

下调 SOAT1 表达对食管癌增殖和转移的影响

宁光耀 张仁泉 黄云龙

摘要 目的 通过 siRNA 干扰技术敲低食管癌细胞内甾醇氧乙酰基转移酶-1 (SOAT1) 表达,探究 SOAT1 异常表达对其生长、迁移及侵袭能力的影响。方法 Western blot 和 PCR 方法检测食管癌组织及细胞系中 SOAT1 蛋白及 mRNA 相对表达量;通过 RNA 干扰技术下调 KYSE30 细胞内 SOAT1 的 mRNA 及蛋白表达;采用 Cell Counting Kit-8 以及流式细胞仪等检测其增殖和凋亡情况,利用 Western blot 检测凋亡相关蛋白(cleaved PARP 和 cleaved caspase-3)的表达情况,采用划痕实验及 transwell 系统检测细胞迁移及侵袭能力。结果 食管癌组织中 SOAT1 蛋白及 mRNA 表达高于癌旁正常组织(均 $P < 0.01$),食管癌细胞系中 SOAT1 蛋白及 mRNA 表达亦高于食管正常上皮细胞($F = 85.72, P < 0.0001$)。敲低 SOAT1 表达可减弱 KYSE30 细胞的增殖能力($t = 10.73, P = 0.0004$),并促进其凋亡增加,亦能减弱 KYSE30 细胞的迁移($t = 9.923, P = 0.0006$)及侵袭能力($t = 3.357, P = 0.0284$)。结论 敲低 SOAT1 表达对食管癌细胞的增殖和转移具有抑制作用。

关键词 食管癌; 甾醇氧乙酰基转移酶; 增殖; 转移

中图分类号 R 655.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0700-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.006

食管癌是全世界最常见的消化道恶性肿瘤之一,具有病死率高、男性多于女性等特点^[1],其发病率和病死率均呈上升趋势^[2]。尽管许多影响食管癌发生发展的危险因素已被证实,但其具体的机制尚未阐明。甾醇氧乙酰基转移酶(sterol O-acyltransferase, SOAT)-1 可催化细胞内游离胆固醇转换成胆固醇脂类,并维持细胞内的胆固醇稳态^[3]。哺乳动物体内 SOAT 包含 2 个亚型: SOAT1 和 SOAT2, SOAT1 是内质网的标记酶,广泛表达于所有组织类型,而 SOAT2 仅在肠道和肝脏中表达^[4]。研究^[5-7]发现,SOAT1 在多种肿瘤中的影响已被报道,其中

包括肝细胞癌^[5]、肾透明细胞癌^[6]以及结肠腺癌^[7]。然而,目前尚无报道阐明 SOAT1 在食管鳞状细胞癌中的作用。因此,该研究主要从细胞学实验阐明 SOAT1 异常表达对食管癌细胞的增殖、迁移及侵袭的调节作用,为今后的临床治疗提供一定的基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 选用的食管癌细胞株(KYSE 510、KYSE 450、KYSE 150 和 KYSE 30)和食道上皮细胞(Het-1a)均购自中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂和仪器 RPMI Medium 1640 basic 培养基(美国 Gibco 公司),无支原体新生牛血清(杭州四季青有限公司),Lipofectamine 2000 转染试剂(美国 ThermoFisher 公司),Transwell 小室(美国 Corning 生物科技有限公司),Cell Counting Kit-8(上海碧云天生物技术有限公司),超敏 ECL 化学发光试剂盒(美国 ThermoFisher 公司),SOAT1 抗体(美国 Abcam 公司),GAPDH 抗体和辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉金桥公司),Annexin V-FITC/PI 双染色试剂盒(美国 BD Biosciences 公司),Takara 逆转录试剂盒、Real Time PCR 试剂盒(北京 Takara 生物医学公司)。2 条 SOAT1 特异性 siRNA 均由上海吉玛生物科技有限公司合成,靶序列分别为:CCCA-CUCAUUGUCAGAGA, CUCUUGAUGUUCUUG-GAA。酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),流式细胞仪(美国 BD 生物科学有限公司),化学发光图像分析系统(上海天能科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基,细胞培养箱的培养条件为 5% CO₂, 37 °C。

1.2.2 siRNA 干扰 当 KYSE 30 细胞处于生长指数期时,在 6 孔板中进行接种。待细胞生长至 70%~80% 时,按照《lipofectamine 2000 操作说明书》进行 siRNA 转染。分别取 100 pmol/ml siRNA 和 3 μl lipofectamine 2000 加入到 2 支含 100 μl Opti-MEM

2020-11-29 接收

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究项目(重大项目)(编号:KJ2019ZD22)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院普胸外科,合肥 230032

作者简介:宁光耀,男,硕士,主治医师;

张仁泉,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: zhangrenquan@live.cn

培养基的 1.5 ml 离心管中混匀室温放置 5 min 将 2 支离心管内液体混匀室温放置 15 min 最后分别均匀加入到每个培养孔内。

1.2.3 细胞增殖检测 在 96 孔板中接种 KYSE30 细胞,密度为 5 000 个/孔。经不同处理后,加入 10 μ l CCK-8 溶液并混匀,继续培养 1.5 h 后采用酶标仪检测吸光度值。

1.2.4 划痕实验 当 KYSE30 细胞处于生长指数期时,按 1×10^6 个/ml 的密度在 6 孔板中接种。24 h 后换成含 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,继续培养 12 h。采用 200 μ l 枪头在培养孔底部划出水平划痕,并用 PBS 洗去漂浮细胞,用含 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基继续培养。置于光学显微镜下拍照,经过不同转染处理后 48 h 再次进行拍照。

1.2.5 Transwell 实验 首先制备预铺 Matrigel 胶的 transwell 小室,Matrigel 胶和 RPMI 1640 培养基的比例为 6:1。选取经 siRNA 转染 48 h 的细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/ml。在上室内加入 100 μ l 细胞悬液,下室内加入 600 μ l 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,继续培养 48 h。取出小室,放入 4% 多聚甲醛溶液中室温固定 20 min,PBS 洗涤后放入 1% 结晶紫染色缸内进行染色 15 min,PBS 洗涤后置于室温干燥,擦去小室内膜上 Matrigel 胶和染色细胞,最后在显微镜下拍照。

1.2.6 流式细胞术 将 KYSE 30 细胞接种于 6 孔板中,分成对照 (NC) 组和 siRNA-2 组,观察细胞凋亡情况。继续培养 48 h 后,使用 Annexin V-FITC/PI 双染色试剂盒对收集的细胞进行染色。用流式细胞仪检测细胞凋亡,用 Flow-jo 软件分析细胞凋亡情况。

1.2.7 Western blot 组织或细胞采用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液进行裂解 5 min 后,在 4 $^{\circ}$ C 环境下进行 14 000 r/min 离心。取清亮的上清液,并采用 BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)进行蛋白定量。取 30 μ g 蛋白液依次进行 SDS-PAGE 浓缩、分离并转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗(1:1 000),在 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜。洗涤 3 次后,加入二抗,室温孵育 1 h,洗涤后在化学发光图像分析系统进行拍照。

1.2.8 mRNA 提取与 qRT-PCR 采用 AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒(美国 Axygen 公司)进行 RNA 提取。然后,采用逆转录试剂盒将提取的 RNA 逆转录成 cDNA。最后,采用 Real Time PCR 试剂盒进行相对定量检测。SOAT1 引物序列: F: TTTGCT-

GACGCTGCTGTAGAACC, R: AAAGGCTTCATT-TACTTCCCACATTGC; GAPDH 引物购于上海生工生物工程有限公司。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad prism 8.0 软件对数据进行分析并绘制图形。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验或单因素方差分析对数据进行统计分析。 $P < 0.05$ 即认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌组织中 SOAT1 蛋白及 mRNA 表达高于癌旁正常组织 收集 9 例食管癌患者的临床资料及组织样本。患者平均年龄为 58 ~ 75 (67.5 \pm 6.6) 岁,其中男性 6 例,女性 3 例。术后病理诊断报告均为食道鳞状细胞癌,其中低分化 5 例、中低分化 3 例、高分化 1 例。食管癌组织中 SOAT1 蛋白的表达高于癌旁组织(图 1A),且 SOAT1 mRNA 表达亦高于癌旁正常组织(图 1B),差异有统计学意义($t = 4.162, P = 0.0007$)。

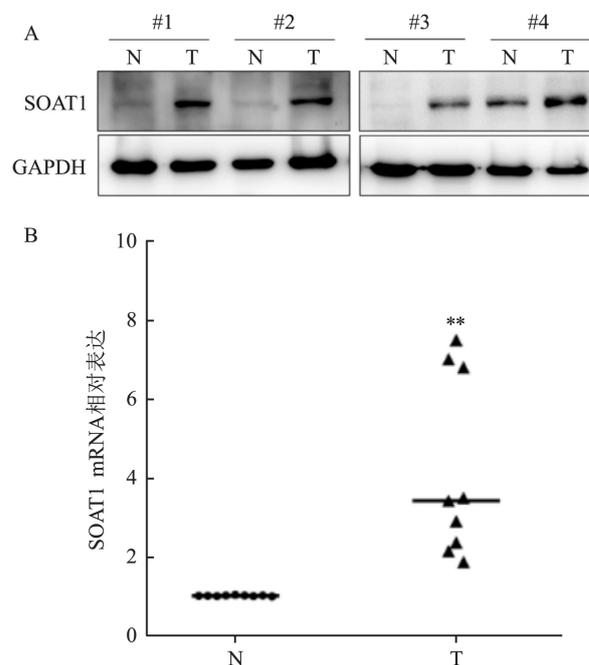


图 1 食管癌患者的配对癌及癌旁组织中 SOAT1 蛋白及 mRNA 表达水平

A: 配对组织中 SOAT1 蛋白表达水平 ($n = 4$); B: 配对组织中 SOAT1 mRNA 表达水平 ($n = 9$); N: 癌旁正常组织; T: 食管癌组织; #1 ~ #4: 4 例患者; 与癌旁正常组织比较: ** $P < 0.01$

2.2 食管癌细胞系中 SOAT1 蛋白及 mRNA 表达高于食管正常上皮细胞 选取 4 株食管癌细胞系以及 Het-1a。如图 2A 示,SOAT1 蛋白在 4 株食管癌细胞系内表达均不同程度高于 Het-1a 细胞。如图

2B 示 4 株食管癌细胞系内 SOAT1 mRNA 表达亦均高于 Het-1a 细胞且差异有统计学意义($F = 85.72$ $P < 0.0001$)。

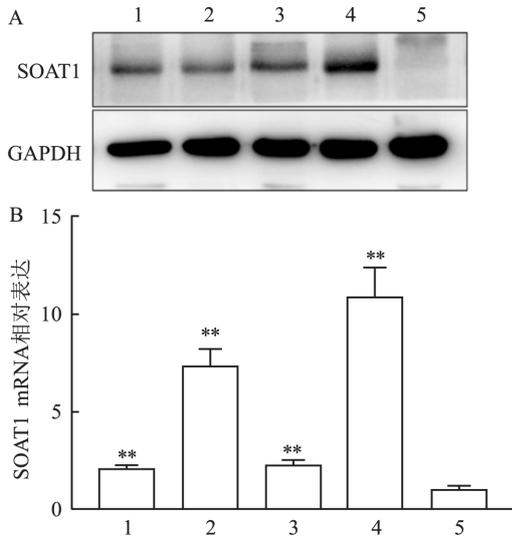


图2 SOAT1 蛋白及 mRNA 在食管癌细胞及食管上皮细胞中的相对表达量

A: 细胞系中 SOAT1 蛋白表达水平; B: 细胞系中 SOAT1 mRNA 表达水平; 1: KYSE510; 2: KYSE450; 3: KYSE150; 4: KYSE30; 5: Het-1a; 与 Het-1a 比较: ** $P < 0.01$

2.3 siRNA 敲低 KYSE30 细胞内 SOAT1 蛋白及 mRNA 表达 如图 2 所示, KYSE30 细胞系内 SOAT1 蛋白及 mRNA 表达相对较高, 因此后续细胞学实验均采用 KYSE30 细胞系。如图 3 所示, 通过细胞转染 siRNA 敲低细胞内 SOAT1 表达, 结果显示, 与 NC 组比较, 2 条 SOAT1 特异性的 siRNA-1/2 均可以下调 KYSE30 细胞内 SOAT1 蛋白(图 3A) 及 mRNA(图 3B) 表达且差异有统计学意义($F =$

42.80 $P = 0.0003$)。同时, 本研究选取 siRNA-2 继续开展功能学实验。

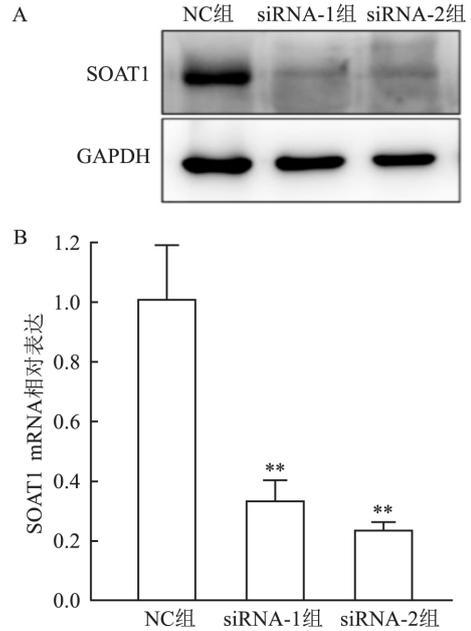


图3 转染 siRNA 后 KYSE30 细胞内 SOAT1 蛋白及 mRNA 表达

A: KYSE30 细胞内 SOAT1 蛋白表达水平; B: KYSE30 细胞内 SOAT1 mRNA 表达水平; 与 NC 组比较: ** $P < 0.01$

2.4 降低 SOAT1 表达可减慢 KYSE30 细胞的增殖能力, 增加细胞凋亡比例, 促进凋亡相关蛋白表达

如图 4A 示, 降低 SOAT1 表达可抑制 KYSE30 细胞的生长速度, 差异有统计学意义(72 h: $t = 5.573$, $P = 0.0051$; 96 h: $t = 10.73$, $P = 0.0004$); 如图 4C 示, 负向调节 SOAT1 表达可增加 KYSE30 细胞的凋亡比例(0.62% vs 6.49%); Western blot 结果也证实, 敲低 SOAT1 表达促进了凋亡蛋白 cleaved PARP 和 cleaved caspase-3 的表达(图 4B)。

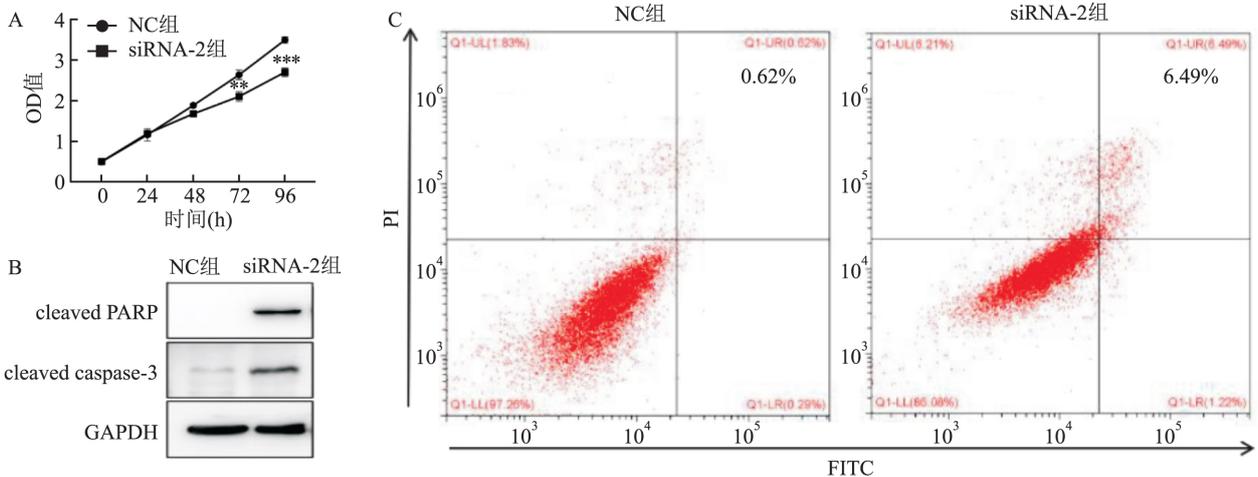


图4 敲低 SOAT1 表达对 KYSE30 细胞增殖、凋亡细胞比例以及凋亡相关蛋白表达的影响

A: 2 组细胞增殖变化; B: 2 组细胞内凋亡相关蛋白表达水平; C: 2 组细胞内凋亡比率变化; 与 NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

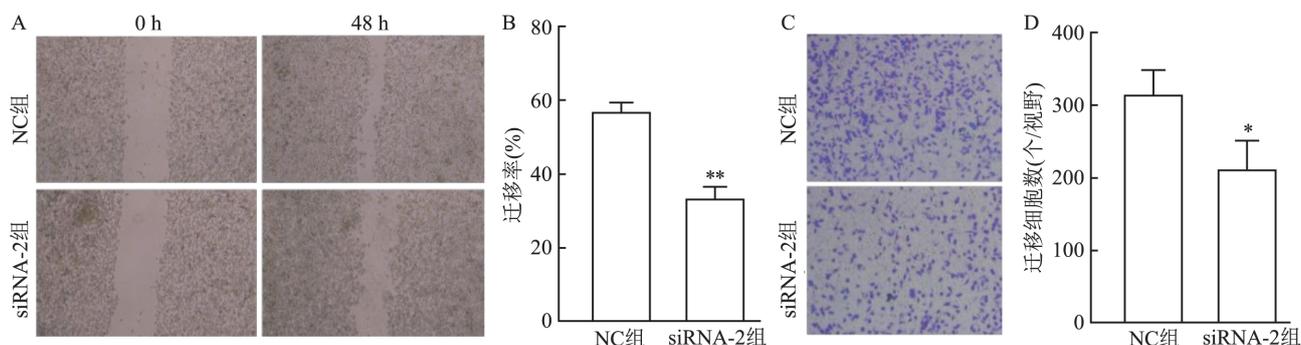


图5 下调 KYSE30 细胞内 SOAT1 表达对其迁移及侵袭的影响 ×100

A: 划痕实验检测细胞迁移能力; B: 2 组细胞的迁移比例; C: transwell 实验检测细胞侵袭能力; D: 2 组细胞的侵入细胞比例; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 下调 SOAT1 表达可减弱 KYSE30 细胞的迁移和侵袭性 如图 5A、B 所示,与 NC 组比较, SOAT1 低表达组 KYSE30 细胞的迁移数目减少且差异有统计学意义 ($t = 9.923$, $P = 0.0006$)。如图 5C、D 示, SOAT1 低表达组 KYSE30 细胞的侵袭能力较 NC 组减弱 ($t = 3.357$, $P = 0.0284$)。

3 讨论

正常细胞向恶性肿瘤细胞转化包括体细胞突变、表观遗传改变、代谢重编程和细胞生长失控。其中代谢重编程已成为肿瘤生物学的研究热点,关键代谢基因也成为癌症发生发展中重要调控因子和潜在的治疗靶点。SOAT1 是一种变构酶,它可利用多种甾醇(包括氧甾醇和植物甾醇等)作为底物和活化剂,其中胆固醇是最优的底物和活化剂。近年来,研究^[8]发现 SOAT1 不仅参与生酮途径、异亮氨酸降解和解酮过程而且具有调控肿瘤增殖及耐药的能力。研究^[9]发现, SOAT1 是前列腺癌的潜在预后标志物之一,前列腺癌样本中出现胆甾醇酯积累,体内动物模型证实降低 SOAT1 介导的胆甾醇酯积累可以抑制前列腺癌的生长和转移。Martinez-Outschoorn et al^[10]发现在 MDA-MB-231 细胞中上调 SOAT1 基因,可显著提高乳腺癌的生长和转移能力。与此同时,在结直肠癌^[11]和肺癌^[12]中, SOAT1 亦可促进癌细胞的增殖以及转移。

为探究 SOAT1 对食管癌是否具有同样调控作用,本研究收集了新鲜的食管癌组织,与正常食道组织比较,癌灶中 SOAT1 蛋白和 mRNA 表达上升。接下来,敲低 SOAT1 表达可以减慢食管癌细胞的增殖速度,促进其凋亡,并抑制其迁移及转移能力,这与

Geng et al^[13] 研究结果类似。然而,在肾细胞癌中, SOAT1 相对低表达组患者具有更短的总生存期和无病生存期,且体外实验发现过表达 SOAT1 基因抑制肾癌细胞的生长及迁移能力^[6]。本研究与 Geng et al^[13] 的研究结果相反,这有可能与纳入实验的细胞系类型有关。盐酸 Nevanimibe 是 SOAT1 的抑制剂之一,体外实验显示,低剂量可抑制降低肾上腺激素生成,高剂量可引起肾上腺皮质细胞凋亡^[14]。一项包含 63 例肾上腺皮质癌患者的多中心的临床 I 期试验发现,盐酸 Nevanimibe 的最大耐受安全剂量为 6 000 mg/75 kg,但是研究中尚未发现任何完全缓解或部分缓解的迹象^[15]。因此,对于盐酸 Nevanimibe 是否在食管癌临床中具备安全性和有效性将值得进一步探究。综上所述,敲低 SOAT1 表达可负向调控食管癌细胞增殖、迁移以及侵袭能力,这为今后的 SOAT1 抑制剂临床治疗提供了一定理论依据。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca Cancer J Clin* 2016; 66(2): 115-32.
- [2] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87-108.
- [3] Di Paolo G, Kim T W. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011; 12(5): 284-96.
- [4] Chang T Y, Chang C C Y, Lin S, et al. Roles of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 and-2 [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2001; 12(3): 289-96.
- [5] Gu L, Zhu Y, Lin X, et al. Stabilization of FASN by ACAT1-mediated GNPAT acetylation promotes lipid metabolism and hepatocarcinogenesis [J]. *Oncogene*, 2020; 39: 2437-49.
- [6] Chen L, Peng T, Luo Y, et al. ACAT1 and metabolism-related

- pathways are essential for the progression of clear cell renal cell Carcinoma (ccRCC), as determined by co-expression network analysis [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 957.
- [7] Ye K, Wu Y, Sun Y, et al. TLR4 siRNA inhibits proliferation and invasion in colorectal cancer cells by downregulating ACAT1 expression [J]. *Life sciences*, 2016: 133–9.
- [8] Garcia-Bermudez J, Birsoy K. Drugging ACAT1 for cancer therapy [J]. *Mol Cell*, 2016, 64(5): 856.
- [9] Yue S, Li J, Lee S Y, et al. Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness [J]. *Cell Metab*, 2014, 19(3): 393–406.
- [10] Martinez-Outschoorn U E, Lin Z, Whitaker-Menezes D, et al. Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(21): 3964–71.
- [11] Xin C, Huiling L, Qibin S, et al. Insulin promotes progression of colon cancer by upregulation of ACAT1 [J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 122.
- [12] Fan J, Lin R, Xia S, et al. Tetrameric acetyl-CoA acetyltransferase 1 is important for tumor growth [J]. *Mol Cell*, 2016, 64(5): 859–74.
- [13] Geng F, Cheng X, Wu X, et al. Inhibition of SOAT1 suppresses glioblastoma growth *via* blocking SREBP-1-mediated lipogenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 22(21): 5337–48.
- [14] Lapensee C R, Mann J E, Rainey W E, et al. ATR-101, a selective and potent inhibitor of Acyl-CoA acyltransferase 1, induces apoptosis in H295R adrenocortical cells and in the adrenal cortex of dogs [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(5): 1775–88.
- [15] Smith D C, Kroiss M, Kebebew E, et al. A phase I study of nevanimibe HCl, a novel adrenal-specific sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1) inhibitor, in adrenocortical carcinoma [J]. *Invest New Drugs*, 2020, 38(5): 1421–9.

Effect of knocking down of SOAT1 expression on proliferation and metastasis of esophageal carcinoma

Ning Guangyao Zhang Renquan Huang Yunlong

(Dept of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract *Objective* To investigate the effect of SOAT1 on proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cells by down-regulating the expression of SOAT1 using RNA interference. *Methods* Firstly, the relative expression levels of SOAT1 protein and mRNA in esophageal cancer tissues and cell lines were detected using western blot and qRT-PCR assay, respectively. Next, after that SOAT1 was down-regulated in KYSE30 cells by RNA interference technique, the proliferation and apoptosis were detected by Cell Counting Kit-8 and flow cytometry respectively, and the expression of apoptosis-related proteins (cleaved PARP and cleaved caspase-3) were detected by western blot, and the cell migration and invasion were detected by scratch and transwell assay. *Results* The expression of SOAT1 protein and mRNA in esophageal cancer tissues was higher than that in adjacent normal tissues (all $P < 0.01$), and the expression of SOAT1 protein and mRNA in esophageal cancer cell lines was also higher than that in normal esophageal epithelial cells ($F = 85.72, P < 0.0001$). Knock-down of SOAT1 expression could weaken the proliferation ability of KYSE30 cells ($t = 10.73, P = 0.0004$) and increase the percentage of apoptosis, and also weaken the migration ($t = 9.923, P = 0.0006$) and invasion ($t = 3.357, P = 0.0284$) ability of KYSE30 cells. *Conclusion* Knock-down of SOAT1 expression can suppress the proliferation and metastasis of esophageal carcinoma cells.

Key words esophagus cancer; sterol O-acyltransferase; proliferation; metastasis