

- [19] LE GOFF M, CORNEC D, JOUSSE-JOULIN S, et al. Comparison of 2002 AECG and 2016 ACR/EULAR classification criteria and added value of salivary gland ultrasonography in a patient cohort with suspected primary sjögren's syndrome[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 269.
- [20] BUNYA VY, MASSARO-GIORDANO M, VIVINO FB, et al. Prevalence of novel candidate sjögren syndrome autoantibodies in the penn sjögren's international collaborative clinical alliance cohort[J]. Cornea, 2019, 38(12): 1500-1505.
- [21] ISENBERG DA. Systemic lupus erythematosus and sjögren's syndrome: historical perspective and ongoing concerns[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(3): 681-683.
- [22] NOCTURNE G, MARIETTE X. B cells in the pathogenesis of primary sjögren syndrome[J]. Nat Rev Rheumatol, 2018, 14(3): 133-145.
- [23] BRITO-ZERÓN P, KOSTOV B, FRAILE G, et al. Characterization and risk estimate of cancer in patients with primary sjögren syndrome[J]. J Hematol Oncol, 2017, 10(1): 90.
- [24] RAMOS-CASALS M, BRITO-ZERÓN P, BOMBARDIERI S, et al. EULAR recommendations for the management of sjögren's syndrome with topical and systemic therapies[J]. Ann Rheum Dis, 2020, 79(1): 3-18.
- [25] MARIETTE X, CRISWELL LA. Primary sjögren's syndrome[J]. N Engl J Med, 2018, 378(10): 931-939.
- [26] RETAMOZO S, ACAR-DENIZLI N, RASMUSSEN A, et al. Systemic manifestations of primary Sjögren's syndrome out of the ESDAI classification: prevalence and clinical relevance in a large international, multi-ethnic cohort of patients[J]. Clin Exp Rheumatol, 2019, 37 Suppl 118(3): 97-106.
- [27] CORNEC D, DEVAUCHELLE-PENSEC V, MARIETTE X, et al. Severe health-related quality of life impairment in active primary sjögren's syndrome and patient-reported outcomes: data from a large therapeutic trial[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2017, 69(4): 528-535.
- [28] SEROR R, THEANDER E, BOOTSMA H, et al. Outcome measures for primary Sjögren's syndrome: a comprehensive review[J]. J Autoimmun, 2014, 51: 51-56.

(收稿日期:2020-07-10,修回日期:2020-08-09)

引用本文:李静,刘芳.甲氟奎对食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制[J].安徽医药,2021,25(6):1065-1069.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.06.002.

◇ 药学研究 ◇



甲氟奎对食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制

李静,刘芳

作者单位:枣庄矿业集团中心医院肿瘤内科,山东 枣庄277000

摘要: 目的 研究甲氟奎对食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制。方法 运用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测甲氟奎(5、10、15、30 $\mu\text{mol/L}$)对食管鳞癌细胞 KYSE140 的增殖的调控,筛选最适浓度 30 $\mu\text{mol/L}$;用 β 连环素(β -catenin)信号通路激活剂 Wnt3a 或二甲亚砜(DMSO)与 30 $\mu\text{mol/L}$ 甲氟奎共处理 KYSE140 细胞 48 h。Transwell 法检测细胞的迁移和侵袭;蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞中 β -catenin、周期素依赖激酶抑制剂 p21、增殖细胞核抗原(PCNA)、神经钙黏素(N-cadherin)、上皮钙黏素(E-cadherin)的蛋白表达;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞中 β -catenin 的表达。结果 甲氟奎可呈浓度依赖性抑制食管鳞癌细胞 KYSE140 的增殖,最适浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$;在 24、48 和 72 h 时对照组细胞吸光度分别为(0.21±0.02)、(0.52±0.04)、(1.19±0.10),15 $\mu\text{mol/L}$ 甲氟奎组细胞吸光度分别为(0.21±0.01)、(0.34±0.03)、(0.68±0.06);对照组迁移和侵袭细胞数分别为(120±8)个、(80±6)个,甲氟奎组迁移和侵袭细胞数分别为(62±5)个、(45±4)个,甲氟奎可明显的抑制 KYSE140 细胞的增殖、迁移和侵袭,上调 p21、E-cadherin,下调 PCNA、N-cadherin;最重要的是,甲氟奎可明显的抑制 β -catenin 信号通路的关键基因 β -catenin 的表达,且激活 β -catenin 信号通路可逆转甲氟奎对 KYSE140 细胞的增殖、迁移和侵袭的抑制。结论 甲氟奎可抑制食管鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,其机制与抑制 β -catenin 信号通路的活性相关,将可为甲氟奎治疗食管鳞癌提供更充分的依据。

关键词: 食管肿瘤; 甲氟奎; β -catenin 信号通路; 增殖; 迁移; 侵袭

Mechanism of mefloquine regulating proliferation, migration and invasion of esophageal squamous carcinoma cells

LI Jing, LIU Fang

Author Affiliation: Department of Oncology, Zaozhuang Mining Group Central Hospital, Zaozhuang, Shandong 277000, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of mefloquine on proliferation, migration and invasion of esophageal squamous carcinoma cells. **Methods** The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to detect the regulation of mefloquine (5, 10, 15, 30 $\mu\text{mol/L}$) on the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma KYSE140, and the optimal concentration was 30 $\mu\text{mol/L}$. β -catenin signaling pathway activator Wnt3a or dimethyl sulfoxide (DMSO) and 30 $\mu\text{mol/L}$ mefloquine co-treated KYSE140 cells for 48 h. Transwell method was used to detect cell migration and invasion; Western blotting was used to detect the expression levels of β -catenin, cyclin-dependent kinase inhibitor p21, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), neural cadherin (N-cadherin), and epithelial cadherin (E-cadherin). Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was adopted to detect the expression of β -catenin in cells. **Results** Mefloquine inhibited the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma KYSE140 in a concentration-dependent manner. The optimal concentration was 15 $\mu\text{mol/L}$. The $A_{450\text{nm}}$ values of cells in the control group at 24, 48 and 72 h were (0.21 $\pm$ 0.02), (0.52 $\pm$ 0.04), (1.19 $\pm$ 0.10), and the $A_{450\text{nm}}$ values of cells in the 15 $\mu\text{mol/L}$ mefloquine group were: (0.21 $\pm$ 0.01), (0.34 $\pm$ 0.03), (0.68 $\pm$ 0.06). The number of migrant and invasive cells in the control group were (120 $\pm$ 8) and (80 $\pm$ 6), respectively, while the number of migrant and invasive cells in the mefloquine group were (62 $\pm$ 5) and (45 $\pm$ 4). Mefloquine significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of KYSE140 cells, up-regulated p21 and E-cadherin, and down-regulated PCNA and N-cadherin. What was most important is that mefloquine could significantly inhibit the expression of β -catenin, a key gene in the β -catenin signaling pathway, and activation of the β -catenin signaling pathway could reverse the inhibition of proliferation, migration and invasion of KYSE140 cells by mefloquine. **Conclusion** Mefloquine can inhibit the proliferation, migration and invasion of esophageal squamous carcinoma cells, and its mechanism is related to the inhibition of β -catenin signaling pathway, which will provide a more sufficient basis for the treatment of esophageal squamous carcinoma.

Key words: Esophageal neoplasms; Mefloquine; β -catenin signaling pathway; Proliferation; Migration; Invasion

食管鳞癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,其占食管癌的90%以上,其特征是脂肪和骨骼肌质量减少、营养不良^[1-2]。据最新调查显示,食管鳞癌的发病率正逐年升高,尽管近期食管癌的预后有所改善,但仍不能令人满意^[3-4]。因此,开发新的抗癌药物对病人具有重要的治疗价值。甲氟奎是氯喹的衍生物,是治疗疟疾的常用药物之一^[5-6]。甲氟奎在胶质母细胞瘤、乳腺癌中均具有抑制肿瘤进一步恶化的作用,甲氟奎的主要优点是其具有良好的剂量耐受性^[7-9]。于是,我们推测其对食管鳞癌的治疗可能也具有一定的疗效。 β 连环素(β -catenin)是Wnt通路中的关键核心因子,也是 β -catenin信号通路的组成部分,其在人类的多种疾病,包括食管鳞癌中均出现活性异常升高^[10-11],但其是否在甲氟奎对食管鳞癌的影响中发挥作用尚未清楚。本研究于2018年8月至2019年4月拟以食管鳞癌细胞KYSE140为研究对象,观察甲氟奎对食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,揭示其机制与甲氟奎失活 β -catenin信号通路有关,将为甲氟奎抗癌应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 食管鳞癌细胞KYSE140购自ATCC;甲氟奎由Unistin®韩国联合制药提供;DMEM培养基、胎牛血清、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、胰蛋白酶均购自美国Selleck公司;Lipofectamine™2000、BCA蛋白定量试剂盒、逆转录试剂盒购自大连Takara公司;聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)购自德国罗氏诊断有限公司;十二烷基

硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、ECL发光液和RIPA蛋白裂解液均购自碧云天生物技术公司;Matrigel基质胶、Transwell小室购自美国Coming公司;凝胶成像分析仪购自柯达公司;半干转膜仪购自美国BIO-RAD公司;Genesys 10紫外分光光度计购自美国Thermo公司;细胞培养箱购自美国Forma Scientific公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将食管鳞癌细胞KYSE140用含10%胎牛血清的DMEM培养基,置于37℃,5%二氧化碳的恒温培养箱中常规培养,待细胞生长至融合度75%左右,用胰蛋白酶消化约1 min,按照1:3的比例更换培养基,每2天传代1次。

1.2.2 细胞处理与分组 将甲氟奎(5、10、15、30 $\mu\text{mol/L}$)用二甲基亚砜(DMSO)溶解然后用培养基稀释为5、10、15、30 $\mu\text{mol/L}$,分别处理KYSE140细胞24、48、72 h,标记为5 $\mu\text{mol/L}$ 甲氟奎组、10 $\mu\text{mol/L}$ 甲氟奎组、15 $\mu\text{mol/L}$ 甲氟奎组、30 $\mu\text{mol/L}$ 甲氟奎组,筛选最适浓度和作用时间,即15 $\mu\text{mol/L}$ 甲氟奎处理KYSE140细胞48 h,标记为甲氟奎组;以DMSO处理KYSE140细胞48 h,标记为对照组;将 β -catenin信号通路激活剂Wnt3a用DMSO稀释至25 mg/L,处理甲氟奎组细胞24 h,标记为甲氟奎+Wnt3a组,其阴性对照用等量的DMSO处理甲氟奎组细胞24 h,标记为甲氟奎+DMSO组。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖抑制率 对数期的KYSE140细胞以 $10^4/\text{mL}$ 的密度种植于96孔板,按照上述“1.2.2”方法处理,分别于24、48和72 h时每孔

细胞中加浓度为 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L, 孵育 4 h, 然后添加 150 μ L DMSO, 待结晶充分融解, 在 490 nm 波长下检测细胞吸光度(A)。细胞抑制率=(1- $A_{\text{样品}}/A_{\text{对照}}$) $\times$ 100%。

1.2.4 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭 Transwell 迁移实验: 将 Transwell 小室置于 24 孔板上, 平衡 30 min。胰酶消化收集各组 KYSE140 细胞, 用不含血清的 RPMI 1640 培养基重悬细胞, 制成 5×10^5 /mL 的单细胞悬液。取约为 1×10^5 个细胞加入 24 孔板各孔, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 24 h, 棉签擦去上室细胞, 甲醇固定, 结晶紫染液染色。晾干, 于倒置显微镜下观察拍照(400倍), 计数 5 个不同视野细胞数。

Transwell 侵袭实验: 将基质胶和 DMEM 培养基按 1:8 稀释后(60 μ L)铺于培养小室上, 风干后备用, 其他步骤同 Transwell 迁移实验。

1.2.5 蛋白质印迹法检测细胞中 β -catenin、周期素依赖激酶抑制剂 p21、增殖细胞核抗原(PCNA)、神经钙黏素(N-cadherin)、上皮钙黏素(E-cadherin)的蛋白表达 各组 KYSE140 细胞以 RIPA 裂解液于冰上裂解提取总蛋白, BCA 法对蛋白定量。并采用沸水浴致蛋白变性, 目的蛋白采用 SDS-PAGE 电泳分离。湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 4 $^{\circ}$ C 下, 将封闭后的 PVDF 膜放入倍比稀释的一抗中反应过夜, 洗膜, 再在 37 $^{\circ}$ C 下将 PVDF 膜转入倍比稀释的二抗中反应 2 h。于暗室内 ECL 试剂盒显影曝光, 以凝胶成像系统采集图像。Quantity One 4.62 图像分析软件进行条带灰度分析, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白的表达情况。

1.2.6 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞中 β -catenin 的表达 各组 KYSE140 细胞按 RNA 抽提试剂盒说明书提取 RNA, 定量后使用逆转录试剂盒合成互补 DNA(cDNA)。按 qRT-PCR 试剂盒说明书操作检测 miR-550a 表达量。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 用 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{样本}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{处理组}} - (Ct_{\text{样本}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{对照组}}$ 计算 β -catenin 的表达。引物信息: β -catenin, 正向引物 5'-CGCTTCTCGGCTTGCT-3', 反向引物 5'-TCCTCCCTCACAGACTCAT-3'; GAPDH, 正向引物 5'-TCCCTCAAGATTGCTAGCAA-3', 反向引物 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两组比较采用两独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲氟奎对食管鳞癌细胞的抑制作用 结果如

表 1 所示, 与对照组相比, 5 μ mol/L 甲氟奎组、10 μ mol/L 甲氟奎组、15 μ mol/L 甲氟奎组、30 μ mol/L 甲氟奎组细胞的增殖均显著降低; 与 5 μ mol/L 甲氟奎组相比, 10 μ mol/L 甲氟奎组、15 μ mol/L 甲氟奎组、30 μ mol/L 甲氟奎组细胞的增殖均显著降低; 与 10 μ mol/L 甲氟奎组相比, 15 μ mol/L 甲氟奎组、30 μ mol/L 甲氟奎组细胞的增殖均显著降低($P < 0.05$)。可见, 甲氟奎可呈浓度依赖性抑制食管鳞癌细胞的增殖, 且最适浓度为 15 μ mol/L, 故选用该浓度用于后续试验。

表 1 甲氟奎对食管鳞癌细胞增殖的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	24 h	48 h	72 h
对照组	6	0.21 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.04	1.19 $\pm$ 0.10
5 μ mol/L 甲氟奎组	6	0.20 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.09
10 μ mol/L 甲氟奎组	6	0.20 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.03 ^①	0.83 $\pm$ 0.08 ^①
15 μ mol/L 甲氟奎组	6	0.21 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.03 ^{①②}	0.68 $\pm$ 0.06 ^{①②}
30 μ mol/L 甲氟奎组	6	0.20 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.02 ^{①②③}	0.61 $\pm$ 0.06 ^{①②③}
F 值		0.643	52.056	51.833
P 值		0.637	<0.001	<0.001

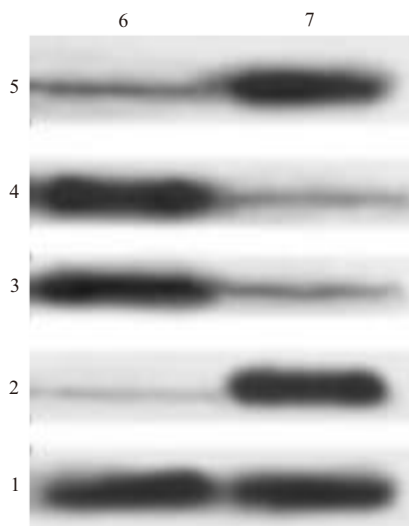
注: ①与对照组比较, $P < 0.05$ 。②与 5 μ mol/L 甲氟奎组比较, $P < 0.05$ 。③与 10 μ mol/L 甲氟奎组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 甲氟奎对食管鳞癌细胞迁移和侵袭的抑制作用 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭, 对照组迁移和侵袭细胞数分别为(120 $\pm$ 8)个、(80 $\pm$ 6)个, 甲氟奎组迁移和侵袭细胞数分别为(62 $\pm$ 5)个、(45 $\pm$ 4)个, 与对照组相比, 甲氟奎组细胞的迁移细胞数显著降低, 侵袭细胞数显著降低($t=15.059$ 、11.889, $P < 0.05$)。

2.3 甲氟奎对食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭相关蛋白表达的影响 结果如图 1 和表 2 所示, 与对照组相比, 甲氟奎组细胞中 p21、E-cadherin 蛋白表达显著升高, PCNA、N-cadherin 蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。

2.4 甲氟奎对食管鳞癌细胞中 β -catenin 信号通路的影响 qRT-PCR 法检测细胞中 β -catenin 的表达, 结果如图 2 所示, 对照组 β -catenin mRNA 和蛋白表达水平分别为(1.00 $\pm$ 0.04)、(1.01 $\pm$ 0.07), 甲氟奎组 β -catenin mRNA 和蛋白表达水平分别为(0.51 $\pm$ 0.05)、(0.34 $\pm$ 0.03), 与对照组相比, 甲氟奎组细胞中 β -catenin 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低($t=18.745$ 、21.550, $P < 0.05$)。

2.5 激活 β -catenin 信号通路逆转了甲氟奎对食管鳞癌细胞增殖、迁移、侵袭的调控 结果如图 3、表 3、表 4 所示, 与甲氟奎+DMSO 组相比, 甲氟奎+Wnt3a 组细胞中 β -catenin 蛋白表达显著升高, 细胞



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—上皮钙黏素(E-cadherin);3—神经钙黏素(N-cadherin);4—增殖细胞核抗原(PCNA);5—周期素依赖激酶抑制剂p21;6—对照组;7—甲氟奎组。

图1 甲氟奎处理的食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭相关蛋白表达

表2 甲氟奎对食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭相关蛋白表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	p21	PCNA	N-cadherin	E-cadherin
对照组	6	1.01±0.06	1.00±0.05	0.99±0.05	1.00±0.07
甲氟奎组	6	1.89±0.14	0.22±0.02	0.19±0.01	1.79±0.09
<i>t</i> 值		14.152	35.479	38.431	16.972
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:p21为周期素依赖激酶抑制剂p21,PCNA为增殖细胞核抗原,N-cadherin为神经钙黏素,E-cadherin为上皮钙黏素。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—β连环素(β-catenin);3—对照组;4—甲氟奎组。

图2 甲氟奎处理的食管鳞癌细胞中β-catenin信号通路关键蛋白的表达

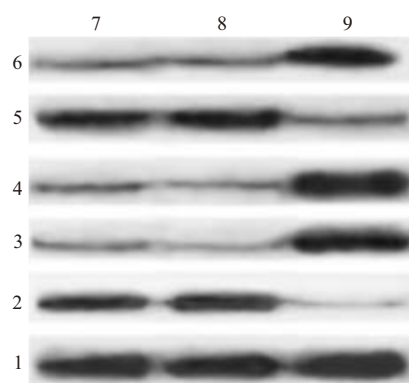
的增殖显著升高,迁移细胞数和侵袭细胞数均显著升高,细胞中p21、E-cadherin蛋白表达显著降低,PCNA、N-cadherin蛋白表达显著升高($P<0.05$)。

表4 激活β-catenin信号通路对甲氟奎调控食管鳞癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	β-catenin	p21	PCNA	N-cadherin	E-cadherin
甲氟奎组	6	65±6	48±3	1.02±0.09	1.00±0.05	0.99±0.07	0.98±0.04	1.01±0.06
甲氟奎+DMSO组	6	63±5	45±4	1.00±0.08	1.01±0.07	1.00±0.05	1.00±0.05	0.99±0.05
甲氟奎+Wnt3a组	6	99±8 ^①	75±6 ^①	2.67±0.24 ^①	0.34±0.03 ^①	1.64±0.09 ^①	1.84±0.18 ^①	0.39±0.03 ^①
<i>F</i> 值		58.94	80.56	489.12	319.74	161.07	118.82	319.20
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:β-catenin为β连环素,p21为周期素依赖激酶抑制剂p21,PCNA为增殖细胞核抗原,N-cadherin为神经钙黏素,E-cadherin为上皮钙黏素。

①与甲氟奎+DMSO组比较, $P<0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—上皮钙黏素(E-cadherin);3—神经钙黏素(N-cadherin);4—增殖细胞核抗原(PCNA);5—周期素依赖激酶抑制剂p21;6—β连环素(β-catenin);7—甲氟奎组;8—甲氟奎+DMSO组;9—甲氟奎+Wnt3a组。

图3 食管癌细胞中的β-catenin信号通路增殖、迁移和侵袭相关蛋白表达

表3 甲氟奎对食管鳞癌细胞增殖的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	24 h	48 h	72 h
甲氟奎组	6	0.21±0.02	0.43±0.04	1.23±0.11
甲氟奎+DMSO组	6	0.21±0.02	0.42±0.03	0.75±0.07
甲氟奎+Wnt3a组	6	0.20±0.01	0.53±0.04 ^①	0.78±0.07 ^①
<i>F</i> 值		0.667	16.244	59.425
<i>P</i> 值		0.528	<0.001	<0.001

注:①与甲氟奎+DMSO组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

尽管医学技术不断发展,食管鳞癌的发病率和病死率仍然很高,因此,寻找高效、低毒的肿瘤治疗药物仍然十分重要。甲氟奎在临床上对耐氯奎恶性疟疾的治疗效果较好,除此之外其在人类的多种肿瘤中也具有抗癌的功效^[12],但是其在食管鳞癌中的功能及机制研究甚少。Xu等^[13]研究报道,甲氟奎可通过阻断结直肠癌细胞中NF-κB信号传导抑制结直肠癌细胞的生长,促进其凋亡,这说明抗疟疾药甲氟奎可单独作为抗癌药在结直肠癌中应用。Xie等^[14]在食管鳞癌的研究中发现,甲氟奎处理食管鳞癌后,线粒体呼吸链中的必需酶SDHC、SDHD、MTCO3和NDUFV3的表达均显著下调,并通过电镜

观察到细胞发生自噬,揭示甲氟奎可通过诱导线粒体发生自噬来抑制食管鳞癌细胞的增殖和异种移植小鼠体内肿瘤的生长。本研究通过MTT法、Transwell小室检测了甲氟奎处理的食管鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭发现,甲氟奎可抑制食管鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,其在食管鳞癌中发挥抑制癌症进一步恶化的作用,这与Xie的研究结果相呼应,再次验证了甲氟奎的抑癌功能,为甲氟奎在癌症中的应用提供理论依据。我们又通过qRT-PCR法、蛋白质印迹法检测了甲氟奎处理的食管鳞癌细胞中 β -catenin信号通路关键因子 β -catenin的表达发现,甲氟奎可明显的抑制食管鳞癌细胞中 β -catenin的表达,失活 β -catenin信号通路的活性。Li等^[15]在肝癌的研究中报道,甲氟奎可抑制小鼠体内肝肿瘤的生长,其机制与抑制 β -catenin信号通路的活性相关。我们推测甲氟奎在食管鳞癌中的功能可能与 β -catenin信号通路的活化程度也具有一定的相关性。

β -catenin信号通路涉及肿瘤的免疫逃避、免疫抑制、免疫监视^[16-18]。Wnt信号传导过程中最重要的是 β -catenin的稳定,导致其核转位和转录因子的激活。大部分肿瘤在Wnt/ β -catenin信号通路的关键调节因子中发生突变。大量研究证实, β -catenin信号通路在食管癌的恶性化进展中具有重要作用^[19]。本研究检测了甲氟奎处理的食管鳞癌细胞中 β -catenin的表达发现,甲氟奎可抑制食管鳞癌细胞中 β -catenin信号通路的活性,这说明甲氟奎可抑制 β -catenin信号通路的活性在食管鳞癌中发挥抗癌功能;进一步研究通过 β -catenin信号通路激活剂和甲氟奎联合处理食管鳞癌细胞发现,激活 β -catenin信号通路可逆转甲氟奎对食管鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭抑制作用,这更充分的说明不仅甲氟奎可抑制 β -catenin信号通路的活性,相反,激活 β -catenin信号通路也可逆转甲氟奎对食管鳞癌的抗癌功能。这些实验结果为甲氟奎在食管鳞癌的治疗中的应用价值提供了充分的理论参考,不足的是,我们没有在动物体内对甲氟奎的功能机制进行验证,这也是本课题下一步的研究计划。

综上所述,甲氟奎可抑制食管鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,其机制与失活 β -catenin信号通路密切相关,为甲氟奎作为抗癌药物治疗食管鳞癌提供理论参考。

参考文献

- [1] LAGERGREN J, SMYTH E, CUNNINGHAM D, et al. Oesophageal cancer[J]. Lancet, 2017, 390(10110): 2383-2396.
- [2] ANANDAVADIVELAN P, LAGERGREN P. Cachexia in pa-

- tients with oesophageal cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13(3): 185-198.
- [3] XIE SH, LAGERGREN J. Risk factors for oesophageal cancer[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2018, 36-37(1): 3-8.
- [4] ZHANG G, WU B, WANG X, et al. Second primary malignancy in patients with esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma [J/OL]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(36): e17083.DOI:10.1097/MD.00000000000017083.
- [5] SOTELO J, BRICEÑO E, LÓPEZ-GONZÁLEZ MA. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme[J]. Ann Intern Med, 2006, 144(5):337-343.
- [6] BRICEÑO E, REYES S, SOTELO J. Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine [J/OL]. Neurosurg Focus, 2003, 14(2):e3.DOI: 10.3171/foc.2003.14.2.4.
- [7] GENG Y, KOHLI L, KLOCKE BJ, et al. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent[J]. Neuro Oncol, 2010, 12(5):473-481.
- [8] SHARMA N, THOMAS S, GOLDEN EB, et al. Inhibition of autophagy and induction of breast cancer cell death by mefloquine, an antimalarial agent[J]. Cancer Lett, 2012, 326(2):143-154.
- [9] TAYLOR WRJ, WHITE NJ. Antimalarial drug toxicity: a review [J]. Drug Saf, 2004, 27(1): 25-61.
- [10] CLEVERS H, NUSSE R. Wnt/ β -catenin signaling and disease [J]. Cell, 2012, 149(6): 1192-1205.
- [11] YANG L, YE Y, CHU J, et al. Long noncoding RNA FEZF1-AS1 promotes the motility of esophageal squamous cell carcinoma through Wnt/ β -catenin pathway[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11(1): 4425-4435.
- [12] YAN KH, YAO CJ, HSIAO CH, et al. Mefloquine exerts anticancer activity in prostate cancer cells via ROS-mediated modulation of Akt, ERK, JNK and AMPK signaling[J]. Oncol Lett, 2013, 5(5): 1541-1545.
- [13] XU X, WANG J, HAN K, et al. Antimalarial drug mefloquine inhibits nuclear factor kappa B signaling and induces apoptosis in colorectal cancer cells[J]. Cancer Sci, 2018, 109(4): 1220-1229.
- [14] XIE YF, ZHANG J, ZHAO JM, et al. Mefloquine inhibited esophageal squamous cells carcinoma proliferation by induction of mitochondrial autophagy[J]. E Bio Med, 2019, 19(7): 41-41.
- [15] LI YH, YANG SL, ZHANG GF, et al. Mefloquine targets β -catenin pathway and thus can play a role in the treatment of liver cancer[J]. Microb Pathog, 2018, 118(1): 357-360.
- [16] SPRANGER S, BAO R, GAJEWSKI TF. Melanoma-intrinsic beta-catenin signalling prevents anti-tumour immunity [J]. Nature, 2015, 523(7559): 231-235.
- [17] HONG Y, MANOHARAN I, SURYAWANSHI A, et al. beta-Catenin promotes regulatory T-cell responses in tumors by inducing vitamin A metabolism in dendritic cells [J]. Cancer Res, 2015, 75(4): 656-665.
- [18] AUGUSTIN I, DEWI DL, HUNDSHAMMER J, et al. Immune cell recruitment in teratomas is impaired by increased Wnt secretion[J]. Stem cell Res, 2016, 17(3): 607-615.
- [19] 胡艳萍, 吴林林, 刘辉, 等. β -Catenin在食管鳞状细胞癌中的表达及相关临床因素分析[J]. 中国医刊, 2018, 53(12): 1367-1370.

(收稿日期:2019-08-26,修回日期:2019-10-09)