



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: DERL1 蛋白在食管鳞状细胞癌中表达及功能初步探究
作者: 李艺冬, 张雪, 周紫如, 马昕, 孙梦菲, 黄萌, 王天鸿, 程艺, 崔晓宾
收稿日期: 2026-06-05
网络首发日期: 2026-07-30
引用格式: 李艺冬, 张雪, 周紫如, 马昕, 孙梦菲, 黄萌, 王天鸿, 程艺, 崔晓宾. DERL1 蛋白在食管鳞状细胞癌中表达及功能初步探究[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260730.1111.004>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DERL1 蛋白在食管鳞状细胞癌中表达及功能初步探究¹

李艺冬¹, 张雪², 周紫如², 马昕², 孙梦菲², 黄萌², 王天鸿²,

程艺², 崔晓宾^{1,2}

(¹江苏大学鼓楼临床医学院, 南京 210008; ²南京大学医学院附属鼓楼医院病理科, 南京 210008)

摘要 **目的** 探讨 DERL1 蛋白在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 中的表达及其对临床预后、癌细胞恶性生物学行为、免疫微环境的影响。**方法** 采用免疫组化染色检测 ESCC 组织及癌旁正常组织中 DERL1 表达, 分析其与临床病理特征及预后的关联。在人食管癌细胞系 TE-1、KYSE-450 中敲低 *DERL1*, 通过 CCK-8、平板克隆及 Transwell 实验检测细胞增殖、克隆形成及迁移能力的变化。利用 TIMER 2.0 数据库分析 DERL1 与免疫细胞浸润的相关性, 通过多色免疫荧光在组织芯片上进行验证。**结果** DERL1 蛋白在 ESCC 组织中高表达, 其高表达患者的总生存期明显缩短 (Log-rank $P=0.011$), 且为不良预后的独立危险因素 ($HR=8.717$, $P=0.035$)。细胞功能实验表明, 敲低 *DERL1* 能显著抑制 TE-1、KYSE-450 细胞的增殖活性、克隆形成能力及迁移侵袭 (均 $P<0.05$)。生信分析显示 DERL1 表达与 M0 巨噬细胞、静息 CD4⁺ 记忆 T 细胞呈正相关, 与 CD8⁺ T 细胞等呈负相关; 多色免疫荧光观察到在 DERL1 蛋白高表达区域 CD4⁺ T 细胞浸润相对较多, 而 CD8⁺ T 细胞浸润相对较少。**结论** DERL1 蛋白在 ESCC 中高表达, 是患者不良预后的独立生物标志物。DERL1 促进肿瘤细胞增殖与迁移, 并与抑制性免疫微环境相关。提示 DERL1 有望成为食管鳞癌潜在的干预靶点。

关键词 DERL1; 食管鳞癌; 预后; 细胞增殖; 细胞迁移; 免疫浸润

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A

Expression and preliminary functional exploration of DERL1 protein in esophageal squamous cell carcinoma

Li Yidong¹, Zhang Xue², Zhou Ziru², Ma Xin², Sun Mengfei², Huang Meng², Wang Tianhong²,
Cheng Yi², Cui Xiaobin^{1,2}

2026-06-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82160542); 南京鼓楼医院临床研究专项资金项目 (编号: 2023-LCYJ-MS-17)

作者简介: 李艺冬, 女, 硕士研究生;

崔晓宾, 男, 副教授, 副主任医师, 博士生导师, 通信作者, E-mail: cuixiaobin4363@foxmail.com

(¹Gulou Clinical Medical College, Jiangsu University, Nanjing 210008; ²Department of Pathology, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008)

Abstract Objective To investigate DERL1 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its impact on prognosis, malignant behavior, and the immune microenvironment. **Methods** DERL1 expression in ESCC and adjacent tissues was detected by immunohistochemistry to analyze its clinicopathological and prognostic significance. After DERL1 knockdown in human esophageal cancer cell lines TE-1 and KYSE-450 cells, cell proliferation, colony formation, and migration were assessed *via* CCK-8, plate colony, and Transwell assays. The correlation between DERL1 and immune infiltration was analyzed using TIMER2.0 and validated by multiplex immunofluorescence. **Results** DERL1 protein was significantly upregulated in ESCC tissues. High DERL1 expression predicted shorter overall survival (Log-rank $P=0.011$) and served as an independent prognostic risk factor ($HR=8.717, P=0.035$). Functional cellular assays showed that DERL1 knockdown significantly inhibited proliferation, colony formation, and migration/invasion in both TE-1 and KYSE-450 cells ($P<0.05$). Bioinformatics analysis revealed that DERL1 expression was positively correlated with M0 macrophages and resting CD4⁺ memory T cells, while negatively correlated with CD8⁺T cells. Multiplex immunofluorescence indicated that regions with high DERL1 expression exhibited increased CD4⁺ but decreased CD8⁺ T cell infiltration. **Conclusion** DERL1 protein is highly expressed in ESCC and serves as an independent biomarker of poor prognosis. DERL1 promotes tumor cell proliferation and migration and is associated with an immunosuppressive tumor microenvironment. These findings suggest that DERL1 may serve as a potential therapeutic target for esophageal squamous cell carcinoma.

Key words DERL1; esophageal squamous cell carcinoma; prognosis; cell proliferation; cell migration; immune infiltration

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82160542); Clinical Research Special Fund of Nanjing Drum Tower Hospital (No. 2023-LCYJ-MS-17)

Corresponding author Cui Xiaobin, E-mail: cuixiaobin4363@foxmail.com

食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 是食管癌最主要的组织学

亚型^[1]，尽管外科手术、放化疗、免疫治疗等手段不断进步，ESCC 患者的整体预后仍不理想。因此，探寻与 ESCC 侵袭、转移及治疗反应相关的分子标志物，对临床分层和新的靶向策略的开发具有重要意义。

DERL1 是内质网相关降解（endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD）通路的关键蛋白，在非小细胞肺癌、肝癌及乳腺癌等多种实体瘤中高表达，并通过调控表皮生长因子受体-细胞外信号调节激酶（EGFR-ERK）或蛋白激酶 B（protein kinase B, PKB/AKT）等信号通路促进肿瘤增殖、迁移及耐药^[2-4]。目前 DERL1 在 ESCC 中研究较少，虽有初步研究^[5]提示 miR-181d 可通过靶向 DERL1 抑制 ESCC 进展，但其在临床样本中的表达模式及对肿瘤免疫微环境的影响仍待阐明。因此，本研究拟系统评估 DERL1 蛋白在 ESCC 组织中的表达情况，并利用多色免疫荧光技术分析其表达与肿瘤免疫微环境的相关性；同时在体外敲低 siRNA 并结合 CCK-8、细胞迁移、侵袭等实验，验证 DERL1 对 ESCC 细胞恶性表型的影响，从而为 DERL1 在 ESCC 中的临床意义与分子机制提供新的证据支持。

1 材料与方法

1.1 临床资料 本研究纳入南京鼓楼医院 2000 至 2021 年收治的 ESCC 患者石蜡标本，纳入标准为：① 根治性手术后经病理确诊为原发性 ESCC；② 临床病理资料完整。排除标准为：① 术前接受过新辅助放化疗或其他抗肿瘤治疗；② 合并其他严重系统性疾病或多原发恶性肿瘤。鉴于跨度时间较长，所有入组患者的 TNM 分期均根据美国癌症联合委员会（AJCC）第八版分期系统由 2 名资深病理科医师重新评估与统一。经筛选后共 176 例癌组织及 202 例癌旁正常组织纳入分析。标本采集通过南京大学医学院附属鼓楼医院医学伦理委员会审批（审批号：2023-648-03）。随访终点为总生存期（overall survival, OS），患者随访截至 2021 年 9 月。

1.2 细胞和主要试剂 ESCC 细胞株 TE-1、KYSE-450 来源于中国科学院细胞库。DERL1 抗体购自 Abcam（上海艾博抗贸易有限公司，货号：ab176732）；Actin 抗体购自 Proteintech Group（武汉三鹰生物技术有限公司，货号：66009-1-Ig）；CD4 抗体、CD8 抗体（货号：IR649、M7103）均购自丹麦 Dako 公司。DERL1 siRNA 由纽赫生物科技（上海）有限公司构建，具体 siRNA 序列见表 1；DERL1 引物、GAPDH 引物由生工生物工程（上海）股份有限公司构建。胎牛血清（货号：SA301.02.V）购自北京 Cellmax 公司；磷酸缓冲盐溶液（货号：MA0015）、1%青-链霉素混合液（货号：MA0110）和 RPMI-1640 培养基（货号：MA0215）购自大连美仑生物技术有限公司；Lipofectamine2000 转染试剂（货号：11668019）购自美国 Invitrogen 公司；RNA 提取试剂盒（货号：AG21024）、Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒

(货号: AG11728)、SYBR Green Premix Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒II(货号: AG11702)均购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; 12.5%PAGE 凝胶快速制备试剂盒(货号: PG113)购自上海雅酶生物科技有限公司; 酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物和 DAB 显色剂(货号: GK600711)购自上海基因科技股份有限公司。

表 1 *DERL1* siRNA 序列
Tab.1 *DERL1* siRNA sequences

Oligo name	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
hs- <i>DERL1</i> -si1	GCAUCGUGAUUACUGGCUUTT	AAGCCAGUAAUCACGAUGCTT
hs- <i>DERL1</i> -si2	GGGUUAUCCUUGGAUUCAATT	UUGAAUCCAAGGAUAACCCTT
hs- <i>DERL1</i> -si3	GCGAGCUGCUGAUCAGAAUTT	AUUCUGAUCAGCAGCUCGCTT

1.3 生物信息学分析 利用 UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/ualcan-res.pl>) 在线平台, 基于 TCGA 数据库分析 *DERL1* 在不同癌症类型及邻近正常组织内的 mRNA 表达水平。使用 TIMER2.0 数据库的“Immune Association”模块, 基于食管癌(esophageal carcinoma, ESCA)数据集, 选择 CIBERSORT 算法评估 *DERL1* 的表达水平与多种免疫细胞浸润水平之间的相关性。

1.4 免疫组织化学染色和结果评估 本研究纳入 ESCC 及配对癌旁正常组织标本, 经石蜡包埋后构建组织芯片, 组织芯片直径为 2 mm。对芯片块进行连续切片, 厚度为 4 μm , 并于 60°C 烘烤 1 h 以增强组织黏附。切片经二甲苯I、II、III依次脱蜡(各 5 min), 再经 100%、95%、75%梯度乙醇水化(各 5 min)。抗原修复采用 pH6.0 枸橼酸盐修复液, 于高压锅中高温修复 3 min。修复后切片自然冷却, 免疫组化笔圈定组织区域。为阻断内源性过氧化物酶活性, 切片于室温下以 10% H_2O_2 孵育 10 min, PBST 冲洗 3 次(每次 5 min)。随后滴加兔抗人 *DERL1* 多克隆抗体(1:2 000 稀释), 4 °C 湿盒中孵育过夜。次日复温 30 min, PBST 洗涤后滴加 HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗, 37 °C 孵育 30 min, 再次用 PBST 洗涤。显色采用 DAB 系统, 镜下控制反应时间, ddH₂O 终止。苏木精复染 20 s, 水洗返蓝, 无水乙醇脱水后封片。

所有切片由两位病理医师独立评估, 若评分不一致, 则共同阅片复核并由第 3 位副高级病理医师判定最终评分。免疫组化(immunohistochemistry, IHC)评分综合染色强度(无色=0 分, 黄色=1 分, 棕黄色=2 分, 棕色=3 分)与阳性细胞比例(<5%=0 分, 5%~25%=1 分, 26%~50%=2 分, 51%~75%=3 分, >75%=4 分), 以两者乘积作为最终评分。

1.5 ESCC 患者 DERL1 蛋白表达强度与临床病理特征和预后的关系 依据 DERL1 免疫组化评分, 将 176 例 ESCC 患者划分为 DERL1 高表达组与低表达组。应用卡方检验比较两组间患者的临床病理特征的分布差异, 纳入分类变量包括患者性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤分化、TNM 分期。为评估 DERL1 蛋白表达对 ESCC 的诊断价值, 进行受试者工作特征 (receiver operating characteristic curve, ROC) 曲线分析。为评估 DERL1 表达水平对 ESCC 患者预后的影响, 首先采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 用 Log-rank 检验比较 DERL1 高、低表达组患者的总生存期差异分析; 随后采用 Cox 比例风险回归模型对 DERL1 表达及各临床病理参数进行单因素分析, 再将单因素分析中 $P < 0.05$ 的变量纳入多因素分析, 以确定影响预后的独立因素。

1.6 细胞培养与转染 将 TE-1、KYSE-450 细胞置于含 10%胎牛血清和 1%青-链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 于 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱中传代培养。取对数生长期的细胞铺于 6 孔板中, 贴壁细胞密度达 50%时进行细胞换液。将 10 μL DERL1 siRNA 加入 125 μL 无血清 RPMI-1640 培养基, 将 10 μL Lipofectamine™2000 转染试剂加入 125 μL 无血清 RPMI-1640 培养基中稀释混匀, 静置 5 min 后, 再将稀释后的 siRNA 溶液与稀释后的转染试剂溶液混合 (总体积 270 μL), 静置 20 min 后, 均匀加入 6 孔板中, 继续培养 48 h。

1.7 qRT-PCR 与 Western blot 实验验证转染效率 转染 48 h 后, 提取总 RNA, 试剂盒法去除基因组 DNA 并完成反转录。以 cDNA 为模板, 进行 qPCR 扩增, 以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 DERL1 mRNA 相对表达量。同时收集转染后细胞总蛋白, 经 BCA 法定量后, 进行电泳及转膜 (恒流 250 mA, 45 min), 室温封闭 1 h, 加入 DERL1 及 Actin 一抗 (稀释比例 1:2 000), 4 °C 孵育过夜; 次日, 二抗室温孵育 2 h 后曝光显影。

1.8 CCK-8 法检测细胞增殖活性 将转染 48 h 后的细胞消化计数, 以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 每组设 6 个复孔。接种后连续培养 4 d, 每日于固定时间点进行检测: 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 于 37 °C 孵育 2 h 后, 使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度 (Absorbance, A)。实验独立重复 3 次, 取各时间点复孔 A 值的平均值, 绘制细胞生长曲线, 采用重复测量双因素方差分析进行统计分析, 并采用 Bonferroni 检验进行事后两两比较。

1.9 平板克隆形成实验评估细胞增殖能力 将转染 48 h 后的细胞以每孔 1 000 个的密度接种于 6 孔板中, 每个处理组设 3 个复孔, 在完全培养基中于 37 °C、5%CO₂ 条件下培养 10 d。培养结束后, 弃去培养基, 使用 4%多聚甲醛固定细胞 30 min, PBS 洗涤后用 0.1%结晶紫溶液染色 30 min, PBS 漂洗、晾干后, 对肉眼可见的细胞克隆 (>50 个细胞) 进行计数, 并计

算各组平均克隆形成数。

1.10 Transwell 实验检验细胞迁移能力 将转染 48 h 后的细胞消化、离心(1500 r/min, 5 min)并重悬计数。取含 4×10^5 个细胞的悬液 400 μ L 加入 Transwell 小室(孔径 8 μ m)上室,下室对应加入含 20%FBS 的完全培养基 600 μ L 作为趋化剂。将小室放入 24 孔板,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h。孵育结束后,弃去上、下室液体,将小室置于含 1 mL 4%多聚甲醛的孔中固定 30 min(下室 600 μ L,上室 400 μ L)。PBS 洗涤后,再将小室转移至含 1 mL 0.1%结晶紫染色液的孔中(下室 600 μ L,上室 400 μ L),染色 30 min。染色后用 PBS 洗涤至背景干净,室温晾干。待小室完全干燥后,在光学倒置显微镜下选取 5 个不重叠视野拍照,计数每个视野中穿过膜的细胞数,取平均值作为该组的迁移细胞数。

1.11 多色免疫荧光染色 为在蛋白原位水平验证 DERL1 表达与 T 细胞亚群的相关性,使用上海阔然生物医药科技有限公司的 Kreen 三标免疫荧光试剂盒对包含 27 例 ESCC 样本的组织芯片进行多色免疫荧光染色。染色程序在 Krast 600 全自动染色平台上完成,确保了操作的一致性与可重复性。染色后的切片使用同品牌数字病理扫描仪(型号:KR-HT5)进行全视野数字化扫描成像。

1.12 统计学处理 所有统计学分析均使用 SPSS 27.0 软件完成,绘图使用 GraphPad Prism 10.2.0。计数资料以例数(百分比)表示,组间比较采用卡方检验或 Fisher 精确检验。计量资料符合正态分布时采用均数 $\pm$ 标准差表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验或曼-惠特尼 *U* 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,通过 Log-rank 检验进行组间比较;预后因素分析采用 Cox 比例风险回归模型,并通过对数-对数生存曲线图(log-minus-log plot, LML)检验模型是否满足比例风险(proportional hazards, PH)假设。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 数据库分析结果 通过在线网站对 TCGA 数据库中 24 种癌症类型和匹配正常样本之间的 DERL1 mRNA 表达水平进行了比较分析。泛癌分析显示,DERL1 mRNA 在包括 ESCA 的 15 种类型的癌症中过度表达(图 1)。在中国,ESCC 是主要的组织学亚型,占有食管癌病例的 90%以上^[6],因此本研究重点关注 DERL1 在 ESCC 中的作用。

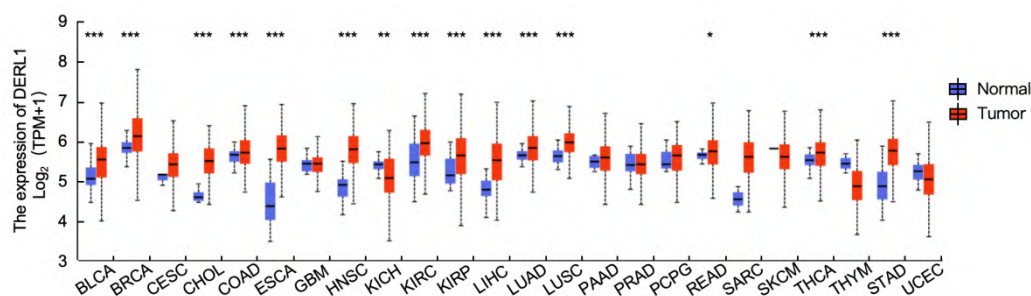


图 1 泛癌分析揭示 *DERL1* mRNA 在多种癌症中高表达

Fig.1 Pan-cancer analysis revealed high expression of *DERL1* mRNA in multiple cancers

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs normal group.

BLCA: Bladder urothelial carcinoma; BRCA: Breast invasive carcinoma; CESC: Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma; CHOL: Cholangiocarcinoma; COAD: Colon adenocarcinoma; ESCA: Esophageal carcinoma; GBM: Glioblastoma multiforme; HNSC: Head and neck squamous cell carcinoma; KICH: Kidney chromophobe; KIRC: Kidney renal clear cell carcinoma; LIHC: Liver hepatocellular carcinoma; LUAD: Lung adenocarcinoma; PAAD: Pancreatic adenocarcinoma; PRAD: Prostate adenocarcinoma; PCPG: Pheochromocytoma and paraganglioma; READ: Rectum adenocarcinoma; SARC: Sarcoma; SKCM: Skin cutaneous melanoma; THCA: Thyroid carcinoma; THYM: Thymoma; STAD: Stomach adenocarcinoma; UCEC: Uterine corpus endometrial carcinoma.

2.2 DERL1 蛋白在 ESCC 及癌旁正常组织中的表达情况 免疫组织化学染色结果显示，在 ESCC 中，DERL1 蛋白主要富集在 ESCC 组织中的胞质，在正常食管上皮中仅基底层及副基底层有微弱表达，ESCC 组织及癌旁正常组织中不同表达强度的代表性图片如图 2A 所示。四级分布的 DERL1 表达（0~1、2~5、6~8、9~12）在相邻的正常组织和 ESCC 组织之间存在显著差异（图 2B）。统计结果显示（图 2C、表 2），ESCC 组织中 DERL1 的蛋白表达明显高于癌旁正常组织（ $\chi^2=217.672$, $P < 0.001$ ）。

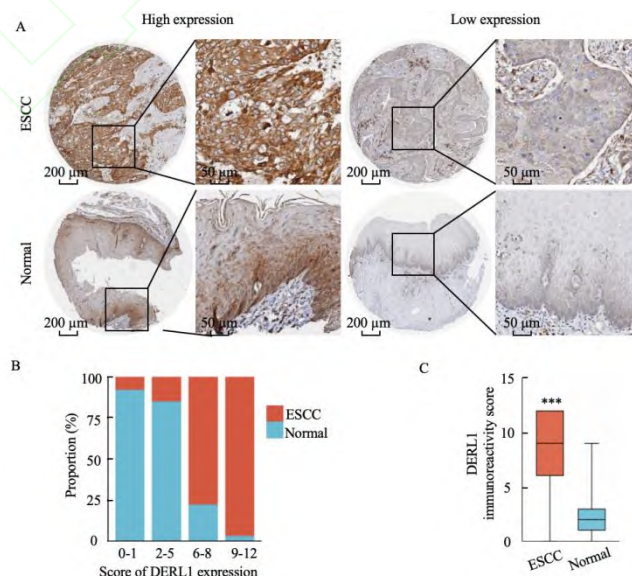


图 2 DERL1 蛋白在 ESCC 组织及癌旁正常组织中的表达与评分

Fig.2 Expression and scoring of DERL1 protein in ESCC tissues and adjacent normal tissues

A: Representative immunohistochemical staining images of high and low DERL1 expression in ESCC tissues and adjacent normal esophageal epithelial tissues (low magnification $\times 40$, high magnification $\times 200$); B: Distribution proportions of the four-grade scoring (0-1, 2-5, 6-8, 9-12) for DERL1 expression in ESCC tissues and adjacent normal tissues; C: Comparison of DERL1 immunohistochemical scores between ESCC tissues and adjacent normal tissues; *** $P < 0.001$ vs normal group.

表 2 ESCC 组织和癌旁正常食管上皮组织 DERL1 蛋白表达情况 $n(\%)$

Tab.2 DERL1 protein expression in ESCC tissues and adjacent normal esophageal epithelial tissues $n(\%)$

Group	n	DERL1		χ^2 value	P value
		Low expression (<6)	High expression (≥ 6)		
ESCC tissue	176	26 (14.8%)	150 (85.2%)	217.672	<0.001
Adjacent normal esophageal epithelial tissue	202	182 (90.1%)	20 (9.9%)		

2.3 DERL1 表达水平对 ESCC 的临床诊断价值评估 为评估 DERL1 蛋白表达对 ESCC 的诊断价值, 进行 ROC 曲线分析。如图 3 所示, DERL1 表达水平区分 ESCC 组织与癌旁正常组织的 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) 高达 0.931 (95%CI: 0.902~0.959)。在约登指数确定的最佳诊断截断值下, 其诊断灵敏度为 90.1%, 特异度为 85.2%。

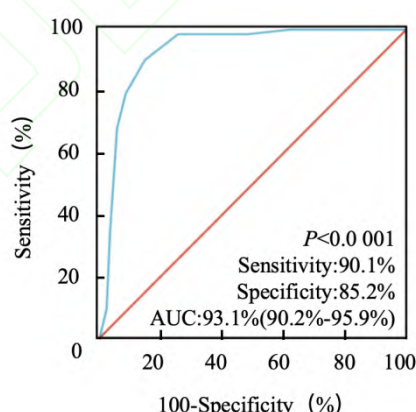


图 3 DERL1 蛋白表达强度识别 ESCC 的 ROC 曲线图

Fig.3 ROC curve of DERL1 protein expression intensity for ESCC identification

2.4 DERL1 蛋白表达与临床病理特征之间的关系 参考 ROC 曲线确定的截断值及免疫组化评分的分布情况, 本研究将患者队列划分为 DERL1 高表达组 (IHC 评分 ≥ 6 , $n=150$) 与低

表达组 (IHC 评分 ≤ 6 , $n=26$)。在本研究队列中, DERL1 高表达普遍存在 (150/176, 85.2%)。分析结果如表 3 所示, DERL1 的表达状态(高/低)与患者性别($P=0.164$)、年龄($P=0.196$)、肿瘤部位($P=0.373$)、分化程度($P=0.902$)、浸润深度($P=0.323$)、淋巴结转移($P=1.000$)以及 TNM 分期($P=0.635$)均未观察到显著的统计学关联。

表 3 ESCC 患者临床病理特征与 DERL1 蛋白表达的相关性分析 $n(\%)$
Tab.3 Analysis of the correlation between clinicopathological characteristics of ESCC patients and DERL1 protein expression $n(\%)$

Group	n	DERL1		χ^2 value	P value
		Low expression (%)	High expression (%)		
Gender				1.939	0.164
Male	122	15 (12.3%)	107 (87.7%)		
Female	54	11 (20.4%)	43 (79.6%)		
Age (years)				1.672	0.196
≤ 60	95	11 (11.6%)	84 (88.4%)		
>60	81	15 (18.5%)	66 (81.5%)		
Tumor location				0.794	0.373
Upper & Middle	149	20 (13.4%)	129 (86.6%)		
Lower	27	6 (22.2%)	21 (77.8%)		
Differentiation status				0.015	0.902
Well + Moderate	147	21 (14.3%)	126 (85.7%)		
Poor	29	5 (17.2%)	24 (82.8%)		
Infiltration depth				0.975	0.323
T1+T2	66	12 (18.2%)	54 (81.8%)		
T3+T4	110	14 (12.7%)	96 (87.3%)		
Lymph node metastasis				0	1.000
No	88	13 (14.8%)	75 (85.2%)		
Yes	88	13 (14.8%)	75 (85.2%)		
TNM stage				0.225	0.635
I + II	94	15 (16.0%)	79 (84.0%)		
III + IV	82	11 (13.4%)	71 (86.6%)		

2.5 DERL1 蛋白表达与食管鳞癌患者预后的关系 对随访信息完整的患者 ($n=101$)，基于 DERL1 表达分组情况评估患者预后差异。Kaplan-Meier 生存分析 (图 4) 的结果显示 ESCC 患者中 DERL1 蛋白高表达的患者生存周期明显低于 DERL1 低表达的患者，且差异具有统计学意义 ($P=0.011$)。为探究影响患者预后的因素，首先进行单因素 Cox 回归分析。结果 (表 4) 显示，TNM 分期 (III+IV 期 vs I+I 期, $HR=1.924$, 95%CI: 1.152~3.212, $P=0.012$) 和 DERL1 蛋白高表达 (High vs Low, $HR=8.758$, 95%CI: 1.174~65.319, $P=0.034$) 与患者的不良总生存期显著相关。在调整 TNM 分期的影响后，DERL1 蛋白高表达仍然是患者总生存期缩短的独立危险因素 ($HR=8.717$, 95%CI: 1.167~65.109, $P=0.035$)。以上结果表明，DERL1 蛋白表达水平是 ESCC 患者独立于其他临床因素的预后指标。

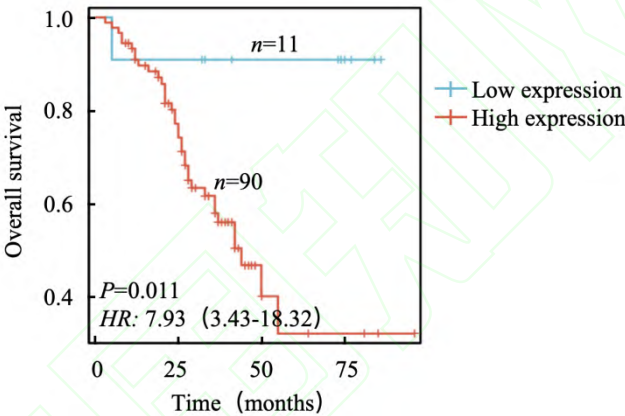


图 4 不同 DERL1 蛋白表达水平 ESCC 患者的生存曲线

Fig.4 Survival curves of ESCC patients with different DERL1 protein expression levels

表 4 ESCC 患者预后的单因素和多因素 Cox 比例风险回归分析

Tab.4 Univariate and multivariate Cox proportional hazards regression analysis of prognosis in ESCC patients

Clinicopathological feature	Univariable analysis		Multivariable analysis	
	HR (95%CI)	P value	HR (95%CI)	P value
Age (≤60 years old vs >60 years old)	1.520 (0.901-2.566)	0.117	-	-
Gender (Male vs Female)	0.869 (0.512-1.476)	0.604	-	-
Location (Up&middle vs Low)	1.873 (0.801-4.378)	0.147	-	-

Differentiation status (Poor vs Well+Moderate)	1.328 (0.703-2.507)	0.382	-	-
Infiltration depth (T3+T4 vs T1+T2)	1.499 (0.895-2.513)	0.124	-	-
Lymph node metastasis (Yes vs No)	1.620 (0.970-2.706)	0.065	-	-
TNM stage (III+IV vs I+II)	1.924 (1.152-3.212)	0.012	1.599 (0.836-3.060)	0.156
DERL1 protein expression (High vs Low)	8.758 (1.174-65.319)	0.034	8.717 (1.167-65.109)	0.035

2.6 在 TE-1、KYSE-450 细胞中成功敲低 *DERL1* 为研究 *DERL1* 的功能，本研究首先构建稳定敲低的细胞模型。在 TE-1 和 KYSE-450 细胞中，针对 *DERL1* 基因设计了 3 条独立的 siRNA 序列（siRNA1、siRNA2、siRNA3）进行转染。转染 48 h 后，通过 qRT-PCR 进行初步筛选。结果显示，与转染阴性对照序列（si-ctrl）的细胞相比，siRNA3 序列最大程度地降低 *DERL1* 的 mRNA 表达水平（TE-1: $t=22.00$, $P<0.001$; KYSE-450: $t=47.29$, $P<0.001$ ）（图 5A）。随后，Western blot 实验在蛋白水平证实了 siRNA3 的高效性（图 5B）。因此，本研究选定 siRNA3 用于后续功能实验。

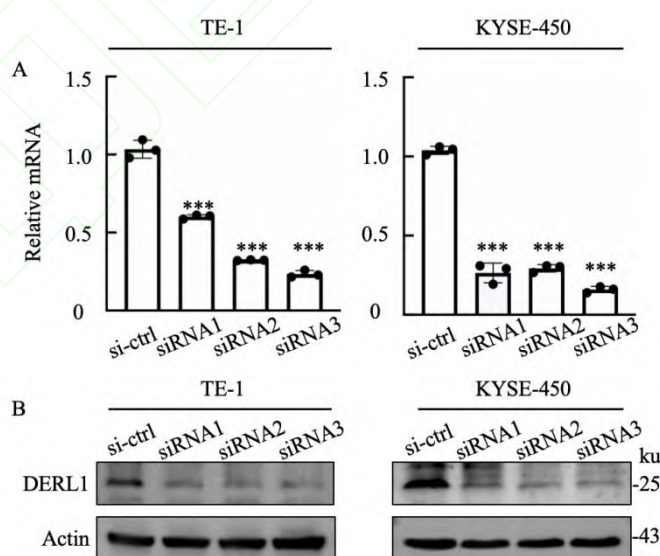


图 5 在 TE-1 和 KYSE-450 细胞中验证 *DERL1* 敲低效率

Fig.5 Validation of *DERL1* knockdown efficiency in TE-1 and KYSE-450 cells

A, B: qRT-PCR and Western blot analyses of *DERL1* mRNA and protein levels in cells

transfected with siRNA; *** $P<0.001$ vs si-ctrl group.

2.7 敲低 *DERL1* 对食管癌细胞增殖活性的影响 为探究 *DERL1* 对食管鳞癌细胞增殖的影响, 在敲低 *DERL1* 的 TE-1、KYSE-450 细胞中进行了 CCK-8 实验 (图 6)。重复测量双因素方差分析显示, *DERL1* 敲低显著抑制了两株细胞的增殖活性, 表现出显著的组别效应 (TE-1: $F=298.00$; KYSE-450: $F=1117.00$; 均 $P<0.001$) 及时间-组别交互效应 (TE-1: $F=35.25$; KYSE-450: $F=317.30$; 均 $P<0.001$)。Bonferroni 事后检验结果显示, 自接种后第 1 天起, si-*DERL1* 组细胞的吸光度 (A 值) 均低于对照组 (TE-1: $P=0.028$; KYSE-450: $P=0.010$), 且在第 2 至 4 天这种生长抑制趋势更加显著 (均 $P<0.001$)。实验结果表明, 敲低 *DERL1* 能有效遏制 ESCC 细胞的体外增殖能力。

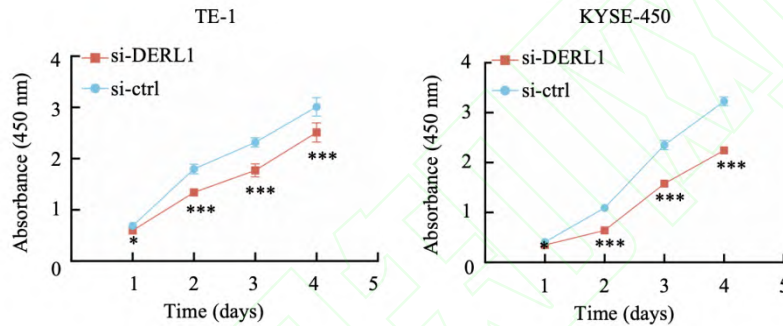


图 6 CCK-8 检测 TE-1 和 KYSE-450 细胞增殖能力

Fig.6 Detection of TE-1 and KYSE-450 cell proliferation ability by CCK-8 assay

* $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs si-ctrl group.

2.8 敲低 *DERL1* 对食管癌细胞迁移能力的影响 Transwell 迁移实验结果显示 (图 7), 与对照组 (si-ctrl) 相比, 敲低 *DERL1* (si-*DERL1*) 明显降低了 TE-1 和 KYSE-450 细胞的迁移能力 (TE-1: $t=6.16$, $P<0.01$; KYSE-450: $t=5.09$, $P<0.01$)。

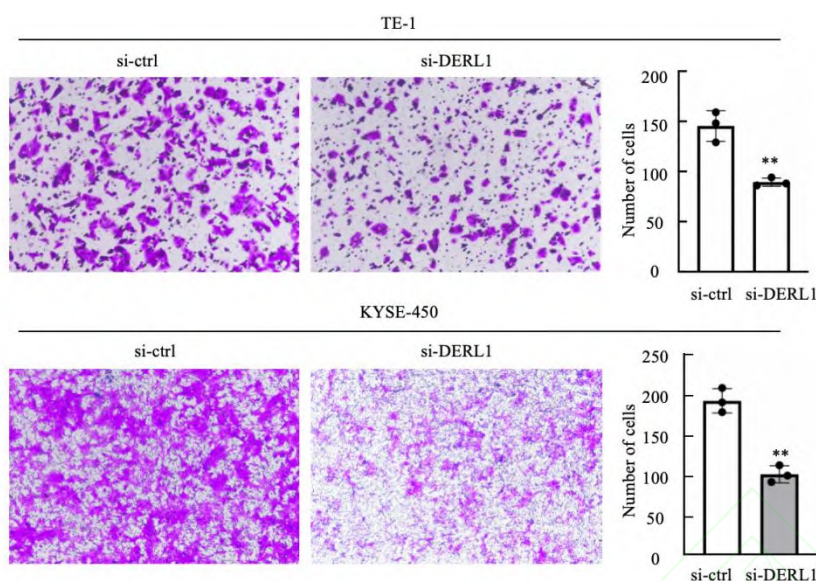


图 7 Transwell 小室实验检测 TE-1 和 KYSE-450 细胞迁移情况 ×200

Fig.7 Detection of TE-1 and KYSE-450 cell migration by Transwell assay ×200

** $P < 0.01$ vs si-ctrl group.

2.9 敲低 *DERL1* 对食管癌细胞克隆形成的影响 平板克隆形成实验结果显示（图 8），与阴性对照组（si-ctrl）相比，敲低 *DERL1*（si-DERL1）显著抑制了 TE-1 及 KYSE-450 细胞的克隆形成能力，差异具有统计学意义（TE-1: $t=19.46$, $P < 0.001$; KYSE-450: $t=6.80$, $P < 0.01$ ）。

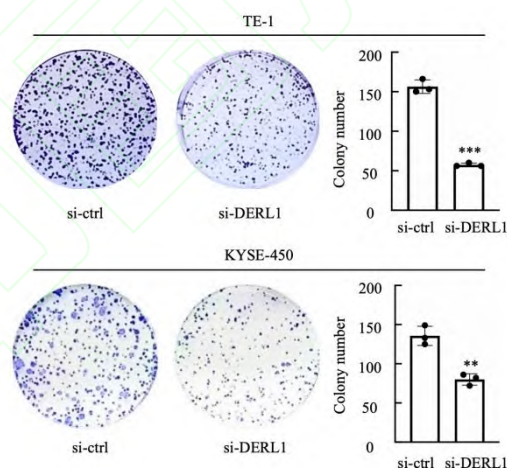


图 8 平板克隆形成实验检测 TE-1 和 KYSE-450 细胞克隆形成情况

Fig.8 Detection of TE-1 and KYSE-450 cell colony formation by plate colony formation assay

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs si-ctrl group.

2.10 *DERL1* 表达与肿瘤免疫微环境的相关性分析 基于 TIMER2.0 数据库分析 *DERL1* 表达与免疫细胞浸润水平的相关性。如图 9 所示，*DERL1* 表达与 M0 巨噬细胞（ $P=0.027$ ）、静息 $CD4^+$ 记忆 T 细胞（ $P=0.028$ ）呈正相关，而与嗜酸性粒细胞（ $P=0.013$ ）、滤泡辅助 T 细

胞 ($P=0.017$)、CD8⁺T 细胞 ($P=0.022$)、单核细胞 ($P=0.047$) 呈负相关。这一预测提示，DERL1 的高表达可能与抑制性的免疫微环境相关。为进一步验证该预测，本研究选取了一个包含 27 例 ESCC 样本的组织芯片，进行 CD4、CD8、DERL1 的多重免疫荧光染色。如图 10 所示，在 DERL1 高表达的癌组织区域，癌巢周围往往浸润较多的 CD4⁺T 细胞，相比之下，具有细胞毒性的 CD8⁺T 细胞在该区域浸润明显稀疏。

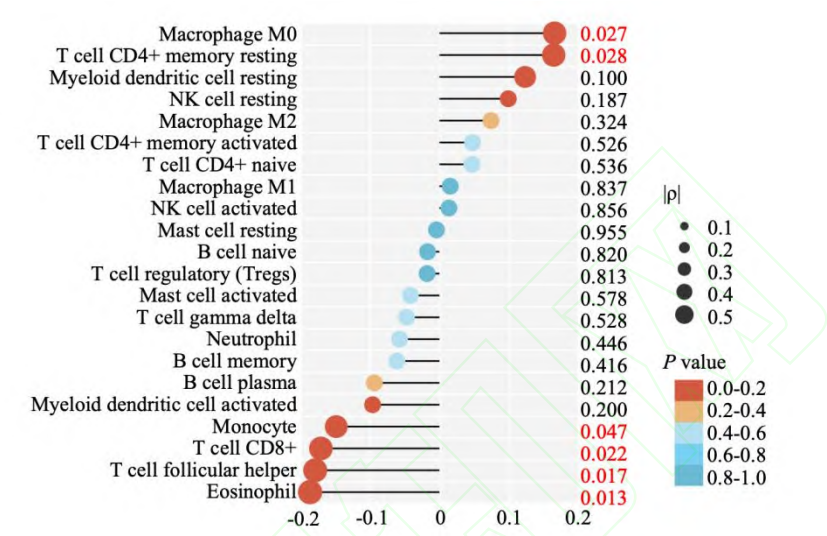


图 9 生信数据库分析 DERL1 与免疫细胞的浸润水平
Fig.9 Analysis of DERL1 and immune cell infiltration levels using bioinformatics databases

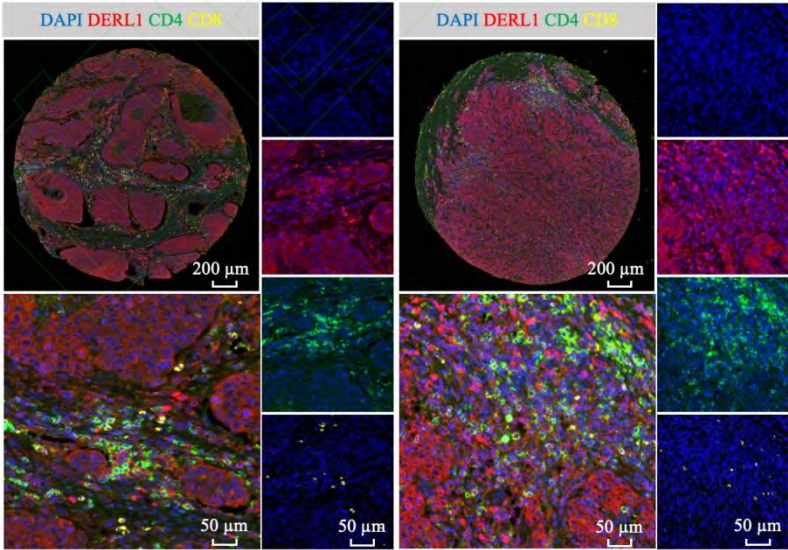


图 10 多色免疫荧光验证 DERL1 表达与 T 细胞空间分布的关系
Fig.10 Validation of the relationship between DERL1 expression and spatial distribution of T cells by multiplex immunofluorescence
low magnification ×40, high magnification ×200
Blue: DAPI; Red: DERL1; Green: CD4; Yellow: CD8.

3 讨论

ESCC 的演进涉及多通路、多层次调控,筛选兼具明确生物学功能与临床转化潜力的关键分子对于精准治疗具有重要意义。本研究系统阐述了 DERL1 在 ESCC 中的表达特征、临床价值、生物学功能及免疫微环境重塑作用。

首先,本研究证实 DERL1 在 ESCC 组织中显著高表达,且具有较高的诊断效能(AUC=0.931)。这与 DERL1 在甲状腺癌^[7]、口腔鳞癌^[8]及葡萄膜黑色素瘤^[9]等多种实体瘤中高表达的模式一致,提示 DERL1 的促癌作用具有一定的普遍性。在生存分析中,DERL1 高表达显示出明显的预后预测价值。虽然低表达组样本量相对偏小($n=11$),导致多因素 Cox 模型中 HR 值置信区间较宽,但在验证比例风险(PH)前提的基础上,模型显示 DERL1 的风险预测效应在随访期间具有良好的稳定性。

然而,在临床病理特征相关性分析中,其表达水平与 TNM 分期、淋巴结转移等指标并未展现出直接的相关性。这一发现与 Zhong et al^[10]在构建乳腺癌预后模型时的结论相似。可能是因为 DERL1 反映的是肿瘤细胞内在的生物学潜能,而在真实人体内,肿瘤的侵袭与分期还受限于周围基质压力、免疫微环境及宿主个体差异等多重因素。作为 ERAD 通路的关键组分,DERL1 可以协助肿瘤细胞抵御微环境中的代谢与低氧压力。这种抗应激能力可能是 DERL1 独立于传统病理指标能够预测不良预后的关键内在因素。研究^[11]表明,DERL1 可通过磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/AKT 信号轴增强细胞的抗应激能力,这使得高表达患者即使在相同分期下,其远期生存风险也显著升高。

此外,本研究的数据提示,DERL1 表达可能与 ESCC 的免疫微环境状态存在关联。生信分析与多色免疫荧光验证结果一致显示:在 DERL1 高表达的癌巢区域,CD8⁺T 细胞的浸润密度相对较低,而 CD4⁺T 细胞虽在癌巢周围存在浸润,但结合生信分析显示的 DERL1 表达与静息 CD4⁺记忆 T 细胞浸润呈正相关($P=0.028$),推测此类 CD4⁺T 细胞可能主要处于静息表型,其抗肿瘤辅助功能可能受限。CD8⁺T 细胞匮乏通常被认为是机体抗肿瘤免疫应答受损的重要标志^[12-13]。这解释了 DERL1 高表达患者生存期缩短的潜在机制。从分子层面推测,DERL1 过表达可能通过未折叠蛋白反应(UPR)通路诱导免疫抑制因子(如 IL-6,IL-23)释放,从而在一定程度上干扰效应 T 细胞的募集与浸润^[14]。

综上所述,本研究的结果提示 DERL1 不仅是 ESCC 的潜在预后标志物,也是干预肿瘤免疫逃逸的潜在靶点。但本研究仍存在一定局限性,首先,生信数据来源于 TCGA 的 ESCA 队列,其涵盖食管癌不同的组织学亚型,数据背景具有一定的异质性;其次,本研究中纳入 Cox 模型的有效终点事件数相对有限,模型参数的稳健性仍需在更大规模、多中心的前瞻性

队列中进一步验证。

参考文献

- [1] Obermannová R, Alsina M, Cervantes A, et al. Oesophageal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2022, 33(10): 992-1004. doi:10.1016/j.annonc.2022.07.003.
- [2] Dong Q Z, Wang Y, Tang Z P, et al. Derlin-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and promotes cancer cell invasion *via* EGFR-ERK-mediated up-regulation of MMP-2 and MMP-9[J]. Am J Pathol, 2013, 182(3): 954-64. doi:10.1016/j.ajpath.2012.11.019.
- [3] Fan J, Tian L, Huang S, et al. Derlin-1 promotes the progression of human hepatocellular carcinoma *via* the activation of AKT pathway[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 5407-17. doi:10.2147/OTT.S222895.
- [4] Zeng J, Tian Q, Zeng Z, et al. Derlin-1 exhibits oncogenic activities and indicates an unfavorable prognosis in breast cancer[J]. Cell Biol Int, 2020, 44(2): 593-602. doi:10.1002/cbin.11259.
- [5] Li D, Shi M, Ji H, et al. microRNA-181d is a tumor suppressor in human esophageal squamous cell carcinoma inversely regulating Derlin-1[J]. Oncol Rep, 2016, 36(4): 2041-8. doi:10.3892/or.2016.5028.
- [6] Yang H, Wang F, Hallemeier C L, et al. Oesophageal cancer[J]. Lancet, 2024, 404(10466): 1991-2005. doi:10.1016/S0140-6736(24)02226-8.
- [7] Dong H, Wu Y L, Zhang X, et al. microRNA-575 targets Derlin 1 to regulate proliferation, migration and invasion of human thyroid cancer cells[J]. Arch Med Sci, 2020, 19(4): 1108-15. doi:10.5114/aoms.2020.92867.
- [8] Shigeishi H, Yokoyama S, Murodumi H, et al. Melatonin enhances cisplatin-induced cell death through inhibition of DERL1 in mesenchymal-like CD44^{high} OSCC cells[J]. J Oral Pathol Med, 2022, 51(3): 281-9. doi:10.1111/jop.13242.
- [9] Hsieh M Y, Chen J R, Tsai P C, et al. Knockdown of derlin-1 represses cellular oncogenic activities in uveal melanoma, enhances its chemosensitivity to cisplatin and reduces cancer stem cell potential[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2025, 22(5): 809-23. doi:10.21873/cgp.20538.

- [10] Zhong Z, Jiang W, Zhang J, et al. Identification and validation of a novel 16-gene prognostic signature for patients with breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 12349. doi:10.1038/s41598-022-16575-8.
- [11] Bai Y, Zhang Z, Bi J, et al. miR-181c-5p/DERL1 pathway controls breast cancer progression mediated by TRAF6-linked K63 ubiquitination of AKT[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 204. doi:10.1186/s12935-024-03395-1.
- [12] Zheng Y, Chen Z, Han Y, et al. Immune suppressive landscape in the human esophageal squamous cell carcinoma microenvironment[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6268. doi:10.1038/s41467-020-20019-0.
- [13] 丁 瑶, 刘 雯, 廖亦然, 等. SQLE 敲除促进黑色素瘤肿瘤微环境 CD8⁺ T 细胞浸润发挥抗肿瘤效应 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(8): 1315-22. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.005.
- Ding Y, Liu W, Liao Y R, et al. Knockout SQLE in melanoma cells potentiates anti-tumor immunity *via* improving CD8⁺ T cell infiltration in tumor microenvironment[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(8): 1315-22. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.005.
- [14] Cubillos-Ruiz J R, Silberman P C, Rutkowski M R, et al. ER stress sensor XBP1 controls anti-tumor immunity by disrupting dendritic cell homeostasis[J]. *Cell*, 2015, 161(7): 1527-38. doi:10.1016/j.cell.2015.05.025.