

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.05.004
文章编号: 1005-8982 (2024) 05-0019-13

实验研究·论著

AZGP1通过FASN/Wnt/ β -catenin通路对食管鳞癌 细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响*

刘犇¹, 高超¹, 刘泽远², 顾俊杰³

(1.徐州医科大学附属医院 肿瘤内科, 江苏 徐州 221000; 2.南京医科大学附属江宁医院
放疗科, 江苏 南京 211100; 3.江苏省人民医院 放疗科, 江苏 南京 210029)

摘要: **目的** 探究锌- α 2-糖蛋白1(AZGP1)对食管鳞癌细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的调控作用, 并探讨其可能的作用机制。 **方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和 Western blotting检测AZGP1在人正常食管上皮细胞(Het-1A)和人食管鳞癌细胞(TE11、EC9706、HCE7、EC109、KYSE150)中的表达。构建AZGP1过表达质粒并转染至EC9706细胞, 分为对照组、过表达对照组(Ov-NC组)、AZGP1过表达组(Ov-AZGP1组); 将AZGP1过表达质粒与脂肪酸合酶(FASN)过表达质粒共转染至EC9706细胞或将AZGP1过表达质粒单独转染至经Wnt通路激活剂 Wnt agonist 1处理的EC9706细胞, 分为对照组、Ov-AZGP1组、Ov-AZGP1+Ov-FASN组、Ov-AZGP1+Wnt agonist 1组。CCK-8法和克隆形成实验检测细胞增殖; TUNEL实验检测细胞凋亡; CCK-8法和TUNEL实验检测顺铂和5-氟尿嘧啶化疗敏感性; Western blotting检测凋亡及FASN/Wnt/ β -catenin通路相关蛋白的表达。 **结果** AZGP1在食管鳞癌细胞中表达降低($P<0.05$), AZGP1过表达可抑制细胞增殖($P<0.05$)、促进细胞凋亡($P<0.05$)并增加顺铂和5-氟尿嘧啶化疗敏感性($P<0.05$)。AZGP1过表达可抑制FASN/Wnt/ β -catenin信号通路($P<0.05$), FASN过表达或Wnt agonist 1可逆转AZGP1对EC9706细胞增殖($P<0.05$)、凋亡($P<0.05$)及化疗敏感性的作用($P<0.05$)。 **结论** AZGP1可通过抑制FASN/Wnt/ β -catenin通路进而抑制食管鳞癌细胞增殖、诱导细胞凋亡并增加化疗敏感性。

关键词: 食管鳞癌; AZGP1; 化疗敏感性; FASN/Wnt/ β -catenin 通路

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

Effect of AZGP1 on proliferation, apoptosis and chemosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells via FASN/Wnt/ β -catenin signaling*

Liu Ben¹, Gao Chao¹, Liu Ze-yuan², Gu Jun-jie³

(1. Department of Medical Oncology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, 221000, China; 2. Department of Radiotherapy, Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211100, China; 3. Department of Radiotherapy, Jiangsu Provincial People's Hospital, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory role of Zinc- α 2-glycoprotein 1 (AZGP1) in proliferation, apoptosis, and chemotherapy sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells, and explore its possible mechanism of action. **Methods** The expression of AZGP1 in human normal esophageal epithelial cells (Het-1A) and ESCC cells (TE11, EC9706, HCE7, EC109, KYSE150) was detected by real-time quantitative

收稿日期: 2023-05-09

* 基金项目: 国家自然科学基金(No:81874217)

[通信作者] 高超, E-mail: gaochaoly@sina.com

polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting. An AZGP1 overexpression plasmid was constructed and transfected into EC9706 cells, which were divided into control group, overexpression negative control group (Ov-NC), and AZGP1 overexpression group (Ov-AZGP1 group). The AZGP1 overexpression plasmid was transfected alone or in combination with a fatty acid synthase (FASN) overexpression plasmid into EC9706 cells treated with Wnt pathway activator Wnt agonist 1, divided into control group, Ov-AZGP1 group, Ov-FASN group, Ov-AZGP1+Ov-FASN group, and Ov-AZGP1+Wnt agonist 1 group. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay and colony formation assay. Cell apoptosis was detected by TUNEL assay. Chemotherapy sensitivity to cisplatin and 5-fluorouracil was evaluated by CCK-8 assay and TUNEL assay. The expression of apoptosis-related proteins and FASN/Wnt/ β -catenin pathway-related proteins was detected by Western blotting. **Results** AZGP1 expression was downregulated in ESCC cells ($P < 0.05$). Overexpression of AZGP1 inhibited cell proliferation ($P < 0.05$), promoted apoptosis ($P < 0.05$), and increased sensitivity to cisplatin and 5-fluorouracil chemotherapy ($P < 0.05$). Overexpression of AZGP1 inhibited the FASN/Wnt/ β -catenin signaling pathway ($P < 0.05$), and overexpression of FASN or Wnt agonist 1 reversed the effects of AZGP1 on cell proliferation ($P < 0.05$), apoptosis ($P < 0.05$), and chemotherapy sensitivity ($P < 0.05$) in EC9706 cells. **Conclusion** AZGP1 can inhibit the proliferation, induce apoptosis, and increase chemotherapy sensitivity of ESCC cells by suppressing the FASN/Wnt/ β -catenin pathway.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma; AZGP1; chemosensitivity; FASN/Wnt/ β -catenin signaling

食管癌是全球第 8 大常见癌症和第 6 大癌症死亡原因^[1]。作为最常见的食管癌病理组织学分型,食管鳞癌是世界上最致命的恶性肿瘤之一^[2]。2018 年全球食管鳞癌新发病例约为 45 000 例,死亡病例约为 40 000 例^[3]。临床实践表明,以顺铂和 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 为主的联合化疗已成为晚期食管鳞癌一线治疗的标准方案^[4]。然而,由于食管鳞癌的高复发率、高转移性和化疗耐药性,患者的 5 年生存率普遍较低,预后差^[5-6]。因此,探讨食管鳞癌化学耐药的潜在分子机制并开发新的策略对提高其疗效有重要意义。

锌- α 2-糖蛋白 1 (Zinc- α 2-glycoprotein 1, AZGP1) 是一种由多种上皮细胞分泌的参与脂肪流失过程的调节因子,可通过刺激脂肪溶解参与癌症恶病质进程^[7]。现有研究证实, AZGP1 在胃癌^[8]、结直肠癌^[9]、肝细胞癌^[10]等恶性肿瘤中发挥抑癌作用。此外,有研究揭示, AZGP1 在多数食管鳞癌患者组织中表达降低,且可作为食管鳞癌预后的潜在生物标志物^[11-12]。然而, AZGP1 对食管鳞癌化疗效果的影响仍待探讨。

脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FASN) 是一种多功能酶蛋白,在脂肪酸合成途径中起关键的调控作用。近年研究表明,作为脂质代谢中枢调控因子, FASN 在癌症进程中发挥着重要作用,可作为肿瘤诊断生物标志物和防控靶点^[13]。另有研究证实, FASN 在食管鳞癌中表达增加,且敲低 FASN 后能抑制食管鳞癌细胞增殖、侵袭和迁移^[14-15]。Wnt/ β -catenin

信号途径通路是一条经典的致癌信号通路,其激活可促进食管鳞癌进展^[16-17]。更有研究报道, FASN 能激活下游 Wnt 信号从而促进癌症的作用进程^[18]。

基于此,本研究旨在分析 AZGP1 对食管鳞癌细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响,并验证 AZGP1 是否通过介导 FASN/Wnt/ β -catenin 通路参与食管鳞癌的发生及影响化疗敏感性。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

人正常食管上皮细胞 Het-1A 购自美国菌种保藏中心,人食管鳞癌细胞 EC9706、EC109 购自北京北纳创联生物技术研究院,人食管鳞癌细胞 TE11、KYSE150 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,人食管鳞癌细胞 HCE7 由美国国家癌症研究所 Curtis C. Harris 博士提供。顺铂、5-FU 购自上海康朗生物科技有限公司,DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、TRIzol 试剂、RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 超敏发光液均购自深圳子科生物科技有限公司, Wnt agonist 1 购自美国 Selleck 公司, Ov-AZGP1、Ov-FASN 和 Ov-NC 质粒由上海吉凯生物技术有限公司构建, Lipofectamine™ 3000 转染试剂购自北京诺为生物技术有限公司,第一链 cDNA 合成试剂盒、SYBR Green qRT-PCR 试剂购自北京君诺德生物技术有限公司, CCK-8、TUNEL 试剂购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, AZGP1 兔多抗、p53 兔单抗、p53 上调凋亡调控因子 (PUMA) 兔多抗、

Cleaved Caspase-3 兔多抗、FASN 兔单抗、 β -连环蛋白(β -catenin)兔单抗、c-Myc 兔单抗、Wnt 家族成员1(Wnt1)兔多抗、GAPDH 兔多抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 二抗均购自英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、处理及质粒转染 人正常食管上皮细胞 Het-1A 及人食管鳞癌细胞(TE11、EC9706、HCE7、EC109、KYSE150)均常规培养于含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中,37℃、5% 二氧化碳环境下培养。后续选择 5 μ mol Wnt agonist 1 处理 EC9706 细胞。取对数生长期的 EC9706 细胞接种于 6 孔板中,当细胞生长融合度达到 60%~70% 时,严格按照 Lipofectamine™ 3000 转染试剂说明将 Ov-NC、Ov-AZGP1 和 Ov-FASN 瞬时转染至细胞中,48 h 后转染完成。将 AZGP1 过表达质粒转染至 EC9706 细胞,分为对照组、过表达对照组(Ov-NC 组)、AZGP1 过表达组(Ov-AZGP1 组);将 FASN 过表达质粒转染至 EC9706 细胞,分为对照组、过表达对照组(Ov-NC 组)、FASN 过表达组(Ov-FASN 组);将 AZGP1 过表达质粒与 FASN 过表达质粒共转染至 EC9706 细胞或将 AZGP1 过表达质粒单独转染至经 Wnt 通路激活剂 Wnt agonist 1 处理的 EC9706 细胞,分为对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist 1 组。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 AZGP1 mRNA 表达 采用 TRIzol 法从各组细胞中提取总 RNA,经第一链 cDNA 合成试剂盒进行逆转录,反应条件:37℃ 15 min、98℃ 5 min,按照说明书使用 SYBR Green qRT-PCR 进行 PCR,反应体系:正反向引物各 0.5 μ L,10 $\times$ cDNA 模板 1 μ L,2 $\times$ SYBR mix 10 μ L,ddH₂O 8 μ L;扩增条件:95℃ 预变性 10 min、95℃ 变性 30 s、60℃ 退火 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 AZGP1 mRNA 相对表达量。AZGP1 正向引物:5'-TACAAC GACAGTAACGGGTCT-3',反向引物:5'-TATTTCCAG AATGCTCCGCTG-3',引物长度:21 bp;FASN 正向引物:5'-AAGGACCTGTCTAGGTTTGATGC-3',引物长度:23 bp,反向引物:5'-TGGCTTCATAGGTGACTTCC A-3',引物长度:21 bp;GAPDH 正向引物:5'-AATGG GCAGCCGTTAGGAAA-3',反向引物:5'-GCGCCCAA

TACGACCAAATC-3',引物长度:20 bp。

1.2.3 Western blotting 检测各蛋白表达 收集各组细胞,经 RIPA 裂解液提取蛋白,采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。经 10% SDS-PAGE 电泳后将蛋白转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,加入对应的一抗 AZGP1、p53、PUMA、Cleaved Caspase-3、FASN、 β -catenin、c-Myc、Wnt1、GAPDH 于 4℃ 下孵育过夜,HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 1 h。TBST 洗涤后,加入 ECL 发光液曝光蛋白条带,并采用 Image J 软件分析蛋白条带。内参蛋白为 GAPDH。

1.2.4 CCK-8 检测细胞活性和化疗耐药性 将转染后的细胞接种于 96 孔板中,每孔约 4×10^3 个细胞;48 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续孵育 2 h;采用酶标仪检测 450 nm 波长处的每孔吸光度值。将转染后的细胞接种于 96 孔板中,24 h 后,分别加入 0、20、40、80 和 100 μ g/mL 顺铂或 0、20、40、80 和 100 μ g/mL 5-FU,作用 72 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续孵育 2 h;采用酶标仪检测 450 nm 波长处的每孔吸光度值。

1.2.5 克隆形成实验检测细胞增殖能力 将转染后的细胞接种于 6 孔板中,每孔约 200 个细胞。当形成肉眼可见的细胞克隆后终止培养,用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次。经多聚甲醛固定和结晶紫染色后,于光学显微镜下统计克隆形成数。

1.2.6 TUNEL 染色检测细胞凋亡和化疗耐药性 将对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组细胞接种于 96 孔板中,加入 4% 多聚甲醛和 0.5% Triton X-100 进行固定和透化处理;随后严格按照试剂盒说明书加入 TUNEL 试剂进行染色,于 37℃ 下反应 45 min,随后加入 DAPI 染液;荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。将各组细胞接种于 96 孔板中,24 h 后,保留一组对照组细胞为空白组,再在对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist 1 组分别加入 80 μ g/mL 顺铂(顺铂组、顺铂+Ov-NC 组、顺铂+Ov-AZGP1 组、顺铂+Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、顺铂+Ov-AZGP1+Wnt agonist 1 组)或 80 μ g/mL 5-FU(5-FU 组、5-FU+Ov-NC 组、5-FU+Ov-AZGP1 组、5-FU+Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、5-FU+Ov-AZGP1+Wnt agonist 1 组),作用 72 h 后加入 4% 多聚甲醛和 0.5% Triton X-100 进行固定和透化处理;随后严格按照试剂盒说明书加入 TUNEL 试剂染色,37℃ 下反应 45 min,随后加入 DAPI 染液;荧光显微

镜下观察各组细胞凋亡情况。

1.3 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 8 统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 Tukey post hoc test 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

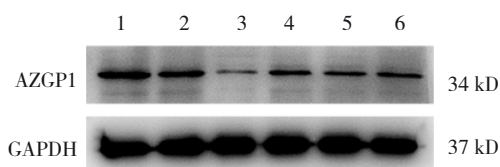
2 结果

2.1 AZGP1 在食管鳞癌细胞中低表达

qRT-PCR 结果显示, 正常食管上皮细胞 Het-1A 细胞、人食管癌细胞 (TE11、EC9706、HCE7、EC109、KYSE150) 中 AZGP1 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 结果: 与 Het-1A 细胞比较, TE11、EC9706、HCE7、EC109、KYSE150 细胞的 AZGP1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果表明, Het-1A、TE11、EC9706、HCE7、EC109、KYSE150 细胞 AZGP1 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 结果: 与 Het-1A 细胞比较, TE11、EC9706、HCE7、EC109、KYSE150 细胞的 AZGP1 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)。AZGP1 在 EC9706 细胞中呈现最低表达, 因此选择 EC9706 细胞进行后续实验。见表 1 和图 1。

表 1 AZGP1 在食管鳞癌细胞中的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

细胞	AZGP1 mRNA	AZGP1 蛋白
Het-1A	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.03
KYSE150	0.52 $\pm$ 0.04	0.72 $\pm$ 0.04
EC9706	0.17 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.02
HCE7	0.34 $\pm$ 0.07	0.48 $\pm$ 0.04
EC109	0.30 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.05
TE11	0.33 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.04
F 值	122.100	147.300
P 值	0.000	0.000



1: Het-1A; 2: KYSE150; 3: EC9706; 4: HCE7; 5: EC109; 6: TE11。

图 1 各食管鳞癌细胞 AZGP1 蛋白表达

2.2 AZGP1 过表达抑制食管鳞癌细胞增殖与克隆

qRT-PCR 结果显示, 对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组的 AZGP1 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 对照组与 Ov-NC 组 EC9706 细胞的 AZGP1 mRNA 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Ov-AZGP1 组较 Ov-NC 组 AZGP1 mRNA 相对表达量升高 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果显示, 对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组的 AZGP1 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 对照组与 Ov-NC 组 EC9706 细胞的 AZGP1 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Ov-AZGP1 组较 Ov-NC 组 AZGP1 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 2A。

对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组的 EC9706 细胞增殖比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 对照组与 Ov-NC 组 EC9706 细胞增殖比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Ov-AZGP1 组较 Ov-NC 组 EC9706 细胞增殖降低 ($P < 0.05$)。克隆形成实验结果同样表明, 对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组的 EC9706 细胞克隆形成能力比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 对照组与 Ov-NC 组 EC9706 细胞克隆形成能力比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Ov-AZGP1 组较 Ov-NC 组 EC9706 细胞克隆形成能力减弱 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 2B。

2.3 AZGP1 过表达诱导食管鳞癌细胞凋亡

TUNEL 实验结果表明, 对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组的 EC9706 细胞凋亡能力比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 对照组与 Ov-NC 组 EC9706 细胞凋亡能力比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Ov-AZGP1 组较 Ov-NC 组 EC9706 细胞凋亡能力提升 ($P < 0.05$) (见表 3 和图 3)。Western blotting 检测结果发现, 对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组 EC9706 细胞的 Caspase-3 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); p53、PUMA、Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 对照组与 Ov-NC 组 EC9706 细胞的 p53、PUMA、Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Ov-AZGP1 组 p53、PUMA、Cleaved Caspase-3 蛋白相对表

达量较 Ov-NC 组均升高 ($P < 0.05$) (见表 3 和图 4)。

表 2 各组细胞的 AZGP1 mRNA 和蛋白相对表达量、EC9706 细胞增殖和克隆形成能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	AZGP1 mRNA	AZGP1 蛋白	细胞增殖	细胞克隆形成能力
对照组	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.09	616.70 $\pm$ 48.75
Ov-NC 组	1.00 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.04	604.30 $\pm$ 37.02
Ov-AZGP1 组	3.02 $\pm$ 0.25	2.71 $\pm$ 0.12	0.41 $\pm$ 0.07	258.00 $\pm$ 52.37
<i>F</i> 值	134.200	273.900	72.540	57.490
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

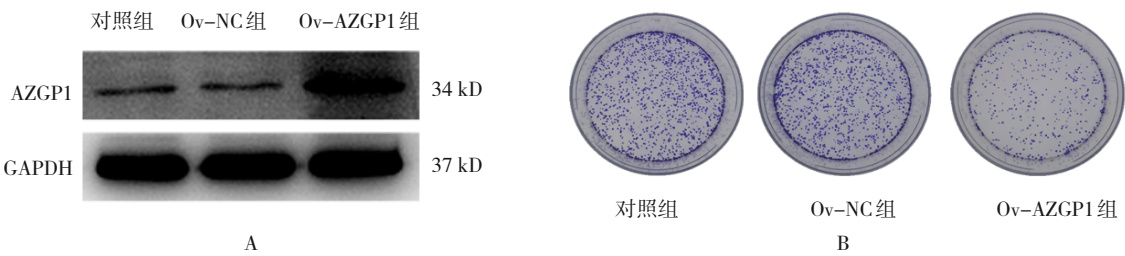


图 2 各组细胞 AZGP1 蛋白条带图及 EC9706 细胞克隆形成实验图

表 3 各组细胞中 EC9706 细胞凋亡能力、凋亡相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡能力	p53 蛋白	PUMA 蛋白	Cleaved Caspase-3 蛋白	Caspase-3 蛋白
对照组	0.52 $\pm$ 0.21	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.04
Ov-NC 组	0.37 $\pm$ 0.19	0.97 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.23	1.01 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.02
Ov-AZGP1 组	20.24 $\pm$ 1.53	3.44 $\pm$ 0.16	3.84 $\pm$ 0.15	1.88 $\pm$ 0.06	1.01 $\pm$ 0.05
<i>F</i> 值	488.100	372.000	245.500	426.900	0.203
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.822

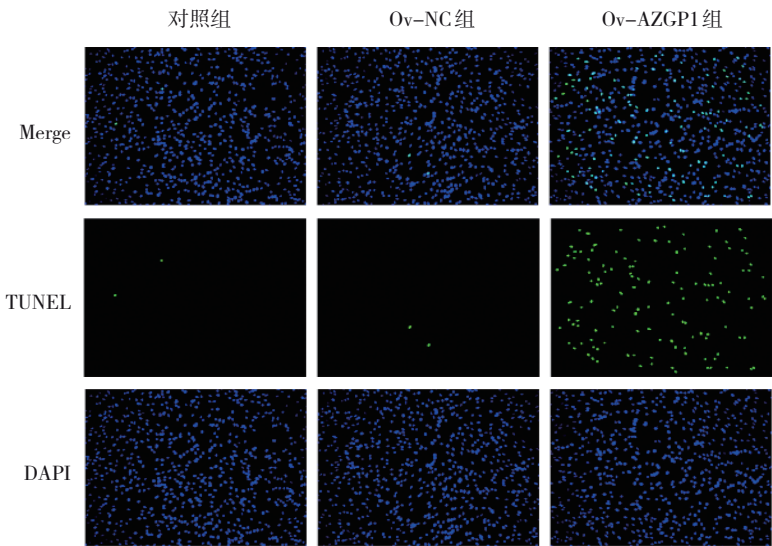


图 3 各组 EC9706 细胞 TUNEL 凋亡图

2.4 AZGP1 过表达提高食管鳞癌细胞对顺铂和 5-FU 的化疗敏感性

对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组 EC9706 细胞分别加入 0、20、40、80 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂后,细胞活性的

变化结果:①对照组不同顺铂浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F = 27.430$, $P = 0.000$);Ov-NC 组不同顺铂浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F = 37.790$, $P =$

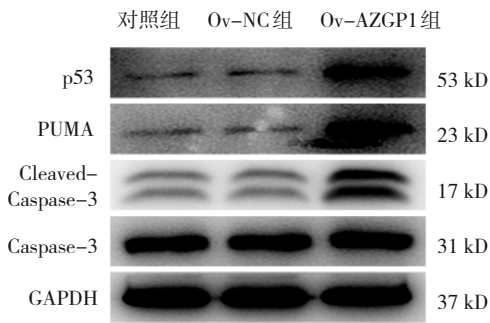


图 4 各组 EC9706 细胞凋亡相关蛋白条带图

0.000); Ov-AZGP1 组不同顺铂浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F=69.000, P=0.000$)。②当顺铂浓度增至 80 $\mu\text{g/mL}$ 时,对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F=9.910, P=0.013$);当顺铂浓度增至 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F=26.600, P=0.001$)。见表 4。

表 4 AZGP1 对不同浓度顺铂作用下 EC9706 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	F 值	P 值
对照组	100.00 $\pm$ 6.90	91.30 $\pm$ 5.90	80.30 $\pm$ 5.90	68.60 $\pm$ 5.60	56.40 $\pm$ 4.20	27.430	0.000
Ov-NC 组	100.20 $\pm$ 4.90	90.40 $\pm$ 6.10	77.00 $\pm$ 6.20	66.80 $\pm$ 4.80	53.00 $\pm$ 4.10	37.790	0.000
Ov-AZGP1 组	100.50 $\pm$ 5.00	79.70 $\pm$ 4.70	70.00 $\pm$ 5.80	49.50 $\pm$ 6.80	31.20 $\pm$ 5.40	69.000	0.000
F 值	0.005	3.952	2.331	9.910	26.600		
P 值	0.995	0.080	0.178	0.013	0.001		

对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组 EC9706 细胞分别加入 0、20、40、80 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU 后,细胞活性的变化结果:①对照组不同 5-FU 浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F=43.740, P=0.000$);Ov-NC 组不同 5-FU 浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F=58.710, P=0.000$);Ov-AZGP1 组不同 5-FU 浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F=65.570, P=0.000$)。②当 5-FU 浓度增至 20 $\mu\text{g/mL}$ 时,对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组 EC9706 细胞活

性比较,差异有统计学意义 ($F=6.378, P=0.033$);当 5-FU 浓度增至 40 $\mu\text{g/mL}$ 时,对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F=8.720, P=0.017$);当 5-FU 浓度增至 80 $\mu\text{g/mL}$ 时,对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F=10.880, P=0.010$);当 5-FU 浓度增至 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义 ($F=29.380, P=0.001$)。见表 5。

表 5 AZGP1 对不同浓度 5-FU 作用下 EC9706 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	F 值	P 值
对照组	100.00 $\pm$ 5.10	93.20 $\pm$ 3.00	78.90 $\pm$ 4.20	69.80 $\pm$ 7.40	50.50 $\pm$ 5.10	43.740	0.000
Ov-NC 组	100.70 $\pm$ 4.20	91.70 $\pm$ 3.40	79.20 $\pm$ 6.40	67.40 $\pm$ 4.20	47.80 $\pm$ 4.80	58.710	0.000
Ov-AZGP1 组	100.00 $\pm$ 9.60	81.70 $\pm$ 6.00	64.10 $\pm$ 4.30	49.20 $\pm$ 5.80	25.40 $\pm$ 3.20	65.570	0.000
F 值	0.012	6.378	8.720	10.880	29.380		
P 值	0.988	0.033	0.017	0.010	0.001		

TUNEL 实验结果显示,空白组、顺铂组、顺铂+Ov-NC 组、顺铂+Ov-AZGP1 组的 EC9706 细胞凋亡率分别为 (0.52 $\pm$ 0.27)%、(15.64 $\pm$ 1.33)%、(15.36 $\pm$ 2.13)%、(31.33 $\pm$ 2.36)%,各组比较,差异有统计学意义 ($F=159.200, P=0.000$)。进一步两两比较结果:顺铂组较空白组 EC9706 细胞凋亡率增加 ($P<0.05$);顺铂+Ov-AZGP1 组较顺铂+Ov-NC 组 EC9706

细胞凋亡率增加 ($P<0.05$) (见图 5)。空白组、5-FU 组、5-FU+Ov-NC 组、5-FU+Ov-AZGP1 组的 EC9706 细胞凋亡率分别为 (0.62 $\pm$ 0.30)%、(14.92 $\pm$ 1.64)%、(14.85 $\pm$ 0.86)%、(30.81 $\pm$ 1.23)%,各组比较,差异有统计学意义 ($F=364.400, P=0.000$)。进一步两两比较,结果:5-FU 组较空白组 EC9706 细胞凋亡率增加 ($P<0.05$);5-FU+Ov-AZGP1 组较 5-FU+Ov-NC 组

EC9706 细胞凋亡能力增强 ($P<0.05$) (见图 6)。

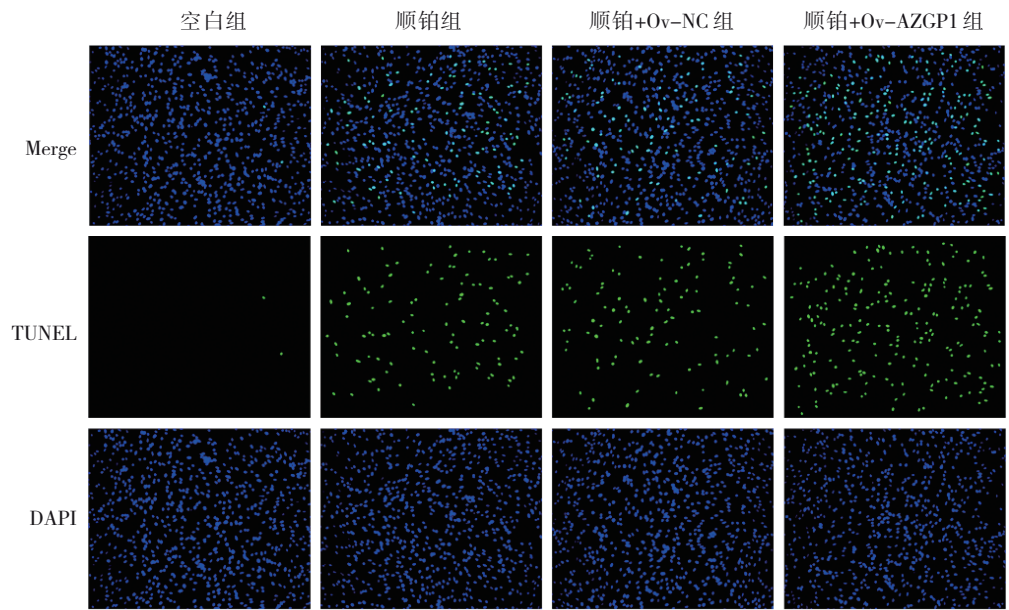


图 5 AZGP1 对顺铂作用下 EC9706 细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色 $\times 200$)

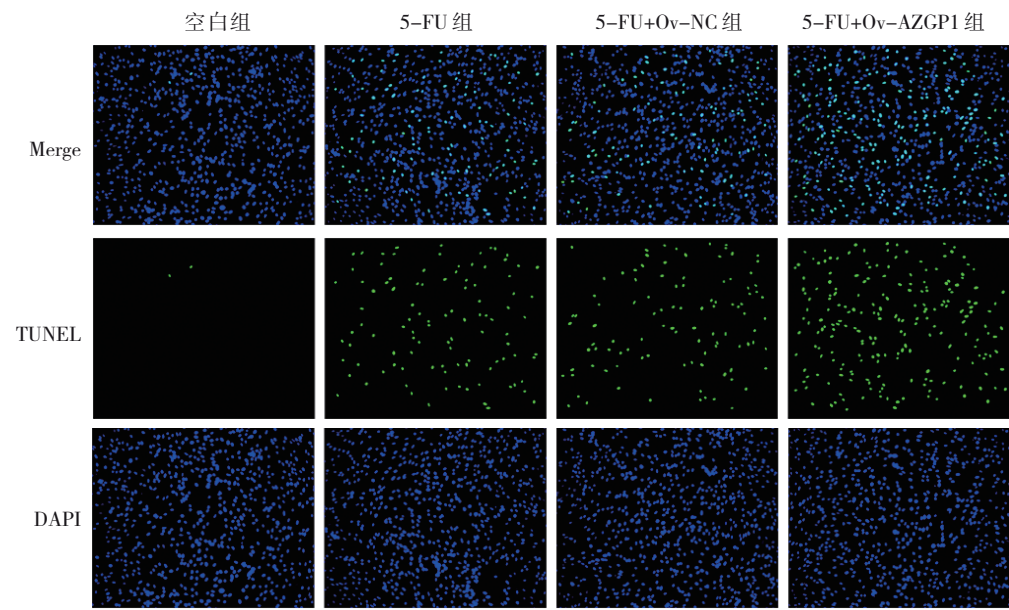


图 6 AZGP1 对 5-FU 作用下 EC9706 细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色 $\times 200$)

2.5 AZGP1 在食管鳞癌细胞中抑制 FASN/Wnt/ β -catenin 信号传导

Western blotting 结果显示, 对照组、Ov-NC 组、Ov-AZGP1 组的 EC9706 细胞的 FASN、 β -catenin、c-Myc、Wnt1 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。进一步两两比较结果: 对照组与 Ov-NC 组 EC9706 细胞的 FASN、 β -catenin、c-Myc、Wnt1 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); Ov-AZGP1 组的 FASN、 β -catenin、c-Myc、Wnt1 蛋白相对

表达量较 Ov-NC 组均下降 ($P<0.05$)。qRT-PCR 结果显示, 对照组、Ov-NC 组、Ov-FASN 组的 FASN mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。进一步两两比较结果: 对照组与 Ov-NC 组 EC9706 细胞的 FASN mRNA 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); Ov-FASN 组较 Ov-NC 组 mRNA 相对表达量升高 ($P<0.05$)。Western blotting 结果表明, 对照组、Ov-NC 组、Ov-FASN 组的 FASN 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。进一步两两比较

结果:对照组与 Ov-NC 组 EC9706 细胞的 FASN 蛋白相对表达量比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Ov-FASN 组较 Ov-NC 组蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。见图 7 和表 6、7。

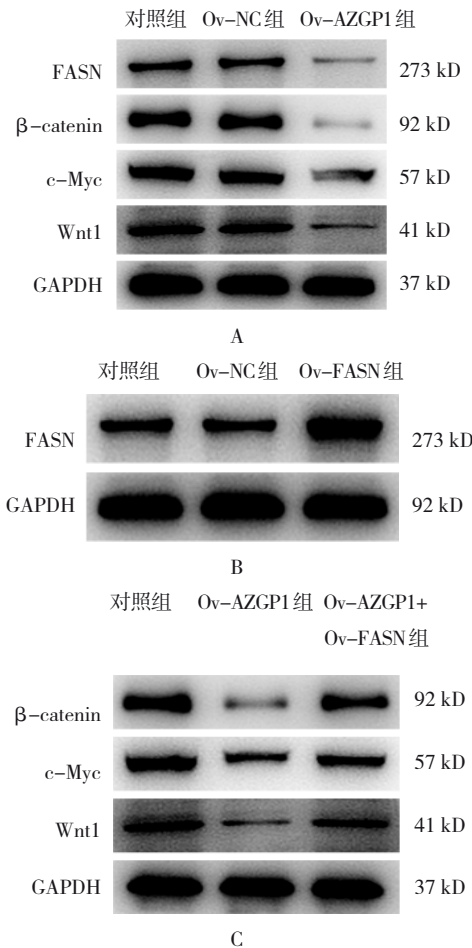


图 7 各组细胞 Wnt 相关蛋白及 FASN 蛋白条带图

表 6 各组细胞 Wnt/β-catenin 通路相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	FASN 蛋白	β-catenin 蛋白	c-Myc 蛋白	Wnt1 蛋白
对照组	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.07
Ov-NC 组	0.98 ± 0.05	1.00 ± 0.06	0.99 ± 0.07	0.97 ± 0.13
Ov-AZGP1 组	0.35 ± 0.02	0.19 ± 0.06	0.57 ± 0.07	0.36 ± 0.07
F 值	196.700	81.440	49.580	42.550
P 值	0.000	0.000	0.000	0.001

对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组 EC9706 细胞的 β-catenin、c-Myc、Wnt1 蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($F=52.640, 48.190$ 和 65.450 , 均 $P=0.000$)。进一步两两比较结果:与对照组比较, Ov-AZGP1 组的 Wnt1、β-catenin、c-Myc 蛋

表 7 各组细胞 FASN mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	FASN mRNA 相对表达量	FASN 蛋白相对表达量
对照组	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.07
Ov-NC 组	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.05
Ov-FASN 组	2.50 ± 0.14	1.88 ± 0.12
F 值	107.800	107.200
P 值	0.000	0.000

白相对表达量下调($P<0.05$);而 Ov-AZGP1+Ov-FASN 组较 Ov-AZGP1 组 Wnt1、β-catenin、c-Myc 蛋白相对表达量再次升高($P<0.05$)。见图 7 和表 8。

表 8 各组细胞 Wnt/β-catenin 通路相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	β-catenin 蛋白	c-Myc 蛋白	Wnt1 蛋白
对照组	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.07
Ov-AZGP1 组	0.32 ± 0.03	0.47 ± 0.09	0.38 ± 0.05
Ov-AZGP1+Ov-FASN 组	0.77 ± 0.10	0.66 ± 0.04	0.77 ± 0.08
F 值	52.640	48.190	65.450
P 值	0.000	0.000	0.000

2.6 AZGP1 可通过使 FASN/Wnt/β-catenin 通路失活而抑制食管鳞癌细胞增殖并促进食管鳞癌细胞凋亡

CCK-8 检测结果显示,对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组的 EC9706 细胞增殖比较,差异有统计学意义($F=45.500, P=0.000$)。进一步两两比较结果:Ov-AZGP1 组较 Ov-NC 组 EC-9706 细胞增殖大幅降低($P<0.05$);而与 Ov-AZGP1 组比较, Ov-AZGP1+Ov-FASN 组和 Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组细胞增殖得以部分恢复($P<0.05$)。克隆形成实验结果表明,对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组的 EC9706 细胞克隆形成能力比较,差异有统计学意义($F=68.190, P=0.000$)。进一步两两比较结果:与 Ov-NC 组比较, Ov-AZGP1 组细胞克隆形成数目减少($P<0.05$);Ov-AZGP1+Ov-FASN 组或 Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组较 Ov-AZGP1 组克隆形成数目增多($P<0.05$)。TUNEL 实验结果显示,对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组的 EC9706 细胞凋亡能

力比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较结果:Ov-AZGP1 组较 Ov-NC 组凋亡细胞数目增多($P<0.05$);而与 Ov-AZGP1 组比较,FASN 过表达或添加 Wnt agonist1 后凋亡细胞数目再次下降($P<0.05$)。Western blotting 结果表明,对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组 EC9706 细胞的 p53、PUMA、Cleaved

Caspase-3 蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较结果:与对照组比较,Ov-AZGP1 组的 p53、PUMA、Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量升高($P<0.05$);Ov-AZGP1+Ov-FASN 组或 Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组的 p53、PUMA、Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量较 Ov-AZGP1 组降低($P<0.05$)。见图 8 和表 9。

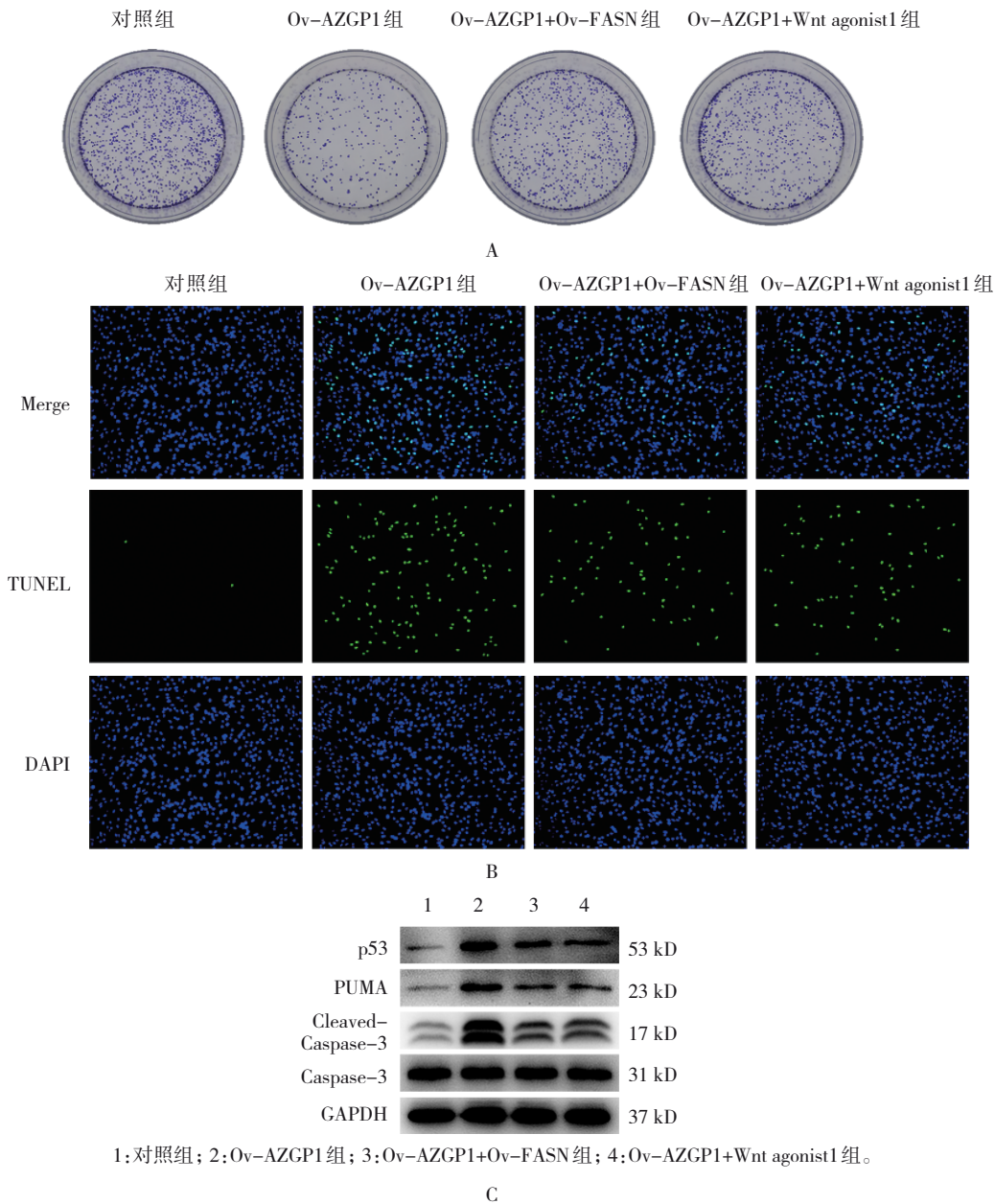


图8 各组细胞中EC9706细胞克隆形成实验图、TUNEL 凋亡图及凋亡相关蛋白条带图

2.7 AZGP1 可通过抑制 FASN/Wnt/ β -catenin 信号传导而提高食管鳞癌细胞化疗敏感性

CCK-8 法检测结果显示,对照组、Ov-AZGP1

组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组加入不同浓度的顺铂后,EC9706 细胞活性的变化结果:①对照组不同顺铂浓度作用下 EC9706 细胞活

表 9 各组细胞 EC9706 细胞增殖、克隆形成能力、凋亡能力和凋亡相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞增殖	细胞克隆形成能力	细胞凋亡能力	p53 蛋白	PUMA 蛋白	Cleaved Caspase-3 蛋白	Caspase-3 蛋白
对照组	1.00 ± 0.07	623.70 ± 39.02	0.50 ± 0.16	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.03
Ov-AZGP1 组	0.38 ± 0.08	260.70 ± 29.37	20.51 ± 1.12	2.95 ± 0.29	2.41 ± 0.12	2.73 ± 0.14	0.99 ± 0.04
Ov-AZGP1+Ov-FASN 组	0.80 ± 0.05	569.70 ± 34.02	10.27 ± 1.32	2.01 ± 0.09	1.44 ± 0.09	1.70 ± 0.14	0.97 ± 0.03
Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组	0.79 ± 0.08	581.30 ± 37.00	10.37 ± 0.83	1.97 ± 0.16	1.46 ± 0.07	1.76 ± 0.08	0.97 ± 0.03
F 值	45.500	68.190	215.800	292.800	165.200	445.000	0.501
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.692

性比较,差异有统计学意义($F=41.620, P=0.000$); Ov-AZGP1 组不同顺铂浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=70.030, P=0.000$); Ov-AZGP1+Ov-FASN 组不同顺铂浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=71.510, P=0.000$); Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组不同顺铂浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=46.140, P=0.000$)。②当顺铂浓度增至 80 $\mu\text{g/mL}$ 时,

对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=8.251, P=0.008$);当顺铂浓度增至 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=14.050, P=0.002$)。见表 10。

表 10 各组细胞在不同浓度顺铂作用下 EC9706 细胞活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	F 值	P 值
对照组	100.00 ± 4.70	92.60 ± 5.30	84.00 ± 3.30	70.90 ± 4.60	58.60 ± 4.30	41.620	0.000
Ov-AZGP1 组	99.80 ± 6.80	82.20 ± 4.50	72.30 ± 6.70	52.30 ± 3.20	32.00 ± 5.30	70.030	0.000
Ov-AZGP1+Ov-FASN 组	100.50 ± 4.70	88.60 ± 3.70	78.30 ± 3.10	62.90 ± 4.10	50.70 ± 4.60	71.510	0.000
Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组	100.20 ± 4.90	87.10 ± 2.00	77.80 ± 4.50	65.20 ± 6.30	48.70 ± 6.40	46.140	0.000
F 值	0.010	3.455	3.225	8.251	14.050		
P 值	0.997	0.071	0.082	0.008	0.002		

对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组加入不同浓度的 5-FU 后,EC9706 细胞活性的变化结果:①对照组不同 5-FU 浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=38.730, P=0.000$); Ov-AZGP1 组不同 5-FU 浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=92.290, P=0.000$); Ov-AZGP1+Ov-FASN 组不同 5-FU 浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=63.590, P=0.000$); Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组不同 5-FU 浓度作用下 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=102.700, P=0.000$)。②当 5-FU 浓度增至 80 $\mu\text{g/mL}$ 时,对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=12.030, P=0.003$);当 5-FU 浓度增至 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,对照组、Ov-AZGP1 组、Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、Ov-

AZGP1+Wnt agonist1 组 EC9706 细胞活性比较,差异有统计学意义($F=12.830, P=0.002$)(见表 11)。

TUNEL 实验结果显示,空白组、顺铂组、顺铂+Ov-AZGP1 组、顺铂+Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、顺铂+Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组的 EC9706 细胞凋亡率分别为 (0.36 ± 0.16)%、(15.60 ± 2.11)%、(31.21 ± 1.10)%、(20.56 ± 1.89)%、(20.55 ± 1.22)%,各组比较,差异有统计学意义($F=176.100, P=0.000$)。进一步两两比较结果:顺铂组较空白组 EC9706 细胞凋亡率增加($P<0.05$);顺铂+Ov-AZGP1 组较顺铂组 EC9706 细胞凋亡率增加($P<0.05$);顺铂+Ov-AZGP1+Ov-FASN 组或顺铂+Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组较顺铂+Ov-AZGP1 组细胞凋亡率再次降低($P<0.05$)(见图 9)。空白组、5-FU 组、5-FU+Ov-AZGP1 组、5-FU+Ov-AZGP1+Ov-FASN 组、5-FU+Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组的 EC9706 细胞凋亡率分别为

表 11 各组细胞在不同浓度 5-FU 作用下 EC9706 细胞活性比较

组别	0 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	100.00 $\pm$ 5.20	93.80 $\pm$ 4.80	80.60 $\pm$ 6.60	72.50 $\pm$ 3.00	52.50 $\pm$ 5.80	38.730	0.000
Ov-AZGP1 组	100.20 $\pm$ 3.70	85.30 $\pm$ 4.20	68.20 $\pm$ 7.10	51.40 $\pm$ 5.80	27.80 $\pm$ 4.00	92.290	0.000
Ov-AZGP1+Ov-FASN 组	100.00 $\pm$ 7.80	89.80 $\pm$ 2.50	75.80 $\pm$ 3.80	65.00 $\pm$ 3.70	40.00 $\pm$ 5.80	63.590	0.000
Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组	100.60 $\pm$ 4.90	90.90 $\pm$ 3.30	76.80 $\pm$ 3.30	62.10 $\pm$ 4.50	42.30 $\pm$ 3.60	102.700	0.000
<i>F</i> 值	0.008	2.615	2.746	8.251	12.830		
<i>P</i> 值	0.999	0.123	0.113	0.008	0.002		

(0.38 $\pm$ 0.16)%、(15.35 $\pm$ 1.38)%、(30.43 $\pm$ 1.66)%、(20.69 $\pm$ 0.68)%、(20.48 $\pm$ 1.76)%, 各组比较, 差异有统计学意义 ($F=220.600$, $P=0.000$)。进一步两两比较结果: 5-FU 组较空白组 EC9706 细胞凋亡率增加 ($P<0.05$); 5-FU+ Ov-AZGP1 组较 5-FU 组 EC9706 细胞凋亡率增加 ($P<0.05$); 5-FU+Ov-AZGP1+Ov-FASN 组或 5-FU+Ov-AZGP1+Wnt agonist1 组较 5-FU+Ov-AZGP1 组细胞凋亡率再次降低 ($P<0.05$) (见图 10)。

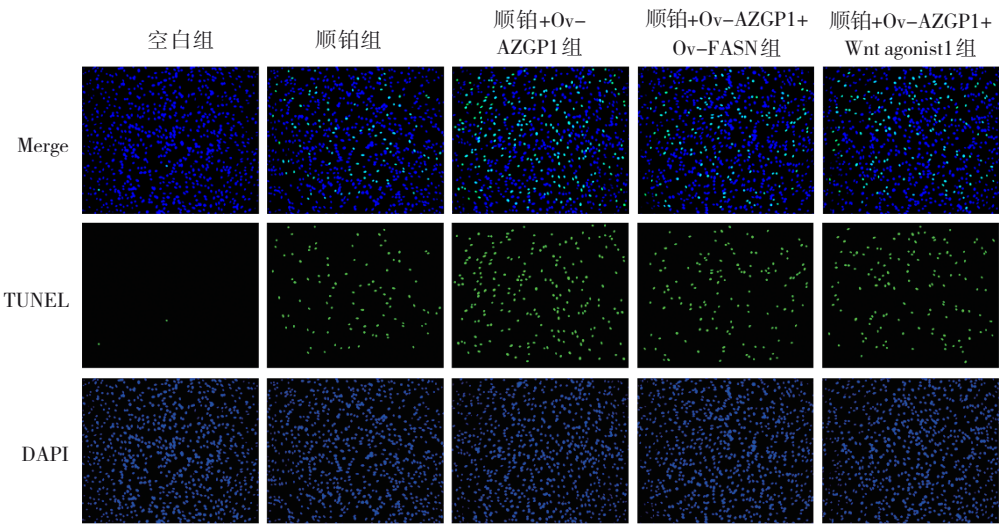


图 9 各组顺铂作用下 EC9706 细胞凋亡 (TUNEL 染色 $\times 200$)

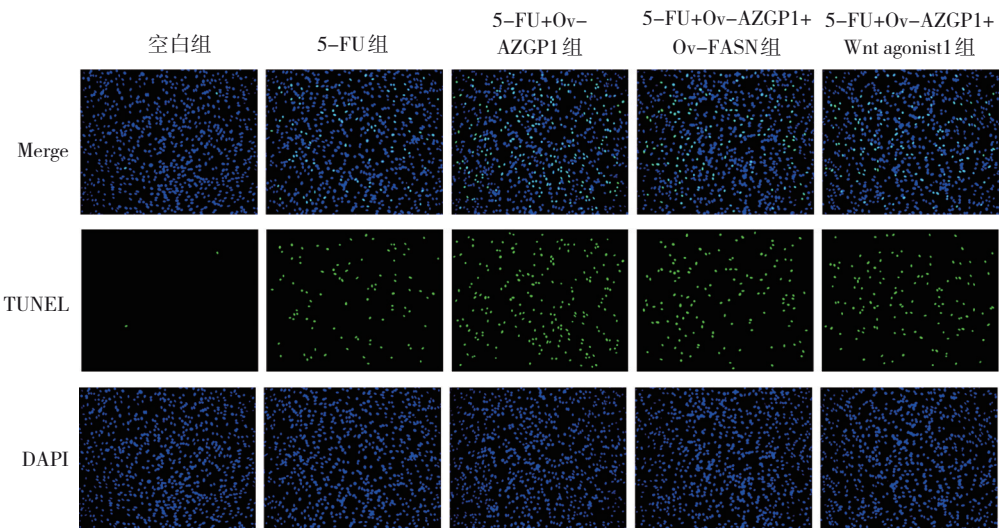


图 10 各组 5-FU 作用下 EC9706 细胞凋亡 (TUNEL 染色 $\times 200$)

3 讨论

食管鳞癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,化疗是其主要治疗手段之一;然而,化疗耐药是食管癌治疗失败的重要原因^[19]。顺铂和 5-FU 是食管鳞癌一线治疗药物,但由于原发性或获得性耐药,大部分患者治疗效果并不理想^[19]。因此,探究食管鳞癌细胞化疗耐药的相关机制,尤其是表观遗传学异常,可为改善并克服食管鳞癌化疗耐药性提供解决方案。

多项证据表明,脂质代谢重编程是癌症的一大标志,脂质代谢的改变与食管鳞癌进展及化疗耐药有关^[20]。AZGP1 是一种新型脂质动员因子,广泛参与癌性恶病质形成^[21]。此前有报道提示,AZGP1 的异常表达可作为肿瘤预后的重要指标^[22-23]。有研究表明 AZGP1 可通过抑制癌细胞增殖、迁移、侵袭从而发挥抑癌作用^[9-10,22]。此外,有文献报道 AZGP1 在消化系统恶性肿瘤中发挥重要作用^[24]。有研究表明,AZGP1 在食管鳞癌组织的表达降低,AZGP1 蛋白表达水平可预测食管鳞癌患者预后,且表达越低预后越差^[11-12]。本研究发现,AZGP1 在食管鳞癌细胞中呈低表达。AZGP1 过表达后,食管鳞癌细胞活性和克隆形成能力均显著降低。PUMA 是 p53 的靶基因,应激后可被诱导激活,参与 p53 依赖途径,具有强大的促凋亡功能^[25]。AZGP1 表达上调可促进细胞凋亡,并促进促凋亡蛋白 p53、PUMA、Cleaved Caspase-3 表达。深入研究结果表明,过表达 AZGP1 可明显增加食管鳞癌细胞对顺铂和 5-FU 的化疗敏感性。

作为调节脂质代谢的关键蛋白之一,FASN 在多种恶性肿瘤中过表达,且广泛参与增殖、侵袭、迁移等癌细胞恶性表型,已成为重要的肿瘤生物标志物^[9,26-27]。多项研究表明,FASN 在食管鳞癌组织和细胞中过表达,且沉默 FASN 表达可抑制食管鳞癌细胞增殖、侵袭和迁移^[14-15]。此外,已有研究发现,AZGP1 可通过下调 FASN 表达从而抑制结肠癌进展^[9]。本研究发现,在食管鳞癌细胞中过表达 AZGP1 可降低 FASN 表达。另有研究证明,抑制 FASN 表达可通过介导细胞凋亡和 DNA 修复进而增强癌细胞对顺铂和 5-FU 的化疗敏感性^[28-30]。拯救实验结果同样表明,FASN 过表达可部分恢复 AZGP1 对细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响。

据 WANG 等^[18]研究提示,FASN 能激活下游 Wnt 信号。 β -catenin 是 Wnt 信号通路中的关键调控因子,通路中的效应因子与癌症发生发展密切相关^[31]。鉴于此,众多报道已充分证实,Wnt/ β -catenin 通路激活可加快食管鳞癌进展,并引发放疗抵抗性及化疗耐药性^[32-33]。本研究结果显示,在食管鳞癌细胞中过表达 AZGP1 可降低 Wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达,抑制 Wnt/ β -catenin 信号传导;此外,添加 Wnt 通路激活剂 Wnt agonist 1 可部分恢复 AZGP1 对细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响。

综上所述,本研究证明了 AZGP1 通过抑制 FASN/Wnt/ β -catenin 通路从而抑制食管鳞癌细胞增殖、诱导细胞凋亡并增加化疗敏感性,该研究提示 AZGP1 可作为食管鳞癌潜在的分子标志物,并提高以顺铂和 5-FU 为主的联合化疗在食管鳞癌中的治疗效果。然而,关于 AZGP1 对食管鳞癌细胞迁移和侵袭的作用仍不十分清楚,需要进一步探索;此外,后续仍需要进行动物实验以进一步验证 AZGP1 对体内食管鳞癌肿瘤生长的影响。

参 考 文 献 :

- [1] UHLENHOPP D J, THEN E O, SUNKARA T, et al. Epidemiology of esophageal cancer: update in global trends, etiology and risk factors[J]. Clin J Gastroenterol, 2020, 13(6): 1010-1021.
- [2] LAM A K. Introduction: esophageal squamous cell carcinoma-current status and future advances[J]. Methods Mol Biol, 2020, 2129: 1-6.
- [3] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [4] HIRANO H, KATO K. Systemic treatment of advanced esophageal squamous cell carcinoma: chemotherapy, molecular-targeting therapy and immunotherapy[J]. Jpn J Clin Oncol, 2019, 49(5): 412-420.
- [5] LAGERGREN J, SMYTH E, CUNNINGHAM D, et al. Oesophageal cancer[J]. Lancet, 2017, 390(10110): 2383-2396.
- [6] KAUPPILA J H, MATTSSON F, BRUSSELAERS N, et al. Prognosis of oesophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma following surgery and no surgery in a nationwide Swedish cohort study[J]. BMJ Open, 2018, 8(5): e021495.
- [7] AKRIDA I, PAPADAKI H. Adipokines and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer[J]. Mol Cell Biochem, 2023. DOI: 10.1007/s11010-023-04670-x. Epub ahead of print.

- [8] LI W B, LIU J C. Overexpression of the zinc- α 2-glycoprotein accelerates apoptosis and inhibits growth via the mTOR/PTEN signaling pathway in gastric carcinoma cells[J]. Life Sci, 2020, 240: 117117.
- [9] YU W X, LING J, YU H L, et al. AZGP1 suppresses the process of colorectal cancer after upregulating FASN expression via mTOR signal pathway[J]. Gen Physiol Biophys, 2020, 39(3): 239-248.
- [10] TIAN H, GE C, ZHAO F Y, et al. Downregulation of AZGP1 by ikaros and histone deacetylase promotes tumor progression through the PTEN/Akt and CD44s pathways in hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2017, 38(2): 207-217.
- [11] TANG H, WU Y F, QIN Y R, et al. Reduction of AZGP1 predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma patients in Northern China[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 85-94.
- [12] 姚传山, 马磊, 赵旭林, 等. 锌- α 2-糖蛋白在食管鳞癌组织中的表达及预后意义[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(1): 51-54.
- [13] FHU C W, ALI A. Fatty acid synthase: an emerging target in cancer[J]. Molecules, 2020, 25(17): 3935.
- [14] ZHOU Y L, NIU C Y, LI Y D, et al. Fatty acid synthase expression and esophageal cancer[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(10): 9733-9739.
- [15] 吴银霞, 张西志, 俞俊杰, 等. siRNA 沉默脂肪酸合成酶基因表达对食管癌细胞增殖的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17(19): 7-10.
- [16] 张江兰, 骆爱萍, 黄福荣, 等. 丝氨酸蛋白酶抑制剂E2通过激活 β -catenin促进食管鳞癌细胞迁移和侵袭[J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(6): 638-645.
- [17] 郭艳丽, 尹情, 韩俊淑, 等. LINC01140 通过 miR-452-5p/Wnt/ β -catenin轴调控食管鳞状细胞癌Eca109细胞的增殖与侵袭[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(9): 900-907.
- [18] WANG H Y, XI Q L, WU G H. Fatty acid synthase regulates invasion and metastasis of colorectal cancer via Wnt signaling pathway[J]. Cancer Med, 2016, 5(7): 1599-1606.
- [19] LOHAN-CODEÇO M, BARAMBO-WAGNER M L, NASCIUTTI L E, et al. Molecular mechanisms associated with chemoresistance in esophageal cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(2): 116.
- [20] CAI X L, LIANG C, ZHANG M Z, et al. N6-methyladenosine modification and metabolic reprogramming of digestive system malignancies[J]. Cancer Lett, 2022, 544: 215815.
- [21] RUSSELL S T, ZIMMERMAN T P, DOMIN B A, et al. Induction of lipolysis *in vitro* and loss of body fat *in vivo* by zinc- α 2-glycoprotein[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1636(1): 59-68.
- [22] TIAN B R, HAN X Y, LI G Z, et al. A long intergenic non-coding RNA, LINC01426, promotes cancer progression via AZGP1 and predicts poor prognosis in patients with LUAD[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020, 18: 765-780.
- [23] LUO H, MA C. Identification of prognostic genes in uveal melanoma microenvironment[J]. PLoS One, 2020, 15(11): e0242263.
- [24] 李雯, 王正根. AZGP1在消化系统恶性肿瘤中的研究进展[J]. 西南军医, 2019, 21(1): 48-51.
- [25] WANG J, THOMAS H R, LI Z, et al. Puma, noxa, p53, and p63 differentially mediate stress pathway induced apoptosis[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(7): 659.
- [26] ZHANG H Y, WANG R M, TANG X R, et al. FASN targeted by miR-497-5p regulates cell behaviors in cervical cancer[J]. Nutr Cancer, 2022, 74(8): 3026-3034.
- [27] HE Y H, XU S F, QI Y, et al. Long noncoding RNA SNHG25 promotes the malignancy of endometrial cancer by sponging microRNA-497-5p and increasing FASN expression[J]. J Ovarian Res, 2021, 14(1): 163.
- [28] PAPAEOVANGELOU E, ALMEIDA G S, BOX C, et al. The effect of FASN inhibition on the growth and metabolism of a cisplatin-resistant ovarian carcinoma model[J]. Int J Cancer, 2018, 143(4): 992-1002.
- [29] AL-BAHLANI S, AL-LAWATI H, AL-ADAWI M, et al. Fatty acid synthase regulates the chemosensitivity of breast cancer cells to cisplatin-induced apoptosis[J]. Apoptosis, 2017, 22(6): 865-876.
- [30] WU X, QIN L, FAKO V, et al. Molecular mechanisms of fatty acid synthase (FASN) -mediated resistance to anti-cancer treatments[J]. Adv Biol Regul, 2014, 54: 214-221.
- [31] YU F Y, YU C H, LI F F, et al. Wnt/ β -catenin signaling in cancers and targeted therapies[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 307.
- [32] ZHANG H F, SI J X, YUE J, et al. The mechanisms and reversal strategies of tumor radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2021, 147(5): 1275-1286.
- [33] SPITZNER M, EMONS G, SCHÜTZ K B, et al. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling sensitizes esophageal cancer cells to chemoradiotherapy[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10301.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 刘犇, 高超, 刘泽远, 等. AZGP1通过FASN/Wnt/ β -catenin通路对食管鳞癌细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(5): 19-31.

Cite this article as: LIU B, GAO C, LIU Z Y, et al. Effect of AZGP1 on proliferation, apoptosis and chemosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells via FASN/Wnt/ β -catenin signaling[J]. China Journal of Modern Medicine, 2024, 34(5): 19-31.