

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.04.004

## NCOR2 基因通过调控 PI3K/AKT 通路促进食管鳞状细胞癌 KYSE450 细胞迁移和侵袭

姚佳丽<sup>ab</sup>, 石秀枝<sup>ab</sup>, 程圣旗<sup>ab</sup>, 张雨彤<sup>ab</sup>, 安哲昆<sup>ab</sup>, 王彦强<sup>b</sup>(山西医科大学 a. 基础医学院; b. 转化医学研究中心, 山西 太原 030001)

**[摘要]** **目的:** 探究核受体辅阻遏物2(NCOR2)基因对食管鳞状细胞癌(ESCC)发生发展的影响及其潜在的分子调控机制。**方法:** 收集2017年5月至2018年7月间在山西省肿瘤医院确诊的155例ESCC患者的癌及癌旁组织标本及临床资料,利用患者的转录组和临床病理数据进行生存预后分析及临床关联性分析。采用qPCR法检测6种ESCC细胞(TE-1、TE-5、TE-9、KYSE150、KYSE180和KYSE450)中NCOR2基因的表达水平,筛选NCOR2基因高表达的KYSE450细胞进行siRNA敲低实验,构建敲降NCOR2的细胞模型。利用CCK-8、克隆形成、细胞划痕和Transwell实验检测敲低NCOR2对KYSE450细胞增殖活性、克隆形成、迁移和侵袭能力的影响。对NCOR2敲低的KYSE450细胞进行转录组测序分析,筛选差异表达基因,进行GO和KEGG富集分析,解析NCOR2可能影响的信号调控网络。**结果:** NCOR2在ESCC组织中表达水平显著高于癌旁组织( $P<0.01$ ), NCOR2高表达ESCC患者的预后较差( $P<0.05$ )。敲低NCOR2基因表达后, KYSE450细胞划痕愈合率、迁移和侵袭能力均显著降低(均 $P<0.01$ ),对细胞的增殖活力及克隆形成能力均无显著影响(均 $P>0.05$ )。在KYSE450细胞中敲低NCOR2基因后,转录组测序分析后发现54个基因发生了显著上调、127个基因发生了显著下调。KEGG分析发现,显著差异基因富集于PI3K/AKT分子信号通路( $P<0.01$ ),该通路中的4个基因PIK3R3、IL4R、COL1A1、EFNA1的表达水平在155例ESCC患者临床样本的转录组数据中与NCOR2呈显著正相关(均 $P<0.01$ ),与转录组测序结果相吻合。**结论:** NCOR2可以通过影响PI3K/AKT信号通路并促进KYSE450细胞迁移与侵袭,进而影响ESCC的发生与发展。

**[关键词]** 核受体辅阻遏物2;食管鳞状细胞癌;KYSE450细胞;迁移;侵袭;PI3K/AKT信号通路

**[中图分类号]** R363.2;R735.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)04-0342-09

## NCOR2 promotes the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma KYSE450 cells by regulating the PI3K/AKT signaling pathway

YAO Jiali<sup>ab</sup>, SHI Xiuzhi<sup>ab</sup>, CHENG Shengqi<sup>ab</sup>, ZHANG Yutong<sup>ab</sup>, AN Zhekun<sup>ab</sup>, WANG Yanqiang<sup>b</sup> (a. Basic Medical School; b. Translational Medicine Research Center, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the role of nuclear receptor corepressor 2 (NCOR2) gene in the carcinogenesis and progression of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and investigate its underlying molecular regulatory mechanism. **Methods:** Tumor tissue specimens, adjacent tissue specimens and clinical data of 155 ESCC patients diagnosed in Shanxi Tumor Hospital between May 2017 and July 2018 were collected. Transcriptome and clinicopathological data of patients were used for survival prognosis analysis and clinical association analysis. qPCR assay was conducted to detect the expression levels of NCOR2 gene in six ESCC cell lines (TE-1, TE-5, TE-9, KYSE150, KYSE180 and KYSE450). KYSE450 cells with highly-expressed NCOR2 gene were selected for siRNA knockdown experiment and construction of knockdown NCOR2 cell model. CCK-8 cell viability assay, colony formation assay, wound healing assay and Transwell assay were performed to explore the effect of NCOR2 knockdown on proliferation vitality, clone formation, invasion and migration abilities of KYSE450 cells. Transcriptome sequencing analysis was conducted on NCOR2 knockdown KYSE450 cells to identify differentially expressed genes. GO (Gene Ontology, GO) and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) analysis were performed to characterize the signal regulation network that might be affected by NCOR2. **Results:** The expression of NCOR2 in ESCC tumor tissues was significantly higher than that in the adjacent tissues ( $P<0.01$ ). Poor prognosis were associated with higher expression of NCOR2 in ESCC patients ( $P<0.05$ ). The knocking-down of NCOR2 significantly reduced wound healing rate and cell migration and invasion abilities of KYSE450 cells (all  $P<0.01$ ). However, cell proliferation and

**[基金项目]** 山西省博士启动基金(No. SD2033);山西医科大学引进人才启动基金

**[作者简介]** 姚佳丽(1999—),女,硕士生,主要从事肿瘤分子遗传学研究。E-mail: yaojiali201709@163.com

**[通信作者]** 王彦强, E-mail: yqwang15@sxmu.edu.cn

colony formation abilities were not significantly affected (all  $P>0.05$ ). After NCOR2 knockdown in KYSE450 cells, transcriptome sequencing analysis revealed that 54 genes were significantly up-regulated and 127 genes were significantly down-regulated. KEGG analysis results showed that the significantly differentially expressed genes were enriched in PI3K/AKT signaling pathway ( $P<0.01$ ). In the transcriptome data of the clinical samples of the 155 ESCC patients, the expression levels of the 4 genes PIK3R3, IL4R, COL1A1 and EFNA1 of the PI3K/AKT pathway were significantly correlated with NCOR2 (all  $P<0.01$ ), which was consistent with the transcriptome sequencing analysis results. **Conclusion:** NCOR2 can promote the invasion and migration of KYSE450 cells via the PI3K/AKT signaling pathway, thus affecting ESCC carcinogenesis and progression.

**[Key words]** nuclear receptor corepressor 2 (NCOR2); esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); KYSE450 cell; migration; invasion; PI3K/AKT signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(4): 342-350. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.04.004]

食管癌作为中国最常见的消化道恶性肿瘤之一,其主要包括食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)和食管腺癌两种组织学亚型。中国的食管癌患者以ESCC为主,约占全部病例的86.3%<sup>[1]</sup>;河南、河北和山西三省交界的太行山地区是中国食管癌的高发区<sup>[2]</sup>。目前,食管癌的靶向治疗方案多针对于食管腺癌,而对于ESCC的治疗靶点仍有待进一步发掘<sup>[3]</sup>。因此,筛选ESCC的治疗靶点和预后标志并阐明其作用及其分子机制,对于ESCC的精准治疗具有重要意义。核受体辅阻遏物2(nuclear receptor corepressor 2, NCOR2)基因是甲状腺激素和视黄酸受体相关共抑制因子家族的成员<sup>[4]</sup>。NCOR2基因编码的蛋白质产物为多亚基复合物的组成部分,可以与多种转录因子结合,调控靶基因的转录活性<sup>[5]</sup>。NCOR2的异常表达与多种类型肿瘤的发生发展密切相关。在结直肠癌中,NCOR2基因参与胆汁酸核受体的激活,促进溃疡型结肠炎发生癌变<sup>[6]</sup>。NCOR2还可通过加速细胞周期进程和抑制细胞凋亡来影响雌激素受体阳性乳腺癌的进展<sup>[7]</sup>。目前,NCOR2在ESCC中的作用机制尚未明了,有待进一步阐明。本研究利用临床样本的转录组数据比较NCOR2在ESCC患者癌与癌旁组织中的表达差异,分析NCOR2表达水平与生存预后的关联性,利用体外细胞功能实验探索NCOR2基因对KYSE450细胞恶性生物学行为的影响,进一步通过转录组测序法筛选NCOR2的下游靶基因和相关信号通路,旨在探明NCOR2在ESCC中表达的临床意义及其分子机制,为ESCC的精准治疗提供新的靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织标本、细胞与主要试剂

本研究所涉及ESCC患者肿瘤及配对的癌旁组织表达数据和临床数据均来自于所在课题组前期发表的工作<sup>[8]</sup>,155例组织标本来自于2017年5月至2018年7月间在山西省肿瘤医院确诊的ESCC患者。所有ESCC患者均为第一次进行手术切除治疗,术前

均未经接受新辅助疗法、化疗或放疗。

人ESCC细胞TE-1、TE-5、TE-9、KYSE150、KYSE180和KYSE450均由食管癌发病机理及转化研究山西省重点实验室样本库保存。

RPMI 1640液体培养基购自VivaCell公司,胎牛血清(FBS)和胰蛋白酶均购自Gibco公司,NCOR2 siRNA(si-NCOR2)及阴性对照siRNA(si-NC)由广州市锐博生物科技有限公司合成,Lipofectamine™ 2000转染试剂购自Thermo Fisher Scientific公司,TRIzol试剂购自北京聚合美生物科技有限公司,PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)和DNA Marker购自TaKaRa公司,Transwell小室购自Corning公司,转录组测序建库使用的建库试剂盒NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina®购自NEB公司。

### 1.2 利用ESCC患者样本数据进行NCOR2表达差异、预后和临床病理特征关联分析

从155例ESCC患者癌与癌旁组织的转录组测序数据中获取NCOR2在ESCC中的表达量相对值,使用SPSS 27.0软件绘制ROC曲线,确定其最佳临界值,将表达量大于临界值的划为高表达组,将表达量小于临界值的划为低表达组。然后通过SPSS.27.0软件进行配对 $t$ 检验,分析NCOR2在ESCC患者癌与癌旁组织中的表达差异。接下来,结合155例ESCC患者完整的生存和临床信息,在SPSS.27.0软件中采用Kaplan-Meier法和Log-Rank检验比较ESCC患者NCOR2表达水平与患者OS率的关系。利用卡方检验比较高表达组和低表达组与各种临床病理特征的关联性。

### 1.3 细胞培养、转染与分组

人ESCC细胞TE-1、TE-5、TE-9、KYSE150、KYSE180和KYSE450均使用含10% FBS的RPMI 1640培养基,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱内进行培养。转染时,首先选择处于对数生长期、生长状态好的KYSE450细胞进行计数,配制密度为 $2.5 \times 10^5$ 个/孔的细胞悬液,接种于6孔细胞培养板中,待细胞汇合度达到

60%时,使用Lipofectamine™ 2000转染试剂分别转染si-NCOR2-1、si-NCOR2-2、si-NCOR2-3及si-NC,其siRNA序列:si-NCOR2-1为GAATCACGCTCGGAAACAA;si-NCOR2-2为GGACGGAGATCTTCAATAT;si-NCOR2-3为GGCAGAACCTCGATGAGAT。实验分为si-NC组(转染si-NC)、si-NCOR2-1组(转染si-NCOR2-1)、si-NCOR2-2组(转染si-NCOR2-2)、si-NCOR2-3组(转染si-NCOR2-3)。转染48 h后,用qPCR法验证敲低效率。

#### 1.4 qPCR法检测ESCC细胞中NCOR2 mRNA的表达水平

采用TRIzol法提取各组细胞的总RNA,并通过PrimeScript™ RT Master Mix(Perfect Real Time)试剂盒反转录为cDNA。取1 μL的cDNA上样进行qPCR反应。引物序列:NCOR2上游引物为5'-TTCTCGCTGGACAGAAGAAG-3',下游引物为5'-TGCAAGATCTCATCGAGGTT-3';GAPDH上游引物为5'-CAACGACCACTTTGTCAAGCTC-3',下游引物为5'-GGTCTACATGGCAACTGTGAGG-3'。qPCR反应条件:95 °C 2 min;95 °C 15 s;60 °C 30 s,共计40个循环。以GAPDH为内参照,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量。

#### 1.5 CCK-8法检测各组KYSE450细胞的增殖能力

对处于对数生长期的ESCC细胞进行胰酶消化,按每孔 $5 \times 10^3$ 个细胞将细胞悬液接种到96孔细胞培养板中,每组细胞设置5个重复孔。分别于0、24、48和72 h时向各孔内加入10 μL CCK-8溶液,继续培养2 h后,取出培养板,上酶标仪检测波长450 nm处各孔的光密度(D)值,分析各组细胞的增殖水平。

#### 1.6 克隆形成实验检测各组KYSE450细胞的增殖能力

胰酶消化处于对数生长期的各组细胞,按每孔 $1 \times 10^3$ 个细胞将细胞悬液接种到6孔板中。将6孔板摇匀后,置入细胞培养箱中培养8 d。当6孔板中出现肉眼可见的细胞集团或克隆时,终止培养。弃去培养基,用PBS洗2次,再用4%多聚甲醛溶液固定15 min,弃去固定液,在0.5%结晶紫染液中染色30 min,后用水洗去多余染色液,待干燥后即可观察各组细胞的克隆形成情况。

#### 1.7 划痕实验检测各组KYSE450细胞的迁移能力

胰酶消化处于对数生长期的各组细胞,按每孔 $3 \times 10^5$ 个细胞将细胞悬液接种到6孔板中,培养至细胞汇合度达80%时,用灭菌的移液器吸头在培养板上轻轻划痕,分别于0、24 h时在倒置显微镜下观测划痕愈合情况,并拍照记录。

#### 1.8 Transwell实验检测各组KYSE450细胞的迁移

和侵袭能力

细胞迁移实验:将Transwell小室置于24孔板中,将100 μL密度为 $1 \times 10^6$ 个/mL的细胞悬液加到上室中,下室中加入500 μL含有10% FBS的RPMI 1640培养液。培养48 h后,取出小室并弃上室培养液,用湿棉签擦去上室侧的细胞,在4%多聚甲醛溶液中固定15 min,于0.5%结晶紫溶液中染色30 min,PBS洗2次,干燥后于显微镜下观察,每孔随机选取3个视野拍照,记录每个视野的细胞数目并进行统计分析。

细胞侵袭实验:在Transwell上室中加入细胞前需预铺基质胶,其余实验步骤同细胞迁移实验。

#### 1.9 转录组测序技术筛选KYSE450细胞中差异表达基因

将NCOR2基因敲低组和对照组KYSE450细胞进行二代转录组测序分析(每组包含3个生物学重复样本)。每个样本测序量为6 G,采用Illumina公司测序仪,使用DESeq2算法进行NCOR2敲低组和对照组的差异表达基因分析。采取矫正后 $P < 0.05$ , $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1.0$ 作为阈值筛选差异表达基因。最后,将全部差异表达基因进行GO和KEGG信号通路分析。

#### 1.10 统计学处理

以上各实验均独立重复3次。采用SPSS 27.0和GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用配对或者独立样本 $t$ 检验,多组样本均数比较采用单因素ANOVA方差分析,采用卡方检验进行表达水平与临床病理因素的关联分析,采用Pearson相关分析验证数据间的相关性。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ESCC中NCOR2基因的生存预后及临床关联性分析

通过对本课题组前期报道的155例ESCC患者的癌及癌旁组织中的转录组测序数据<sup>[8]</sup>进行分析后发现,NCOR2基因在ESCC组织中表达水平显著高于癌旁组织( $P < 0.01$ ,图1)。结合患者的生存和临床信息,采用Kaplan-Meier法分析ESCC患者NCOR2表达水平与生存预后的关联性。使用NCOR2在ESCC中表达量做ROC曲线确定其最佳临界值为64.157,将表达量大于64.157的划为高表达组( $n=52$ 例),将表达量小于64.157的划为低表达组( $n=103$ 例)。分析结果显示,NCOR2高表达患者的OS显著短于NCOR2低表达患者( $P < 0.05$ ,图2A)。然后,将临床信息中的样本进行分组,通过Kaplan-Meier法分

析发现,在无饮酒史、食管中上段癌患者中 NCOR2 高表达患者的预后均显著劣于低表达患者(均  $P < 0.05$ , 图 2B、2C)。利用卡方检验比较高表达组和低表达组与临床病理特征的关联性结果表明,NCOR2 的表达水平与患者年龄具有显著关联性(表 1)。

## 2.2 NCOR2 基因在 ESCC 细胞中的表达分析

本研究选取 6 种 ESCC 细胞 TE-1、TE-5、TE-9、KYSE150、KYSE180 和 KYSE450,通过 qPCR 方法对各细胞中 mRNA 水平表达量进行分析。结果显示,NCOR2 表达量相对较高的为 TE-1、KYSE180 和 KYSE450 细胞;NCOR2 表达量相对较低的为 TE-9 和 KYSE150 细胞(图 3A)。根据结果及细胞耐受程度选取 KYSE450 细胞进行后续的敲降实验。siRNA 转染 48 h 后通过 qPCR 法验证敲低效率,结果表明,

si-NCOR2-1 和 si-NCOR2-3 均能显著敲低 KYSE450 细胞中 NCOR2 的表达水平,敲低效率分别约为 70% 和 73%,因此选取这两组细胞进行后续功能实验。

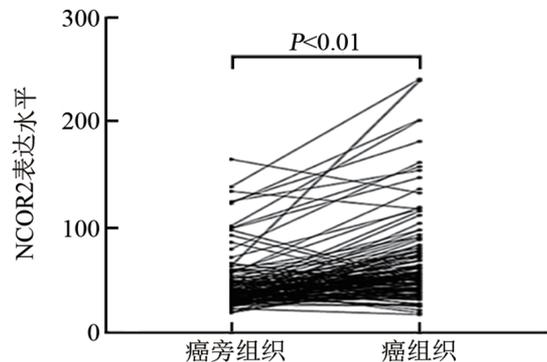
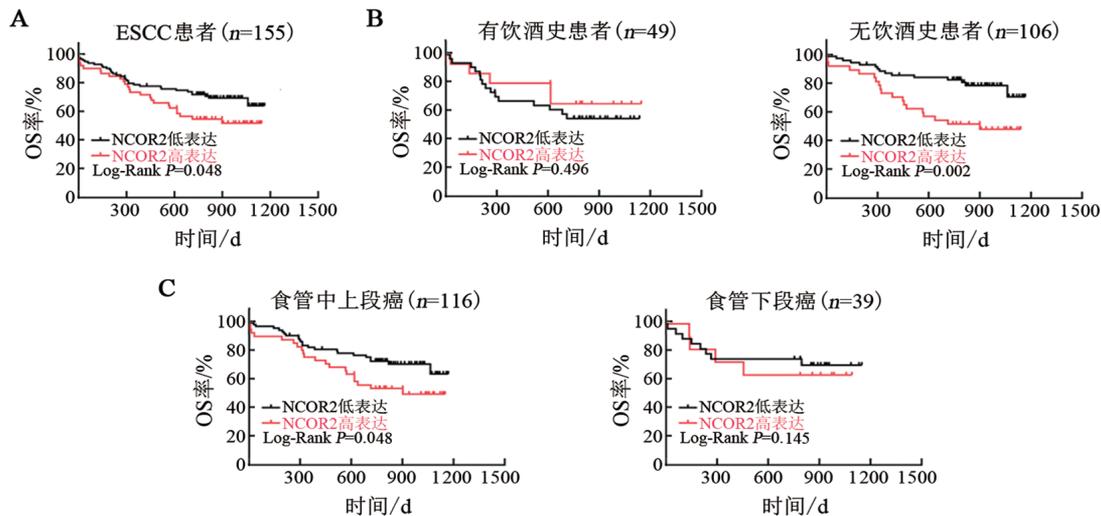


图 1 NCOR2 基因在 155 例 ESCC 患者癌与癌旁组织中表达差异分析



A: NCOR2 表达水平与 155 例 ESCC 患者的生存预后分析; B: NCOR2 表达水平与饮酒及不饮酒患者的生存预后分析; C: NCOR2 表达水平与食管中上段癌及食管下段癌患者的生存预后分析。

图 2 NCOR2 表达水平与 ESCC 患者的生存预后分析

## 2.3 NCOR2 敲低后对 KYSE450 细胞的增殖能力无显著影响

CCK-8 法检测结果(图 4A)显示,与 si-NC 组细胞相比,si-NCOR2-1 和 si-NCOR2-3 组 KYSE450 细胞的增殖活力均无显著变化(均  $P > 0.05$ )。克隆形成实验结果(图 4B)显示,两组 NCOR2 基因敲低组 KYSE450 细胞的克隆形成数目与 si-NC 组比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。实验结果表明,敲低 NCOR2 基因表达对 KYSE450 细胞的增殖能力无显著影响。

## 2.4 NCOR2 敲低后显著抑制 KYSE450 细胞的迁移和侵袭能力

细胞划痕实验结果(图 5A)显示,与 si-NC 组比较,si-NCOR2-1 组 KYSE450 细胞的划痕愈合率显著降低( $P > 0.01$ )。Transwell 实验结果(图 5B)显示,与

si-NC 组比较,si-NCOR2-1 组 KYSE450 细胞迁移和侵袭能力均显著降低(均  $P > 0.01$ )。结果表明,敲低 NCOR2 基因表达可显著抑制 KYSE450 细胞的迁移和侵袭能力。

## 2.5 NCOR2 敲低后转录组测序和差异基因富集分析

前期实验结果<sup>[8]</sup>表明,敲低 NCOR2 可以抑制 ESCC 细胞的迁移和侵袭能力。为进一步探究 NCOR2 在 ESCC 细胞中的作用机制,对 si-NCOR2 组和 si-NC 组 KYSE450 细胞进行二代转录组测序,采用 DESeq2 算法对测序数据进行差异基因表达分析,共发现 54 个下游基因发生了显著上调(包括 HIC1、CREB5、POLR2D 等)、127 个基因发生了显著下调(包括 IL6R、PRSS8、LGASL1 等)(图 6)。

GO 分析结果(图 7A)显示,NCOR2 敲低后显著

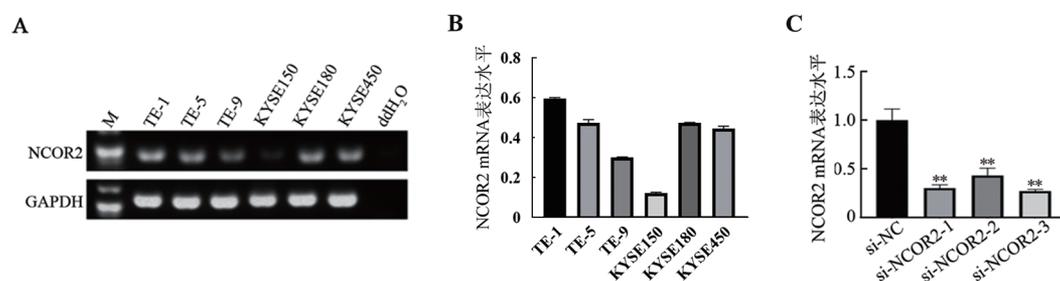
变化基因会影响染色质修饰等生物学过程、转移酶复合体等细胞结构的形成,以及穿膜信号受体活性等生物活性。KEGG 分析结果(图7B)发现,NCOR2 基因敲低会显著影响PI3K/AKT信号通路( $P=0.002$ ),此通路中多个关键基因均呈现显著下调(图6)。其中,4个基因(PIK3R3、IL4R、COL1A1、EFNA1)在155例ESCC患者癌和癌旁组织的转录组数据中与NCOR2的表达呈显著正相关,这与NCOR2敲降后的转录组测序结果相吻合(图8)。本研究结果表明,NCOR2可能通过影响PI3K/AKT信号通路促进ESCC细胞的迁移与侵袭,是一个潜在的致癌基因,可以作为ESCC的生物标志物。

### 3 讨论

ESCC 是全世界最常见的食管癌类型,每年新增的食管癌病例中约90%为该亚型<sup>[9]</sup>。在世界范围内,中国北方是亚洲的食管癌高发带,在非洲的部分地区也存在高危人群;在中国,河南、河北和山西三省交界的太行山地区属于食管癌的高发区<sup>[2]</sup>。中国食管癌患者的整体生存率较低,绝大部分患者初次诊断时即处在疾病的中晚期,5年OS率在30%左右<sup>[10]</sup>。ESCC的致病因素较为复杂,其在西方发达国家患者中主要与饮酒和吸烟有关,而在其他欠发达国家则可能与营养缺乏、亚硝胺、过烫食物的摄入等多种因素有关<sup>[11]</sup>。

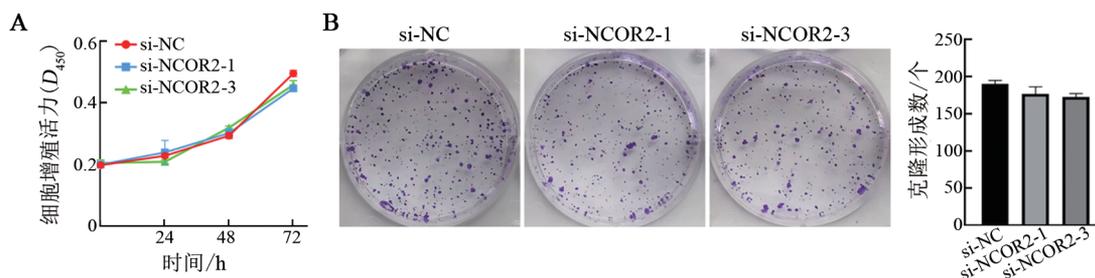
表1 NCOR2表达量与ESCC患者临床数据的关联分析

临床特征	NCOR2表达		P值
	高(n=103)	低(n=52)	
性别			
女	35	17	0.873
男	68	35	
年龄			
<60	36	27	0.042
≥60	67	25	
位置			
下段	28	11	0.262
中段	68	40	
上段	7	1	
饮酒史			
有	34	15	0.599
无	69	37	
TNM分期			
I-II	64	30	0.593
III	39	22	
Grade分级			
G1	14	8	0.913
G2	57	27	
G3	32	17	



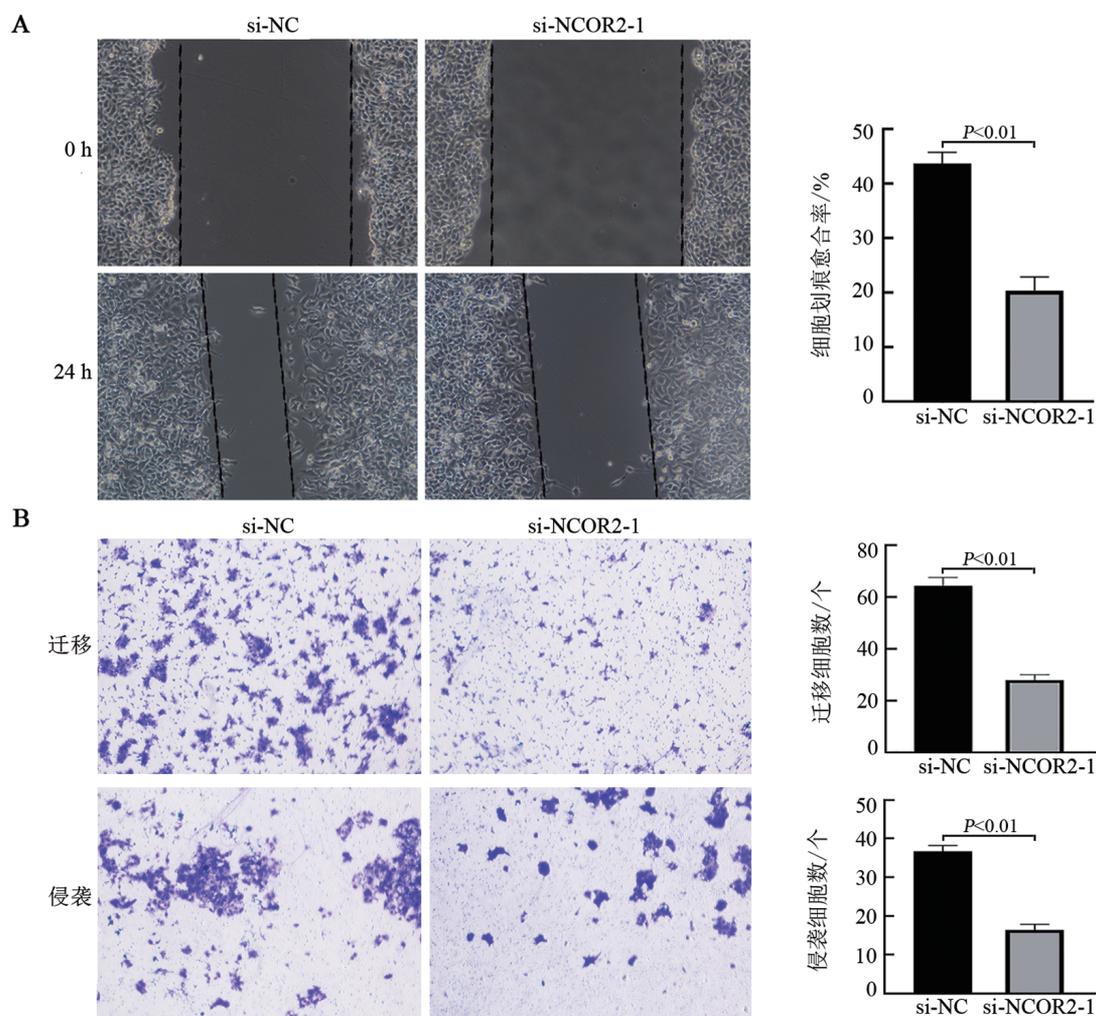
A: qPCR法检测ESCC细胞中的NCOR2 mRNA表达水平; B: qPCR法检测NCOR2 mRNA在ESCC细胞中的表达水平; C: qPCR法检测NCOR2 mRNA在KYSE450细胞中的敲减效率。与si-NC组比较, \*\* $P<0.01$ 。

图3 NCOR2在ESCC细胞中的表达分析



A: CCK-8法检测各组细胞的增殖能力; B: 克隆形成实验检测各组细胞的克隆形成能力。

图4 敲低NCOR2基因对KYSE450细胞的增殖无显著影响



A: 划痕实验检测各组细胞的划痕愈合率; B: Transwell 实验检测各组细胞的迁移和侵袭能力(结晶紫染色,  $\times 200$ )。

图5 敲低 NCOR2 基因对 KYSE450 细胞迁移和侵袭能力的影响

NCOR2 基因在神经发育和多种类型肿瘤的发生发展中发挥重要的作用<sup>[12]</sup>。NCOR2 属于转录辅阻遏物家族,在人体组织中广泛表达,它通常会被招募到含有组蛋白脱乙酰酶抑制复合物中的核和非核受体<sup>[13]</sup>,对下游基因的表达进行调控以维持系统的发育<sup>[14-15]</sup>。NCOR2 在不同类型肿瘤中的作用存在较大差异。迄今为止,对 NCOR2 在 ESCC 中的作用及其分子机制仍知之甚少,其在 ESCC 中促癌或抑癌的功能有待进一步阐明。本研究通过对 155 例 ESCC 患者癌及配对的癌旁组织中 NCOR2 表达数据进行分析发现,NCOR2 在 ESCC 组织中表达水平显著高于癌旁组织,且 NCOR2 高表达 ESCC 患者的临床预后较差。此外,本研究发现,在食管中上段癌患者中 NCOR2 高表达患者的预后显著劣于低表达患者。已有研究<sup>[16]</sup>表明,食管中上段癌患者的 T4 期肿瘤体积要显著大于病灶在下段的患者,相较于后者,前者的生存预后更差。同时,食管中段癌组织的磷酸化 PI3K 表达水平要显著高于食管下段,而磷酸化 PI3K 的高表达又与 ESCC 患者较差的预后显著相关<sup>[17]</sup>。

结合本研究结果,笔者认为在 ESCC 患者,尤其是中上段 ESCC 患者中,NCOR2 的高表达可能会促进 PI3K 的磷酸化并激活 PI3K/AKT 信号通路,从而造成患者的不良预后。

本研究在体外细胞实验中发现,与对照组细胞相比,NCOR2 敲低后显著抑制 ESCC 细胞的迁移、侵袭能力,这表明 NCOR2 在 ESCC 中发挥促癌的作用。在乳腺癌的研究<sup>[18]</sup>中发现,NCOR2 可以作为致癌因子,通过增加 SRC3 表达而影响细胞周期蛋白 D1 水平,从而促进细胞增殖。同样,在神经系统中 NCOR2 的异常表达也可促进肿瘤发生。CAMPOS 等<sup>[19]</sup>在 283 例星形细胞胶质瘤组织标本中发现,NCOR2 在细胞核中呈现高表达,并且与肿瘤细胞的增殖和分化相关。NCOR2 也可以通过脑源性神经营养因子(BDNF)/TrkB 途径调节 ERK 活化,从而加速恶性神经鞘瘤的生长<sup>[20]</sup>。虽然 NCOR2 水平升高在前列腺癌细胞中较为常见,可以促进细胞增殖<sup>[21-22]</sup>。但是, LONG 等<sup>[23]</sup>研究指出,NCOR2 的高表达有利于前列腺癌的雄激素剥夺治疗。MORI 等<sup>[24]</sup>也发现,多发性

骨髓瘤患者的NCOR2高水平表达有利于多药治疗。上述研究表明,NCOR2行使促癌基因或抑癌基因的功能与肿瘤类型和具体机制密切相关。

PI3K/AKT 信号通路是一种响应细胞外信号的胞内信号转导途径<sup>[25]</sup>。PI3K 信号的升高可以通过促进代谢、细胞增殖、细胞侵袭和血管生成,导致肿瘤的恶化<sup>[26]</sup>。当 PI3K 上游的致癌信号蛋白的活性增加时,肿瘤细胞产生大量的磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸酯,这种磷脂作为第二信使,将细胞质蛋白招募到特定的质膜或内膜位置,促进细胞代谢<sup>[27]</sup>。此外,多种类型肿瘤还同时出现肿瘤抑制因子 PTEN 功能丧失,这进一步导致了第二信使周转率的降低,使得 PI3K/AKT 通路被过度激活,加速肿瘤进程<sup>[28]</sup>。研究<sup>[29]</sup>证实,在 ESCC 中 EphB1 可以通过诱导 PI3K、p-AKT 的活性来激活 PI3K/AKT 信号通路,从而促进 ESCC 细胞 EC-9706 的迁移及侵袭。本研究中,通过转录组测序分析发现,敲低 NCOR2 后,有 40 个差异表达基因显著富集在 PI3K/AKT 信号通路,且通路关键基因 PIK3R3 发生显著下调。因此, NCOR2 可能通过影响 PI3K/AKT 信号通路来促进 ESCC 细胞的迁移和侵袭,但其深层的分子调控机制仍有待进一步研究。

综上所述,NCOR2 的表达水平与 ESCC 患者的不良预后显著相关,敲低 NCOR2 能够显著抑制 KYSE450 细胞的迁移和侵袭能力,并且可能通过 PI3K/AKT 信号通路影响 ESCC 的发生发展过程。本研究着重探讨了 NCOR2 在 ESCC 中的功能和潜在分子机制,发现了 NCOR2 对 PI3K/AKT 信号通路的影响。但另一方面,本研究对于 NCOR2 对 PI3K/AKT 通路中关键分子的调控机制尚未诠释,对 NCOR2 与 PIK3R3 等下游分子间的相互作用

机制仍有待进一步阐明。本研究为深入开发有效的 ESCC 生物标志物和发掘潜在的治疗靶点奠定了理论基础。

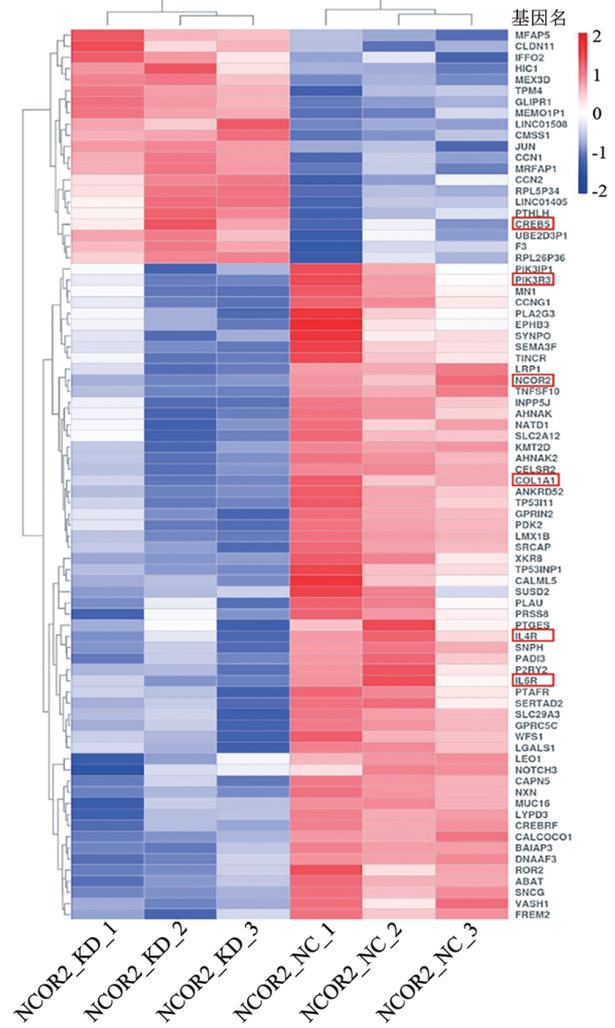
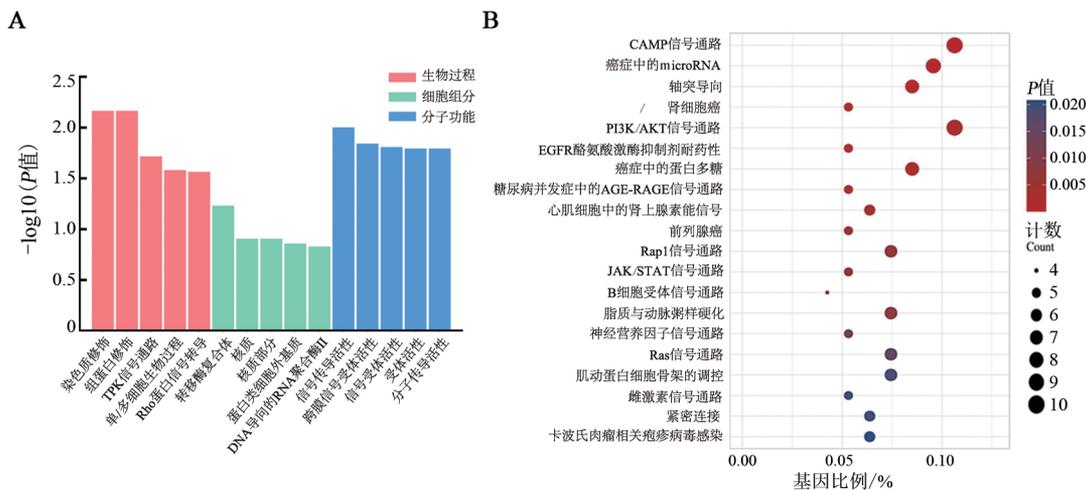
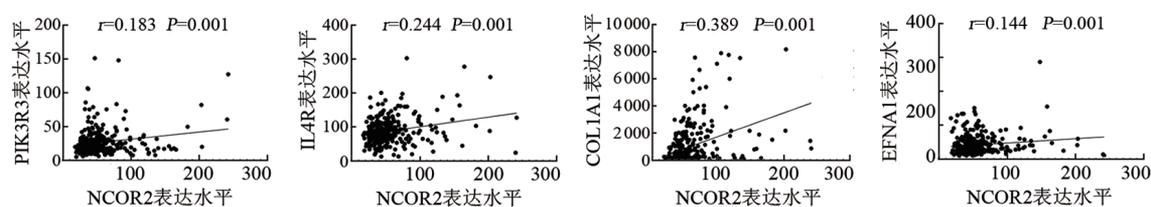


图6 NCOR2敲低后KYSE450细胞的差异基因表达谱分析



A:NCOR2敲低后的差异基因GO分析;B:NCOR2敲低后的差异基因KEGG分析。

图7 NCOR2敲低后KYSE450细胞差异基因功能富集分析



A: PIK3R3 与 NCOR2 相关性分析; B: IL4R 与 NCOR2 相关性分析; C: COL1A1 与 NCOR2 相关性分析; D: EFNA1 与 NCOR2 相关性分析。

图8 PI3K/AKT 信号通路中关键差异基因与 NCOR2 的相关性分析

## [参 考 文 献]

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] CODIPILLY D C, QIN Y, DAWSEY S M, *et al.* Screening for esophageal squamous cell carcinoma: recent advances[J]. *Gastrointest Endosc*, 2018, 88(3): 413-426. DOI: 10.1016/j.gie.2018.04.2352.
- [3] ZHANG X, WANG Y X, MENG L H. Comparative genomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma: new opportunities towards molecularly targeted therapy[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(3): 1054-1067. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.09.028.
- [4] CHEN J D, EVANS R M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors[J]. *Nature*, 1995, 377(6548): 454-457. DOI: 10.1038/377454a0.
- [5] REICHENBACH J, FRAUNGRUBER P, MAYR D, *et al.* Nuclear receptor co-repressor NCOR2 and its relation to GPER with prognostic impact in ovarian cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(11): 8719-8728. DOI: 10.1007/s00432-023-04708-z.
- [6] YAN P G, WANG Y N, MENG X C, *et al.* Whole exome sequencing of ulcerative colitis-associated colorectal cancer based on novel somatic mutations identified in Chinese patients[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(8): 1293-1301. DOI: 10.1093/ibd/izz020.
- [7] LEE R D, KNUTSON T P, MUNRO S A, *et al.* Nuclear corepressors NCOR1/NCOR2 regulate B cell development, maintain genomic integrity and prevent transformation[J/OL]. *Nat Immunol*, 2022, 23(12): 1763-1776[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9772092/>. DOI: 10.1038/s41590-022-01343-7.
- [8] LIU Z H, ZHAO Y H, KONG P Z, *et al.* Integrated multi-omics profiling yields a clinically relevant molecular classification for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(1): 181-195. e9. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.12.004. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.12.004.
- [9] SHUAI S M, SUZUKI H, DIAZ-NAVARRO A, *et al.* The U1 spliceosomal RNA is recurrently mutated in multiple cancers[J/OL]. *Nature*, 2019, 574(7780): 712-716[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/26781813/>. DOI: 10.1038/s41586-019-1651-z.
- [10] ORAZBAYEV B A, MUSULMANBEKOV K, BUKENOV A. Analysis of treatment results of the thoracic part of oesophageal cancer[J/OL]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 7(1): 82-87[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6352489/>. DOI: 10.3889/oamjms.2019.023.
- [11] ABNET C C, ARNOLD M, WEI W Q. Epidemiology of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(2): 360-373. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.08.023.
- [12] TSAI K K, HUANG S S, NORTHEY J J, *et al.* Screening of organoids derived from patients with breast cancer implicates the repressor NCOR2 in cytotoxic stress response and antitumor immunity[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(6): 734-752. DOI: 10.1038/s43018-022-00375-0.
- [13] JIANG Q, GALIÈGUE-ZOUITINA S, ROUMIER C, *et al.* Genomic organization and refined mapping of the human nuclear corepressor 2 (NCOR2)/silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor (SMRT) gene on chromosome 12q24.3[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2001, 92(3/4): 217-220. DOI: 10.1159/000056906.
- [14] CODINA A, LOVE J D, LI Y, *et al.* Structural insights into the interaction and activation of histone deacetylase 3 by nuclear receptor corepressors[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(17): 6009-6014[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1087922/>. DOI: 10.1073/pnas.0500299102.
- [15] JEPSEN K, GLEIBERMAN A S, SHI C, *et al.* Cooperative regulation in development by SMRT and FOXP1[J/OL]. *Genes Dev*, 2008, 22(6): 740-745[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2275427/>. DOI: 10.1101/gad.1637108.
- [16] KATO H, TACHIMORI Y, WATANABE H, *et al.* Thoracic esophageal carcinoma above the carina: a more formidable adversary?[J]. *J Surg Oncol*, 1997, 65(1): 28-33. DOI: 10.1002/(sici)1096-9098(199705)65:1<28:aid-jso6>3.0.co;2-q.
- [17] WANG B, LI M Y, SU A N, *et al.* Prognostic value of GPNMB, EGFR, p-PI3K, and ki-67 in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Anal Cell Pathol*, 2022, 2022: 9303081[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9452951/>. DOI: 10.1155/2022/9303081.
- [18] KARMAKAR S, GAO T, PACE M C, *et al.* Cooperative activation of cyclin D1 and progesterone receptor gene expression by the SRC-3 coactivator and SMRT corepressor[J/OL]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(6): 1187-1202[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2875800/>. DOI: 10.1210/me.2009-0480.
- [19] CAMPOS B, BERMEJO J L, HAN L, *et al.* Expression of nuclear receptor corepressors and class I histone deacetylases in astrocytic gliomas[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(2): 387-392. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01792.x.
- [20] LI Y H, CHUNG M, AIMAIER R, *et al.* Knockdown of NCOR2 inhibits cell proliferation *via* BDNF/TrkB/ERK in NF1-derived MPNSTs[J/OL]. *Cancers*, 2022, 14(23): 5798[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9738545/>. DOI: 10.3390/

- cancers14235798.
- [21] KHANIM F L, GOMMERSALL L M, WOOD V H, *et al.* Altered SMRT levels disrupt vitamin D3 receptor signalling in prostate cancer cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(40): 6712-6725. DOI: 10.1038/sj.onc.1207772.
- [22] ABEDIN S A, BANWELL C M, COLSTON K W, *et al.* Epigenetic corruption of VDR signalling in malignancy[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(4A): 2557-2566.
- [23] LONG M D, JACOBI J J, SINGH P K, *et al.* Reduced NCOR2 expression accelerates androgen deprivation therapy failure in prostate cancer[J/OL]. *Cell Rep*, 2021, 37(11): 110109[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8889623/>. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.110109.
- [24] MORI T, VERMA R, NAKAMOTO-MATSUBARA R, *et al.* Low NCOR2 levels in multiple myeloma patients drive multidrug resistance *via* MYC upregulation[J/OL]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(12): 194[2023-10-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8643354/>. DOI: 10.1038/s41408-021-00589-y.
- [25] TEWARI D, PATNI P, BISHAYEE A, *et al.* Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: a novel therapeutic strategy[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 80: 1-17. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.12.008.
- [26] 何锋, 狐鸣, 冯世林, 等. 银杏内酯B通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制胃癌HGC-27细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(10): 874-880. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2023.10.004.
- [27] ERAMO M J, MITCHELL C A. Regulation of PtdIns(3,4,5)P3/Akt signalling by inositol polyphosphate 5-phosphatases[J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44(1): 240-252. DOI: 10.1042/BST20150214.
- [28] PAPA A, PANDOLFI P P. The PTEN-PI3K axis in cancer[J/OL]. *Biomolecules*, 2019, 9(4): 153[2023-10-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30999672/>. DOI: 10.3390/biom9040153.
- [29] 张键, 康敏. EphB1通过PI3K/AKT信号通路促进食管鳞状细胞癌EC-9706细胞增殖、迁移、侵袭并抑制其凋亡[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(24): 4445-4453. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2022.24.006.
- [收稿日期] 2023-10-19 [修回日期] 2024-02-27  
[本文编辑] 党瑞山