

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.12.004

COPB1 通过激活 PI3K/AKT 通路并调控肿瘤免疫微环境促进食管鳞状细胞癌发生发展

林妍, 喻双剑, 贾思凡, 李飞宇, 赵晨普, 董稚明, 沈素朋, 梁佳, 郭艳丽(河北医科大学第四医院 河北省肿瘤研究所, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探究包被蛋白复合体 β 1亚基(COPB1)在食管鳞状细胞癌(ESCC)中的表达,及其对ESCC细胞恶性生物学行为的影响、作用机制及临床意义。**方法:** 采用2014~2018年间在河北医科大学第四医院生物样本库中82例ESCC组织及癌旁组织,常规培养正常食管鳞状上皮细胞HEEC和食管癌细胞KYSE-150、KYSE-170、Eca109、TE1、KYSE-30、KYSE-450,用转染试剂将pcDNA3.1-vector(空载体)、pcDNA3.1-COPB1载体,si-NC和si-COPB1转染至KYSE-150、TE1细胞中,记为NC、COPB1-OE、si-NC和si-COPB1组。用数据库数据分析COPB1 mRNA在泛癌组织中的表达及其表达与免疫细胞浸润的关系,qPCR法检测ESCC组织和细胞中COPB1、PIK3CB、CD68、CD163、CD206、ARG1、IL-10 mRNA水平表达情况,WB法检测ESCC组织和各组细胞中的COPB1、PI3K、CD68、CD163、CD206、p-AKT蛋白表达,克隆形成实验和MTS实验检测各组细胞的增殖能力,划痕愈合实验和Transwell实验检测各组细胞的迁移和侵袭能力,免疫组织化学染色(IHC)法检测ESCC组织中COPB1和CD206蛋白表达。以人单核细胞白血病细胞(THP-1)构建巨噬细胞模型,用佛波酯(PMA)和IL-3和IL-4和ESCC细胞上清液诱导巨噬细胞转型,用qPCR和WB法检测CD68和CD206 mRNA和蛋白的表达。**结果:** COPB1在泛癌组织和ESCC组织中均呈高表达且与淋巴结转移和TNM分期有关联(均 $P < 0.01$),COPB1高表达的ESCC患者总生存期短($P < 0.05$),COPB1是潜在的ESCC的诊断标志物。COPB1在KYSE-150和TE1细胞中也呈高表达(均 $P < 0.05$),过表达或敲减COPB1可明显抑制或促进KYSE-150和TE1细胞的增殖能力、迁移和侵袭能力(均 $P < 0.05$)。COPB1表达变化诱导的差异表达基因主要富集于PI3K/AKT通路(均 $P < 0.001$),COPB1可促进PI3K/AKT通路的活化($P < 0.05$),COPB1高表达可导致M2型巨噬细胞浸润增加($P < 0.05$),COPB1高表达促进TAM/M2极化($P < 0.05$)。**结论:** COPB1在ESCC组织中呈高表达,其可激活PI3K/AKT通路及调控肿瘤免疫微环境促进ESCC发生发展,COPB1有望成为ESCC诊断和预后的生物标志物及治疗靶点。

[关键词] 食管鳞状细胞癌;包被蛋白复合体 β 1亚基(COPB1);PIK3CB;PI3K/AKT信号通路;肿瘤免疫微环境

[中图分类号] R73-35;R73-36 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)12-1236-12

COPB1 promotes the development and progression of esophageal squamous cell carcinoma by activating the PI3K/AKT pathway and regulating the tumor immune microenvironment

LIN Yan, YU Shuangjian, JIA Sifan, LI Feiyu, ZHAO Chenpu, DONG Zhiming, SHEN Supeng, LIANG Jia, GUO Yanli (Hebei Cancer Institute, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of coatamer protein complex subunit beta 1 (COPB1) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its impact on the malignant biological behavior of ESCC cells, as well as the underlying mechanism of action and its clinical significance. **Methods:** A total of 82 pairs of ESCC tissues and adjacent non-cancerous were collected from the biobank of the Fourth Hospital of Hebei Medical University during 2014 and 2018. Normal esophageal squamous cells (HEEC) and ESCC cell lines (KYSE-150, KYSE-170, Eca109, TE1, KYSE-30, KYSE-450) were routinely cultured. The pcDNA3.1-vector (empty vector), pcDNA3.1-COPB1 vector, si-NC, and si-COPB1 were transfected into KYSE-150 and TE1 cells using transfection reagents. The resulting groups were designated as the NC, COPB1-OE, si-NC, and si-COPB1 groups, respectively. A comprehensive database analysis was conducted to assess the mRNA expression of COPB1 in pan-cancer tissues and its correlation with immune cell infiltration. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was utilized to assess the mRNA expression of COPB1, PIK3CB,

[基金项目] 河北省重点研发计划(No. 22377730D;No. 22377721D);河北省自然科学基金项目(No. H2025206589);河北医科大学第四医院科研创新团队支持计划(No. 2023C12);政府资助临床医学优秀人才培养项目(No. ZF2024112)

[作者简介] 林妍(1999—),女,硕士生,主要从事病理学与病理生理学研究

[通信作者] 郭艳丽(扫码获取作者通信方式)



CD68, CD163, CD206, ARG1, and IL-10 in ESCC tissues and cells. Western blotting (WB) analysis was performed to detect COPB1, PI3K, CD68, CD163, CD206 and p-AKT protein expression in ESCC tissues and various cell groups. Colony formation and MTS assays were conducted to assess cell proliferation, while wound healing assay and Transwell assay were used to determine cell migration and invasion. Immunohistochemistry (IHC) was employed to detect the protein expression of COPB1 and CD206 in ESCC tissues. A macrophage model was established using human monocytic leukemia cells (THP-1). Macrophage polarization was induced with phorbol myristate acetate (PMA), interleukin-3 (IL-3), IL-4, and ESCC cell supernatant. WB and qPCR were performed to detect the protein and mRNA expression of CD68 and CD206, respectively. **Results:** COPB1 was highly expressed in both pan-cancer and ESCC tissues, and its expression was associated with lymph node metastasis and TNM staging (both $P < 0.01$). ESCC patients with high COPB1 expression exhibited shorter overall survival ($P < 0.05$), making COPB1 a potential diagnostic biomarker for ESCC. COPB1 was also highly expressed in KYSE-150 and TE1 cells (both $P < 0.05$). Overexpression or knockdown of COPB1 significantly inhibited or promoted the proliferation, migration and invasion capabilities of KYSE-150 and TE1 cells (both $P < 0.05$). Differentially expressed genes induced by COPB1 expression changes were primarily enriched in the PI3K/AKT pathway (both $P < 0.001$), and COPB1 activated the PI3K/AKT pathway ($P < 0.05$). Additionally, high COPB1 expression increased M2 macrophage infiltration ($P < 0.05$) and promoted TAM/M2 polarization ($P < 0.05$). **Conclusion:** COPB1 is highly expressed in ESCC tissues and can activate the PI3K/AKT pathway and modulates the tumor immune microenvironment, thereby promoting ESCC occurrence and development. COPB1 holds promise as a diagnostic and prognostic biomarker, as well as a therapeutic target for ESCC.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); coatomer protein complex subunit beta 1 (COPB1); PIK3CB; PI3K/AKT signaling pathway; tumor immune microenvironment

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(12): 1235-1246. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.12.004]

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是全球高发的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率居高不下,严重威胁人类健康^[1]。目前,ESCC临床诊疗仍面临早期诊断困难、预后较差等问题,深入探究其发病机制并寻找有效的生物标志物及治疗靶点至关重要^[2]。近年研究^[3]发现,包被蛋白复合体 $\beta 1$ 亚基(coatomer protein complex subunit beta 1, COPB1)作为囊泡运输相关蛋白^[4-5]在多种恶性肿瘤中异常表达,与肿瘤的发生发展密切相关,具有成为肿瘤生物标志物的潜力。然而,COPB1在ESCC中的具体表达模式、临床意义及其作用机制尚未明确。本研究着重探究COPB1对ESCC细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响及其分子机制,以及COPB1异常表达对肿瘤免疫微环境的影响,旨在为阐明ESCC的发病机制提供新视角,并为分子免疫治疗提供潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 ESCC组织标本、细胞及主要试剂

本研究纳入2014—2018年间在河北医科大学第四医院生物样本库中的82例ESCC的原发肿瘤组织及对应的癌旁组织,其收集与使用流程均经该院伦理委员会审批(No. 2022KY111)。所有患者均充分知情并签署书面知情同意书。生存信息通过肿瘤登记系统及医院病历回顾确认。

食管癌细胞KYSE-150、KYSE-170、Eca109、TE1、KYSE-30、KYSE-450由河北医科大学第四医院生物样本库留存并传代,人单核细胞白血病细胞

THP-1购自苏州海星生物科技有限公司, TriQuick总RNA提取试剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自索莱宝公司,逆转录试剂盒(Eastep RT Master Mix Kit)购自上海普洛麦格生物产品有限公司,佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)(蛋白激酶C激活剂)、BeyoClick™ EDU-594细胞增殖检测试剂盒购自碧云天生物技术,RPMI 1640细胞培养基购自美国赛默飞世尔科技,所用抗体购自成都正能生物或武汉三鹰生物技术有限公司(CD68、COPB1、CD163、CD206、PI3K、Ki67、AKT、p-AKT), siRNA购自吉玛基因,本研究所用全部引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 细胞培养、处理与分组

正常食管鳞状上皮细胞HEEC和ESCC细胞KYSE-150、KYSE-170、Eca109、TE1、KYSE-30、KYSE-450均培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,THP-1细胞培养于含 β -巯基乙醇的专用培养基中,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。THP-1细胞经100 ng/mL PMA处理24 h后,悬浮圆形细胞贴壁并转化为M0细胞;随后向M0细胞中加入20 ng/mL IL-4和20 ng/mL IL-13,继续培养48 h,此时M0细胞极化为M2细胞,收集细胞,用以检测其RNA和蛋白,分析细胞M2极化情况。

将对数生长期的KYSE-150、TE1细胞以 2×10^5 个/孔接种于6孔板中进行培养,用Lipofectamine 2000分别将pcDNA3.1-vector(空载体)、pcDNA3.1-COPB1载体, si-COPB1和 si-NC转染至KYSE-150、TE1细胞中,记为NC、COPB1-OE、si-NC和si-COPB1

组。转染 24 h 后收集细胞,检测转染效率,达 50% 以上时进行后续实验。

1.3 用数据库数据分析 COPB1 在泛癌组织中的表达及其表达与免疫细胞浸润的关系

用 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 和 GEO 数据库数据分析泛癌组织中 COPB1 mRNA 的表达;基于 TCGA 数据库 ESCC 相关数据,对随 COPB1 表达变化而出现差异表达的基因进行基因富集分析,用 ESTIMATE 算法,计数 COPB1 高表达组免疫评分与 ESTIMATE 评分,进一步用单样本基因集富集分析 (single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 算法分析 COPB1 表达与 ESCC 组织中免疫细胞浸润水平的关系。

1.4 qPCR 检测 ESCC 组织中 COPB1 及相关基因的 mRNA 水平表达情况

用 TriQuick 试剂提取 ESCC 组织和各组细胞中总 RNA,用 Eastep RT Master Mix Kit 逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA,用于后续基因表达检测。R735.2; R730.2 以 GAPDH 为内参照,用一法计数 mRNA 的相对表达水平。引物序列详见表 1。

表 1 qPCR 引物及 siRNA 序列(3'-5')

基因名称	序列
PIK3CB	F: CTTTATGGGTAGACTGGGCCTTTG R: AAGCCTTAGCCTATTCCTGAGGTTG
CD68	F: CTTCTCTCATTCCCCTATGGACA R: GAAGGACACATTGTACTCCACC
CD163	F: TTTGTCAACTTGAGTCCCTTCAC R: TCCCGCTACACTTGTTTTAC
CD206	F: CTCCAAGGGATCGGGTTTATGGA R: TTGGCATTGCCTAGTAGCGTA
ARG1	F: TGGACAGACTAGGAATTGGCA R: CCAGTCCGTCAACATCAAAACT
IL-10	F: TCAAGGCGCATGTGAACTCC R: GATGTCAAACACTCATGGCT
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R: AGGGGTCATTGATGGCAACA
COPB1	F: GCAGCCAACCTTTATGCTCG R: ACTTAAGGCCATTCCCTGGC
siRNA	AGAUCAGGAUCGAGCUUUGTT

1.5 WB 法检测 ESCC 组织和各组细胞中的 COPB1、PI3K、CD68、CD163、CD206、p-AKT 蛋白表达水平

用 Pierce™ RIPA 裂解液提取 ESCC 组织和各组细胞中总蛋白,检测其浓度后,按照先前描述方法^[6]进行 WB 实验。实验所用一抗(均为兔多/单抗):抗 CD68 (稀释比例 1:800)、COPB1(稀释比例 1:800)、CD163(稀释比例 1:800)、CD206(稀释比例 1:2 000)、PI3K(稀释

比例 1:800)、Ki67(稀释比例 1:100)、AKT(稀释比例 1:6 000)和 p-AKT(稀释比例 1:5 000)抗体。

1.6 克隆形成实验和 MTS 实验检测 COPB1 调控对 ESCC 细胞克隆形成能力及增殖活力的影响

克隆形成实验:将对数生长期的各组细胞,以 3×10^3 个/孔接种于 6 孔板中,恒温培养至可见克隆,弃培养液,用甲醛固定细胞、0.1% 结晶紫染色后在显微镜下观察计数,计数含 50 个以上细胞的克隆,用“克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ ”计算克隆形成率,反映细胞增殖能力。实验重复 3 次。

MTS 实验:将对数生长期的各组细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板中,每组设置 6 个复孔。分别于接种后 0、24、48、72 和 96 h 时在每孔加入 20 μ L MTS 试剂,继续培养 2 h,用酶标仪测在 490 nm 处检测各孔的光密度(D)值,以 D 值代表细胞的增殖活力。实验重复 3 次。

1.7 划痕愈合实验和 Transwell 实验检测 COPB1 对 ESCC 细胞迁移及侵袭能力的影响

将对数生长期的各组细胞,以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,待汇合度为 80%~90% 时,用移液器吸头在细胞层上划痕,PBS 洗去脱落细胞后加培养基培养,在 0、24 h 时显微镜下观察、拍照,记录划痕宽度,用“(0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 100% ”计算划痕愈合率。

在 Transwell 小室底部预铺 Matrigel 基质胶,取对数生长期的各组细胞以 1×10^5 个/孔接种于小室上室中,下室中加入 600 μ L 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,培养 24 h 后,用 4% 多聚甲醛固定细胞,用 0.1% 结晶紫染色后,随机在显微镜下取 5 个视野计数穿膜细胞数。实验重复 3 次。

1.8 免疫组织化学(IHC)法检测 ESCC 组织中 COPB1 和 CD206 蛋白表达

ESCC 组织切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水和柠檬酸盐缓冲液抗原修复后,3% H_2O_2 室温下处理 30 min,10% 正常兔血清封闭,一抗[兔抗人 COPB1 (稀释比例 1:500)和兔抗人 CD206(稀释比例 1:500)] 4 $^{\circ}$ C 处理过夜,次日滴加多聚辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(稀释比例 1:800)室温下处理 1 h,DAB 显色液显色,苏木精复染,梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片后镜检。

采用染色强度与阳性细胞占比双评分标准^[7]评估蛋白表达水平:染色强度分 4 级(阴性记 0 分、弱阳性记 1 分、阳性记 2 分、强阳性记 3 分);阳性细胞占比分 4 级($\leq 25\%$ 记 1 分、 $> 25\% \leq 50\%$ 记 2 分、 $> 50\% \leq 75\%$ 记 3 分、 $> 75\%$ 记 4 分)。两项评分的乘积代表该蛋白的相对表达水平。

1.9 统计学处理

用 SPSS 27.0 统计软件处理本实验数据。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异用两独立样本 *t* 检验比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。用 Log-Rank 检验和 Kaplan-Meier 法分析 ESCC 患者的总生存期, 用单因素 Cox 回归分析筛选与预后相关的变量, 以 HR 值和 *P* 值判断变量对预后的影响。

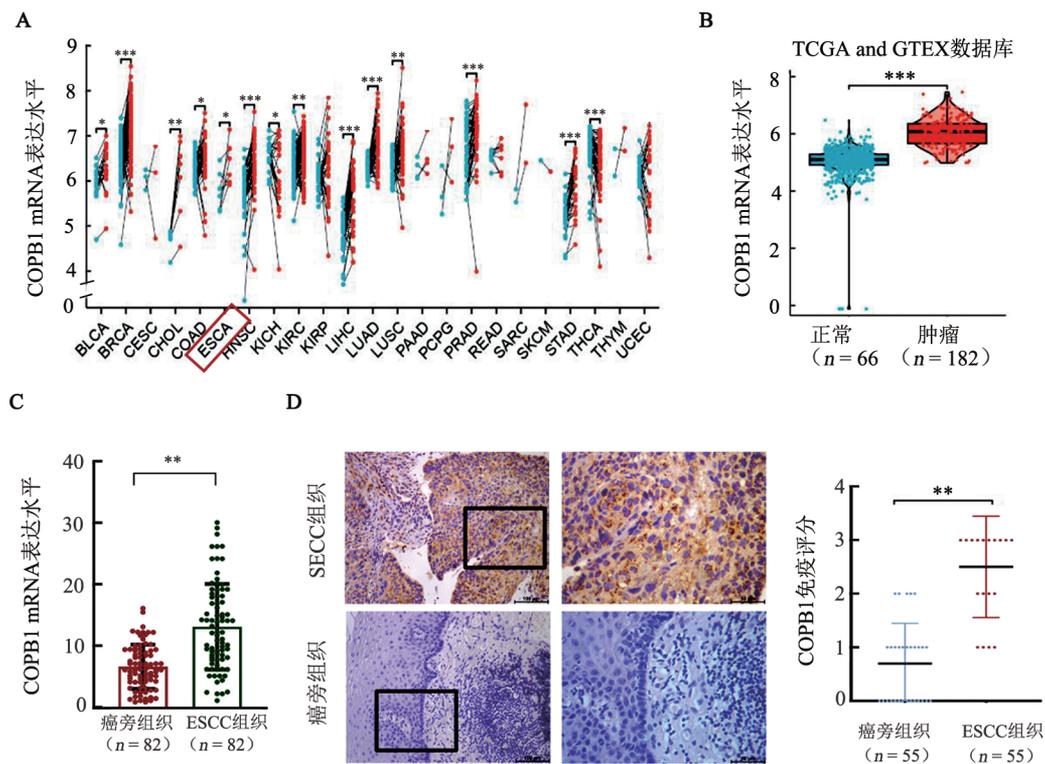
2 结果

2.1 COPB1 在泛癌组织和 ESCC 组织中呈高表达且与淋巴结转移和 TNM 分期有关联

基于 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 的泛癌 RNA-seq 数据, 用 R 语言环境中的 ggplot2 等工具包进行统计分析, 解析 COPB1 基因在 23 种人肿瘤组织及其配对癌旁组织中的表达, 结果 (图 1A) 显示, COPB1 在多种恶性肿瘤组织中均呈高表达, 食管

癌组织中上调尤为显著 ($P < 0.001$)。从 GEO 数据库获取整合 TCGA 及 GTEx 来源的基因表达数据, 涵盖 182 例食管癌组织和 666 例食管正常黏膜样本。数据分析结果 (图 1B) 再次证实, 食管癌组织中 COPB1 的转录水平显著高于正常黏膜组织。

用 qPCR 和 IHC 法检测国人 ESCC 组织中 COPB1 mRNA 和蛋白表达水平。qPCR 法检测结果 (图 1C) 显示, ESCC 癌组织中 COPB1 mRNA 呈高表达 ($P < 0.05$), IHC 法分析结果 (图 1D) 表明, COPB1 蛋白主要定位于细胞质, 且其在癌组织中的表达强度显著高于癌旁组织 ($P < 0.01$)。进一步分析 ESCC 癌组织中 COPB1 mRNA 表达水平与患者临床病理特征的关系, 结果 (表 2) 显示, ESCC 组织中 COPB1 高表达与淋巴结转移及 TNM 分期有关联 ($P = 0.004$ 或 $P = 0.007$), 与患者年龄、性别及病理分级无明显关联。



A: TCGA 数据库数据分析 COPB1 在泛癌组织中的表达红色数据点代表肿瘤组织, 蓝色数据点代表癌旁组织; B: GEO 数据库补充分析食管癌组织中 COPB1 mRNA 的表达; C、D: 用 qPCR (C) 和 IHC 法 (D, $\times 400$) 检测临床 ESCC 组织中 COPB1 的表达水平。

膀胱尿路上皮癌 (bladder urothelial carcinoma, BLCA); 乳腺癌 (breast cancer, BRCA); 宫颈鳞状细胞癌 (cervical squamous cell carcinoma, CESC); 胆管癌 (cholangiocarcinoma, CHOL); 结直肠腺癌 (colorectal adenocarcinoma, COAD); 食管癌 (esophageal carcinoma, ESCA); 头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSC); 肾嫌色细胞癌 (kidney chromophobe carcinoma, KICH); 肾透明细胞癌 (kidney renal clear cell carcinoma, KIRC); 肾乳头状细胞癌 (kidney renal papillary cell carcinoma, KIRP); 肝细胞癌 (liver hepatocellular carcinoma, LIHC); 肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD); 肺鳞状细胞癌 (lung squamous cell carcinoma, LUSC); 胰腺腺癌 (pancreatic adenocarcinoma, PAAD); 嗜铬细胞瘤和副神经节瘤 (pheochromocytoma and paraganglioma, PCPG); 前列腺腺癌 (prostate adenocarcinoma, PRAD); 直肠腺癌 (rectal adenocarcinoma, READ); 肉瘤 (sarcoma, SARC); 皮肤黑色素瘤 (skin cutaneous melanoma, SKCM); 胃腺癌 (stomach adenocarcinoma, STAD); 甲状腺癌 (thyroid carcinoma, THCA); 胸腺瘤 (thymoma, THYM); 子宫内膜癌 (uterine corpus endometrial carcinoma, UCEC)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 ESCC 组织中 COPB1 的表达

表2 COPB1 表达水平与 ESCC 患者临床病理特征的关联性分析

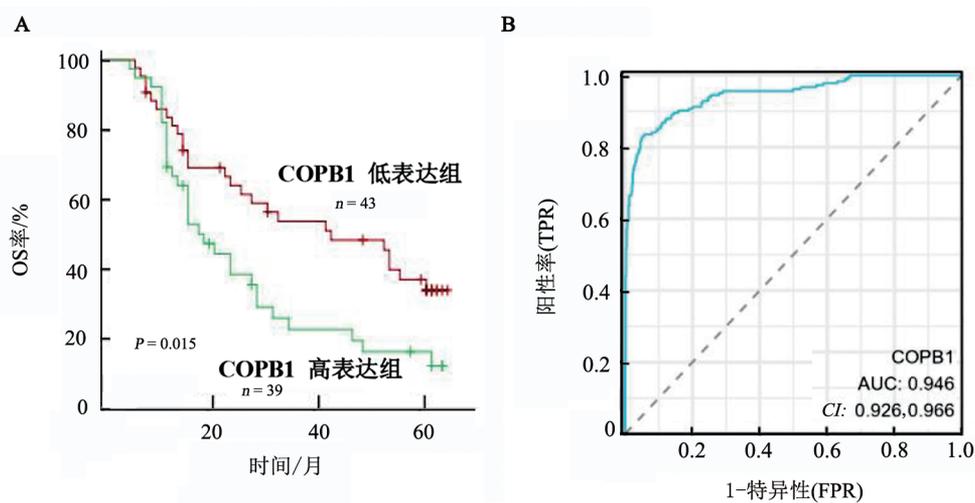
临床病理特征	n(%)	COPB1	t	P
年龄				
< 50	26(31.7)	13.369 ± 7.564	0.100	0.921
≥ 50	56(68.3)	13.203 ± 6.744		
性别				
男	45(54.9)	12.511 ± 6.992	-1.069	0.288
女	37(45.1)	14.162 ± 6.925		
TNM分期				
I + II	24(29.3)	9.837 ± 4.996	-2.996	0.004
III + IV	58(70.7)	14.671 ± 7.208		
淋巴结转移				
是	62(75.6)	14.426 ± 6.725	-2.789	0.007
否	20(24.4)	9.627 ± 6.589		
远处转移				
M0	66(80.5)	12.651 ± 6.615	-1.613	0.111
M1	16(19.5)	15.751 ± 8.017		
组织学分级				
良好/中等	56(68.3)	12.763 ± 7.471	-0.939	0.351
不良	26(31.7)	14.317 ± 5.725		

2.2 COPB1 高表达的 ESCC 患者总生存期短, COPB1 是潜在的 ESCC 的诊断标志物

根据 COPB1 mRNA 表达量均值(13.265), 82 例 ESCC 患者被分为高表达组(39 例)和低表达组(43 例)。生存分析结果(图 2A)显示, 全组患者 5 年总生存(OS)率为 34.0%, 中位生存期 28 个月。其中高表达组 5 年生存率(16.1%)显著低于低表达组(36.9%), 中位生存期分别为 19 个月与 43 个月(图 2A)。Kaplan-Meier 生存曲线结合 Log-Rank 检验证实, COPB1 高表达与患者 OS 缩短显著关联($P = 0.015$)。

单因素 COX 回归分析结果显示, TNM 分期($P < 0.05$)、淋巴结转移($P < 0.05$)、远处转移($P < 0.05$)及 COPB1 表达水平($P < 0.05$)是影响患者生存的危险因素, 而年龄、性别、病理分级及上消化道肿瘤家族史则无统计学关联($P > 0.05$, 表 3)。

鉴于已有文献报道 COPB1 在多种肿瘤中具有生物标志物潜力^[5], 本研究基于 TCGA 数据集数据构建 ROC 曲线评估其食管癌诊断价值。结果(图 2B)显示, COPB1 的 AUC 达 0.946, 提示其有望作为新型食管癌诊断标志物。



A: COPB1 高低表达与患者总生存期(OS)的关系; B: 基于 TCGA 数据集构建受试者工作特征(ROC)曲线分析其对食管癌的诊断价值。

图 2 COPB1 表达水平与 ESCC 患者生存期及诊断效能的关系

表3 单因素 Cox 回归分析 ESCC 患者生存的影响因素

临床特征	B	SE	HR (95% CI)	P
年龄	-0.360	0.282	0.698 (0.401, 1.212)	0.201
性别	0.111	0.266	1.117 (0.664, 1.881)	0.676
组织学分级	0.182	0.276	1.200 (0.699, 2.060)	0.509
TNM 分期	0.797	0.184	2.218 (1.546, 3.182)	< 0.001
淋巴结转移	-0.915	0.367	0.400 (0.195, 0.882)	0.013
远处转移	1.001	0.323	2.721 (1.445, 5.122)	0.002
上消化道肿瘤家族史	0.437	0.278	1.548 (0.898, 2.668)	0.116
COPB1 表达	0.074	0.020	1.077 (1.035, 1.120)	< 0.001

2.3 COPB1 对 ESCC 细胞增殖能力的影响及其表达调控验证

qPCR 法和 WB 法检测结果(图 3A、B)显示,与正常食管鳞状细胞 HEEC 比较,食管癌细胞 KYSE-150、KYSE-170、Eca109、TE1、KYSE-30、KYSE-450 中 COPB1 mRNA 和蛋白呈高表达($P < 0.05$);与 si-NC 或 NC 组比较,si-COPB1 组或 COPB1-OE 组细胞中 COPB1 mRNA 和蛋白均显著降低或升高(均 $P < 0.05$, 图 3C、D),实验结果说明,在 KYSE-150 和 TE1 细胞中均成功地敲减或过表达了 COPB1 的表达。

MTS 法检测结果(图 3E)显示,与 NC 组或 si-NC 比较,COPB1-OE 组或 si-COPB1 组 KYSE-150 和 TE1 细胞的增殖能力均明显减弱或增强(均 $P < 0.05$)。细胞克隆形成实验检测结果(图 3F)显示,与 NC 组或 si-NC 比较,COPB1-OE 组或 si-COPB1 组 KYSE-150 和 TE1 细胞的克隆形成能力均明显减弱或增强(均 $P < 0.05$)。实验结果说明,COPB1 在 KYSE-150 和 TE-1 细胞中呈高表达,过表达或敲减 COPB1 明显抑制或促进 KYSE-150 和 TE1 细胞的增殖能力。

2.4 COPB1 对 ESCC 细胞迁移和侵袭能力的双向调控作用

Transwell 实验和划痕愈合实验检测结果(图 4A)显示,与 NC 或 si-NC 组比较,COPB1-OE 组的 KYSE-150 和 TE1 细胞的侵袭数均明显增多(均 $P < 0.05$),si-COPB1 组 KYSE-150 和 TE1 细胞的侵袭数均明显减少(均 $P < 0.05$)。划痕愈合实验检测结果(图 4B)显示,与 NC 或 si-NC 组比较,COPB1-OE 组的 KYSE-150 和 TE1 细胞的划痕愈合率均明显升高(均 $P < 0.05$),si-COPB1 组 KYSE-150 和 TE1 细胞的划痕愈合率均明显降低(均 $P < 0.05$)。实验结果说明,过表达或敲减 COPB1 可明显促进或抑制 KYSE-150 和 TE1 细胞的迁移和侵袭能力。

2.5 COPB1 可促进 PI3K/AKT 通路的活化

为探究 COPB1 在 ESCC 中的作用机制,首先基于 TCGA 数据库的 ESCC 相关数据,参照 MSigDB 数

据库的预定义基因集,借助 clusterProfiler 包对随 COPB1 表达变化而出现差异表达的基因进行基因富集分析,分析结果(图 5A)表明,PI3K/AKT 信号通路被显著富集($NES = 1.756, P < 0.001$),其中包含通路关键基因 PIK3CB。PIK3CB 编码 PI3K 的 p110 β 催化亚基,可通过催化生成 PIP3 激活 AKT 通路,参与调控肿瘤细胞的增殖、存活等进程^[8]。进一步分析 TCGA 数据,分析结果(图 5B)显示,在 ESCC 组织中 COPB1 与 PIK3CB 的表达呈明显正相关($P < 0.001$)。为验证 COPB1 与 PIK3CB 之间的具体调控关系,在 ESCC 细胞中敲减 COPB1,通过 qPCR 及 WB 法检测 PIK3CB 的表达变化,检测结果(图 5C)显示,敲减 COPB1 后,PIK3CB 的相对表达量也随之降低($P < 0.05$),这证实了在 ESCC 细胞中 COPB1 对 PIK3CB 具有正向调控作用。

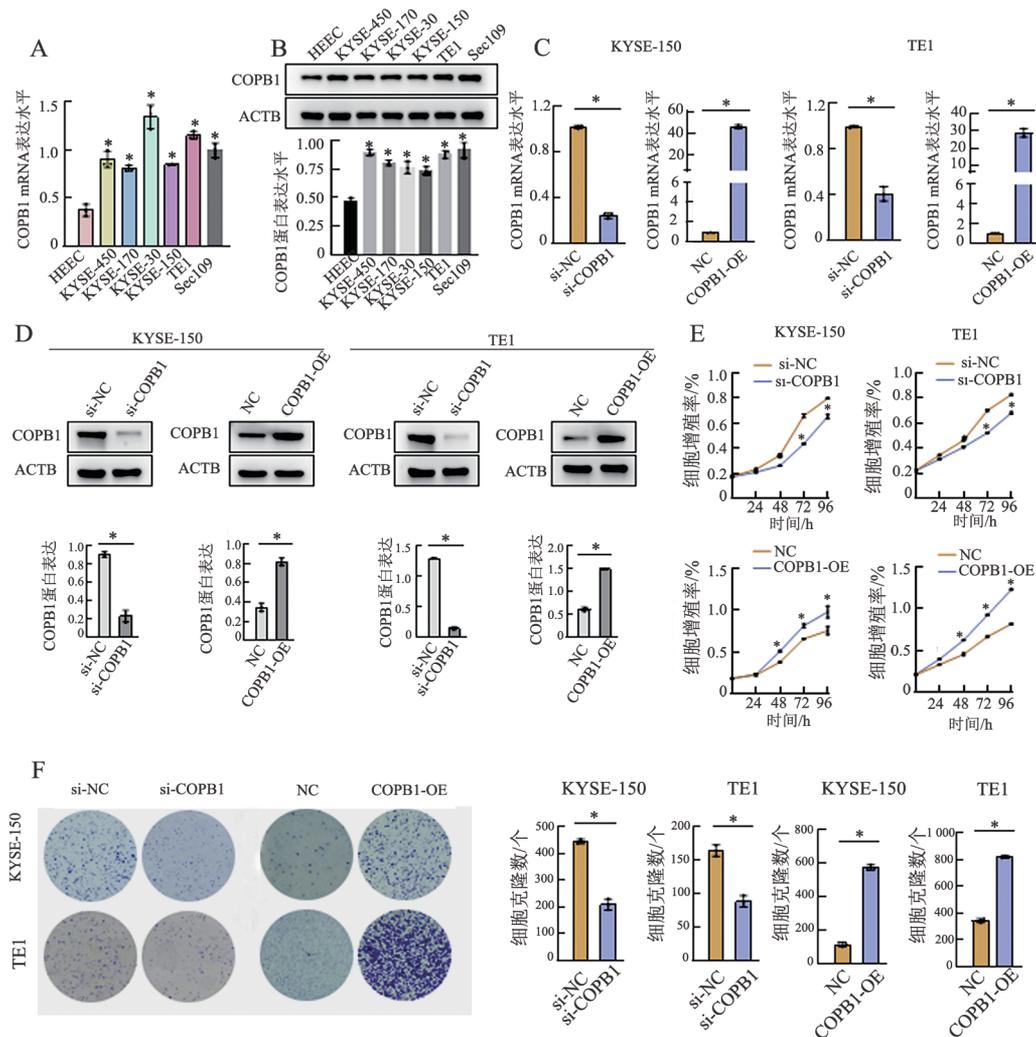
为进一步明确在 ESCC 中 COPB1 对 PI3K/AKT 通路的调控作用,在 ESCC 细胞中过表达 COPB1 后,检测 AKT 磷酸化水平的变化。WB 法检测结果(图 5D)显示,与 NC 组比较,COPB1-OE 组细胞中 AKT 磷酸化水平显著升高($P < 0.05$)。为验证这一调控关系,用 PI3K/AKT 通路特异性抑制剂 LY294002 处理上述细胞,检测结果(图 5D)显示,与 NC 组比较,LY294002 组细胞中 AKT 磷酸化水平显著降低($P < 0.05$);而对过表达 COPB1 的细胞用 LY294002 处理后,可部分降低由过表达 COPB1 导致的 AKT 磷酸化水平的升高(图 5D, $P < 0.05$)。实验结果表明,COPB1 可通过调控 PI3K/AKT 通路的活性,进而调控 ESCC 细胞的恶性生物学行为。

2.6 COPB1 高表达可导致 M2 型巨噬细胞浸润增加

基于 TCGA 数据库的 RNA-seq 数据及病理资料,利用 ESTIMATE 算法计算肿瘤微环境特征,分析结果(图 6A)显示,COPB1 高表达组的免疫评分与肿瘤纯度评分均显著低于低表达组($P < 0.05$),提示 COPB1 可能介导免疫抑制性微环境的形成。进一步采用 ssGSEA 算法(借助 GSVA 包)分析 24 种免疫细

胞的浸润水平与COPB1表达的关系,结果发现,与多种免疫细胞的丰度显著相关,如B淋巴细胞,T淋巴细胞($P < 0.05$),提示其具有免疫调节功能(图6B)。同时,食管癌组织中巨噬细胞的M2极化富集分数水平显著高于癌旁组织(图6C, $P < 0.01$)。进一步采用IHC法分析ESCC组织中COPB1与M2型巨噬细胞

标志物CD206的表达关系,结果(图6D)显示,COPB1高表达组的ESCC组织中CD206蛋白表达也明显升高($P < 0.05$)。实验结果说明,COPB1高表达可能导致M2型巨噬细胞浸润增加,从而造成免疫抑制微环境的形成。



A、B:qPCR法(A)和WB法(B)检测人正常食管上皮和6种食管癌细胞中COPB1的表达;C、D:qPCR法(C)和WB法(D)检测COPB1的敲减和过表达效率;E、F:MTS实验和集落形成实验检测各组KYSE-150、TE1细胞的增殖能力($\times 40$)。与si-NC或NC组相比,* $P < 0.05$ 。

图3 COPB1对KYSE-150和TE1细胞增殖能力的影响

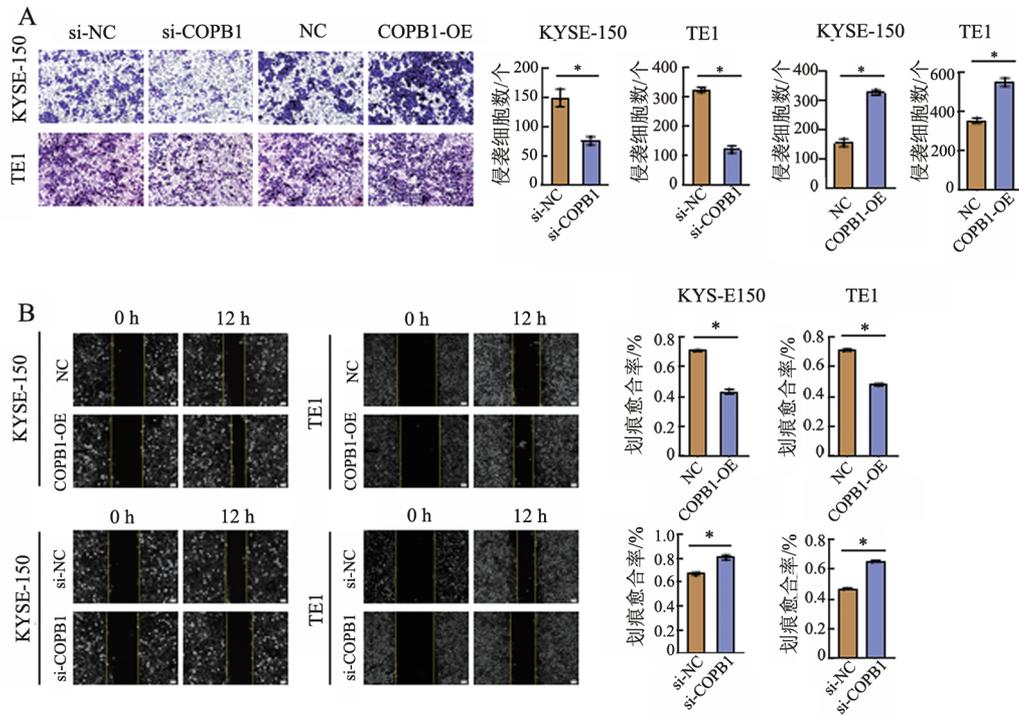
2.7 COPB1高表达促进TAM/M2极化

参照先前叙述的方法^[9],THP-1细胞用100 ng/mL PMA处理24 h分化为M0巨噬细胞,在显微镜下观察处理前后细胞的形态变化,并通过WB法检测处理前后CD68的蛋白含量变化以证明分化成功(图7A, B)。为探究COPB1对巨噬细胞极化的调控作用,用不同COPB1表达水平的食管癌细胞上清液,诱导M0巨噬细胞分化为肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)。结果显示,与对照组相比,肿瘤细胞上清显著上调了巨噬细胞中M2相关

分子标志物(CD163、CD206、ARG1、IL-10、TGF- β)的表达;然而,当肿瘤细胞中COPB1的表达受到干扰时,其肿瘤细胞上清对M2型巨噬细胞标志物的调节被明显削弱(图7C, $P < 0.05$)。这些结果表明,COPB1显著促进了TAM/M2极化,导致更具免疫抑制性的肿瘤微环境。

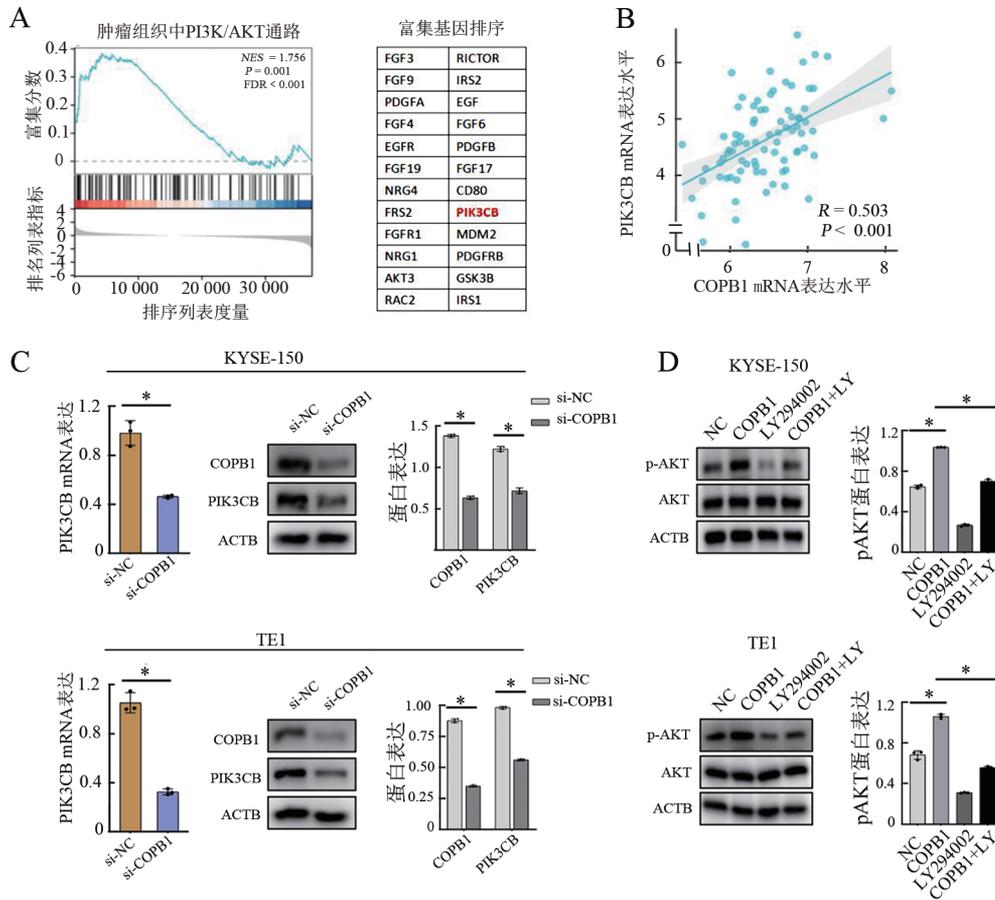
3 讨论

ESCC作为高发高危恶性肿瘤,其临床治疗仍面临巨大挑战。目前,ESCC患者总体预后较差,晚期患者



A: Transwell 实验检测各组细胞的侵袭能力($\times 200$); B: 划痕愈合实验检测各组细胞的迁移能力($\times 100$)。* $P < 0.05$ 。

图4 COPB1对KYSE-150和TE1细胞迁移和侵袭能力的影响

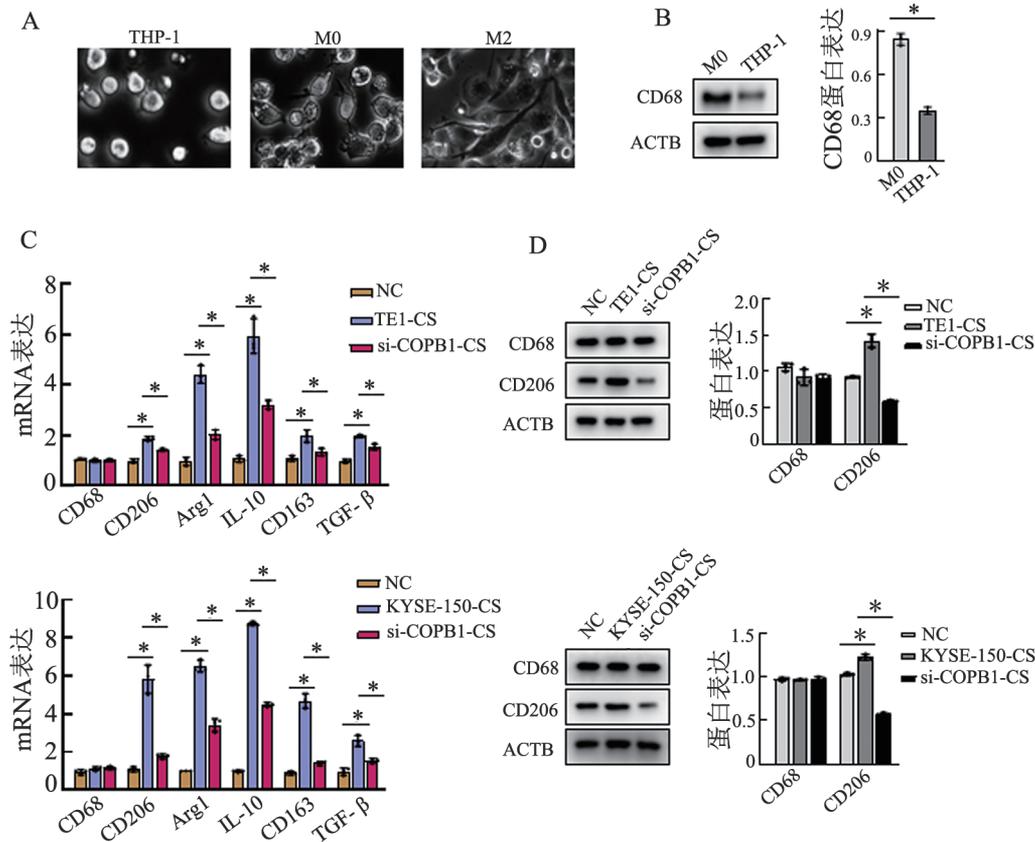


A: 对COPB1调控的差异表达基因进行GSEA集富集分析筛选其可能涉及的信号通路; B: 用TCGA数据集数据分析ESCC组织中COPB1与PI3K/AKT通路关键分子PIK3CB的表达的相关性; C: qPCR和WB法检测各KYSE-150和TE1细胞中COPB1和PIK3CB的表达; D: WB法检测各组细胞中AKT的磷酸化水平。* $P < 0.05$ 。

图5 ESCC细胞中COPB1对PIK3CB表达及PI3K/AKT信号通路的活化作用

表明 COPB1 可能作为一种泛癌相关促癌基因, 在 ESCC 侵袭、转移等恶性进程中扮演着重要的角色^[8]。生存分析结果显示, COPB1 高表达患者的生存期显著降低, 且单因素 COX 回归分析证实其为影响 ESCC 患者预后的危险因素。同时, ROC 曲线分析显示,

COPB1 具有较高的诊断效能。目前临床常用的 ESCC 诊断标志物如 CEA、CA19-9 等存在特异性不足的问题^[16-17], 而本研究发现的 COPB1 有望作为新型诊断及预后评估标志物, 为 ESCC 的早期筛查与病情监测提供参考。



A: PMA 诱导 THP-1 细胞极化; B: WB 法检测 THP-1 细胞极化 CD68 蛋白的表达($\times 400$); C、D: qPCR 法(C)和 WB 法(B)检测 KYSE-150 和 TE1 细胞上清诱导后, 巨噬细胞中各型细胞极化标志分子 mRNA 的表达和 CD68 和 CD206 蛋白的表达。* $P < 0.05$ 。

图7 ESCC 细胞中 COPB1 高表达对 TAM/M2 极化的影响

为探究 COPB1 发挥作用的分子基础, 本研究通过 GSEA 富集分析发现, PI3K/AKT 信号通路在 COPB1 高表达样本中显著富集。机制验证显示, COPB1 可通过上调 PIK3CB 表达促进 AKT 磷酸化, 而 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 可部分逆转这一效应, 提示 COPB1 可能通过 COPB1-PIK3CB-AKT 轴调控 ESCC 发生发展过程。PI3K/AKT 通路作为细胞内重要的信号转导枢纽, 其异常激活可通过调控细胞周期进程、抑制凋亡信号及促进血管生成等途径参与肿瘤发生发展^[18-19]。本研究首次证实 COPB1 对该通路的调控作用, 补充了 PI3K/AKT 通路异常激活的上游调控机制, 为解析 ESCC 的分子发病机制提供了新视角。值得注意的是, PI3K/AKT 通路的功能并非局限于调控肿瘤细胞自身生物学行为, 该通路在巨噬细胞等免疫细胞的极化过程中同样发挥核心作用。

已有研究^[20]证实, 其激活可直接促进巨噬细胞向 M2 型免疫抑制表型的转化, 这提示 COPB1 对 PI3K/AKT 通路的调控, 可能是连接肿瘤细胞内在信号与外在免疫微环境重塑的关键节点。

肿瘤微环境的免疫抑制状态是肿瘤细胞逃逸免疫监视及产生治疗耐药的核心机制。CHEN 等^[8]证实, COPB1 的异常表达可通过调控多种免疫细胞的浸润水平参与肿瘤免疫调控, 提示其作为免疫相关基因的潜在功能。本研究基于 TCGA 数据集数据的分析进一步验证了这一特征, 发现在 ESCC 组织中 COPB1 高表达显著影响免疫细胞浸润模式, 且高表达组患者的免疫评分显著降低。临床样本的 IHC 染色结果进一步验证了这一关联: COPB1 表达水平与 M2 型巨噬细胞标志物(CD206)呈正相关。上清液诱导巨噬细胞极化的实验显示, ESCC 细胞上清液可诱

导 THP-1 来源巨噬细胞向 TAM 极化, 而敲减 COPB1 可显著削弱 TAM/M2 极化效应, 提示 COPB1 可能通过旁分泌机制调控免疫微环境。已知 M2 型巨噬细胞可通过分泌 IL-10、TGF- β 等细胞因子抑制抗肿瘤免疫应答^[21], 因此 COPB1 介导的免疫微环境重塑可能是其促进 ESCC 进展的另一重要途径。这一发现为联合靶向 COPB1 与免疫检查点抑制剂的治疗策略提供了实验支持。

综上所述, 本研究通过多层面实验证实, COPB1 在 ESCC 组织中高表达, 与肿瘤进展及不良预后密切相关, 其可通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进肿瘤细胞的恶性表型, 并通过调控巨噬细胞 M2 极化参与肿瘤免疫抑制微环境的形成。这些发现揭示了 COPB1 在 ESCC 发生发展中的关键作用, 为 ESCC 的诊断、预后评估及靶向治疗提供了新的潜在分子靶点和理论依据。

利益冲突声明: 所有作者声明无利益冲突。

[参考文献]

- [1] JUBASHI A, KOTANI D, KOJIMA T, *et al.* Current landscape of targeted therapy in esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Curr Probl Cancer*, 2024, 53: 101152[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39454516/>. DOI: 10.1016/j.crrproblecancer.2024.101152.
- [2] CHEN X J, CHENG G Y, ZHU L, *et al.* Alarmin S100A8 imparts chemoresistance of esophageal cancer by reprogramming cancer-associated fibroblasts[J/OL]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(6): 101576 [2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38776909/>. DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101576.
- [3] CHEN H Y, LI K L, LI Y J, *et al.* An integrative pan-cancer analysis of COPB1 based on data mining[J]. *Cancer Biomark*, 2021, 30(1): 13-27. DOI: 10.3233/CBM-200398.
- [4] BI J, TSAI N P, LU H Y, *et al.* Copb1-facilitated axonal transport and translation of kappa opioid-receptor mRNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(34): 13810-13815. DOI: 10.1073/pnas.0703805104.
- [5] PETER F, PLUTNER H, ZHU H, *et al.* Beta-COP is essential for transport of protein from the endoplasmic reticulum to the Golgi *in vitro* [J]. *J Cell Biol*, 1993, 122(6): 1155-1167. DOI: 10.1083/jcb.122.6.1155.
- [6] 王淑彬, 潘腾, 张跃华, 等. FOXD1 在食管鳞状细胞癌组织中表达的意义及其对 TE1 细胞恶性生物学行为影响的分子机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(12): 1087-1093. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2022.12.004.
- [7] GUO Z, ZHANG X F, ZHU H B, *et al.* Telo2 induced progression of colorectal cancer by binding with RICTOR through mTORC2[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(2): 523-534. DOI: 10.3892/or.2020.7890.
- [8] XU W, WANG Z Q, ZHANG Z, *et al.* PIK3CB promotes oesophageal cancer proliferation through the PI3K/AKT/mTOR signalling axis[J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(9): 1399-1408. DOI: 10.1002/cbin.11847.
- [9] 王颖毅, 骆慧, 张军霞, 等. 胶质瘤 U87 细胞培养上清诱导 CD133⁺ 内皮细胞血管生成及其可能的机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(6): 615-619. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.6.005.
- [10] 张博为, 韩卓莹, 马天云, 等. CTAGE15 与食管鳞状细胞癌 (ESCC) 患者预后相关并抑制 ESCC 细胞的恶性表型[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*. 2024, 44(5): 634-642. DOI: 10.7655/NYDXBNSN231018.
- [11] AN L B, LI M Y, JIA Q G. Mechanisms of radiotherapy resistance and radiosensitization strategies for esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 140[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37598158/>. DOI: 10.1186/s12943-023-01839-2.
- [12] ZHOU Y, MO S L, CUI H Y, *et al.* Immune-tumor interaction dictates spatially directed evolution of esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Natl Sci Rev*, 2024, 11(5): nwae150[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38803565/>. DOI: 10.1093/nsr/nwae150.
- [13] ZHENG Y X, CHEN Z Y, HAN Y C, *et al.* Immune suppressive landscape in the human esophageal squamous cell carcinoma microenvironment[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6268[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33293583/>. DOI: 10.1038/s41467-020-20019-0.
- [14] HOWLEY B V, LINK L A, GRELET S, *et al.* A CREB3-regulated ER-Golgi trafficking signature promotes metastatic progression in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2018, 37(10): 1308-1325. DOI: 10.1038/s41388-017-0023-0.
- [15] YANG Q, QIN J J, SUN G Y, *et al.* Discovery and validation of serum autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in gastric adenocarcinoma based on the focused protein arrays[J/OL]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2020, 12(1): e00284[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33346593/>. DOI: 10.14309/ctg.0000000000000284.
- [16] YU Y X, XIA L, WANG Z X, *et al.* A cross-cohort study identifies potential oral microbial markers for esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *iScience*, 2024, 27(12): 111453[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39758985/>. DOI: 10.1016/j.isci.2024.111453.
- [17] YANG Y C, HUANG X Z, ZHOU L K, *et al.* Clinical use of tumor biomarkers in prediction for prognosis and chemotherapeutic effect in esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 526[2025-09-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31151431/>. DOI: 10.1186/s12885-019-5755-5.
- [18] MANGIAPANE L R, NICOTRA A, TURDO A, *et al.* PI3K-driven HER2 expression is a potential therapeutic target in colorectal cancer stem cells[J]. *Gut*, 2022, 71(1): 119-128. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-323553.
- [19] LI Y S, SHEN Z Y, CHAI Z, *et al.* Targeting MS4A4A on tumour-associated macrophages restores CD8⁺ T-cell-mediated antitumour immunity[J]. *Gut*, 2023, 72(12): 2307-2320. DOI: 10.1136/gutjnl-2022-329147.
- [20] ZHAO S J, KONG F Q, JIE J, *et al.* Macrophage MSR1 promotes BMSC osteogenic differentiation and M2-like polarization by activating PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin pathway[J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 17-35. DOI: 10.7150/thno.36930.
- [21] PEURA A, TURPIN R, LIU R X, *et al.* Soft matrix promotes immunosuppression in tumor-resident immune cells via COX-FGF2 signaling[J/OL]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 4908[2025-09-11]. DOI: 10.1038/s41467-025-60092-x.

[收稿日期] 2025-07-27

[修回日期] 2025-11-11

[本文编辑] 向正华