

转录因子 ZEB1 对肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭作用机制的研究

赵云¹, 马贝贝¹, 幸化学¹, 黄绍峰¹, 张张伟², 凌博¹

(右江民族医学院¹基础医学院、²药学院, 百色 533000)

摘要 目的 探讨锌指 E 盒结合同源盒 1 (ZEB1) 对肺腺癌 H322 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制。方法 基于 GEO 和 TCGA 公共数据库分析转录因子 ZEB1 在肺腺癌中的基因表达特征; 采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测肺腺癌细胞系 (H322、A549、95-D) 和正常肺上皮细胞 (BEAS-2B) 中 ZEB1 的 mRNA 和蛋白表达水平; 进一步构建慢病毒稳定转染 ZEB1 过表达 (Oe-ZEB1) 和过表达对照 (Oe-NC) H322 细胞株; 利用 CCK-8、平板克隆、EdU、Hoechst33258/PI 双染检测细胞的增殖和凋亡水平; 划痕实验和 Transwell 检测细胞的迁移和侵袭能力; 流式细胞术分析细胞的周期水平; Western blot 检测相关通路的蛋白表达。结果 GEO 和 TCGA 结果显示, ZEB1 在肺腺癌中的表达特征与肿瘤恶性程度差异有统计学意义; RT-qPCR 和 Western blot 结果显示, ZEB1 在肺腺癌细胞系中的表达均高于 BEAS-2B ($P < 0.05$); CCK-8、平板克隆、EdU、划痕和 Transwell 结果显示, 与未转染的空白对照 (Control) 组相比, Oe-ZEB1 肺腺癌 H322 细胞的增殖、迁移和侵袭能力增强 ($P < 0.05$); Hoechst33258/PI 双染和流式细胞术结果显示, 与 Control 组相比, Oe-ZEB1 肺腺癌 H322 细胞凋亡水平降低 ($P < 0.05$), 且 Oe-ZEB1 肺腺癌 H322 细胞的 G₁ 期比例减少, S 期比例增加, 从而细胞周期加快; Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, Oe-ZEB1 肺腺癌 H322 细胞 N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、突变型 p53 (mutp53) 蛋白和细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) ($P < 0.05$) 表达水平升高; 与 Control 组相比, Oe-ZEB1 肺腺癌 H322 细胞 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、鼠双微体 2 (MDM2) 蛋白和 p21 ($P < 0.05$) 表达水平降低。结论 过表达 ZEB1 可以促进肺腺癌 H322 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并可能通过调控 MDM2/mutp53/p21 通路促使细胞从 G₀/G₁ 进入 S 期, 从而加快 H322 细胞周期进程。

关键词 ZEB1; 肺腺癌; 转移; 增殖; 侵袭; 细胞周期

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2026)03-0470-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.012

2025-12-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82060540); 广西自然科学基金项目 (编号: 2025GXNSFHA069028)

作者简介: 赵云, 女, 硕士研究生;

凌博, 男, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: lingbo268@163.com

根据国际癌症研究机构 (international agency for research on cancer, IARC) 的统计数据, 2022 年全球新增肺癌患者 2 480 308 例, 有 1 817 131 例因肺癌死亡^[1]。肺腺癌作为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的主要亚型, 其侵袭性和

RT-PCR. **Results** Compared with the control group, the COE, OE-FOXO4 and OE-FOXO4+COE groups exhibited significantly improved gastric mucosal lesions, reduced lactic acid levels, weakened expression of aerobic glycolysis-related proteins (PKM2, HK2, LDHA, GLUT1), and enhanced FOXO4 expression. The OE-FOXO4+COE group showed the lowest lactic acid level and more pronounced changes in related protein expression compared with the COE and OE-FOXO4 groups. In contrast, the shFOXO4 and shFOXO4+COE groups displayed increased lactic acid levels, enhanced expression of aerobic glycolysis-related proteins, and reduced FOXO4 expression compared with the model group. **Conclusion** FOXO4 expression is involved in the inhibitory effect of COE on GPL, possibly by regulating the aerobic glycolysis process.

Key words *Celastrus orbiculatus thunb*; extract; gastric precancerous lesions; forkhead box O4; aerobic glycolysis

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82274355); Key Project for the Cultivation of Outstanding Young Teachers in Colleges and Universities in Anhui Province (No. 2023-385)

Corresponding author Zhu Yaodong, E-mail: zhuyaodong2022@126.com

异质性与上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程密切相关^[2]。锌指 E 盒结合同源蛋白(zinc finger e-box-binding homeobox, ZEB)家族包括 ZEB1 和 ZEB2 两个蛋白,其中 ZEB1 的 N 端锌指结构域(n-terminal zinc finger, NZF)和 C 端锌指结构域(c-terminal zinc finger, CZF)可与特定蛋白结合,从而调节多种生理过程^[3]。已有研究表明, ZEB1 在多种癌症类型呈高表达,包括淋巴瘤、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌等多种癌症类型^[4]。ZEB1 可通过诱导免疫抑制细胞和趋化因子,促进肿瘤细胞免疫逃脱,构建肿瘤免疫抑制微环境^[5],并进一步参与 EMT 过程、细胞凋亡调控及肿瘤转移等多种病理进程^[6]。然而,过表达 ZEB1 对肺腺癌的进展尚未明确。本研究旨在探讨 ZEB1 对肺腺癌 H322 细胞的生物学功能及其对周期相关蛋白的影响,为肺腺癌的临床治疗提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 细胞系和实验材料

BEAS-2B、H322、A549 购自浙江美森生物技术有限公司;95-D 购自镇江维根生物科技有限公司;RPMI-1640、DMEM 培养基(货号:C11875500BT、11965092)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液、青霉素-链霉素双抗溶液(货号:FSP500、E607002-0100、E607011-0100)购自上海生工技术有限公司;CCK-8 细胞增殖检测试剂、逆转录试剂盒(含 gDNA 酶)(货号:BS350B、BL699A)购自安徽 Biosharp 公司;基质胶、Transwell 小室(货号:2278002、3422)购自上海康宁公司;总 RNA 提取试剂盒(货号:R1200)购自北京索莱宝公司;SYBR Green 荧光染料(货号:22204-1)购自上海吐露港生物科技有限公司。N-cadherin、E-cadherin (CST-9782T, 1:2 000)购自上海 Cell Signaling Technology 公司;ZEB1(ag16204, 1:1 000)购自武汉三鹰生物技术公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记抗兔 IgG(A0208, 1:4 000)、HRP 标记抗鼠 IgG(A0216, 1:4 000)购自上海碧云天生物技术有限公司;p21(ARG 58183, 1:2 000)、MDM2(ARG 51392, 1:2 000)、Cyclin D1(ARG 52923, 1:2 000)购自杭州 Arigo Biolaboratories Corp 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

H322 细胞使用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基培养,A549、BEAS-2B、95-D 使用

含 10%FBS 的高糖 DMEM 培养基培养,细胞密度达 80% 以上进行细胞传代。

1.2.2 生物信息学分析

利用 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)分析 ZEB1 基因在肺腺癌中的转录表达情况,同时使用 TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)分析 ZEB1 与肿瘤状态的相关性。

1.2.3 ZEB1 慢病毒细胞株构建

质粒载体构建由江苏镇江维根生物科技有限公司进行设计和构建。载体图谱如图 1 所示。构建质粒后,获得慢病毒滴度液。过表达 ZEB1 的细胞株构建是在聚乙烯亚胺介导下,使用病毒液感染细胞株。用胰酶消化细胞,将细胞接种到 6 孔板(2×10^6 个/mL)。配比加入(细胞悬液:转导增强剂=100 μ L:1.4 μ L),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,孵育结束后混合摇匀放置培养箱过夜。第 2 天加入新鲜培养基待细胞长至 80% 时,加入终浓度为 1 mg/mL 嘌呤霉素进行筛选。

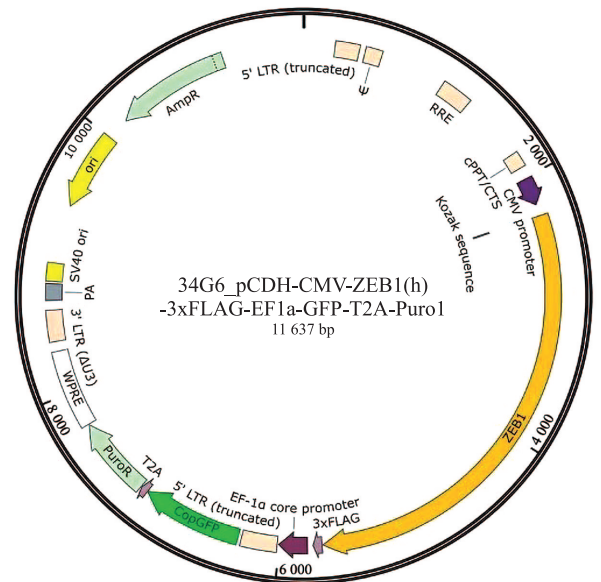


图 1 过表达 ZEB1 质粒载体构建

Fig. 1 Construction of ZEB1 overexpression plasmid vector

1.2.4 CCK-8 法检测细胞活力

将对数生长的 Control 组、Oe-NC 组和 Oe-ZEB1 组细胞接种到 96 孔板中(2×10^3 个/孔)。每组 3 个复孔,培养 24、48 和 72 h 后,每孔分别加入 10 μ L CCK-8 试剂,培养箱培养 2 h 后,用酶标仪在 450 nm 波长下检测 3 组细胞的吸光度值。

1.2.5 EdU 检测细胞增殖能力

将 3 组细胞接种于 6 孔板(4×10^5 个/孔),培养细胞密度至 80%~90%。每孔加入 1 mL EdU 染色液(EdU:完全培养基=

1 μL : 500 μL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。根据 EdU 试剂盒操作说明书加入反应体系工作试剂孵育 30 min, 随后用 1 mL 洗涤液清洗 3 次, 每次 5 min, 随后加入 1 mL Hoechst33342 染液, 室温避光孵育 10 min, PBS 清洗 3 次。最后用倒置显微镜拍照记录。

1.2.6 Hoechst33258/PI 双染检测细胞凋亡 将 3 组细胞接种到 6 孔板中(4×10^5 个/孔)培养 24 h, 收集离心后的细胞。加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 10 min, 离心后弃上清液。1 mL 预冷 PBS 重悬, 添加 Hoechst33258/PI (100 μL : 10 μL) 的混合工作液, 避光孵育 10 min, 随后加入 1 mL 预冷 PBS 重悬, 离心余留上清液约 100 μL 重悬细胞, 最后加入 10 μL 荧光淬灭剂, 取细胞悬液 15 μL 滴至载玻片上, 在倒置荧光显微镜下拍照。

1.2.7 划痕和克隆实验检测迁移增殖能力 将 3 组细胞接种到 6 孔板(5×10^6 个/孔)培养 24 h, 细胞增长至 80%~90%, 使用 200 μL 枪头进行细胞划痕实验, 使用 PBS 清洗, 加入无血清培养基后使用倒置显微镜进行拍照记录, 48 h 后同一位置拍照, ImageJ 软件计算迁移率; 将 3 组细胞接种到 6 孔板(6×10^2 个/孔), 在 CO_2 培养箱内持续培养 14 d, 期间每 3~4 d 进行换液, 培养结束后使用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 结晶紫染色 15 min, 随后清洗、晾干并拍照记录。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞迁移侵袭能力 将基质胶和无血清培养基按照 (1:8) 比例稀释, 上室加入 100 μL , 放入培养箱静置 (Transwell 迁移无此步骤, 上室直接加入 200 μL 细胞悬液)。待基质胶凝固后, 下室加入 600 μL 基础培养基, 随后将细胞接种到 Transwell 小室的上室(4×10^5 个/孔)。培养 48 h 后, 将小室上层残留的细胞擦掉, 使用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 结晶紫染色 15 min, 随后清水清洗 3 次, 晾干, 拍照, 最后使用 ImageJ 软件进行计数。

1.2.9 RT-qPCR 检验 *ZEB1* 的 mRNA 水平 将 3 组细胞接种 6 孔板中待细胞长满。用总 RNA 提取试剂提取 RNA, 随后逆转录为 cDNA。再用 SYBR green 荧光染料试剂盒进行 RT-qPCR 检测。具体引物序列见表 1。

1.2.10 Western blot 检测相关蛋白表达 将 3 组细胞接种到 6 孔板中待细胞长满。使用细胞裂解液在冰上裂解 30 min 后提取总蛋白, SDS-PAGE 电泳 (恒压 80 V、30 min, 120 V、60 min), 转膜 (恒流 300 mA、60 min), 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗涤 3 次, 二抗 2 h, TBST 洗涤 3 次, 最后使用

表 1 RT-qPCR 引物合成序列

Tab. 1 RT-qPCR primer sequences

Gene	Sequences (5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: TGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG
	R: GTGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAG
<i>ZEB1</i>	F: CCACCCTTGAAGTGATCCAGC
	R: CGGTGTAGAATCAGTCATTCTG
<i>MDM2</i>	F: GTTTGCCCTTAATGCCAT TGAACC
	R: GCCATAAGATGTCCTGTTT TGCCATG

发光成像系统成像检测, ImageJ 进行数据分析。

1.2.11 流式细胞术检测细胞周期水平 将 3 组细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中。第 2 天收集细胞, PBS 进行重悬后, 将 1 mL 细胞悬液滴入 3 mL 预冷无水乙醇至终浓度 75%, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定过夜。离心去除固定液后, 用 PBS 将细胞进行重悬, 室温水化 15 min。加入 1 mL PI 染色工作液, 避光孵育 30 min。最后使用流式细胞仪收集细胞信号, 用 Mod Fit LT 5.0 软件进行细胞周期阶段拟合分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 27.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析以及图表绘制。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布和方差齐性的多组间比较用单因素方差分析。两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学方法分析在肺腺癌组织中的表达差异 本研究使用 GEO 和 TCGA 数据库分析了 *ZEB1* 在肺腺癌中的表达特征及其与肿瘤恶性程度的相关性。在 GSE 数据集显示, *ZEB1* 在 Low-Mal 肺腺癌中的基因拷贝数最高, 并表现出较高的转录活性 (图 2A)。统计分析表明, Low-Mal 组与 Normal 组之间差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 而 High-Mal 组与 Low-Mal 组间差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。通过 *ZEB1* 在内皮细胞中的比例分析, 显示其在内皮细胞中上调的比例为 21.6%, 下调比例为 1.5% (图 2B)。在免疫细胞中, 耗竭型 CD8^+ T 细胞 (CD8Tex) 中 *ZEB1* 表达上调的比例为 36%, 下调比例为 16.6%。 CD8Tex 细胞的高基因表达通常与肿瘤的免疫编辑和逃逸密切相关, 其表达模式与不良预后显著相关 (图 2C)。TCGA 数据库的分析结果显示, *ZEB1* 的表达与肿瘤分化、EMT、侵袭、转移、增殖及扩散呈正相关 (图 2D)。上述结果表明, *ZEB1* 可能通过调控多种生物学过程促进肿瘤的侵袭和转移。

2.2 ZEB1 在肺腺癌细胞系中的 mRNA 和蛋白表达水平 为探究 ZEB1 在肺腺癌中的表达,该实验使用 Western blot 和 RT-qPCR 检测肺腺癌细胞系 H322、A549、95-D 和 BEAS-2B 中 ZEB1 的表达情况。结果显示(图3),与正常肺上皮 BEAS-2B 细胞相比, ZEB1 在 H322、A549、95-D 细胞系的蛋白表达水平 ($t=10.630, 11.010, 21.180, P<0.05$) 和 mRNA 表达水平均升高 ($t=6.447, 30.730, 21.900, P<0.05$)。

与 A549、95-D 相比, ZEB1 在 H322 细胞中的表达水平较低,因此,选择 H322 细胞构建稳定过表达 ZEB1 的细胞株。

2.3 ZEB1 在 H322 细胞中过表达效率验证 荧光转染效率如图 4A 所示, Oe-NC 和 Oe-ZEB1 过表达效率均较强。随后使用 Western blot 和 RT-qPCR 进行验证。结果如图 4B-4D 所示,与 Control 组相比, Oe-ZEB1 组 ZEB1 蛋白表达 ($t=7.688, P<0.05$) 和 mRNA

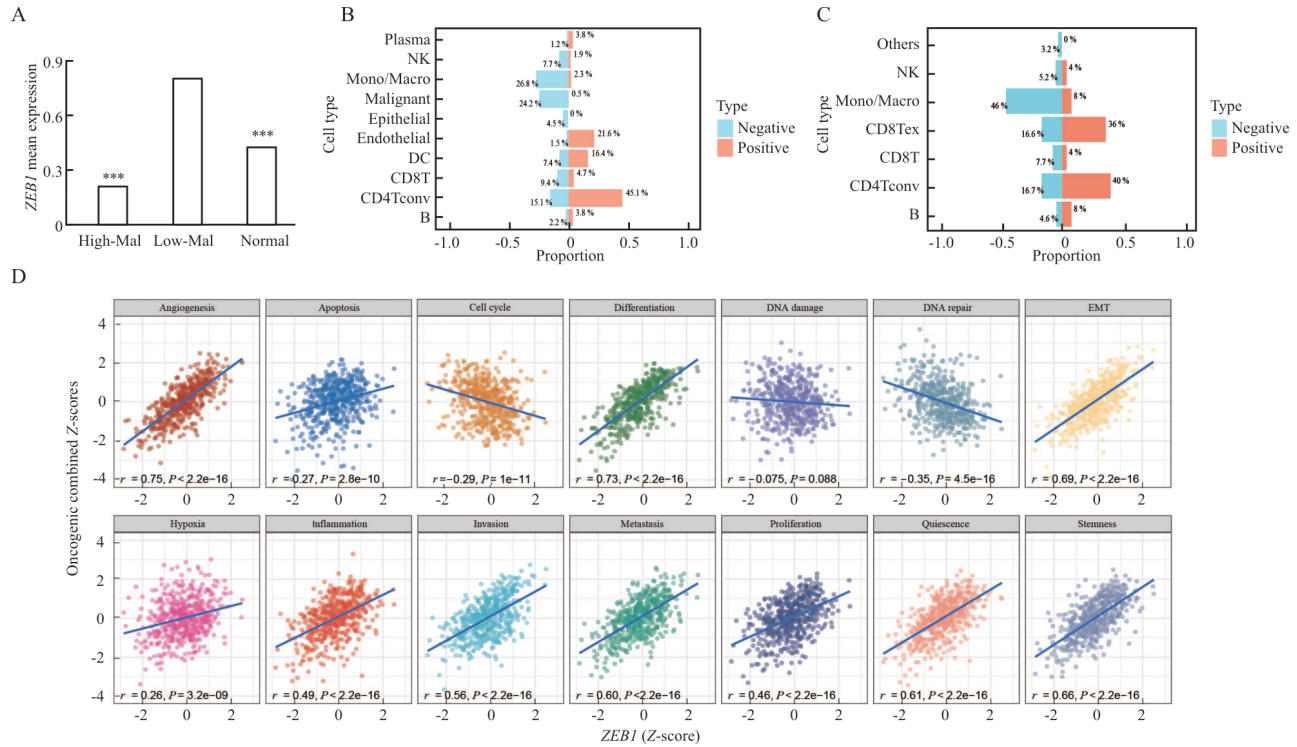


图2 GEO和TCGA数据库对ZEB1的分析

Fig. 2 Analysis of ZEB1 using the GEO and TCGA databases

A: ZEB1 showed differential expression in the spatial transcriptomics deconvolution regions in the GSE179572 dataset; B: Expression of ZEB1 in endothelial cells in the GSE117570 dataset; C: Expression of ZEB1 in immune cells in the GSE127471 dataset; D: Correlation analysis of ZEB1 gene and 14 tumor states in the TCGA dataset; *** $P<0.001$ vs Low-Mal group.

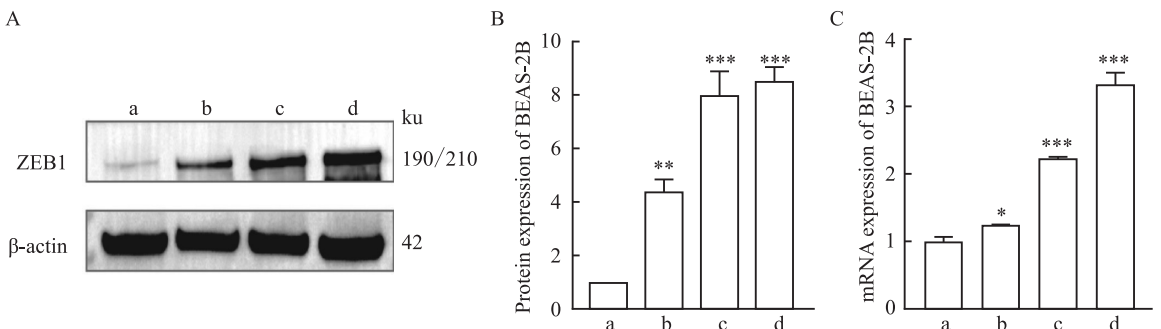


图3 ZEB1在肺癌细胞系中的mRNA和蛋白表达水平

Fig. 3 mRNA and protein expression levels of ZEB1 in lung cancer cell lines

A: The ZEB1 protein expression levels in cells; B: The statistical chart of ZEB1 protein expression levels in cells; C: The statistical chart of ZEB1 mRNA expression levels in cells; a: BEAS-2B group; b: H322 group; c: A549 group; d: 95-D group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs BEAS-2B group.

表达($t=44.320, P<0.05$)均显著增加。

2.4 过表达 ZEB1 对 H322 细胞增殖和凋亡的影响 CCK-8 结果显示(图 5A),与 Control 组相比, Oe-ZEB1 组细胞吸光度值增加($F=6.974, P<0.05$)。平板克隆结果显示(图 5B、5E), Oe-ZEB1 组克隆数(175.7 ± 17.67)高于 Control 组克隆数(118.3 ± 15.82)($t=4.186, P<0.05$)。EdU 实验结果显示(图 5C、5F),与 Control 组相比, Oe-ZEB1 组绿色荧光强度增加($t=6.579, P<0.05$)。Hoechst33258/PI 双染实验结果显示(图 5D、5G),与 Control 组相比, Oe-ZEB1 组高蓝光细胞数量和低红光细胞数量减少($t=6.221, P<0.05$)。以上结果表明 Oe-ZEB1 促进 H322 细胞的增殖能力,抑制 H322 细胞的凋亡水平。

2.5 过表达 ZEB1 对 H322 细胞迁移和侵袭的影响 划痕实验结果显示(图 6A、6D、6E),与 Control 组相比, Oe-ZEB1 组 24 h 和 48 h 迁移率均增高($t=3.470, t=6.515, P<0.05$); Transwell 实验结果显示(图 6B、6C、6F、6G), Oe-ZEB1 组迁移细胞数($t=$

$29.650, P<0.05$)和侵袭细胞数($t=14.540, P<0.05$)均高于 Control 组细胞迁移数和细胞侵袭数。以上结果表明, Oe-ZEB1 促进 H322 细胞的迁移和侵袭。

2.6 过表达 ZEB1 对 EMT 和 MDM2/mutp53/p21 通路的表达影响 Western blot 实验结果显示(图 7A、7B),与 Control 组相比, Oe-ZEB1 组 E-cadherin 的蛋白表达水平下降($t=5.249, P<0.05$), N-cadherin 的蛋白表达水平显著升高($t=4.435, P<0.05$)。MDM2/mutp53/p21 通路相关蛋白结果显示(图 7C、7D),与 Control 组相比, Oe-ZEB1 组 MDM2 和 p21 蛋白的表达水平下降($t=7.070, t=4.115, P<0.05$), mutp53 和 Cyclin D1 蛋白表达水平增加($t=7.099, t=7.078, P<0.05$)。流式细胞周期实验结果显示(图 7E、7F), OE-ZEB1 组 G₁ 期占比为 58.63%, 低于 Control 组 G₁ 期占比 66.67% ($t=11.760, P<0.05$)。OE-ZEB1 组 S 期占比为 14.01%, 高于 Control 组 S 期占比 10.32% ($t=7.349, P<0.05$)。图 7G 显示,与 Control 组相比, Oe-ZEB1 组 MDM2 的 mRNA 表达水平下降($t=10.640, P<0.05$)。

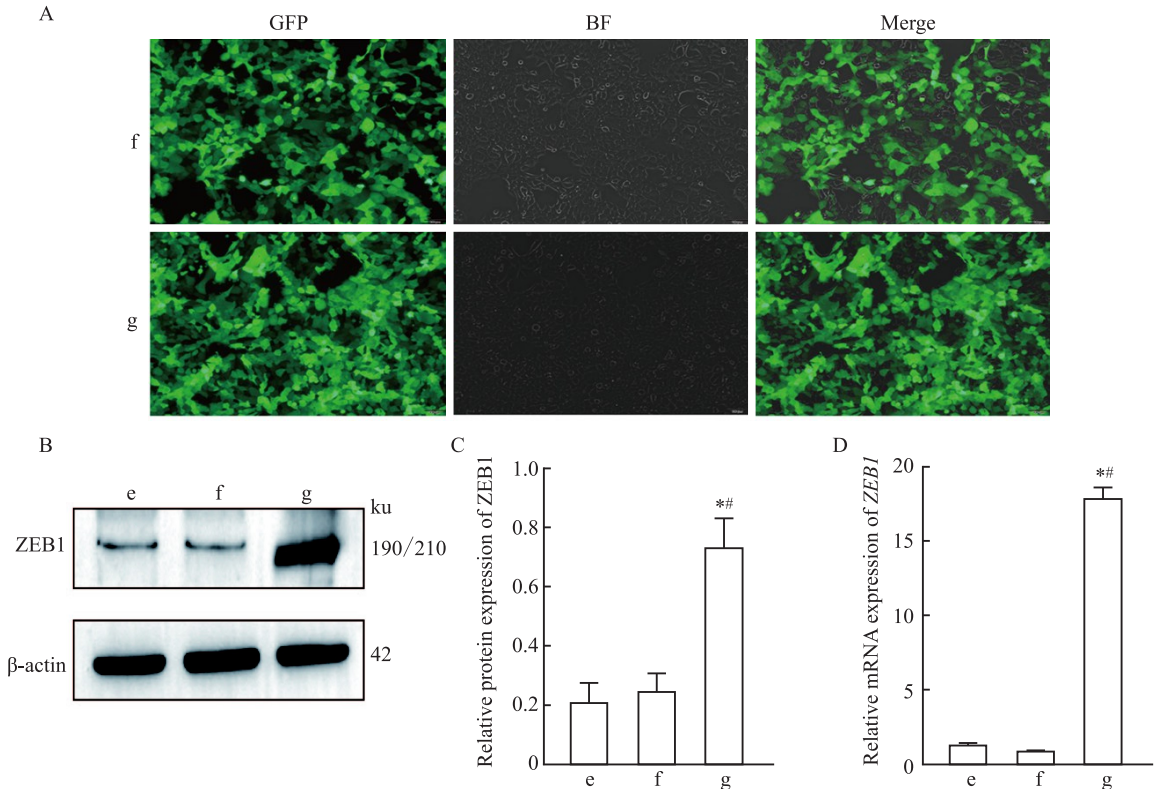


图 4 ZEB1 在 H322 细胞中过表达效率验证

Fig. 4 Verification of ZEB1 overexpression efficiency in H322 cells

A: The fluorescent transfection image of overexpressed ZEB1 in H322 cells $\times 200$; Green light: GFP; B: The ZEB1 protein expression levels in H322 cells after transfection; C: The statistical chart of ZEB1 protein expression levels in H322 cells after transfection; D: The statistical chart of ZEB1 mRNA expression levels in cells after transfection; e: Control group; f: Oe-NC group; g: Oe-ZEB1 group; * $P<0.05$ vs Control group; ** $P<0.05$ vs Oe-NC group.

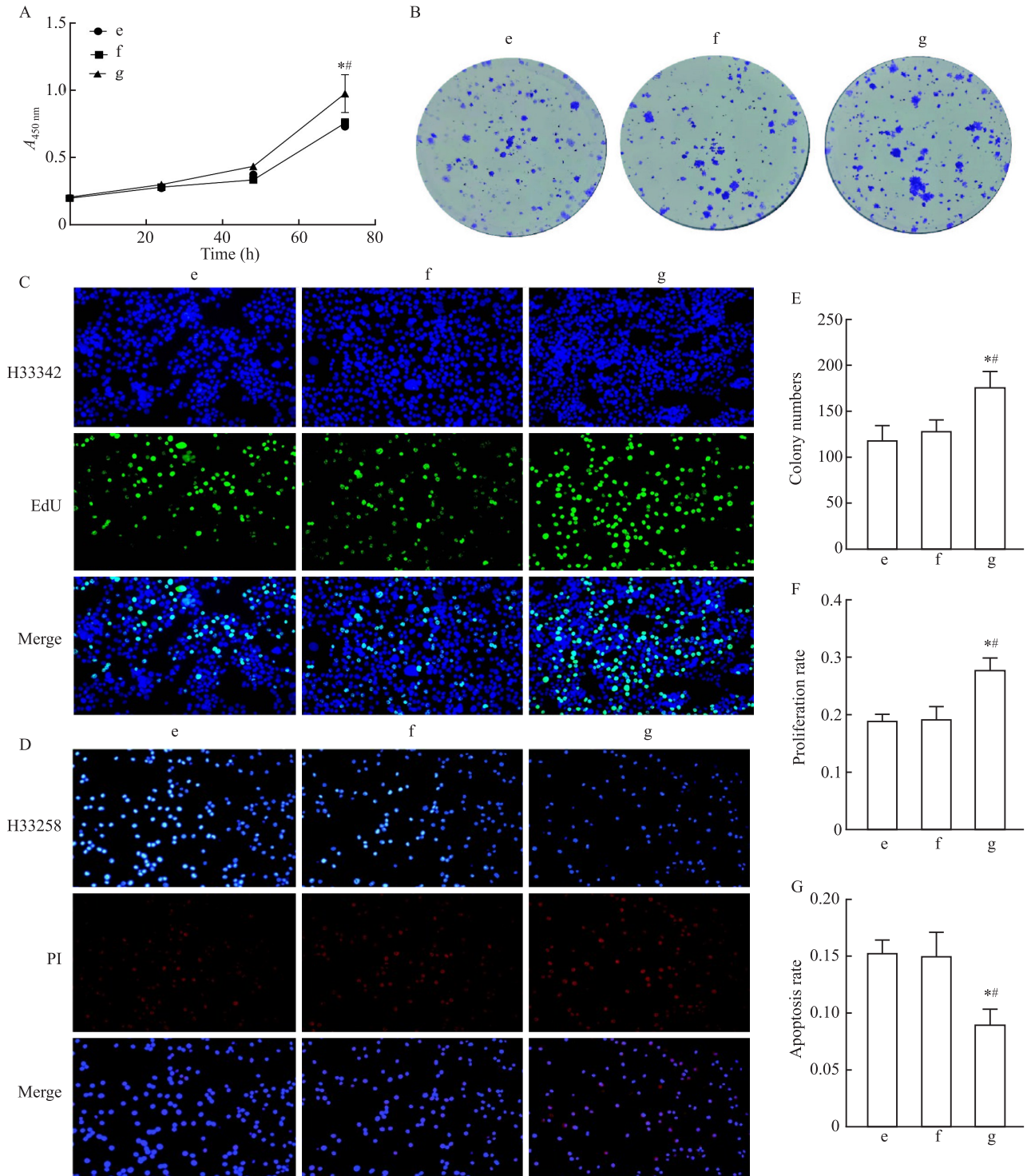


图5 过表达ZEB1对H322细胞增殖和凋亡的影响

Fig. 5 The effects of ZEB1 overexpression on the proliferation and apoptosis of H322 cells

A: CCK-8 assay results of H322 cells; B: Plate cloning experiment results of H322 cells; C: EdU staining was used to detect the proliferative capacity of H322 cells $\times 200$; Blue light: Hoechst33342, Green light: Edu; High green light low blue light: proliferation cells; D: Hoechst 33258/PI double staining apoptosis fluorescence images of H322 cells $\times 200$; Blue light: Hoechst33258, Red light: PI; High blue light low red light: apoptotic cells; E: The statistical chart of plate cloning experiment results of H322 cells; F: The statistical chart of EDU staining assay results of H322 cells; G: The statistical chart of Hoechst33258/PI double staining results of H322 cells; e: Control group; f: Oe-NC group; g: Oe-ZEB1 group; ^{*} $P < 0.05$ vs Control group; ^{##} $P < 0.05$ vs Oe-NC group.

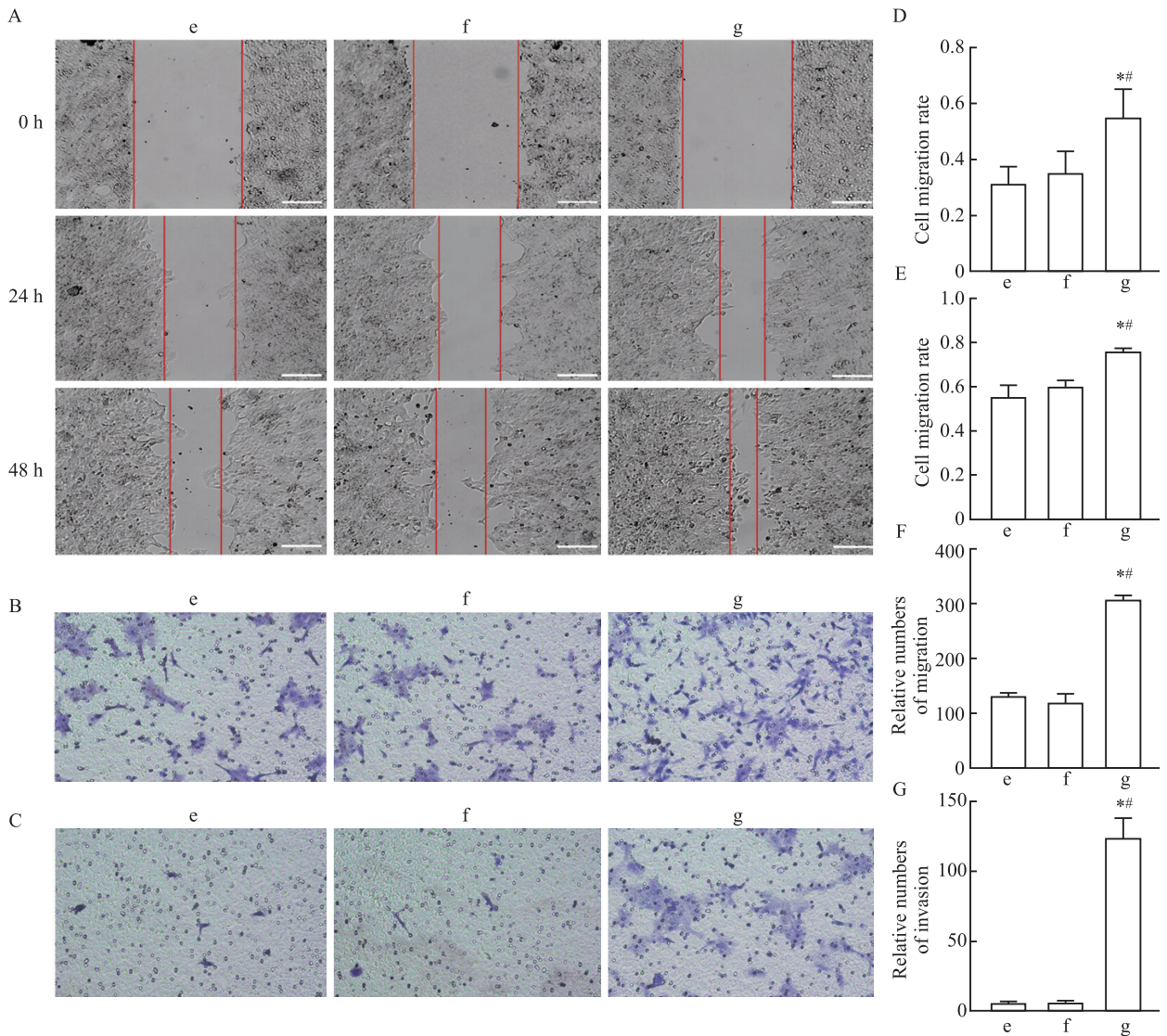


图6 过表达ZEB1对H322细胞迁移和侵袭的影响

Fig. 6 The effects of ZEB1 overexpression on the migration and invasion of H322 cells

A: Scratch test result of H322 cells ×100; B: Transwell migration assay results of H322 cells ×200; C: Transwell invasion assay results of H322 cells ×200; D: The statistical chart of the migration rate of H322 cells by 24 hours cell scratch assay; E: The statistical chart of the migration rate of H322 cells 48 hours after transfection detected by cell scratch assay; F: The statistical chart of Transwell migration assay results of H322 cells; G: The statistical chart of Transwell invasion assay results of H322 cells; e: Control group; f: Oe-NC group; g: Oe-ZEB1 group; *P<0.05 vs Control group; #P<0.05 vs Oe-NC group.

3 讨论

有研究^[7]表明,ZEB1的高表达与肺癌患者的不良预后显著相关,并且进一步证实ZEB1为总生存期(overall survival, OS)和无进展生存期(progression-free survival, PFS)缩短的独立危险因素^[8]。本研究通过生物信息学分析显示,ZEB1在低恶性肺腺癌中的基因拷贝数表达最高,并表现出较高的转录活性。其表达水平与肺腺癌的癌变、侵袭、转移过程密切相关。此外,细胞学实验结果显示,ZEB1

在肺腺癌细胞系(H322、A549、95-D)中的表达均高于BEAS-2B,提示ZEB1可能在肺腺癌发生和发展过程中发挥重要作用。

ZEB1是胚胎发育的关键转录因子,在细胞增殖调控中具有重要作用^[9]。在骨肉瘤中,ZEB1过表达可增强细胞活力、迁移和侵袭能力,通过正向调控致癌表型促进肿瘤进展^[10]。CCK-8、平板克隆和EdU实验结果显示,ZEB1过表达可增强H322细胞的增殖能力。EMT是指上皮细胞在特定生物信号诱导下转化为具有间充质细胞特性的过程,同时伴

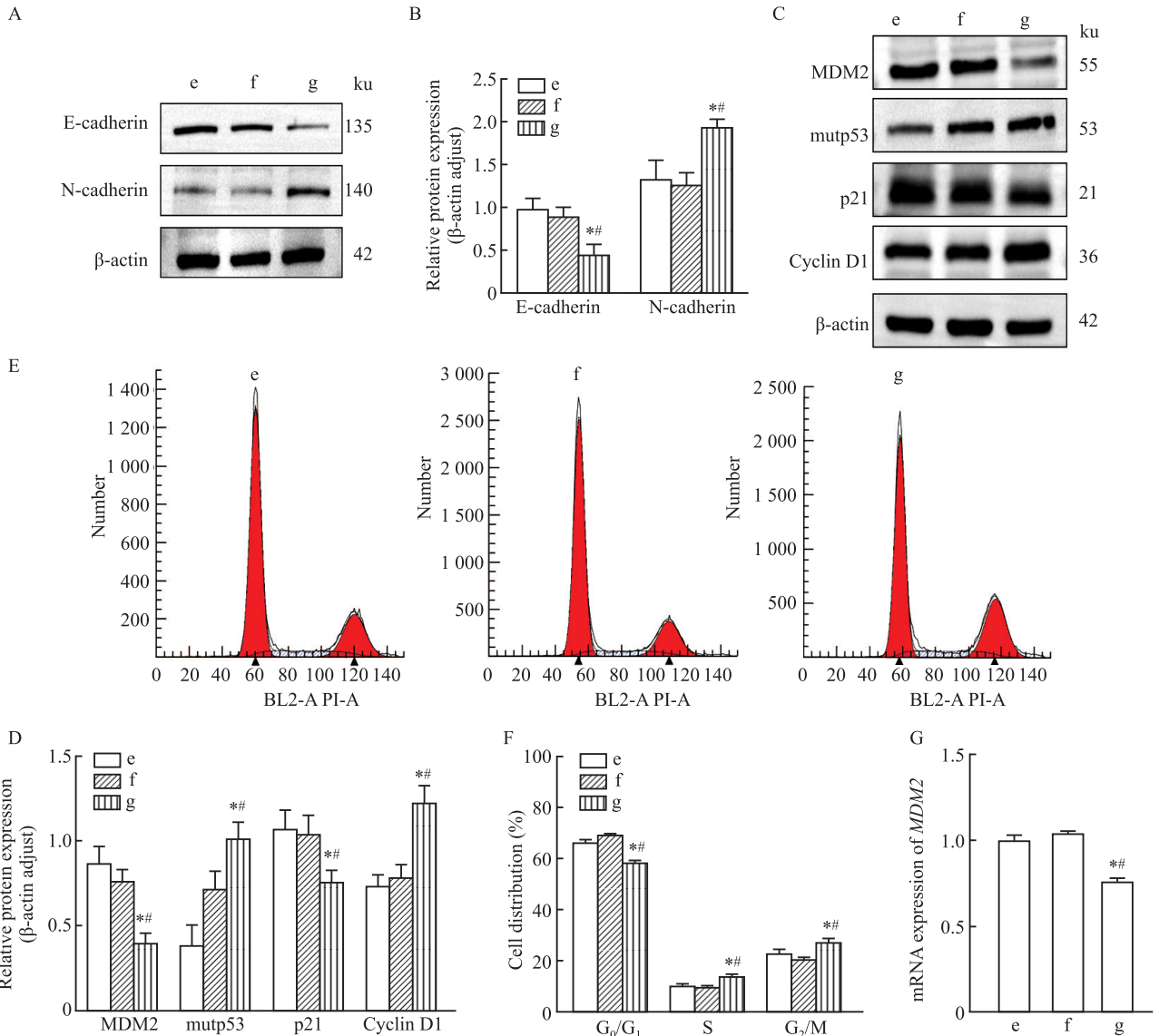


图7 过表达ZEB1对EMT和MDM2/mutp53/p21通路的影响

Fig. 7 The effects of ZEB1 overexpression on the expression of EMT and MDM2/mutp53/p21 pathway

A: E-cadherin and N-cadherin protein expression levels in H322 cells; B: The statistical chart of E-cadherin and N-cadherin protein expression levels in H322 cells; C: MDM2, mutp53, p21 and Cyclin D1 protein expression levels in H322 cells; D: The statistical chart of MDM2, mutp53, p21 and Cyclin D1 protein expression levels in H322 cells; E: Flow cytometry was used to detect the cell cycle of H322 cells; F: The statistical chart of cell cycle proportion in H322 cells; G: The statistical chart of MDM2 mRNA expression levels in H322 cells; e: Control group; f: Oe-NC group; g: Oe-ZEB1 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Oe-NC group.

随细胞形态及骨架重塑,导致细胞迁移能力增强、黏附作用减弱^[11]。ZEB1作为EMT经典转录调控因子,其NZF和CZF可通过结合靶基因启动子区E-box,抑制E-cadherin表达并促进N-cadherin转化^[12]。划痕和Transwell实验结果显示,ZEB1过表达可显著增强H322细胞的迁移能力。Western blot结果进一步证实,ZEB1可通过下调E-cadherin、上调N-cadherin表达,驱动EMT进程并促进细胞迁移与侵袭。

MDM2是一种具有环指结构域的E3泛素连接酶,可介导p53的核输出与泛素化降解。p53通过转录激活下游p21,参与肿瘤细胞增殖、凋亡及DNA损伤修复等关键生物学过程^[13]。p21属于G₁/S期细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)抑制剂,可通过抑制CDK家族蛋白活性阻滞细胞周期于G₁期;反之,p21缺失会通过改变细胞分化特性促进肿瘤进程^[14]。Cyclin D1作为p21下游的细胞周期调控因子,与CDK4/6形成复合

物被激活,可磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白,推动细胞由 G₁ 期进入 S 期;但异常高表达可能加速细胞周期进程^[13-14]。在 Tp53 突变背景下,mutp53 丧失了野生型 p53 的抑癌功能,但 MDM2 仍可通过结合 mutp53 介导其泛素化降解,从而调控其稳定性及致癌活性^[15]。已有研究^[16]表明,MDM2 的上调可促进 mutp53 的降解。而 mutp53 的乙酰化增强及降解也可诱导 p21 表达上调^[17]。MDM2 的转录调控与 EMT 途径(如转化生长因子 β、受体酪氨酸激酶)密切相关。作为 EMT 核心转录因子,ZEB1 可通过调控 MDM2 影响其下游信号通路的表达。此外,mutp53 保留了与磷酸化及异丙基异构酶 1 相互作用的能力,从而允许 p63 的隔离与抑制作用,进一步促进 EMT 进程^[18-19]。本研究表明,ZEB1 过表达可通过抑制 MDM2 介导的 mutp53 蛋白降解作用,并协同下调 p21 的表达水平,从而驱动恶性细胞周期进程。Western blot 结果显示,与 Control 相比,Oe-ZEB1 中 MDM2、p21 蛋白表达下调,而 mutp53、Cyclin D1 蛋白表达上调。流式细胞周期实验进一步表明,Oe-ZEB1 组 G₀/G₁ 期细胞比例减少、S 期比例增加,未出现明显 G₁/S 阻滞,提示细胞周期进程加速。

综上所述,本研究表明,过表达 ZEB1 可促进肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭以及 EMT 进程。并且 ZEB1 可能通过调控 MDM2/mutp53/p21 通路参与 H322 细胞的周期调控。后续研究将筛选 ZEB1 与 MDM2/mutp53 互作分子,并结合染色质免疫沉淀技术精准定位 ZEB1 调控靶点。同时,构建 ZEB1 敲低细胞株以进一步验证 MDM2/mutp53/p21 通路在肺癌中的生物学意义。

参考文献

[1] 李小钰,黄青,吴雨濛,等. 2022 年全球癌症统计报告的窄谱总结和展望[J]. 肿瘤防治研究, 2024, 51(5): 307-12. doi: 10.3971/j. issn. 1000-8578. 2024. 24. 0437.

[1] Li X Y, Huang Q, Wu Y M, et al. The global cancer statistics report in 2022: a narrow spectrum summary and outlook [J]. Cancer Res Prev Treat, 2024, 51(5): 307-12. doi: 10.3971/j. issn. 1000-8578. 2024. 24. 0437.

[2] Menju T, Date H. Lung cancer and epithelial-mesenchymal transition [J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2021, 69(5): 781-9. doi: 10.1007/s11748-021-01595-4.

[3] Cheng L, Zhou M Y, Gu Y J, et al. ZEB1: new advances in fibrosis and cancer [J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(4): 1643-50. doi: 10.1007/s11010-020-04036-7.

[4] Perez-Oquendo M, Gibbons D L. Regulation of ZEB1 function and molecular associations in tumor progression and metastasis

[J]. Cancers, 2022, 14(8): 1864. doi: 10.3390/cancers14081864.

[5] Lu J, Fei F, Wu C, et al. ZEB1: catalyst of immune escape during tumor metastasis [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113490. doi: 10.1016/j.biopha. 2022. 113490.

[6] Menche C, Schuhwerk H, Armstark I, et al. ZEB1-mediated fibroblast polarization controls inflammation and sensitivity to immunotherapy in colorectal cancer [J]. EMBO Rep, 2024, 25(8): 3406-31. doi: 10.1038/s44319-024-00186-7.

[7] Byers L A, Diao L, Wang J, et al. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(1): 279-90. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1558.

[8] Zhang P, Sun Y, Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance [J]. Cell Cycle, 2015, 14(4): 481-7. doi: 10.1080/15384101. 2015. 1006048.

[9] Ashrafzadeh M, Ang H L, Moghadam E R, et al. microRNAs and their influence on the ZEB family: mechanistic aspects and therapeutic applications in cancer therapy [J]. Biomolecules, 2020, 10(7): 1040. doi: 10.3390/biom10071040.

[10] Jiang M, Jike Y, Liu K, et al. Exosome-mediated miR-144-3p promotes ferroptosis to inhibit osteosarcoma proliferation, migration, and invasion through regulating ZEB1 [J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 113. doi: 10.1186/s12943-023-01804-z.

[11] Lenda B, Żebrowska-Nawrocka M, Turek G, et al. Zinc finger E-box binding homeobox family: non-coding RNA and epigenetic regulation in gliomas [J]. Biomedicines, 2023, 11(5): 1364. doi: 10.3390/biomedicines11051364.

[12] Perez-Oquendo M, Manshour R, Tian Y, et al. ZEB1 is regulated by K811 acetylation to promote stability, NuRD complex interactions, EMT, and NSCLC metastasis [J]. Mol Cancer Res, 2023, 21(8): 779-94. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-22-0503.

[13] Chinnam M, Xu C, Lama R, et al. MDM2 E3 ligase activity is essential for p53 regulation and cell cycle integrity [J]. PLoS Genet, 2022, 18(5): e1010171. doi: 10.1371/journal.pgen. 1010171.

[14] 唐帆,黄永周,庞丽娟,等. G3BP2 通过抑制 p53/p21 信号通路抑制结肠癌细胞衰老 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(2): 239-44. doi: 10.19405/j. cnki. issn1000-1492. 2020. 02. 016.

[14] Tang F, Huang Y Z, Pang L J, et al. G3BP2 inhibits cell senescence by inhibiting p53/p21 signaling pathway in colon cancer [J]. Acta Univ Med Anhui, 2020, 55(2): 239-44. doi: 10.19405/j. cnki. issn1000-1492. 2020. 02. 016.

[15] Wang S, Hao Q, Li J, et al. Ubiquitin ligase DTX3 empowers mutant p53 to promote ovarian cancer development [J]. Genes Dis, 2022, 9(3): 705-16. doi: 10.1016/j.gendis. 2020. 11. 007.

[16] Wang Y S, Yin J Z, Shi X Q, et al. MDM2-mediated inhibitory effect of arsenic trioxide on small cell lung cancer cell line by

- degrading mutant p53[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2023, 23(16): 1829-37. doi:10.2174/1871520623666230530095435.
- [17] Di Crosta M, Ragone F C, Benedetti R, et al. SAHA/5-AZA enhances acetylation and degradation of mutp53, upregulates p21 and downregulates c-Myc and BRCA-1 in pancreatic cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(13): 7020. doi: 10.3390/ijms25137020.
- [18] Qin J J, Li X, Hunt C, et al. Natural products targeting the p53-MDM2 pathway and mutant p53: recent advances and implications in cancer medicine[J]. *Genes Dis*, 2018, 5(3): 204-19. doi:10.1016/j.gendis.2018.07.002.
- [19] Park M K, Lee H, Lee C H. Post-translational modification of ZEB family members in cancer progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 15127. doi:10.3390/ijms232315127.

Mechanism of transcription factor *ZEB1* in the proliferation, migration, and invasion of lung adenocarcinoma cells

Zhao Yun¹, Ma Beibei¹, Xing Huaxue¹, Huang Shaofeng¹, Zhang Zhongwei², Ling Bo¹

(¹*School of Basic Medical Sciences*, ²*School of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000*)

Abstract Objective To investigate the effects of zinc finger E-box binding homeobox 1 (*ZEB1*) on the proliferation, migration, and invasion of lung adenocarcinoma H322 cells, as well as its underlying molecular mechanisms. **Methods** The gene expression characteristics of the transcription factor *ZEB1* in lung adenocarcinoma were analyzed using data from the GEO and TCGA public databases. RT-qPCR and Western blot were employed to measure mRNA and protein expression levels of *ZEB1* in lung adenocarcinoma cell lines (H322, A549, 95-D) and normal human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). Lentiviral transduction was utilized to establish stable *ZEB1*-overexpressing (Oe-*ZEB1*) and vector control (Oe-NC) H322 cell lines. Cell proliferation was assessed using CCK-8, colony formation, and EdU assays, while apoptosis was evaluated by Hoechst33258/PI double staining. Wound healing and Transwell assays were performed to examine cell migration and invasion capabilities. Cell cycle distribution was determined by flow cytometry, and Western blot was used to analyze protein expression changes in relevant signaling pathways. **Results** The findings from GEO and TCGA indicated that *ZEB1* expression in lung adenocarcinoma varied with tumor malignancy grade. RT-qPCR and Western blot analyses revealed significantly higher *ZEB1* expression in lung adenocarcinoma cell lines compared to BEAS-2B cells ($P < 0.05$). Results from the CCK-8, colony formation, EdU, wound healing, and Transwell assays demonstrated that, compared with the un-transfected control (Control) group, Oe-*ZEB1* H322 cells exhibited enhanced proliferation, migration, and invasion capabilities ($P < 0.05$). Hoechst33258/PI double staining and flow cytometry analyses showed that, relative to the Control group, apoptosis was reduced in Oe-*ZEB1* H322 cells ($P < 0.05$). Additionally, a decreased proportion of cells in the G₁ phase and an increased proportion in the S phase were observed in Oe-*ZEB1* cells, indicating accelerated cell cycle progression. Western blot analysis further revealed that, compared with the Control group, Oe-*ZEB1* H322 cells exhibited upregulated expression of N-cadherin, mutant p53 (mutp53), and Cyclin D1 ($P < 0.05$), while expression levels of E-cadherin, murine double minute 2 (MDM2), and p21 were downregulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of *ZEB1* promotes the proliferation, migration, and invasion of lung adenocarcinoma H322 cells and may facilitate cell cycle progression by modulating the MDM2/mutp53/p21 signaling pathway, thereby promoting the transition of cells from the G₀/G₁ phase to the S phase.

Key words *ZEB1*; lung adenocarcinoma; metastasis; proliferation; invasion; cell cycle

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82060540); Natural Science Foundation of Guangxi Province (No. 2025GXNSFHA069028)

Corresponding author Ling Bo, E-mail: lingbo268@163.com