

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.009

Claudin-2 蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其对 KYSE450 细胞恶性生物学行为的影响

尚晋文, 贾培君, 张丽亚, 张成娟(郑州大学附属肿瘤医院暨河南省肿瘤医院 生物样本中心, 河南 郑州 450003)

[摘要] **目的:** 分析 Claudin-2 蛋白在食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中的表达及其与患者临床病理特征、5年生存率的关系,探索其对 ESCC 细胞 KYSE450 的增殖、迁移和侵袭的影响。**方法:** 选取河南省肿瘤医院 2010 至 2013 年间初治的 ESCC 患者手术切除肿瘤组织 52 例及其中 20 例对应的癌旁组织标本,采用免疫组化和 WB 法检测 Claudin-2 的表达并分析其与患者临床病理特征和 5 年生存率的关系。WB 法检测 ESCC 细胞(KYSE450、KYSE150、KYSE510、KYSE140)和人永生食管上皮细胞 SHEE 中 Claudin-2 的表达,构建 Claudin-2 shRNA 慢病毒载体并转染 KYSE450 细胞构建敲低 Claudin-2 表达的细胞系,进一步通过克隆形成实验、细胞划痕实验及 Transwell 实验检测敲低 Claudin-2 对 KYSE450 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**结果:** ESCC 组织中 Claudin-2 阳性率显著高于癌旁组织($P<0.05$), ESCC 组织中 Claudin-2 的表达与淋巴结转移有关($P<0.05$)。Claudin-2 表达阳性患者 5 年生存率显著低于阴性者($P<0.05$)。成功构建敲低 Claudin-2 表达的 KYSE450 细胞系。sh-Claudin-2 组细胞的克隆形成数、伤口愈合率和侵袭细胞数均显著低于 sh-NT 组和对照组($P<0.05$)。**结论:** ESCC 组织中 Claudin-2 的表达高于癌旁组织,且与患者 5 年生存率呈负相关, Claudin-2 能够增强 KYSE450 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

[关键词] 食管鳞癌; Claudin-2; KYSE450 细胞; 增殖; 侵袭

[中图分类号] R735.1; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)05-0482-07

Expression of Claudin-2 in human esophageal squamous cell carcinoma tissues and its effect on the malignant biological behaviors of KYSE450 cells

SHANG Jinwen, JIA Peijun, ZHANG Liya, ZHANG Chengjuan (Center of Bio-Repository, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the expression of Claudin-2 in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues and its relationship with clinicopathological characteristics and 5-year survival rate of ESCC patients, and to explore its effect on proliferation, migration and invasion of ESCC KYSE450 cells. **Methods:** A total of 52 cases of tumor tissues and 20 cases of corresponding paracancerous tissues that surgically removed from ESCC patients who were primarily treated in Henan Cancer Hospital from 2010 to 2013 were collected for this study. Claudin-2 expression was analyzed by Immunohistochemistry and WB assay, and its relationship with clinicopathological characteristics and 5-year survival rate of ESCC patients was further investigated. The expression of Claudin-2 in ESCC cells (KYSE450, KYSE150, KYSE510 and KYSE140) and human immortalized esophageal epithelial SHEE cells was detected by WB assay. The Claudin-2 shRNA lentiviral vector was established and transfected into KYSE450 cells to establish a Claudin-2 knockdown cell line. Furthermore, the effects of knockdown of Claudin-2 on the proliferation, migration and invasion of KYSE450 cells were tested by clone formation experiment, cell scratch experiment and Transwell experiment. **Results:** The positive rate of Claudin-2 in ESCC tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P<0.05$). The expression of Claudin-2 in ESCC tissues was related to lymph node metastasis ($P<0.05$). The 5-year survival rate of Claudin-2 positive patients was significantly lower than that of negative patients ($P<0.05$). The KYSE450 cell line with Claudin-2 knockdown was successfully constructed. The number of clone formation, wound healing rate and number of invaded cells in the sh-Claudin-2 group were significantly lower than those in the sh-NT group and the control group (all $P<0.05$). **Conclusion:** The expression level of Claudin-2 in ESCC tissues is higher than that of the tumor-adjacent tissues, and is negatively related with 5-year survival rate of ESCC patients. Claudin-2 can promote the proliferation,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81602637);河南省重点研发与推广专项资助项目(No. 202102310089)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81602637), and the Key R&D and Promotion Projects of Henan Province (No.202102310089)

[作者简介] 尚晋文(1994-),女,硕士生,住院医师,主要从事消化道肿瘤相关研究, E-mail:448338129@qq.com

[通信作者] 张成娟(ZHANG Chengjuan, corresponding author),女,博士,副主任医师,硕士生导师,主要从事生物样本中心的建设和肿瘤化学预防及靶向治疗相关研究, E-mail:zcj2016@126.com

migration and invasion of ESCC cells.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); Claudin-2; KYSE450 cell; proliferation; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(5): 482-488. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.009]

在中国,食管癌发病率位列常见癌症的第六位,5年总生存率很低(2012—2015年为30.3%)^[1],病死率较高(2015年为13.68/10万)^[2]。食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是食管癌最常见的分型,主要发生于亚洲及非洲的发展中国家^[3],明确ESCC发生发展的相关机制,寻找其在发生、侵袭、转移过程中的分子标志物,对于ESCC的早期诊断、改善患者预后非常重要。Claudin蛋白是一种细胞间黏附分子,位于上皮细胞间紧密连接(tight junction, TJ)处,是TJ发挥细胞旁屏障及细胞旁通道功能的组成分子之一^[4]。Claudin和TJ其他蛋白丢失会引起细胞黏附丧失并导致细胞屏障功能受损,这被认为是癌症的发生发展及转移过程中的重要一步^[5]。已发现Claudins与肿瘤的发生、淋巴结转移、预后都有着密切的关系^[6-9]。Claudin家族由27个成员组成,这些成员均为具有4个穿膜结构域的蛋白,但其细胞外区域各不相同,在TJ发挥细胞旁屏障及细胞旁通道功能中的作用各异^[4]。Claudin-2参与形成细胞旁的水通道,介导上皮细胞旁水转运^[9-10],其表达于正常肾、肝、胰腺、小肠等^[11],在结直肠癌^[12]、肺腺癌^[13]中表达增加,而在骨肉瘤^[14]、前列腺癌^[15]中表达减少。ABU-FARSAKH等^[16]发现,Claudin-2高表达于食管腺癌和鳞癌,在食管黏膜化生、异型增生和癌的发生和发展中有作用,未发现食管腺癌和鳞癌的Claudin-2表达与患者年龄、性别、分级、分期和患者生存时间相关。本研究分析ESCC组织中Claudin-2表达及其与临床病理特征的关系,并探讨Claudin-2表达对ESCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

1 资料与方法

1.1 样本、细胞及试剂

1.1.1 样本资料 选取河南省肿瘤医院2010至2013年间初治的ESCC患者手术切除肿瘤组织52例及其中20例对应的癌旁组织标本。入组病例术前均未接受过放化疗,病理学诊断均经过两名病理科医生诊断后确诊,患者年龄中位数为65岁。通过复诊和电话等方式随访至2018年9月,中位随访时间为63个月。研究方案经河南省肿瘤医院伦理委员会批准和许可。本研究已获得所有患者及家属知情同意,并签署知情同意书。

1.1.2 细胞及试剂 人ESCC细胞KYSE-510、KYSE140、KYSE150、KYSE450,人永生食管上皮细胞SHEE,293T细胞、慢病毒载体pshRNA-EF1-

EGFP-P2A-Puro均由中美(荷美尔)肿瘤研究院保存。细胞用含10%FBS的DMEM(KYSE150、KYSE510、KYSE140)或RPMI 1640(KYSE450、293T)或M199(SHEE)培养基于5% CO₂、37 °C恒温加湿培养箱中培养。1640培养基、DMEM培养基均购自以色列BI公司,M199购自Gibco公司,Lipofectamine 2000转染试剂、Transwell小室均购自Sigma-Aldrich公司,Matrigel基质胶购自美国Corning公司,胰蛋白酶、蛋白裂解液、BCA蛋白定量试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司,ECL发光液购自上海碧云天生物技术有限公司,兔抗Claudin-2抗体和HRP标记二抗均购自英国Abcam公司。

1.2 免疫组化染色检测Claudin-2在ESCC组织中的表达

ESCC及癌旁组织标本用4%多聚甲醛于室温下固定25 min,经常规石蜡包埋、切片。用2%牛血清白蛋白封闭30 min,加入兔抗Claudin-2抗体(1:500稀释)室温孵育2 h,PBS洗涤,加入HRP标记二抗(1:1 000)室温孵育1.5 h,加入二氨基联苯胺显色。

Claudin-2表达情况用染色指数评估,归纳为阴性(-)、弱阳性(+)、阳性(++)、强阳性(+++)三类,染色指数依次为0、1~2、3~4、5~6。染色指数=染色强度评分+染色细胞评分。染色强度评分:0分(阴性),1或2分(中等染色),3或4分(强染色);染色细胞评分:0分(无染色细胞),1分(10%~60%阳性细胞),2分(超过60%阳性细胞)。染色强度及染色细胞评分由两名病理医师双盲独立评估。

1.3 构建Claudin-2 shRNA慢病毒载体

设计并选定Claudin-2 shRNA的靶序列5'-GCAGTGATAAAGGAGGCATTT-3',插入慢病毒载体pshRNA-EF1-EGFP-P2A-Puro的寡核苷酸由上海生工合成。寡核苷酸序列:正义链5'-CCGGCCAGAGAAATCGCTCCAACACTACTCGAGTAGTTGGAGCGATTCTCTGGTTTTTG-3',反义链5'-AATTCAA AACCAGAGAAATCGCTCCAACACTACTCGAGTAGT TGGAGCGATTCTCTGG-3'。用Age I-HF和EcoR I消化pshRNA-EF1-EGFP-P2A-Puro获取的凝胶纯化消化载体,和合成的寡核苷酸连接,经酶切和测序证实Claudin-2 shRNA慢病毒载体pshRNA-EF1-EGFP-P2A-Puro构建成功。

1.4 Claudin-2 shRNA慢病毒载体感染KYSE450细胞 以Lipofectamine 2000分别瞬时转染Claudin-2 shRNA慢病毒载体或空载体(sh-NT)于293T细胞

48 h后,用0.22 μm孔径滤器过滤,获取培养基含慢病毒颗粒的上清液。上清液分别加入KYSE450细胞培养基中,设为sh-Claudin-2组和sh-NT组,24 h后,用含1 μg/ml嘌呤霉素的正常培养基筛选72 h,荧光显微镜下能够发出绿色荧光的细胞即转染成功的细胞。

1.5 WB法检测Claudin-2蛋白在ESCC组织和细胞中的表达水平

分别抽提5例ESCC患者的癌及癌旁组织、人ESCC细胞(KYSE150、KYSE510、KYSE140、KYSE450)、人永生食管上皮细胞SHEE、sh-Claudin-2组和sh-NT组细胞的总蛋白,用BCA法制作标准曲线测定浓度。行10%SDS-PAGE,转膜,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入兔抗Claudin-2抗体(1:500),4 °C过夜孵育,加入HRP标记二抗(1:5 000)室温孵育1 h,ECL发光液曝光显影。

1.6 克隆形成实验、划痕实验和Transwell侵袭实验检测敲低Claudin-2表达对KYSE450细胞的增殖、迁移及侵袭能力的影响

取培养至对数期的KYSE450、sh-Claudin-2组和sh-NT组细胞,以KYSE450为对照组,进行克隆实验、划痕实验和Transwell侵袭实验测定细胞的增殖、迁移及侵袭。克隆实验:将细胞以200个/孔接种于6孔板中培养1周,3.7%甲醛固定,吉姆萨染液染色,计细胞克隆数。划痕实验:在长满细胞的培养板上用200 μl枪头按照标记位置进行划痕,显微镜下观察培养0、24、48 h时划痕闭合情况。Transwell实验:收取细胞悬浮于无FBS的1640培养液成悬液(2×10⁵个/ml),加入提前铺好Matrigel基质胶的小室,下室加入含10%FBS的1640培养液,培养24 h,PBS洗涤,95%乙醇固定,吉姆萨染液染色,在显微镜下计数膜下室侧细胞。

1.7 统计学处理

采用SPSS 25.0软件分析。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料用率或百分比表示。采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法对Claudin-2表达水平与临床病理特征的关系进行分析,用Kaplan-Meier方法

及Log-Rank检验分析比较Claudin-2表达与ESCC患者5年生存之间的关系,COX比例风险回归单因素和多因素分析影响ESCC预后的危险因素,采用单因素方差分析比较人ESCC细胞和人永生食管上皮细胞SHEE的Claudin-2表达以及sh-Claudin-2组、sh-NT组与空白对照组细胞之间增殖、迁移和侵袭能力的差异。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Claudin-2在ESCC组织中呈高表达

免疫组化染色结果(图1)显示,癌旁组织和ESCC组织中均有Claudin-2表达,ESCC组织中Claudin-2阳性表达率(71.20%)显著高于癌旁正常组织(40.00%, $P < 0.05$)(表1, $\chi^2 = 8.405, P = 0.015$)。WB检测结果(图2)显示,Claudin-2在ESCC组织表达高于癌旁组织。

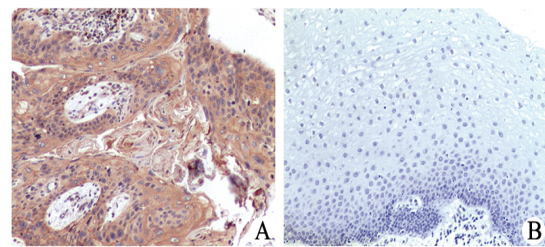


图1 ESCC组织(A)和癌旁组织(B)Claudin-2表达的免疫组化检测(×200)

Fig.1 Immunohistochemical staining of Claudin-2 in ESCC tissues (A) and adjacent tissues (B) (×200)

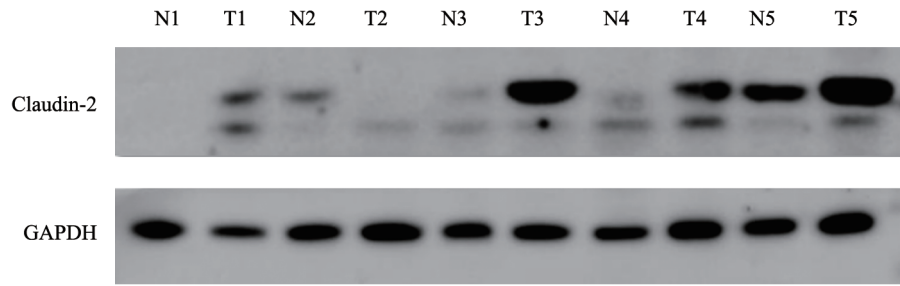
2.2 ESCC组织中Claudin-2的表达水平与患者淋巴结转移相关

52例患者的临床病理特征不同,ESCC组织Claudin-2表达也有差别。 χ^2 检验和Fisher精确检验结果(表2)显示,ESCC组织Claudin-2表达情况与淋巴结转移相关($P < 0.05$),与性别、年龄、吸烟史、饮酒史、分化程度、肿瘤位置、TNM分期未显现统计学相关性($P > 0.05$)。

表1 Claudin-2在ESCC组织及癌旁组织表达情况

Tab.1 The expression of claudin2 in ESCC tissues and adjacent tissues

Claudin-2	Negativity (n)	Positivity		Total	Positivity rate
		+	++		
Normal tissue (N)	12	8	0	20	40.00%
Tumor tissue (T)	15	28	9	52	71.20%



N: Adjacent tissue; T: Tumor tissue

图2 WB法检测 Claudin-2 在 ESCC 组织和癌旁组织中的表达 (n=5)

Fig.2 Expression of Claudin-2 in ESCC tissues and adjacent tissues detected by WB assay (n=5)

表2 52例 ESCC 患者临床特征与 Claudin-2 表达的关系 (N=52)

Tab.2 The correlation between the Claudin-2 expression and clinical characteristics (N=52)

Characteristic	Case [n (%)]		Claudin-2 expression	
	Negativity	Positivity	χ^2	P
Gender			0.514	0.474
Male	12 (80.0)	26 (70.3)		
Female	3 (20.0)	11 (29.7)		
Age (t/a)*			0.335	0.563
≤50	2 (13.3)	3 (8.1)		
>50	13 (86.7)	34 (91.9)		
Sites ^a			1.656	0.482
Upper	11 (73.4)	20 (54.1)		
Middle	2 (13.3)	9 (24.3)		
Lower	2 (13.3)	8 (21.6)		
Differentiation ^b			2.508	0.291
High	4 (26.7)	4 (10.9)		
Middle	7 (46.6)	17 (45.9)		
Low	4 (26.7)	16 (43.2)		
Tumor size (d/cm)			3.036	0.081
≤5	3 (20.0)	17 (45.9)		
>5	12 (80.0)	20 (54.1)		
TNM			0.435	0.509
I-II	10 (66.7)	21 (56.8)		
III-IV	5 (33.3)	16 (43.2)		
LYM			7.241	0.044
N0	11 (73.3)	22 (59.5)		
N1	3 (20.0)	9 (24.3)		
N2	0	6 (16.2)		
N3	1 (6.7)	0		
Smoking			1.201	0.273
Yes	6 (40.0)	21 (56.8)		
No	9 (60.0)	16 (43.2)		
Drinking			0.001	0.979
Yes	4 (26.7)	10 (27.0)		
No	11 (73.3)	27 (73.0)		

*Fisher exact test; a: Locations were separated as follows: Upper, including cervical esophagus and upper thoracic esophagus; middle, middle thoracic esophagus; lower, lower thoracic esophagus including abdominal esophagus. b: The degree of differentiation is defined as follows: High: The differentiation of cancer cells in tumors is closer to normal cells; Low: Tumor cells in tumors are poorly differentiated, extremely immature, or apparently abnormal to normal cells, but still retain traces of some source tissues; Middle: The boundary between high and low differentiated

2.3 ESCC 患者 5 年生存率与 Claudin-2 的表达呈负相关

所有患者的中位生存时间为 23 个月, 5 年生存病例为 23 例, 5 年生存率为 44.2%。ESCC 组织 Claudin-2 阴性表达组 15 例, 中位生存时间为 62.5 个月, 5 年生存病例为 11 例, 5 年生存率为 73.3%。Claudin-2 阳性表达组 37 例, 中位生存时间为 23 个月, 5 年生存病例为 12 例, 5 年生存率为 32.4%。Kaplan-Meier 生存分析及 Log-Rank 检验结果 (图 3) 显示, Claudin-2 表达阳性组患者 5 年生存率显著低于 Claudin-2 表达阴性组 ($\chi^2=6.513, P=0.011$)。

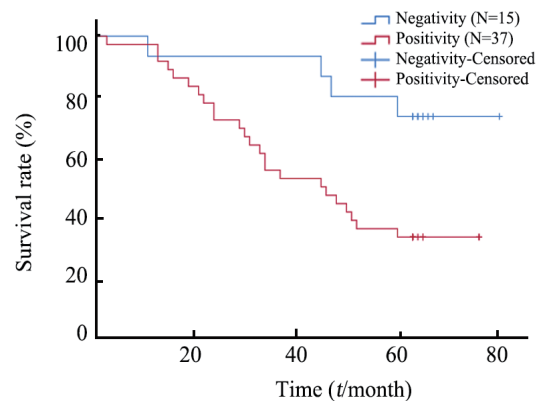


图3 Kaplan-Meier 分析 Claudin-2 表达与 ESCC 患者 5 年生存率的关系

Fig.3 Kaplan-Meier analysis of Claudin-2 expression and 5-year survival rate of ESCC patients

COX 比例风险回归单因素分析结果 (表 3) 显示, 年龄、肿瘤大小、吸烟史、饮酒史、TNM 分期与患者的 5 年生存无显著相关性 (均 $P>0.05$), 而性别、淋巴结转移、分化程度、肿瘤位置、Claudin-2 是影响 ESCC 患者 5 年生存的危险因素 (均 $P<0.05$)。排除混杂因素, COX 比例风险回归多因素分析结果 (表 4) 显示, 分化程度、Claudin-2 表达为 ESCC 患者 5 年生存独立的危险因素 (均 $P<0.05$)。

表3 52例ESCC患者5年生存单因素方差分析

Tab.3 Univariate analysis of variance for 5-year survival in 52 ESCC patients

Characteristic	B	HR	Wald	95% CI	P
Gender	-1.326	0.613	4.675	0.08-0.883	0.031
Age	0.5	0.734	0.465	0.391-6.951	0.496
Site	0.6	0.216	7.741	1.194-2.781	0.005
Differentiation	1.034	0.318	10.562	1.507-5.243	0.001
Tumor size	0.27	0.382	0.498	0.619-2.77	0.481
TNM	0.363	0.34	1.141	0.738-2.8	0.89
LYM	0.42	0.202	4.33	1.025-2.26	0.037
Smoking	0.067	0.382	0.03	0.505-2.26	0.862
Drinking	0.386	0.405	0.908	0.665-3.256	0.341
Claudin-2	-1.288	0.542	5.643	0.095-0.798	0.018

表4 Claudin-2与5年生存多因素方差分析

Tab.4 Multivariate analysis of variance for 5-year survival and Claudin-2

Characteristic	B	HR	Wald	95% CI	P
Gender	-1.082	0.342	2.614	0.091-1.258	0.106
Site	-0.382	1.696	0.411	0.213-2.193	0.522
Differentiation	0.926	2.605	5.631	1.175-5.425	0.018
LYM	-0.049	0.929	0.034	0.567-1.601	0.853
Claudin-2	1.301	3.729	5.234	1.205-11.193	0.022

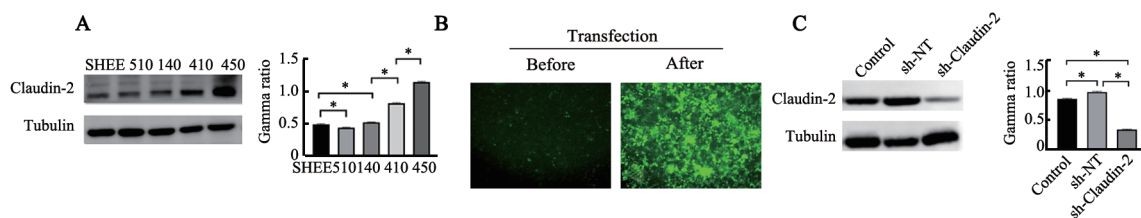
2.4 成功构建敲降 Claudin-2 表达的 ESCC 细胞 sh-claudin-2 KYSE450

2.4.1 KYSE450 细胞高表达 Claudin-2 WB 检测 ESCC 细胞(KYSE450、KYSE150、KYSE510、KYSE140)和人永生食管上皮细胞 SHEE 中 Claudin-2 的表达水平, 结果(图4A)显示, KYSE450 细胞 Claudin-2 的表达水平显著高于其他细胞($P<0.05$)。

2.4.2 Claudin-2 shRNA 慢病毒载体成功感染 KYSE450 细胞 经 293T 细胞包装后的 Claudin-2

shRNA 慢病毒感染 KYSE450 细胞 3 d 后, 荧光显微镜观察发现, sh-claudin2 组和 sh-NT 组细胞均有绿色荧光, 经含浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素培养基筛选终止时, 有绿色荧光的细胞占至 80% 以上(图4B)。

2.4.3 sh-Claudin-2 KYSE450 细胞的 Claudin-2 表达降低 WB 检测结果(图4C)显示, sh-Claudin-2 组细胞的 Claudin-2 表达显著低于 sh-NT 组和对照组(均 $P<0.05$), 提示成功敲降 sh-Claudin-2 KYSE450 细胞中的 Claudin-2 表达。



* $P<0.05$

A: Claudin-2 was highly expressed in ESCC cells KYSE450; B: The cells infected with lentivirus were cultured and screened successfully with 1 $\mu\text{g/ml}$ purinomycin; C: Claudin-2 expression was decreased in sh-Claudin-2 KYSE450 cells

图4 成功建立敲降 Claudin-2 表达的 ESCC 细胞 sh-Claudin-2 KYSE450

Fig.4 ESCC cell line sh-Claudin2 KYSE450 with successful Claudin-2 knockdown

2.5 敲降 Claudin-2 抑制 KYSE450 细胞的增殖、迁移和侵袭

克隆形成实验结果(图5)显示, sh-Claudin-2 组

KYSE450 细胞形成的克隆数显著低于 sh-NT 组和对照组[(44.00 \pm 9.54) vs (167.33 \pm 6.66)、(167.00 \pm 3.00)个, 均 $P<0.05$]。划痕实验结果(图6)显示, sh-Claudin-2

组细胞伤口愈合率显著低于 sh-NT 组和空白对照组 [(23.33±5.77)% vs (51.33±8.08)%、(54.17±7.22)%，均 $P<0.05$]。Transwell 实验结果 (图 7) 显示, sh-Claudin-2 组的侵袭细胞少于 sh-NT 组和空白对照组 [(61.67±7.64) vs (134.00±5.29)、(134.00±6.25) 个, 均 $P<0.05$]。

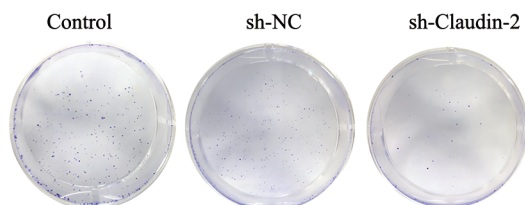


图5 敲降 Claudin-2 抑制 KYSE450 细胞的克隆形成能力
Fig.5 Knockdown of Claudin-2 inhibited the clone formation ability of KYSE450 cells

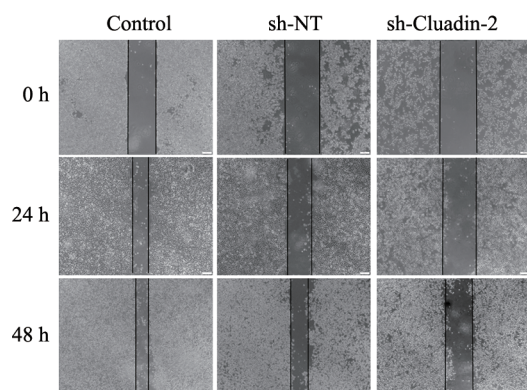


图6 敲降 Claudin-2 抑制 KYSE450 细胞的迁移能力
Fig.6 Knockdown of Claudin-2 inhibited the migration ability of KYSE450 cells

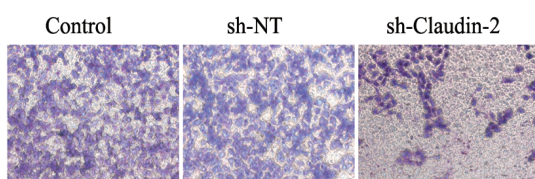


图7 敲降 Claudin-2 抑制 KYSE450 细胞的侵袭能力
Fig.7 Knockdown of Claudin-2 inhibited the invasion ability of KYSE450 cells

3 讨论

本研究发现 Claudin-2 在 ESCC 组织中的表达高于癌旁组织, 与以往报道的 Claudin-2 在结直肠癌^[11]、肺腺癌^[12]、食管腺癌和 ESCC^[15]等组织中呈高表达的结果相一致。本研究发现 Claudin-2 表达与淋巴结转移相关, 与 ESCC 患者 5 年生存率呈负相关, 提示 Claudin-2 高表达与 ESCC 的预后不良相关。

本研究进一步探讨了 Claudin-2 可能参与的

ESCC 预后不良相关生物学行为。本研究发现 Claudin-2 在 KYSE450 中高表达。敲降 KYSE450 细胞中 Claudin-2 的表达后发现, 细胞的增殖、迁移和侵袭受到抑制。由此推测, Claudin-2 在 ESCC 的发生发展过程中起重要作用, 提示 Claudin-2 可能作为 ESCC 的治疗靶点及肿瘤标志物, 也有作为预后标志物的潜力, 这与 Claudin-2 可作为乳腺癌预后标志物^[17]的报道一致。

目前已有研究建立了 Claudin 敲除或过表达的小鼠模型。比如将敲低 Claudin-1 的胃癌细胞通过尾静脉注入小鼠体内, 发现敲低 Claudin-1 的表达能够显著抑制胃癌肺转移瘤的形成^[18]。而在肺腺癌中, Claudin-1 过表达能够抑制小鼠肺内转移结节的形成^[19]。在卵巢中, 沉默 Claudin-3 的表达能够使小鼠卵巢肿瘤荷载和腹水生成量显著降低^[20], Claudin-3 或 Claudin-4 表达的增加能促进小鼠体内肿瘤的生长^[21]。

Claudin 家族参与肿瘤生物学作用的分子机制已有一些报道。Claudin-1 作为 RRP1B-DNMT-Claudin-1 通路分子, 是胞质分裂作用因子 (dedicator of cytokinesis 1, DOCK1) 的靶点, 可抑制三阴乳腺癌的增殖和转移^[5]; Claudin-6 至少部分通过激活 YAP1 及其下游转录靶点的转录来促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[22]; Claudin-7 激活 EMT 促进结直肠癌的侵袭和转移^[23], 但是 Claudin-7 可通过增加细胞间黏附抑制 ESCC 细胞的侵袭^[24]。Claudin-2 激活 Afadin 信号通路促进乳腺癌肝转移^[25], 也可抑制 Afadin/ERK 信号通路来抑制骨肉瘤细胞的转移^[13], 食管腺癌 Claudin-2 的表达与胆汁酸受体表达呈正相关^[15]。ABU-FARSAKH 等^[15]未发现 Claudin-2 表达与 ESCC 患者生存时间相关, 可能与本研究样本量 52 例较文献的 26 例更多有关。

综上所述, 关于 Claudin-2 参与 ESCC 细胞肿瘤生物学作用的分子机制目前研究较少, 需要进一步探索 Claudin-2 在 ESCC 发生发展、侵袭和转移过程中的相关分子机制, 本研究为 Claudin-2 作为 ESCC 的潜在分子靶点、标记物和预后标志物提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] ZENG H M, CHEN W Q, ZHENG R S, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries[J/OL]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5): e555-e567[2021-03-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29653628/>. DOI:10.1016/S2214-109X(18)30127-X.
- [2] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.

- issn.0253-3766.2019.01.008.
- [3] MCCORMACK V A, MENYA D, MUNISHI M O, et al. Informing etiologic research priorities for squamous cell esophageal cancer in Africa: a review of setting-specific exposures to known and putative risk factors[J/OL]. *Int J Cancer*, 2017, 140(2): 259-271 [2021-03-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5763498/>. DOI:10.1002/ijc.30292.
- [4] TSUKITA S, TANAKA H, TAMURA A. The claudins: from tight junctions to biological systems[J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(2): 141-152. DOI:10.1016/j.tibs.2018.09.008.
- [5] GOWRIKUMAR S, SINGH A B, DHAWAN P. Role of claudin proteins in regulating cancer stem cells and chemoresistance-potential implication in disease prognosis and therapy[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): E53[2021-03-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6982342/>. DOI:10.3390/ijms21010053.
- [6] CHIANG S K, CHANG W C, CHEN S E, et al. DOCK₁ regulates growth and motility through the RRP1B-claudin-1 pathway in claudin-low breast cancer cells[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): E1762[2021-03-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6896004/>. DOI:10.3390/cancers11111762.
- [7] OKUI N, KAMATA Y, SAGAWA Y, et al. Claudin 7 as a possible novel molecular target for the treatment of pancreatic cancer[J]. *Pancreatology*, 2019, 19(1): 88-96. DOI:10.1016/j.pan.2018.10.009.
- [8] AKIZUKI R, SHIMOBABA S, MATSUNAGA T, et al. Claudin-5, -7, and -18 suppress proliferation mediated by inhibition of phosphorylation of Akt in human lung squamous cell carcinoma[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, 1864(2): 293-302. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.018.
- [9] ZHOU S, PIAO X, WANG C, et al. Identification of claudin-1, -3, -7 and -8 as prognostic markers in human laryngeal carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(1): 393-400. DOI:10.3892/mmr.2019.10265.
- [10] VENUGOPAL S, ANWER S, SZÁSZI K. Claudin-2: roles beyond permeability functions[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): E5655[2021-03-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6888627/>. DOI:10.3390/ijms20225655.
- [11] AUNG P P, MITANI Y, SANADA Y, et al. Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas[J]. *Virchows Arch*, 2006, 448(4): 428-434. DOI: 10.1007/s00428-005-0120-2.
- [12] CHERRADI S, MARTINEAU P, GONGORA C, et al. Claudin gene expression profiles and clinical value in colorectal tumors classified according to their molecular subtype[J/OL]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 1337-1348[2021-03-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6389001/>. DOI: 10.2147/CMAR.S188192.
- [13] IKARI A, WATANABE R, SATO T, et al. Nuclear distribution of claudin-2 increases cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(9): 2079-2088. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.017.
- [14] ZHANG X W, WANG H M, LI Q, et al. CLDN2 inhibits the metastasis of osteosarcoma cells via down-regulating the afadin/ERK signaling pathway[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 160[2021-03-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6192349/>. DOI: 10.1186/s12935-018-0662-4.
- [15] SOINI Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours[J]. *Histopathology*, 2005, 46(5): 551-560. DOI:10.1111/j.1365-2559.2005.02127.x.
- [16] ABU-FARSAKH S, WU T T, LALONDE A, et al. High expression of Claudin-2 in esophageal carcinoma and precancerous lesions is significantly associated with the bile salt receptors VDR and TGR5 [J/OL]. *BMC Gastroenterol*, 2017, 17(1): 33[2021-03-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5316202/>. DOI: 10.1186/s12876-017-0590-0.
- [17] KIMBUNG S, KOVÁCS A, BENDAHL P O, et al. Claudin-2 is an independent negative prognostic factor in breast cancer and specifically predicts early liver recurrences[J/OL]. *Mol Oncol*, 2014, 8(1): 119-128[2021-03-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5528500/>. DOI:10.1016/j.molonc.2013.10.002.
- [18] LI J F, HUANG J, LIU B Y, et al. Abstract 5197: Claudin-1 enhances tumor proliferation and metastasis by regulating cell anoikis in gastric cancer[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15 Supplement): 5197. DOI:10.1158/1538-7445.AM2015-5197.
- [19] CHAO Y C, PAN S H, YANG S C, et al. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(2): 123-133. DOI:10.1164/rccm.200803-456oc.
- [20] HUANG Y H, BAO Y H, PENG W D, et al. Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(9): 3426-3430. DOI:10.1073/pnas.0813348106.
- [21] SHANG X Y, LIN X J, ALVAREZ E, et al. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases[J]. *Neoplasia*, 2012, 14(10): 974-985. DOI:10.1593/neo.12942.
- [22] KOHMOTO T, MASUDA K, SHODA K, et al. Claudin-6 is a single prognostic marker and functions as a tumor-promoting gene in a subgroup of intestinal type gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2020, 23(3): 403-417. DOI:10.1007/s10120-019-01014-x.
- [23] PHILIP R, HEILER S, MU W, et al. Claudin-7 promotes the epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(4): 2046-2063. DOI:10.18632/oncotarget.2858.
- [24] LIONI M, BRAFFORD P, ANDL C, et al. Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(2): 709-721. DOI:10.2353/ajpath.2007.060343.
- [25] TABARIÈS S, MCNULTY A, OUELLET V, et al. Afadin cooperates with Claudin-2 to promote breast cancer metastasis[J]. *Genes Dev*, 2019, 33(3/4): 180-193. DOI:10.1101/gad.319194.118.

[收稿日期] 2020-12-20

[修回日期] 2021-04-13

[本文编辑] 黄静怡