

- 340; b5569
- 4 姚晓军,刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 8:1982 - 1986
 - 5 Hong QY, Wu GM, Qian GS, *et al.* Prevention and Management of Lung Cancer in China[J]. *Cancer*, 2015, 121 Suppl 17:3080 - 3088
 - 6 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation[J]. *Science*, 2009, 324(5930):1029 - 1033
 - 7 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell* 2011, 144(5):646 - 674
 - 8 Ferguson EC, Rathmell JC. New roles for pyruvate kinase M2: Working out the Warburg effect[J]. *Trends BiochemSci*, 2008, 33(8): 359 - 362
 - 9 Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, *et al.* Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2[J]. *Nature*, 2012, 491: 458 - 462
 - 10 Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(7):969 - 980
 - 11 Vander Heiden MG, Locasale JW, Swanson KD, *et al.* Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells[J]. *Science*, 2010, 329(5998):1492 - 1499
 - 12 Warner SL, Carpenter KJ, Bearss DJ. Activators of PKM2 in cancer metabolism[J]. *Future Med Chem*, 2014, 6(10):1167 - 1178
 - 13 Jett JR. Current treatment of unresectable lung cancer[J]. *Mayo Clin Proc*, 1993, 68(6):603 - 611
 - 14 Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer[J]. *Chest*, 1997, 111(6):1710 - 1717
 - 15 Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. *Science*, 1956, 123(3191):309 - 314
 - 16 Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5):325 - 337
 - 17 Dombrowski JD, Santarsiero BD, Mesecar AD. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(27): 9417 - 9429
 - 18 Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. The M1 - and M2 - type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing [J]. *Biol Chem*, 1986, 261(29):13807 - 13812
 - 19 Susor WA, Rutter WJ. Some distinctive properties of pyruvate kinase purified from rat liver [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968, 30(1): 14 - 20
 - 20 Ashizawa K, McPhie P, Lin KH, *et al.* An in vitro novel mechanism of regulating the activity of pyruvate kinase M2 by thyroid hormone and fructose 1, 6 - bisphosphate [J]. *Biochemistry* 1991, 30:7105 - 7111

(收稿日期:2017-04-16)
(修回日期:2017-05-31)

Coronin3 促进食管癌 Eca - 109 细胞的迁移和侵袭

林 宇 陈俊强 周智峰 何 诚 郑 飞 刘萍萍 陈元美 李建成 朱坤寿

摘要 目的 探讨 Coronin3 基因促进食管癌 Eca - 109 细胞株迁移和侵袭的可能机制。方法 用慢病毒稳转的方式构建过表达和敲减 Coronin3 的 Eca - 109 食管癌细胞株,通过划痕和 Transwell 实验分别检测 Coronin3 基因对 Eca - 109 食管癌细胞的迁移和侵袭的影响。Western blot 法实验检测 Coronin3 对 CDH11 及 E - cadherin、N - cadherin 等 EMT 标志分子蛋白表达的影响。实时荧光定量 PCR 实验检测 Coronin3 对 CDH11 及 E - cadherin、N - cadherin 等 EMT 标志分子 mRNA 表达的影响。结果 笔者成功构建了 Coronin3 过表达和敲减的 Eca - 109 细胞株。Coronin3 过表达能够促进细胞迁移和侵袭。与之相反,Coronin3 敲减能够显著抑制细胞迁移和侵袭。Coronin3 过表达能够提高 CDH11 的蛋白和 mRNA 水平,提高 α - SMA、N - cadherin 的蛋白和 mRNA 水平,降低 E - cadherin 的蛋白和 mRNA 水平。与之相反,Coronin3 敲减能显著降低 CDH11 的蛋白和 mRNA 水平,降低 α - SMA、N - cadherin 的蛋白和 mRNA 水平,提高 E - cadherin 的蛋白和 mRNA 水平。结论 Coronin3 可以通过促进上皮 - 间质转换 (EMT) 来调控食管癌的转移和侵袭,为治疗食管癌提供了潜在的新靶标。

关键词 Coronin3 食管癌 转移 侵袭 上皮 - 间质转换

中图分类号 R73 - 37 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.016

Impact of Coronin3 Gene on Migration and Invasion of Esophagus Carcinoma Cell Line Eca - 109. Lin Yu, Chen Junqiang, Zhou Zhifeng, *et al.* Fujian Cancer Hospital & Fujian Medical University Cancer Hospital, Fujian 350014, China

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2015J01377);福建省科技厅重点项目(2011Y0014);福建省临床重点专科建设项目(2012) 作者单位:350014 福州,福建省肿瘤医院放疗科、福建医科大学附属肿瘤医院 通讯作者:陈俊强,电子邮箱:junqiang@163.com

Abstract Objective To study the mechanism of coronin3 promote esophagus carcinoma cell line Eca - 109 migration and invasion. **Methods** We established Coronin3 overexpression and Coronin3 knockdown stable Eca - 109 cell lines through lentivirus infection. Then we used wound healing and Transwell assays to detect the ability of tumor migration and invasion. Western blot and real - time PCR assays validated the protein and mRNA level of CDH11, E - cadherin, N - cadherin, α - SMA up on Coronin3 over - expression and knockdown. **Results** We successfully established Coronin3 over - expression and Coronin3 knockdown stable Eca - 109 cell lines. Coronin3 over - expression promoted Eca - 109 cell migration and invasion. Conversely, Coronin3 knockdown reversed the progress. Coronin3 over - expression up - regulated the protein and mRNA level of CDH11, α - SMA, N - cadherin, down - regulated the protein and mRNA level of E - cadherin, and vice versa. **Conclusion** Coronin3 might regulate esophagus cancer migration and invasion through epithelial - mesenchymal transitions progression. Thus we suggest that Coronin3 might be a novel therapeutic target for esophagus cancer treatment.

Key words Coronin3; Esophagus cancer; Migration; Invasion; Epithelial - mesenchymal transitions

食管癌位居我国恶性肿瘤死亡的第4位,其中鳞癌占90%以上^[1],福建省是食管癌高发区之一,外科手术是治疗食管癌的首选方法,但是由于食管癌发病隐匿,症状出现时就诊已为中晚期,多数患者失去了手术的机会。同步放化疗是局部晚期食管癌的首选治疗^[2,3],但5年生存率仅为10%~20%,局部复发或转移是失败的重要原因^[2-5]。上皮-间充质转换(epithelial - mesenchymal transitions, EMT)是肿瘤转移的重要机制,因此,找到食管癌中影响上皮-间充质转换的重要基因是彻底根除食管癌的重要途径^[6,7]。

Coronin3又名Coronin-1c或CORO1C,定位于人染色体12q24.11,由474个氨基酸组成,Coronin3与肿瘤的关系十分密切,其在多种类型的侵袭性肿瘤中均有所上调。研究表明Coronin3可上调转录因子Snail、Slug,这些转录因子都与上皮-间充质转化相关,且在侵袭转移性的肿瘤细胞性中均呈过表达^[8]。这表明Coronin3既可以作为侵袭性肿瘤的生物标志物,也与肿瘤的进展密切相关。本研究着眼于Coronin3跟食管癌的发生、发展,转移侵袭的关系,探究Coronin3基因在食管癌细胞株Eca-109过表达及敲减对细胞转移和侵袭的影响,并探讨其分子机制,即对上皮-间充质转换标志物的影响。

材料与与方法

1. 材料:限制性内切酶,连接酶,PCR酶采购自加拿大Fermentas公司, Lipofetamin 2000,胎牛血清,DMEM培养基,胰酶,双抗等采购自美国Life Technology公司,嘌呤霉素(puromycin)购自美国Sigma公司,细胞培养皿和Transwell小室(3422)购自Corning品牌。HEK-293T, Eca-109细胞购自中科院上海细胞库。Coronin3抗体(14749-1-AP)购自美国Proteintech公司,CDH11抗体(GTX109792)购自美国GeneTex公司, α -SMA抗体(ab28052),N-cadherin

抗体(ab18203),E-cadherin抗体(ab76055)购自英国Abcam公司,GAPDH抗体(YM3040)购自美国Immunoway公司,反转录试剂盒(R123-01),荧光定量PCR试剂盒(Q311-02)购自南京诺维赞生物公司,荧光定量PCR引物购自上海生工。

2. 载体构建:人源Coronin3基因(1425bp)扩增自EC109细胞的cDNA,使用的引物如下,上游引物:5'-AGAGAATTCGGATCCATGAGGCCAGTGGTACGA-3',下游引物:5'-CCATGGCTCGAGCCCTCAGGCTGC-TATCTTTGCCATC-3',PCR产物克隆连接进BamH I/Sma I线性化的pLV-EF1a-MCS-IRES-puro载体,PCR鉴定阳性克隆,并送测序验证。人源Coronin3的干扰shRNA靶点1序列:5'-GCACAAGACTGGTCAATT-3',靶点2序列:5'-CGTCCACTACCTCAACACATT-3',shRNA两条链退火后连接进EcoR I/Age I线性化的pLKO.1-U6-PGK-puro载体,PCR鉴定阳性克隆,测序鉴定结果。

3. 慢病毒包装与稳转细胞株构建:HEK-293T用含10%FBS的DMEM高糖培养基培养,将Coronin3过表达或者敲减质粒与pMD2.G和paPAX2共转染进HEK-293T细胞,48~72h后收取细胞上清作为病毒使用。Eca-109细胞用含10%FBS的DMEM高糖培养基培养,收取的过表达和敲减Coronin3的病毒上清及对对照病毒感染Eca-109细胞株,72h后,用2 μ g/ml的嘌呤霉素筛选4~6天,筛选好的稳转细胞株扩增后冻存及进行后续实验操作。

4. 免疫印迹法:用免疫印迹法检测Coronin3、CDH11、 α -SMA、N-cadherin、E-cadherin、GAPDH等蛋白的表达。细胞用1%SDS裂解液裂解细胞,95 $^{\circ}$ C加热10min,离心收集上清并用BCA protein assay kit检测蛋白浓度。40 μ g样品进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后将蛋白转移到PCDF膜,用5%BSA封闭1h,于4 $^{\circ}$ C孵育一抗过夜,用TBST洗4次,

每次 10min, 室温孵育偶联 HRP 的二抗 1h, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10min。加上发光液 ECL 后在暗室用 X 光胶片显影。

5. 实时荧光定量 PCR : Coronin3 过表达和敲减 Eca - 109 细胞株铺到 60mm 细胞培养皿, 长到汇合度 80% 左右时用 Trizol 裂解细胞, 提取总 RNA。用诺维赞反转录试剂盒 HiScript Q - RT SuperMix, 以 1 μ g RNA 为模板合成 cDNA。用以下引物检测 mRNA 表达: Coronin3 正向引物: 5' - CTGCAC AGCTTCAAAGACAAGA - 3', 反向引物: 5' - GGCTGAACCCAGTGGTGAAGA - 3'; CDH11 正向引物: 5' - GCTGACTTGTGAATGGGACC - 3', 反向引物: 5' - GC CGCTGAGCTGAAAACA - 3'; α - SMA 正向引物: 5' - CCAAGTGAAGCCTCGCTT - 3', 反向引物: 5' - TCTCGTCTTCGTCGCACA - 3'; N - cadherin 正向引物: 5' - TGTTTACTATGAAGGCAGTGG - 3', 反向引物: 5' - TCAGTCATCACCTCCACCAT - 3'; E - cadherin 正向引物: 5' - GAAAGCGGCTGATACTGACC - 3', 反向引物: 5' - CGTACATGTCAGCCGCTTC - 3'; 18S rRNA, 正向引物: 5' - CGACGACCCATTCGAACGTCT - 3', 反向引物: 5' - CTCTCCGGAATCGAACCTGA - 3'。

6. 划痕实验: 细胞接种在 6 孔板中并当细胞铺满时, 用 10 μ l 的无菌枪头在培养细胞的培养皿中划 3 条分开的划痕, 用 PBS 轻轻洗去细胞并加培养基在培养箱培养。分别在 0、24 和 48h 小室用显微镜在同一个划痕区域拍照。

7. Transwell 小室实验: 转移和侵袭实验使用 Tr-

answell, 将含有 2.5 \times 10⁵ 个细胞的 250 μ l 无血清 DMEM 培养基加入 Transwell 上小室, 完全培养基加入下小室。细胞培养 24h 后以 4% 多聚甲醛固定并用结晶紫染色。上小室的细胞会迁移, 在显微镜下计数迁移的细胞, 每个拍 6 个不重复的视野照片。侵袭实验过程类似, 不同的是需要提前一天在 Transwell 上小室铺上 20 μ l 左右的 matrigel 基质胶。

8. 统计学方法: 采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计分析处理, 组间比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. Coronin3 过表达和敲减慢病毒载体构建: 以 Eca - 109 细胞的 cDNA 做模板, 用 Coronin3 的引物扩增出全长的序列, 大小为 1425bp (图 1A), 将扩增片段切胶回收备用。慢病毒载体 pLV - EF1a 载体用 BamH I 和 Sma I 线性化后, 切胶回收 (图 1B), 用诺维赞无缝克隆试剂盒将线性化载体与 Coronin3 片段重组, 重组产物转化大肠杆菌 DH5a, 过夜后用 Coronin3 的引物菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 笔者发现所挑取的 6 个菌全部都是阳性菌, 成功率 100%, 取其中一个菌扩大培养后提取质粒并送测序鉴定 (图 1C)。根据 Sigma 网站查找 Coronin3 的 shRNA 靶点序列, 选取其中两个已鉴定的序列, 按照 pLKO.1 载体规则, 设计合成 shRNA oligo, 将正义链和反义链退火后, T4 DNA 连接酶连接进用 EcoR I 和 Age I 线性化好的 pLKO.1 - U6 - hPGK - GFP - puro 慢病毒载体 (图 1D)。

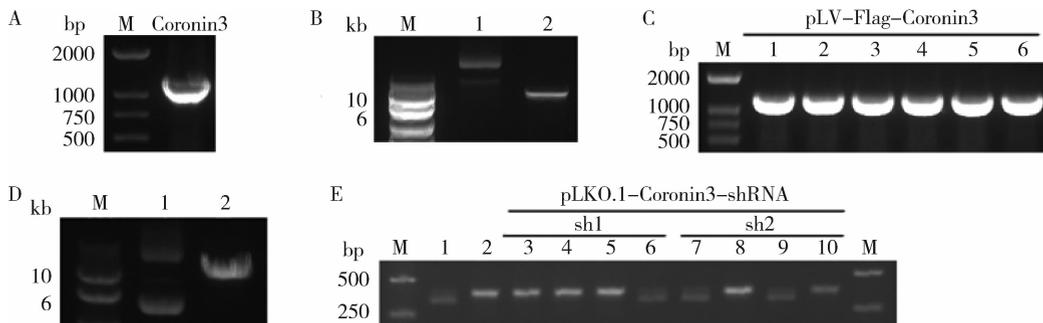


图 1 Coronin3 过表达和敲减慢病毒载体构建

A. PCR 钓取全长 Coronin3 基因; B. pLV - EF1a - Flag 载体用 BamH I 和 Sma I 酶切线性化, lane 1 是未线性化的完整载体, lane 2 是线性化的载体; C. 菌落 PCR 鉴定 Coronin3 过表达慢病毒重组菌; D. pLKO.1 - U6 - hPGK - GFP - T2A - puro 载体用 EcoR I 和 Age I 酶切线性化, lane 1. 未线性化的完整载体; lane 2. 线性化的载体; E. 菌落 PCR 鉴定 Coronin3 敲减慢病毒重组菌

2. Coronin3 过表达和敲减稳转 Eca - 109 细胞株筛选: 用 HEK - 293T 包装 pLV - Coronin3 和 pLKO.1 -

sh - Coronin3 及其对照慢病毒后, 将获得的病毒上清感染 Eca - 109 细胞株, 感染 48h 后, 用 2 μ g/ml 的嘌

呤霉素筛选,4~6天后,撤掉嘌呤霉素,用完全培养基扩增稳转好的细胞株,取部分细胞收样做 Western blot 法和实时荧光定量 PCR 检测 Coronin3 的表达量。在过表达稳转细胞株中,Coronin3 的蛋白和 mRNA 水平较对照细胞株有明显的提高(图 2A、C)。在敲减

稳转细胞株中,Coronin3 的蛋白和 mRNA 水平较对照细胞株有显著的减弱(图 2B、D),其中 pLKO.1-Coronin3-sh1 敲减效果最好,后续笔者都采用该序列稳转细胞株进行实验研究。

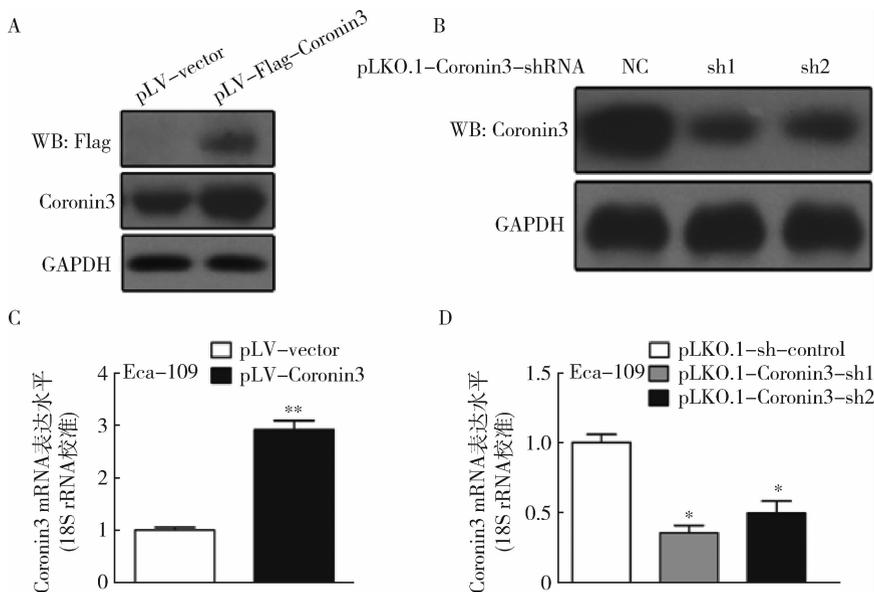


图 2 Coronin3 过表达和敲减稳转 Eca-109 细胞株筛选

A. Western blot 法检测 Coronin3 过表达稳转细胞株中的表达;B. Western blot 法检测 Coronin3 敲减稳转细胞株中的表达;
C. 荧光定量 PCR 检测 Coronin3 过表达稳转细胞株中的表达;D. 荧光定量 PCR 检测 Coronin3 敲减稳转细胞株中的表达;
每组实验 3 个复孔,与对照组比较,* $P < 0.01$,** $P = 0.000$

3. Coronin3 过表达和敲减影响 Eca-109 细胞的转移和侵袭:划痕实验,48h 后,过表达 Coronin3 细胞株相对对照细胞株划痕愈合得更快,而敲减了 Coronin3 的细胞株相对对照细胞株划痕愈合得要更慢,Coronin3 能够正调控 Eca-109 细胞株的迁移速度(图 3A)。Transwell 实验同样验证了 Coronin3 能够正调控 Eca-109 细胞株的迁移速度(图 3B)。最后,用铺基质胶的 Transwell 实验得出,过表达 Coronin3 细胞株要比对照细胞株侵袭能力强 4 倍左右,而敲减了 Coronin3 的细胞株相对对照细胞株侵袭能力弱 2 倍左右(图 3C)。以上实验表明 Coronin3 确实能够促进食管癌细胞株 Eca-109 细胞株的迁移和侵袭。

4. Coronin3 调控食管癌细胞侵袭转移的机制探讨:众所周知,肿瘤细胞株的迁移侵袭与 EMT 密切相关。所以笔者检测了过表达和敲减 Coronin3 后 Eca-109 细胞株中 EMT 标志物 CDH11、 α -SMA、N-cadherin 和 E-cadherin 的蛋白和 mRNA 表达情况,过表达 Coronin3 确实能够促进 CDH11、 α -SMA、N-cad-

herin 的蛋白和 mRNA 水平的表达,抑制 E-cadherin 的蛋白和 mRNA 水平的表达。而敲减 Coronin3 刚好与之相反,能够降低 CDH11、 α -SMA、N-cadherin 的蛋白和 mRNA 水平,增强 E-cadherin 的蛋白和 mRNA 水平(图 4)。由此笔者得出,Coronin3 能够正调控由上皮到间质转换的过程,与 Figure 3 细胞功能实验相吻合。

讨 论

我国研究者对食管癌进行了长期的研究并取得显著成绩,提出环境因素是食管癌病因的假说^[1,9]。然而,同样暴露于相似环境因素的人群,却只有少数人发生食管癌,提示个人的遗传因素对食管癌发生可能有重要作用。目前普遍认为食管癌是多因素作用,属于多基因参与、多阶段发展的疾病,然而其发生、发展的确切机制仍未阐明。已有许多研究探讨了食管癌中癌基因和抑癌基因的改变,研究发现亚甲基四氢叶酸还原酶(methyltetrahydrofolate reductase, MTHFR),677C T 和 1298A C 两个位置的单核

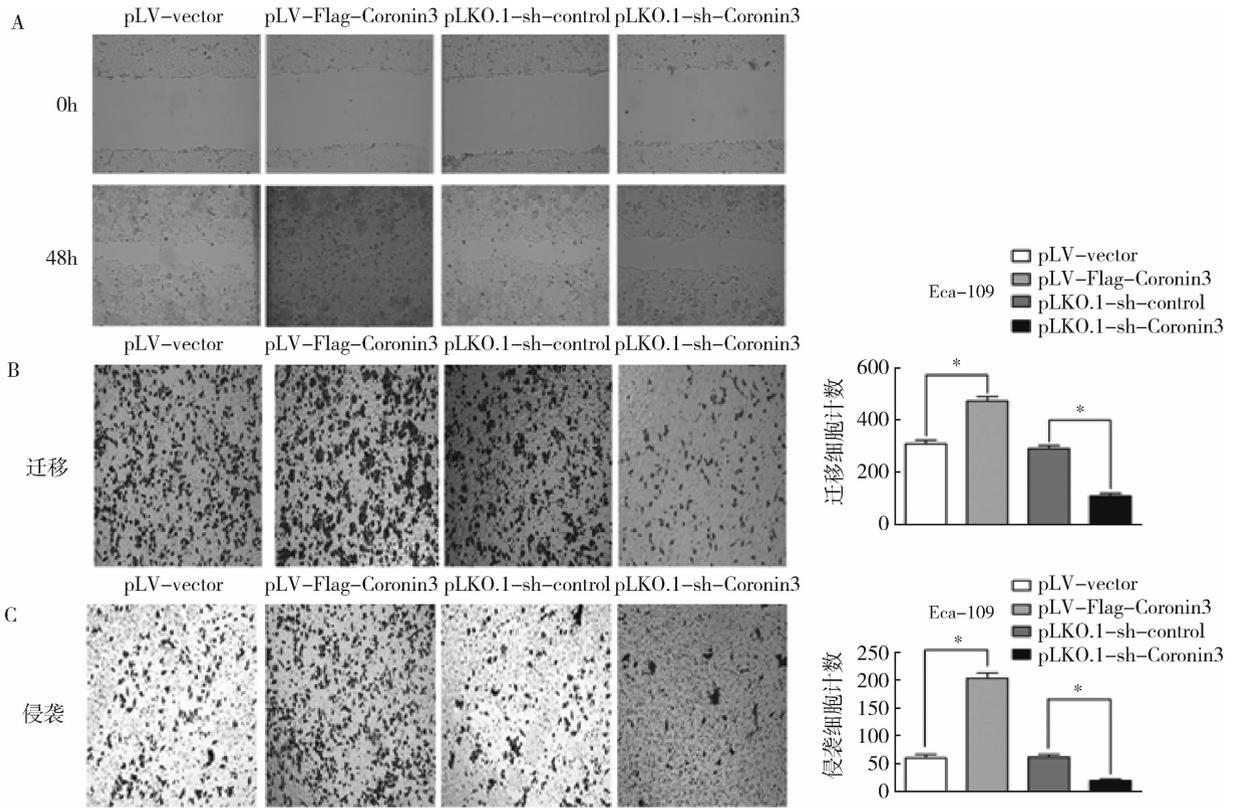


图 3 Coronin3 过表达和敲减影响 Eca - 109 细胞的转移和侵袭

A. 划痕实验验证 Coronin3 基因对细胞迁移的影响; 分别于 0h 和 48h 拍照, 观察划痕愈合情况; B. Transwell 实验验证 Coronin3 基因对细胞迁移的影响; 左图是细胞拍照图, 右边是 6 个不同视野下细胞计数统计图; C. Transwell 实验验证 Coronin3 基因对细胞侵袭的影响, 左图是细胞拍照图, 右边是 6 个不同视野下细胞计数统计图; 每组 6 个数据统计, 与对照组比较, * $P = 0.000$

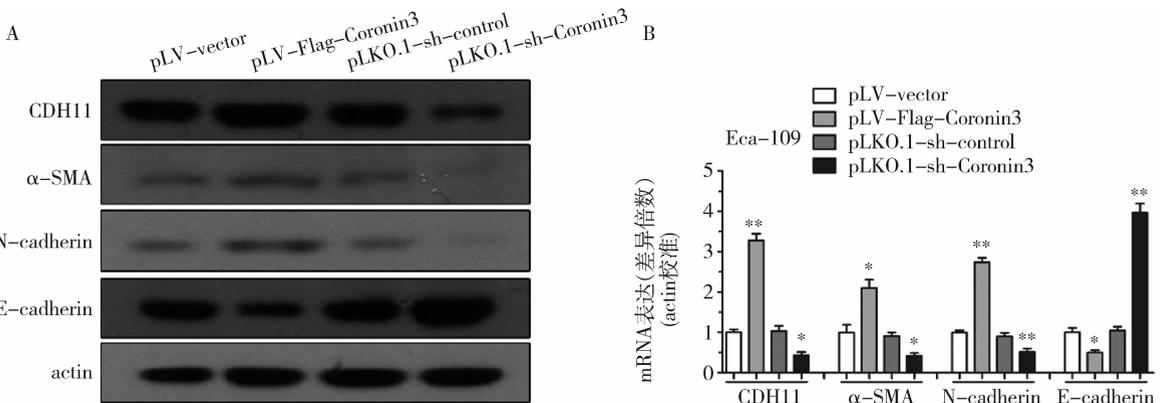


图 4 Coronin3 能够调控 EMT 标志物 CDH11, α -SMA, N-cadherin 和 E-cadherin 的蛋白和 mRNA 水平

A. Western blot 法检测 Coronin3 对 EMT 标志物 CDH11, α -SMA, N-cadherin 和 E-cadherin 的蛋白水平调控;
B. 荧光定量 PCR 检测 Coronin3 对 EMT 标志物 CDH11, α -SMA, N-cadherin 和 E-cadherin 的 mRNA 水平调控;
每组 3 个复孔, 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P = 0.000$

苷酸多态与食管癌的发生、发展具有紧密的相关性, 细胞色素 P450 基因家族中的 CYP2E1 和 CYP2A6 的基因多态性与食管癌风险相关, P53 和 CCND1 基因的突变, 拷贝数变化及多态性与食管癌发生和转移也

是具有较大的相关性^[10-17]。

目前很多文献报道了 Coronin3 在多种侵袭转移性肿瘤中的表达异常。一项关于头颈部鳞状细胞肿瘤(HNSCC)的研究发现在缺氧条件下 Coronin3 的表

达上调,由于局部缺氧是多种肿瘤预后不良的有力证据,因此 Coronin3 可能是恶性肿瘤预后不良的标志物^[18-20]。有研究发现雄激素敏感和不敏感的前列腺癌细胞系间存在 Coronin3 的差异表达,而雄激素不敏感是高侵袭性前列腺癌的特性之一,因此 Coronin3 的表达可能与前列腺癌的侵袭转移存在密切的联系。人肝癌标本的免疫组化研究显示 Coronin3 表达升高的患者其肿瘤的体积较大且多处于疾病进展期,因此 Coronin3 的水平很可能反映了肝癌的进展,有望成为预测肝癌疾病进展的候选生物标志物^[21]。事实上,Coronin3 已被证实是黑色素瘤进展的一个候选标志物,该分子的表达至少在一定程度上依赖 ERK 通路的激活。人弥漫性脑胶质细胞瘤中 Coronin3 的表达与其恶性程度密切相关,下调 Coronin3 的表达能够显著抑制细胞增殖,影响细胞迁移和抑制侵袭性伪足的形成,基质金属蛋白酶分泌也相应减少,最终抑制肿瘤细胞的侵袭转移。

本研究成功构建了 Coronin3 基因过表达和敲减的慢病毒载体,并且成功构建了 Coronin3 基因过表达和敲减的稳转食管癌 Eca-109 细胞株,通过划痕实验和两种 Transwell 实验笔者发现 Coronin3 基因对食管癌细胞株 Eca-109 迁移和侵袭有促进作用,显示 Coronin3 可能作为食管癌转移过程起到了重要作用,Coronin3 可以作为潜在的食管癌预后的标志物,以及治疗的靶标。通过后续的 Western blot 法和荧光定量 PCR 实验笔者发现了 Coronin3 促进食管癌细胞株 Eca-109 迁移和侵袭的机制主要通过促进上皮到间质转换的标志物的表达,及抑制间质到上皮转换的标志物的表达来实现的。因此,Coronin3 可以通过促进上皮-间质转换(EMT)来调控食管癌的转移和侵袭,为治疗食管癌提供了潜在的新靶标。

参考文献

- 1 贺宇彤,李道娟,梁迪,等. 2013 年中国食管癌发病和死亡估计[J]. 中华肿瘤杂志, 2017,39(4):60-66
- 2 Kato K, Muro K, Minashi K, *et al.* Phase II study of chemoradiotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin for Stage II-III esophageal squamous cell carcinoma: JCOG trial (JCOG 9906) [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 81(3):684-690
- 3 Cooper JS, Guo MD, Herskovic A, *et al.* Chemoradiotherapy of locally advanced esophageal cancer: long-term follow-up of a prospective randomized trial (RTOG 85-01). *Radiation Therapy Oncology Group* [J]. *JAMA*, 1999, 281(17):1623-1627
- 4 Gwynne S, Hurt C, Evans M, *et al.* Definitive chemoradiation for esophageal cancer - a standard of care in patients with non-metastatic esophageal cancer [J]. *Clin Oncol*, 2011, 23(3):182-188
- 5 Chen J, Su T, Lin Y, *et al.* Intensity-modulated radiotherapy combined with paclitaxel and platinum treatment regimens in locally advanced esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Transl Oncol*, 2017, 3:1-9
- 6 Chen J, Liu S, Pan J, *et al.* The pattern and prevalence of lymphatic spread in thoracic esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009, 36(3):480-486
- 7 陈建华,桑玫,陈宇航,等. 食管癌术后复发转移的类型及预后分析[J]. 中华肿瘤杂志, 1998, 4:293-295
- 8 Kanamoto A, Ninomiya I, Harada S, *et al.* Valproic acid inhibits irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like characteristics in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(5):1859-1869
- 9 张小刚,钟理,王建飞. 食管癌危险因素及预防研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(7):677-680
- 10 Qiu H, Wang Y, Kang M, *et al.* The relationship between IGF2BP2 and PPARG polymorphisms and susceptibility to esophageal squamous cell carcinomas in the eastern Chinese Han population [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10:5525-5532
- 11 Wang Y, Chen S, Kang M, *et al.* Genetic variations in MTHFR and gastric cardia adenocarcinoma susceptibility in the Chinese Han population [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10):18936-18944
- 12 Tan X, Chen M. Association between glutathione S-transferases P1 Ile105Val polymorphism and susceptibility to esophageal cancer: evidence from 20 case-control studies [J]. *Mol Biol Rep*, 2015, 42(2):399-408
- 13 He P, Wei M, Wang Y, *et al.* Associations among glutathione S-transferase T1, M1, and P1 polymorphisms and the risk of oral leukoplakia [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(6):312-321
- 14 Murao K, Yoshioka R, Kubo Y. Human papillomavirus infection in Bowen disease: negative p53 expression, not p16 (INK4a) overexpression, is correlated with human papillomavirus-associated Bowen disease [J]. *J Dermatol*, 2014, 41(10):878-884
- 15 李晓燕,李林蔚,王文玉,等. 食管癌相关基因 4 通过 p53 通路诱导食管癌细胞 G1 期阻滞 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(3):553-555
- 16 Eblen ST. Regulation of chemoresistance via alternative messenger RNA splicing [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(8):1063-1072
- 17 Komatsu S, Ichikawa D, Hirajima S, *et al.* Clinical impact of predicting CCND1 amplification using plasma DNA in superficial esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(6):1152-1159
- 18 Winter SC, Buffa FM, Silva P, *et al.* Relation of a hypoxia metagene derived from head and neck cancer to prognosis of multiple cancers [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(7):3441-3449
- 19 De Cecco L, Bossi P, Locati L, *et al.* Comprehensive gene expression meta-analysis of head and neck squamous cell carcinoma microarray data defines a robust survival predictor [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(8):1628-1635
- 20 Forster JC, Douglass MJ, Harriss-Phillips WM, *et al.* Simulation of head and neck cancer oxygenation and doubling time in a 4D cellular model with angiogenesis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):11037
- 21 Wang ZG, Jia MK, Cao H, *et al.* Knockdown of Coronin-1C disrupts Rac1 activation and impairs tumorigenic potential in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(3):1066-1072

(收稿日期:2017-12-21)

(修回日期:2018-01-04)