

FXYP6 在食管癌中表达及对增殖的影响

周佳敏¹ 丁雨轩¹ 高池¹ 赵仕博² 邢恩鸿^{1*}

1 承德医学院附属医院中心实验室, 河北省泛血管疾病重点实验室

2 承德医学院附属医院脊柱外科

DOI:10.12238/bmtr.v6i6.10985

[摘要] 目的: 探究FXYP6在食管癌组织中表达及其对食管癌细胞株TE-1增殖的影响。方法: 通过实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)在收集到的15例食管癌患者癌和癌旁组织中检测FXYP6的表达水平; 敲低TE-1细胞中的FXYP6; 利用CCK-8实验检测敲低FXYP6对TE-1细胞增殖的变化。结果: RT-qPCR结果分析表明, 食管癌肿瘤组织中FXYP6 RNA的表达水平显著高于癌旁组织($p < 0.05$); CCK-8实验结果分析表明, FXYP6的敲低能够显著降低食管癌TE-1细胞增殖能力($p < 0.05$)。结论: FXYP6在食管癌患者的癌组织中表达上调, 下调的FXYP6抑制食管癌TE-1细胞增殖的能力。

[关键词] FXYP6; 食管癌; 细胞增殖

中图分类号: R571 **文献标识码:** A

The expression of FXYP6 in esophageal cancer and its effect on the proliferation

Jiamin Zhou¹ Yuxuan Ding¹ Chi Gao¹ Shibo Zhao² Enhong Xing^{1*}

1 Department of central laboratory, The Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Hebei Key Laboratory of Panvascular Diseases

2 The Spinal Surgery Department of the Affiliated Hospital of Chengde Medical University

[Abstract] Objective : To investigate the expression of FXYP6 in esophageal cancer tissues and its effect on the proliferation of esophageal cancer cell line TE-1. Methods : The expression level of FXYP6 was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in cancer and adjacent tissues of 15 patients with esophageal cancer. Knockdown FXYP6 in TE-1 cells ; CCK-8 assay was used to detect the effect of FXYP6 knockdown on the proliferation of TE-1 cells. Results : RT-qPCR results showed that the expression level of FXYP6 RNA in esophageal cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($p < 0.05$). The results of CCK-8 assay showed that the knockdown of FXYP6 could significantly reduce the proliferation of esophageal cancer TE-1 cells ($p < 0.05$). Conclusion : The expression of FXYP6 is up-regulated in esophageal cancer tissues, and the down-regulated FXYP6 inhibits the proliferation of esophageal cancer TE-1 cells.

[Key words] FXYP6; Esophageal carcinoma; Cell proliferation

引言

食管癌的发病率在全球多种肿瘤中位列第八, 死亡率更是高居第六位^[1]。中国新发癌症病例的41.6%和死亡病例的49.3%发生在消化系统, 其中食管癌、鼻咽癌、肝癌和胃癌占全球新发恶性肿瘤病例的40%以上^[2]。食管鳞状细胞癌(Esophageal Squamous cell carcinoma, ESCC)在中国更为常见, 约占全球发病率和死亡率的一半。ESCC一经发现, 往往已处于晚期阶段, 其病情进展较为迅速, 预后相对较差。食管癌确诊后的5年生存率仅维持在10%至30%^[3], 约50%的患者死于局部肿瘤进展^[4]。目前在食管癌诊断治疗中, 没有明确的机制和靶点, 因此, 探究食管癌治疗机制找到诊疗靶点有助于食管癌早期诊疗。

FXYP结构域的离子转运调节因子6(FXYP6蛋白)是一种肿瘤相关蛋白, 在胶质母细胞瘤、肺腺癌、肝癌、骨肉瘤中已被证实 在肿瘤的发生发展中起着调控作用^[5-6]。然而, 其在食管癌发病 进展中的作用尚不明确。本研究旨在深入探究FXYP6基因在食管 癌中的表达水平变化, 并进一步分析其在食管癌发病进展中的 作用, 为诊断及治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本及细胞来源: 标本采集自2022年1月至2023年1月期间在河北医科大学第四医院确诊的15例食管癌患者的食管癌组织及相应的癌旁组织。其中, 男性10例, 女性5例。所有标本

在离体之后迅速液氮冻储。本研究已经通过伦理委员会审核,所有纳入患者均知情并签署知情同意书。人食管癌细胞株TE-1购自苏州海星生物公司,于液氮中保存。

食管癌患者纳入标准:①首次就诊;患者经内镜下病理及术中冰冻病理证实,并结合影像学进行分析,符合原发性食管癌;②未行放疗、化疗及其他治疗;③无远处转移;④未合并其他部位原发肿瘤。

排除标准:①患有其他严重的消化道疾病或心、肝、肺、肾等重要脏器功能异常的患者;②预期生存期<6个月;③合并血液系统疾病、自身免疫疾病等;④患有肺结核、酒精药物滥用史、精神疾病史等。

1.1.2主要试剂:RPMI-1640培养基、胰酶(美国Gibco公司)、胎牛血清(广州Oricell公司),Trizol试剂(美国Invitrogen公司),Lipofectamine 3000(美国 Thermo Fisher公司),FastKing cDNA第一链合成试剂盒、FastReal快速荧光定量PCR预混试剂(北京天根科技有限公司),RT-qPCR引物设计与合成(上海生工生物工程有限公司),BCA蛋白含量检测试剂盒(江苏凯基生物技术公司),FXVD6抗体(英国Abcam公司), β -Tubulin Rabbit mAb(杭州芸丹生物科技有限公司),羊抗兔二抗(苏州博奥龙生物科技有限公司),RIPA裂解缓冲液(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2方法

1.2.1细胞培养和转染与分组:将人食管癌细胞TE-1置于10%胎牛血清、RPMI-1640培养基中,并置于恒温37℃、5%CO₂和95%空气饱和湿度的培养箱中进行培养。取处于对数生长期的TE-1细胞以4.5×10⁵个/孔的密度铺于六孔板中,分为si-NC组及si-FXVD6组,当细胞融合度达到60%~70%左右时,按照Lipofectamine 3000试剂说明书进行si-NC和si-FXVD6瞬时转染,转染后的细胞在上述培养箱中继续培养48小时。

1.2.2 RNA的提取和FXVD6的敲减:采用TRIZOL试剂从收集的组织、细胞中提取总RNA。按照FastKing cDNA第一链合成试剂盒说明书将总RNA逆转录成cDNA。根据FastReal快速荧光定量PCR预混试剂说明书进行RT-qPCR的检测,反应条件:预变性95℃ 2min;循环条件为变性95℃ 5s,退火60℃ 15s共40个循环。FXVD6在组织和细胞样本中表达水平以GAPDH作为内参基因进行均一化,以2^{-ΔΔC_t}进行计算。

1.2.3 CCK-8实验:TE-1细胞的培养、转染及分组同前,转染48小时后接种到96孔板中进行培养。在0、24、48、72和96小时孵育后,去上清,每个孔中加入100 μl无血清培养基和10 μl CCK-8试剂,混匀后37℃孵育1h,采用酶标仪(Multiskan FC)检测各孔450nm吸光度值(OD值)。吸光度值的计算公式为:增殖率(%)=(转染组吸光度值/对照组吸光度值)×100%。

1.2.4 Western blot(蛋白质印记实验)。在冰上使用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液从不同的分组TE-1细胞中提取总蛋白质,通过BCA试剂盒进行蛋白定量。等量蛋白质通过12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),160V,分离蛋白条带,在350mA电流作用下将蛋白转膜至PVDF膜上。在快

速封闭液中室温封闭10min;一抗FXVD6(1:2000)、 β -Tubulin(1:3000)4℃孵育过夜;加入羊抗兔二抗(1:1000)室温孵育1h,洗膜30min,加入ECL电化学发光显影液进行曝光显影。

1.3统计学方法

采用GraphPad Prism9.5对数据进行统计分析并作图。当p<0.05时,差异具有统计学意义。显著性水平:NS(不显著);*p≤0.05,**p≤0.01,***p≤0.001。

2 结果

2.1 FXVD6在患者食管癌肿瘤组织中表达量显著提高

为了检测FXVD6在食管癌肿瘤组织和癌旁组织中的表达差异,对RT-qPCR法检测15例食管癌患者的组织样本分析结果显示(图1),相较于癌旁组织,食管癌组织中FXVD6的表达水平显著提高,差异具有统计学意义(p<0.05)。

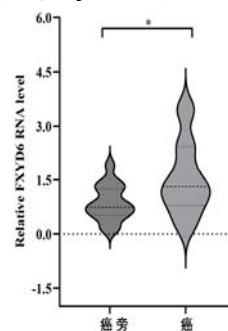


图1: RT-qPCR法检测食管癌患者肿瘤组织及癌旁组织中FXVD6 mRNA的表达水平

2.2 siRNA成功敲减TE-1细胞中FXVD6表达水平

为了研究FXVD6在食管癌细胞中的生物学功能,采用siRNA敲低FXVD6在TE-1细胞中表达,RT-qPCR和Western blot结果的检测显示(图2A,图2B):在mRNA水平上:si-FXVD6-1组、si-FXVD6-2组、si-FXVD6-3组与对照组si-NC相比,FXVD6RNA水平降低,表明转染的si-FXVD6-1、si-FXVD6-2、si-FXVD6-3均能显著下调TE-1细胞中FXVD6RNA水平(p<0.05),而以si-FXVD6-1下调最多,因此,后续实验选取si-FXVD6-1进行敲低;在蛋白水平上:与si-NC相比较,si-FXVD6-1转染的TE-1的蛋白表达水平明显降低,差异有统计学的意义(***p<0.001),表明转染的si-FXVD6-1成功下调TE-1细胞中FXVD6蛋白表达水平。

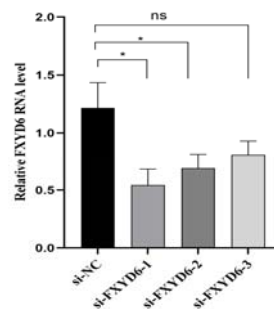


图2A: RT-qPCR法检测敲低FXVD6后TE-1细胞中的FXVD6 mRNA表达水平

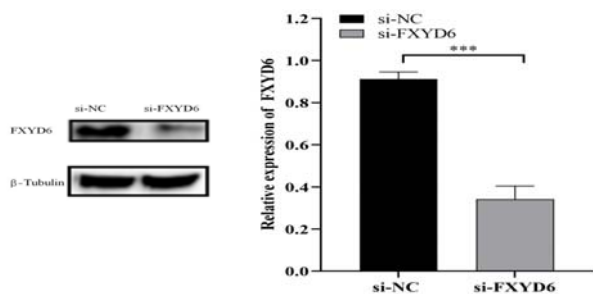


图2B: Western blot法检测敲低FXYD6后TE-1细胞中的FXYD6蛋白水平表达情况

2.3 敲低FXYD6会抑制TE-1细胞增殖能力

通过CCK-8实验分析敲低FXYD6对TE-1细胞增殖能力的影响。CCK-8实验结果显示(图3), si-FXYD6组的TE-1细胞增殖能力较si-NC组明显减慢, 差异具有统计学意义($p < 0.05$), 上述实验结果明确揭示了敲减FXYD6对TE-1细胞增殖产生的显著抑制作用。

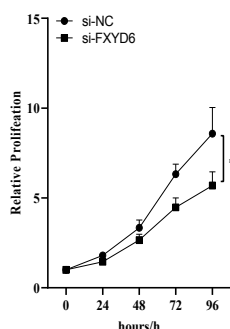


图3 CCK-8法检测敲低FXYD6对TE-1细胞增殖活性的变化

3 讨论

我国是食管癌发病率较高的国家, 大多数患者确诊时已是晚期。晚期食管癌预后较差, 五年生存率较低, 探索新致病基因有助于指导其靶向治疗研究。本次研究检测15例食管癌患者癌组织中FXYD6表达水平显著高于癌旁组织, 敲低FXYD6会抑制食管癌增殖能力。这提示FXYD6是食管癌发病进展的潜在生物标志物, 为食管癌的研究和诊疗提供一个新的靶点。

FXYD蛋白家族包含七个成员, 其名称源自于其功能结构域中特有的FXYD结构域序列排列, 这些小分子蛋白质由66至178个氨基酸组成。当前研究表明, FXYD基因家族蛋白产物的功能与 Na^+ , K^+ -ATP酶的离子转运调节密切相关, 它们共同维持 Na^+ 、 K^+ 的跨膜浓度梯度, 确保细胞稳态及特异组织功能的正常发挥。FXYD蛋白家族的大部分基因均在胚胎早期呈现显著高表达, 尤其是肾脏、结肠、乳腺、胰腺、前列腺及胎盘等组织器官中。在神经系统、肌肉等电兴奋性组织中, 该家族成员的离子转运调节或诱导离子通道行为亦表现出高度表达。近期有研究表明FXYD6被鉴定为调节胶质母细胞瘤免疫网络动力学的关键转换基因或信号^[5]。在乙型肝炎病毒(HBV)感染相关的肝癌组织中, FXYD6的mRNA分子表达水平显著升高, 提示FXYD6可能是肝细胞癌患者的一个不良预后指标^[6]。在骨肉瘤中FXYD6分子表达水平明显升高, 且可能与MicroRNA-137和MicroRNA-372-3p存在靶向关系,

上调MicroRNA-137和MicroRNA-372-3p会抑制FXYD6的表达水平, 进而抑制骨肉瘤细胞增殖及迁移的能力。FXYD6基因作为膜离子通道蛋白FXYD家族的新成员, 其功能目前尚不明确, 且其在食管癌中的研究目前未见报道。本实验结果表明FXYD6基因在食管癌恶性肿瘤中高表达。我们认为该基因及其表达产物在食管癌的发生和发展中可能具有重要作用。本研究存在一些局限性, 例如在评估FXYD6在癌旁及肿瘤组织的表达水平时, 所收集的样本数量较为有限; 虽然已进行了功能学验证, 但尚未开展更加深入的机制探究。

综上, FXYD6在食管癌中表达上调, 并且加速了ESCC增殖、迁移的进程, 提示FXYD6作为肿瘤促进因子参与ESCC的恶性生物学功能, 该研究为探讨ESCC的发病机制与诊断治疗提供了新的分子靶点。

[课题基金]

2023年度承德市应用技术与开发暨可持续发展议程创新示范区专项科技计划, 环状RNA circTRIO对食管鳞癌生物学行为的影响及机制研究(项目编号: 202305B087)。

[参考文献]

[1]Morgan E, Soerjomataram I, Rumgay 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. *Gastroenterology*. 2022;163(3):649–658.e2.

[2]He S, Xia C, Li H, et al. Cancer profiles in China and comparisons with the USA: a comprehensive analysis in the incidence, mortality, survival, staging, and attribution to risk factors. *Sci China Life Sci*. 2024; 67(1):122–131.

[3]Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet*. 2018;391(10125):1023–1075.

[4]Chen C, Chen J, Luo T, et al. Late Toxicities, Failure Patterns, Local Tumor Control, and Survival of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Patients After Chemoradiotherapy With a Simultaneous Integrated Boost: A 5-Year Phase II Study. *Front Oncol*. 2021;11:738936.

[5]Uthamacumaran A. Cell Fate Dynamics Reconstruction Identifies TPT1 and PTPRZ1 Feedback Loops as Master Regulators of Differentiation in Pediatric Glioblastoma-Immune Cell Networks. *Interdiscip Sci*. 2024.

[6]Chen X, Ding L, Kong D, et al. FXYD6 overexpression in HBV-related hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *Open Life Sci*. 2020;15(1):259–266.

作者简介:

周佳敏(1999--), 女, 汉族, 河北省沧州市人, 研究生在读, 研究方向: 肿瘤学。