

硼替佐米抑制胰腺癌细胞恶性生物学行为和肝转移

陈崑峰¹, 黄 星^{1,2}

(¹ 浙江大学医学院, 杭州 310058; ² 浙江省胰腺病研究重点实验室, 杭州 310009)

摘要 目的 探究硼替佐米在抑制胰腺癌细胞恶性生物学行为和肝转移方面的潜能。方法 以 KPC 和 Panc02 细胞为研究对象, 利用 CCK-8 实验用于检测硼替佐米对胰腺癌细胞活力的影响, 并计算半抑制浓度 (IC₅₀) 值; 通过 EdU 染色检测硼替佐米对胰腺癌细胞活力的影响; 凋亡实验用于检测硼替佐米对胰腺癌细胞的促凋亡作用; 集落形成、细胞划痕和 Transwell 实验检测硼替佐米对胰腺癌细胞集落形成、迁移和侵袭能力的影响; qRT-PCR 和 Western blot 用于检测硼替佐米对细胞上皮间质转化 (EMT) 相关标志物分子, 包括 *Cdh1*、*Cdh2*、*Vim* 和 *Snail* 基因, E-cadherin 蛋白 (上皮钙黏蛋白)、神经钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 和 Snail 蛋白表达的影响; 动物脾转肝模型用于评估硼替佐米对于抑制胰腺癌肝转移的治疗价值。结果 CCK-8 实验显示硼替佐米能降低胰腺癌 KPC 和 Panc02 细胞的活力 ($P < 0.0001$), IC₅₀ 值分别约为 118.70 nmol/L 和 34.16 nmol/L; EdU 实验显示硼替佐米能抑制胰腺癌细胞的增殖能力 ($P < 0.01$); 凋亡实验显示硼替佐米能促进胰腺癌细胞发生早期凋亡和晚期凋亡 ($P < 0.05$); 集落形成、细胞划痕和 Transwell 实验显示硼替佐米能抑制胰腺癌细胞的集落形成、迁移和侵袭能力 ($P < 0.01$); qRT-PCR 和 Western blot 实验显示硼替佐米能够改变胰腺癌细胞 EMT 相关标志物分子的 mRNA ($P < 0.0001$) (*Cdh1* 基因表达水平提高, *Cdh2*、*Vim* 和 *Snail* 基因表达水平降低) 和蛋白 (E-cadherin 蛋白水平提高, N-cadherin、Vimentin 和 Snail 蛋白水平降低) 表达; 动物脾转肝模型表明硼替佐米能够有效限制胰腺癌肝转移能力 ($P < 0.01$)。结论 硼替佐米能够抑制胰腺癌细胞多种恶性生物学行为和肝转移, 可能是胰腺癌治疗的潜在药物。

关键词 硼替佐米; 胰腺癌; 上皮间质转化; 肝转移; 迁移; 侵袭

中图分类号 R735.9

文献标志码 A

2025-02-07 接收

基金项目: 浙江省自然科学基金杰出青年基金项目 (编号: LR22H160010)

作者简介: 陈崑峰, 男, 硕士研究生;

黄 星, 男, 博士, 特聘研究员, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: huangxing66@zju.edu.cn

胰腺癌被称为“癌中之王”, 有着较高的发病率和极高的致死率^[1]。根据最近相关统计数据, 全球胰腺癌新发病例数已达约 49.6 万, 其发病率在所有癌症中位居第十二位, 死亡率为第六位^[2]。目前, 中国胰腺癌发病率及病死率也逐年增加, 2022 年新发病例人数约为 11.87 万人, 死亡人数约为 10.63

cancer tissues was higher than that in adjacent non-tumour tissues ($P < 0.05$), and its expression level of the protein was significantly and positively correlated with the tumor size, histological grade, lymph node metastasis and Ki-67 proliferation index ($P < 0.05$). The Kaplan-Meier survival curve showed that high expression of HSPA8 was significantly associated with poor prognosis in breast cancer patients ($P < 0.05$). CCK-8, clone formation, transwell, cell scratch, Western blot and immunofluorescence assay showed that knockdown of HSPA8 expression could significantly inhibit the proliferation, invasion, migration function and EMT of breast cancer cells ($P < 0.05$), while overexpression of HSPA8 could significantly promote the proliferation, invasion, migration function and EMT of breast cancer cells ($P < 0.05$). **Conclusion** HSPA8 is highly expressed in breast cancer tissues, which is closely related to disease progression and the malignant phenotype of breast cancer, suggesting that HSPA8 may be a potential biological target for breast cancer treatment.

Key words HSPA8; breast cancer; proliferation; invasion; migration; EMT

Found program National Natural Science Foundation of China (No. 82473059)

Corresponding author Wu Zhengsheng, E-mail: wuzhengsheng@ahmu.edu.cn

万人^[3]。随着老龄化进程加剧,有研究^[4]预测,到2050年,全球胰腺癌发病率可增加至18.6/10万人,年均增长率约为1.1%。目前临床胰腺癌治疗最为有效的方式依旧是手术切除,但临床确诊胰腺癌时患者往往伴发转移灶的形成,这给手术治疗带来了极大的挑战^[5]。因此,探究新的治疗方式对于改善胰腺癌患者预后有着重要价值。

硼替佐米是一种硼酸肽类蛋白酶体抑制剂,因其具有较为明显的抗肿瘤效果而被美国食品药品监督管理局批准应用于临床治疗^[6]。近年来,随着硼替佐米在血液系统肿瘤治疗中的良好疗效得到印证,部分研究者也尝试将其推广应用于实体肿瘤,如硼替佐米被证明可上调结直肠癌细胞中Fas死亡受体表达量,与阿霉素的联用可以显著提升其抑癌作用^[7]。然而,硼替佐米在胰腺癌中是否能发挥其抗肿瘤生长作用,尤其能否抑制其转移,目前尚不明确。该研究旨在探索硼替佐米对胰腺癌细胞恶性生物学行为的影响,并探索其是否在抑制胰腺癌肝转移中发挥功效,为将来硼替佐米应用于临床胰腺癌治疗提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 鼠源胰腺癌细胞系KPC及Panc02购于中国科学院细胞库。

1.1.2 动物 本研究中所使用20只6周龄雄性C57BL/6小鼠购于杭州医学科学院,在浙江大学医学院附属第一医院庆春院区实验动物中心的SPF级环境中饲养,每只小鼠体质量约为20g。小鼠饲养环境为12h昼夜交替,饮食自由。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清、McCoy's 5A培养基、氯仿和TRIzol试剂(美国赛默飞世尔科技公司,货号:A5256701,16600082、C298-500和15596018CN);DMEM培养基和青-链霉素(北京索莱宝生物科技有限公司,货号:SH30022.01B、HZ90307-100);CCK-8试剂盒(上海陶术生物科技有限公司,货号:CT-K-5);玉米油、多聚甲醛、结晶紫染色液、RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、EdU-488细胞增殖检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、二抗:辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、目的蛋白一抗:小鼠抗小鼠上皮钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin)、兔抗小鼠神经钙黏蛋白(neural cadherin, N-cadherin)、兔抗小鼠波形蛋白(Vimentin)和小

鼠抗小鼠 α -微管蛋白(α -tubulin, α -Tubulin)(上海碧云天生物技术公司,货号:ST1177、P0099、C0121、P0013C、P1005、P1081、C0071S、P0012、A0350、A0352、AF0138、AG1554、AG3556和AF2827);反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:P612-01);凋亡试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,货号:AP101C);硼替佐米(美国Selleck生物科技有限公司,货号:S1013);兔抗小鼠Snail蛋白(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号:A5544);qRT-PCR试验中相关引物购自生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.4 主要仪器 CO₂恒温细胞培养箱(德国Heraeus公司,型号:HERAcell 240i),倒置显微镜及荧光显微镜(德国Leica公司,型号:DM ILM、DMi8-M),细胞超净工作台(香港Healfore公司,型号:OptiClean1300),紫外分光光度计(美国NanoDrop公司,型号:NanoDrop 2000/2000c),化学发光成像系统(上海勤翔公司,型号:ChemiScope 6100),荧光定量PCR仪(美国Thermo公司,型号:QuantStudio 3),多功能酶标仪(美国BioTek公司,型号:Synergy H1),蛋白电泳转膜系统(美国Bio-Rad公司,型号:1703935),Beckman Cytoflex流式细胞仪(美国Beckman公司,型号:CytoFLEX S)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代 胰腺癌细胞株KPC和Panc02分别使用McCoy's 5A培养基和DMEM培养基(内含有10%胎牛血清及1%的青-链霉素)进行培养,细胞培养箱环境为37℃、5%CO₂。光学显微镜下观察细胞状态,当细胞生长至密度约为90%时进行细胞消化及传代。

1.2.2 CCK-8实验 在96孔板中分别接种KPC及Panc02细胞(8000个/孔),待细胞贴壁后加入含相应硼替佐米药物浓度(KPC细胞为5、10、20、40、80、160、320和640nmol/L, Panc02细胞为1.25、2.5、5、10、20、40、80和160nmol/L)的完全培养基,培养18h,将原有培养基替换为含有CCK-8试剂的培养基(每100 μ L含有10 μ L试剂),培养箱中避光孵育1h,使用多功能酶标仪测量450nm处吸光度值并记录。

1.2.3 细胞凋亡实验 在6孔板里分别接种KPC和Panc02细胞(5×10^5 个/孔),使用含相应硼替佐米药物浓度的完全培养基处理细胞18h(KPC和Panc02细胞的具体浓度分别为20nmol/L和10nmol/L),消化细胞,在1000r/min的条件下离心5

min 并洗涤细胞沉淀,取 500 μL \times Binding Buffer 重悬细胞,每孔细胞加入 10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,轻柔混匀并室温避光孵育 5 min,上机检测并记录数据(Annexin + PI - 标记的细胞为早期凋亡细胞,而 Annexin + PI + 标记的细胞为晚期凋亡)。

1.2.4 细胞培养 分别将处于对数生长期的 KPC 和 Panc02 细胞(5×10^5 个/孔)接种到 6 孔板中,待细胞贴壁后将培养基换为含相应硼替佐米药物浓度的培养基(KPC 和 Panc02 细胞的具体浓度分别为 20 nmol/L 和 10 nmol/L),培养 18 h。

1.2.5 EdU 染色实验 将硼替佐米药物培养好的 KPC 和 Panc02 细胞用 PBS 润洗数遍,并根据试剂说明书进行后续操作。简述如下:配置 $2 \times$ EdU 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 预热后与培养基 1 : 1 混匀并加入孔板中,继续培养 2 h,弃上清液后依次加入 4% 多聚甲醛固定 15 min,通透液孵育 10 min,PBS 洗涤数遍后每孔加入 0.5 mL Click 反应液,室温避光孵育 30 min,弃反应液后加入试剂盒中染核试剂并避光孵育 10 min,洗净后拍照并统计。

1.2.6 集落形成实验 将硼替佐米药物培养好的 KPC 和 Panc02 细胞消化并计数,以每孔 500 个细胞接种到 6 孔板中并每组设置 3 个复孔,后续每隔 2 ~ 3 d 更换 1 次培养基,培养约 10 ~ 14 d,当肉眼可见细胞团块时终止培养,PBS 润洗数遍后,依次使用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min 以及 0.1% 结晶紫染色 30 min,最后使用 PBS 洗净晾干并拍照及统计。

1.2.7 细胞划痕实验 在 6 孔板里分别接种 KPC 和 Panc02 细胞(9×10^5 个/孔),使细胞均匀分布于孔板中,待细胞长满整个孔板后,使用灭菌 200 μL 枪头划线并清洗漂浮细胞团块,寻找合适位置拍摄记录 0 h 图片,后续更换为含相应硼替佐米药物浓度(分别为 20 nmol/L 和 10 nmol/L)的无血清培养基进行培养,16 h 后重复拍摄并统计。

1.2.8 Transwell 实验 将硼替佐米药物培养好的 KPC 和 Panc02 细胞消化并使用无血清培养基重悬计数,在 Transwell 上室(侵袭实验的小室提前用 100 μL 稀释的基质胶 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜)中加入 200 μL 上述细胞悬液(5×10^4 个),下室加入 700 μL 完全培养基。培养 24 h 后,依次使用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 ~ 30 min,0.1% 结晶紫染色 30 min,后续使用棉签将上室中未穿膜细胞轻轻擦去,洗涤干净后使用显微镜观察并拍照统计。

1.2.9 细胞 RNA 提取及 qRT-PCR 实验 将硼替佐米药物培养好的 KPC 和 Panc02 细胞在 1 000 r/

min 的条件下离心 5 min,收集细胞沉淀,使用 TRIzol 及氯仿提取细胞 RNA,检测 RNA 浓度与纯度,后续使用反转录试剂盒将其逆转录为 cDNA,并将 cDNA 原液稀释 4 倍,后续按 5 : 1 : 3 : 1 的比例向 384 孔板中依次添加荧光染料、引物体系、双蒸水及稀释后的 cDNA(每孔总计 10 μL 溶液)并放入 qRT-PCR 仪中进行相应反应。所使用引物序列如下: β -Actin,(正义链)5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3',(反义链)5'-TGTAGTTTGTGGCTCCGAGAT-3';Cdh1,(正义链)5'-TCCTGCTGCTCCTACTGTTTCTAC-3',(反义链)5'-TCTTCTCCACCTCCTTCTTCATCATAG-3';Cdh2,(正义链)5'-CCATCATCGCTATCCTTCTGTG-TATC-3',(反义链)5'-CGCTCTTTATCCCGCCGTTTC-3';Vim,(正义链)5'-GCGTGGGCTGCTTCAAG-3',(反义链)5'-TCTCGTTGGTGGGCTGTTTC-3';Snail,(正义链)5'-TTCACCTTCCAGCAGCCCTAC-3',(反义链)5'-GTACCAGGAGAGAGTCCCAGATG-3'。

1.2.10 细胞蛋白提取及 Western blot 实验 将硼替佐米药物培养好的 KPC 和 Panc02 细胞在 1 000 r/min 的条件下离心 5 min,收集细胞沉淀并使用 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂配制细胞裂解液,冰上裂解细胞沉淀 20 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液并进行 BCA 定量。后续将 30 μg 总蛋白加入每孔泳道中,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并在恒流 300 mA 的条件下转膜 90 min,再使用 5% 奶粉室温封闭 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗(小鼠抗小鼠 E-cadherin、兔抗小鼠 N-cadherin、兔抗小鼠 Vimentin、小鼠抗小鼠 α -Tubulin 和兔抗小鼠 Snail 抗体,每种抗体浓度均为 1 : 1 000)孵育过夜,TBST 溶液洗膜 3 次(10 min/次)后,室温二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG,每种抗体浓度均为 1 : 10 000)孵育 1 h,并洗膜 3 次(10 min/次)后使用增强化学发光液检测蛋白条带。

1.2.11 C57BL/6 小鼠脾转肝模型 20 只 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠饲养在 SPF 环境中适应 7 d 后,分别将 KPC 及 Panc02 细胞悬液(2.5×10^5 个/25 μL)直接注射到小鼠脾脏被膜下。注射每种胰腺癌细胞的小鼠各自随机分成 2 组,待荷瘤后第 7 d,开始进行相应治疗。治疗组每 2 d 腹腔注射 0.5 mg/kg 硼替佐米,对照组注射等量玉米油溶剂。5 个疗程后,称取小鼠体质量并安乐处死,后续剥离完整肝脏组织并称量及拍照统计。该实验符合浙江大学医学院附属第一医院实验动物委员会要求,动物伦理

批件号:2023 实动快审第 1427 号。

1.2.12 统计学处理 本文实验独立重复 3 次,使用 GraphPad Prism 9 软件进行相应统计分析并作图,所有结果均使用均值 \pm 标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用 Dunnett' t 检验,两组间比较采用独立样本 t 检验,两组间多个时间点数据的比较采用重复测量资料方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硼替佐米对胰腺癌细胞增殖及凋亡的影响

两种鼠源胰腺癌细胞株 KPC 和 Panc02 被不同浓度的硼替佐米处理 18 h。CCK-8 实验结果表明,硼替佐米在 10 ~ 640 nmol/L 的浓度范围内能有效抑制胰腺癌细胞 KPC 细胞活力,在 10 ~ 160 nmol/L 的浓度范围内能有效抑制胰腺癌细胞 Panc02 细胞活力 ($t_{\text{KPC}} = 12.39, 30.95, 40.78, 46.40, 53.45, 60.63, 72.96, t_{\text{Panc02}} = 26.40, 52.59, 60.21, 63.64, 68.11$, 均 $P < 0.0001$, 图 1A), IC_{50} 分别约为 118.70 nmol/L 和 34.16 nmol/L (图 1B)。EdU 实验结果显示,和对照组相比,硼替佐米处理后的 KPC 和 Panc02 细胞的增殖能力明显降低 ($t = 6.40, 8.74$, 均 $P < 0.01$, 图 1C)。细胞凋亡试验结果显示,硼替佐米处理后胰腺癌细胞 KPC 早期、晚期凋亡率 ($t = 80.96, 51.57$, 均 $P < 0.0001$, 图 1D) 及 Panc02 早期、晚期凋亡率 ($t = 3.27, 27.97$, 均 $P < 0.05$, 图 1E) 均明显增加。提示该药物对胰腺癌细胞早期凋亡和晚期凋亡均有促进作用。

2.2 硼替佐米对胰腺癌细胞集落形成、迁移和侵袭能力的影响 为探究硼替佐米对胰腺癌细胞恶性生物学行为的影响,使用硼替佐米处理胰腺癌细胞 KPC 和 Panc02,集落形成实验显示,硼替佐米处理后 KPC 和 Panc02 细胞集落形成能力明显降低 ($t = 23.32, 5.21$, 均 $P < 0.01$, 图 2A、2B)。细胞划痕实验结果显示,硼替佐米处理后 KPC 和 Panc02 细胞划痕愈合速度明显慢于对照组 ($t = 5.20, 9.30$, 均 $P < 0.01$, 图 2C、2D)。Transwell 实验结果显示,硼替佐米处理后 KPC 和 Panc02 细胞迁移和侵袭能力明显降低 ($t_{\text{迁移}} = 8.60, 9.71, t_{\text{侵袭}} = 5.22, 6.92$, 均 $P < 0.01$, 图 2E、2F)。上述实验结果表明,硼替佐米能抑制胰腺癌细胞集落形成、迁移和侵袭能力。

2.3 硼替佐米对胰腺癌细胞上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关标志物分子的影响 qRT-PCR 实验表明,硼替佐米处理后的

胰腺癌细胞 KPC 和 Panc02 中 *Cdh1* 基因 (编码 E-cadherin 蛋白) 表达均上升 ($t = 26.73, 24.29$, 均 $P < 0.0001$), 而 *Cdh2* 基因 (编码 N-cadherin 蛋白)、*Vim* 基因 (编码 Vimentin 蛋白) 和 *Snail* 基因 (编码 Snail 蛋白) 表达均明显下降 ($t_{\text{KPC}} = 23.10, 11.96, 15.91, t_{\text{Panc02}} = 10.94, 12.09, 8.29$, 均 $P < 0.0001$), 见图 3A、3B。Western blot 实验显示,硼替佐米处理后的胰腺癌细胞 KPC 和 Panc02 中 E-cadherin 蛋白表达明显增加,相应的 N-cadherin 蛋白、Vimentin 蛋白和 Snail 蛋白表达均有不同程度的下降 (图 3C、3D)。上述结果表明,硼替佐米可能影响胰腺癌细胞 EMT。

2.4 硼替佐米对胰腺癌肝转移的影响 为进一步明确硼替佐米是否能在体内抑制胰腺癌肝转移,20 只 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠脾脏被膜下注射 KPC 或 Panc02 细胞悬液,接种 7 d 后分别将注射 KPC 或 Panc02 细胞小鼠随机分为对照组和硼替佐米治疗组 (图 4A)。治疗 5 个疗程后,可观察到硼替佐米治疗组小鼠肝脏表面转移灶数目明显少于对照组 ($t_{\text{KPC}} = 6.80, t_{\text{Panc02}} = 4.93$, 均 $P < 0.01$, 图 4B、4C), 且肝脏系数也明显下降 ($t_{\text{KPC}} = 4.19, t_{\text{Panc02}} = 5.01$, 均 $P < 0.01$, 图 4B、4C)。此外,相关结果还表明硼替佐米 (0.5 mg/kg) 治疗对小鼠体质量增加无明显作用 (均 $P > 0.05$, 图 4D、4E)。以上实验结果提示,硼替佐米能够有效抑制胰腺癌肝转移。

3 讨论

胰腺癌是一种高度恶性的肿瘤,起病隐匿,确诊时患者一般已处于晚期,预后极差^[8-9]。胰腺癌的恶性增殖特性主要表现为癌细胞在局部组织中的迅速扩散、侵袭周围器官以及通过血液或淋巴系统转移至远处脏器^[10]。肝脏是胰腺癌最常见的转移靶器官,癌细胞能经血液循环进入肝脏,并通过与肝脏血管内皮的相互作用、诱导局部免疫逃逸以及血管生成等,成功在肝脏建立新发转移灶。更为致命的是,一旦发生肝转移,患者预后显著恶化,且生存期明显缩短^[11-13]。目前,临床上胰腺癌肝转移的治疗效果较为有限,尽管化疗、靶向治疗和免疫疗法在某些情况下能暂时缓解患者症状,但由于胰腺癌特殊免疫微环境产生的耐药性,上述治疗手段收效甚微。因此,找到一个抑制胰腺癌肝转移较为有效的治疗手段成为胰腺癌临床治疗上亟须解决的难题。

硼替佐米作为一种蛋白酶体抑制剂,近年来已被证明对多种类型的肿瘤都具有抑制作用^[14-16]。

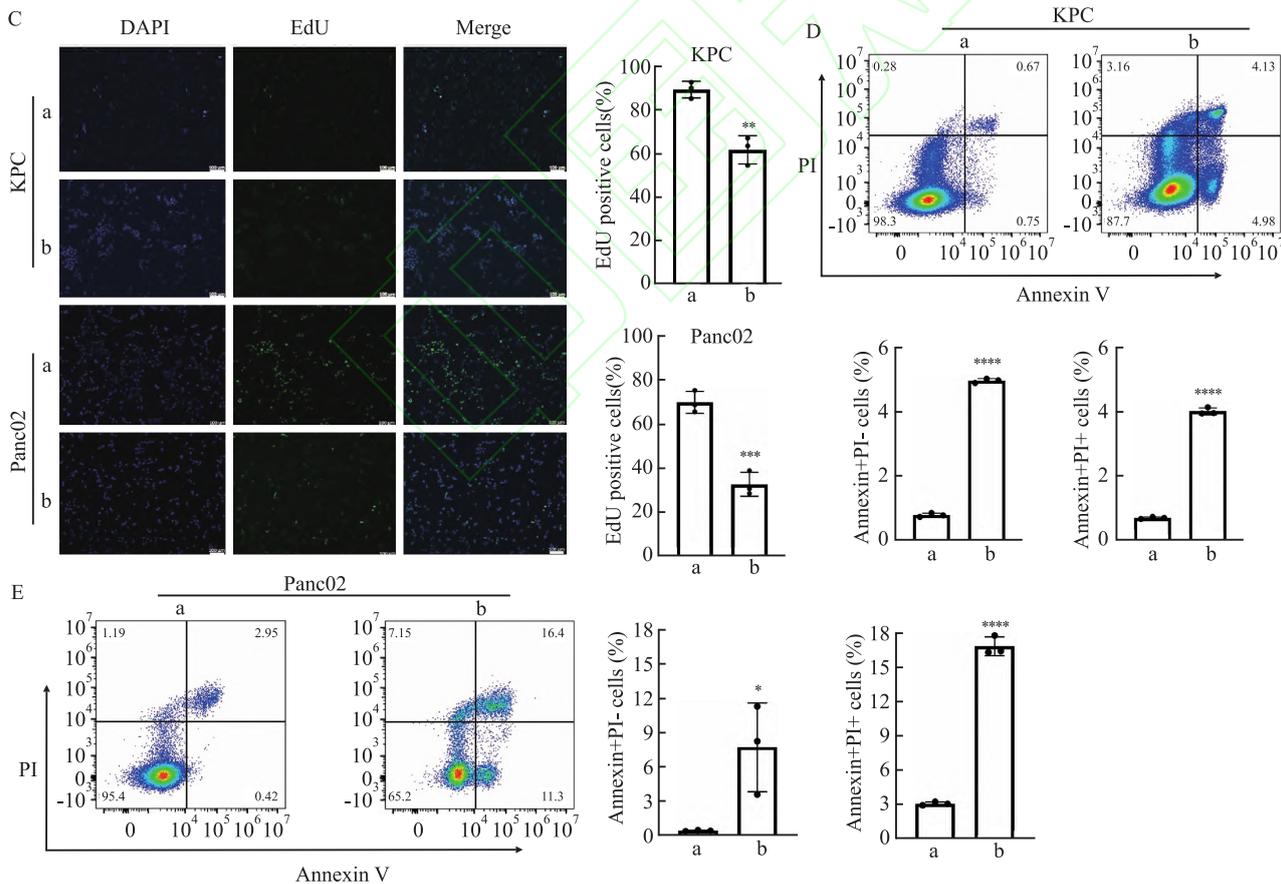
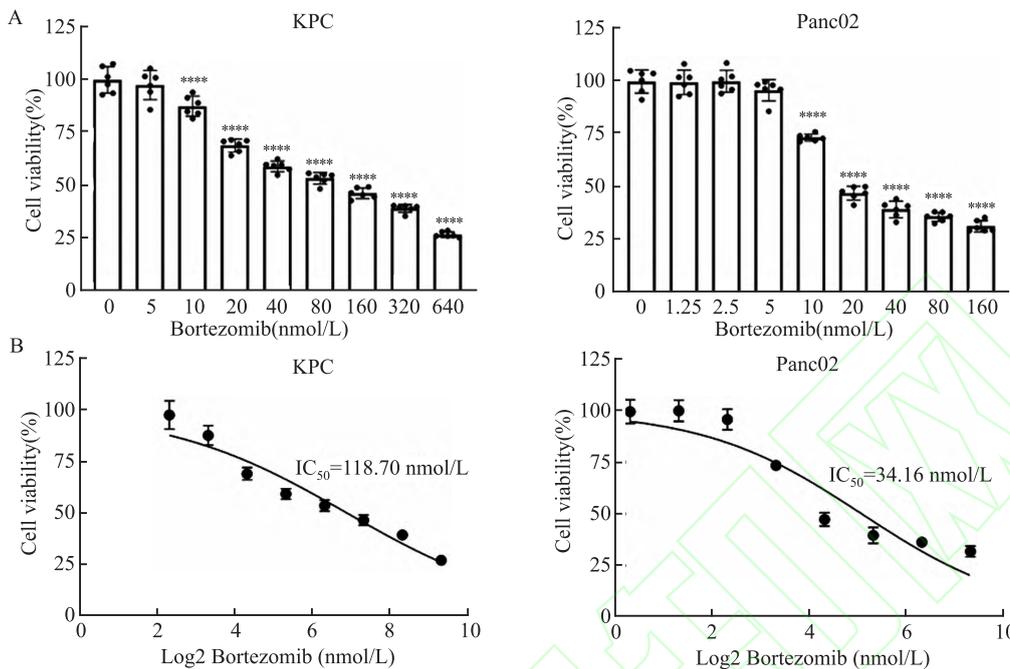


图 1 硼替佐米对胰腺癌细胞增殖及凋亡的影响

Fig. 1 Effect of bortezomib on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells

A, B: The cell viability of two murine pancreatic cancer cell lines (KPC and Panc02) detected by CCK-8 assay and the corresponding statistical graphs and IC₅₀ curves; C: The proliferation ability of pancreatic cancer cells in each group detected by EdU staining and its statistical map $\times 10$; D, E: Early and late apoptosis of pancreatic cancer cells in each group detected by apoptosis test and their statistical maps; a: Control group; b: Bortezomib group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Control group.

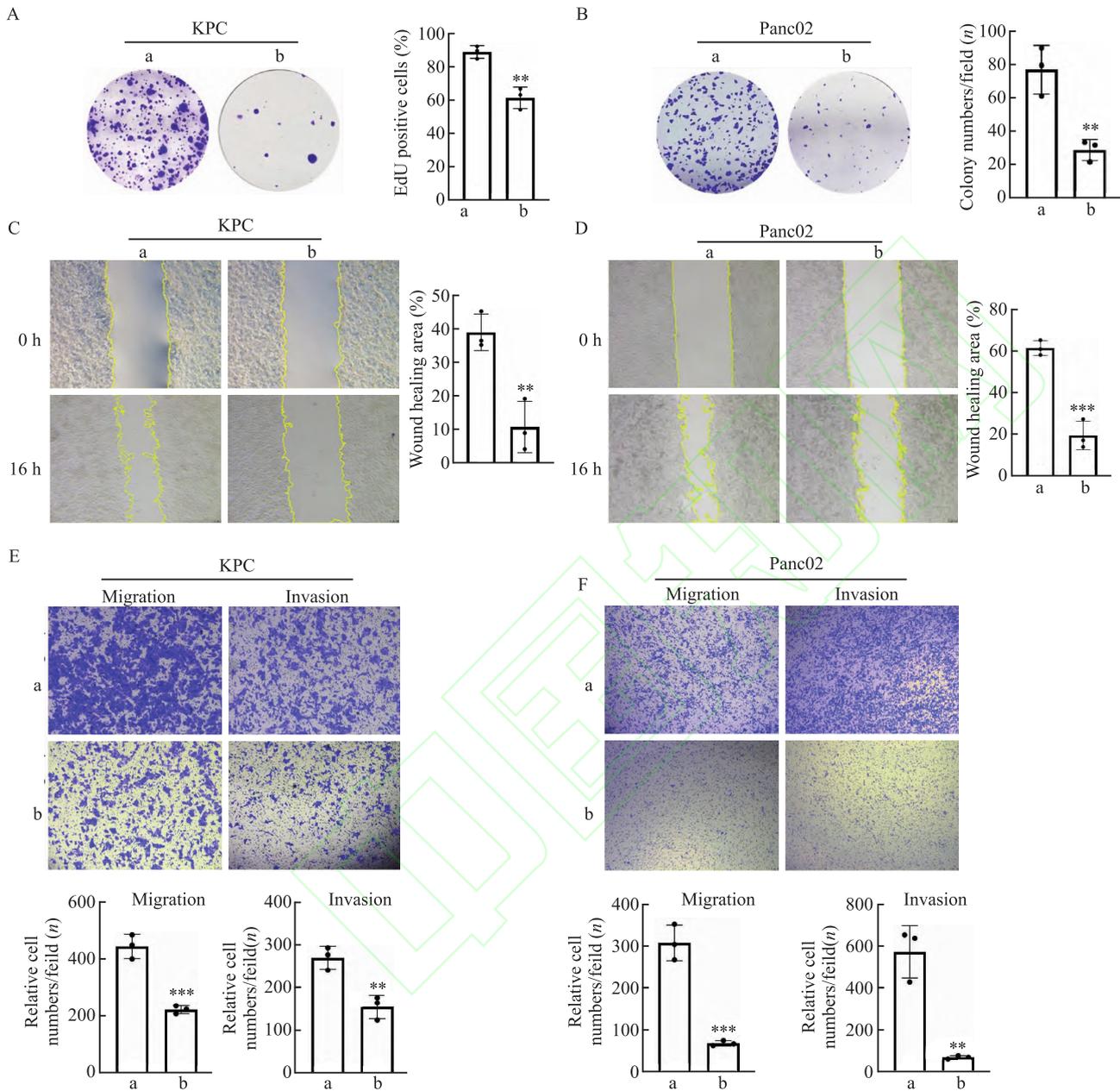


图2 硼替佐米对胰腺癌细胞集落形成、迁移和侵袭能力的影响

Fig.2 Effect of bortezomib on colony formation, migration and invasion of pancreatic cancer cells

A, B: The colony formation ability of pancreatic cancer cells in different groups detected by colony formation assay and their statistical maps; C, D: Wound healing ability of pancreatic cancer cells in different groups detected by scratch wound healing assay and its statistical plot $\times 10$; E, F: The migration and invasion ability of pancreatic cancer cells in different groups verified by Transwell assay and statistical plots $\times 10$; a: Control group; b: Bortezomib group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Control group.

因此,硼替佐米抑癌作用的相关机制受到了广泛关注,有研究报道硼替佐米能通过激活细胞启动凋亡进程来发挥抗肿瘤生长的作用^[17]。具体而言,硼替佐米可通过减少促凋亡蛋白 BAX 和 BAK 的降解,增加其寡聚化,进而促进细胞色素 C 进入胞质并激活细胞内的凋亡通路,最终诱导细胞凋亡的发生。相似的,本研究也发现硼替佐米能有效促进胰腺癌

KPC 和 Panc02 细胞发生凋亡,且对于早期凋亡与晚期凋亡均有促进作用。虽然上述研究表明,硼替佐米在多种癌症中发挥着出色的抗癌作用,但是其在胰腺癌中的研究很少,其是否发挥良好的抑癌作用,以及是否能在缓解胰腺癌肝转移方面展现有价值的作用尚未可知。故本研究聚焦于硼替佐米在胰腺癌中的作用,深入研究其是否可以抑制胰腺癌细胞相

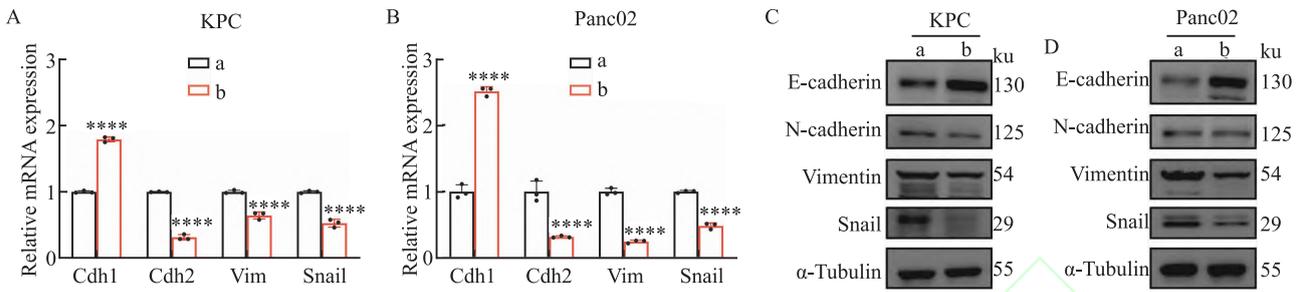


图3 硼替佐米对胰腺癌细胞 EMT 相关标志物分子的影响

Fig.3 Effect of bortezomib on EMT-related marker molecules in pancreatic cancer cells

A, B: qRT-PCR was used to detect the effect of bortezomib on the mRNA levels of EMT-related markers in pancreatic cancer cells KPC and Panc02; C, D: Western blot was used to detect the effect of bortezomib on the protein levels of EMT-related marker molecules in pancreatic cancer cells KPC and Panc02; a: Control group; b: Bortezomib group; **** $P < 0.0001$ vs Control group.

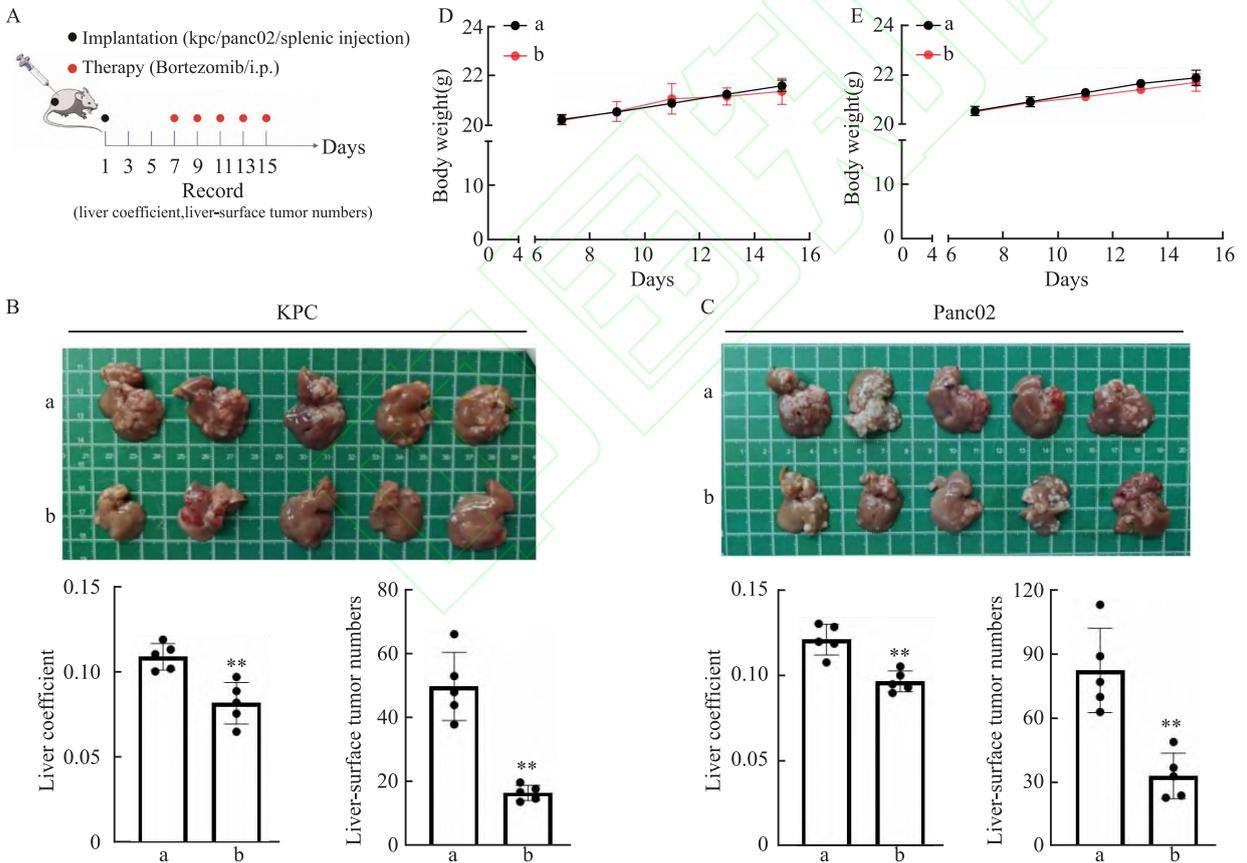


图4 硼替佐米对胰腺癌肝转移的影响

Fig.4 Effect of bortezomib on liver metastasis of pancreatic cancer

A: Schematic diagram of C57BL/6 mouse spleen to liver treatment model ($n = 5$); B, C: General comparison diagrams of liver morphology in each group of mice, statistical graphs of liver coefficient, and statistical graphs of liver surface metastatic foci in mice; D, E: Statistical plots of body weight changes of mice in each group; a: Control group; b: Bortezomib group; ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs Control group.

关的恶性生物学行为以及肝转移。本研究显示,硼替佐米能显著降低胰腺癌细胞 KPC 和 Panc02 的活力, IC_{50} 值分别约为 118.7 nmol/L 和 34.16 nmol/L, 且硼替佐米能显著抑制胰腺癌细胞的增殖、集落形

成、迁移和侵袭能力。鉴于 EMT 在肿瘤细胞迁移和侵袭过程中发挥着重要作用^[18-20], qRT-PCR 和 Western blot 实验被用于评估 EMT 相关标志物分子的表达情况, 本研究显示硼替佐米能在 mRNA 和蛋

白水平改变胰腺癌细胞内 EMT 相关标志物分子的表达,具体表现为上皮标志物 E-cadherin 的上调和间质标志物 N-cadherin、Vimentin、Snail 的下调,这进一步支持了硼替佐米通过抑制 EMT 来减弱肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。最后,本研究利用动物脾转移肝模型证明了硼替佐米能够有效限制胰腺癌肝转移能力。

综上所述,本研究证明了硼替佐米能有效抑制胰腺癌细胞增殖、集落形成、迁移和侵袭等多种恶性生物学行为,能诱导胰腺癌细胞发生凋亡,并且能够抑制胰腺癌细胞的肝转移。这为硼替佐米作为潜在的胰腺癌治疗药物提供了有力证据,尤其是在防止肝转移方面,提示其在临床应用中具有一定的潜在价值。然而,需要注意的是,本研究只观察到 EMT 相关标志物分子表达水平发生了变化,并未深入研究硼替佐米是通过何种机制影响上述分子的变化,这也是本研究局限所在,需要后续进一步深入探究。

参考文献

- [1] 蒋梦若,彭立嗣,夏传超,等. 循环肿瘤细胞在胰腺癌早期诊断及预后中的研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(11): 2059 - 64. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.023.
- [1] Jiang M R, Peng L S, Xia C C, et al. Research progress on circulating tumor cells for early diagnosis and prognosis of pancreatic cancer[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(11): 2059 - 64. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.023.
- [2] Klein A P. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(7): 493 - 502. doi: 10.1038/s41575-021-00457-x.
- [3] Han B F, Zheng R S, Zeng H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47 - 53. doi: 10.1016/j.jncc.2024.01.006.
- [4] Hu J X, Zhao C F, Chen W B, et al. Pancreatic cancer: a review of epidemiology, trend, and risk factors[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(27): 4298 - 321. doi: 10.3748/wjg.v27.i27.4298.
- [5] De Dosso S, Siebenhüner A R, Winder T, et al. Treatment landscape of metastatic pancreatic cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2021, 96: 102180. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102180.
- [6] Richardson P G, Sonneveld P, Schuster M W, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(24): 2487 - 98. doi: 10.1056/NEJMoa043445.
- [7] Feng X J, Yang G, Zhang L T, et al. TRIM59 guards ER proteostasis and prevents Bortezomib-mediated colorectal cancer (CRC) cells' killing[J]. *Invest New Drugs*, 2022, 40(6): 1244 - 53. doi: 10.1007/s10637-022-01306-7.
- [8] Yi L, Pan H, Ning Z, et al. Clinical and biomarker analyses of SHR-1701 combined with famitinib in patients with previously treated advanced biliary tract cancer or pancreatic ductal adenocarcinoma: a phase II trial[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 347. doi: 10.1038/s41392-024-02052-3.
- [9] Li J J, Chen X L, Zhu L Q, et al. SOX9 is a critical regulator of TSPAN8-mediated metastasis in pancreatic cancer[J]. *Oncogene*, 2021, 40(30): 4884 - 93. doi: 10.1038/s41388-021-01864-9.
- [10] Leong S P, Pissas A, Scarato M, et al. The lymphatic system and sentinel lymph nodes: conduit for cancer metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2022, 39(1): 139 - 57. doi: 10.1007/s10585-021-10123-w.
- [11] Astuti Y, Raymant M, Quaranta V, et al. Efferocytosis reprograms the tumor microenvironment to promote pancreatic cancer liver metastasis[J]. *Nat Cancer*, 2024, 5(5): 774 - 90. doi: 10.1038/s43018-024-00731-2.
- [12] Horn S R, Stoltzfus K C, Lehrer E J, et al. Epidemiology of liver metastases[J]. *Cancer Epidemiol*, 2020, 67: 101760. doi: 10.1016/j.canep.2020.101760.
- [13] Shahrestani S, Silverstein M, Nasrollahi T, et al. The influence of frailty on perioperative outcomes in patients undergoing surgical resection of liver metastases: a nationwide readmissions database study[J]. *Ann Gastroenterol*, 2023, 36(3): 333 - 9. doi: 10.20524/aog.2023.0787.
- [14] Yao X S, Hong J H, Nargund A M, et al. PBRM1-deficient PBAF complexes target aberrant genomic loci to activate the NF- κ B pathway in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(5): 765 - 77. doi: 10.1038/s41556-023-01122-y.
- [15] Zhu Y H, Jian X X, Chen S P, et al. Targeting gut microbial nitrogen recycling and cellular uptake of ammonium to improve bortezomib resistance in multiple myeloma[J]. *Cell Metab*, 2024, 36(1): 159 - 75. e8. doi: 10.1016/j.cmet.2023.11.019.
- [16] Li L, Zhang Y C, Zhou Y, et al. Quaternary nanoparticles enable sustained release of bortezomib for hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2022, 76(6): 1660 - 72. doi: 10.1002/hep.32584.
- [17] Van Stiphout C M, Luu A K, Vilorio-Petit A M. Proteasome inhibitors and their potential applicability in osteosarcoma treatment[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(19): 4544. doi: 10.3390/cancers14194544.
- [18] Lee J H, Sánchez-Rivera F J, He L, et al. TGF- β and RAS jointly unmask primed enhancers to drive metastasis[J]. *Cell*, 2024, 187(22): 6182 - 99. e29. doi: 10.1016/j.cell.2024.08.014.
- [19] Zhang N, Ng A S, Cai S, et al. Novel therapeutic strategies: targeting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(8): e358 - 68. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00343-0.
- [20] 王娟,刘蕾蕾,郝雅丽,等. lncRNA FUT8-AS1 通过调控 miR-142-5p/BCL2 轴促进上皮性卵巢癌细胞增殖、侵袭和 EMT[J]. 临床与实验病理学杂志, 2024, 40(9): 935 - 41. doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2024.09.008.

[20] Wang J, Liu L L, Hao Y L, et al. LncRNA FUT8-AS1 promotes proliferation, invasion, and EMT of epithelial ovarian cancer cells by regulating the miR-142-5p/BCL2 axis [J]. *Chin J Clin Exp*

Pathol, 2024, 40(9): 935–41. doi: 10.13315/j.cnki.cjcep.2024.09.008.

Bortezomib inhibits the malignant biological behaviors of pancreatic cancer cells and liver metastasis

Chen Yinfeng¹, Huang Xing^{1,2}

(¹Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058; ²Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pancreatic Disease, Hangzhou 310009)

Abstract Objective To investigate the potential of bortezomib in inhibiting the malignant biological behaviors and liver metastasis of pancreatic cancer cells. **Methods** KPC and Panc02 cell lines were used as a couple of working cells in this study. The CCK-8 assay was used to assess the effect of bortezomib on cell viability in murine pancreatic cancer cells, and the half inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated. The EdU assay was performed to evaluate the impact of bortezomib on the proliferation of these two cell lines. Apoptosis assays were conducted to investigate the pro-apoptotic effects of bortezomib on pancreatic cancer cells. Colony formation, scratch wound healing, and Transwell assays were used to examine the effects of bortezomib on the proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer cells. qRT-PCR and Western blot were employed to assess the impact of bortezomib on the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related markers, including *Cdh1*, *Cdh2*, *Vim* and *Snail* gene and E-cadherin protein, N-cadherin protein, Vimentin protein and Snail protein. An *in vivo* spleen-to-liver metastasis model was established to evaluate the therapeutic value of bortezomib in inhibiting pancreatic cancer liver metastasis. **Results** The CCK-8 assay showed that bortezomib significantly reduced the viability of KPC and Panc02 cells ($P < 0.0001$), with IC_{50} values of approximately 118.70 nmol/L and 34.16 nmol/L, respectively. The EdU assay showed that bortezomib markedly inhibited the proliferative capacity of pancreatic cancer cells ($P < 0.01$). Apoptosis assays showed that bortezomib promoted both early and late apoptosis in pancreatic cancer cells ($P < 0.05$). Colony formation, scratch wound healing, and Transwell assays showed that bortezomib effectively suppressed colony formation ($P < 0.01$), migration, and invasion ($P < 0.01$) of pancreatic cancer cells. qRT-PCR and Western blot analyses showed that bortezomib altered the expression of EMT-related markers at both the mRNA (the expression level of *Cdh1* gene increased, while the expression levels of *Cdh2*, *Vim* and *Snail* genes decreased.) ($P < 0.0001$) and protein (the expression level of E-cadherin protein increased, while the expression levels of N-cadherin protein, Vimentin protein and Snail protein decreased) levels in pancreatic cancer cells. The *in vivo* spleen-to-liver metastasis model demonstrated that bortezomib significantly inhibited pancreatic cancer liver metastasis ($P < 0.01$). **Conclusion** Bortezomib can inhibit the malignant biological behaviors of pancreatic cancer cells, suggesting it might be a potential anti-cancer drug in pancreatic cancer.

Key words bortezomib; pancreatic cancer; epithelial-mesenchymal transition; liver metastasis; migration; invasion

Found program Zhejiang Provincial Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (No. LR22H160010)

Corresponding author Huang Xing, E-mail: huangxing66@zju.edu.cn