

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.06.005

连接蛋白4/泛酸酯酶1轴对食管鳞状细胞癌细胞恶性生物学行为的影响及其机制

龙元凤^{1,2}, 邓钰滨^{1,2}, 杨航^{1,3}, 张若兰¹, 杨蜜¹, 宋桂芹³, 刘康^{1,2} (1. 首都医科大学附属北京安贞医院南充医院南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院 组织工程与干细胞研究所, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院 检验医学院, 四川 南充 637000; 3. 川北医学院 基础医学与法医学院, 四川 南充 637100)

[摘要] **目的:** 探究连接蛋白4/泛酸酯酶1轴在食管鳞状细胞癌(ESCC)中的表达和其对ESCC细胞恶性生物学行为的影响及机制。**方法:** 转录组测序结合GO和KEGG富集分析筛选出连接蛋白4调控下游靶基因泛酸酯酶1, 用数据库Timer2.0分析泛酸酯酶1 mRNA在ESCC组织中的表达, 并用qPCR和WB法检测正常食管上皮细胞HET-1和ESCC细胞中泛酸酯酶1 mRNA和蛋白的表达, 筛选出表达差异最为显著的ESCC KYSE-410和KYSE-510细胞。用siRNA敲减KYSE-410和KYSE-510细胞中泛酸酯酶1的表达, 用CCK-8法、划痕愈合实验和Transwell小室实验检测敲减泛酸酯酶1表达对细胞增殖、迁移和侵袭的影响。此外, 对泛酸酯酶1相关信号通路进行KEGG和GO富集分析, 并采用免疫组化法比较泛酸酯酶1在ESCC组织和癌旁组织中的表达差异。**结果:** Timer2.0数据库数据分析和qPCR法检测结果显示, 泛酸酯酶1在ESCC组织和细胞中呈高表达(均 $P < 0.01$)。WB法检测结果显示, 泛酸酯酶1蛋白在ESCC细胞中高表达($P < 0.01$)。siRNA成功敲减了KYSE-410和KYSE-510细胞中泛酸酯酶1的表达。敲减泛酸酯酶1能显著抑制KYSE-410和KYSE-510细胞的增殖、迁移和侵袭能力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。KEGG和GO富集分析提示泛酸酯酶1可能通过参与泛酸和辅酶A的合成代谢途径发挥作用。免疫组化法检测结果显示, 泛酸酯酶1在ESCC组织中呈高表达($P < 0.0001$)。**结论:** 泛酸酯酶1在ESCC组织中呈高表达, 通过连接蛋白4/泛酸酯酶1轴促进KYSE-410和KYSE-510细胞增殖、迁移和侵袭能力。靶向抑制泛酸酯酶1可能为ESCC的治疗提供新的思路。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; 连接蛋白4; 泛酸酯酶1; 迁移; 侵袭; 增殖

[中图分类号] R735.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)06-0594-10

The effect of nectin-4/vanin-1 regulatory axis on the development of esophageal squamous carcinoma and the preliminary investigation of the mechanism

LONG Yuanfeng^{1,2}, DENG Yubin^{1,2}, YANG Hang^{1,3}, ZHANG Ruolan¹, YANG Mi¹, SONG Guiqin³, LIU Kang^{1,2} (1. Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, Beijing Anzhen Hospital Capital Medical University, Nanchong Hospital [Nanchong Central Hospital, The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College], Nanchong 637000, Sichuan, China; 2. School of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China; 3. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of nectin-4 and vanin-1 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its influence on the malignant biological behaviors of ESCC cells, as well as the underlying mechanisms. **Methods:** Transcriptome sequencing combined with GO and KEGG enrichment analysis was used to identify the downstream target gene (vanin-1) regulated by nectin-4. The mRNA expression of vanin-1 in ESCC tissues was studied using the Timer2.0 database, and the mRNA and protein expression of vanin-1 in normal esophageal epithelial HET-1 and ESCC cells was detected by qPCR and Western blot, identifying ESCC KYSE-410 and KYSE-510 cells with the most significant differential expression. The expression of vanin-1 in KYSE-410 and KYSE-510 cells was knocked down using siRNA. The effects of vanin-1 knockdown on cell proliferation, migration, and invasion were measured using CCK-8 assay, wound healing assay, and Transwell chamber assay. Furthermore, KEGG and GO enrichment analyses were conducted for vanin-1-related signaling pathways. Immunohistochemistry was performed to compare the expression of vanin-1 between ESCC tissues and adjacent non-tumor tissues. **Results:** Timer2.0 database analysis and qPCR results showed that vanin-1 was

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 82203851); 四川省自然科学基金(No. 023NSFSC0731); 南充市市校合作项目(No.22SXQT0336, No.20SXQT0328); 南充市基础研究平台项目(No.23JCYJPT0027); 四川省科技厅苗子工程(No.MZGC20240072, No.MZGC20240071)

[作者简介] 龙元凤(1999—), 女, 硕士生, 初级检验技师, 主要从事肿瘤发生发展分子机制的研究

[通信作者] 刘康; 宋桂芹(扫码获取作者联系方式)



highly expressed in both ESCC tissues and cell lines (both $P < 0.01$). WB assay also confirmed high expression of vanin-1 protein in ESCC cells ($P < 0.01$). siRNA successfully knocked down vanin-1 expression in KYSE-410 and KYSE-510 cells. Knockdown of vanin-1 significantly inhibited the proliferation, migration, and invasion capabilities of KYSE-410 and KYSE-510 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ or $P < 0.001$ or $P < 0.000 1$). KEGG and GO enrichment analysis suggested that vanin-1 might function through pathways related to pantothenic acid and coenzyme A synthesis metabolism. Immunohistochemistry results indicated that vanin-1 was highly expressed in ESCC tissues ($P < 0.000 1$). **Conclusion:** Vanin-1 is highly expressed in ESCC tissues and promotes the proliferation, migration, and invasion of KYSE-410 and KYSE-510 cells through the nectin-4/vanin-1 axis. Targeting vanin-1 might offer a new therapeutic strategy for ESCC.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); nectin-4; vanin-1; migration; invasion; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(6): 594-603. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.06.005]

食管癌(esophageal cancer, EC)是一种常见的恶性肿瘤,其全球发病率和病死率分别为6.5%和5.65%^[1-3]。尽管目前采用放化疗作为主要治疗方案,但患者的5年生存率仍然较低,仅为6.7%~18%^[4-5]。临床上,EC可分为食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, ESCA)和食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)两种类型。先前研究^[6-7]发现,连接蛋白4作为Ca²⁺独立的IgG样分子连接蛋白家族成员之一,在尿路上皮癌和膀胱癌等多种肿瘤中异常表达,导致肿瘤的发生,但连接蛋白在EC中的分子机制仍不清楚。因此,寻找连接蛋白下游的调控机制具有重大意义。根据转录组测序结果筛选出的连接蛋白4下游调节分子泛酸酯酶1是一种具有丝氨酸酯酶活性的细胞膜酶^[8-9]。一方面,它催化泛酸脂脱酯化反应,参与泛酸和辅酶A的合成^[10];另一方面,作为GPI锚定蛋白,泛酸酯酶1参与调节多种代谢和肿瘤发生^[11-12],但泛酸酯酶1在EC中的作用及其机制尚未得到充分研究。本研究利用ESCC细胞KYSE-410和KYSE-510,通过siRNA敲低泛酸酯酶1表达,探究其对ESCC细胞恶性特征的影响。富集分析发现泛酸酯酶1参与泛酸和辅酶A合成代谢途径。本研究有助于理解ESCC的分子机制,并可能为治疗提供潜在的新靶点。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞及主要试剂

收集2018年11月至2019年3月在南充市中心医院胸外科手术切除的40例ESCC患者的癌组织及其对应癌旁组织。所有患者均充分知情并签署了知情同意书,本研究方案获得本医院伦理委员会批准[批准号:2019年审(095)号]。

人食管上皮细胞HET-1A购自上海名劲生物,ESCC KYSE-30、KYSE-410细胞购自湖南丰晖生物科技有限公司,KYSE-150、TE-1获取自上海中国科学院细胞资源中心,KYSE-510采购自武汉尚恩生物科技有限公司。细胞培养主要试剂RPMI 1640培养基、胎牛血清和胰酶均购自Gibco公司, FastPure Cell/Tissue Total RNA

Isolation Kit、HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit和SYBR Green Master Mix均购自南京诺维赞公司,转染试剂Lipofectamine™2000购自赛默飞公司, RNAi和慢病毒序列合成于上海吉玛制药技术有限公司,其相关序列如下: si-NC和Sh-NC:正向引物为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反向引物为5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3';sh-连接蛋白4#1正向引物为5'-ATTGGCAGAGAAGGAGCTATG-3'; si-泛酸酯酶1#1正向引物为5'-GAGGAGGCUUUGGCAUUAATT-3';反向引物为5'-UUAAUGCCA AAGCCUCCUCTT-3'; si-泛酸酯酶1#2:正向引物为5'-GGACCUGUCUUAACAGUAATT-3';反向引物为5'-UUACUGUUAAGACAGGUCCTT-3'。CCK-8法检测试剂盒购自南京凯基生物,Transwell小室购自美国Corning公司,泛酸酯酶1、GAPDH抗体及二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司,免疫组化相关试剂盒购自福州迈新生物,DAB显色剂和蛋白显色试剂购自Millipore公司。qPCR引物由上海生工科技有限公司合成,其引物序列如下,连接蛋白4正向引物为5'-ATA CAACTGGACACGGCTGG-3',反向引物为5'-CCT GGGGGTCAAGAATCC-3'; GAPDH正向引物为5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3',反向引物为5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3';泛酸酯酶1正向引物为5'-GACCCCAGTACAAGAAAGACTCA-3',反向引物为5'-TCA GGCTCCTTGGGTACATTG-3'。

1.2 用数据库在线分析EC与正常食管组织中基因表达差异及临床意义

利用在线数据分析网站Timer2.0(<http://cistrome.org>)、UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu>)和KM plotter(<https://kmplot.com/>)比较连接蛋白4和泛酸酯酶1在EC组织与正常食管组织中的表达差异,并分析泛酸酯酶1的临床相关性和生存预后。

1.3 转录组测序分析筛选连接蛋白4下游靶基因

KYSE-510细胞感染针对敲低连接蛋白4的慢病毒48 h后,从sh-NC和sh-连接蛋白4处理的KYSE-510细胞中提取RNA,使用Illumina平台进行

转录组测序。通过比较 sh-NC 组和 sh-连接蛋白 4 组处理后的转录组数据,筛选下游靶基因。

1.4 GO 和 KEGG 富集分析泛酸酯酶 1 在 ESCC 中参与的关键生物过程和信号通路

使用 R 语言 ClusterProfiler 包对 KEGG 信号通路和 GO 功能进行富集分析。根据 $\log_2FC \leq -1.5$ 和 $P \leq 0.01$ 的标准筛选下调基因,并对显著富集的 KEGG 条目进行柱状图可视化,探讨这些差异表达基因在 ESCC 发生发展中所参与的关键生物过程和信号通路。

1.5 细胞培养、细胞转染或感染

人食管上皮细胞 HET-1A 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基,ESCC KYSE-410 和 KYSE-510 细胞用 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。细胞消化后离心,重悬并转移至 6 孔板继续培养。当细胞汇合度达 30%~50% 时,按 siRNA 转染标准流程进行转染。为敲减连接蛋白 4,使用携带 sh-连接蛋白 4#1 和 sh-连接蛋白 4#2 序列的慢病毒感染 KYSE-510 细胞,24 h 后更换含 10% FBS 新鲜培养基,72 h 后加入 2.5 μg/mL 嘌呤霉素筛选 1 周,获得连接蛋白 4 稳定下调的 KYSE-510 细胞,随后培养 1×10^6 个细胞用于转录组测序。为敲减泛酸酯酶 1,使用 si-泛酸酯酶 1#1、si-泛酸酯酶 1#2 及 si-NC 转染 KYSE-410 和 KYSE-510 细胞,转染后 48 h 和 72 h,分别通过 qPCR 和 WB 法检测 siRNA 转染效率。

1.6 qPCR 法检测各组 ESCC 细胞中连接蛋白 4 和泛酸酯酶 1 的 mRNA 表达水平

转染 48 h 后提取细胞总 RNA,逆转录制备 cDNA。使用 SYBR Green Master Mix 及特异性引物对连接蛋白 4 和泛酸酯酶 1 进行定量 PCR 扩增。qPCR 反应条件:95 °C 预变性 3 min,95 °C 30 s,60 °C 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算连接蛋白 4 和泛酸酯酶 1 mRNA 的相对表达量。

1.7 WB 法检测 ESCC 细胞中泛酸酯酶 1 蛋白表达

使用含 PMSF 溶液和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液提取各组细胞的总蛋白质,10% SDS-PAGE 分离目标蛋白后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h,抗泛酸酯酶 1(稀释比例 1:1 000)、GAPDH(稀释比例 1:10 000)抗体 4 °C 下处理过夜。PBST 清洗 5 min × 4,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体室温下处理 1 h,用 ECL 化学发光液显色及成像系统进行成像,Image J 软件分析图像灰度量化蛋白表达水平。

1.8 CCK-8 法及细胞平板克隆检测敲减泛酸酯酶 1 对 ESCC 细胞增殖能力的影响

CCK-8 实验: KYSE-410 和 KYSE-510 细胞转染 48 h 后,以 4×10^3 细胞/孔密度接种于 96 孔板。在 0、24、48、72 及 96 h,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,继续培养 1 h,用酶标仪检测各孔在 450 nm 处的光密度 (*D*) 值,以 *D* 值代表细胞的增殖能力。每个时间点设置 3 个复孔。

平板克隆实验: 转染 48 h 后的 1×10^3 个细胞接种于 6 孔板中,培养 10 d 后用 4% 甲醛溶液固定 60 min,0.1% 结晶紫溶液染色 3 min,显微镜下观察、照相并统计克隆形成情况。

1.9 Transwell 小室实验检测敲减泛酸酯酶 1 对 ESCC 细胞迁移与侵袭能力的影响

KYSE-410 和 KYSE-510 细胞转染 48 h 后,经消化、离心、洗涤,用无血清培养基悬浮细胞使其密度至 5×10^4 个/mL,在 Transwell 上室加入 200 μL 细胞悬液,下室加入含 10% FBS 的培养基 600 μL。48 h 后,4% 甲醛溶液固定 1 h,0.1% 结晶紫染色 10 min,湿棉签清除未迁移细胞,盐水冲洗 2 次,光镜下观察、拍照、计数。在侵袭实验中,在 Transwell 上室预涂基质胶,细胞悬液密度增至 9×10^5 个/mL,每孔加入 100 μL 的细胞悬液,其余步骤与迁移实验相同。

1.10 划痕愈合实验检测敲低泛酸酯酶 1 对 ESCC 细胞迁移能力的影响

KYSE-410 和 KYSE-510 细胞转染 48 h 接种于 6 孔板中,至汇合度达 80% 时,每孔用移液吸头尖制作均匀划痕,PBS 冲洗漂浮细胞,在 0、24 h 时用倒置显微镜拍摄划痕区域。划痕愈合率 = [(0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度] × 100%,评估细胞迁移的能力。

1.11 免疫组织化学法检测泛酸酯酶 1 蛋白在 ESCC 组织的表达

石蜡包埋 ESCC 组织经切片、脱蜡复水、抗原修复、去内源性过氧化物酶和封闭后,经泛酸酯酶 1 抗体和 HRP 标记二抗体处理,最后 DAB 显色。免疫组织化学染色结果由两位病理学家独立评估。评分细则如下:阳性细胞比例按 0 分(无阳性细胞)、1 分(0~≤ 10% 阳性细胞)、2 分(>10~≤ 35% 阳性细胞)、3 分(>35~≤ 75% 阳性细胞)、4 分(> 75% 阳性细胞)进行评分;染色强度按 1 分(无染色)、2 分(呈浅黄色)、3 分(呈黄色)、4 分(呈黄褐色)、5 分(呈褐色)进行评分。综合评分 = 阳性细胞比例评分 + 染色强度评分^[13]。

1.12 统计学处理

所有实验至少独立重复 3 次。使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析和绘图。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较使用单因素方差分析 (ANOVA)。以

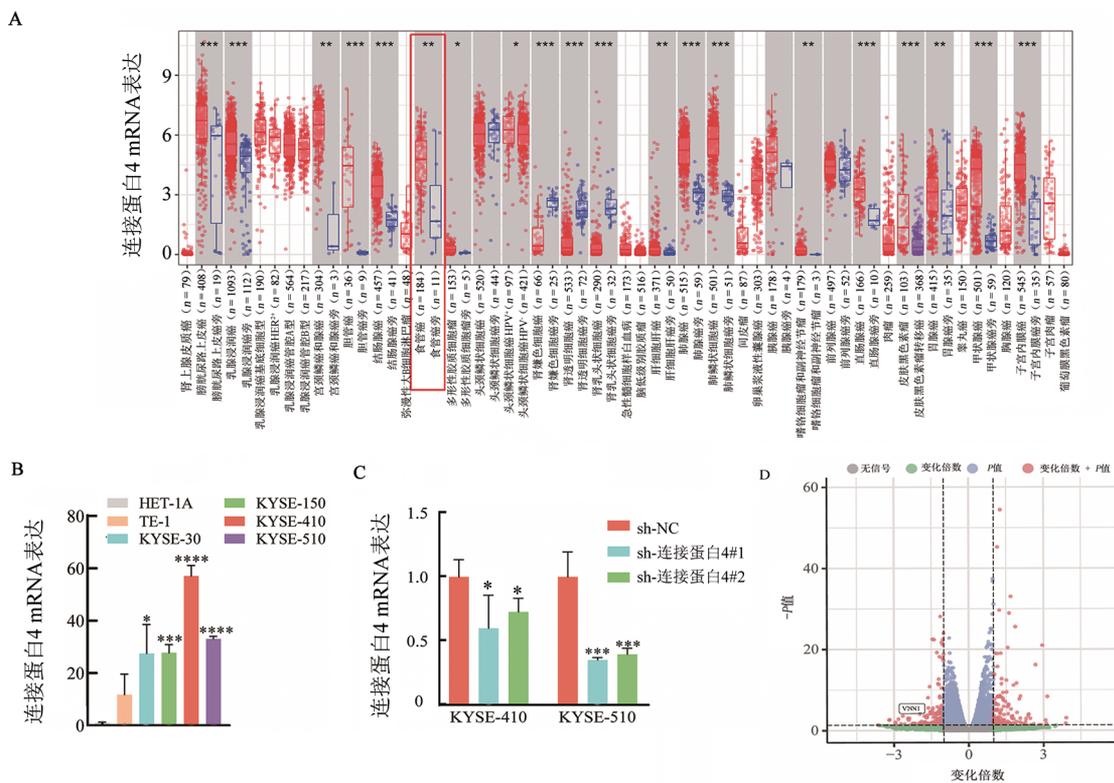
$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转录组测序筛选出泛酸酯酶1是连接蛋白4下游靶基因

通过 Timer2.0 在线数据库数据分析结果(图 1A)显示,连接蛋白4 mRNA 在 EC 组织中的表达水平明显高于正常食管组织($P < 0.01$)。qPCR 法检测结果(图 1B)显示,连接蛋白4 mRNA 在 ESCC 细胞中的表达水平也明显高于正常食管上皮细胞 HET-1A ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。课题组前期已研究连接蛋白4在 ESCC 中的发生发展及分子机制^[14],本研究重点为连接蛋白4的下游靶基因。本研究设计并构建了敲减连接蛋白4表达的慢病毒感染 KYSE-410 和 KYSE-510 细胞,qPCR 法检测结果(图 1C)显示,在 KYSE-510 和 KYSE-410 细胞中均显著敲减了连接蛋白 mRNA 的表达水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),由于在 KYSE-510 细胞中敲减 mRNA 表达更为明显,且在实验操作上更稳定,易于培养和感染,故选用敲减连接蛋白4的 KYSE-510 细胞进行转

录组测序。在本研究的转录组测序分析(图 1D)中,以 $\log_2FC \leq -1.5$ 和 $P \leq 0.01$ 的基因认为是敲减连接蛋白4后的下调基因,这些基因与 TCGA-EC 数据库中高表达的基因取交集,筛选出潜在的下游靶基因为泛酸酯酶1、CCL28 和 PLEKHS1(图 2A)。qPCR 法验证了这3个基因在 HET-1A 和 ESCC 细胞中 mRNA 表达水平,结果(图 2B)显示,在 ESCC 细胞中泛酸酯酶1 mRNA 表达量最高。然后,本研究敲减连接蛋白4后用 qPCR 法验证下游泛酸酯酶1的 mRNA 表达水平,结果(2C)显示,敲减连接蛋白4后泛酸酯酶1表达水平降低,实验结果表明,连接蛋白4对下游泛酸酯酶1表达具有调控。考虑到泛酸酯酶1在癌症中的研究相对较少,认为其在 EC 的发生发展中可能具有重要意义,因此选择泛酸酯酶1作为实验研究的重点。为了进一步探索泛酸酯酶1在 EC 中的作用机制,本研究对转录组测序结果进行了 KEGG 富集分析和 GO 分析,结果(图 2D、E)显示,泛酸酯酶1可能通过促进泛酸和辅酶 A 合成这一代谢途径,在 EC 的发生发展中发挥重要作用。



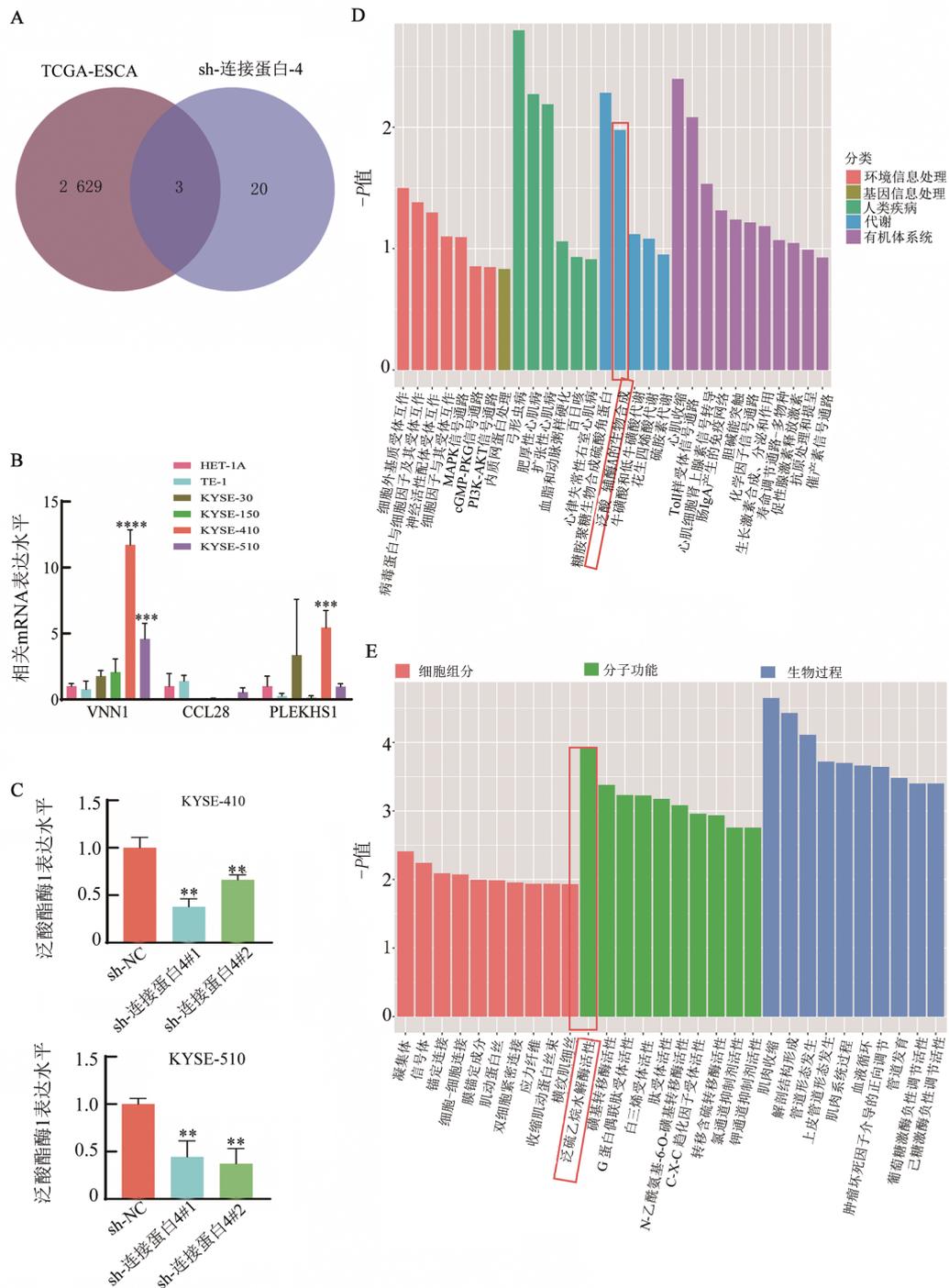
A: Timer2.0 在线数据库探索连接蛋白4在正常食管组织和 EC 组织中的表达水平; B: qPCR 法检测连接蛋白4 mRNA 在 HET-1A 细胞和 ESCC 细胞中的表达水平; C: qPCR 法检测 KYSE-510 细胞和 KYSE-410 细胞中慢病毒敲减连接蛋白4的效率; D: 在 KYSE-510 细胞中敲减连接蛋白4后的转录组测序结果火山图。与癌旁组织或 HET-1A 细胞或 sh-NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图1 连接蛋白4在 EC 组织和 ESCC 细胞中的表达及敲减连接蛋白4后转录组测序

2.2 在 KYSE-510 和 KYSE-410 细胞中成功地敲减泛酸酯酶 1 的表达

qPCR 和 WB 法检测结果 (图 3A~D) 显示, 与 si-NC 组相比, si-泛酸酯酶 1#1 和 si-泛酸酯酶 1#2 组

ESCC 细胞中泛酸酯酶 1 mRNA 和蛋白水平均有显著下降 (均 $P < 0.01$)。实验结果表明, 本研究在 KYSE-510 和 KYSE-410 细胞中成功地敲减泛酸酯酶 1 的表达。



A:TCGA 数据库中 EC 组织中上调基因与敲减连接蛋白 4 后转录组测序下调基因取交集的韦恩图;B:qPCR 法检测泛酸酯酶 1、CCL28 和 PLEKHS1 mRNA 在 ESCC 和 HET-1A 胞中 mRNA 表达水平;C:qPCR 法检测在 KYSE-510 和 KYSE-410 细胞中敲低连接蛋白 4 对其中泛酸酯酶 1 mRNA 表达水平的影响;D:KEGG 富集分析结果;E:GO 富集分析结果。与 HET-1A 细胞或 NC 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

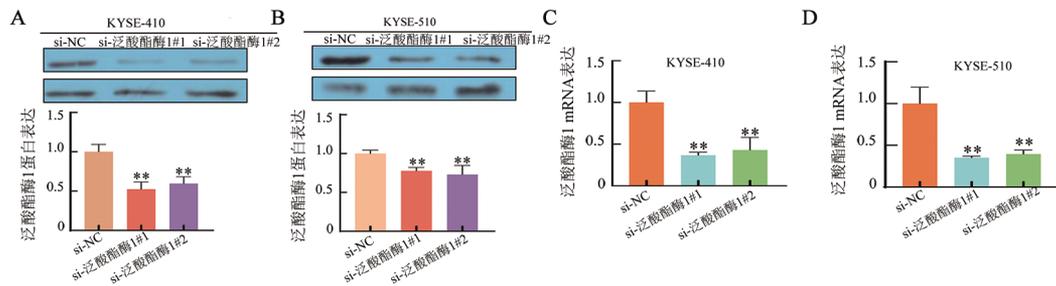
图 2 在 KYSE-510 细胞中敲减连接蛋白 4 后转录组测序结果中筛选出下游靶基因泛酸酯酶 1

2.3 泛酸酯酶 1 促进 KYSE410 和 KYSE-510C 细胞的增殖能力

平板克隆实验检测结果 (图 4A、B) 显示, 与 si-NC 组比较, si-泛酸酯酶 1#1 和 si-泛酸酯酶 1#2 组

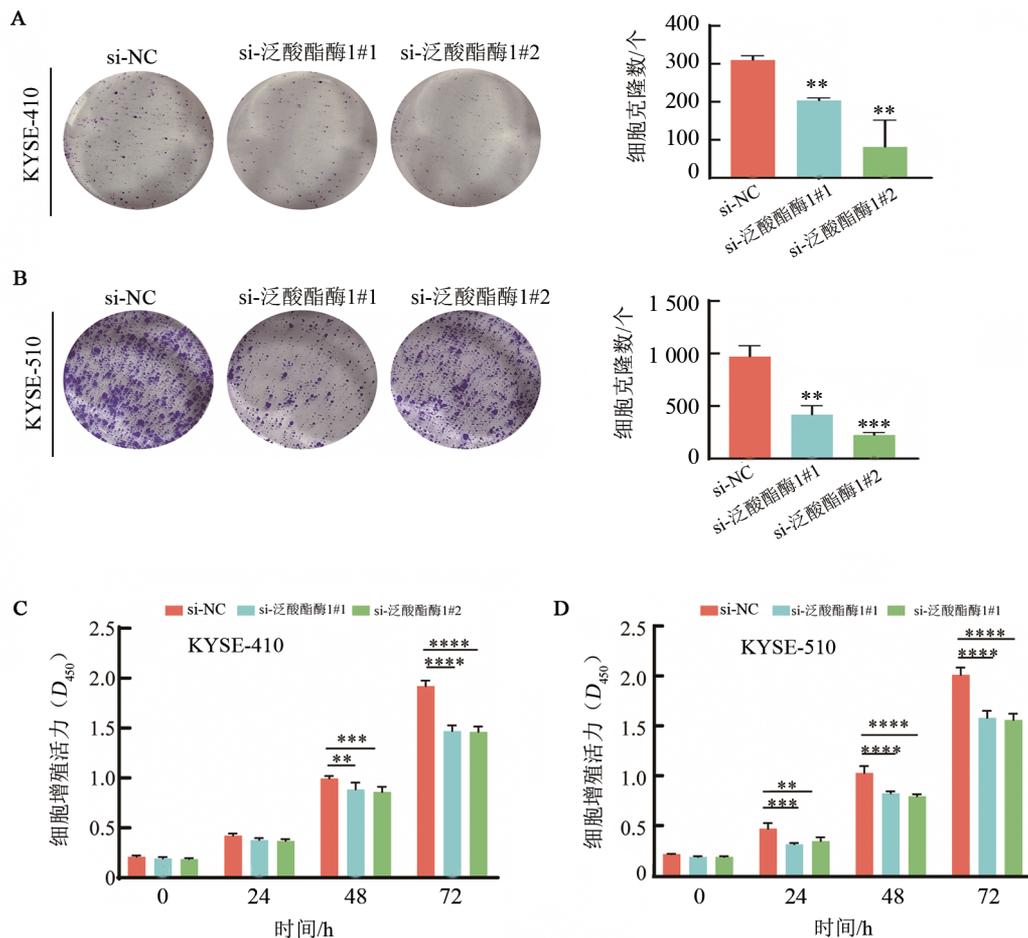
KYSE-410和KYSE-510细胞的克隆形成能力均显著下降(均 $P < 0.001$)。CCK-8 法检测结果(图4C~D)显示,与 si-NC 组比较, si-泛酸酯酶 1#1 和 si-泛酸酯酶 1#2 组 KYSE-410 和 KYSE-510 细胞的

增殖能力均显著下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。实验结果表明,敲减泛酸酯酶 1 可显著抑制 KYSE-410 和 KYSE-510 细胞的增殖能力,泛酸酯酶 1 在 ESCC 细胞增殖中可能扮演重要角色。



A、B:qPCR法检测各组KYSE-410和KYSE-510细胞中泛酸酯酶1 mRNA的表达;C、D:WB法检测各组KYSE-410和KYSE-510细胞中泛酸酯酶1蛋白的表达。与 si-NC 组比较, $*P < 0.01$ 。

图3 qPCR和WB法检测各组KYSE-410和KYSE-510细胞中泛酸酯酶1 mRNA和蛋白的表达



A、B:平板克隆实验检测敲减泛酸酯酶1对KYSE-410和KYSE-510细胞克隆形成能力的影响($\times 40$);C、D:CCK-8法检测敲减泛酸酯酶1对KYSE-410和KYSE-510的增殖能力的影响。与 si-NC 组比较, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ 。

图4 敲减泛酸酯酶1对KYSE-410和KYSE-510细胞增殖能力的影响

2.4 敲减泛酸酯酶1可明显抑制KYSE-410和KYSE-510细胞的迁移和侵袭能力

Transwell实验检测结果(图5A)显示,与 si-NC 组相比,泛酸酯酶1敲低组KYSE-410和KYSE-510细胞的迁

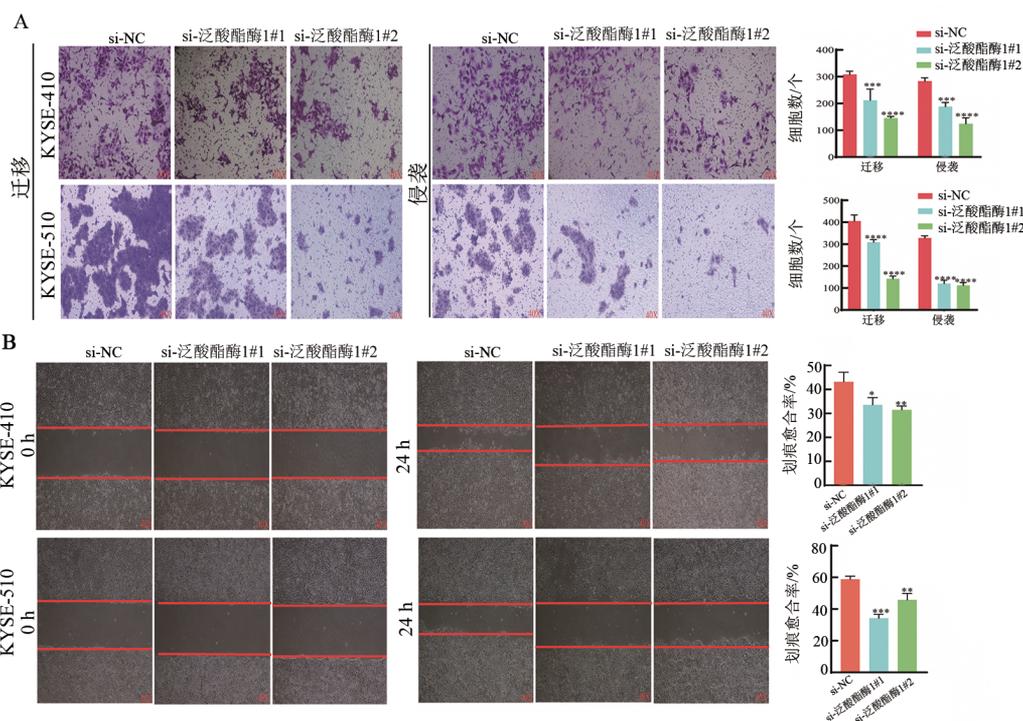
移和侵袭能力均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.0001$)。划痕愈合实验检测结果(图5B)显示,与 si-NC 组相比,敲减组KYSE-410和KYSE-510细胞的划痕愈合能力均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。实验结

果表明,敲减泛酸酯酶 1 能显著抑制 KYSE-410 和 KYSE-510 细胞的迁移和侵袭能力。

2.5 泛酸酯酶 1 在 ESCC 组织中呈高表达,并与多种患者的性别、肿瘤的分期、分级有关联

免疫组化法检测结果(图 6A~C)显示,与癌旁组织比较,ESCC 组织中泛酸酯酶 1 蛋白染色明显增强 ($P < 0.0001$)。阳性染色主要定位于细胞膜。Timer2.0 数据库在线分析(图 6D)显示,与癌旁组织比较,泛酸酯酶 1 在 EC 组织中呈高表达。UALCAN

数据库分析显示,泛酸酯酶 1 的表达水平与肿瘤分期(图 6E)、部分肿瘤分级(图 6F)以及患者性别(图 6G)有关联($P < 0.5, P < 0.01, P < 0.001, P < 0.0001$)。然而,根据 KM plotter 在线数据库的生存分析(图 6H、I)显示,泛酸酯酶 1 表达水平与 EC 患者的总生存期(OS)和无病生存期(DFS)无显著关联。实验结果表明,泛酸酯酶 1 在 ESCC 组织中呈高表达,并与多种患者的性别、肿瘤的分期、分级有关联。



A: Transwell 小室实验检测敲减泛酸酯酶 1 对 KYSE-410 和 KYSE-510 细胞的迁移及侵袭能力的影响(结晶紫染色, $\times 40$):

B: 划痕愈合实验检测敲减泛酸酯酶 1 对 KYSE-410 和 KYSE-510 细胞的迁移能力的影响($\times 40$).

与 si-NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 5 敲减泛酸酯酶 1 对 ESCC KYSE-410 和 KYSE-510 细胞迁移和侵袭能力的影响

3 讨论

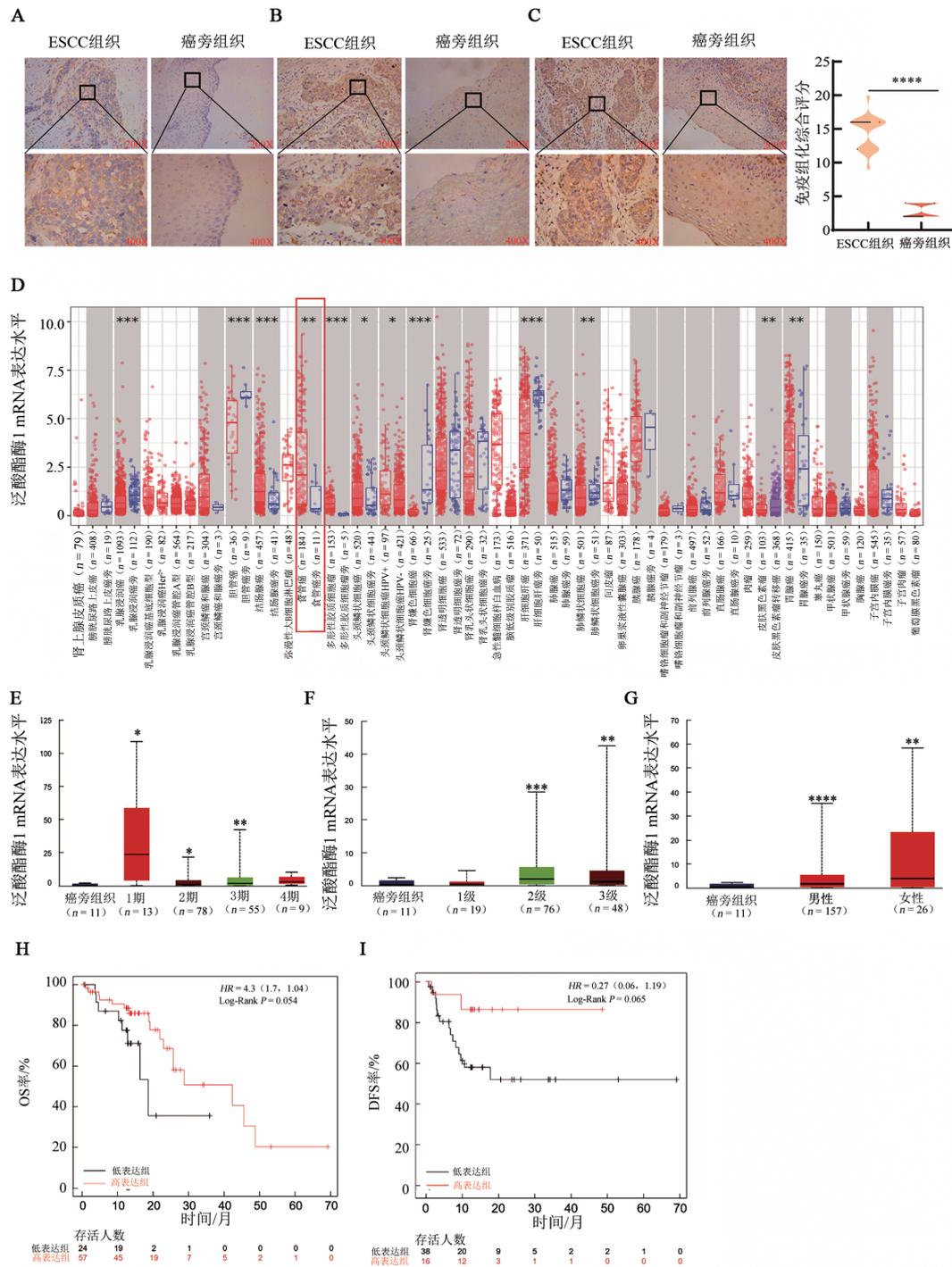
EC 主要包括两种类型: ESCC 和 ESCA^[15], 其中 ESCC 占 EC 总数的 90%。由于父母、兄弟、姐妹等一级亲属具有 EC 病史、热烫和高盐饮食习惯、长期吸烟和饮酒等, EC 的发生发展与这些风险因素密切相关^[16-17]。尽管在过去几十年中, EC 的治疗方法取得了显著进展, 包括外科手术、放疗和化疗等^[18-19], 但这些传统治疗手段往往只适用于早期诊断的病例。对于大多数晚期确诊的 EC 患者来说, 治疗效果有限, 五年生存率仍然低于 20%^[20]。这一现状凸显了急需深入探究 EC 的发病机制以及开发新的治疗策略的重要性。

连接蛋白 4 又称脊髓灰质炎病毒的受体相关

基因 4 (poliovirus receptor-related protein 4, PVRL4), 它是一种关键的细胞间黏附调节蛋白, 影响着细胞黏附和迁移等多个细胞生物学过程^[21-22]。有研究^[23-24]表明, 在乳腺癌, 甲状腺癌等多种肿瘤中, 连接蛋白 4 的表达与癌细胞增殖和转移有关, 然而连接蛋白 4 在 ESCC 中的作用以及分子机制, 仍未有研究报道。因此, 本研究旨在深入探讨通过连接蛋白 4 转录组测序筛选出的下游分子泛酸酯酶 1 在 ESCC 中的表达及其潜在功能, 并尝试揭示其可能的调控机制。首先, 通过文献回顾, 发现连接蛋白 4 在多种肿瘤中异常表达。利用 Timer2.0 数据库以及 qPCR 实验, 发现连接蛋白 4 在 ESCC 组织和细胞中高表达。为了找出其下游的靶基因, 对其敲减细胞进行了转录组测序, 选取测序

结果中下调基因, 并与TCGA-EC数据库中高表达的基因取交集, 共筛选出泛酸酯酶1、CCL28和PLEKHS1 3个基因。紧接着在mRNA水平上验证了这3个基因在正常食管上皮细胞和ESCC细胞中的表达水平。结合它们在KYSE-410和KYSE-510细胞中的高表达水平, 选取了表达水平最高的

泛酸酯酶1进行后续研究。查阅文献发现, 泛酸酯酶1针对肿瘤的研究还较少, 在ESCC中的功能及作用机制仍未有相关报道, 因此泛酸酯酶1的发现为ESCC临床治疗提供了潜在的新靶点。



A~C: 低分化、中分化及高分化泛酸酯酶1免疫组化染色结果(200×;400×);D: Timer2.0在线数据库EC中泛酸酯酶1的表达;E~G: TCGA数据库数据分析EC组织的泛酸酯酶1表达水平与肿瘤分级分期及性别的关系;H~I: KM plotter分析泛酸酯酶1的表达与患者OS和DFS率的关系。与癌旁组织或正常组织或低表达组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。

图6 泛酸酯酶1在ESCC组织的表达及其临床意义

泛酸酯酶 1 是一类特殊的细胞膜酶,泛酸酯酶 1 在生物体中的主要作用是催化泛酸酯的脱酯化反应,从而释放泛酸。泛酸是合成辅酶 A 的前体,辅酶 A 是多种代谢途径中必需的辅因子,参与脂肪酸、氨基酸和碳水化合物的代谢^[25-26]。在肿瘤学领域,泛酸酯酶 1 的功能开始受到关注。研究^[27]表明,泛酸酯酶 1 通过其酶活性影响肿瘤微环境以及通过调节局部的氧化还原平衡和炎症反应来影响肿瘤细胞的生存和增殖泛酸酯酶 1。它能够影响免疫细胞,如巨噬细胞的功能,进而影响炎症反应和免疫监视。这一功能在肿瘤微环境中尤为重要,可能影响肿瘤细胞逃避免疫系统的监控。综上所述,可见泛酸酯酶 1 在肿瘤的发生和发展中扮演的角色非常重要。泛酸酯酶 1 的多面性功能使其成为一个潜在的治疗目标,特别是在如 ESCC 这样的肿瘤类型中,深入研究其精确机制可能揭示新的治疗策略。因此,未来的研究需更系统地探索泛酸酯酶 1 在 ESCC 中的表达模式、调控机制及其与疾病进展之间的具体联系,以期 EC 的治疗提供新的思路。

本研究首次揭示了泛酸酯酶 1 作为连接蛋白 4 的下游靶基因在 ESCC 中的重要作用。通过一系列实验证实了泛酸酯酶 1 在 ESCC 中的高表达及其对肿瘤细胞恶性行为的促进作用,为深入理解 ESCC 的分子机制提供了新的视角。首先,通过敲低连接蛋白 4 后的转录组测序分析发现泛酸酯酶 1 是其重要的下游靶基因。这一发现不仅扩展了对连接蛋白 4 信号通路的认识,也为 ESCC 中连接蛋白 4/泛酸酯酶 1 轴的研究奠定了基础。通过功能实验发现,敲减泛酸酯酶 1 能显著抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。这表明泛酸酯酶 1 可能是 ESCC 恶性进展的关键驱动因子之一。值得注意的是,KEGG 和 GO 富集分析结果提示,泛酸酯酶 1 可能通过参与泛酸和辅酶 A 的合成代谢途径发挥作用。这一发现为理解泛酸酯酶 1 在 ESCC 中的作用机制提供了新的方向。泛酸和辅酶 A 作为重要的代谢中间体,参与了多种生物过程。泛酸酯酶 1 通过调节这些代谢途径可能影响 ESCC 细胞的能量代谢和生物合成,从而促进肿瘤进展。临床样本分析和在线数据库研究进一步支持了泛酸酯酶 1 在 ESCC 中的重要性。免疫组化结果显示,泛酸酯酶 1 在 ESCC 组织中高表达,主要定位于细胞膜。这一结果与泛酸酯酶 1 作为 GPI 锚定蛋白的特性相一致。此外,泛酸酯酶 1 的表达水平与肿瘤分期、部分肿瘤分级以及患者性别相关,表明其可能参与 ESCC 的进展过程。然而,泛酸酯酶 1 表达与患者预后未显示显著相关性,这可能暗示泛酸酯酶 1 在 ESCC 发生发展的不同阶段

发挥不同的作用,或者存在其他因素影响预后。

尽管本研究取得了重要进展,但仍存在一些局限性。首先,本实验尚未在体内模型中验证泛酸酯酶 1 的作用,这将是未来研究的重要方向。其次,泛酸酯酶 1 如何精确调控 ESCC 细胞的恶性行为,特别是其与泛酸和辅酶 A 代谢的具体关系,仍需进一步探索。

总的来说,本研究揭示了泛酸酯酶 1 作为连接蛋白 4 的下游靶基因在 ESCC 中的重要作用,为 ESCC 的分子机制研究和靶向治疗提供了新的见解。未来的研究应聚焦于以下几个方面,首先,在动物模型中验证泛酸酯酶 1 的功能;其次,深入探索泛酸酯酶 1 调控 ESCC 细胞代谢的具体机制,阐明连接蛋白 4/泛酸酯酶 1 轴的详细调控网络;进一步,探索以泛酸酯酶 1 为靶点的治疗策略。这些研究将有助于更全面地理解 ESCC 的分子机制,并为开发新的诊断和治疗方法提供重要依据。

[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] WATERS J K, REZNIK S I. Update on management of squamous cell esophageal cancer[J]. *Curr Oncol Rep*, 2022, 24(3): 375-385. DOI:10.1007/s11912-021-01153-4.
- [3] CHAMIL CODIPILLY D, WANG K K. Squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2022, 51(3): 457-484. DOI:10.1016/j.gtc.2022.06.005.
- [4] HE H Q, CHEN N Z, HOU Y, *et al.* Trends in the incidence and survival of patients with esophageal cancer: a SEER database analysis[J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(5): 1121-1128. DOI:10.1111/1759-7714.13311.
- [5] HE S M, XU J, LIU X J, *et al.* Advances and challenges in the treatment of esophageal cancer[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11): 3379-3392. DOI:10.1016/j.apsb.2021.03.008.
- [6] KLÜMPER N, TRAN N K, ZSCHÄBITZ S, *et al.* NECTIN4 amplification is frequent in solid tumors and predicts enfortumab vedotin response in metastatic urothelial cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2024, 42(20): 2446-2455. DOI:10.1200/JCO.23.01983.
- [7] FUKUSHIMA H, TAKAO S, FURUSAWA A, *et al.* Near-infrared photoimmunotherapy targeting Nectin-4 in a preclinical model of bladder cancer[J/OL]. *Cancer Lett*, 2024, 585: 216606[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38272345/>. DOI:10.1016/j.canlet.2023.216606.
- [8] CHEN J, LU H X, WANG X Y, *et al.* VNN1 contributes to the acute kidney injury-chronic kidney disease transition by promoting cellular senescence via affecting RB1 expression[J/OL]. *FASEB J*, 2022, 36(9): e22472[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35959877/>. DOI:10.1096/fj.202200496RR.
- [9] ZHANG S Y, FANG X, WU R Q, *et al.* VNN1 gene expression and

- polymorphisms associated with chicken carcass traits[J]. *Animals*, 2024, 14(13): 1888[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38998000/>. DOI:10.3390/ani14131888.
- [10] SCHALKWIJK J, JANSEN P. Chemical biology tools to study pantetheinases of the vanin family[J]. *Biochem Soc Trans*, 2014, 42(4): 1052-1055. DOI:10.1042/BST20140074.
- [11] GIESSNER C, MILLET V, MOSTERT K J, *et al.* Vnn1 pantetheinase limits the Warburg effect and sarcoma growth by rescuing mitochondrial activity[J/OL]. *Life Sci Alliance*, 2018, 1(4): e201800073[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30456364/>. DOI:10.26508/lsa.201800073.
- [12] YU H, CUI Y Y, GUO F Y, *et al.* Vanin1 (VNN1) in chronic diseases: future directions for targeted therapy[J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 962: 176220[2025-02-11]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.176220>. DOI:10.1016/j.ejphar.2023.176220.
- [13] GUO Z, ZHANG X F, ZHU H B, *et al.* Telo2 induced progression of colorectal cancer by binding with RICTOR through mTORC2[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(2): 523-534. DOI:10.3892/or.2020.7890.
- [14] 李钰婷. Nectin-4 通过 PI3K/AKT 信号通路促进食管鳞癌进展的分子机制研究[D]. 川北医学院, 2023. DOI: 10.27755/d.cnki.gcbyx.2023.000284.
- [15] 郑荣寿, 陈茹, 韩冰峰, 等. 2022 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2024, 46(3): 221-231. DOI: 10.3760/cma.j.cn112152-20240119-00035.
- [16] YANG X, TANG Z, LI J, *et al.* Esophagus cancer and essential trace elements[J/OL]. *Front Public Health*, 2022, 10: 1038153[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36466456/>. DOI: 10.3389/fpubh.2022.1038153.
- [17] SAKAI M, KITAGAWA Y, SAEKI H, *et al.* Fruit and vegetable consumption and risk of esophageal cancer in the Asian region: a systematic review and meta-analysis[J]. *Esophagus*, 2022, 19(1): 27-38. DOI:10.1007/s10388-021-00882-6.
- [18] 国家卫生健康委员会. 食管癌诊疗规范(2018年版)[J/OL]. *中华消化病与影像杂志(电子版)*, 2019, 9(4): 158-192[2025-02-11]. <https://zhxhbyyzz.cma-cmc.com.cn/CN/10.3877/cma.j.issn.2095-2015.2019.04.005>. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2015.2019.04.005.
- [19] STANDARDS OF PRACTICE COMMITTEE A S G E, FORBES N, ELHANAFI S E, *et al.* American Society for Gastrointestinal Endoscopy guideline on endoscopic submucosal dissection for the management of early esophageal and gastric cancers: summary and recommendations[J]. *Gastrointest Endosc*, 2023, 98(3): 271-284. DOI:10.1016/j.gie.2023.03.015.
- [20] TANG H, WANG H, FANG Y, *et al.* Neoadjuvant chemoradiotherapy versus neoadjuvant chemotherapy followed by minimally invasive esophagectomy for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma: a prospective multicenter randomized clinical trial[J]. *Ann Oncol*, 2023, 34(2): 163-172. DOI:10.1016/j.annonc.2022.10.508.
- [21] SHEIKH M, ROSHANDEL G, MCCORMACK V, *et al.* Current status and future prospects for esophageal cancer[J/OL]. *Cancers*, 2023, 15(3): 765[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36765722/>. DOI:10.3390/cancers15030765.
- [22] CHATTERJEE S, SINHA S, KUNDU C N. Nectin cell adhesion molecule-4 (NECTIN-4): a potential target for cancer therapy[J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 911: 174516[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34547246/>. DOI:10.1016/j.ejphar.2021.174516.
- [23] WANG H, SUN D J, CHEN J X, *et al.* Nectin-4 has emerged as a compelling target for breast cancer[J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 960: 176129[2025-02-11]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.176129>. DOI:10.1016/j.ejphar.2023.176129.
- [24] CHEN J, BHANDARI A, HIRACHAN S, *et al.* A specificity protein 1 assists the progression of the papillary thyroid cell line by initiating NECTIN4[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2024, 24(7): 789-797. DOI:10.2174/1871530323666230413134611.
- [25] TAN S K, HOUGEN H Y, MERCHAN J R, *et al.* Fatty acid metabolism reprogramming in ccRCC: mechanisms and potential targets[J]. *Nat Rev Urol*, 2023, 20(1): 48-60. DOI:10.1038/s41585-022-00654-6.
- [26] SHVEDUNOVA M, AKHTAR A. Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(5): 329-349. DOI:10.1038/s41580-021-00441-y.
- [27] QIN W J, KANG M X, LI C, *et al.* VNN1 overexpression in pancreatic cancer cells inhibits paraneoplastic islet function by increasing oxidative stress and inducing β -cell dedifferentiation[J/OL]. *Oncol Rep*, 2023, 49(6): 120[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37114564/>. DOI:10.3892/or.2023.8557.

[收稿日期] 2025-02-10

[修回日期] 2025-04-25

[本文编辑] 向正华