

网络出版时间:2023-11-30 11:17:56 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20231129.1025.008

SP1 在食管鳞癌组织中的表达 及其对食管鳞状细胞增殖和凋亡的影响

黄红芳¹, 卢香云¹, 孙梦菲¹, 崔晓宾^{1,2}

摘要 目的 探讨特异性蛋白 1 (SP1) 在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 和癌旁正常组织中的表达及其对 ESCC 细胞增殖和凋亡的影响。方法 通过免疫组化法检测 121 例 ESCC 组织和 74 例癌旁正常组织中 SP1 蛋白的表达;卡方检验、Cox 回归分析 SP1 与食管鳞癌患者临床病理参数及生存预后的关系;构建 SP1 小干扰 RNA (siRNA) 转染食管鳞癌 Eca109 和 EC9706 细胞系,利用 Western blot 技术检测转染后的蛋白表达水平;通过克隆实验、CCK-8 细胞增殖实验、流式细胞术实验检测 SP1 对食管鳞癌细胞增殖及凋亡水平的影响。结果 SP1 蛋白在食管鳞癌组织细胞核中表达,且食管鳞癌组织中 SP1 蛋白的表达率明显高于癌旁正常组织 ($\chi^2 = 20.568, P < 0.001$);组间比较结果显示,在女性 ($P = 0.041$)、中低分化 ($P = 0.038$) 及 T3 ~ T4 浸润深度 ($P = 0.041$) 的食管鳞癌患者中,SP1 的高表达率更高,且 log-rank 检验对生存曲线比较的结果显示 SP1 高表达的患者生存时间更短 ($P = 0.048$);多因素 Cox 回归分析显示 TNM 分期 (III + IV) 是导致食管鳞癌患者生存时间较短的潜在危险因素 ($P < 0.001$);细胞生物学实验结果显示,与对照组相比,在食管鳞癌细胞系中沉默 SP1 后,其增殖能力降低 ($P < 0.05$)、细胞凋亡指数升高 ($P < 0.05$)。结论 SP1 蛋白在人食管鳞癌组织中高表达,与患者不良预后相关,沉默 SP1 后

能够抑制食管鳞癌细胞的增殖,促进其凋亡。

关键词 特异性蛋白 1;食管鳞癌;增殖;凋亡;预后

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)12-2031-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.007

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一^[1],生存预后较差,仅不到 20% 的患者生存时间超过 5 年^[2]。虽然食管癌治疗方法多样,但外科手术仍是食管癌治疗最有效的方式^[3],然而术后预后效果不佳,存在严重的术后不良反应^[4]。研究^[5]发现,特异性蛋白 (specific protein, SP) 是一个重要的转录因子家族,其包括 SP1、SP2 和 SP3。SP1 是第一个在哺乳动物中被鉴定和克隆的 SP 家族蛋白,SP1 作为靶基因表达的调节剂可与功能蛋白特别是转录因子相互作用参与调控多种生物过程。SP1 还参与癌基因、抑癌基因的表达,影响细胞生长、凋亡、分化等多种细胞基本功能,在多种肿瘤中高表达,并且与患者的不良预后有关^[6]。然而,SP1 在食管鳞癌发生发展中的作用尚不明确,有待进一步研究。该研究旨在探讨转录因子 SP1 在食管鳞癌中的表达及其对食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 细胞生物学功能的影响,分析其与 ESCC 患者生存预后的关系,从而为 ESCC 患者的临床预后提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2023-09-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160542)

作者单位:¹石河子大学医学院基础医学系,石河子 832002

²南京大学医学院附属鼓楼医院病理科,南京 210008

作者简介:黄红芳,女,硕士研究生;

崔晓宾,男,副教授,博士生导师,责任作者,E-mail:cuixiaobin4363@foxmail.com

D pathway-related proteins on the survival and prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** Pg infection and the expression of 24 hydroxylase (CYP24A1), 1 α hydroxylase (CYP27B1) and vitamin D receptor (VDR) in 173 ESCC tissues were detected by immunohistochemistry. The correlation between each index and the survival time of patients was analyzed. **Results** The positive rates of Pg, CYP24A1, CYP27B1 and VDR in ESCC were 43.35%, 37.57%, 20.23% and 21.97%, respectively. The 5-year survival time of ESCC patients in the Pg⁺ CYP24A1⁺ CYP27B1⁻ VDR⁻ high-risk group was shortened ($P < 0.05$). **Conclusion** Pg infection and vitamin D pathway-associated proteins can be used as reliable indicators to predict the survival and prognosis of ESCC patients.

Key words esophageal squamous cell carcinoma; *Porphyromonas gingivalis*; CYP24A1; CYP27B1; vitamin D receptor; prognosis

1.1.1 病例资料 该研究收集了喀什第一人民医院、乌鲁木齐市自治区人民医院、石河子大学医学院第一附属医院3所医院2015年—2016年间的食管鳞癌石蜡包埋组织标本121例。由石河子大学医学院第一附属医院病理科两位专家审查确诊为食管鳞状细胞癌,依照第8版食管癌分期标准对组织样本进行TNM分期,所有患者均已签署知情同意书(伦理学批号:shzu2015CG09),通过电话等联系方式随访至2022年5月。

1.1.2 细胞系、试剂与仪器 食管鳞癌细胞系(Eca109货号:iCell-h056、EC9706货号:YS105C)购自中国科学院北京细胞库;无血清1640培养基(货号:IMC-202)购自厦门逸漠生物科技有限公司;兔抗人SP1单克隆抗体购自英国艾博抗贸易有限公司(货号:ab231778);EDTA修复液(货号:abs9247)购自北京爱必信生物科技有限公司;SP siRNA(小干扰RNA)购自上海吉玛公司 sense sequence:CCAGCA-ACAUGGGAAUUAUdTdT anti-sense sequence:AUA-AUUC-CAUGUUGCUGGdTdT;BSA封闭液(货号:SW3015)购自北京索莱宝科技有限公司;LiP 2000转染试剂(货号:18324012)购自上海 invitrogen 生命技术公司;CCK-8试剂盒(货号:C0042)、凋亡试剂盒(货号:70-AP101-100)分别购自日本同仁和联科生物。高压锅(型号:7970A)购自上海仪涛生物仪器有限公司;CO₂细胞培养箱(型号:I-5110-230V)、差速离心机(型号:Sorvall ST40)均购自美国赛默飞世尔科技公司;光学显微镜(型号:CX23双目)购自日本 Olympus 公司;转膜仪(型号:DYC-Mini4)、电泳仪(型号:1658033)均购自美国伯乐生命科学产品有限公司;流式细胞仪(型号:FACS-Canto II)购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化法染色及结果判定 利用免疫组织化学实验法对收集的组织蜡块进行切片、烘干后依次进行脱蜡、脱二甲苯、脱酒精,随后将切片放进盛满 EDTA 修复液的塑料盒内置于高压锅行高温高压修复,并在室温条件下进行冷却降温,BSA 封闭液 37℃下封闭反应 30 min,去除废液后 4℃孵育一抗(1:1 200)过夜,第二天在 37℃恒温箱中复温完成后用 PBS 冲洗滴加二抗(1:1 000)恒温箱孵育 2 h,再次冲洗后进行显色、复染和酸酒精的分化,最后树脂封片后于光学显微镜下观察结果,取相应组织做阳性对照,用 PBS 溶液代替一抗做阴性对照。SP1 主要定位于细胞核,核染棕黄色为阳性。根据阳性

细胞所占百分比计分:<5%计0分,6%~25%计1分,26%~50%计2分,51%~75%计3分,76%~100%计4分。根据阳性细胞着色强度计分:无着色计0分,黄色计1分,棕黄色计2分,棕色计3分。两个判定标准相乘≤8分为低表达,>8分为高表达。结果由两名以上经验丰富的病理学医师评定,意见不一致时由上级医师做最终评定计分并录入统计学软件。

1.2.2 细胞转染 细胞计数完成后,将 Eca109 和 EC9706 细胞分为 si-Control 组和 si-SP1 组(Western blot 实验设置3组转染浓度:100、120、140 nmol/ml)并均匀接种于6孔中,待细胞密度达70%~80%时进行转染,将转染试剂(5 μl LiP 2000)、SP1 siRNA(14 μl、sense sequence:CCAGCAACAUGG-GAAUUAUdTdT anti-sense sequence:AUAAUUC-CCAUGUUGCUGGdTdT)分别加入125 μl的无血清1640培养基中混匀,活化20 min后移至孔板内。

1.2.3 Western blot 实验 将转染好的细胞进行蛋白的提取:将配好的裂解液(PMSF:RIPA裂解液=1:100)覆盖孔板,于4℃冰箱孵育30 min,用细胞刮板将孔板内的细胞刮下,移至EP管中,置于差速离心机(12 000 r/min)内离心15 min后取出,计算体积并煮沸,按照制胶-电泳-上样-转膜-封闭-孵育一抗(1:1 000)8 h-孵育二抗(1:10 000)2 h-洗膜步骤依次操作,最后于避光室内滴加化学发光试剂进行显色。

1.2.4 克隆实验 通过 CCK-8 细胞增殖实验检测两组食管鳞癌细胞系的集落形成能力,将转染后的细胞(400~500个)均匀接种到12孔培养板中培养10~14 d,间隔3 d进行换液,观察细胞生长情况。待克隆集落形成后,移除废液,PBS清洗,孔板内加入多聚甲醛固定30~40 min,染色完成后拍照,利用 ImageJ 软件进行计数。

1.2.5 CCK-8 细胞增殖实验 通过 CCK-8 细胞增殖实验检测两组食管鳞癌细胞系的增殖能力。将转染好的 si-Control 组,si-SP1 组和空白对照组(仅培养基)消化离心接种至96孔板内,并于每个时间点(0、24、48、72、96 h)铺一个96孔板,每组设置5个复孔,分别于0、1、2、4、5 d后于避光条件下在各孔内依次加入10 μl CCK-8 试剂,作用2 h后,上机(避光)检测450 nm波长处吸光度值。

1.2.6 流式细胞术 利用流式细胞术检测两组食管鳞癌细胞系的凋亡能力,于12孔板内进行转染(计数后每孔细胞数约 1×10^4);待转染48 h后,把

5 μl 的 PI 及 10 μl 的 FITC 加于处理好的细胞中(空白组不加),避光 5 min,在每个流式管中加入 2 ml PBS 及处理好的细胞,上机检测,记录结果。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 25.0 统计软件处理数据;计数资料采用绝对数(%)表示,计数资料组间比较采用 χ^2 检验;正态分布计量资料组间比较采用独立样本 t 检验,不服从正态分布计量资料组间比较采用非参数检验;绘制 SP1 表达与食管鳞癌关系的 Kaplan-Meier 生存曲线图, log-rank 检验用作生存曲线的比较;Cox 回归分析评定相关指标能否作为独立预后因子。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SP1 在食管鳞癌及癌旁正常组织中的表达情况 免疫组化结果显示食管鳞癌癌旁正常组织(图 1A、B)、食管鳞癌组织中 SP1 均定位于细胞核(图 1C、D)。食管鳞癌组织和癌旁正常组织中 SP1 蛋白表达阳性率分别为 26.4% 和 1.4%。癌组织中 SP1 的蛋白表达阳性率高于癌旁正常组织($\chi^2 = 20.568$, $P < 0.001$)。

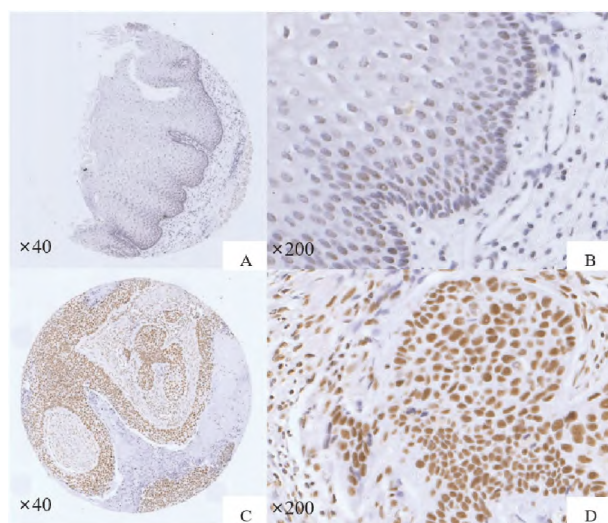


图1 食管鳞癌癌旁正常组织与食管鳞癌组织中 SP1 蛋白的表达情况
A、B:食管鳞癌癌旁正常组织中 SP1 的表达;C、D:食管鳞癌组织中 SP1 的表达

表1 SP1 在食管鳞癌与癌旁正常组织中的表达

分组	免疫组化染色		χ^2 值	P 值
	低表达 (%)	高表达 (%)		
正常组织	73(98.6)	1(1.4)	20.568	<0.001
食管鳞癌	89(73.6)	32(26.4)		

2.2 食管鳞癌组织中 SP1 蛋白表达与临床病理特征之间的关系 食管鳞癌组织中,SP1 蛋白在女性、中低分化、浸润深度 T3 ~ T4 级的高表达率高于食管鳞癌癌旁正常组织(均 $P < 0.05$),差异具有统计学意义。见表 2。

2.3 SP1 蛋白表达与食管鳞癌患者生存预后的关系 通过生存曲线结果图可以发现,食管鳞癌患者中 SP1 蛋白高表达的患者生存时间低于 SP1 低表达的患者($P = 0.048$)。见图 2。单因素 Cox 回归分析显示,淋巴结转移($P = 0.004$)和 TNM 分期(Ⅲ + Ⅳ)(均 $P < 0.01$)是影响食管鳞癌患者生存时间的危险因素,多因素 Cox 回归显示 TNM 分期(Ⅲ + Ⅳ)是影响患者生存期的独立危险因素($P < 0.001$)。见表 3。

表2 食管鳞癌患者不同临床病理特征中 SP1 蛋白表达的比较

项目	例数 <i>n</i> (%)	食管鳞癌中 SP1 的表达		χ^2 值	P 值
		低表达	高表达		
性别					
男	46	29(63.04)	17(36.96)	4.168	0.041
女	24	9(37.50)	15(62.50)		
年龄(岁)					
≤60	36	14(38.89)	22(61.11)	1.396	0.237
>60	34	18(52.95)	16(47.06)		
分化程度					
高分化	18	12(66.67)	6(33.33)	4.318	0.038
中低分化	52	20(38.46)	32(61.54)		
浸润深度					
T1 + T2	24	15(62.50)	9(37.50)	4.168	0.041
T3 + T4	46	17(36.96)	29(63.04)		
淋巴结转移					
无	37	19(51.35)	18(48.65)	1.008	0.315
有	33	13(39.39)	20(60.60)		
TNM 分期					
I 期 + II 期	41	21(51.22)	20(48.78)	1.126	0.270
III 期 + IV 期	29	11(37.93)	18(62.07)		

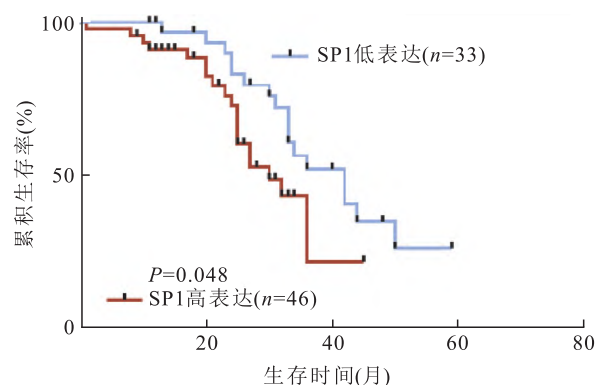


图2 SP1 蛋白的表达情况与食管鳞癌患者预后关系的生存曲线图

2.4 沉默 SP1 后食管鳞癌细胞的 SP1 蛋白表达情况 为摸索 SP1 siRNA 的最佳的作用浓度,我们选取食管鳞癌 Eca109 细胞系进行 Western blot 实验,以检测不同 SP1 siRNA 浓度(100、120、140 nmol/ml)作用下 SP1 的表达水平。结果显示,与对照组相比,转染浓度在 140 nmol/ml、作用 48 h 的 Western blot 条带最浅,沉默效果最佳(图 3)。

2.5 沉默 SP1 对食管鳞癌细胞增殖的影响 CCK-8 细胞增殖实验结果显示,沉默 SP1 后,食管鳞癌

Eca109 细胞系培养至 48 h 时,si-SP1 组与 si-Control 组的细胞增殖能力开始出现明显差异($t = 5.377, P < 0.001$);而对于食管鳞癌 EC9706 细胞系,在沉默 SP1 后培养至 24 h 时,增殖能力就已出现明显差异($t = 2.340, P = 0.047$);随着培养时间的延长,待细胞培养至 96 h 时,食管鳞癌 Eca109 细胞系($t = 8.722, P < 0.001$)和 EC9706 细胞系($t = 8.635, P < 0.001$)中 si-SP1 组的细胞增长能力均低于 si-Control 组(图 4)。平板克隆实验结果同样提示,食管鳞

表 3 食管鳞癌患者生存预后独立危险因素单、多因素 Cox 回归分析

变量	单因素分析			多因素分析		
	HR	95% CI	P 值	HR	95% CI	P 值
SP1 表达 (IS ≤8/ >8)	0.619	0.826 ~ 3.158	0.161	2.145	0.995 ~ 4.622	0.051
性别 (男性/女性)	0.888	0.411 ~ 1.512	0.473	0.852	0.425 ~ 1.705	0.650
年龄 (≤59 岁/ >59 岁)	0.650	0.340 ~ 1.242	0.192	0.559	0.272 ~ 1.152	0.115
部位 (上段/中段/下段)	0.702	0.308 ~ 1.600	0.400	0.478	0.180 ~ 1.268	0.138
分化 (低/中/高)	0.999	0.511 ~ 1.954	0.997	0.506	0.231 ~ 1.109	0.089
远处转移 (有/无)	0.528	0.288 ~ 0.966	0.038	5.875	0.438 ~ 78.857	0.181
浸润深度 (T3 ~ T4)	1.580	0.803 ~ 3.108	0.185	0.710	0.261 ~ 1.934	0.503
淋巴结转移 (是/否)	2.626	1.366 ~ 5.048	0.004	0.721	0.242 ~ 2.144	0.556
TNM 分期 (Ⅲ + Ⅳ/ Ⅰ + Ⅱ)	3.265	2.029 ~ 5.251	<0.001	9.415	2.646 ~ 33.503	0.001

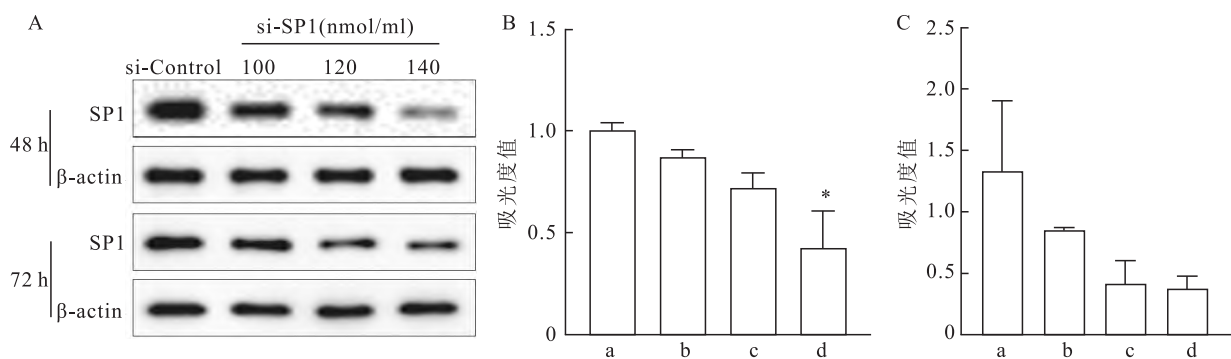


图 3 不同 SP1 siRNA 浓度转染 Eca109 细胞系后 SP1 蛋白的表达

A: Western blot 蛋白表达条带图; B, C: Western blot 条带灰度值结果 (48h、72h); a: si-Control 组; b: si-SP1 (100 nmol/ml) 组; c: si-SP1 (120 nmol/ml) 组; d: si-SP1 (140 nmol/ml) 组; 与 si-Control 组比较: * $P < 0.05$

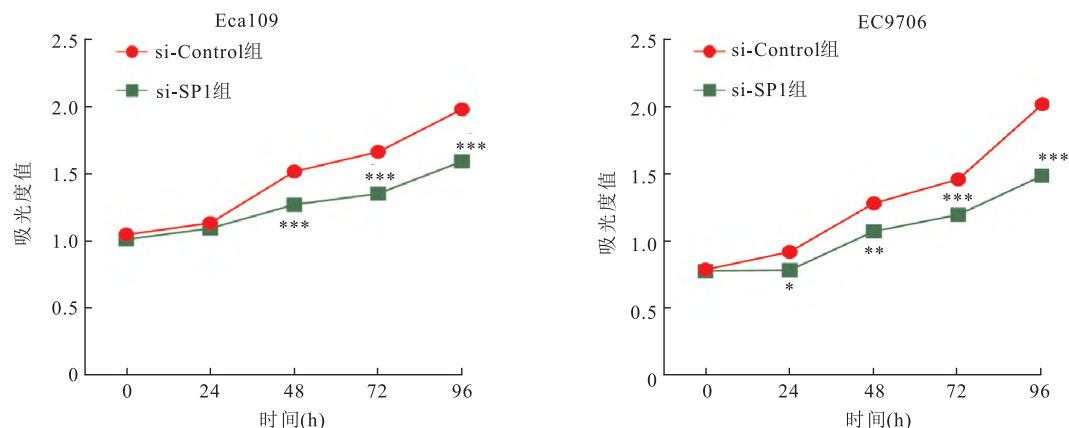


图 4 沉默 SP1 后食管鳞癌细胞 (Eca109、EC9706) 的增殖能力

与 si-Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

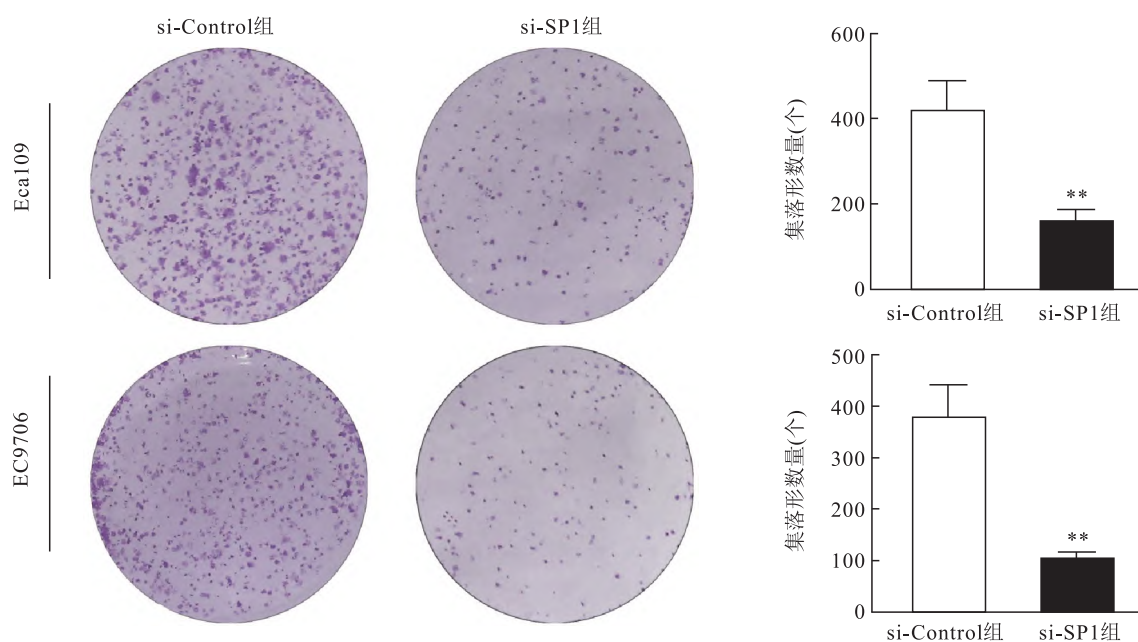


图5 沉默 SP1 后食管鳞癌细胞(Eca109、EC9706)的集落形成能力

与 si-Control 组比较: ** $P < 0.01$

癌 Eca109 细胞系中, si-SP1 组的集落形成能力明显低于 si-Control 组($t = 6.332, P < 0.001$), 在食管鳞癌 EC9706 细胞系中, si-SP1 组的集落形成能力低于 si-Control 组($t = 7.690, P < 0.001$, 图 5)。以上实验结果表明沉默 SP1 可以抑制食管鳞癌细胞的增殖。

2.6 沉默 SP1 对食管鳞癌细胞凋亡的影响 在食管鳞癌 Eca109 细胞系中, si-SP1 组凋亡指数(16.38 ± 4.01)高于 si-Control 组凋亡指数(6.72 ± 2.68), 差异具有统计学意义($t = 3.69, P < 0.05$); 在食管鳞癌 EC9706 细胞系中, si-SP1 组凋亡指数(11.77 ± 3.31)高于 si-Control 组凋亡指数(5.80 ± 2.18), 差异具有统计学意义($t = 4.91, P < 0.001$)。提示沉默 SP1 蛋白可以促进食管鳞癌细胞的凋亡。见图 6。

3 讨论

食管鳞状细胞癌在肿瘤中具有较高的发生率, 生存预后较差, 缺乏有效的治疗方案^[7]。食管癌的发生发展机制较为复杂, 与多种影响因素相关^[8], 探索食管鳞癌发生发展的机制以寻求食管鳞癌新型治疗手段已成为当前研究的目标。截止目前, SP1 蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其对食管鳞癌细胞增殖、凋亡的生物学行为影响的研究较少。在本研

究中, 免疫组化发现 SP1 在食管鳞癌组织中的表达高于癌旁正常组织, 且主要表达在食管鳞癌组织的细胞核内。SP1 蛋白在女性、低中分化及浸润深度 T3 ~ T4 级的食管鳞癌组织中表达率更高, Cox 单因素回归分析提示有远处转移、淋巴结转移和 TNM 分期是影响食管鳞癌患者生存时间的危险因素, TNM 分期是影响患者生存期的独立危险因素。

SP 家族转录因子在多种细胞过程中起着至关重要的作用, SP1、SP3 和 SP4 调控多种癌症相关的基因, 这些基因参与细胞周期、细胞增殖、细胞分化和凋亡^[9]。有研究^[10]表明, 转录增强因子 1 可以通过激活 SP1 促进结直肠癌细胞增殖。此外, SP1 还可以与 RasGRP1 启动子结合, 促进其转录, 进而诱导肝细胞的增殖^[11]。另有研究^[12]证明, 甘草查尔酮 A 通过下调 SP1 的表达诱导口腔鳞癌细胞的凋亡。本研究利用 SP1 siRNA 转染食管鳞癌 Eca109 和 EC9706 细胞系, 通过 CCK-8 细胞增殖试验、克隆实验发现 si-SP1 组的细胞增殖能力及集落形成能力明显低于 si-Control 组, si-SP1 组的细胞凋亡指数明显高于 si-Control 组。本研究在 Eca109 和 EC9706 两株食管鳞癌细胞系中验证了 SP1 蛋白对食管鳞癌细胞增殖及凋亡, 补充了 SP1 蛋白在食管鳞癌发生

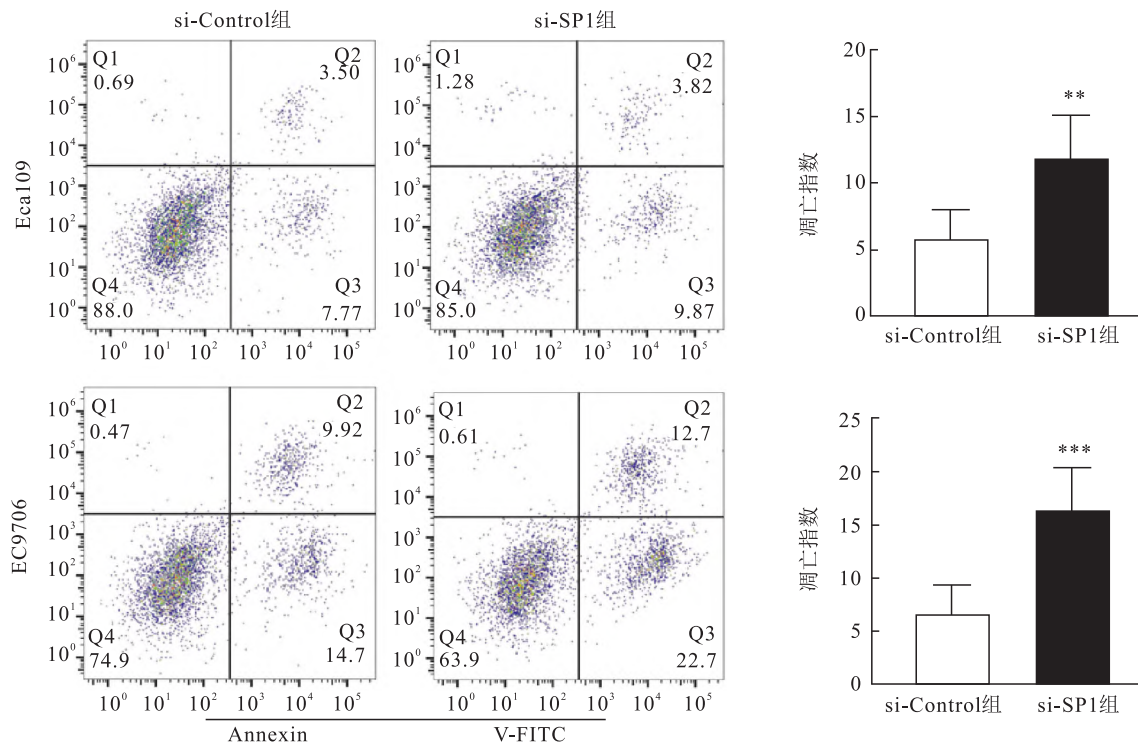


图6 沉默SP1后食管鳞癌细胞(Eca109、EC9706)的凋亡能力

与 si-Control 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

发展过程中关系的相关研究。有研究^[13]表明在食管鳞癌中长链非编码 RNA FGD5-AS1 作为 microRNA-383 上的竞争内源性 RNA, 可通过增加 SP1 的表达来增强食管鳞状细胞癌的恶性特征, 这与本研究的结果一致。这些研究提示, SP1 具有促进食管鳞癌发生发展的作用。

综上所述, 本研究表明 SP1 在食管鳞癌组织中高表达, 并且沉默 SP1 能够抑制食管鳞癌细胞的增殖和凋亡, SP1 可能成为食管鳞癌潜在的分子治疗靶点。但是 SP1 在食管鳞癌组织中高表达的分子机制尚未明确, 未来将通过细胞学实验和动物实验进一步探究 SP1 在食管鳞状细胞癌中表达的发生机制, 更深层次探索 SP1 在食管鳞癌进展中的作用。

参考文献

- [1] Zhou S, Yang Y, Zhang Q, et al. Analysis of the prognostic factors of simultaneous integrated boost-intensity modulated radiation therapy (SIB-IMRT) in 220 cases of locally advanced squamous esophageal cancer: a retrospective cohort study [J]. Ann Transl Med, 2023, 11(2): 103.
- [2] Bregni G, Beck B. Toward targeted therapies in oesophageal cancers: an overview [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(6): 1522.
- [3] Dabsha A, Elkhartoby I A M H, Yaghmour M, et al. Novel mediastinoscope-assisted minimally invasive esophagectomy for esoph-

ageal cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Ann Surg Oncol, 2023, 30(7): 4030–9.

- [4] Wei L, Shao M, Zhao Y, et al. Functional role of PLCE1 intronic insertion variant associated with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2018, 39(2): 191–201.
- [5] Jiang J F, Zhou Z Y, Liu Y Z, et al. Role of Sp1 in atherosclerosis [J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(10): 9893–902.
- [6] Beishline K, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and the 'hallmarks of cancer' [J]. FEBS J, 2015, 282(2): 224–58.
- [7] Sun G, Yang Y, Liu J, et al. Cancer stem cells in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Pathol Res Pract, 2022, 237: 154043.
- [8] 李政奇, 陈志浩, 王贵齐. 食管微生态与食管癌发生发展关系的研究进展 [J]. 中国肿瘤, 2017, 26(11): 899–903.
- [9] Sankpal U T, Goodison S, Abdelrahim M, et al. Targeting Sp1 transcription factors in prostate cancer therapy [J]. Med Chem, 2011, 7(5): 518–25.
- [10] Yu M H, Zhang W. TEAD1 enhances proliferation via activating SP1 in colorectal cancer. [J] Biomed Pharmacother, 2016, 83: 496–501.
- [11] Bai X, Deng H. Research progress on relationship between transcription factor Sp1 and tumor [J]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2010, 39(2): 215–20.
- [12] Cho J J, Chae J I, Yoon G, et al. Licochalcone A, a natural chalconoid isolated from Glycyrrhiza inflata root, induces apoptosis via Sp1 and Sp1 regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Oncol, 2014, 45(2): 667–74.

[13] Gao J, Zhang Z, Su H, et al. Long noncoding RNA FGD5-AS1 acts as a competing endogenous RNA on microRNA-383 to enhance the malignant characteristics of esophageal squamous cell

carcinoma by increasing SP1 expression[J]. *Cancer Manag Res*, 2020,12:2265–78.

Expression of SP1 in esophageal squamous cell carcinoma and its effect on proliferation and apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma cells

Huang Hongfang¹, Lu Xiangyun¹, Sun Mengfei¹, Cui Xiaobin^{1,2}

(¹Dept of Basic medicine, Shihezi University, Shihezi 832002; ²Dept of Pathology, Nanjing Drum Tower Hospital, The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008)

Abstract Objective To investigate the expression of Specific protein1 (SP1) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and adjacent normal tissues and its effect on the proliferation and apoptosis of ESCC cells. **Methods**

The expression of SP1 protein in 121 ESCC tissues and 74 adjacent normal tissues was detected by immunohistochemistry. Chi-square test and Cox regression analysis were used to analyze the relationship between SP1 and clinicopathological parameters and survival prognosis of ESCC patients. SP1 siRNA (small interfering RNA) was constructed and transfected into esophageal squamous cell carcinoma Eca109 and EC9706 cell lines. Western blot was used to detect the expression of SP1 after transfection. The effects of SP1 on the proliferation and apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma cells were detected by cloning assay, CCK-8 cell proliferation assay and flow cytometry. **Results** SP1 protein was expressed in the nucleus of esophageal squamous cell carcinoma tissues, and the expression rate of SP1 protein in esophageal squamous cell carcinoma tissues was significantly higher than that in adjacent normal tissues ($\chi^2 = 20.568$, $P < 0.01$). Comparison between groups showed that the high expression rate of SP1 was higher in female ($P = 0.041$), moderately or poorly differentiated ($P = 0.038$) and T3–T4 invasion depth ($P = 0.041$) ESCC(esophageal squamous cell carcinoma) patients. Log-rank test showed that the survival time of patients with high expression of SP1 was shorter than that of patients with low expression of SP1 ($P = 0.048$). Multivariate Cox regression analysis showed that TNM (tumor node metastasis classification) stage (III + IV) was a potential risk factor for shorter survival time in patients with esophageal squamous cell carcinoma ($P < 0.001$). Cell biological experiments showed that compared with the control group, the proliferation ability of esophageal squamous cell carcinoma cell lines decreased ($P < 0.05$) and the apoptosis index increased ($P < 0.05$) after silencing SP1. **Conclusion** SP1 protein is highly expressed in human esophageal squamous cell carcinoma tissues and is associated with poor prognosis in patients. Silencing SP1 can inhibit the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells and promote their apoptosis.

Key words specific protein 1; esophageal squamous cell carcinoma; proliferation; apoptosis; prognosis