

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.01.008
文章编号: 1005-8982 (2022) 01-0040-07

实验研究·论著

EphA2基因沉默对人食管癌EC9706细胞迁移、侵袭的影响及其机制研究

任利兵, 贾如江, 苏春永, 杨晓光, 秦景云
(邯郸市中心医院 胸外科, 河北 邯郸 056001)

摘要: **目的** 探讨促红细胞生成素产生肝细胞受体A2(*EphA2*)基因沉默对人食管癌EC9706细胞迁移、侵袭的影响及其作用机制。**方法** 取对数生长期人食管癌EC9706细胞随机分为对照组、空载组及沉默组, 分别转染Lipofectamine™ 2000、含无义随机序列(siRNA-NC-PGCsi.3.0)和*EphA2*干扰序列(*EphA2*-siRNA-PGC-si.3.0)质粒和脂质体的复合物。稳定转染后, Brd U法检测细胞增殖能力, 划痕实验检测细胞迁移能力, Transwell小室实验检测细胞侵袭能力, qRT-PCR和Western blotting分别检测细胞中*EphA2*、Wnt1、 β -连环蛋白(β -catenin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)mRNA及蛋白相对表达量。**结果** 对照组、空载组、沉默组Brd U阳性率分别为(26.48±2.79)%、(23.52±2.57)%、(13.29±2.06)%, Brd U阳性率组间比较, 差异有统计学意义($F=38.560, P=0.000$)。与对照组、空载组比较, 沉默组Brd U阳性率降低($P<0.05$); 对照组与空载组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组、空载组、沉默组细胞划痕愈合率分别为(83.16±8.31)%、(82.35±7.24)%、(34.24±5.27)%, 细胞划痕愈合率组间比较, 差异有统计学意义($F=78.869, P=0.000$)。与对照组、空载组比较, 沉默组细胞划痕愈合率降低($P<0.05$); 对照组与空载组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组、空载组、沉默组穿膜细胞数分别为(326.74±33.15)个、(331.27±34.59)个、(126.23±26.18)个, 穿膜细胞数组间比较, 差异有统计学意义($F=68.997, P=0.000$), 与对照组、空载组比较, 沉默组穿膜细胞数减少($P<0.05$); 对照组与空载组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。细胞中*EphA2*、Wnt1、 β -catenin、E-cadherin、Vimentin mRNA相对表达量比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 与对照组、空载组比较, 沉默组Wnt1、 β -catenin、Vimentin mRNA相对表达量降低($P<0.05$), E-cadherin mRNA相对表达量升高($P<0.05$)。对照组、空载组、沉默组细胞中*EphA2*、Wnt1、 β -catenin、E-cadherin、Vimentin蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 与对照组、空载组比较, 沉默组*EphA2*、Wnt1、 β -catenin、Vimentin蛋白相对表达量降低($P<0.05$), E-cadherin蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。对照组和空载组上述指标比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** *EphA2*基因沉默对人食管癌EC9706细胞迁移和侵袭有一定的抑制作用, 其机制可能与阻止Wnt/ β -catenin信号通路相关。

关键词: 食管肿瘤; 促红细胞生成素产生肝细胞受体A2; 迁移; 侵袭

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

Effect and mechanism of *EphA2* gene silencing on migration and invasion of human esophageal carcinoma EC9706 cells

Li-bing Ren, Ru-jiang Jia, Chun-yong Su, Xiao-guang Yang, Jing-yun Qin
(Department of Thoracic Surgery, Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of erythropoietin producing hepatoma receptor (Eph) receptor A2 gene silencing on migration and invasion of human esophageal cancer EC9706 cells.

收稿日期: 2021-06-12

Methods Human esophageal cancer EC9706 cells in logarithmic growth phase were randomly divided into control group, empty group, and silent group, transfected with Lipofectamine™ 2000, containing nonsense random sequence (siRNA-NC-PGCsi3.0) and EphA2 interference sequence (EphA2-siRNA-PGCsi3.0). After stable transfection, Brd U method was used to detect cell proliferation ability, scratch test to detect cell migration ability, Transwell cell test to detect invasion ability, qRT-PCR and Western blotting to detect the mRNA and protein expression levels of EphA2, Wnt1, β -catenin, E-cadherin, Vimentin in cells. **Results** The relative expression of EphA2 mRNA in the control group, no-load group, and silent group were (1.78 ± 0.17) , (1.82 ± 0.18) , (0.37 ± 0.11) , respectively. The difference between the groups was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group and the no-load group, the relative expression of EphA2 mRNA in the silent group decreased ($P < 0.05$). The positive rates of Brd U in the control group, the no-load group, and the silent group were $(26.48 \pm 2.79)\%$, $(23.52 \pm 2.57)\%$, $(13.29 \pm 2.06)\%$, respectively. The difference between the groups was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group and the no-load group, the positive rate of Brd U in the silent group was lower ($P < 0.05$). The cell scratch healing rates of the control group, no-load group, and silent group were $(83.16 \pm 8.31)\%$, $(82.35 \pm 7.24)\%$, $(34.24 \pm 5.27)\%$, respectively. The difference between the groups was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group and the no-load group, the cell scratch healing rate of the silent group increased ($P < 0.05$). The number of transmembrane cells in the control group, the no-load group, and the silent group were (326.74 ± 33.15) , (331.27 ± 34.59) , (126.23 ± 26.18) , respectively. The difference between the groups was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group and the no-load group, the number of transmembrane cells in the silent group decreased ($P < 0.05$). The differences of relative expression levels of Wnt1, β -catenin, E-cadherin, and Vimentin mRNA were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group and the no-load group, the relative expression of Wnt1, β -catenin, Vimentin mRNA in the silent group decreased, and the relative expression of E-cadherin mRNA increased ($P < 0.05$). The difference of relative expression levels of EphA2, Wnt1, β -catenin, E-cadherin, and Vimentin protein in cells were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group and the no-load group, the relative expression of EphA2, Wnt1, β -catenin, and Vimentin protein in the silent group decreased, and the relative expression of E-cadherin protein increased ($P < 0.05$). The comparison of the above indicators between the control group and the no-load group showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** *EphA2* gene silencing has a certain inhibitory effect on the migration and invasion of human esophageal cancer EC9706 cells, and its mechanism may be related to preventing the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords: esophageal neoplasms; erythropoietin produces hepatocyte receptor A2; migration; invasion

食管癌发生在食管上皮组织,是消化道常见的恶性肿瘤之一,发病率及病死率均较高,对人们生命和健康造成严重危害。我国是食管癌发病和死亡人数最多的国家,目前治疗手段以手术切除为主,5年内存活率低于30%^[1]。食管癌的发生、侵袭及转移过程极其复杂,其中涉及到多个基因调控异常,癌细胞的侵袭和转移是食管癌预后差的主要原因之一^[2]。促红细胞生成素产生肝细胞受体(erythropoietin produces hepatocyte receptor, Eph)家族是一类酪氨酸蛋白激酶受体,在肿瘤细胞增殖和迁移相关信号通路中起关键调控作用,EphA2是Eph家族最早发现的成员,广泛表达于上皮来源的细胞,参与肿瘤侵袭、转移过程^[3]。研究表明,EphA2在乳腺癌、胃癌、前列腺癌等多种肿瘤组织和细胞中表达异常升高,促进肿瘤细胞恶性表型行为。高活性的EphA2与肿瘤上皮间质转化

(epithelial-mesenchymal-transition, EMT)密切相关,肿瘤细胞发生EMT后更易发生侵袭和迁移,是早期诱发肿瘤细胞侵袭和迁移的关键环节^[4-5]。EphA2在食管癌细胞中参与细胞侵袭和迁移机制研究尚少,本研究在RNA干扰条件下,探讨EphA2对食管癌细胞侵袭和迁移的影响,以为食管癌的治疗提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人食管癌EC9706细胞购于中国科学院上海细胞研究所。

1.1.2 主要试剂和仪器 RPMI 1640培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素(美国Gibco公司), Brd U(美国Sigma公司),含有EphA2干扰序列(EphA2-siRNA)、无义随机干扰序列(siRNA-NC)

的PGCsi3.0质粒(中国吉凯基因公司),Lipofectamine™ 2000试剂盒(美国Invitrogen公司),Transwell细胞培养小室(美国Corning公司),兔抗人EphA2单抗、Wnt1多抗、 β -连环蛋白(β -catenin)单抗、E-钙黏蛋白(E-cadherin)单抗、波形蛋白(Vimentin)单抗、山羊抗兔IgG-HRP(美国Abcam公司),PowerPac系列电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人食管癌EC9706细胞复苏后,置于含有10% FBS、100 u/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI 1640培养液中,于5%的二氧化碳培养箱,37℃恒温培养,2~3 d传代1次。取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2.2 细胞分组及转染 将EC9706细胞随机分为对照组、空载组及沉默组。转染前24 h,将细胞按 2×10^5 个/孔接种于6孔板,常规培养,待细胞贴壁良好,融合80%左右时按照Lipofectamine™ 2000转染试剂说明书进行转染。转染前4 h,将培养基更换为不含FBS的RPMI 1640培养基,取4 μ g质粒(EphA2-siRNA-PGCsi3.0、siRNA-NC-PGCsi3.0)和10 μ L脂质体,用250 μ L不含FBS的培养基分别进行稀释,5 min内将稀释后的质粒和脂质体混匀,分别将稀释后的EphA2-siRNA-PGCsi3.0、siRNA-NC-PGCsi3.0复合物加入空载组、沉默组细胞,对照组细胞只加入不含质粒的Lipofectamine™ 2000,转染后培养6 h,然后更换为含10% FBS的RPMI 1640培养基。转染48 h后,荧光显微镜下观察转染情况,均 $\geq 80\%$,可用于后续实验。

1.2.3 Brd U法检测细胞增殖能力 取稳定转染的各组细胞,按 3×10^4 个/mL密度接种于24孔板,内附无菌圆玻片,细胞贴壁后,更换含有10 μ mol/L的10% FBS的RPMI 1640培养基,继续培养72 h,使用4%多聚甲醛4℃条件下固定过夜,PBS洗涤 $\times 3$ 次,甲醇固定3 min,加入甲酰胺100℃,5 min核酸变性,10%山羊血清封闭,加入1:100抗小鼠Brd U单抗(阴性对照加PBS)4℃孵育过夜,加入荧光抗体Cy3(1:100)室温避光孵育2 h,DAPI染色,封片,显微镜下观察拍照,每组随机选取5个视野进行计数,计算Brd U阳性率,Brd U阳性率=Brd U阳性细胞数(红色)/DAPI阳性细胞数(蓝色) $\times 100\%$ 。

1.2.4 划痕实验检测细胞迁移能力 取稳定转染各组细胞,按 2×10^5 个/孔接种于6孔板,待各组细胞单层生长铺满板底时,用无菌的200 μ L移液枪头垂直于培养板,在其底部划一字型划痕,用PBS洗去划下的细胞,显微镜下观察拍照(0 h),培养24 h后,观察各组细胞划痕愈合情况并拍照,计算细胞划痕愈合率。划痕愈合率=(0 h划痕距离-24 h划痕距离)/0 h划痕距离 $\times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell小室实验检测细胞侵袭能力 用不含FBS的RPMI 1640培养基按1:2对Matrigel基质胶进行稀释,放入培养箱静置2 h,取10 μ L的Matrigel胶铺在Transwell小室上室,将细胞重悬,调整密度为 2×10^5 个/ml,取200 μ L细胞悬液接种于Transwell小室上室,下室加入600 μ L含10% FBS的RPMI 1640培养基,置于培养箱常规培养24 h,取出小室,擦去上室多余细胞,每孔加入1 mL多聚甲醛固定30 min,用0.1%结晶紫染色30 min,PBS洗涤细胞后,置于显微镜下观察细胞穿膜情况,并拍照计数,每组细胞重复计数3次,取平均值。

1.2.6 qRT-PCR检测细胞中EphA2、Wnt1、 β -catenin、E-cadherin、Vimentin mRNA相对表达量 取稳定转染的各组细胞,Trizol法提取细胞总RNA,进行核酸定量,按照逆转录试剂盒说明书逆转录cDNA,取5 μ L逆转录产物A进行PCR扩增。反应体系:2 \times SYBR Green qPCR Master Mix 10 μ L,模板cDNA 2 μ L,正反向引物各1 μ L,加双蒸水至总体积20 μ L。反应条件:95℃预变性10 min;95℃变性30 s,60℃退火1 min,72℃延伸1 min,共35个循环。每组设置5个复孔。以 β -actin为内参。引物由上海吉玛基因公司设计合成,引物序列见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算EphA2、Wnt1、 β -catenin、E-cadherin、Vimentin mRNA相对表达量。

1.2.7 Western blotting检测细胞中EphA2、Wnt1、 β -catenin、E-cadherin、Vimentin蛋白相对表达量 取稳定转染的各组细胞,加入RIPA裂解液裂解细胞,离心取上清液,BCA法测定蛋白浓度,校正上样量,加入上样缓冲液,100℃水浴5 min蛋白变性后进行SDS-PAGE凝胶电泳,电泳结束后,将蛋白质转至PVDF膜上,TBS洗膜,5%脱脂牛奶封闭2 h后TBS洗膜,加入稀释的EphA2、Wnt1、 β -catenin、E-cadherin、Vimentin、 β -actin一抗(1:2 000),4℃孵育

表1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/ bp
EphA2	正向: 5'-AAGCAATGCCATGCATGACTA-3'	132
	反向: 5'-ACGCATGCTAGTGCATGCACA-3'	
Wnt1	正向: 5'-AACTAGCCAGTAGTAGCACA-3'	251
	反向: 5'-AGTAATGACTACGTACAGTA-3'	
β -catenin	正向: 5'-AGGCATAGCATGTACCAAGTACA-3'	165
	反向: 5'-ATTTCAGGACGTTCCAGAAGCTAA-3'	
E-cadherin	正向: 5'-ACGTAGCATGAAATGCTAGCTA-3'	103
	反向: 5'-CATGCATGCATGCTAACCGATA-3'	
Vimentin	正向: 5'-AATCGGTAGCTAGCCATGAATAA-3'	189
	反向: 5'-CGTAGTAACGTAGCTGATCGATA-3'	
β -actin	正向: 5'-AATGCATGCTAGCTAGCTCGATGA-3'	157
	反向: 5'-ATGCATGCATGCATGCATGCTTCA-3'	

过夜, TBS洗膜, 加入HRP标记的二抗(1:5 000), 室温孵育2 h, TBS洗膜, 滴加ECL化学发光液, 曝光、显影, 采用凝胶成像分析系统进行灰度扫描, 计算目的蛋白相对表达量, 以目的蛋白条带灰度值与内参 β -actin条带灰度比值表示。

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 25.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较用方差分析, 进一步两两样本比较用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖能力比较

对照组、空载组、沉默组Brd U阳性率分别为(26.48 \pm 2.79)%、(23.52 \pm 2.57)%、(13.29 \pm 2.06)%, 3组Brd U阳性率比较, 差异有统计学意义($F = 38.560, P = 0.000$)。与对照组、空载组比较, 沉默组Brd U阳性率降低($P < 0.05$); 对照组与空载组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1。

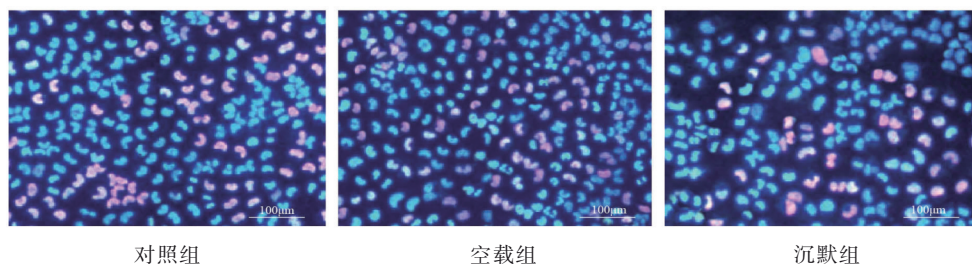


图1 EphA2对细胞增殖能力的影响 (DAPI染色 $\times 200$)

2.2 细胞迁移能力比较

对照组、空载组、沉默组细胞划痕愈合率分别为(83.16 \pm 8.31)%、(82.35 \pm 7.24)%、(34.24 \pm 5.27)%。3组细胞划痕愈合率比较, 差异有统计学意义($F = 78.869, P = 0.000$)。与对照组、空载组比较, 沉默组细胞划痕愈合率降低($P < 0.05$); 对照组与空载组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图2。

2.3 细胞侵袭能力比较

对照组、空载组、沉默组穿膜细胞数分别为(326.74 \pm 33.15)个、(331.27 \pm 34.59)个、(126.23 \pm 26.18)个。3组穿膜细胞数比较, 差异有统计学意义($F = 68.997, P = 0.000$)。与对照组、空载组比较, 沉

默组穿膜细胞数减少($P < 0.05$); 对照组与空载组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图3。

2.4 3组细胞中EphA2、Wnt1、 β -catenin、E-cadherin、Vimentin mRNA相对表达量比较

对照组、空载组、沉默组细胞中EphA2、Wnt1、 β -catenin、E-cadherin、Vimentin mRNA相对表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组、空载组比较, 沉默组EphA2、Wnt1、 β -catenin、Vimentin mRNA相对表达量降低($P < 0.05$), E-cadherin mRNA相对表达量升高($P < 0.05$); 对照组与空载组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

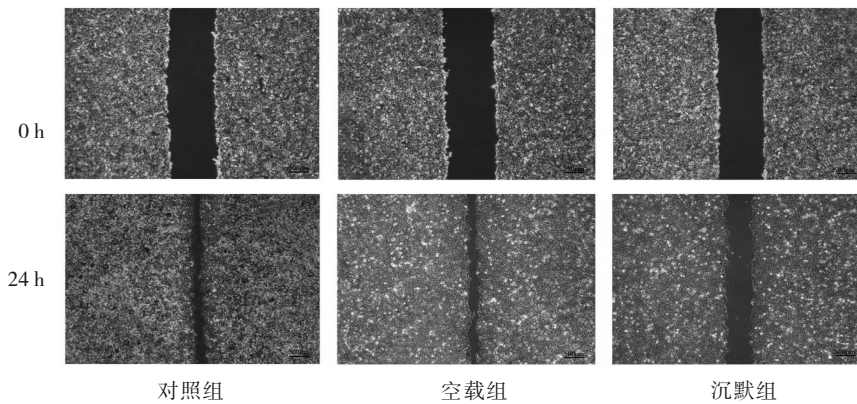


图2 EphA2对细胞迁移能力的影响 (DAPI染色×100)

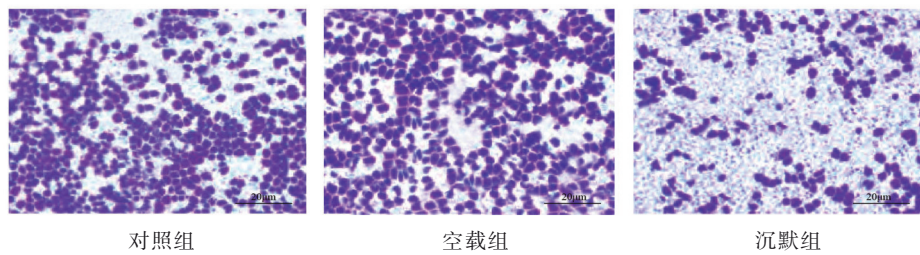


图3 EphA2对细胞侵袭能力的影响 (0.1%结晶紫染色×100)

表 2 3组细胞中EphA2、Wnt1、β-catenin、E-cadherin、Vimentin mRNA相对表达量比较 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	EphA2 mRNA	Wnt1 mRNA	β-catenin mRNA	E-cadherin mRNA	Vimentin mRNA
对照组	1.78±0.17	1.26 ± 0.13	0.98 ± 0.11	1.01 ± 0.15	0.92 ± 0.11
空载组	1.82±0.18	1.31 ± 0.13	0.95 ± 0.09	0.98 ± 0.14	0.90 ± 0.10
沉默组	0.37±0.11 ^{①②}	0.64 ± 0.09 ^{①②}	0.51 ± 0.08 ^{①②}	1.97 ± 0.19 ^{①②}	0.63 ± 0.07 ^{①②}
F值	38.560	49.869	39.041	60.825	14.574
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较,P<0.05; ②与空载组比较,P<0.05。

2.5 3组细胞中EphA2、Wnt1、β-catenin、E-cadherin、Vimentin蛋白相对表达量比较

3组细胞中EphA2、Wnt1、β-catenin、E-cadherin、Vimentin蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义(P<

0.05)。与对照组、空载组比较,沉默组EphA2、Wnt1、β-catenin、Vimentin蛋白相对表达量降低(P<0.05),E-cadherin蛋白相对表达量升高(P<0.05);对照组与空载组比较,差异无统计学意义(P>0.05)。见表3和图4。

表 3 3组细胞中EphA2、Wnt1、β-catenin、E-cadherin、Vimentin蛋白相对表达水平比较 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	EphA2蛋白	Wnt1蛋白	β-catenin蛋白	E-cadherin蛋白	Vimentin蛋白
对照组	1.13 ± 0.11	0.73 ± 0.08	0.86 ± 0.08	0.57 ± 0.06	0.64 ± 0.07
空载组	1.09 ± 0.10	0.71 ± 0.07	0.83 ± 0.08	0.55 ± 0.07	0.67 ± 0.08
沉默组	0.21 ± 0.05 ^{①②}	0.31 ± 0.04 ^{①②}	0.36 ± 0.05 ^{①②}	1.14 ± 0.11 ^{①②}	0.25 ± 0.05 ^{①②}
F值	164.878	65.271	77.092	81.723	59.674
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较,P<0.05; ②与空载组比较,P<0.05。

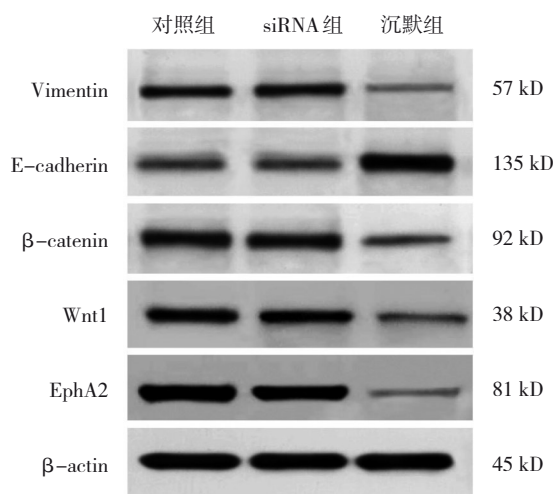


图4 3组细胞中各蛋白相对表达量

3 讨论

随着外科水平的提高和放疗技术的成熟,食管癌的综合治疗有了很大进步,但由于食管癌细胞侵袭性极强,极易侵袭邻近部位,治疗效果仍不够理想,术后生存率较低。*EphA2*与许多肿瘤细胞的生长和远处转移有关,其高表达是多种肿瘤细胞的共同事件,尤其在侵袭性强的肿瘤细胞中表达异常高,且*EphA2*的表达也往往随着肿瘤恶性程度增强而升高^[6-7]。利用新兴的RNA干扰技术,通过沉默*EphA2*基因,阻断*EphA2*基因和蛋白合成,从而抑制肿瘤细胞侵袭和迁移,为临床治疗食管癌提供一种新的思路和方法。

细胞迁移是肿瘤侵袭和转移的关键环节,肿瘤细胞与细胞外基质之间的相互作用在肿瘤细胞迁移与侵袭过程中发挥重要作用,引起细胞迁移的必要步骤是细胞与细胞外基质的黏附与解离^[8]。*EphA2*通过与细胞黏附分子相互作用,促进血管生成,参与调控信号转导,从而维持细胞之间良好的黏附性^[9]。在癌组织中,*EphA2*信号转导发生异常,癌细胞脱离黏附,容易游离,侵袭性增强,进而促进肿瘤细胞恶性表型行为^[10]。研究发现,在转录水平下调*EphA2*的表达可逆转肝细胞癌细胞迁移及侵袭^[11]。*EphA2*在神经胶质瘤细胞、前列腺癌细胞中表达较高,并能促进细胞增殖、侵袭和迁移,降低*EphA2*表达,可明显抑制细胞侵袭和迁移等恶性生物学行为^[12-13]。本研究对照组*EphA2*相对表达量较高,与其在其他肿瘤中表达结果一致^[14],通过转染*EphA2*干扰序列后,细胞增殖、迁移和侵

袭能力显著下降,提示*EphA2*基因沉默,对人食管癌EC9706细胞迁移和侵袭能力具有一定的抑制作用。*EphA2*高表达能减弱肿瘤细胞之间的连接,并同时增加肿瘤细胞与细胞外基质的黏附,促进肿瘤细胞的迁移和侵袭,增加患者肿瘤细胞转移的风险,影响预后^[15]。由此表明,通过RNA干扰技术,沉默*EphA2*基因能在一定程度上抑制人食管癌EC9706细胞的迁移和侵袭。

EMT是上皮细胞向间质样细胞转化的现象,上皮源肿瘤细胞通过EMT向周围组织迁移。EMT发生期间细胞的黏附力减弱,侵袭性增强,同时伴随上皮标志物E-cadherin表达下调以及间质标志物Vimentin和β-catenin表达上调。E-cadherin表达下调和β-catenin核转位是EMT的标志性变化,是肿瘤细胞发生迁移和侵袭的基础条件。Wnt/β-catenin信号通路参与诱导肿瘤细胞EMT过程,肿瘤细胞中Wnt/β-catenin信号通路被异常激活,β-catenin在胞质中聚集,激活下游靶基因,并可与E-cadherin结合,形成β-catenin/E-cadherin复合物,使细胞之间的黏附性减弱,诱导肿瘤细胞EMT,增强细胞迁移和侵袭的能力。在乳腺癌组织中及人胃癌细胞中,Wnt/β-catenin信号通路与癌细胞的EMT及侵袭和迁移密切相关^[16-17]。本研究对照组Wnt1、β-catenin mRNA及蛋白相对表达量均较高,提示在Wnt/β-catenin信号通路人食管癌EC9706细胞被激活,通过干扰*EphA2*表达后Wnt1、β-catenin mRNA及蛋白相对表达量均下降,E-cadherin mRNA及蛋白相对表达量升高,Vimentin mRNA及蛋白相对表达量降低,表明Wnt/β-catenin信号通路被抑制,并阻止癌细胞EMT,提示*EphA2*基因沉默抑制人食管癌EC9706细胞侵袭和迁移,可能与癌细胞内Wnt/β-catenin信号通路失活相关。

综上所述,*EphA2*基因沉默对人食管癌EC9706细胞迁移和侵袭具有一定的抑制作用,其作用机制可能与Wnt/β-catenin信号通路失活相关,抑制细胞EMT,降低细胞增殖、迁移和侵袭能力,为临床治疗食管癌提供实验依据。*EphA2*基因在多种肿瘤细胞中高表达,且与肿瘤细胞迁移和侵袭也存在一定的相关性,是否为人食管癌及其细胞迁移和侵袭的特异性基因或标志靶点,尚需进一步深入研究。

参 考 文 献 :

- [1] KIKUCHI H, TAKEUCHI H. Future perspectives of surgery for esophageal cancer[J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2018, 24(5): 219-222.
- [2] FU L, QIN Y R, MING X Y, et al. RNA editing of SLC22A3 drives early tumor invasion and metastasis in familial esophageal cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(23): E4631-E4640.
- [3] PARK B H, SHIN M H, DOUGLAS I S, et al. Erythropoietin-producing hepatoma receptor tyrosine kinase A2 modulation associates with protective effect of prone position in ventilator-induced lung injury[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(4): 519-529.
- [4] WEN Q C, CHEN Z H, CHEN Z K, et al. EphA2 affects the sensitivity of oxaliplatin by inducing EMT in oxaliplatin-resistant gastric cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 47998-48011.
- [5] HUANG J, HE Y, MCLEOD H L, et al. miR-302b inhibits tumorigenesis by targeting EphA2 via Wnt/ β -catenin/EMT signaling cascade in gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 886.
- [6] FAN J, WEI Q, KOAY E J, et al. Chemoresistance transmission via exosome-mediated epha2 transfer in pancreatic cancer[J]. *Theranostics*, 2018, 8(21): 5986-5994.
- [7] TAN Y C, SRIVASTAVA S, WON B M, et al. EPHA2 mutations with oncogenic characteristics in squamous cell lung cancer and malignant pleural mesothelioma[J]. *Oncogenesis*, 2019, 8(9): 49.
- [8] NAJAFI M, FARHOOD B, MORTEZAEE K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 2782-2790.
- [9] KIM Y, KANG H, POWATHIL G, et al. Role of extracellular matrix and microenvironment in regulation of tumor growth and LAR-mediated invasion in glioblastoma[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0204865.
- [10] GARCIA-MONCLÚSS, LÓPEZ-ALEMANYR, ALMACELLAS-RABAIGET O, et al. EphA2 receptor is a key player in the metastatic onset of Ewing sarcoma[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(5): 1188-1201.
- [11] JIN R A, LIN H, LI G H, et al. TR4 nuclear receptor suppresses HCC cell invasion via downregulating the EphA2 expression[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 283.
- [12] WU Q L, XU L X, WANG C, et al. MicroRNA-124-3p represses cell growth and cell motility by targeting EphA2 in glioma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2436-2442.
- [13] LI Q G, XIAO T, ZHU W, et al. HDAC7 promotes the oncogenicity of nasopharyngeal carcinoma cells by miR-4465-EphA2 signaling axis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 322.
- [14] KIM H S, WON Y J, SHIM J H, et al. Role of EphA2-PI3K signaling in vasculogenic mimicry induced by cancer-associated fibroblasts in gastric cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3): 3031-3038.
- [15] KUROSE H, UEDA K, KONDO R, et al. Elevated expression of EPHA2 is associated with poor prognosis after radical prostatectomy in prostate cancer[J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(11): 6249-6257.
- [16] 李艳娇, 张本斯, 李庄, 等. EphA2在乳腺癌中的表达及其与上皮间质转化的关系[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2018, 36(3): 294-298.
- [17] SONG B, LIN H X, DONG L L, et al. MicroRNA-338 inhibits proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells by the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(5): 1290-1296.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 任利兵, 贾如江, 苏春永, 等. *EphA2*基因沉默对人食管癌EC9706细胞迁移、侵袭的影响及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(1): 40-46.

Cite this article as: REN L B, JIA R J, SU C Y, et al. Effect and mechanism of *EphA2* gene silencing on migration and invasion of human esophageal carcinoma EC9706 cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(1): 40-46.