doi:10.11659/jjssx.12E021138

·基础研究·

LIMD2 基因表达对食管癌细胞增殖、凋亡及 ERK/MAPK 信号通路的影响

李险波[1],张志强[1],韩小勇[1],甄志鹏[1],李焕芬[2],赵 钦[1] (1.保定市第一中心医院胸外科,河北 保定 071000;2.河北省人民医院胸外科,河北 石家庄 050051)

[摘 要] **目的** 探讨 LIM 结构域 2(LIMD2)对食管癌细胞增殖、凋亡的影响,及其对细胞外信号调节激酶(ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路的调控作用。**方法** 取 10 例食管癌患者癌组织及癌旁组织标本,采用 qRT-PCR 检测 LIMD2 mRNA 表达,采用免疫荧光染色检测 LIMD2 蛋白表达,采用 Western blot 法检测 ERK1/2、p-ERK1/2、p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达。取人食管癌细胞(KYSE30、EC9706)和人正常食管上皮细胞(HEEC),采用 qRT-PCR 及免疫荧光染色检测细胞中 LIMD2 mRNA 及蛋白表达,筛选出 LIMD2 mRNA 及蛋白表达最高的 EC9706 细胞进行后续试验。取 EC9706 细胞,分为对照组(常规培养)、Si-LIMD2 组(转染 LIMD2 干扰序列的腺病毒载体)、Si-NC 组(转染不含 LIMD2 干扰序列的空腺病毒载体)、PD98059 组(ERK/MAPK 通路阻断剂)、ISO 组(ERK/MAPK 通路激活剂)、Si-LIMD2 + ISO 组(在 Si-LIMD2 组基础上加入 ISO 溶液);采用 qRT-PCR 及免疫荧光染色检测细胞中 LIMD2 mRNA 及蛋白表达;采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性;采用流式细胞术检测细胞周期及凋亡率;采用 Western blot 法检测细胞 ERK1/2、p-ERK1/2、p38MAPK、p-p38MAPK、细胞周期相关蛋白 cyclin D1 和 CDK2、caspase-3、整合素 β1、黏着斑激酶(FAK)、整合素连接激酶(ILK)表达。**结果** LIMD2 mRNA 及蛋白在食管癌组织及 KYSE30 细胞、EC9706 细胞中的表达均较高,且在 EC9706 细胞中的表达高于 KYSE30 细胞,差异均有统计学意义($P<0.05$);p-ERK1/2、p-p38MAPK 蛋白在食管癌组织中表达较高($P<0.05$)。与对照组相比,Si-LIMD2 组和 PD98059 组 FAK、ILK、整合素 β1 蛋白及p-ERK1/2、p-p38MAPK 蛋白表达较低,增殖活性较低,G0/G1 期比例较高,S 期及 G2/M 期比例较低,凋亡率较高,cyclin D1、CDK2 蛋白表达较低,caspase-3 蛋白表达较高,差异均有统计学意义($P<0.05$),ISO 组 FAK、ILK、整合素 β1 蛋白及 p-ERK1/2、p-p38MAPK 蛋白表达较高,增殖活性较高,G0/G1 期比例较低,S 期及 G2/M 期比例较高,凋亡率较低,cyclin D1、CDK2 蛋白表达较高,caspase-3 蛋白表达较低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 Si-LIMD2 组相比,Si-LIMD2 + ISO 组 FAK、ILK、整合素 β1 蛋白及 p-ERK1/2、p-p38MAPK 蛋白表达较高,增殖活性较高,G0/G1 期比例较低,S 期及 G2/M 期比例较高,凋亡率较低,cyclin D1、CDK2 蛋白表达较高,caspase-3 蛋白表达较低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 沉默 LIMD2 基因表达可能通过抑制 ERK/MAPK 磷酸化途径激活而抑制食管癌细胞增殖、促进其凋亡。

[关键词] LIM 结构域 2;食管癌细胞;细胞外信号调节激酶;丝裂原活化蛋白激酶;增殖;凋亡

[中图分类号] R735.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-12-21

Effects of LIMD2 gene expression on the proliferation, apoptosis and ERK/MAPK signal pathway of esophageal cancer cells

LI Xian-bo[1], ZHANG Zhi-qiang[1], HAN Xiao-yong[1], ZHEN Zhi-peng[1], LI Huan-fen[2], ZHAO Qin[1] (1. Department of Thoracic Surgery, Baoding First Central Hospital, Baoding Hebei 071000, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang Hebei 050051, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of LIM domain 2 (LIMD2) on the proliferation and apoptosis of esophageal cancer cells, and the regulation on extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. **Methods** The samples of tumor tissues and adjacent tissues were taken from 10 patients with esophageal cancer. qRT-PCR was used to detect the expression of LIMD2 mRNA; immunofluorescence was used to detect the protein expression of LIMD2; Western blot was used to detect the protein expression of ERK1/2, p-ERK1/2, p38MAPK, and p-p38MAPK. Human esophageal cancer cell (KYSE30, EC9706) and normal human esophageal epithelial cell (HEEC) were taken. qRT-PCR and immunofluorescence were used to measure the expression of LIMD2 mRNA and protein in cells, and the EC9706 cell with the highest expression of LIMD2 mRNA and protein was selected for the follow-up experiments. EC9706 cells were taken and divided into the control group (routinely cultured), the Si-LIMD2 group (transfected with adenovirus vector containing LIMD2 interference sequence), the Si-NC group (transfected with empty adenovirus vector without LIMD2 interference sequence), the PD98059 group (ERK/MAPK pathway blocker), the ISO group (ERK/MAPK pathway activator), and the Si-LIMD2 + ISO group (add ISO solution on basis of the si-LIMD2 group). qRT-PCR and immunofluorescence were used to measure the expression of LIMD2 mRNA and protein in cells; CCK-8 was used to measure cell proliferation activity; flow cytometry was used to measure cell cycle and apoptosis

[基金项目] 河北省医学科学研究课题计划(20190945)

rate;Western blot was used to detect the expression of cell ERK1/2,p-ERK1/2,p38MAPK,p-p38MAPK,cell cycle related proteins cyclin D1 and CDK2,caspase-3,integrin β1,focal adhesion kinase (FAK),integrin-linked kinase (ILK). **Results** LIMD2 mRNA and protein expression in esophageal cancer tissues,KYSE30 cells and EC9706 cells were higher,and the expression in EC9706 cells was higher than that in KYSE30 cells ($P<0.05$). The expression of p-ERK1/2 and p-p38MAPK protein in esophageal cancer tissues were higher($P<0.05$). Compared with the control group,the si-LIMD2 group and the PD98059 group showed lower protein expression of FAK,ILK,integrin β1,p-ERK1/2 and p-P38MAPK,lower proliferation activity,higher proportion of G0/G1 phase,lower proportion of S phase and G2/M phase,higher apoptosis rate,lower protein expression of cyclin D1 and CDK2,and higher protein expression of caspase-3($P<0.05$);while the ISO group showed higher protein expression of FAK,ILK,integrin β1,p-ERK1/2 and p-P38MAPK,higher proliferation activity,lower proportion of G0/G1 phase,higher proportion of S phase and G2/M phase,lower apoptosis rate,higher protein expression of cyclin D1 and CDK2,and lower protein expression of caspase-3 ($P<0.05$). Compared with the Si-LIMD2 group,the Si-LimD2 + ISO group showed higher protein expression of FAK,ILK,integrin β1,p-ERK1/2 and p-P38MAPK,higher proliferation activity,lower proportion of G0/G1 phase,higher proportion of S phase and G2/M phase,lower apoptosis rate,higher protein expression of cyclin D1 and CDK2,and lower protein expression of caspase-3($P<0.05$). **Conclusion** Silencing LIMD2 gene expression may inhibit the proliferation of esophageal cancer cells and promote cell apoptosis by inhibiting the activation of ERK/MAPK phosphorylation pathway.

Keywords: LIM domain 2;esophageal cancer cells;extracellular signal-regulated kinase;mitogen-activated protein kinase;proliferation;apoptosis

食管癌是消化道系统最常见的肿瘤之一[1],其病死率居世界第6位,是世界第八大癌症[2]。食管癌的发生发展涉及遗传、表观遗传、基因及蛋白异常表达等多种途径的改变[3],阐明食管癌的致癌分子机制对食管癌的靶向治疗具有重要意义。LIM 结构域(LIM domain,LIMD)可广泛存在于真核生物中,能调控细胞黏附、运动和信号转导等相关基因表达,从而参与调节细胞生长发育进程[4]。LIMD 家族中的 LIMD2 目前已被证实与人类癌症的发生和进展相关[5],且 LIMD2 已被确定为甲状腺乳头状癌淋巴结转移的生物标志物,成为了肿瘤进展的新效应器[6]。但 LIMD2 在食管癌中的作用尚未明确。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)磷酸化活化后,可从细胞质转移到细胞核,并激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)信号转导通路,调控细胞增殖、生长、分化、凋亡等生命活动过程[7]。且 ERK/MAPK 信号通路活化已被证实参与食管癌、结肠癌、甲状腺癌等多种癌症的发展过程[8]。有研究显示,LIMD2 能够通过调控 ERK/MAPK 信号通路而影响甲状腺癌进展[9]。本研究就 LIMD2 对食管癌细胞增殖、凋亡的影响及分子机制展开分析,以期为食管癌的靶向治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源及细胞来源

选择2019年3月至2020年6月于保定市第一中心医院进行手术切除治疗的食管癌患者10例,留取新鲜的癌组织及对应的癌旁组织标本。患者术前均未接受化疗或放疗,10例患者中,男6例,女4例;年龄42~70岁;肿瘤最大径3~8 cm;高分化2例,中分化6例,低分化2例;TNM 分期:Ⅰ期1例,Ⅱ期5例,Ⅲ期4例;淋巴结转移7例,无淋巴结转移3例。本研究经保定市第一中心医院伦理委员会批准执行(2018-B-566),患者均知情同意。

人食管癌细胞 KYSE30、EC9706 和人正常食管上皮细胞(HEEC)均购自宁波明舟生物科技有限公司,批号分别为18210615、18251481、18053217。

1.2 主要试剂与仪器

CCK-8 试剂盒(批号8127165)购自福州飞净生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒(批号15181036)购自北京博迈斯科技发展有限公司;逆转录试剂盒(批号0621181809)购自美国 GeneCopoeia 公司;一抗 ERK1/2、p-ERK1/2、p38MAPK、p-p38MAPK、细胞周期相关蛋白 cyclin D1 和 CDK2、凋亡相关蛋白 caspase-3、整合素 β1、黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)、整合素连接激酶(integrin-linked kinase,ILK)均购自 Abcam 公司,批号分别为1513812、0627143、0825641、1315703、2164215、5108514、1003052、02190418、1652025、0583521;Q1600 型 qRT-PCR 仪购自厦门和谱仪器有限公司;SpectraMax i3x 酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.3 组织处理、细胞培养及分组处理

各新鲜食管癌组织及癌旁组织标本,剪取1 g置于-80 ℃冰箱保存,以备检测 LIMD2 mRNA 及 ERK1/2、p-ERK1/2、p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达,剩余组织置于4%多聚甲醛中固定24 h,随后进行石

蜡包埋、切片,以备免疫荧光染色检测 LIMD2 蛋白表达水平。

取人食管癌细胞(KYSE30、EC9706)和人正常食管上皮细胞(HEEC)常规复苏,随后用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清及 100 U/mL 青霉素—链霉素)在恒温培养箱中常规培养及传代,待细胞达到 90% 融合度时收集,采用 qRT-PCR 及免疫荧光染色检测各细胞中 LIMD2 mRNA 及蛋白表达,选择 LIMD2 mRNA 及蛋白表达最高的 EC9706 细胞进行后续试验。

取 EC9706 细胞,按照 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,并设置为:对照组、Si-LIMD2 组、Si-NC 组、PD98059 组、ISO 组、Si-LIMD2 + ISO 组,每组 6 个复孔。对照组常规培养;Si-LIMD2 组及 Si-NC 组分别转染含 LIMD2 干扰序列的腺病毒载体及不含 LIMD2 干扰序列的空腺病毒载体;PD98059 组及 ISO 组参照文献[10-11]分别在培养基中加入终浓度为 50 μmol/L 的 ERK/MAPK 通路阻断剂(PD98059)及 20 μmol/L 的 ERK/MAPK 通路激活剂盐酸异丙肾上腺素(isoproterenol hydrochloride, ISO);Si-LIMD2 + ISO 组在 Si-LIMD2组基础上加入 ISO 溶液(20 μmol/L)进行培养。各组培养 24 h 后进行后续试验。

1.4 qRT-PCR 法检测细胞及组织 LIMD2 mRNA 表达

取 1.3 项下于 -80 ℃保存的癌组织及癌旁组织,4 ℃解冻,冰上匀浆分离,随后用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。取 1.3 项下的 KYSE30 细胞、EC9706 细胞、HEEC 细胞及各组 EC9706 细胞,加入细胞裂解液,用 RNA 提取试剂盒分别提取总 RNA。将提取的总 RNA 用逆转录试剂盒反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板,按照 qRT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 反应(反应体系:上下游引物各 0.5 μL,2 × SYBR mix 10 μL,10 × cDNA 模板 1 μL,灭菌双蒸水 8 μL。反应条件:94 ℃预变性 14 min、94 ℃变性 33 s、67 ℃退火 57 s,55 个循环,72 ℃延伸 17 min),以 GAPDH 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 LIMD2 mRNA 表达水平。各引物序列由大连宝生物公司合成,见表 1。

表 1 引物序列表

基因	引物序列(5'-3')
LIMD2	正向:TGTCATCGACACTGACGTGG
	反向:CTCCACCGAGAACCTCTGTG
GAPDH	正向:CTCGCTCGGCAGA
	反向:ACGCTCACGAATTTGGT

1.5 免疫荧光染色检测细胞 LIMD2 蛋白表达

取 1.3 项下 KYSE30 细胞、EC9706 细胞、HEEC 细胞及各组 EC9706 细胞进行细胞爬片,将爬片经 4% 多聚甲醛固定,曲拉通透化、封闭,而后加入一抗(LIMD2,1∶200)4 ℃孵育过夜,避光加入荧光二抗(异硫氰酸荧光素,1∶200),DAPI 染核、甘油封片后于荧光显微镜下观察拍照,用 Image Pro Plus 5.0 分析图像,测定阳性表达的平均光密度值。

1.6 Western blot 法检测相关蛋白表达

取 1.3 项下 -80 ℃保存的癌组织及癌旁组织,4 ℃解冻,冰上匀浆分离,用蛋白提取试剂盒提取总蛋白,并用 BCA 法检测蛋白浓度。取 1.3 项下 KYSE30 细胞、EC9706 细胞、HEEC 细胞及各组 EC9706 细胞,加入细胞裂解液,用蛋白提取试剂盒提取总蛋白,并用 BCA 法检测蛋白浓度。各取 25 μg 蛋白样品行电泳(浓缩胶 80 V,分离胶 120 V)及转膜反应 200 mA,加入一抗(ERK1/2、p-ERK1/2、p38MAPK、p-p38MAPK、cyclin D1、CDK2、caspase-3、整合素 β1、FAK、ILK 抗体,1∶2 000;内参抗体 β-actin,1∶2 000),4 ℃孵育过夜,加入辣根过氧化物酶二抗(1∶3 000),室温下孵育 2 h。ECL 显影曝光后用化学发光成像分析系统拍照并分析灰度值,每组试验重复 3 次。其中癌组织及癌旁组织只检测 ERK/MAPK 通路蛋白表达。

1.7 CCK-8 法检测细胞增殖活性

取 1.3 项下培养 24 h 后的各组 EC9706 细胞,加入 10 μL CCK-8 溶液继续培养 2 h,随后用比色法在 450 nm 波长下检测各组细胞 OD 值,以细胞培养液 OD 值为空白 OD 值,根据公式细胞生存率(%) = [(试验组 OD 值 - 空白 OD 值)/(对照组 OD 值 - 空白 OD 值)] × 100% 计算细胞生存率,以细胞生存率高低代表细胞增殖活性。

1.8 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率

收集 1.3 项下培养 24 h 后的各组 EC9706 细胞,加入 100 μL 结合缓冲液、10 μL FITC 标记的 Annexin-V 溶液,室温避光孵育 30 min,再加入 5 μL 碘化丙啶避光孵育 5 min,随后加入 400 μL 结合缓冲液,在流式细胞仪下检测细胞周期和凋亡情况。

1.9 统计学分析

数据采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。2 组间比较行 t 检验;多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较行 *SNK-q* 检验;$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

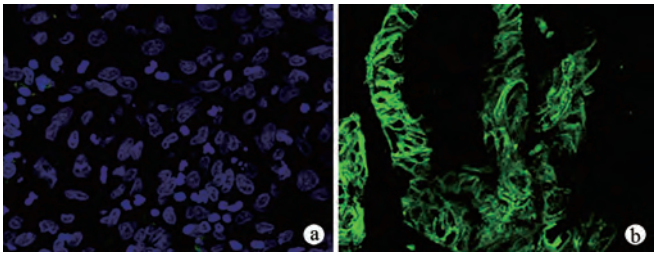
2.1 食管癌组织中 LIMD2 mRNA、蛋白及 ERK/MAPK 通路蛋白表达

qRT-PCR 结果显示,癌组织中 LIMD2 mRNA 表达高

于癌旁组织($P<0.05$),见表2。免疫荧光染色显示,癌组织中LIMD2蛋白表达高于癌旁组织($P<0.05$),见图1。Western blot结果显示,癌组织中p-ERK1/2、p-p38MAPK蛋白表达高于癌旁组织($P<0.05$),见图2、表2。

表2 食管癌组织中LIMD2 mRNA、蛋白及ERK/MAPK通路蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

标本	LIMD2 mRNA	LIMD2蛋白(平均光密度/mm²)	p-ERK1/2蛋白	p-p38MAPK蛋白
癌旁组织	1.03±0.12	0.16±0.01	1.09±0.10	1.11±0.09
癌组织	2.65±0.09	1.37±0.11	1.95±0.19	1.77±0.17
t	34.153	34.642	12.666	10.850
P	0.000	0.000	0.000	0.000



a:癌旁组织;b:癌组织

图1 食管癌组织中LIMD2免疫荧光图片(×400)

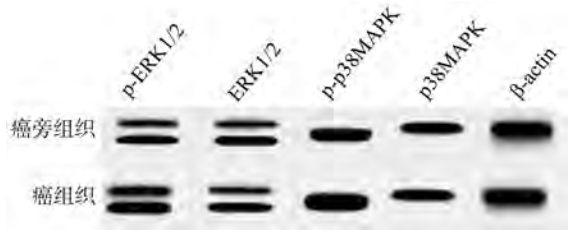


图2 食管癌组织中ERK/MAPK通路蛋白表达免疫印迹图

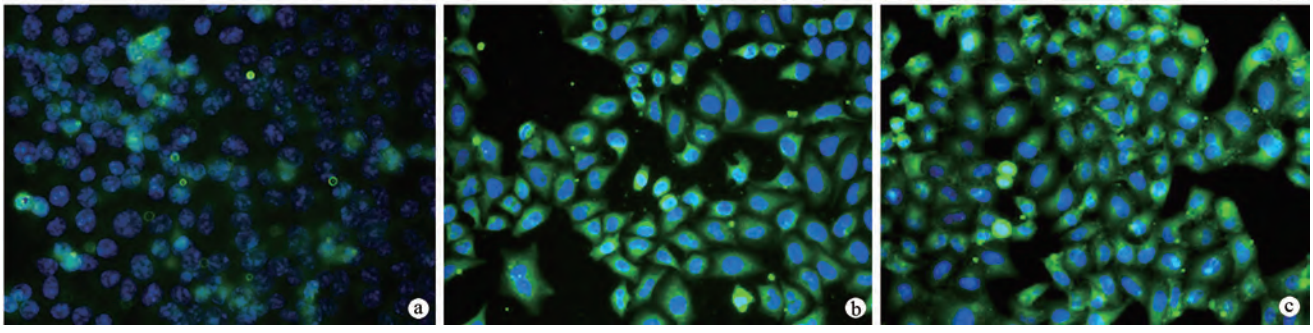
2.2 细胞中LIMD2表达

qRT-PCR结果显示,KYSE30、EC9706细胞中LIMD2 mRNA表达高于HEEC细胞($P<0.05$)。免疫荧光染色显示,KYSE30、EC9706细胞中LIMD2蛋白表达高于HEEC细胞($P<0.05$),且EC9706细胞中LIMD2 mRNA、LIMD2蛋白表达高于KYSE30细胞,见表3、图3。

表3 细胞中LIMD2 mRNA、LIMD2蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

细胞	LIMD2 mRNA	LIMD2蛋白(平均光密度/mm²)
HEEC细胞	1.06±0.10	0.23±0.02
KYSE30细胞	1.55±0.15*	1.45±0.14*
EC9706细胞	2.02±0.20*#	2.14±0.21*#

*:与HEEC细胞比较,$P<0.05$;#:与KYSE30细胞比较,$P<0.05$



a:HEEC细胞;b:KYSE30细胞;c:EC9706细胞

图3 细胞中LIMD2免疫荧光图片(×400)

2.3 各组EC9706细胞LIMD2 mRNA、蛋白及ERK/MAPK通路蛋白表达

qRT-PCR及免疫荧光染色结果显示,与对照组相比,Si-LIMD2组LIMD2 mRNA、LIMD2蛋白表达较低($P<0.05$),见图4、表4。Western blot结果显示,与对照组相比,Si-LIMD2组和PD98059组p-ERK1/2、p-p38MAPK蛋白表达较低($P<0.05$),ISO组p-ERK1/2、p-p38MAPK蛋白表达较高($P<0.05$);与Si-LIMD2组相比,Si-LIMD2+ISO组p-ERK1/2、p-p38MAPK蛋白表达较高($P<0.05$),见表4、图5。

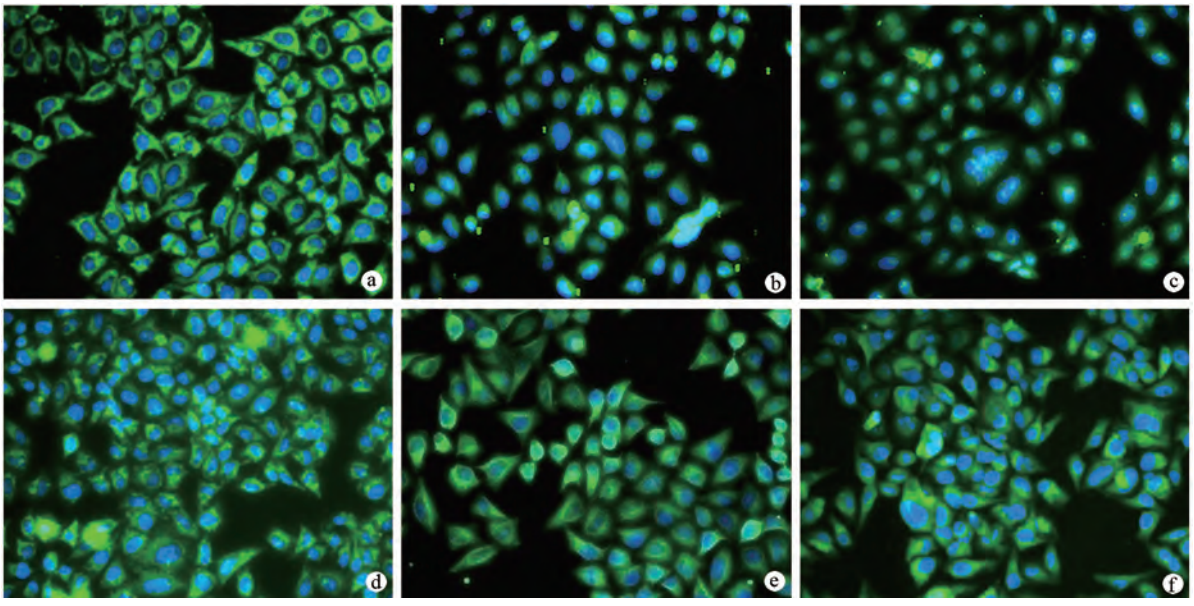
2.4 各组EC9706细胞增殖活性

与对照组相比,Si-LIMD2组和PD98059组细胞增殖活性较低($P<0.05$),ISO组细胞增殖活性较高($P<0.05$)。与Si-LIMD2组比较,Si-LIMD2+ISO组细胞增殖活性较高($P<0.05$),见表5。

表4 各组EC9706细胞LIMD2 mRNA、蛋白及ERK/MAPK通路蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

组别	LIMD2 mRNA	LIMD2蛋白(平均光密度/mm²)	p-ERK1/2蛋白	p-p38MAPK蛋白
对照组	1.19±0.12	2.46±0.21	1.09±0.10	1.17±0.09
Si-LIMD2组	0.65±0.09*	1.37±0.11*	0.57±0.05*	0.77±0.07*
PD98059组	1.18±0.13#	2.49±0.24#	0.55±0.04*	0.79±0.08*
ISO组	1.14±0.14#	2.45±0.21#	1.87±0.18*#△	1.75±0.11*#△
Si-LIMD2+ISO组	0.64±0.15▲	1.38±0.22▲	1.04±0.11#▲	1.18±0.12#▲
Si-NC组	1.17±0.13#	2.44±0.23#	1.07±0.10#△▲	1.16±0.13#△▲

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与Si-LIMD2组比较,$P<0.05$;△:与PD98059组比较,$P<0.05$;▲:与ISO组比较,$P<0.05$



a:对照组;b:Si-LIMD2 组;c:PD98059 组;d:ISO 组;e:Si-LIMD2 + ISO 组;f:Si-NC 组

图 4 各组 EC9706 细胞 LIMD2 免疫荧光图片(×400)

2.5 各组 EC9706 细胞周期及凋亡率

与对照组相比,Si-LIMD2 组和 PD98059 组细胞 G0/G1 期比例较高,S 期及 G2/M 期比例较低,凋亡率较高($P<0.05$);ISO 组细胞 G0/G1 期比例较低,S 期及 G2/M 期比例较高,凋亡率较低($P<0.05$);与 Si-LIMD2组相比,Si-LIMD2 + ISO 组细胞 G0/G1 期比例较低,S 期及 G2/M 期比例较高,凋亡率较低($P<0.05$),见表 6、图 6。

2.6 各组 EC9706 细胞周期及凋亡相关蛋白表达

与对照组相比,Si-LIMD2 组和 PD98059 组 cyclin D1、CDK2 蛋白表达较低,caspase-3 蛋白表达较高($P<0.05$),ISO 组 cyclin D1、CDK2 蛋白表达较高,caspase-3 蛋白表达较低($P<0.05$);与Si-LIMD2组相比,Si-LIMD2 + ISO 组 cyclin D1、CDK2 蛋白表达较高,caspase-3 蛋白表达较低($P<0.05$),见表 7、图 7。

2.7 各组 EC9706 细胞 FAK、ILK、整合素 β1 蛋白表达

与对照组相比,Si-LIMD2 组和 PD98059 组 FAK、ILK、整合素 β1 蛋白表达较低($P<0.05$),ISO 组 FAK、ILK、整合素 β1 蛋白表达较高($P<0.05$);与Si-LIMD2组相比,Si-LIMD2 + ISO 组 FAK、ILK、整合素 β1 蛋白表达较高($P<0.05$),见图 8、表 8。

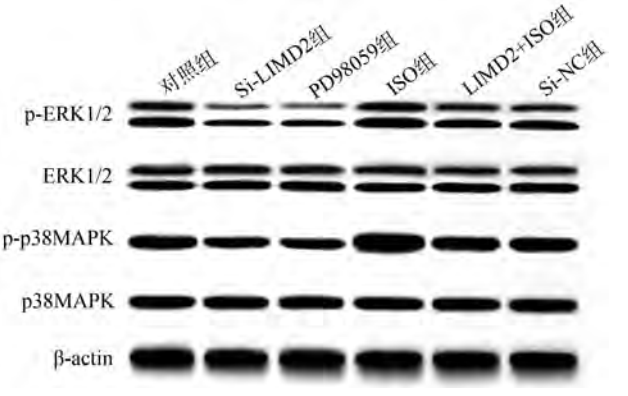


图 5 各组 EC9706 细胞 ERK/MAPK 通路蛋白表达免疫印迹图

表 5 各组 EC9706 细胞增殖活性比较($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

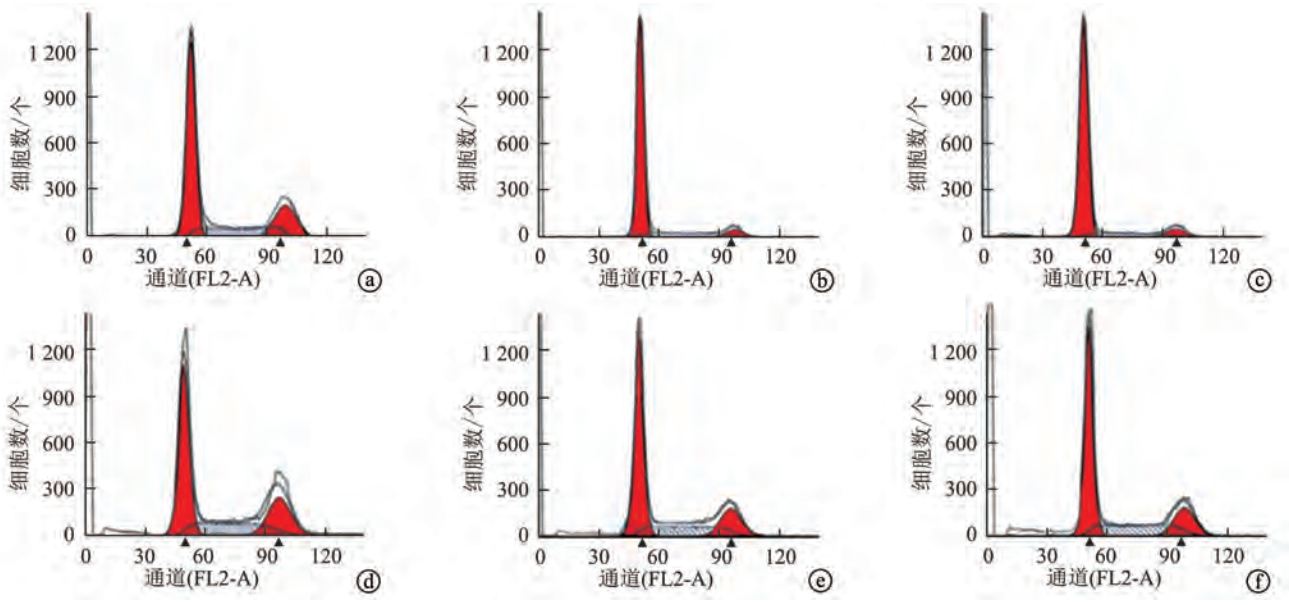
组别	增殖活性/%
对照组	100.00 ± 0.00
Si-LIMD2 组	60.42 ± 5.23*
PD98059 组	63.29 ± 5.45*
ISO 组	170.19 ± 9.05*#△
Si-LIMD2 + ISO 组	109.36 ± 4.16#▲
Si-NC 组	105.82 ± 4.33#△▲

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 Si-LIMD2 组比较,$P<0.05$;△:与 PD98059 组比较,$P<0.05$;▲:与 ISO 组比较,$P<0.05$

表 6 各组 EC9706 细胞周期及凋亡率比较($\bar{x}\pm s$,$n=6$,%)

组别	G0/G1 期	S 期	G2/M 期	凋亡率
对照组	71.65 ± 1.16	11.66 ± 1.21	17.15 ± 1.13	4.49 ± 0.40
Si-LIMD2 组	92.55 ± 1.33*	4.65 ± 0.61*	3.16 ± 0.34*	33.45 ± 3.11*
PD98059 组	91.53 ± 1.49*	4.44 ± 0.48*	3.24 ± 0.35*	32.48 ± 3.12*
ISO 组	66.07 ± 1.08*#△	15.32 ± 1.44*#△	22.57 ± 1.27*#△	1.06 ± 0.13*#△
Si-LIMD2 + ISO 组	71.06 ± 1.18#▲	11.36 ± 1.11#▲	17.36 ± 1.04#▲	4.69 ± 0.44#▲
Si-NC 组	71.44 ± 1.17#△▲	11.54 ± 1.17#△▲	17.23 ± 1.09#△▲	4.81 ± 0.54#△▲

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 Si-LIMD2 组比较,$P<0.05$;△:与 PD98059 组比较,$P<0.05$;▲:与 ISO 组比较,$P<0.05$



a:对照组;b:Si-LIMD2 组;c:PD98059 组;d:ISO 组;e:Si-LIMD2 + ISO 组;f:Si-NC 组

图 6 各组 EC9706 细胞流式周期图

表 7 各组 EC9706 细胞周期及凋亡相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	cyclin D1 蛋白	CDK2 蛋白	caspase-3 蛋白
对照组	1.09 ± 0.08	1.06 ± 0.10	1.17 ± 0.10
Si-LIMD2 组	0.63 ± 0.06 *	0.54 ± 0.08 *	1.77 ± 0.17 *
PD98059 组	0.66 ± 0.05 *	0.58 ± 0.07 *	1.75 ± 0.16 *
ISO 组	1.83 ± 0.18 *#△	1.91 ± 0.19 *#△	0.47 ± 0.04 *#△
Si-LIMD2 + ISO 组	1.06 ± 0.07#▲	1.02 ± 0.08#▲	1.18 ± 0.11#▲
Si-NC 组	1.05 ± 0.09#△▲	1.03 ± 0.10#△▲	1.14 ± 0.14#△▲

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 Si-LIMD2 组比较,$P<0.05$;△:与 PD98059 组比较,$P<0.05$;▲:与 ISO 组比较,$P<0.05$

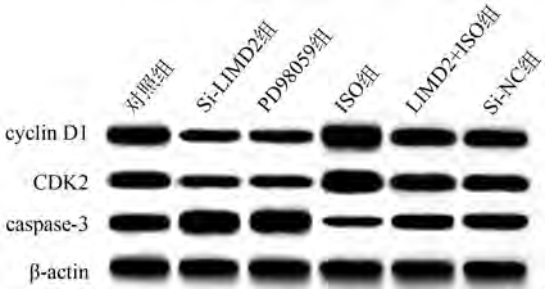


图 7 各组 EC9706 细胞周期及凋亡相关蛋白表达免疫印迹图

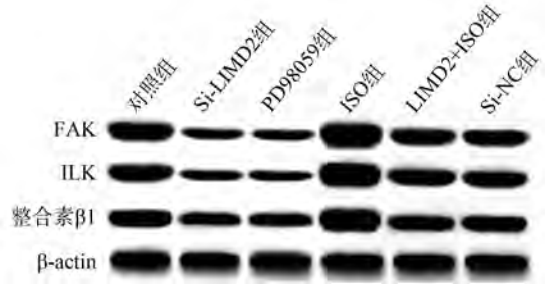


图 8 各组 EC9706 细胞 FAK、ILK、整合素 β1 蛋白表达免疫印迹图

表 8 各组 EC9706 细胞 FAK、ILK、整合素 β1 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	FAK 蛋白	ILK 蛋白	整合素 β1 蛋白
对照组	1.00 ± 0.08	0.99 ± 0.10	1.04 ± 0.10
Si-LIMD2 组	0.47 ± 0.04 *	0.57 ± 0.05 *	0.74 ± 0.07 *
PD98059 组	0.44 ± 0.05 *	0.56 ± 0.06 *	0.77 ± 0.06 *
ISO 组	1.77 ± 0.17 *#△	1.87 ± 0.18 *#△	1.67 ± 0.16 *#△
Si-LIMD2 + ISO 组	1.01 ± 0.07#▲	1.04 ± 0.08#▲	1.06 ± 0.09#▲
Si-NC 组	1.07 ± 0.08#△▲	1.00 ± 0.10#△▲	1.10 ± 0.10#△▲

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 Si-LIMD2 组比较,$P<0.05$;△:与 PD98059 组比较,$P<0.05$;▲:与 ISO 组比较,$P<0.05$

3 讨论

近年来研究发现,含 LIMD 的蛋白与人类多种肿瘤的生长及增殖密切相关,并逐渐受到肿瘤研究者的重视。Wang 等[12]研究发现,LIMD 家族的 LIMD2 可促进非小细胞肺癌细胞的增殖及侵袭进程。夏朝晖等[13]发现,LIMD2 高表达与子宫内膜癌肿瘤分期及淋巴结转移浸润有关。LIMD2 已在乳腺癌、膀胱癌、甲状腺癌、黑色素瘤等人类癌症中有较多研究,但 LIMD2 在食管癌中的作用尚未明确。本研究发现,LIMD2 在食管癌组织及 KYSE30、EC9706 细胞中表达均较高,且在食管癌细胞中以 EC9706 细胞表达较高,提示 LIMD2 参与了食管癌的发生发展过程。本研究进一步沉默 EC9706 细胞中 LIMD2 表达后,发现细胞增殖活性降低,细胞周期阻滞于 G0/G1 期,细胞凋亡率增加,表明沉默 LIMD2 表达可显著抑制 EC9706 细胞增殖,并促进其凋亡,预示 LIMD2 可能成为治疗食管癌的潜在靶分子,但其具体调控机制还有待进一步探究。

据文献资料研究显示,LIMD2 可在细胞质与细胞核之间穿梭,并组装蛋白,使原本无相互作用的蛋白产生级联作用,进而调控信号转导[14]。Pinheiro 等[6]及 Peng 等[15]发现,LIMD2 可直接与 ILK 结构域结合,促进 ILK 活化,引起细胞运动和侵袭性相关信号转导途径激活,参与癌细胞扩散过程。另外,ILK 与整合素 β1 结合活化后,可促进整合素 β1 下游 FAK/MAPK 通路活化,从而调控细胞增殖、分化过程[16-17]。本研究发现,沉默 EC9706 细胞中 LIMD2 表达后,ILK、整合素 β1、FAK 蛋白及 ERK/MAPK 通路 p-ERK1/2、p-p38MAPK 蛋白表达亦减少,提示沉默 LIMD2 表达抑制 EC9706 细胞增殖,并促进其凋亡的作用可能与抑制 ERK/MAPK 通路有关。

MAPK 与其通路中的重要分子 ERK 作用,将细胞外信号传递至细胞内,并调控细胞周期,将增殖信号传至细胞内,促进细胞周期相关蛋白 cyclin D1 及 CDK2 表达,进而增强癌细胞恶性增殖能力[18]。且 ERK/MAPK 通路已被证实是参与肿瘤细胞发生发展的重要通路[19]。本研究发现,ERK/MAPK 通路 p-ERK1/2、p-p38MAPK 蛋白在食管癌组织中表达较高,用 ISO 激活 EC9706 细胞 ERK/MAPK 通路后,细胞增殖活性升高,G0/G1 期比例较低,S 期及 G2/GM 期比例较高,凋亡率较低,同时细胞周期蛋白 cyclin D1 及 CDK2 表达较高,凋亡相关蛋白 caspase-3 表达较低,反之用 PD98059 抑制 EC9706 细胞 ERK/MAPK 通路后,癌细胞显示出较低的增殖活性,且凋亡率升高,提示 ERK/MAPK 通路激活可能是促进食管癌恶性发展的诱因,这与以往文献研究结果一致[9-10]。本研究在沉默 LIMD2 表达的基础上用 ISO 激活 ERK/MAPK 通路,结果发现,沉默 LIMD2 表达抑制 EC9706 细胞增殖,并促进其凋亡的作用被逆转,证实 LIMD2 是通过调控 ERK/MAPK 通路参与食管癌的发生发展。

综上所述,沉默 LIMD2 表达可能通过抑制 ERK/MAPK 通路而抑制食管癌细胞增殖、促进其凋亡,这为阐明 LIMD2 参与食管癌发生发展的可能机制提供了一定理论依据。

[参考文献]

[1] Ho ALK, Smyth EC. A global perspective on oesophageal cancer: two diseases in one[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(6): 521 - 522. doi: 10.1016/S2468 - 1253(20)30047 - 9.

[2] Thrift AP. Global burden and epidemiology of Barrett oesophagus and oesophageal cancer[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(10): 419 - 430. doi: 10.1038/s41575 - 021 - 00419 - 3.

[3] Qian P, Xu Z, Chen H, et al. Abnormally expressed lncRNAs in the prognosis and clinicopathology of oesophageal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. J Genet, 2020, 99(1): 43 - 46. doi: 10.1007/s12041 - 020 - 01203 - z.

[4] Ríos H, Paganelli AR, Fosser NS, et al. The role of PDLIM1, a PDZ-LIM domain protein, at the ribbon synapses in the chicken retina[J]. J Comp Neurol, 2020, 528(11): 1820 - 1832. doi: 10.1002/cne.24855.

[5] Ohnishi T, Kiyama Y, Arima-Yoshida F, et al. Cooperation of LIM domain-binding 2 (LDB2) with EGR in the pathogenesis of schizophrenia [J]. EMBO Mol Med, 2021, 3(1): 1257 - 1274. doi: 10.15252/emmm.202012574.

[6] Pinheiro Dos Santos MJC, Bastos AU, da Costa VR, et al. LIMD2 is overexpressed in BRAF V600E-positive papillary thyroid carcinomas and matched lymph node metastases[J]. Endocr Pathol, 2018, 29(3): 222 - 230. doi: 10.1007/s12022 - 018 - 9526 - 7.

[7] Dasgupta P, Kulkarni P, Bhat NS, et al. Activation of the Erk/MAPK signaling pathway is a driver for cadmium induced prostate cancer[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 401: 115102. doi: 10.1016/j.taap.2020.115102.

[8] Chen Q, Song S, Wang Z, et al. Isorhamnetin induces the paraptotic cell death through ROS and the ERK/MAPK pathway in OSCC cells[J]. Oral Dis, 2021, 27(2): 240 - 250. doi: 10.1016/j.taap.2020.115102.

[9] Araldi RP, de Melo TC, Levy D, et al. LIMD2 regulates key steps of metastasis cascade in papillary thyroid cancer cells via MAPK crosstalk [J]. Cells, 2020, 9(11): 2522. doi: 10.3390/cells9112522.

[10] 刘梦琪,张文文,陈晓伟,等. PD98059 抑制 MAPK/ERK 信号通路对胃癌细胞生物学功能的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 163(1): 17 - 23. doi: 10.3969/j.issn.1004 - 616x.2019.01.003.

[11] 胡 晶,戴 娜,徐冰雁,等. 益气解毒方通过 MAPK/ERK 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(6): 1221 - 1227. doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20180104.024.

[12] Wang F, Li Z, Xu L, et al. LIMD2 targeted by miR-34a promotes the proliferation and invasion of nonsmall cell lung cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(5): 4760 - 4766. doi: 10.3892/mmr.2018.9464.

[13] 夏朝晖,吴蓉宜,陈悦悦. 子宫内膜癌组织中 LIMD2 的表达及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2019, 24(7): 616 - 620. doi: 10.3969/j.issn.1009 - 0460.2019.07.010.

[14] Dedhar S, Awrey S. LIMD2 is an intracellular activator of integrin linked kinase (ILK) activity and GSK-3/Akt/beta-catenin signaling [J]. FASEB J, 2018, 32(1): 666 - 668. doi: 10.1096/fasebj.2018.32.1_supplement.666.1.

[15] Peng H, Talebzadeh-Farrooji M, Osborne MJ, et al. LIMD2 is a small LIM-only protein overexpressed in metastatic lesions that regulates cell motility and tumor progression by directly binding to and activating the integrin-linked kinase[J]. Cancer Res, 2014, 74(5): 1390 - 1403. doi: 10.1158/0008 - 5472.CAN - 13 - 1275.

[16] 田 鹤,刘建生,王雅光,等. 小鼠肾发育过程中整合素 β1 和整合素连接激酶的表达变化[J]. 中国体视学与图像分析, 2020, 25(1): 25 - 30. doi: 10.13505/j.1007 - 1482.2020.25.01.004.

[17] 阳 莲,洪 莉. 整合素 β1-FAK-Ras-MAPK 信号转导通路与肿瘤关系的相关研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(30): 38 - 41.

[18] Qiang Y, Ma F, Wang Z, et al. LukS-PV induces cell cycle arrest and apoptosis through p38/ERK MAPK signaling pathway in NSCLC cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(4): 846 - 852. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.181.

[19] Guo YJ, Pan WW, Liu SB, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 1997 - 2007. doi: 10.3892/etm.2020.8454.

(编辑:魏 源)