

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.20.002

辅酶 Q10B 调控 PI3K/AKT 信号通路促进食管鳞癌恶性生物学行为的分子机制研究*

魏瑜 曹雷雨 高艳 李志芳 渠成程 马晓丽 卡丽玛·木合塔尔 张莉[△]

(新疆医科大学第一附属医院综合内四科 / 特需内科 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的:探讨辅酶 Q10B(COQ10B)影响食管鳞癌细胞恶性生物学行为的分子机制。**方法:**采用 qRT-PCR 检测 3 种人 ESCC 细胞系 (KYSE150、KYSE450 和 TE-1) 和食管上皮细胞系 Het-1A 细胞中 COQ10B 表达情况。对敲减 COQ10B 的 KYSE150 细胞进行 RNA 测序筛选差异表达基因, 通过 KEGG 通路分析寻找密切相关信号通路。利用慢病毒构建 COQ10B 过表达 KYSE150 和 TE-1 细胞稳转株, Western blot 方法检测过表达效率。采用 CCK8 法检测 PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002 对食管鳞癌细胞的半抑制浓度 (IC₅₀) 值。通过 EDU、平板克隆实验、流式细胞术、创面愈合实验、Transwell 侵袭小室检测过表达 COQ10B 以及加入 LY294002 抑制剂后对食管鳞癌细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭能力的影响。同时采用 Western blot 技术检测过表达 COQ10B 以及加入 LY294002 抑制剂后对 KYSE150 食管鳞癌细胞中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白 (PI3K、AKT、p-PI3K 和 p-AKT) 表达的影响。**结果:**COQ10B 在 ESCC 细胞系中相对高表达。RNA-seq 筛选出显著性差异表达基因共 319 个, 包括 285 个上调基因、34 个下调基因, 通过 KEGG 通路分析筛选出 PI3K/AKT 信号通路作为后续分子机制的研究对象。PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002 随浓度和作用时间的增加, 对食管鳞癌细胞的毒性作用增强, 后续实验中使用 LY294002 作用 48 h 的 IC₅₀ 值左右的药物浓度。与阴性对照组相比, 在 KYSE150 和 TE-1 食管鳞癌细胞中过表达 COQ10B 后可显著增强细胞的增殖、迁移及侵袭并抑制其凋亡。然而, 在加入 LY294002 抑制剂处理 48h 后, COQ10B 过表达所增强的 ESCC 细胞增殖、迁移、侵袭能力均被显著抑制, 而凋亡能力的抑制被逆转。同时与阴性对照组相比, KYSE150 食管鳞癌细胞中过表达 COQ10B 后 PI3K/AKT 信号通路中 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达水平显著升高。而在加入 LY294002 抑制剂处理 48 h 后可显著抑制 COQ10B 过表达所增强的 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白 p-PI3K、p-AKT 表达水平。**结论:**COQ10B 可通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进食管鳞癌细胞的增殖、迁移、侵袭, 并抑制其凋亡。

关键词:食管鳞状细胞癌; 辅酶 Q10B; PI3K/AKT 信号通路; 恶性生物学行为

中图分类号:R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)20-3809-09

Coenzyme Q10B Promotes the Malignant Biological Behavior of Esophageal Squamous Cell Carcinoma through PI3K/AKT Signaling Pathway*

WEI Yu, CAO Lei-yu, GAO Yan, LI Zhi-fang, QU Cheng-cheng, MA Xiao-li, Kalima·Muhetaer, ZHANG Li[△]

(Fourth Department of General Internal Medicine/Special Needs Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the molecular mechanism of coenzyme Q10B (COQ10B) affecting the malignant biological behavior of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells. **Methods:** qRT-PCR was used to detect the expression of COQ10B in 3 human ESCC cell lines (KYSE150, KYSE450 and TE-1) and esophageal epithelial cell line Het-1A. To knock on reducing COQ10B KYSE150 cells RNA sequencing screening differentially expressed genes, through KEGG pathway analysis for closely related signaling pathway. KYSE150 and TE-1 cells stably overexpressing COQ10B were constructed by lentivirus, and the overexpression efficiency was detected by Western blot. CCK8 method is used to detect the PI3K/AKT signal pathway inhibitor LY294002 for esophageal squamous cancer cells half inhibitory concentration (IC₅₀) values. Through EDU, plate cloning experiment, flow cytometry, wound healing, Transwell invasion chamber express COQ10B and tested after joining LY294002 inhibitors of esophageal squamous cancer cell proliferation, apoptosis, migration and invasion ability of influence. Western blot was used to detect the effects of COQ10B overexpression and LY294002 inhibitor on the expression of PI3K/AKT signaling pathway related proteins (PI3K, AKT, p-PI3K and p-AKT) in KYSE150 esophageal squamous cell carcinoma cells. **Results:** COQ10B was relatively highly expressed in ESCC cell lines. Based on RNA transcriptome sequencing technology, a total of 319 significantly differentially expressed genes were screened. Cut genes

* 基金项目: 省部共建中亚高发成因与防治国家重点实验室开放课题资助项目 (SKL-HIDCA-2022-SG1);

新疆维吾尔自治区重点研发计划项目 (2020B03003, 2020B03003-3); 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2022D01C783)

作者简介: 魏瑜 (1988-), 女, 博士研究生, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤的个体化治疗工作, E-mail: Weiyu4039@126.com

[△] 通讯作者: 张莉 (1969-), 女, 主任医师, 教授, 硕士生硕士生导师, 主要从事恶性肿瘤的个体化治疗工作, E-mail: 18799131188@163.com

(收稿日期: 2024-05-29 接受日期: 2024-06-30)

which raised 285 genes, 34, through KEGG pathway analysis selecting and PI3K/AKT signaling pathway as the research object of subsequent molecular mechanisms. LY294002, an inhibitor of PI3K/AKT signaling pathway, showed an enhanced toxic effect on ESCC cells with the increase of concentration and action time. In the subsequent experiments, the IC_{50} value of LY294002 for 48 hours was used. Compared with the negative control group, overexpression of COQ10B in KYSE150 and TE-1 cells significantly enhanced cell proliferation, migration and invasion and inhibited cell apoptosis. However, after treatment with LY294002 inhibitor for 48 h, the proliferation, migration and invasion abilities of ESCC cells enhanced by COQ10B overexpression were significantly inhibited, while the inhibition of apoptosis ability was reversed. Compared with the negative control group, the expression levels of p-PI3K and p-AKT in PI3K/AKT signaling pathway were significantly increased after overexpression of COQ10B in KYSE150 esophageal squamous cell carcinoma cells. Treatment with LY294002 inhibitor for 48 hours significantly inhibited the expression of p-PI3K and p-AKT, which were related proteins in PI3K/AKT signaling pathway enhanced by COQ10B overexpression. **Conclusion:** COQ10B can through the activation of PI3K/AKT signaling pathway to promote esophageal squamous cancer cell proliferation, migration, invasion, and inhibiting apoptosis.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; Coenzyme Q10B; PI3K/AKT signaling pathway; Malignant biological behavior

Chinese Library Classification(CLC): R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)20-3809-09

前言

食管癌(Esophageal cancer, EC)为消化道常见的恶性肿瘤之一。我国仍是全世界食管癌疾病负担最重的国家^[1],据 2022 年我国肿瘤登记数据统计,食管癌发病率和死亡率分别位居我国恶性肿瘤的第七位和第五位^[2],且病理类型主要为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)^[3]。由于食管鳞癌患者约有 4/5 在明确诊断时已为肿瘤中晚期,5 年生存率在 30%左右^[4,5]。因此,在分子水平上探究食管鳞癌的潜在发病机制至关重要,对提高食管鳞癌患者的生存有积极意义。

辅酶 Q10(coenzyme Q, COQ10)是体内重要且高效的脂溶性抗氧化剂,一是在能量转化及合成中起重要作用,参与线粒体内呼吸链的氧化反应,增强 ATP 的合成;二是有明显的抗脂质过氧化作用,COQ10 可转变成具有抗氧化活性的还原产物泛醇(COQH₂),参与抗氧化作用^[6,9]。此外,COQ10 影响许多与代谢、转录调节、细胞运输和细胞信号传导相关的基因的表达,使得 COQ10 可能成为一个有效的基因调节靶点参与肿瘤的发生发展^[10]。有多项研究报道证实^[11,12]COQ10 是可通过 COQ10/FSP1-泛醇轴阻止脂质过氧化,进而抑制铁死亡参与肿瘤的发生发展。COQ10B 作为 COQ10 的同源物之一^[13],本课题组前期实验结果已证实,食管鳞癌组织中 COQ10B 较癌旁组织呈高表达水平,且与食管鳞癌患者预后差相关^[14],提示其可能参与食管鳞癌的发生发展,但其对食管鳞癌细胞恶性生物学行为的影响及机制尚不明确。本研究目的在于探讨 COQ10B 对食管鳞癌细胞恶性生物学行为的影响,并探索其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 食管鳞癌细胞及测序样品来源

人正常食管上皮细胞 Het-1A 购置武汉普诺赛生命科技有限公司。人 ESCC 细胞系(TE-1、KYSE150 和 KYSE450)均购置上海吉凯基因科技有限公司。测序样品为将 KYSE150 细胞分为两组:COQ10B 敲减组(sh-COQ10B)及阴性对照组(sh-NC),利用 TAKARA RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,

委托上海吉凯基因医学科技股份有限公司完成转录组测序。

1.2 试剂

胎牛血清购自 BI 公司;RPMI-1640 培养基和胰酶购自 Gibco 公司;COQ10B 过表达慢病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司;BCA 蛋白分析试剂盒及 ECL 化学发光液购自 Thermo Fisher 公司;EdU-488 细胞增殖检测试剂盒、裂解液和 DMSO 均购自碧云天生物技术;COQ10B I 抗购自 affinity 公司;I 抗 GAPDH、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、HRP 标记山羊抗兔及山羊抗小鼠 II 抗均购自 Abcam 公司;I 抗 β -actin 购自义翘神州;qRT-PCR 试剂购自 TAKARA 生物试剂公司。LY294002 购自 MCE 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养、分组及转染 将 KYSE450、KYSE150、TE-1 及 Het-1A 细胞置于 RPMI 1640 培养基(含 10%胎牛血清及 1%双抗)中,在培养箱(37℃,5% CO₂)中进行培养。取对数生长期 KYSE150、TE-1 细胞按每孔 2×10^5 个细胞接种至 6 孔板中,待细胞密度达 60%左右过表达 COQ10B 的慢病毒及对应阴性对照均以 MOI=20 加入到细胞中。感染 12 h 后更换为含 10%胎牛血清和双抗的 RPMI 1640 培养基,将细胞继续培养至融合度为 70%-80%。收集细胞继续后续实验并利用 Western blot 检测 COQ10B 过表达效率。实验分组为阴性对照组(oe-NC)、COQ10B 基因过表达组(oe-COQ10B)和 COQ10B 基因过表达+LY294002 组(oe-COQ10B+LY294002)。

1.3.2 qRT-PCR 法检测 采用 Trizol 法提取细胞中的 RNA,通过逆转录试剂盒(TAKARA)两步法逆转录成 cDNA。采用 Super Real PreMix Plus(SYBR Green)进行扩增,结果分析采用 $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。COQ10B 引物序列如下:COQ10B-F:5'-TGGAGACTATTTGGCGTTTTAGC-3';COQ10B-R:5'-GCAAGCTGGGAATGTAGAAGTG-3';GAPDH-F:5'-TGACTTCAA CAGCGACACCCA-3';GAPDH-R:5'-CACCTGTTGCTGTAG CCAAA-3'。

1.3.3 转录组测序及数据分析 构建文库的起始 RNA 是总 RNA ($\geq 1 \mu\text{g}$)。使用寡聚物磁珠富集具有多聚腺苷酸尾的 mRNA,利用 NEB 片段缓冲液中的二价阳离子对富集得到的

mRNA 进行片段化。之后以片段化 mRNA 为模版,随机寡核苷酸为引物,进行逆转录反应得到 cDNA 的第一条链。利用核糖核酸酶降解 RNA 链,以 dNTPs、DNA 聚合酶等为原料合成 cDNA 的第二条链。经过末端修复、加 A 尾后的纯化双链 cDNA 与测序接头连接,将 250 bp 左右的 cDNA 筛选出来进行扩增,通过 AMPure XP beads 对 PCR 产物进行纯化,最终得到文库。文库质检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求集中后进行测序。测序获得的原始数据中包含少量带有测序接头或测序质量较低的 reads。对原始数据进行过滤,以保证数据分析的质量及可靠性。采用 DESeq2 软件计算得到 $|\log_2(\text{FoldChange})|$ 值,分析不同组之间的显著差异表达基因,并通过京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 分析揭示不同组之间的显著差异表达基因的通路富集。

1.3.4 Western blot 检测相关蛋白表达 收取各实验组细胞沉淀,用含有蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 裂解液提取总蛋白。采用 BCA 试剂盒蛋白定量,进行 SDS-PAGE 电泳分离,电转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h,一抗 4℃ 孵育过夜,即 (COQ10B, 1:1000; PI3K, 1:1000; p-PI3K, 1:800; AKT, 1:1000; p-AKT, 1:800; β -actin, 1:1000; GAPDH, 1:1000)。TBST 洗膜,加入 HRP 二抗 (1:5000) 室温孵育 1h, TBST 洗膜,条带滴加超敏化学发光显色剂进行曝光显影, Image J 软件进行定量分析。

1.3.5 CCK8 检测 LY294002 药物对食管鳞癌细胞的 IC₅₀ 值 将各实验组细胞以 3×10^3 个 / 孔铺至 96 孔板,每组 3-6 个复孔,在培养箱 (37℃, 5% CO₂) 培养 12-24 小时。吸除各孔培养基,并根据实验设计,实验组分别加入 10 μ M、25 μ M、50 μ M、75 μ M 不同浓度梯度的 LY294002,对照组加入含有 DMSO 的 RPMI 1640 完全培养基,均为 100 μ L / 孔。之后将细胞培养板放入细胞培养箱培养 24 和 48 小时。培养结束后,吸除待测孔培养基,加入 110 μ L 提前配制好的含有 10% CCK8 的完全培养基,将 96 孔板放入细胞培养箱内培养 2 h,用酶标仪在 450 nm 波长处测定各组细胞的吸光度。计算细胞存活率,并绘图。

1.3.6 EDU 检测细胞增殖 将各实验组细胞以 3×10^4 个细胞 / 孔接种到 24 孔板,每组设置 3 个复孔。次日配制 EDU 工作液进行 EDU 标记,采用低浓度在细胞培养箱中孵育 4-6 小时。吸除培养基后每孔加入 500 μ L 4% 多聚甲醛并在室温固定 15 分钟。去除固定液之后洗涤细胞 3 次,每孔加入 1 mL 0.3% TritonX-100 室温通透 15 分钟。去除通透液之后洗涤细胞 3 次,每孔中加入 200 μ L 提前按说明书配制的 Click 反应液,室温避光孵育 30 分钟。之后每孔中加入 1xHoechst 33342 溶液 500 μ L,室温避光孵育 30 分钟。然后用洗涤液洗涤细胞 3 次,用荧光显微镜拍照后分析。

1.3.7 平板克隆形成实验 将各实验组细胞以 800 个 / 孔加入细胞培养板中并摇匀。在细胞培养箱中培养 10 天以上,培养条件为 37℃, 5% CO₂。当培养板中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。中途每隔 3 天进行换液并观察细胞状态。克隆结束后,每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛室温固定 30 分钟,然后吸掉多聚甲醛,用 PBS 清洗 3 次,每次 3-5 分钟。每孔中加入 1 mL 结晶紫染色液,室温孵育 8-10 分钟,之后用流水轻柔缓慢冲洗,随后将细胞培养板倒置,待其干燥后拍照并在显微镜下计数。

1.3.8 流式细胞术检测细胞凋亡 将各实验组细胞用不含 EDTA 的胰酶进行消化,得到的细胞悬液转移至离心管中,低速离心,得到的细胞沉淀使用提前预冷处理的 PBS 溶液充分洗涤 2-3 遍,弃去上清液。用 1 mL 1xbinding buffer 溶液重悬各组细胞,从每组细胞悬液中取 100 μ L 移至 1.5 mL EP 管中。向 EP 管中避光加入染色液,室温条件下避光孵育 15 分钟并不时振动。染色结束后,每管加入 400 μ L 1xbinding buffer 溶液重悬细胞,让其通过筛网过滤一次,然后转移至流式管中,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.9 创面愈合实验 将各实验组细胞密度调整为每毫升 3×10^5 个细胞。取 1 mL 细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中,使细胞完全贴壁且单层细胞融合度应达到 70-80%。将 6 孔板从培养箱中取出,吸除培养基,用 PBS 洗涤 1-2 遍。用 200 μ L 枪头垂直于孔底行 "十" 字形划痕,然后加入 PBS 缓慢清洗掉脱落细胞。加入无血清培养基,继续在培养箱里培养,选择在 0 h、24 h 用荧光显微镜观察并拍照,计算每组细胞迁移率。

1.3.10 Transwell (含 Matrigel 基质胶) 侵袭实验 每个 Transwell 小室铺入 50 μ L Matrigel 基质胶过夜。次日将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化后,使用无血清 RPMI 1640 培养基重悬浮细胞,使细胞数为 5×10^4 个 / 孔;上层加无 FBS 的培养基,下层加入含有 20% FBS 的培养基,孵育 24 h 后,去除上层小室细胞,4% 多聚甲醛溶液固定 30 分钟,小室取出倒扣滤纸上,浸泡结晶紫染色液 30 min,清洗后用棉签轻轻取出未转移的细胞风干。显微镜拍照,分析数据。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 和 Graphpad Prism 9.3 软件,对实验数据进行分析并绘图。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较前进行正态检验和方差同质性检验,两组间比较采用 *t* 检验,多组组间比较采用单因素方差分析 (One-way-ANOVA)。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COQ10B 在食管鳞癌细胞株中表达上调

采用 qRT-PCR 技术分别检测正常食管上皮细胞 Het-1A 和 3 种食管鳞癌细胞系 KYSE150、KYSE450、TE-1 中 COQ10B 蛋白的表达水平,GAPDH 作为内参。结果如图 1 所示,与正常食管上皮细胞 Het-1A 相比,COQ10B 基因在 KYSE450、KYSE150 和 TE-1 细胞系中均高表达。后续的实验细胞系我们选用表达水平处于中等水平的 KYSE150 和 TE-1 细胞。

2.2 COQ10B 干扰慢病毒感染食管鳞癌 KYSE150 细胞后显著差异表达基因分析

将 KYSE150 细胞系的 sh-NC 和 sh-COQ10B 组测序筛选出的差异表达基因进行信息分析,以 $\text{padj} \leq 0.05$ 且 $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1.0$ 为筛选标准,共获 319 个显著性差异表达基因,其中上调基因 285 个,如 IGHEP2 (immunoglobulin heavy constant epsilon P2, 免疫球蛋白重常数 P2)、C16orf90 (chromosome 16 open reading frame 90, 16 号染色体开放阅读框 90)、MSLN1 (mesothelin-like, 间皮素样蛋白) 等;下调基因 34 个,如 ISCA1P4 (iron-sulfur cluster assembly 1 pseudogene 4, 铁-硫簇组

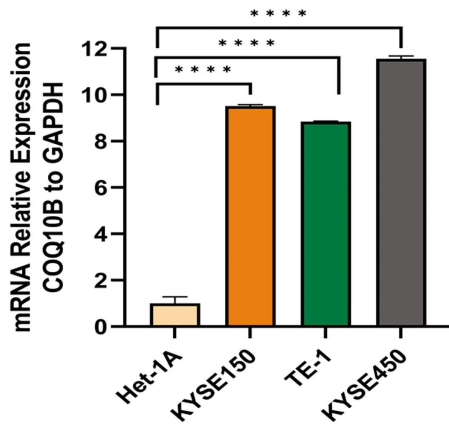


图 1 qRT-PCR 检测 COQ10B 在食管鳞癌细胞及食管上皮细胞中的表达水平
**** $P < 0.0001$

Fig.1 The expression level of COQ10B in ESCC and Esophageal epithelial cell lines was detected by qRT-PCR
**** $P < 0.0001$

合 1 假基因 4)、GNG7(G protein subunit gamma 7,G 蛋白亚基 $\gamma 7$)、RN7SL5P (RNA, 7SL, cytoplasmic 5, pseudogene, RNA, 7SL, 细胞质 5, 假基因)等,见图 2A-B。通过 KEGG 通路富集对

两组差异基因进行分析,结果发现上调差异基因主要影响补体和凝血级联、NOD-样受体信号通路、细胞因子受体相互作用等,见图 2C;下调差异基因主要影响 MAPK 信号通路、Ras 信号通路、PI3K/AKT 信号通路、脂质代谢等,见图 2D。

2.3 食管鳞癌细胞中 PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002 作用的 IC_{50} 值

在分别加入 10 μM 、25 μM 、50 μM 、75 μM 浓度的 LY294002 作用 24 h 后,KYSE150 细胞和 TE-1 细胞的 IC_{50} 值分别为 43.29 μM 和 30.11 μM 。作用 48 h 后,KYSE150 细胞和 TE-1 细胞的 IC_{50} 值分别为 34.18 μM 和 21.03 μM ,表明随着 LY294002 抑制剂的浓度和作用时间的增加,对食管鳞癌细胞的毒性作用增强。为了尽可能地使用低浓度的药物达到相同作用的效果,在后续实验中使用 LY294002 作用 48 h 的 IC_{50} 值左右的药物浓度,见图 3。

2.4 COQ10B 过表达效率检测

采用 Western blot 对过表达效率进行验证。结果如图 4 所示与 oe-NC 组相比,oe-COQ10B 组中 COQ10B 蛋白表达量显著升高($P < 0.01$, $P < 0.001$)。结果表明过表达慢病毒转染成功。

2.5 COQ10B 对 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响

过表达 COQ10B 基因后,并加入 PI3K/AKT 信号通路特异性抑制剂 LY294002 处理 48 小时。采用 Western blot 检测结果

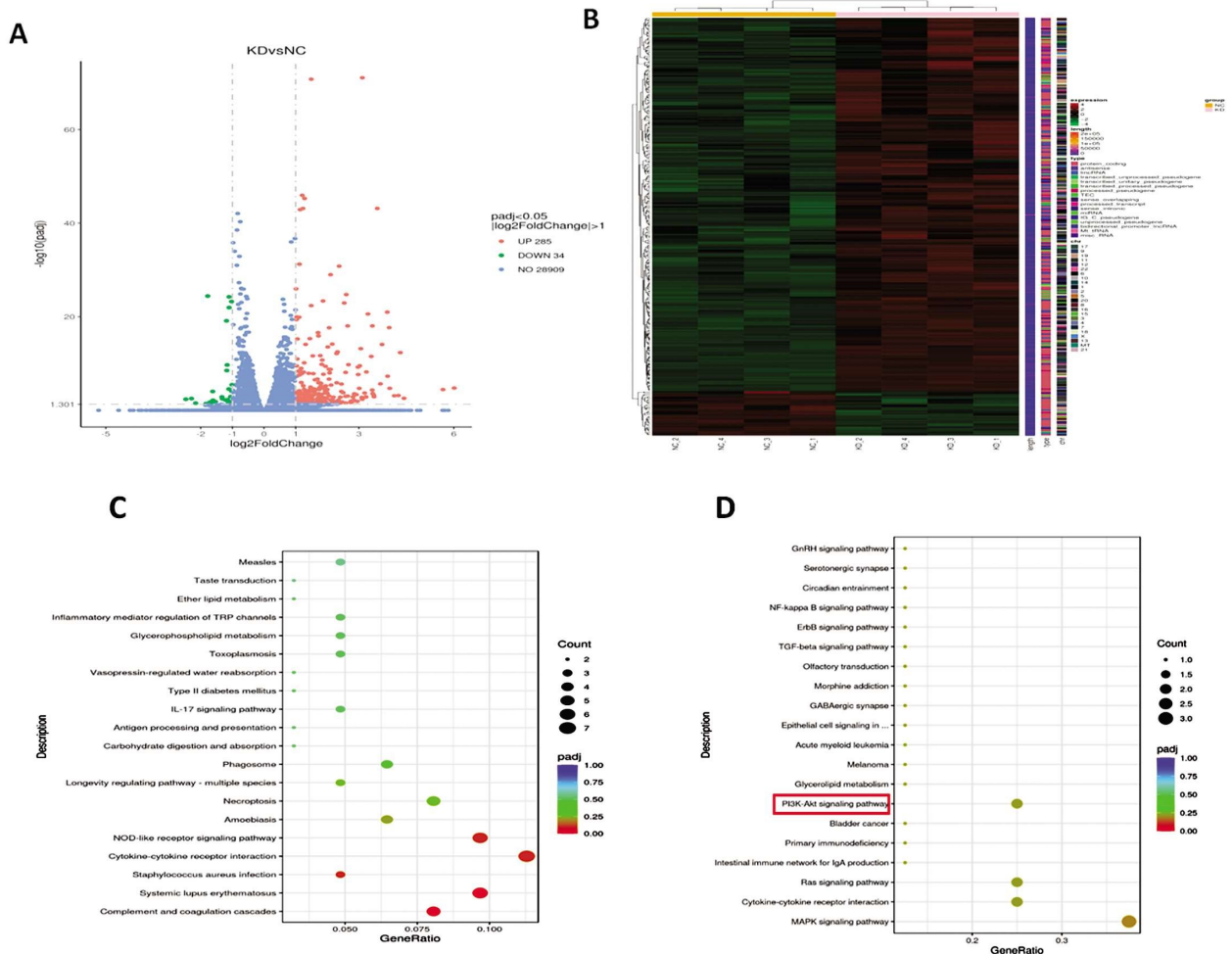


图 2 敲减 COQ10B 后 KYSE150 细胞中显著差异表达基因分析

Fig.2 Analysis of significantly differentially expressed genes in KYSE150 cells after COQ10B knockdown

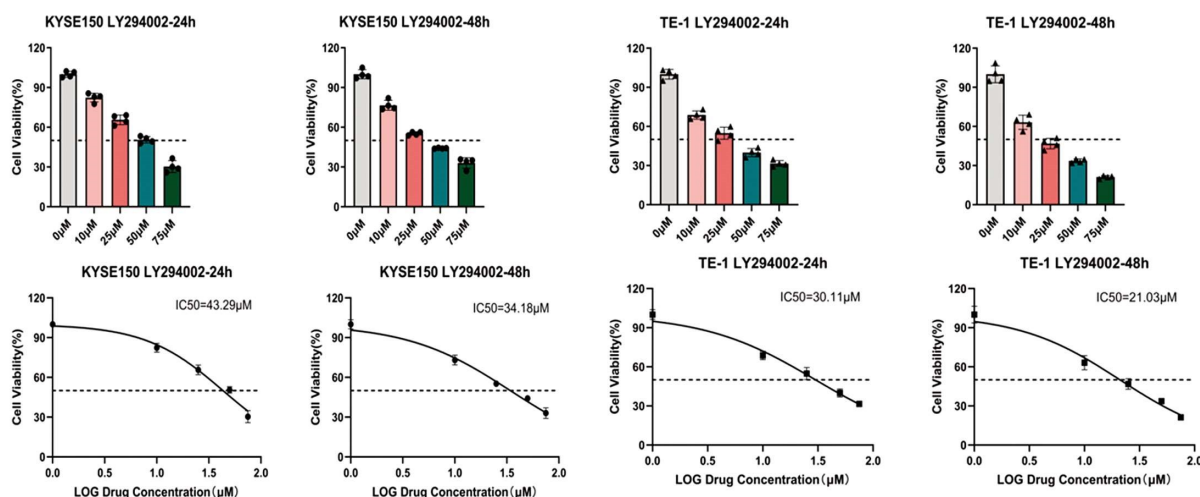


图3 PI3K/AKT 抑制剂 LY294002 在食管鳞癌细胞中的 IC₅₀ 值

Fig.3 IC₅₀ value of PI3K/AKT inhibitor LY294002 in ESCC

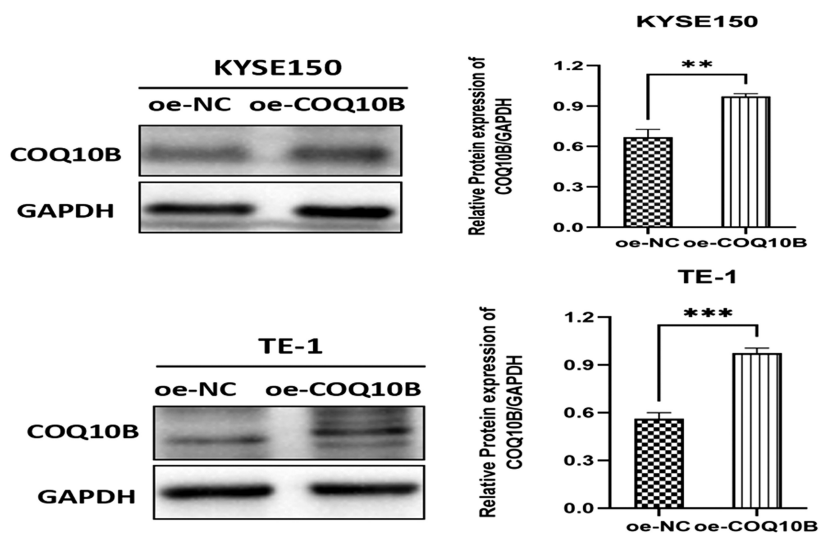


图4 WB 检测食管鳞癌细胞 COQ10B 过表达慢病毒的感染效率

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Fig.4 Detection of COQ10B overexpression lentivirus infection efficiency in ESCC cells by WB

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

如图5所示,与 oe-NC 组相比,oe-COQ10B 组 PI3K/AKT 信号通路中 p-PI3K ($P < 0.0001$)、p-AKT ($P < 0.0001$) 蛋白表达水平显著升高,而 PI3K、AKT 蛋白表达也呈上升趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 oe-COQ10B 组相比,oe-COQ10B+LY294002 组中 PI3K/AKT 信号通路中 p-PI3K ($P < 0.0001$)、p-AKT ($P < 0.01$) 蛋白表达水平被显著抑制,而 PI3K、AKT 蛋白表达也呈下降趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明加入 LY294002 可显著抑制因 COQ10B 过表达所增强的 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白 p-PI3K、p-AKT 表达水平。

2.6 COQ10B 通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进食管鳞癌细胞增殖

平板克隆形成实验结果如图6所示,与 oe-NC 组相比,oe-COQ10B 组 KYSE150 和 TE-1 细胞克隆团明显增多 ($P < 0.01, P < 0.001$),而加入 LY294002 后可以明显减少因过表达 COQ10B 所增加的细胞克隆团数量(均为 $P < 0.0001$)。

为进一步佐证平板克隆实验结果,采用 EDU 实验检测细

胞增殖,结果如图7所示,与 oe-NC 组相比,oe-COQ10B 组 KYSE150 和 TE-1 细胞中细胞 DNA 复制能力明显增强,EDU 阳性细胞数明显增加(均为 $P < 0.01$);而加入 LY294002 后可显著抑制因过表达 COQ10B 所增强的细胞 DNA 复制能力,EDU 阳性细胞数明显减少(均为 $P < 0.01$)。以上平板克隆实验以及 EDU 增殖实验证实过表达 COQ10B 可促进 ESCC 细胞的增殖,然而在加入通路抑制剂 LY294002 后可显著抑制 ESCC 细胞的增殖。

2.7 COQ10B 通过激活 PI3K/AKT 信号通路抑制食管鳞癌细胞凋亡

采用流式细胞术检测过表达 COQ10B 及加入 LY294002 对细胞凋亡的影响。结果如图8所示,与 oe-NC 组相比,oe-COQ10B 组 KYSE150 和 TE-1 细胞凋亡数量显著减少 ($P < 0.001, P < 0.01$);而加入 LY294002 后可逆转过表达 COQ10B 所抑制的细胞凋亡能力(均为 $P < 0.05$)。提示过表达 COQ10B 可通过激活 PI3K/AKT 信号通路抑制食管鳞癌细胞凋亡。

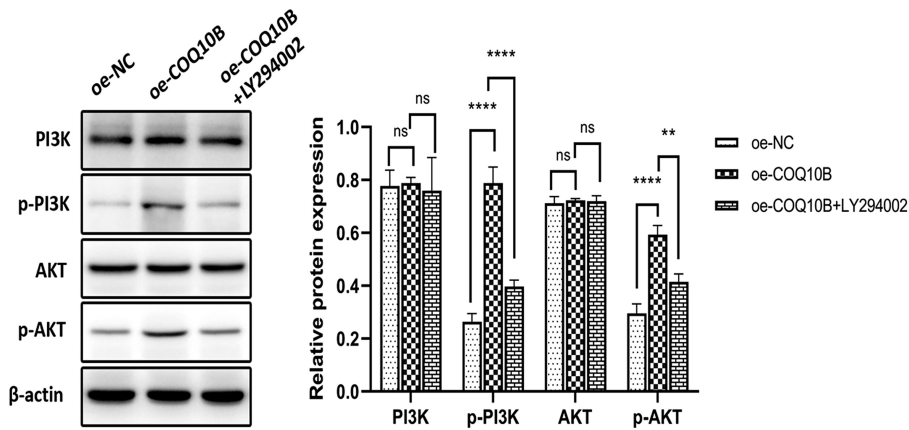


图 5 Western blot 方法检测加入 LY294002 后对 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响

ns>0.05, ** P <0.01, **** P <0.0001

Fig.5 The effect of LY294002 pathway inhibitor on the expression of related proteins in PI3K/AKT signaling pathway by WB

ns>0.05, ** P <0.01, **** P <0.0001

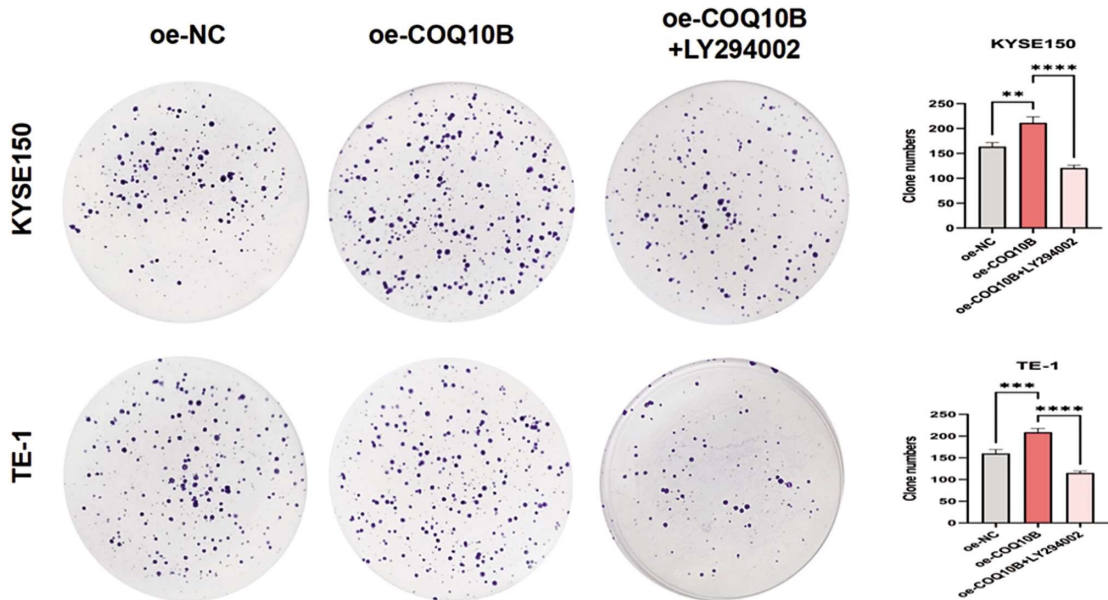


图 6 平板克隆形成实验检测过表达 COQ10B 及加入 LY294002 后对细胞克隆能力的影响

** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001

Fig.6 The effect of LY294002 on the cell cloning ability of overexpressed COQ10B by colony formation assays

** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001

2.8 COQ10B 通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进食管鳞癌细胞迁移

通过创面愈合实验探究过表达 COQ10B 及加入 LY294002 对食管鳞癌细胞迁移能力的影响。结果如图 9 所示,与 oe-NC 组相比,oe-COQ10B 组 KYSE150 和 TE-1 细胞迁移能力显著增强(均为 P <0.001);而加入 LY294002 后可显著抑制因过表达 COQ10B 所增强的细胞迁移能力(均为 P <0.001)。提示过表达 COQ10B 可通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进食管鳞癌细胞迁移。

2.9 COQ10B 通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进食管鳞癌细胞侵袭

通过 Transwell 实验探究过表达 COQ10B 及加入 LY294002 对食管鳞癌细胞侵袭能力的影响。结果如图 10 所示,与 oe-NC 组相比,oe-COQ10B 组 KYSE150 和 TE-1 细胞侵

袭能力显著增强(P <0.001, P <0.01);而加入 LY294002 后可显著抑制因过表达 COQ10B 所增强的细胞侵袭能力 (P <0.001, P <0.01)。提示过表达 COQ10B 可通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进食管鳞癌细胞侵袭。

3 讨论

COQ10 的抗氧化作用可以减少受损细胞的自由基和活性氧的产生,还可以通过氧化还原信号来控制细胞的能量代谢和死亡的调节^[15]。COQ10B 是 COQ10 同源物之一。有研究表明降低 COQ10B 水平可诱导线粒体呼吸链功能障碍导致人肾皮质近曲小管上皮细胞(HK-2)凋亡^[16]。此外,有研究报道 COQ10B 为非线粒体内的 COQ10,具有强抗氧化作用,通过影响脂质过氧化的启动过程,有效避免自由基对膜脂质过氧化,线粒体 DNA 和膜蛋白氧化损伤。同时,在多种细胞器和质膜上直接与

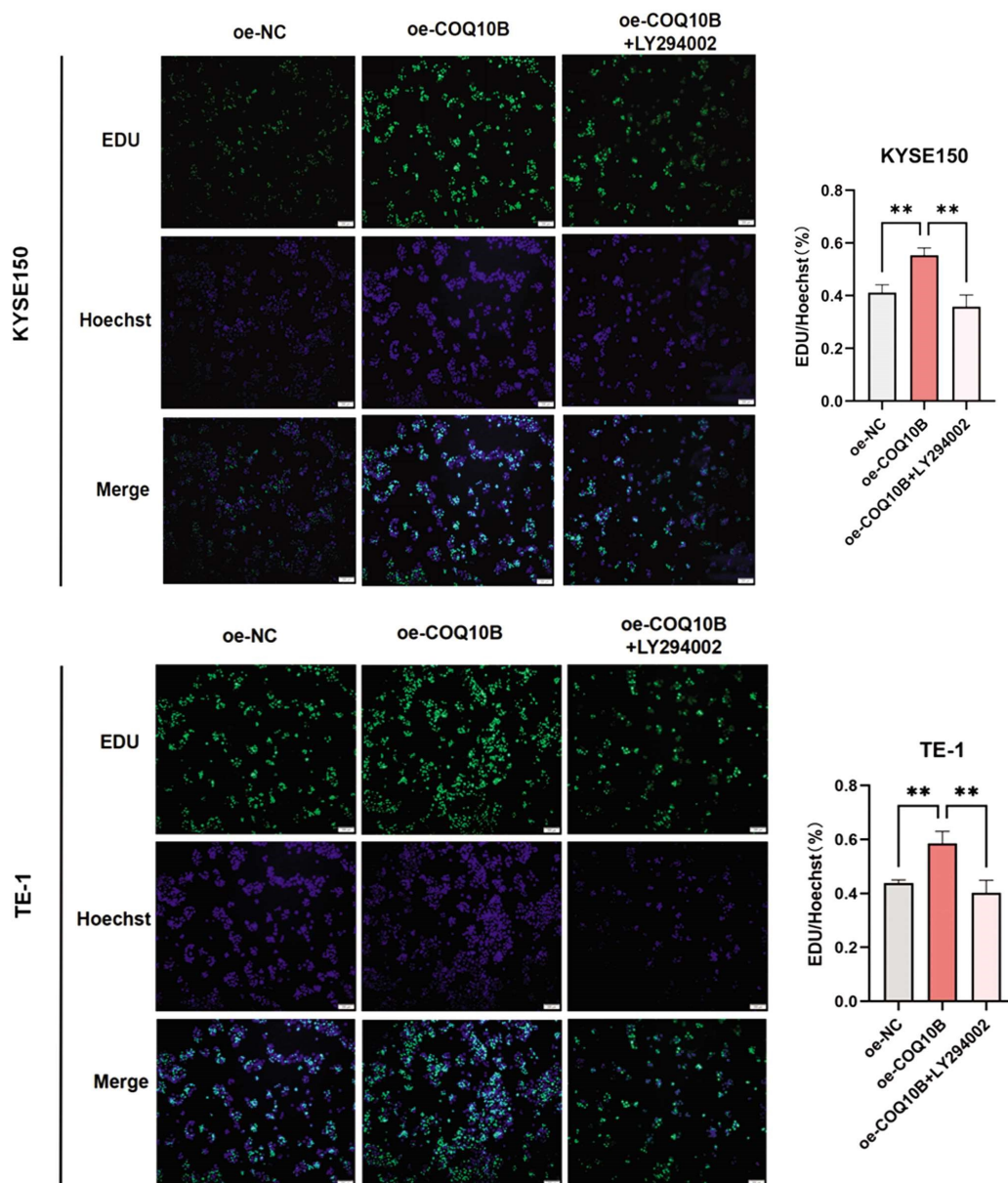


图 7 EDU 检测加入 LY294002 后对过表达 COQ10B 细胞 DNA 复制能力的影响

** $p < 0.01$

Fig.7 The effect of LY294002 on the DNA replication ability of overexpressed COQ10B was detected by EDU

** $p < 0.01$

自由基反应, 促进氧化型维 E 和维 C 还原再生发挥抗氧化作用, 从而抑制铁死亡促进肿瘤生长^[17]。

本研究从细胞水平分析发现 COQ10B 在食管鳞癌细胞中的表达量显著高于正常食管上皮细胞。并通过 CCK8、平板克隆实验、流式细胞术、创面愈合实验和 Transwell 实验证实过表达 COQ10B 基因后, 食管鳞癌细胞增殖、迁移及侵袭能力显著增强, 并抑制其凋亡, 提示 COQ10B 在 ESCC 发生发展中扮演着促癌因子的角色。通过转录组测序结果发现与阴性对照组相比, COQ10B 敲减组共有 319 个显著差异基因, 其中上调基因 285 个如 IGHEP2、C16orf90、MSLNL 等; 下调基因 34 个 ISCA1P4、GNG7、RN7SL5P 等。这里值得注意的是 ISCA1P4 与 COQ10B 表达成正相关。ISCA1P4 属于铁硫簇(ISC)蛋白家族, 有研究报道富氧环境中, 肺癌细胞的存活依赖于铁硫簇生物合成, 铁硫簇缺乏可强烈地激活铁-饥饿应答(iron-starvation re-

sponse)从而引发细胞铁死亡^[18]。此外, 有研究探讨了铁硫簇缺乏通过调控铁代谢稳态影响癌细胞对铁死亡敏感性的分子机制, 结果发现抑制铁硫簇合成可以激活铁调节蛋白 2(iron regulatory protein, IRP2)增强铁死亡的敏感性。在低 O₂ 浓度下, 铁硫簇缺乏增强了 IRP2 与靶基因的结合, 且不依赖于铁调节蛋白 1(iron regulatory protein, IRP1)、FBXL5 和 IRP2 蛋白水平的变化。IRP1 和 IRP2 的敲除则阻止了铁硫簇合成抑制对铁-饥饿反应的激活^[19]。这些发现将有助于控制铁死亡敏感性的策略。这与 COQ10B 的合成可通过直接清除脂质过氧自由基抑制铁死亡的报道结果相一致^[17]。综上所述, 铁硫簇和 COQ10B 可通过抑制细胞铁死亡从而促进肿瘤进展。

在分析了基于基因表达水平的差异基因后, 本研究对差异表达基因进行 KEGG 信号通路富集分析发现 COQ10B 可能与 PI3K/AKT 信号通路密切相关。有研究报道, COQ10 可通过激

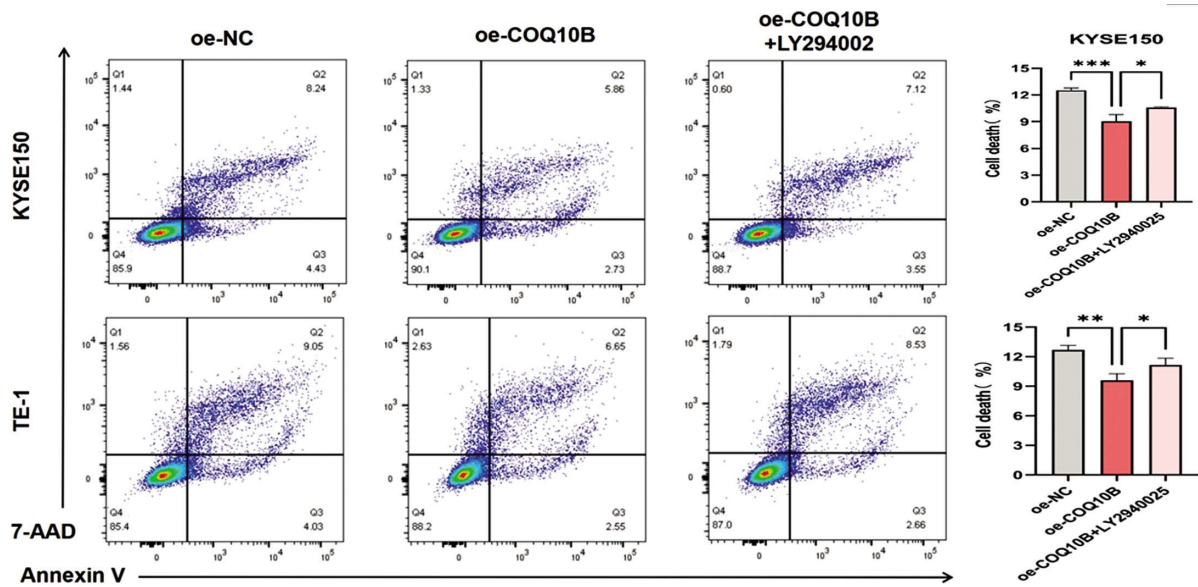


图 8 流式细胞仪检测加入 LY294002 后对过表达 COQ10B 细胞凋亡能力的影响

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Fig.8 The effect of LY294002 on apoptosis ability of overexpressed COQ10B by flowcytometry assay

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

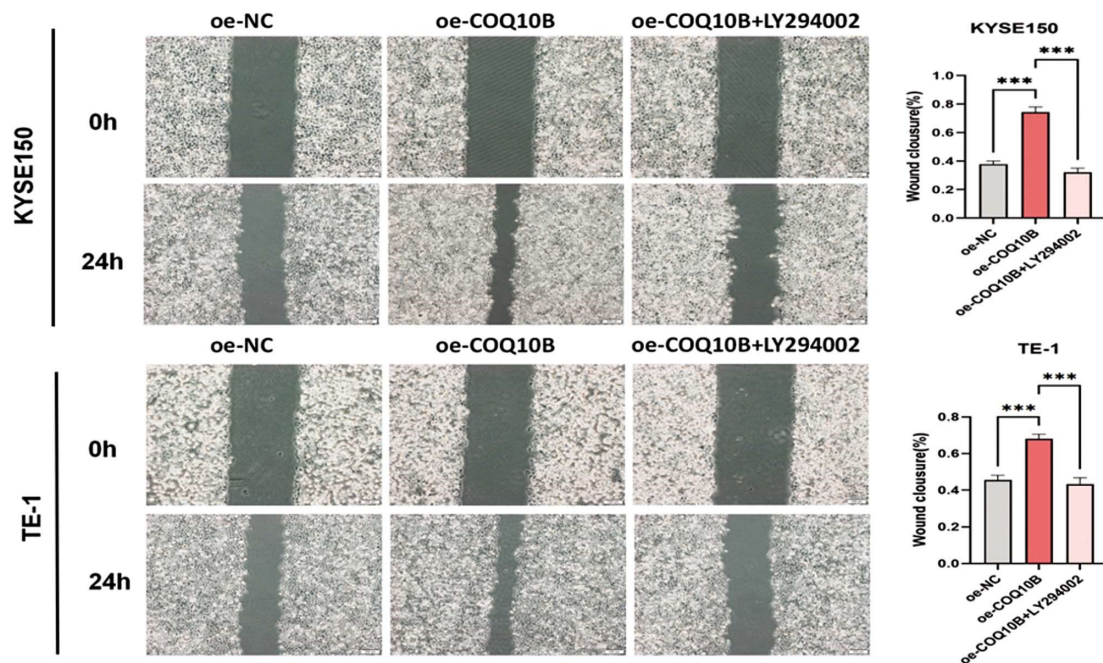


图 9 创面愈合实验检测加入 LY294002 后对过表达 COQ10B 细胞迁移能力的影响

*** $P < 0.001$

Fig.9 The effect of LY294002 on migration ability of overexpressed COQ10B by wound healing assay

*** $P < 0.001$

活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路减少胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs) 细胞自噬水平, 进而抑制 PSCs 活化, 改善胰腺纤维化^[20]。另有研究表明, COQ10 激活下游 PI3K/AKT 信号通路, 从而导致人类永生表皮细胞的伤口闭合^[21]。此外, COQ10 通过激活 AKT 信号通路增强瑞舒伐他汀在全脑缺血模型中的神经保护作用^[22], 并通过激活 PI3K/AKT 通路恢复 A β 25-35 寡聚物抑制的神经干细胞 (NSCs) 的增殖^[23]。综上所述, 本研究选取 PI3K/AKT 信号通路作为 COQ10B 调控食管鳞

癌演进的分子机制进行深入研究。

PI3K/AKT 在食管鳞癌的发展中异常激活, 与癌细胞的迁移、黏附、肿瘤血管的生成及细胞质基质的降解密切相关^[24]。PI3K/AKT 通路相关信号分子自身磷酸化后使得下游靶蛋白 Bcl-2 家族成员、c-Myc 等, 进而调节肿瘤细胞的增殖、迁移、凋亡等生物学行为。LY294002 是第一个合成的 PI3K α , δ 和 β 抑制剂, 能够阻断 PI3K 信号通路的蛋白激酶抑制剂^[25]。目前它被广泛用于 PI3K/AKT 信号通路的表征研究中。本研究通过

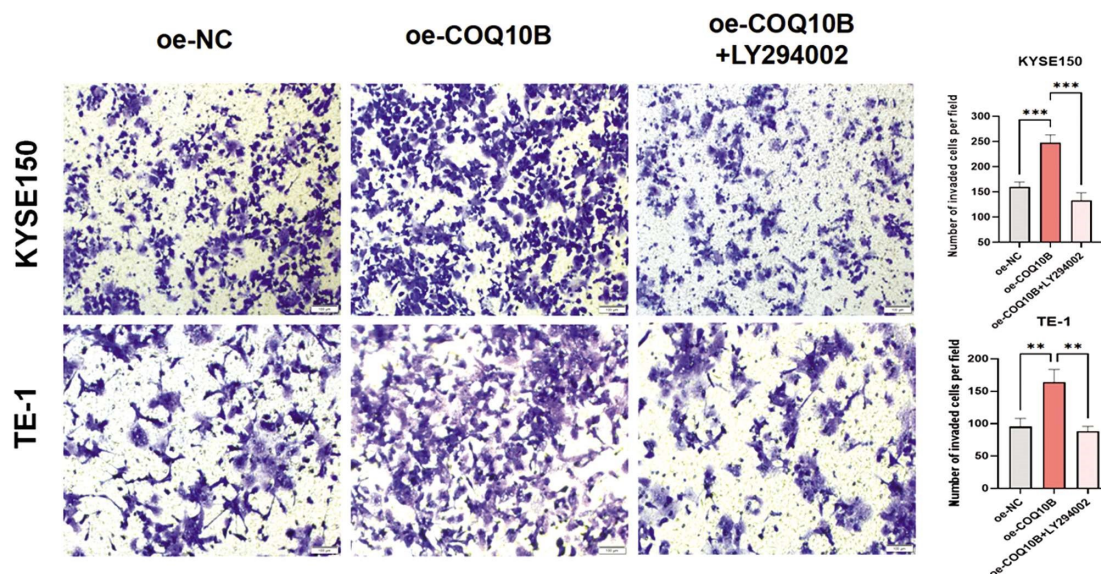


图 10 Transwell(含 Matrigel)实验检测加入 LY294002 后对过表达 COQ10B 细胞侵袭能力的影响

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Fig.10 The effect of LY294002 on invasion ability of overexpressed COQ10B cells by Transwell assay containing Matrigel

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Western blotting 实验发现, 过表达 COQ10B 可显著上调 KYSE150 细胞中下游信号通路磷酸化 PI3K 和磷酸化 AKT 蛋白表达,但在加入 LY294002 抑制剂后 PI3K、AKT 磷酸化被抑制。同时食管鳞癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭等分子功能学实验亦证实加入 LY294002 抑制剂后,COQ10B 过表达所增强的增殖、迁移、侵袭能力均受到抑制,而凋亡能力的抑制被逆转。

综上所述,本研究从细胞水平一定程度上证实了 COQ10B 可通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进食管鳞癌细胞恶性生物学行为。目前,关于 COQ10B 在食管鳞癌发生发展中的研究鲜有报道,通过深入研究 COQ10B 的作用及其分子机制,将有助于未来广泛应用于指导临床治疗,对改善食管鳞癌患者的预后具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer[EB/OL]. <https://gco.iarc.who.int/today>.
- [2] Liu B, Fan Y, Song Z, et al. Identification of DRP1 as a prognostic factor correlated with immune infiltration in breast cancer [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 89(Pt B): 107078.
- [3] 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(03): 221-231.
- [4] Thrift AP. The epidemic of oesophageal carcinoma: Where are we now[J]. Cancer Epidemiol, 2016, 41: 88-95.
- [5] Zeng H, Chen W, Zheng R, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15:a pooled analysis of 17 population-based cancer registries[J]. Lancet Glob Health, 2018, 6(5): e555-e567.
- [6] Testai L, Martelli A, Flori L, et al. Coenzyme Q10: Clinical Applications beyond Cardiovascular Diseases [J]. Nutrients, 2021, 13(5): 1697.
- [7] Pallotti F, Bergamini C, Lamperti C, et al. The Roles of Coenzyme Q in Disease: Direct and Indirect Involvement in Cellular Functions[J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 128.
- [8] Kumar A, Kaur H, Devi P, et al. Role of coenzyme Q10(CoQ10)in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome [J]. Pharmacol Ther, 2009, 124(3): 259-268.
- [9] Hargreaves I, Heaton RA, Mantle D. Disorders of Human Coenzyme Q10 Metabolism:An Overview[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6695.
- [10] Guerra RM, Pagliarini DJ. Coenzyme Q biochemistry and biosynthesis[J]. Trends Biochem Sci, 2023, 48(5): 463-476.
- [11] Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor[J]. Nature, 2019, 575(7784): 693-698.
- [12] Koppula P, Lei G, Zhang Y, et al. A targetable CoQ-FSP1 axis drives ferroptosis- and radiation-resistance in KEAP1 inactive lung cancers [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2206.
- [13] Tsui HS, Pham NVB, Amer BR, et al. Human COQ10A and COQ10B are distinct lipid-binding START domain proteins required for coenzyme Q function[J]. J Lipid Res, 2019, 60(7): 1293-1310.
- [14] 魏瑜, 曹雷雨, 高艳, 等. COQ10B 在食管鳞癌中的表达及其调控 Snail 表达促进食管鳞癌细胞增殖与侵袭[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(12): 2146-2154.
- [15] Crane FL. Discovery of ubiquinone (coenzyme Q)and an overview of function[J]. Mitochondrion, 2007, 7 Suppl: S2-S7.
- [16] Wang Y, Chi H, Xu F, et al. Cadmium chloride-induced apoptosis of HK-2 cells via interfering with mitochondrial respiratory chain [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 236: 113494.
- [17] Zhong G, Li Y, Ma F, et al. Copper Exposure Induced Chicken Hepatotoxicity: Involvement of Ferroptosis Mediated by Lipid Peroxidation, Ferritinophagy, and Inhibition of FSP1-CoQ10 and Nrf2/SLC7A11/GPX4 Axis [J]. Biol Trace Elem Res, 2024, 202(4): 1711-1721.
- [18] Johnson NB, Deck KM, Nizzi CP, et al. A synergistic role of IRP1 and FBXL5 proteins in coordinating iron metabolism during cell proliferation[J]. J Biol Chem, 2017, 292(38): 15976-15989.

(下转第 3844 页)

- [7] 许玉,程忠平. 基于类器官模型的宫颈癌铂类化疗药物敏感性的免疫组化指标分析与探索[J]. 同济大学学报(医学版), 2021, 42(1): 68-73.
- [8] Cree IA, White VA, Indave BI, et al. Revising the WHO classification: female genital tract tumours[J]. *Histopathology*, 2020, 76(1): 151-156.
- [9] Mestrovic T, Ljubin-Sternak S, Bozic evic I, et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence, temporal dynamics and association with abnormal cervical cytology findings in women from Croatia: is there a compounding effect of low-risk / high-risk HPV Co-infection? [J]. *Clin Lab*, 2020, 66(12): 19-27.
- [10] Mirabello L, Yeager M, Yu K, et al. HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis[J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1164-1174.
- [11] 孟俊,许啸声,陆一一,等. 2017年至2020年上海地区妇女宫颈脱落细胞 HPV 感染亚型 调查分析 [J]. *诊断学理论与实践*, 2021, 20(06): 567-572.
- [12] Zhang M, Zhong Y, Wang L, et al. Cervical cancer screening coverage-China, 2018-2019[J]. *China CDC Weekly*, 2022, 4(48): 1077.
- [13] US Preventive Services Task Force, Curry SJ, Krist AH, et al. Screening for cervical cancer: US preventive services task force recommendation statement[J]. *JAMA*, 2018, 320(7): 674-686.
- [14] Canfell K, Saville M, Caruana M, et al. Protocol for compass: A randomised controlled trial of primary HPV testing versus cytology screening for cervical cancer in HPV-unvaccinated and vaccinated women aged 25-69 years living in Australia [J]. *BMJ Open*, 2018, 8: e016700.
- [15] 樊凌云,王欢,韩毅敏. 人乳头瘤病毒新型检测及分型方法的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(03): 525-528.
- [16] Brant A C, Menezes A N, Felix S P, et al. Preferential expression of a HPV genotype in invasive cervical carcinomas infected by multiple genotypes[J]. *Genomics*, 2020, 112(5): 2942-2948.
- [17] WHO. Guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention[M/OL]. 2nd edition. [2023-09-05].
- [18] Poljak M, Ostrbenk Valenc ak A, Gimpelj Domjanic G, et al. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses: a global overview[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(9): 1144-1150.
- [19] Akar S, Harmankaya I, Ugras S, et al. Expression and clinical significance of nicotinamide N-Methyltransferase in cervical squamous cell carcinoma[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2020, 39(3): 289-295.
- [20] Bhatla N, Singhal S. Primary HPV screening for cervical cancer[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2020, 65: 98-108.
- [21] Peto J, Gilham C, Fletcher O, et al. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK[J]. *Lancet*, 2004, 364(9430): 249-256.
- [22] Pyo JS, Kang G, Yoon HK, et al. Diagnostic test accuracy review of cytology for squamous intraepithelial lesion and squamous cell carcinoma of uterine cervix[J]. *J Korean Med Sci*, 2019, 34 (2): e16.
- [23] 张爱华. TCT 和 HPV-DNA 检测在宫颈癌前病变筛查中的临床应用[J]. *中华现代妇产科学杂志*, 2005, 2(11): 1039-1040.
- [24] 潘琪,杨二姣,韩大芬,等. TCT 联合 HPV 检测诊断宫颈病变的临床价值分析[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(01): 80-83.
- [25] Cohen E, Coviello C, Menaker S, et al. P16 and humanpapillomavirus in sinonasal squamous cell carcinoma [J]. *Head Neck*, 2020, 42(8): 2021-2029.
- [26] Li M, Yang J, Liu K, et al. P16 promotes proliferation in cervical carcinoma cells through CDK6-HuR-IL1A axis[J]. *J Cancer*, 2020, 11(6): 1457-1467.
- [27] 邱晓阳,王少洪,郑璟,等. 免疫细胞化学 P16 /Ki-67 双染检测对宫颈细胞学阴性且 HR-HPV 阳性的分流 作用及组织学 LSIL 的转归 预测价值[J]. *中国癌症杂志*, 2020, 30(7): 512-518.
- [28] Yingxun WANG, Tian ZHANG, Zhihao CAI, et al. Multi-UAV coordination control by chaotic grey wolf optimization based distributed MPC with event-triggered strategy [J]. *Chinese Journal of Aer onautics*, 2020, 33(11): 2877-2897.

(上接第 3817 页)

- [19] Terzi EM, Sviderskiy VO, Alvarez SW, et al. Iron-sulfur cluster deficiency can be sensed by IRP2 and regulates iron homeostasis and sensitivity to ferroptosis independent of IRP1 and FBXL5[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(22): eabg4302.
- [20] Xue R, Yang J, Wu J, et al. Coenzyme Q10 inhibits the activation of pancreatic stellate cells through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(54): 92300-92311.
- [21] Kurashiki T, Horikoshi Y, Kamizaki K, et al. Molecular mechanisms underlying the promotion of wound repair by coenzyme Q10: PI3K/Akt signal activation via alterations to cell membrane domains [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2022, 70(3): 222-230.
- [22] Abd El-Aal SA, Abd El-Fattah MA, El-Abhar HS. CoQ10 Augments Rosuvastatin Neuroprotective Effect in a Model of Global Ischemia via Inhibition of NF- κ B/JNK3/Bax and Activation of Akt/FOXO3A/ Bim Cues[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 735.
- [23] Choi H, Park HH, Lee KY, et al. Coenzyme Q10 restores amyloid beta-inhibited proliferation of neural stem cells by activating the PI3K pathway[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(15): 2112-2120.
- [24] Yang J, Nie J, Ma X, et al. Targeting PI3K in cancer:mechanisms and advances in clinical trials[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 26.
- [25] Guney Eskiler G, Ozturk M. Therapeutic potential of the PI3K inhibitor LY294002 and PARP inhibitor Talazoparib combination in BRCA-deficient triple negative breast cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2022, 91: 110229.