16(3): 442—458.
- [13] 谢锐,尹源,滕俊,等. 长链非编码 RNA LINC00261 通过调控 miR-324-3p/EST1 促进胃癌进展[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(10): 2101—2107.
- [14] MA L, YAN W, SUN X, et al. Long noncoding RNA VPS9D1-AS1 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *J Cancer*, 2021, 12(22): 6894—6904.
- [15] 许思贵,莫怀忠,向梅,等. 异丙酚通过下调 ERK-VEGF/MMP-9 信号通路对肝癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响及机制研究[J]. 中国现代医学杂志,2022,32(23): 39—44.
- [16] 黄虹,黄蝶,王瑞杰,等. 辣椒素通过上调 MTSS1 表达抑制结肠癌细胞侵袭、迁移的实验研究[J]. 中国比较医学杂志,2022,32(3): 31—37.
- [17] 刘其伟,晁玮霞,焦叶林,等. 食管鳞癌多药耐药细胞建立及干性和上皮间质转化表型鉴定[J]. 中国药理学通报,2020,36(12): 1717—1724.
- [18] 石雅馨,王子璐,曹涵,等. 重楼皂苷 VII 通过调控上皮间充质转化抑制子宫腺肌病异位内膜迁移和侵袭的分子机制[J]. 中华中医药杂志,2024,39(5): 2534—2541.
- [19] 杨谦,张军,马玉泉,等. 胡黄连苷 II 通过 MEK/ERK 通路抑制食管癌细胞增殖及侵袭转移的机制研究[J]. 中国医院用药评价与分析,2021,21(7): 820—825.

(收稿日期 2024-12-12)