

# IKBKE 沉默对食管鳞癌细胞生物学行为的影响

王佳佳<sup>1</sup>, 王军<sup>2</sup>, 姜黄<sup>1</sup>

(河南中医药大学第五临床医学院郑州人民医院 1.病理科;2.妇科, 郑州 450003)

**摘要** 目的:探讨核因子(NF)κB 激酶亚单位 ε 抑制剂(IKBKE)在食管鳞状细胞癌(ESCC)中的表达及其沉默对 KYSE-30 细胞生物学行为的影响。方法:收集自 2020 年 6 月至 2023 年 6 月开展 ESCC 根治术的 30 例患者的癌组织以及癌旁组织,并分为 ESCC 组( $n=30$ )与对照组( $n=30$ )。运用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)与蛋白质印迹法(WB)检测 ESCC 组及对照组中的 IKBKE mRNA 与蛋白水平,并分析 ESCC 组中的 IKBKE mRNA 以及蛋白水平与 ESCC 患者临床病理特征(性别、年龄与肿瘤的 TNM 分期、分化、浸润深度及是否转移)的关系。将培养的 ESCC 细胞系 KYSE-30 细胞随机分为空白对照组(无任何处理)、NC-IKBKE 组(转染 NC-siRNA)、si-IKBKE 组(转染 IKBKE-siRNA)。CCK-8 法检测 KYSE-30 细胞增殖能力;流式细胞术检测 KYSE-30 细胞凋亡率;划痕法检测 KYSE-30 细胞迁移能力;Transwell 法检测 KYSE-30 细胞侵袭能力;采用 qRT-PCR 及 WB 检测 KYSE-30 细胞中 IKBKE mRNA 及蛋白水平;采用 WB 检测 KYSE-30 细胞中 NF-κB 通路关键蛋白 NF-κB p65、磷酸化核因子 κB 抑制蛋白 α(p-IκBα)表达水平。结果:ESCC 组 IKBKE 的 mRNA 及蛋白表达水平均显著高于对照组( $t=9.769, 12.960$ , 均  $P=0.000$ );IKBKE 在 ESCC 组的 mRNA 及蛋白水平与 ESCC 的肿瘤的分化程度、TNM 分期及转移有关( $t=2.070-2.829$ , 均  $P<0.05$ ),而与其与性别、年龄、浸润深度无关(均  $P>0.05$ );与 NC-IKBKE 组相比,si-IKBKE 组 KYSE-30 细胞中的 IKBKE 的 mRNA 以及蛋白水平均显著降低( $F=77.244, 78.436$ , 均  $P=0.000$ );成功沉默 IKBKE 表达的 KYSE-30 细胞系后,与 NC-IKBKE 组相比,si-IKBKE 组细胞的 48、72 h 细胞增殖能力及 24、48 h 细胞迁移率均显著下降( $F=12.355-44.755$ , 均  $P<0.05$ ),与 NC-IKBKE 组比较,si-IKBKE 组 48 h 细胞侵袭抑制率、细胞凋亡率均明显增加( $F=155.436, 46.360$ , 均  $P=0.000$ );si-IKBKE 组的 NF-κB p65、p-IκBα 的蛋白表达水平均显著低于 NC-IKBKE 组( $F=139.206, 55.551$ , 均  $P=0.000$ )。结论:ESCC 组织中的 IKBKE 表达水平显著高于癌旁组织,且与肿瘤的分化程度、TNM 分期及转移有关,沉默 IKBKE 可显著抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移以及侵袭能力,促进细胞凋亡,其机制可能与 IKBKE 调控 NF-κB 通路有关。

**关键词** 核因子 κB 激酶亚单位 ε 抑制剂;食管鳞癌;KYSE-30 细胞;增殖;迁移;侵袭

中图分类号 R735.1

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)04-0316-07

## Effects of IKBKE silencing on the biological behavior of esophageal squamous cell carcinoma cells

WANG Jiajia<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, JIANG Huang<sup>1</sup>

(1.Department of Pathology; 2.Department of Gynecology, The Fifth Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract Objective:** To investigate the expression of nuclear factor(NF)-κB kinase subunit ε inhibitor(IKBKE) in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) and the effect of IKBKE silencing on the biological behavior of KYSE-30 cell. **Methods:** The cancer tissues and adjacent tissues of 30 patients who underwent radical ESCC operation in our hospital from June 2020 to June 2023 were collected and divided into ESCC group( $n=30$ ) and control group( $n=30$ ). Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR) and Western blotting(WB) were used to detect IKBKE mRNA and protein levels in ESCC group and control group. The relationship between IKBKE mRNA and protein levels and clinicopathological characteristics of ESCC patients (gender, age, TNM stage, differentiation, depth of invasion and metastasis) was analyzed. The cultured ESCC cell line KYSE-30 cells were randomly divided into blank control group(without any treatment), NC-IKBKE group(transfected with NC-siRNA) and si-IKBKE group(transfected with IKBKE-siRNA). CCK-8 assay was used to detect the proliferation of KYSE-30 cells. The apoptosis rate of KYSE-30 cells was detected by flow cytometry. The migration ability of KYSE-30 cells was detected by scratch assay. Transwell assay was used to detect the invasion ability of KYSE-30 cells. QRT-PCR and WB were used to detect the mRNA and protein levels of IKBKE in KYSE-30 cells. WB was used to detect the expression levels of NF-κB pathway key protein including NF-κB p65 and phosphorylated nuclear factor-κB inhibitor protein α(p-IκBα) in KYSE-30 cells. **Results:** The expression levels of IKBKE mRNA and protein in ESCC group were significantly higher than those in control group( $t=9.769, 12.960$ , all  $P=0.000$ ). The mRNA and protein levels of IKBKE in ESCC group were related to the degree of tumor differentiation, TNM stage and metastasis( $t=2.070-2.829$ , all  $P<0.05$ ), but not related to gender, age and depth of invasion(all  $P>0.05$ ). Compared with the NC-IKBKE group, the mRNA and protein levels of IKBKE

基金项目 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20210706)

作者简介 王佳佳(1987-),女,学士,主治医师,研究方向:消化道肿瘤;通信作者:姜黄, E-mail:jiaahuang@126.com。

in KYSE-30 cells of the si-*IKBKE* group were significantly decreased ( $F=77.244, 78.436$ , all  $P=0.000$ ). After successfully silencing *IKBKE* expression in KYSE-30 cell line, compared with NC-*IKBKE* group the 48 h and 72 h cell proliferation ability and 24 h and 48 h cell migration rate in the si-*IKBKE* group were significantly decreased ( $F=12.355-44.755$ , all  $P<0.05$ ). Compared with the NC-*IKBKE* group the cell invasion inhibition rate and apoptosis rate in the si-*IKBKE* group were significantly increased at 48 h ( $F=155.436, 46.360$ , all  $P=0.000$ ). The protein expression levels of NF- $\kappa$ B p65 and p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  in the si-*IKBKE* group were significantly lower than those in the NC-*IKBKE* group ( $F=139.206, 55.551$ , all  $P=0.000$ ). **Conclusion:** The expression level of *IKBKE* in ESCC tissues is significantly higher than that in adjacent tissues, which is related to the degree of tumor differentiation, TNM stage and metastasis. *IKBKE* silencing can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of ESCC cells and promote cell apoptosis, which may be related to *IKBKE* regulating the NF- $\kappa$ B pathway.

**Key words** nuclear factor- $\kappa$ B kinase subunit  $\epsilon$  inhibitor; esophageal squamous cell carcinoma; KYSE-30 cell; proliferation; migration; invasion

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)是我国主要的食管癌类型,虽近年发病率呈逐年下降趋势,但依然高于全球平均水平<sup>[1]</sup>。随着医疗水平的不断提高,ESCC 的治疗效果得到很大程度的提升,但因缺乏有效的早期诊断标志物与抑制肿瘤转移的治疗靶点,ESCC 患者的预后较差<sup>[2]</sup>。因此,筛选出有效的标志物对于 ESCC 患者早期诊断以及预后预测具有重要价值。核因子(NF) $\kappa$ B 激酶亚单位  $\epsilon$  抑制剂 (Nuclear factor- $\kappa$ B kinase subunit  $\epsilon$  inhibitor, *IKBKE*)属于非经典抑制  $\kappa$ B (inhibitor  $\kappa$ B,  $\text{I}\kappa\text{B}$ )激酶,可通过调控多种信号通路抑制肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭,促进细胞凋亡。近年来,已有研究表明 *IKBKE* 在人乳腺癌、脑胶质瘤等肿瘤中表达异常,并在肿瘤的病理进程中起着关键作用,其可能作为肿瘤潜在的治疗靶点<sup>[3-4]</sup>。既往黄璐等<sup>[5]</sup>研究已表明 *IKBKE* 在 ESCC 组织中高表达,且与患者术后复发转移密切相关,其可作为 ESCC 患者潜在的治疗靶点。然而,*IKBKE* 在 ESCC 组织与细胞作用及相关机制的研究目前尚不明确。基于此,本研究进一步探讨 *IKBKE* 在 ESCC 组织中的表达及其沉默对 ESCC 细胞生物行为学的影响,旨在为后期 ESCC 的临床靶点治疗奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 临床材料** 收集 2020 年 6 月至 2023 年 6 月行 ESCC 根治术的 30 例患者,留取患者的 ESCC 病灶组织以及对应的癌旁组织(距癌组织 $\leq 5$  cm)作为对照。纳入标准:(1)经病理活检诊断为 ESCC。(2)术前均未经过放疗与化疗。(3)无合并其原发性肿瘤。其中男性 17 例,女性 13 例,年龄平均( $62.37\pm 8.16$ )岁;高分化 3 例,中分化 10 例,低分化 17 例;TNM 分期, I ~ II 期 14 例, III ~ IV 期 16 例;淋巴转移 18 例,无淋巴转移 12 例;浸润深度 T1~T2 13 例, T3~T4 17 例。本研究患者均对本研究知情同意,且本研究通过本院的伦理委员会审核(伦理审批号:2023011146)。

**1.2 主要材料与试剂** 人 ESCC 细胞系 KYSE-30 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库;RP-MI1640 培养基、胰酶、青链霉素(购自 Hyclone);胎牛血清(美国 Gibco);TRIzol 试剂、反转录试剂盒(日本 TaKaRa);实时荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo);Matrigel 胶及 Transwell 小室(美国 Corning);TRIzol 试剂及 Lipofectamine2000(美国 Invitrogen);*IKBKE*-siRNA 及 NC-siRNA 质粒(上海吉凯基因);兔抗 *IKBKE*、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、NF- $\kappa$ B p65、磷酸化 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$ (phosphonated inhibitor of NF- $\kappa$ B  $\alpha$ , p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ )、Tubulin 抗体(美国 Abcam);HRP 标记的山羊抗兔二抗、CCK-8 试剂盒、细胞凋亡试剂盒(北京索莱宝);引物序列由上海生工生物公司合成。

## 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养、分组及转染** 将人 ESCC 细胞株用含 10%FBS、1%双抗(100 U/mL 青霉素及 100 mg/L 链霉素)的 RPMI-1640 完全培养基置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。每 2~3 d 换液 1 次,当细胞生长至 90%密度时,0.25%胰酶消化按照 1:3 的比例进行传代培养,取对数生长期的第三代细胞进行后续实验。将细胞分为空白对照组(不做任何处理),NC-*IKBKE* 组(转染 NC-siRNA 质粒),si-*IKBKE* 组(转染 *IKBKE*-siRNA 质粒)。si-RNA 转染方法:取对数生长期的细胞经过胰酶消化、洗涤,离心、重悬,取  $5\times 10^4$  mL 细胞悬液接种无抗生素的 6 孔板中培养,待细胞生长至 50%~60%密度时,分别取 4  $\mu$ L *IKBKE*-siRNA 质粒溶于 250  $\mu$ L 无血清培养基混匀,取 10  $\mu$ L 的 lipo2000 溶于 250  $\mu$ L 无血清培养基,室温放置 5 min,将以上两种混合液混匀室温放置 20 min 后均匀加入到 6 孔板细胞液中,置于培养箱中继续培养 4~6 h,更换无双抗新鲜培养基

继续培养,NC-IKBKE 组转染 NC-siRNA,方法同上。培养至 24~72 h 进行相应实验。

**1.3.2 qRT-PCR 法测定 IKBKE 表达水平** 收集 30 例患者癌组织、癌旁组织与各组转染培养 48 h 细胞,使用 TRIzol 法提取总 RNA,依据反转录试剂盒将其转录为 cDNA,运用 qRT-PCR 检测 IKBKE 表达,反应条件:95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s 共 40 个循环,IKBKE 上游引物:5'-TGCGTGCAGAAGTATCAAGC-3',下游引物:5'-TACAGGCAGCCACAGAACAG-3';GAPDH 内参上游引物:5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',下游引物 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3';计算 IKBKE 基因的 mRNA 相对表达量。

**1.3.3 蛋白质免疫印迹(Western blotting, WB)法测定 IKBKE 相关蛋白表达水平** 收集 30 例患者癌组织以及癌旁组织,以及各组转染培养 48 h 细胞,分别提取组织与各组细胞总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加入 loading buffer 煮沸 5 min,取 30 μg 蛋白溶液进行 SDS-PAGE(80 V 30 min、100 V 90 min),电泳结束后将蛋白转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,洗膜 3 次,一抗[兔抗 IKBKE(1:10 000)、NF-κB p65(1:10 000)、p-IκBα(1:10 000)、GAPDH(1:10 000)、Tubulin(1:5 000)]4℃ 孵育过夜;二抗[山羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000)]室温避光孵育 2 h;ECL 法进行显色,使用凝胶成像仪拍照观察组织与细胞中 IKBKE 蛋白表达,以及细胞中 NF-κB p65、p-IκBα 蛋白表示情况,并采用 Image J 软件依据蛋白条带灰度值分析 IKBKE、NF-κB p65、p-IκBα 蛋白的相对表达量。

**1.3.4 CCK-8 检测细胞的增殖** 待转染后的各组细胞稳定后,将其经消化、洗涤、重悬,调整浓度至  $3 \times 10^4$  /mL 接种至 96 孔板中,在 37℃ 下培养 24、48、72 h 后,每孔均加入 10 μL CCK-8 试剂继续培养 2 h,检测各孔细胞在 450 nm 处的 OD 值,分析细胞的增殖能力,实验重复 3 次。

**1.3.5 划痕愈合法检测细胞迁移能力** 将各组细胞接种至 6 孔板中,转染后继续培养 24 h,用 10 μL 枪头做划痕愈合实验,之后用 PBS 洗去脱落细胞,分别于划痕后的 0、24、48 h 拍照观察划痕宽度。计算各组细胞的迁移率。细胞迁移率(%)=(0 h 划痕距离-48 h 划痕距离)/(0 h 划痕距离)×100%。实验重复 3 次。

**1.3.6 Transwell 法检测细胞侵袭能力** 细胞转染后继续培养 24 h,消化细胞,用无血清的培养基稀释至细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/mL,用预冷 RPMI1640 培养基按照 1:8 的比例稀释 Matrigel 基质胶,向已被

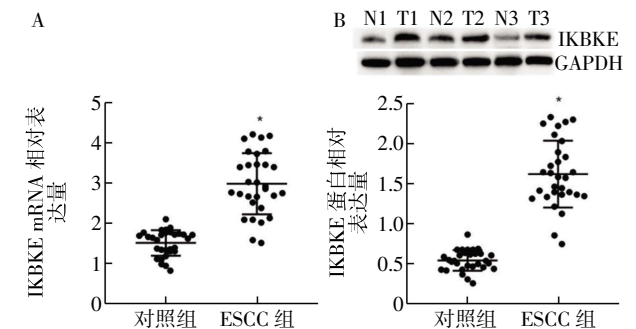
置入基质胶的上室加入 200 μL 细胞悬液,下室加入 600 μL 含 10%FBS 培养基,37℃ 继续培养 48 h,吸去上室培养液,4%的多聚甲醛组织固定液固定 30 min,PBS 洗 2 遍,1%结晶紫染液于 24 孔板中 30 min,PBS 洗涤 3 次并倒置风干,倒置显微镜下观察细胞穿膜情况。每张膜选 5 个视野拍照,计算平均细胞数,计算各组细胞侵袭抑制率。细胞侵袭抑制率(%)=(对照组穿膜细胞数-观察组穿膜细胞数)/对照组穿膜细胞数×100%。

**1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡** 待各组细胞转染后培养 48 h 后,常规消化处理,洗涤,制备细胞悬液(浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL),加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀,4℃ 避光孵育 30 min,再加入 10 μL PI,4℃ 避光孵育 5 min,最后加入 400 μL 缓冲液,上机采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

**1.4 统计学处理** 使用 SPSS22.0 软件进行数据分析,计量资料且符合正态分布则运用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间数据比较使用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ESCC 组织及其癌旁组织中的 IKBKE 的表达水平** 经 qRT-PCR 及 WB 结果显示,ESCC 组中的 IKBKE 的 mRNA 及蛋白表达水平均显著高于对照组( $t=9.769$ 、 $12.960$ ,均  $P=0.000$ ),见图 1。



注:A:qRT-PCR 检测组织中 IKBKE mRNA 水平;B:Western 印迹检测组织 IKBKE 蛋白水平,N 表示癌旁组织,T 表示癌组织;与对照组相比,\* $P < 0.05$

图 1 qRT-PCR 及 WB 法检测 ESCC 组织及其癌旁组织中的 IKBKE 的表达

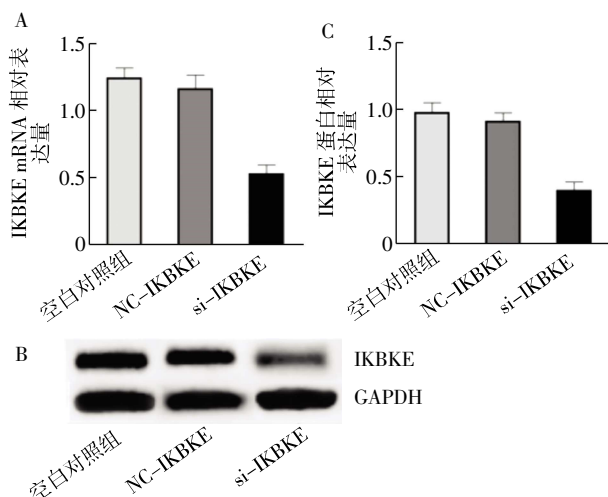
Fig.1 The expression of IKBKE in ESCC tissues and adjacent tissues detected by qRT-PCR and WB

**2.2 IKBKE 表达水平与 ESCC 患者临床病理特征的关系** 结果显示,IKBKE 在 ESCC 组织中的 mRNA 以及蛋白表达水平与 ESCC 患者的性别、年龄、浸润深度比较均无显著差异(均  $P > 0.05$ ),而与肿瘤分化程度、TNM 分期以及是否转移比较均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表1 IKBKE 表达与 ESCC 患者临床病理特征的关系( $\bar{x} \pm s$ )Tab.1 Relationship between the expression of IKBKE and clinical pathological characteristics of patients with ESCC( $\bar{x} \pm s$ )

临床指标	例数 (n=30)	IKBKE- mRNA	t/P	IKBKE 蛋白	t/P
性别					
女	13	3.02±0.74	0.235/0.816	1.55±0.43	0.887/0.383
男	17	2.96±0.81		1.69±0.42	
年龄(岁)					
≤60	12	2.96±0.62	0.157/0.876	1.53±0.38	1.038/0.308
>60	18	3.00±0.86		1.69±0.44	
分化程度					
高~中分化	13	2.63±0.68	2.395/0.024	1.45±0.36	2.070/0.048
低分化	17	3.26±0.73		1.76±0.42	
TNM					
I~II期	14	2.61±0.65	2.829/0.009	1.43±0.36	2.646/0.013
III~IV期	16	3.32±0.72		1.80±0.40	
转移					
是	18	3.22±0.79	2.231/0.034	1.75±0.40	2.157/0.040
否	12	2.63±0.57		1.44±0.38	
浸润深度					
T1~T2	13	2.83±0.78	0.985/0.333	1.56±0.38	0.779/0.433
T3~T4	17	3.11±0.75		1.68±0.45	

2.3 ESCC 细胞系 KYSE-30 中 IKBKE 的表达水平 qRT-PCR 及 WB 结果显示,与 NC-ICKBKE 组相比, si-ICKBKE 组细胞中的 IKBKE mRNA 以及蛋白水平均显著降低( $F=77.244, 78.436$ , 均  $P=0.000$ ),空白对照组与 NC-ICKBKE 组的细胞 IKBKE mRNA 以及蛋白水平均无明显差异( $P>0.05$ ),见图 2。



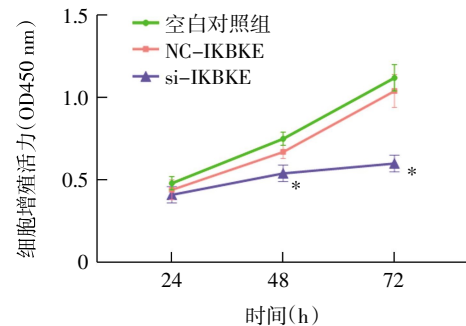
注:A:qRT-PCR 检测各组 KYSE-30 细胞中 IKBKE mRNA 表达水平;B:Western 印迹检测 KYSE-30 各组细胞中 IKBKE 蛋白表达情况;C:Western 印迹检测 KYSE-30 各组细胞中 IKBKE 蛋白表达水平;与 NC-ICKBKE 组相比,\* $P<0.05$

图2 qRT-PCR 及 Western 印迹法检测 KYSE-30 细胞中 IKBKE 表达水平

Fig.2 The expression of IKBKE in KYSE-30 cell detected by qRT-PCR and Western blotting

2.4 沉默 IKBKE 对 ESCC 细胞株 KYSE-30 增殖能力的影响 CCK-8 检测结果显示,空白对照与 NC-ICKBKE 组 24、48、72 h 的细胞增殖能力比较差

异无统计学意义(均  $P>0.05$ ),与 NC-ICKBKE 组相比, si-ICKBKE 组的 KYSE-30 细胞 24 h 增殖能力无明显差异( $P>0.05$ ),而 48、72 h 时,si-ICKBKE 组的 KYSE-30 细胞增殖能力均显著下降( $F=18.547, 36.518$ ,  $P=0.003, 0.000$ ),见图 3。

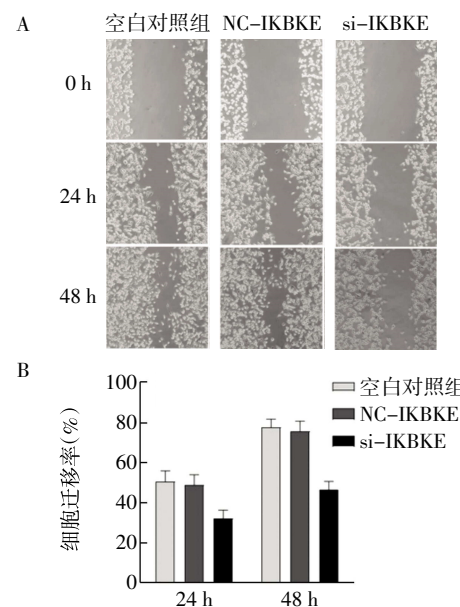


注:与 NC-ICKBKE 组相比,\* $P<0.05$

图3 CCK-8 法检测 KYSE-30 细胞增殖能力

Fig.3 The proliferative ability of KYSE-30 cells detected by CCK-8 assay

2.5 沉默 IKBKE 对 ESCC 细胞株 KYSE-30 迁移能力的影响 划痕实验结果显示,空白对照与 NC-ICKBKE 组的 24 与 48 h 的细胞迁移率比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),与 NC-ICKBKE 组相比, si-ICKBKE 组 24、48 h 的细胞迁移率均显著降低( $F=12.355, 44.755$ ,  $P=0.007, 0.000$ ),见图 4。



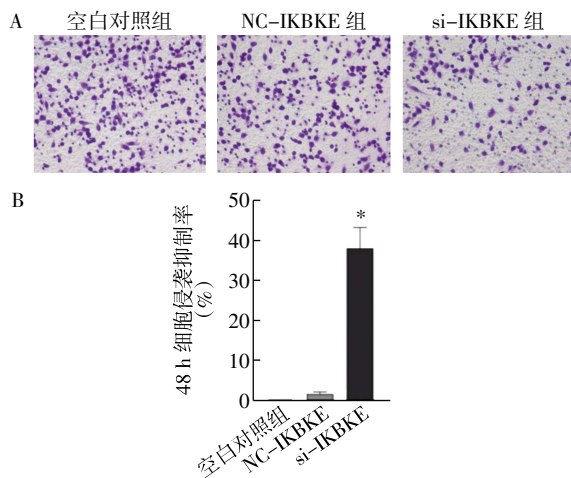
注:A:各组 KYSE-30 细胞的划痕变化情况;B:各组 KYSE-30 细胞的细胞迁移率;与 NC-ICKBKE 组相比,\* $P<0.05$

图4 划痕愈合法检测 KYSE-30 细胞迁移能力

Fig.4 The migration ability of KYSE-30 cells detected by scratch healing method

2.6 沉默 IKBKE 对 ESCC 细胞株 KYSE-30 的细胞侵袭能力的影响 Transwell 实验结果显示,空白对照组与 NC-ICKBKE 组 48 h 的细胞侵袭抑制率比

较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),与 NC-IKBKE 组相比,si-IKBKE 组 48 h 的细胞侵袭抑制率显著增加( $F=155.436, P=0.000$ ),见图 5。

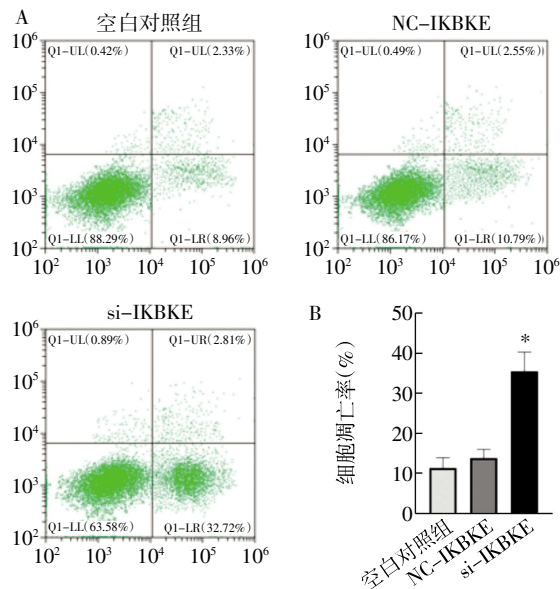


注:A:各组 KYSE-30 细胞的侵袭情况;B:各组 KYSE-30 细胞的侵袭抑制率;与 NC-IKBKE 组相比,\* $P<0.05$

图 5 Transwell 法检测 KYSE-30 细胞侵袭能力

Fig.5 The invasive ability of KYSE-30 cells detected by Transwell assay

2.7 沉默 IKBKE 对 ESCC 细胞株 KYSE-30 的细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示,空白对照组与 NC-IKBKE 组的细胞凋亡率比较无显著差异( $P>0.05$ ),与 NC-IKBKE 组相比,si-IKBKE 组的细胞凋亡率均显著增加( $F=46.360, P=0.000$ ),见图 6。



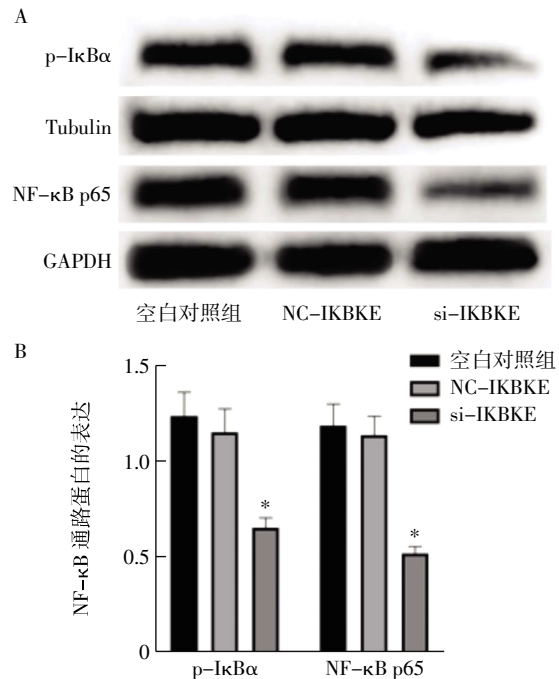
注:A:各组 KYSE-30 细胞的细胞凋亡情况;B:各组 KYSE-30 细胞的细胞凋亡率;与 NC-IKBKE 组相比,\* $P<0.05$

图 6 流式细胞术检测 KYSE-30 细胞凋亡率

Fig.6 The apoptosis rate of KYSE-30 cells detected by flow cytometry

2.8 沉默 IKBKE 对 ESCC KYSE-30 细胞中 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白的影响 为了验证 IKBKE 对

KYSE-30 细胞的增殖、迁移、侵袭以及凋亡生物行为学的潜在机制,本研究通过 WB 检测了 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白的表达情况,结果显示,与 NC-IKBKE 组相比,si-IKBKE 组的 NF- $\kappa$ B p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平均显著降低( $F=139.206, 55.551$ ,均  $P=0.000$ ),见图 7。



注:A:各组 KYSE-30 细胞中 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达情况;B:各组 KYSE-30 细胞中 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达水平;与 NC-IKBKE 相比,\* $P<0.05$

图 7 Western 印迹检测 KYSE-30 细胞中 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达

Fig.7 The expression of NF- $\kappa$ B pathway related proteins in KYSE-30 cells detected by Western blotting

### 3 讨论

ESCC 作为临床常见的食管癌组织类型,其发生、发展过程可涉及多因素、多基因以及多通路的调控,但具体机制仍不完全明确。ESCC 患者预后不佳,其术后 5 年的生存率低于 50%,病死率较高<sup>[6]</sup>。因该病早期不易察觉,其浸润与转移是导致治疗失败及患者死亡的主要原因,因此,在早期 ESCC 制定特异性诊疗方案以及找出潜在治疗靶点对改善患者预后具有重要意义。近年来,随着学者不断的研究发现,蛋白激酶在肿瘤的诸多方面扮演着重要角色,并已成为临床治疗中的潜在靶点。其中,IKBKE 又称 IKK $\epsilon$ 、IKK-i,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 IKK 激酶家族成员(IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 、IKK $\gamma$ 、IKBKE、TBK1)之一。近年来的研究表明,IKBKE 不单在炎症因子的激活、代谢性疾病以及细胞免疫的进展中发挥关键的调控作用,而且在多种恶性肿瘤的发

生、发展中也发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。研究表明,IKBKE 导致肿瘤发生的有关机制为:(1)NF- $\kappa$ B 通路是炎症免疫反应、细胞增殖、迁移与侵袭等重要调控者,IKBKE 所组成的复合体是 NF- $\kappa$ B 通路激活的关键,其可经磷酸化 I $\kappa$ B,消除 I $\kappa$ B 对 NF- $\kappa$ B 的抑制作用,使 NF- $\kappa$ B 入核,进而使与肿瘤发生、发展相关的 NF- $\kappa$ B 靶基因的转录过程被激活,促使疾病的进展。(2)IKBKE 可激活 AKT 相关信号通路,如 AKT/mTOR/S6K 通路,促进肿瘤细胞增殖、迁移等。(3)IKBKE 还可通过激活 Hippo 信号通路,增加该通路关键蛋白如 Yes 相关蛋白 1(YAP1)和 TEAD 家族蛋白 2(TEAD2)的表达,诱导上皮间充质转化过程,进而促进肿瘤细胞的侵袭、迁移等。(4)IKBKE 还可通过磷酸化 FOXO3a 或 Snail1 转录因子,进而促进肿瘤的发生<sup>[3,8-11]</sup>。已有研究证实 IKBKE 在胰腺癌、结直肠癌、乳腺癌等多种癌组织中高表达,且与患者的预后密切相关<sup>[11-13]</sup>。而目前有关 IKBKE 在 ESCC 表达及其相关机制研究鲜有报道。

本研究对比 30 例 ESCC 患者的癌组织及其癌旁组织中的 IKBKE 表达发现,ESCC 组织中的 IKBKE 的 mRNA 及蛋白表达水平均显著高于癌旁组织,说明 IKBKE 与 ESCC 的发生、发展有关。另外,本研究将 IKBKE 在组织中的表达水平与患者临床病理特征进行分析,结果显示,肿瘤分化程度越低、TNM 分期越高以及肿瘤转移的 ESCC 患者,IKBKE 的表达水平显著增加,说明 IKBKE 与 ESCC 的分化程度、TNM 分期及其转移密切相关,提示 IKBKE 可能具有促进 ESCC 侵袭及转移的作用。余冬<sup>[14]</sup>研究显示,敲低 IKBKE 表达后,可有效降低胰腺癌细胞增殖、迁移以及侵袭能力。郭高超<sup>[15]</sup>研究显示沉默 IKBKE 可有效抑制人胶质瘤细胞的增殖能力,且敲低 IKBKE 后可明显抑制小鼠颅内肿瘤生长,延长小鼠的生存时间。为进一步了解 IKBKE 对 ESCC 的生物学作用,本研究通过瞬时转染 IKBKE-siRNA 至 KYSE-30 细胞,经 qRT-PCR 及 WB 测定转染后细胞中 IKBKE 的表达,结果显示 si- $\text{IKBKE}$  组的 IKBKE mRNA 及蛋白表达水平均明显低于 NC- $\text{IKBKE}$  组与空白对照组,说明转染效果较好,成功沉默 KYSE-30 细胞中 IKBKE 表达量。通过细胞增殖、迁移、划痕、侵袭以及凋亡实验检测 IKBKE 对 ESCC 细胞的生物学行为的影响,结果显示,si- $\text{IKBKE}$  组的细胞增殖能力、细胞迁移能力均显著低于 NC- $\text{IKBKE}$  组,而其细胞侵袭抑制率、细胞凋亡率均明显高于 NC- $\text{IKBKE}$  组,说明沉默 IKBKE 表达可有效抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移及侵袭能力,促进细

胞凋亡,有助于患者预后。

目前,关于 IKBKE 对 ESCC 作用的有关机制尚不清楚。既往研究表明,NF- $\kappa$ B 通路的激活是导致多种肿瘤发生、发展的关键,而 IKBKE 被认为是促使 NF- $\kappa$ B 激活的重要效应因子<sup>[16]</sup>。正常情况下,NF- $\kappa$ B 因子与 I $\kappa$ B 家族成员如 I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$ 、I $\kappa$ B $\varepsilon$  等滞留在细胞质中,形成复合物,导致 NF- $\kappa$ B 失活。而当肿瘤细胞微环境发生变化时,由 IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$  和 IKK $\gamma$  组成的复合物可直接磷酸化 I $\kappa$ B 蛋白,使其泛素化降解,从而释放出 NF- $\kappa$ B,使其进入细胞核,进而激活 NF- $\kappa$ B 通路。既往研究显示,IKBKE 可通过上调磷酸化的 I $\kappa$ B $\alpha$  的 Ser-32、Ser-36 位点,激活 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[17]</sup>。郭彩丽<sup>[18]</sup>研究显示 IKBKE 可直接磷酸化 p65,增强 NF- $\kappa$ B 活化,促进肿瘤细胞增殖。Guo 等<sup>[19]</sup>指出 IKBKE 通过上调 AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路,增强胶质母细胞瘤对替莫唑胺化疗耐药性。IKBKE 还通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,促进乳腺癌的发生和进展<sup>[20]</sup>。本研究通过 WB 检测 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白的表达情况,结果显示,si- $\text{IKBKE}$  组细胞的 NF- $\kappa$ B p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平均显著低于 NC- $\text{IKBKE}$  组。说明沉默 IKBKE 可显著下调 NF- $\kappa$ B 通路蛋白的表达水平,提示下调 IKBKE 抑制 ESCC 细胞增殖、迁移、侵袭能力,促进细胞凋亡可能与通过调控 NF- $\kappa$ B 通路的分子机制有关。

综上所述,IKBKE 参与 ESCC 的发生、发展,进一步的机制研究显示 IKBKE 可能通过调控 NF- $\kappa$ B 通路影响 ESCC 细胞的增殖、凋亡、迁移以及侵袭能力。IKBKE 有望成为 ESCC 的治疗的新靶点、新方向。此外,针对 IKBKE 在 ESCC 其他细胞系或其体内相关分子机制研究将在后续的研究中开展。

#### 参考文献:

- [1] LIU Z,ZHAO Y,KONG P,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.
- [2] 梁佳,吴璇,邝钢,等. lncRNA NUP50-AS1 在食管鳞癌组织中的表达及其对 Eca109 细胞恶性生物学行为的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*,2018,25(12):1290-1295.
- [3] XIE W,JIANG Q,WU X,et al. IKBKE phosphorylates and stabilizes Snail to promote breast cancer invasion and metastasis[J]. *Cell Death Differ*,2022,29(8):1528-1540.
- [4] XIONG J,GUO G,GUO L,et al. Amlexanox enhances temozolomide-induced antitumor effects in human glioblastoma cells by inhibiting IKBKE and the Akt-mTOR signaling pathway[J]. *ACS Omega*,2021,6(6):4289-4299.
- [5] 黄璐,王凯,任玉峰. IKBKE 在食管鳞癌中的表达及临床意义[J]. *中国中西医结合消化杂志*,2019,27(2):101-105.
- [6] YANG T,HUI R,NOUWS J,et al. Untargeted metabolomics analysis of esophageal squamous cell cancer progression[J]. *J Transl Med*,

- 2022,20(1):127.
- [7] YIN M, WANG X, LU J. Advances in IKBKE as a potential target for cancer therapy[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(1):247-258.
- [8] MESSEHA S S, ZARMOUH N O, ANTONIE L, et al. Sanguinarine inhibition of TNF- $\alpha$ -induced CCL2, IKBKE/NF- $\kappa$ B/ERK1/2 signaling pathway, and cell migration in human triple-negative breast cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15):8329.
- [9] GÖKTUNA S İ. IKBKE inhibits TSC1 to activate the mTOR/S6K pathway for oncogenic transformation[J]. *Turk J Biol*, 2018, 42(4):268-278.
- [10] BAINBRIDGE A, WALKER S, SMITH J, et al. IKBKE activity enhances AR levels in advanced prostate cancer via modulation of the Hippo pathway[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(10):5366-5382.
- [11] CHALLA S, HUSAIN K, KIM R, et al. Targeting the I $\kappa$ B kinase enhancer and its feedback circuit in pancreatic cancer [J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(2):481-489.
- [12] REMOLI A L, SGARBANTI M, PERROTTI E, et al. I $\kappa$ B kinase- $\varepsilon$ -mediated phosphorylation triggers IRF-1 degradation in breast cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2020, 22(10):459-469.
- [13] CATALANO C, DA SILVA FILHO M I, FRANK C, et al. Epistatic effect of TLR3 and cGAS-STING-IKK $\varepsilon$ -TBK1-IFN signaling variants on colorectal cancer risk[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(4):1473-1484.
- [14] 余冬. IKBKE 在胰腺癌中的表达及其对胰腺癌生物学行为的影响[D]. 天津医科大学, 2020.
- [15] 郭高超. IKBKE 通过磷酸化 Amotl2 促进 YAP1 的表达调控脑胶质瘤恶性进展的机制研究[D]. 天津医科大学, 2020.
- [16] 李俊, 余冬, 孔德刚, 等. IKBKE 和 NF- $\kappa$ B 在胰腺癌中的表达及沉默 IKBKE 对胰腺癌细胞增殖、迁移的影响[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2020, 26(4):274-280.
- [17] ZHU M, WANG M, YANG F, et al. miR-155-5p inhibition promotes the transition of bone marrow mesenchymal stem cells to gastric cancer tissue derived MSC-like cells via NF- $\kappa$ B p65 activation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13):16567-80.
- [18] 郭彩丽. IKBKE 通过激活 AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路调控胶质瘤的生长过程及增强胶质瘤的抗药性[D]. 河南: 郑州大学, 2019.
- [19] GUO G, SUN Y, HONG R, et al. IKBKE enhances TMZ-chemoresistance through upregulation of MGMT expression in glioblastoma[J]. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(8):1252-1262.
- [20] HARQUAIL J, LEBLANC N, LANDRY C, et al. Pax-5 inhibits NF- $\kappa$ B activity in breast cancer cells through IKK $\varepsilon$  and miRNA-155 effectors[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2018, 23(3):177-187.
- (2023-12-19 收稿)

++++++  
(上接第 315 页)

- and immunotherapy: a synergistic effect in cancer care[J]. *Med J Aust*, 2019, 210(1):47-53.
- [7] WEISS T, WELLER M, GUCKENBERGER M, et al. NKG2D-based CAR T cells and radiotherapy exert synergistic efficacy in glioblastoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(4):1031-1043.
- [8] ZHANG Y, DING Z, PERENTESIS J P, et al. Can rational combination of ultra-high dose rate FLASH radiotherapy with immunotherapy provide a novel approach to cancer treatment?[J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2021, 33(11):713-722.
- [9] 柴笑, 金鑫, 赵明峰. 靶向 CLL-1 嵌合抗原受体 T 细胞的构建及其功能验证[J]. *中华血液学杂志*, 2022, 43(2):102-106.
- [10] 肖霞. 改进的放疗分割方式联合 CAR-T 细胞治疗 B 细胞淋巴瘤的作用研究[D]. 天津医科大学, 2022.
- [11] 韩为东, 张亚晶. CAR-T 细胞治疗淋巴瘤——我们仍然在路上[J]. *临床血液学杂志*, 2022, 35(9):612-615.
- [12] 赵培起, 张会来. 嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法在 B 细胞非霍奇金淋巴瘤中的研究进展[J]. *天津医药*, 2020, 48(1):71-75.
- [13] STERNER R C, STERNER R M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies[J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(4):69.
- [14] TOKOLA S, KUITUNEN H, TURPEENIEMI-HUJANEN T, et al. Significance of bulky mass and residual tumor-treated with or without consolidative radiotherapy-to the risk of relapse in DLBCL patients[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(6):1966-1977.
- [15] HERRERA F G, IRVING M, KANDALAFT L E, et al. Rational combinations of immunotherapy with radiotherapy in ovarian cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(8):e417-e433.
- [16] TURCHAN W T, PITRODA S P, WEICHSELBAUM R R. Radiotherapy and immunotherapy combinations in the treatment of patients with metastatic disease: current status and future focus[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(19):5188-5194.
- [17] SAIFI O, LESTER S C, BREEN W G, et al. Incorporating radiation with anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma: a multicenter consensus approach[J]. *Am J Hematol*, 2024, 99(1):124-134.
- [18] HOVHANNISYAN L, RIETHER C, AEBERSOLD D M, et al. CAR T cell-based immunotherapy and radiation therapy: potential, promises and risks[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1):82.
- [19] NG A K, YAHALOM J, GODA J S, et al. Role of radiation therapy in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2018, 100(3):652-669.
- [20] QU C, PING N, KANG L, et al. Radiation priming chimeric antigen receptor T-cell therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma with high tumor burden[J]. *J Immunother*, 2020, 43(1):32-37.
- [21] DUTT S, ATALLAH M B, MINAMIDA Y, et al. Accelerated, but not conventional, radiotherapy of murine B-cell lymphoma induces potent T cell-mediated remissions[J]. *Blood Adv*, 2018, 2(19):2568-2580.
- [22] 王玉洁, 王桃, 杨建民. 嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法预处理方案的研究进展[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2020, 43(1):77-81.
- (2024-02-01 收稿)