

沃替西汀抑制食管鳞癌细胞增殖和转移的作用和机制初探

罗嫚^{1,2,3}, 马强^{1,2,3}, 钟晓武^{1,2,3}, 廖重博^{2,3}, 徐磊³, 郭晓兰^{1,2,3}
(川北医学院, 1. 附属医院检验科; 2. 检验医学院; 3. 转化医学研究中心, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨抗抑郁症药物沃替西汀对食管鳞癌细胞增殖和转移的作用和分子机制。**方法:** 使用不同浓度 (0、2、4、6、8、10 $\mu\text{mol/L}$) 的沃替西汀处理食管鳞癌细胞系 Eca109 和 KYSE150, 采用 CCK-8 实验检测细胞活力, Transwell 及划痕实验检测细胞的迁移能力, 平板克隆形成实验检测细胞增殖能力; 通过 TCGA 数据库筛选食管癌中差异表达的基因, 采用 AutoDock 软件对沃替西汀与环氧化酶-2 (COX-2) 蛋白进行分子对接; 使用 RT-qPCR、Western blot 检测沃替西汀处理后的 Eca109 和 KYSE150 细胞中 COX-2 mRNA 和蛋白水平的变化。**结果:** 不同浓度沃替西汀处理 Eca109 和 KYSE150 细胞后, 其存活率呈浓度依赖性下降 ($P < 0.05$), 半抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 5.086 $\mu\text{mol/L}$ 、5.179 $\mu\text{mol/L}$ 。与对照组相比, 沃替西汀处理组细胞增殖和迁移能力均降低 ($P < 0.05$)。沃替西汀可抑制 COX-2 基因 mRNA 及蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。**结论:** 沃替西汀可抑制食管鳞癌细胞的增殖和迁移, 可能与其下调 COX-2 表达有关。

【关键词】 食管鳞癌; 沃替西汀; 环氧化酶-2; 增殖; 迁移

【中图分类号】 R735.1 **【文献标志码】** A

Primary study of vortioxetine in inhibiting proliferation and migration of esophageal cancer cells

LUO Man^{1,2,3}, MA Qiang^{1,2,3}, ZHONG Xiao-wu^{1,2,3}, LIAO Chong-bo^{2,3}, XU Lei³, GUO Xiao-lan^{1,2,3}
(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 2. Department of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College; 3. Translational Medicine Research Center, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the effects and mechanisms of vortioxetine on the proliferation and migration of esophageal squamous cell cancer. **Methods:** CCK-8 assay was used to detect the viability of Eca109 and KYSE150 cells after treated with vortioxetine at different concentrations (0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{mol/L}$). Moreover, transwell and scratch assays were employed to evaluate the migration of ESCC cells, plate colony formation assay was used to detect the proliferation. The differentially expressed genes were screened by TCGA database, AutoDock software was used to predict the binding of vortioxetine and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein. Furthermore, the expression of COX-2 mRNA and protein were measured by RT-qPCR and Western blot, respectively. **Results:** The cell viability of Eca109 and KYSE150 decreased in a concentration-dependent manner after treatment with different concentrations of vortioxetine ($P < 0.05$), and the semi-inhibitory concentrations (IC₅₀) were 5.086 $\mu\text{mol/L}$ and 5.179 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Compared with the control group, the cell proliferation and migration of the vortioxetine group were reduced ($P < 0.05$). In addition, vortioxetine could inhibit the expression of COX-2 at mRNA and protein level ($P < 0.05$). **Conclusion:** Vortioxetine inhibits the proliferation and migration of esophageal cancer cells probably through COX-2 down-regulation.

【Key words】 Esophageal squamous cell cancer; Vortioxetine; COX-2; Proliferation; Migration

食管癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 中国的食管癌患者约占全球总数的 40%。食管癌的主要病理类型可分为鳞癌和腺癌, 我国以鳞癌为主。吸烟和饮酒是导致食管鳞癌发病的主要因素^[1]。由于食管癌发病隐匿, 大多数患者确诊时已处于疾病的中晚期, 而治疗以放化疗及免疫治疗为主。虽然食管癌的治疗逐年进步, 但其易对化疗药物产生耐药性, 治疗效果和预后较差^[2]。因此, 筛选新的具有抗食管癌活性的治疗药物具有重要意义。与新药研发相比, “老药” 经过了长时间的使用和检验,

其安全性和有效性已经得到广泛认可,是新药研发的重要策略^[3]。

多个临床研究^[4-5]结果表明,沃替西汀在重度抑郁症的治疗中展现了良好的有效性、安全性及耐受性。除了抗抑郁症作用,沃替西汀在恶性肿瘤治疗中展现了强大潜力。Lv 等^[6]研究发现,沃替西汀可通过 PI3K/AKT 信号通路诱导胃腺癌细胞凋亡和自噬。Li 等^[7]研究表明,沃替西汀作为一种新型的 JAK2/SRC 双重抑制剂,可通过 JAK2/SRC-STAT3 信号通路抑制胃癌的生长。此外,沃替西汀亦可通过下调细胞周期依赖性蛋白激酶 4/6 (CDK4/6) 表达并抑制食管癌细胞增殖^[8]。然而,沃替西汀的直接作用靶点尚不清楚,有必要进一步探索其抑制食管癌增殖与转移的作用和分子机制。

肿瘤的发生与炎症密切相关,而环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 是炎症和癌症的重要介质^[9]。大量研究^[10]表明,催化花生四烯酸转化为前列腺素的关键酶 COX-2 在机体内参与炎症反应和组织损伤等过程。据报道^[11],COX-2 在包括食管癌在内多种恶性肿瘤中表达,并在癌细胞对化疗和放疗的抗药性方面发挥着重要作用。此外,COX-2 可作为癌症化学治疗的潜在靶点,与多种肿瘤的发生、发展和预后密切^[12]。已有研究^[13]发现,胃食管反流患者因接触胃酸和胆汁酸而产生的持续低 pH 值可诱导食管上皮细胞中的 COX-2 过度表达。COX-2 过度表达与食管癌的发生有关,调控 COX-2 表达可能预防食管癌的发生^[14]。然而,COX-2 是否为沃替西汀抗食管癌的作用靶点尚不清楚。基于此,本研究拟探讨沃替西汀在食管癌细胞增殖与转移中的作用及对 COX-2 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

食管鳞状细胞癌细胞株 Eca109 和 KYSE150 由川北医学院转化医学研究中心保存。

1.2 主要试剂与仪器

沃替西汀(上海陶术生物科技有限公司),蛋白裂解液、BCA 法蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo 公司),CCK-8 试剂盒(中国碧云天),Transwell 小室(美国康宁公司),细胞凋亡检测试剂盒(美国 Biolegend 公司),COX-2、 β -actin 抗体及山羊抗兔 IgG (H + L)均来源于美国 CST 公司,DMEM 培养基、胎牛血清及 0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司),酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),CO2 细胞培养箱(美国 Thermo fisher 公司)和化学发光成像分析系统(法国

Vliber Lourmat 公司)。

1.3 方法

1.3.1 Eca109 和 KYSE150 细胞培养与传代 显微镜下观察细胞密度(80% ~ 90%)时进行传代。加入 0.25% 胰蛋白酶消化后离心,然后按照 1:3 的比例在完全培养基中传代,置于 37 ℃、含 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.3.2 分组及给药 将食管鳞状细胞癌细胞株 Eca109 和 KYSE150 分别分为对照组及阳性药物组。对照组细胞加入等体积 DMSO 溶剂;阳性药物组加入实验浓度的沃替西汀进行干预。干预时间均为 48 h,每组 3 个复孔,置于 37 ℃、含 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3.3 细胞活力检测 取对数生长期 Eca109 和 KYSE150 细胞接种于 96 孔板中,接种密度为 4 000 个/孔,待细胞贴壁后,对照组加入等体积 DMSO 溶剂,阳性药物组加入 2、4、6、8 和 10 μ mol/L 沃替西汀进行干预,处理 48 h 后,每孔 100 μ L 培养基中加入 10 μ L CCK-8 溶液,在 37 ℃、含 5% CO₂ 的培养箱内孵育 1 h,于 450 nm 波长检测光密度(OD)值,计算细胞活力(%) = 实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times$ 100%。

1.3.4 细胞增殖检测 Eca109 和 KYSE150 按 500 个/孔的密度在 12 孔板中铺板,置于 37 ℃、含 5% CO₂ 培养箱中培养 7 d 后,用 1 mL 含 DMSO 或沃替西汀的培养基培养至克隆肉眼可见时终止。用 4% 多聚甲醛固定 10 min,结晶紫染色 10 min。扫描细胞克隆数量并统计。

1.3.5 划痕实验检测细胞迁移能力 将 Eca109 和 KYSE150 接种于 6 孔板,接种密度为 3×10^5 个/孔,置于 37 ℃、含 5% CO₂ 培养箱中培养 1 d 后,显微镜下观察细胞密度为 90% 时,用 10 μ L 枪头尖端划直线路径,PBS 洗两遍后拍照。按照分组加入 DMSO 或沃替西汀,置于培养箱中培养 24 h,拍照记录迁移宽度,并用 Image J 分析细胞迁移率。

1.3.6 Transwell 实验检测细胞迁移能力 0.25% 胰酶消化 Eca109 和 KYSE150 细胞,取 200 μ L 含 5×10^4 个细胞的无血清细胞悬液加入上层小室,下层加入 600 μ L 完全培养基,置于 37 ℃、含 5% CO₂ 培养箱中培养 1 d 后,取出小室并用 4% 多聚甲醛固定 10 min,结晶紫染色 10 min,在倒置显微镜下进行图像采集并用 Image J 进行分析。

1.3.7 生物信息学分析 登录 TIMER 数据库(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)分析 COX-2 基因在不同肿瘤及其癌旁组织中的表达差异,采用箱形图展示基因表达水平。通过 TCGA 数据库的

UALCAN 平台 (<http://ualcan.path.uab.edu/>),分析 COX-2 基因在食管癌及其旁组织中的转录水平。

1.3.8 分子对接 利用 Pubchem 数据库获取沃替西汀的主要有效成分的 SDF 格式文件,随后采用 Pymol-2.1.0 软件对 COX-2 蛋白的关键靶点进行水分子和小分子配体的去除及优化,并使用 AutoDock Tools-1.5.6 对其进行加氢及电荷处理并另存为 PDB 格式。通过 pyrx 软件中的 vina-2.0 模块实现分子对接实验,计算相应的结合能并生成结果文件。最终借助 PyMol 软件对实验结果进行可视化分析。

1.3.9 COX-2 mRNA 定量检测 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。然后用逆转录系统试剂盒将 1 μ g RNA 逆转录成 cDNA。基因特异性扩增在 Roche Lightcycler 实时 PCR 系统中进行。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 COX-2 的相对表达量。使用的引物如下:COX-2 正向引物:5'-TGAGTACCGCAAACGCTTCTC-3'; COX-2 反向引物:5'-TGGACGAGGTTTTTCCACCAG-3'; β -肌动蛋白正向引物:5'-CATGTA CGTTGC-TATCCAGGC-3'; β -肌动蛋白反向引物:5'-CTCCT-TAATGTCAC GCACGAT-3'。

1.3.10 COX-2 蛋白表达检测 对照组和药物组处理细胞 48 h 后,使用 RIPA 裂解液裂解细胞,4 $^{\circ}$ C 下以 12 000 r/min 离心 10 min 获取总蛋白。通过 BCA 法测定蛋白浓度,配置 20 μ L 体系并于 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min。样品经过 12% SDS-PAGE 分离,转膜至 PVDF 膜,室温封闭 1 h,4 $^{\circ}$ C 下一抗孵育过夜,二抗中室温孵育 1 h,使用 ECL 试剂在化学发光系统中显示蛋白表达水平,Image J 软件进行灰度分析。

1.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件对数据进行统计处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沃替西汀抑制食管癌细胞活力和增殖能力

采用 0、2、4、6、8、10 μ mol/L 的沃替西汀处理 Eca109 和 KYSE150 细胞。结果发现,沃替西汀在 Eca109 和 KYSE150 细胞中的半抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 5.086 μ mol/L、5.179 μ mol/L (图 1)。本研究后续均采用 5 μ mol/L 作为药物实验浓度。CCK-8 实验显示,5 μ mol/L 沃替西汀处理后的 KYSE150 和 Eca109 细胞活力降低,并呈时间依赖效应 ($P < 0.05$) (图 2)。同时,沃替西汀处理后的 Eca109 和 KYSE150 细胞克隆数量降低 ($P < 0.01$) (图 3)。

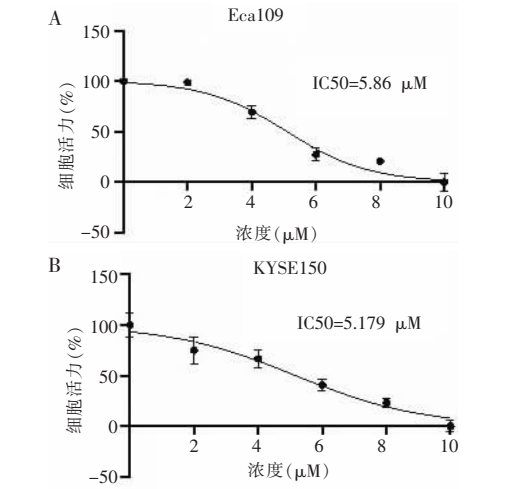


图 1 沃替西汀在食管癌细胞中的半抑制浓度 A. Eca109 细胞;B. KYSE150 细胞。

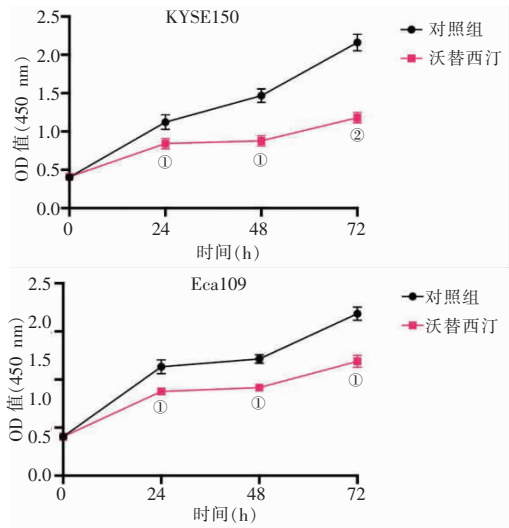


图 2 沃替西汀对食管癌细胞增殖能力的影响 A. KYSE150 细胞;B. Eca109 细胞。① $P < 0.05$;② $P < 0.01$ 。

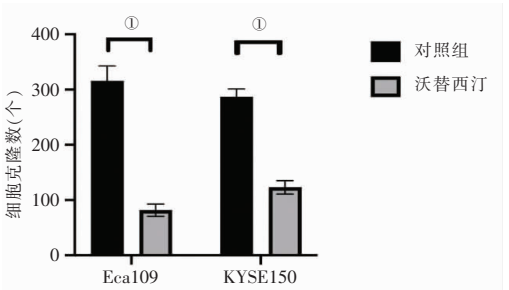
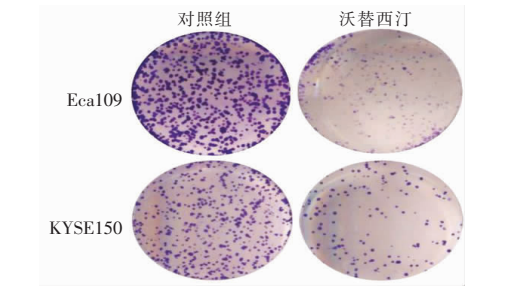


图 3 沃替西汀对 Eca109 和 KYSE150 细胞克隆形成的影响

A. 平板克隆结晶紫染色仪器扫描图;B. 细胞克隆数统计图。① $P < 0.01$ 。

2.2 沃替西汀抑制食管癌细胞的迁移能力

划痕实验显示,沃替西汀处理后 Eca109 和 KYSE150 细胞的迁移面积较对照组下降($P < 0.01$) (图 4)。此外,Transwell 实验显示,沃替西汀处理的 Eca109 和 KYSE150 细胞迁移数量较对照组明显减低($P < 0.01$) (图 5)。

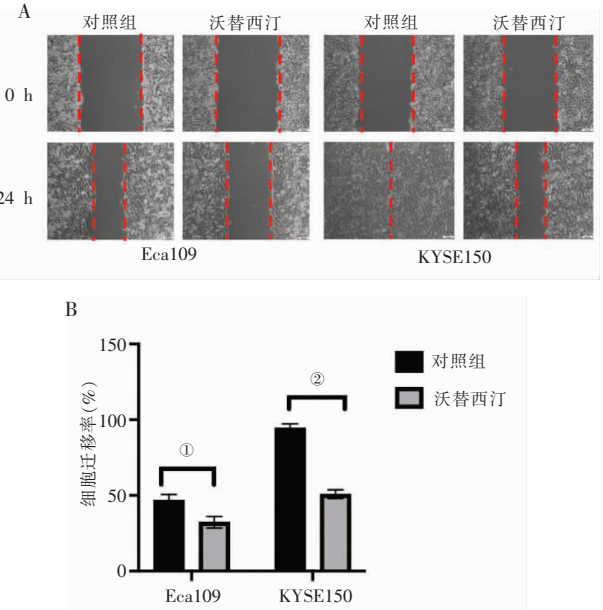


图 4 划痕实验检测 Eca109 和 KYSE150 细胞迁移能力的影响
A. 红色虚线代表细胞边界线($\times 100$);B. 细胞迁移率统计图。
① $P < 0.05$;② $P < 0.01$ 。

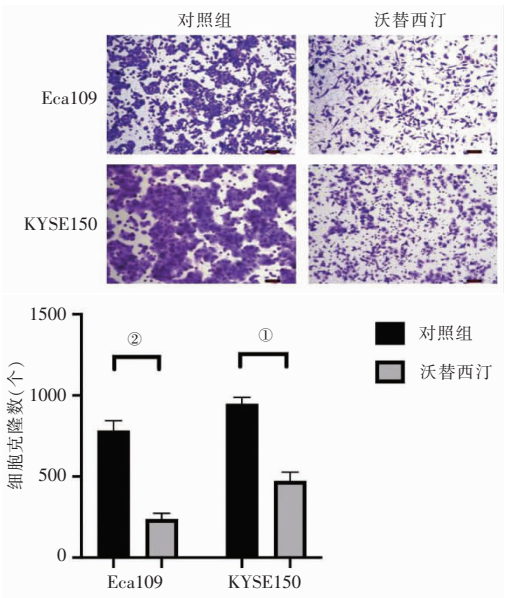


图 5 Transwell 检测沃替西汀对 Eca109 和 KYSE150 细胞迁移能力的影响
A. 迁移细胞结晶紫染色($\times 100$);B. 细胞迁移数统计图。
① $P < 0.01$;② $P < 0.001$ 。

2.3 COX-2 在食管癌组织中的表达

基于 TCGA 数据库,分析 COX-2 在各种肿瘤组织中的表达水平。结果显示,COX-2 mRNA 在包括食管癌等多种癌症中均呈高表达 (图 6)。同时,COX-2 在食管癌患者组织中的表达水平高于癌旁组织($P < 0.05$) (图 7)。

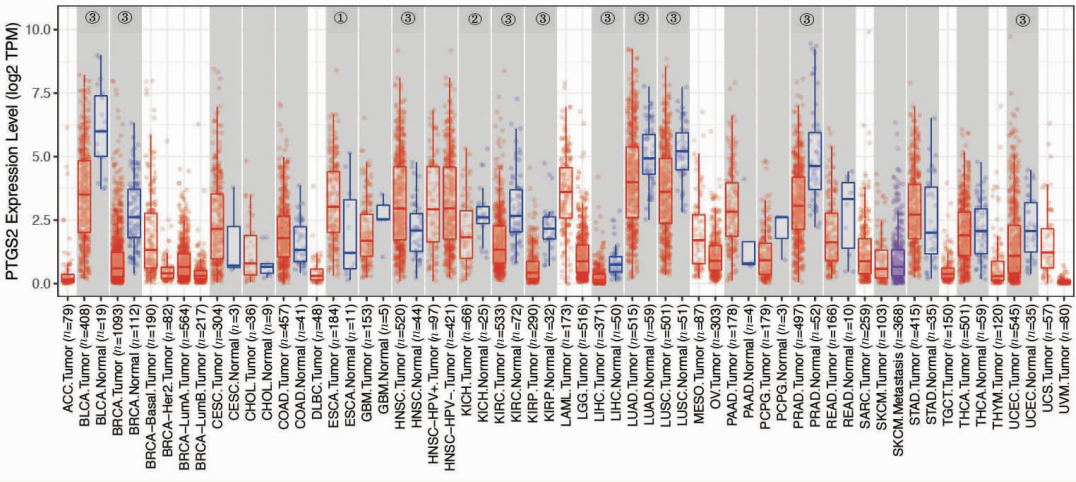


图 6 COX-2 在多种癌症组织中的表达水平
① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;③ $P < 0.001$

2.4 沃替西汀与 COX-2 蛋白关键靶点有较好的结合活性

使用 AutoDock Tools-1.5.6 软件对沃替西汀与 COX-2 蛋白进行分子对接,分析沃替西汀与 COX-2 蛋白核心成分之间的结合稳定性。通常情况下,对接能量值 < -5.0 kcal/mol 表示有较好的结合活性。分子对接结果显示,沃替西汀与 COX-2 蛋白结合能

为 -6.5 kcal/mol,表明二者具有较好的结合活性 (图 8)。

2.5 沃替西汀抑制 COX-2 mRNA 及蛋白的表达

为了进一步探索沃替西汀在食管癌细胞中的作用机制,本研究探索沃替西汀处理后的 Eca109 和 KYSE150 细胞中 COX-2 mRNA 及蛋白水平。结果显示,沃替西汀组 COX-2 的 mRNA 水平低于对照组(P

<0.001)(图9)。此外,沃替西汀可下调 KYSE150 和 Eca109 细胞的 COX-2 蛋白表达水平(图10)。

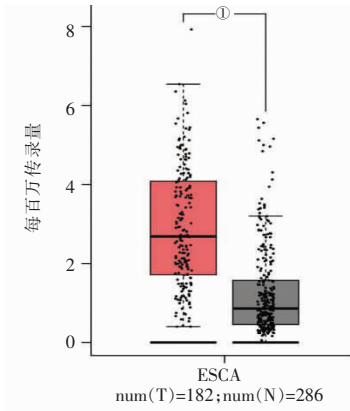


图7 COX-2在食管癌和癌旁组织的表达水平
① $P<0.05$ 。

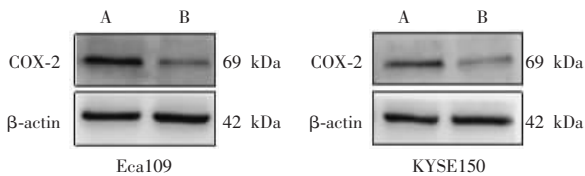


图10 Western blot分析沃替西汀对COX-2蛋白水平的影响

A. 对照组;B. 沃替西汀组。

3 讨论

食管癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,发病率和死亡率目前仍较高。目前,食管癌的主要治疗包括手术切除、放疗、化疗和靶向治疗^[15]。然而,化学药物治疗易产生抗性和耐药性,并伴随明显的不良反应,这使得治疗效果难以达到预期^[16-17]。因此,寻找新的抗食管癌药物对于延长患者生存时间和提升生活质量具有重要意义。沃替西汀是一种治疗重度抑郁障碍的新型抗抑郁药,主要通过增加中枢神经系统的五羟色胺(5-HT)浓度发挥抗抑郁作用,与其他选择性5-HT再摄取抑制剂(selective serotonin reuptake inhibitors,SSRIS)或五羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors,SNRIS)相比,沃替西汀对去甲肾上腺素和多巴胺能神经元几乎没有影响^[18]。本研究发现,沃替西汀可以抑制食管癌细胞的增殖和迁移能力,表明沃替西汀能够作为潜在的抗癌药物。

为进一步探索沃替西汀抗食管癌细胞的作用机制,课题组使用 AutoDock 软件对沃替西汀与 COX-2 蛋白进行分子对接。分子对接结果显示,沃替西汀与 COX-2 蛋白关键靶点有较好的结合活性。COX-2 作为花生四烯酸转化为前列腺素的重要同工酶,其在多种肿瘤发生和进展中的作用已被广泛证实^[19]。在正常组织中,COX-2 的 mRNA 及蛋白水平并不表现出显著的表达。然而,在包括食管癌在内的多种恶性肿瘤中,COX-2 的表达量明显增加^[20]。COX-2 的过表达有利于癌细胞抵抗化疗药物,调控 COX-2 的表达可能有助于肿瘤的治疗^[21]。因此,COX-2 被认为是肿瘤预防和治疗的潜在靶点。本研究发现,沃替西汀组 COX-2 的 mRNA 及蛋白水平低于对照组,提示沃替西汀可能通过调控 COX-2 发挥抗食管癌作用。

综上,沃替西汀可抑制食管癌细胞的增殖和迁移,其作用机制可能与下调 COX-2 的表达有关。沃替西汀作为一种口服的抗抑郁药,大部分患者需长期使用,药物毒副作用较低,是其作为潜在的抗癌药物的显著优势。

参考文献

[1] Zhu H, Ma X, Ye T, et al. Esophageal cancer in China: Practice and

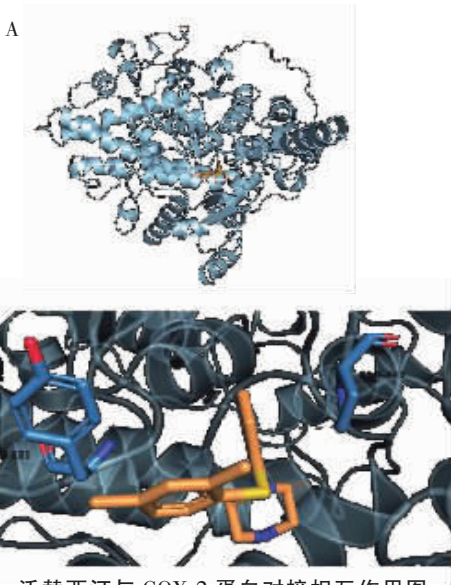


图8 沃替西汀与 COX-2 蛋白对接相互作用图
A. 相互作用整体图示;B. 相互作用局部图示。

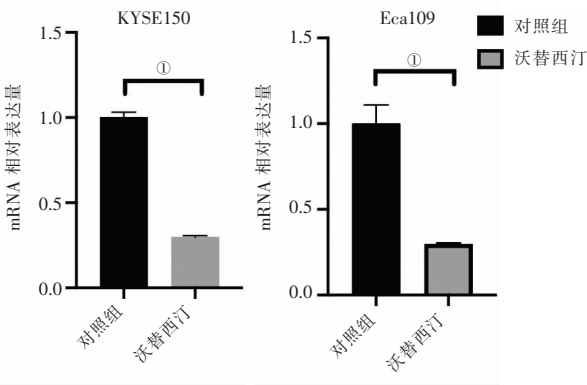


图9 PCR检测沃替西汀对COX-2 mRNA水平的影响
① $P<0.001$ 。

- research in the new era[J]. International Journal of Cancer, 2023, 152(9):1741–1751.
- [2] Demarest CT, Chang AC. The landmark series: multimodal therapy for esophageal cancer[J]. Annals of Surgical Oncology, 2021, 28(6):3375–3382.
- [3] Xia Y, Sun M, Huang H, et al. Drug repurposing for cancer therapy[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9(1):92.
- [4] Adair M, Christensen MC, Florea I, et al. Vortioxetine in patients with major depressive disorder and high levels of anxiety symptoms: an updated analysis of efficacy and tolerability[J]. Journal of Affective Disorders, 2023, 328:345–354.
- [5] Findling RL, DelBello MP, Zuddas A, et al. Vortioxetine for major depressive disorder in adolescents: 12-week randomized, placebo-controlled, fluoxetine-referenced, fixed-dose study[J]. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 2022, 61(9):1106–1118. e2.
- [6] Lv GB, Wang TT, Zhu HL, et al. Vortioxetine induces apoptosis and autophagy of gastric cancer AGS cells via the PI3K/AKT pathway[J]. FEBS Open Bio, 2020, 10(10):2157–2165.
- [7] Li M, Duan L, Wu W, et al. Vortioxetine hydrobromide inhibits the growth of gastric cancer cells in vivo and in vitro by targeting JAK2 and SRC[J]. Oncogenesis, 2023, 12(1):24.
- [8] 王东浩. 沃替西汀通过下调 CDK4/6-RB1 信号通路抑制食管鳞癌细胞增殖的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- [9] Huang R, Yu J, Zhang B, et al. Emerging COX-2 inhibitors-based nanotherapeutics for cancer diagnosis and treatment[J]. Biomaterials, 2025, 315:122954.
- [10] Cui J, Jia J. Natural COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: an update[J]. Current Medicinal Chemistry, 2021, 28(18):3622–3646.
- [11] Goradel NH, Najafi M, Salehi E, et al. Cyclooxygenase-2 in cancer: a review[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(5):5683–5699.
- [12] Sheng J, Sun H, Yu FB, et al. The role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer[J]. International Journal of Medical Sciences, 2020, 17(8):1095–1101.
- [13] Shen J, Nayoung K, Wang H, et al. COX-2 strengthens the effects of acid and bile salts on human esophageal cells and Barrett esophageal cells[J]. BMC Molecular and Cell Biology, 2022, 23(1):19.
- [14] Moon H, White AC, Borowsky AD. New insights into the functions of Cox-2 in skin and esophageal malignancies[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2020, 52(4):538–547.
- [15] Rogers JE, Sewastjanow-Silva M, Waters RE, et al. Esophageal cancer: emerging therapeutics[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2022, 26(2):107–117.
- [16] Luan S, Zeng X, Zhang C, et al. Advances in drug resistance of esophageal cancer: from the perspective of tumor microenvironment[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9:664816.
- [17] Yang YM, Hong P, Xu WW, et al. Advances in targeted therapy for esophageal cancer[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, 5(1):229.
- [18] Sanchez C, Asin KE, Artigas F. Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: Review of preclinical and clinical data[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2015, 145:43–57.
- [19] Li W, Zhang Z, Wang B, et al. microRNA and cyclooxygenase-2 in breast cancer[J]. Clinica Chimica Acta, 2021, 522:36–44.
- [20] Sobolewski C, Legrand N. Celecoxib analogues for cancer treatment: an update on OSU-03012 and 2,5-dimethyl-celecoxib[J]. Biomolecules, 2021, 11(7):1049.
- [21] Xu Y, Wang J, He Z, et al. A review on the effect of COX-2-mediated mechanisms on development and progression of gastric cancer induced by nicotine[J]. Biochemical Pharmacology, 2024, 220:115980.

(收稿日期: 2024-11-17

修回日期: 2025-01-13)