

• 消化疾病专栏 •

# CBS 表达与食管鳞癌生物学行为的关系

于永军<sup>1</sup>, 道日娜<sup>2</sup>, 刘春玲<sup>3</sup>, 杨鹏杰<sup>4</sup>, 李勇<sup>5</sup>, 廖振涛<sup>1\*</sup>

(1.内蒙古自治区赤峰市第二医院胸心血管外科, 内蒙古赤峰 024000; 2.内蒙古自治区赤峰市第二医院介入血液科, 内蒙古赤峰 024000; 3.内蒙古自治区赤峰市第二医院科研科, 内蒙古赤峰 024000; 4.北京大学肿瘤医院内蒙古医院胸外科, 内蒙古呼和浩特 010000; 5.北京国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院胸外科, 北京 100021)

**[摘要]** **目的** 探讨半胱氨酸  $\beta$ -合成酶 (cystathionine- $\beta$ -synthase, CBS) 在食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 组织中的表达特征, 明确其与患者临床病理参数的相关性, 并通过体内外实验深入探讨 CBS 对 ESCC 细胞恶性生物学行为 (包括增殖、迁移、侵袭、凋亡及体内成瘤能力) 的调控作用, 以期对 ESCC 的分子靶向治疗提供理论依据。**方法** 前瞻性收集 38 例行根治性切除术的 ESCC 患者的肿瘤组织及配对癌旁正常组织, 采用转录组测序筛选差异表达基因; 通过实时定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 和免疫组织化学实验分别在 mRNA 和蛋白水平验证 CBS 的表达, 分析 CBS mRNA 水平与患者临床病理特征 (TNM 分期、淋巴结转移等) 及预后的相关性。选取人正常食管上皮细胞 (human normal esophageal epithelial cells, HEEC) 及 ESCC 细胞系 (TE-1、ECA-109、KYSE-150), 检测 CBS 的 mRNA 表达水平, 并基于表达差异筛选目标细胞系。利用慢病毒介导的 shRNA 技术构建 CBS 敲降的 KYSE-150 细胞模型; 综合运用 CCK-8 法、Transwell 小室实验、流式细胞术 (Annexin V-FITC/PI 双染法) 及裸鼠皮下移植瘤模型, 分析 CBS 敲降对细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡及体内肿瘤生长的影响。**结果** 转录组测序及后续验证实验一致表明, CBS 在 ESCC 组织中的 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于癌旁正常组织 ( $P < 0.05$ )。临床相关性分析显示, CBS 表达水平与 T 分期 ( $r = 0.438, P = 0.006$ )、N 分期 ( $r = 0.730, P = 0.001$ )、TNM 分期 ( $r = 0.788, P < 0.001$ ) 及淋巴结转移 ( $r = 0.355, P < 0.001$ ) 呈正相关。在体外成功构建 CBS 稳定敲降的 KYSE-150 细胞株, 功能实验表明, 与空载体对照组 (sgRNA-NC) 相比, CBS 敲降组 (sgRNA-CBS) 的细胞增殖活性 (48 h 和 72 h OD 值) 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )、迁移能力 (迁移细胞数减少约 31%,  $P < 0.01$ ) 和侵袭能力 (侵袭细胞数减少约 40%,  $P < 0.01$ ) 均受到显著抑制, 同时细胞凋亡率显著升高 (约增加 54.4%,  $P < 0.01$ )。体内动物实验进一步证实, 干扰 CBS 表达可显著抑制裸鼠移植瘤的生长 [sgRNA-CBS 组第 22 天肿瘤体积 ( $624.0 \text{ mm}^3$ ) 明显低于 sgRNA-NC 组 ( $974.2 \text{ mm}^3$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )], 并伴随肿瘤增殖标志物 Ki-67 表达的下降。**结论** CBS 在 ESCC 中呈现显著高表达, 且其表达水平与肿瘤的恶性进展密切相关。体内外功能实验证实, CBS 具有促进 ESCC 细胞增殖、迁移、侵袭并抑制其凋亡的作用。本研究提示 CBS 可能作为 ESCC 一个有潜力的诊断标志物和治疗靶点, 为后续开发针对 CBS 的靶向治疗策略提供了重要的实验依据。

**[关键词]** 食管肿瘤; 半胱氨酸  $\beta$ -合成酶; 细胞恶性生物学行为 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2025.11.002

**[中图分类号]** R737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)11-1248-11

## Relationship between CBS expression and biological behavior of esophageal squamous cell carcinoma

YU Yong-jun<sup>1</sup>, DAO Ri-na<sup>2</sup>, LIU Chun-ling<sup>3</sup>, YANG Peng-jie<sup>4</sup>, LI Yong<sup>5</sup>, LIAO Zhen-tao<sup>1\*</sup>

(1. Department of Cardiovascular Thoracic Surgery, the Second Hospital of Chifeng City, Inner Mongolia Autonomous Region, Chifeng 024000, China; 2. Department of Interventional Hematology, the Second

[收稿日期] 2025-07-20

[基金项目] 内蒙古医学科学院公立医院科研联合基金科技项目

(2023GLLH0331)

[作者简介] 于永军 (1984-), 男, 内蒙古呼伦贝尔人, 内蒙古自治区赤峰市第二医院主治医师, 医学硕士, 从事食管癌诊治研究。

\* 通信作者。E-mail: Liaozt2007@sina.com

*Hospital of Chifeng City, Inner Mongolia Autonomous Region, Chifeng 024000, China; 3. Department of Scientific Research, the Second Hospital of Chifeng City, Inner Mongolia Autonomous Region, Chifeng 024000, China; 4. Department of Thoracic Surgery, Peking University Cancer Hospital (Inner Mongolia Campus), Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010000, China; 5. Department of Thoracic Surgery, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital of Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)*

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression characteristics of cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues, to clarify its correlation with clinicopathological parameters of patients, and to further explore the regulatory role of CBS in the malignant biological behaviors of ESCC cells (including proliferation, migration, invasion, apoptosis, and in vivo tumorigenicity) through in vitro and in vivo experiments, with the goal of providing a theoretical basis for molecular targeted therapy of ESCC. **Methods** Tumor tissues and paired adjacent normal tissues were prospectively collected from 38 ESCC patients undergoing radical resection. Transcriptome sequencing was used to screen differentially expressed genes. The expression of CBS was verified at the mRNA and protein levels by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and immunohistochemistry, respectively, and the correlation of CBS mRNA levels with clinicopathological features (TNM stage, and lymph node metastasis) and prognosis of patients was analyzed. Normal human normal esophageal epithelial cells (HEEC) and ESCC cell lines (TE-1, ECA-109, KYSE-150) were selected to detect CBS mRNA expression levels, and a target cell line was screened based on expression differences. A CBS-knockdown KYSE-150 cell model was constructed using lentivirus-mediated shRNA technology. The effects of CBS knockdown on cell proliferation, migration, invasion, apoptosis, and in vivo tumor growth were analyzed comprehensively using the CCK-8 assay, Transwell chamber assay, flow cytometry (Annexin V-FITC/PI double staining), and a subcutaneous xenograft tumor model in nude mice. **Results** Transcriptome sequencing and subsequent validation experiments consistently showed that the mRNA and protein expression levels of CBS in ESCC tissues were significantly higher than those in adjacent normal tissues (all  $P < 0.05$ ). Clinical correlation analysis revealed that CBS expression levels were positively correlated with T stage ( $r = 0.438$ ,  $P = 0.006$ ), N stage ( $r = 0.730$ ,  $P = 0.001$ ), TNM stage ( $r = 0.788$ ,  $P < 0.001$ ), and lymph node metastasis ( $r = 0.355$ ,  $P < 0.001$ ). A CBS-knockdown KYSE-150 cell line was successfully established in vitro. Functional experiments demonstrated that compared with the empty vector control group (sgRNA-NC), the CBS knockdown group (sgRNA-CBS) showed significantly inhibited cell proliferation activity (OD values suggesting significant differences at 48 h and 72 h,  $P < 0.001$ ), migration capacity (approximately 31% reduction in migrated cell number,  $P < 0.01$ ), and invasion capacity (approximately 40% reduction in invaded cell number,  $P < 0.01$ ), while the apoptosis rate was significantly increased (approximately 54.4% increase,  $P < 0.01$ ). In vivo animal experiments further confirmed that interfering with CBS expression significantly inhibited the growth of xenograft tumors in nude mice [At 22 d, the tumor volume in the sgRNA-CBS group ( $624.0 \text{ mm}^3$ ) was significantly lower than that in the sgRNA-NC group ( $974.2 \text{ mm}^3$ ), with a significant difference,  $P < 0.001$ ], accompanied by decreased expression of the tumor proliferation marker Ki-67. **Conclusion** CBS is significantly highly expressed in ESCC, and its expression level is closely related to malignant progression of the tumor. In vitro and in vivo functional experiments confirm that CBS promotes the proliferation, migration, and invasion of ESCC cells and inhibits their apoptosis. This study

suggests that CBS may serve as a potential diagnostic marker and therapeutic target for ESCC, providing important experimental evidence for the subsequent development of CBS-targeted therapeutic strategies.

[Key words] esophageal tumor; cysteine-β synthase; malignant biological behavior of cells

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)因其高病死率以及不良预后引起广泛关注<sup>[1-4]</sup>。ESCC 发病呈显著地域性,部分亚洲地区发病率可达全球平均水平的 5~8 倍<sup>[5-7]</sup>。从病理特征看,ESCC 具有高度侵袭性和转移倾向<sup>[8]</sup>,其致病机制涉及多因素协同作用<sup>[9]</sup>,包括烟草、乙醇、膳食亚硝酸盐以及微量营养素缺乏等<sup>[10-13]</sup>。半胱氨酸 β-合酶(cystathionine-β-synthase, CBS)作为含硫氨基酸代谢的关键酶,在同型半胱氨酸循环和硫化氢生物合成中发挥核心作用<sup>[14]</sup>。CBS 衍生物通过多种病理生理机制参与疾病进展<sup>[15-17]</sup>,与肿瘤进展密切相关<sup>[18-20]</sup>。然而, CBS 在 ESCC 中的作用机制尚不清楚。本研究全面解析 CBS 在 ESCC 中的表达特征及其对肿瘤恶性表型的调控作用。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 前瞻性收集了内蒙古自治区赤峰市第二医院 2022 年 9 月—2023 年 12 月 38 例行根治性食管切除术的 ESCC 患者手术标本,每例患者均同时获取肿瘤组织及距肿瘤边缘≥5 cm 的配对正常黏膜组织。所有入组病例均经两名资深病理医师双盲复核确认,肿瘤分期参照 AJCC 第 8 版 TNM 分期系统(T1N0M0-T3N3M0)。

本研究所有实验流程均通过赤峰市第二医院伦理委员会审批(批号:KY-24004),并严格遵循《赫尔辛基宣言》及 CIOMS 国际伦理准则。

1.2 纳入标准与排除标准 纳入标准:①初治患者,未接受过新辅助化疗、放疗等抗肿瘤治疗;②接受标准 R0 切除+D2 淋巴清扫术;③术后病理确

诊为原发性食管鳞癌;④临床随访资料完整。排除标准:①术前接受过任何形式的抗肿瘤治疗;②非根治性手术(探查或姑息切除);③存在远处转移(M1 期);④混合型或其他特殊类型食管恶性肿瘤;⑤合并消化系统慢性疾病;⑥严重系统性疾病(心功能 III~IV 级、未控制糖尿病等);⑦失访或临床数据缺失病例。

1.3 转录组测序 选取 6 组经病理确诊的 ESCC 组织及其配对癌旁正常组织进行高通量测序分析。样本采集后立即置于-80 °C 干冰保存,全程冷链运输至测序中心。测序数据质量控制采用多维度评估:①使用 FastQC 进行原始数据质量评估;② Trimmomatic 软件去除低质量序列(Phred 评分<30 分);③SortMeRNA 过滤核糖体 RNA 污染。基因表达量采用 TPM 法标准化处理,并通过主成分分析验证样本聚类特征。差异表达基因筛选标准设定为|log2FC|>1 且校正 P 值<0.01(Benjamini-Hochberg 法)。功能注释分析通过 DAVID 6.8 数据库完成。

1.4 实时定量聚合酶链式反应(Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)分析 RNA 提取采用改良型 Trizol 法,严格监控提取质量(A260/A280 比值 1.8~2.0)。cDNA 合成使用 HiScript II 逆转录试剂盒,反应体系包含:总 RNA 1 μg、Oligo(dT)18 primer 1 μL、dNTP Mix 1 μL、5×RT Buffer 4 μL。反应条件:预变性为 95 °C 30 s;扩增循环为 95 °C 5 s,60 °C 30 s(40 个循环);熔解曲线分析为 65~95 °C(0.5 °C/s)。所用 PCR 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
GAPDH	CAACTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC
CBS	TTCTCCTGGGCTTCTCTGA	GTTACACCTCATGTCTCTCT

1.5 免疫组织化学染色 组织样本在 10%中性缓冲福尔马林(pH=7.4),4 °C 固定 72 h。随后梯度乙醇脱水(70%~100%),二甲苯透明,石蜡浸渍。最后制备 4 μm 厚连续切片备用。载玻片经烘烤、脱腊、复水后,首先用 1×乙二胺四乙酸缓冲液(pH=

9.0)高压热修复(121 °C,15 min),随后用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 30 min、10%正常山羊血清,37 °C 30 min。使用兔抗 CBS 单克隆抗体(1:200,Abcam,英国)4 °C 过夜,加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG(1:1 000, Abcam,英国)37 °C 30 min。DAB 显色系统严格控

制显色时间(3~5 min),Mayer's 苏木素对比染色 1 min。结果判读采用双盲法,由 2 名病理医师独立评估。使用 Image Pro Plus 6.0 软件进行半定量分析,计算积分光密度值。

**1.6 细胞系和细胞培养** 实验细胞模型为恶性表型:TE-1(中分化)、ECA-109(低分化)、KYSE-150(高转移);正常对照:HEEC(3代以内)。细胞均购买自中国科学院上海生命科学研究院。培养条件:①培养基,TE-1/ECA-109 为 RPMI-1640+10%热灭活胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Gibco, 美国);KYSE-150/HEEC 为高糖 DMEM+10% FBS;②添加剂,1%双抗(青霉素 100 kU/L+链霉素 100 mg/L);③培养环境:37℃、5% CO<sub>2</sub>。

**1.7 CBS 敲降细胞株构建** 本研究采用慢病毒介导的 shRNA 干扰技术构建 CBS 基因敲降的 KYSE-150 细胞模型。具体操作流程如下:基于 CBS 基因序列(NCBI 登录号:NM\_000071)设计特异性 gRNA,由专业公司完成慢病毒载体构建。以 MOI=20 的感染复数进行病毒感染,同时设置空载体对照组。转染 48 h 后换用含 2 mg/L 嘌呤霉素的完全培养基进行阳性克隆筛选。通过有限稀释法获得单克隆细胞株,持续培养观察细胞形态变化。

## 1.8 转染效率验证

**1.8.1 转录水平检测** 按 1.4 节所述 RT-qPCR 方法操作,设置 3 组对照:未转染组、空载体组、野生型组。

**1.8.2 蛋白水平检测** 使用预冷 RIPA 裂解缓冲液(含 1×蛋白酶抑制剂)处理样本,BCA 法检测蛋白浓度。使用 10%分离胶,80 V 30 min 条件进行电泳,后改为 120 V 至溴酚蓝到达胶底。将蛋白转印至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭、一抗 4℃孵育过夜(CBS 1:1 000, GAPDH 1:5 000, Abcam, 英国)。洗膜后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:10 000, Abcam, 英国),室温 2 h。ECL 化学发光,Image Lab 软件进行灰度值分析。

**1.9 细胞增殖实验** 用 CCK-8 法评估细胞增殖。将食管癌细胞以  $2 \times 10^3$  个细胞/孔密度接种于 96 孔板(每孔 100  $\mu$ L 完全培养基),每组设 5 个技术重复,进行 3 次生物学重复。分别培养 24 h、48 h、72 h 后,移除原培养基,每孔加 100  $\mu$ L 含 10% CCK-8 试剂的新鲜培养基,37℃孵育 2 h,用酶标仪测 450 nm 吸光度值。

**1.10 细胞迁移和侵袭实验** 先将 CBS 基因敲降细胞在无血清培养基中饥饿培养 12 h,再接种于 Transwell 24 孔板。侵袭实验时,小室加 100  $\mu$ L

Matrigel 于 37℃孵育 1 h 成凝胶层,加  $1.25 \times 10^5$  个/mL 细胞悬液,下室加 600  $\mu$ L 含血清基础培养基。静置 10 min 观察记录。培养 48 h 后,将板移至含 500  $\mu$ L 固定液(甲醇:乙酸=3:1)的新板,小室加等量固定液摇匀,固定 10 min 后 PBS 清洗 3 次。用结晶紫染色,上室加 300  $\mu$ L、下室加 500  $\mu$ L,覆盖 20 min 后 PBS 清洗 3 次。棉签移除未穿透膜面细胞,移至加 500  $\mu$ L PBS 的新板,上室也加 500  $\mu$ L PBS。200 倍镜下观察选 10 个视野,算迁移细胞平均数评估肿瘤细胞迁移和侵袭能力。

**1.11 流式细胞术细胞凋亡检测** 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法(联科生物科技有限公司,中国杭州)。具体操作如下:取  $5 \times 10^4$  个细胞悬液,加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 荧光标记物,轻柔混匀后,再加入 10  $\mu$ L 碘化丙啶染色液。样本经充分混匀后,使用流式细胞仪进行检测,并通过 CellQuest 专业分析软件对凋亡细胞比例进行定量分析。

**1.12 动物实验** 本研究用 6 周龄雄性 BALB/c 裸鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,在 SPF 级环境饲养,通过伦理审批(批号:KY-24004)。将稳定转染 sgRNA-NC 或 sgRNA-CBS 的 KYSE-150 细胞悬液皮下注射到裸鼠背部,用游标卡尺测量肿瘤长径和短径,计算体积。当肿瘤体积达到 1 000 mm<sup>3</sup> 时人道处死取瘤。解剖取出肿瘤,称重、拍照,并可根据后续实验需求将组织分为 2 部分:冻存于-80℃用于蛋白/核酸提取或固定于福尔马林用于石蜡切片、HE 染色、Ki-67 免疫组织化学。

**1.13 统计学方法** 应用 SPSS Statistics 25 和 GraphPad Prism 10.0 软件分析数据。计量资料比较采用 *t* 检验或单因素方差分析进行组间比较,多重比较校正采用 Bonferroni 法;非正态分布数据则选用 Mann-Whitney *U* 检验及 Spearman 秩相关分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 食管癌患者的临床病理学特征** 本研究共纳入 38 例经病理确诊的食管鳞癌患者,其中男性 24 例(63.2%),女性 14 例(36.8%),患者年龄≤65 岁 19 例(50%),>65 岁 19 例(50%)。肿瘤部位分布情况如下:胸上段 5 例(13.2%),胸中段 15 例(39.5%),胸下段 18 例(47.4%)。病理分级结果显示:高分化型 3 例(7.9%),中分化型 25 例(65.8%),低分化型 10 例(26.3%)。所有病例均参照 NCCN 第 8 版 TNM 分期标准进行评估:原发肿瘤(T)分期为 T1 期 13 例(34.2%),T2 期 7 例(18.4%),T3

期 17 例(44.7%), T4 期 1 例(2.6%); 区域淋巴结(N) 分期为 N0 期 18 例(47.4%), N1 期 14 例(36.8%), N2 期 2 例(5.3%), N3 期 4 例(10.5%)。综合临床分期显示: I 期 9 例(23.7%), II 期 12 例(31.6%), III 期 12 例(31.6%), IV 期 5 例(13.2%); 值得注意的是, 52.6%(20/38) 的患者存在淋巴结转移。

**2.2 转录组测序结果** 在 6 对初始样本中, 质量值为  $Q20 \geq 90\%$ 、 $Q30 \geq 80\%$  且 GC 含量达标的 3 对样本(A1、A2、A3 为癌组织, B1、B2、B3 为配对癌旁组织) 通过质量检测被纳入分析, 见表 2。采用五数概

括法(最小值、下四分位数、中位数、上四分位数和最大值)对样本数据进行归一化处理, 见图 1A。通过双向层次聚类分析筛选差异表达基因, 当  $|\log_2(FC)| > 0.5, P < 0.05$  时, 共识别出 5 976 个差异表达的 mRNAs(3 125 个上调 mRNAs, 2 851 个下调 mRNAs)。其表达情况通过热图来可视化结果见图 1B。通过 TopGO 软件进行 GO 功能富集分析, 见图 1C, 结果显示这些基因富集在肿瘤形成上。差异表达基因中 CBS 基因在癌组织中的表达水平较癌旁组织显著升高, 见图 1D。

表 2 测序数据质量统计结果

Table 2 Statistical results of sequencing data quality

样本	原始读段	原始读对	原始底稿	清洗读段	清洗基线	清洗读取 对齐序列	平均长度	清洗读段 (%)	清洗基线 (%)	Q20(%)	Q30(%)
A1	37655502	18827751	5685980802	35921478	5355099855	17960739	149.1	95.40	94.18	97.30	93.20
A2	34871724	17435862	5265630324	32839748	4907544395	16419874	149.4	94.17	93.20	97.35	93.00
A3	44723994	22361997	6753323094	43772284	6546679335	21886142	149.6	97.87	96.94	97.75	93.75
B1	48526036	24263018	7327431436	47166786	7038434503	23583393	149.2	97.20	96.06	97.50	93.20
B2	35335188	17667594	5335613388	33889082	5061273032	16944541	149.3	95.91	94.86	97.45	93.20
B3	46919496	23459748	7084843896	45550278	6795379244	22775139	149.2	97.08	95.91	97.45	93.20

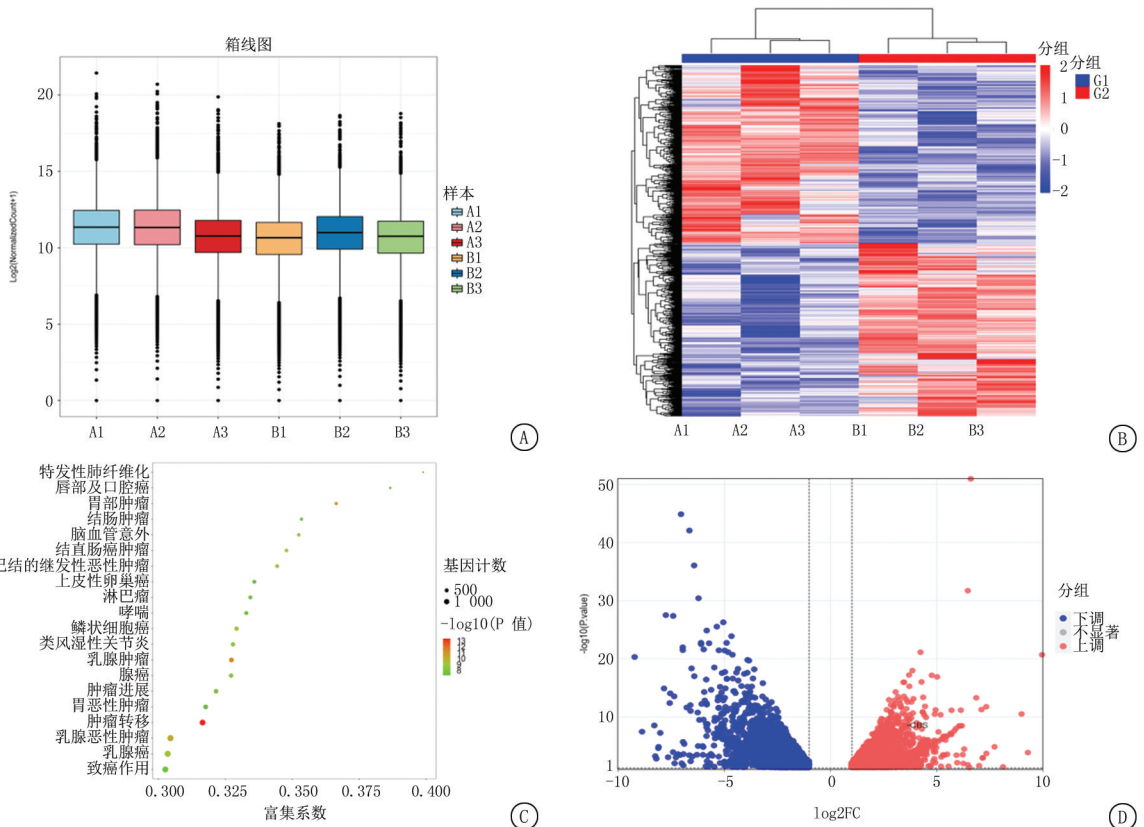


图 1 转录组测序结果

A. 转录数据归一化处理 Boxplot 图; B. 2 组样本间差异表达基因热图; C. 食管癌组织差异基因疾病富集; D. 2 组样本间差异表达基因火山图

Figure 1 Transcriptome sequencing results

**2.3 CBS 在食管癌和癌旁正常组织中的表达情况**

综合 RT-qPCR 和免疫组织化学结果, CBS 在食

管癌组织中的 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于癌旁正常组织 ( $P < 0.001$  和  $P < 0.05$ ), 见表 3、表 4、图 2。

表 3 在食管癌和癌旁正常组织中的 CBS mRNA 表达情况

Table 3 Expression of CBS mRNA in esophageal cancer and adjacent normal tissues

( $n=33, \bar{x} \pm s$ )

组别	CBS mRNA
癌旁组	1.346 ± 0.193
癌组	3.974 ± 0.244
<i>t</i> 值	8.442
<i>P</i> 值	< 0.001

表 4 在食管癌和癌旁正常组织中的 CBS 蛋白表达情况

Table 4 Expression of CBS protein in esophageal cancer and adjacent normal tissues

( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	CBS 蛋白
癌旁组	59.480 ± 9.363
癌组	111.900 ± 9.179 *
<i>t</i> 值	4.001
<i>P</i> 值	0.016

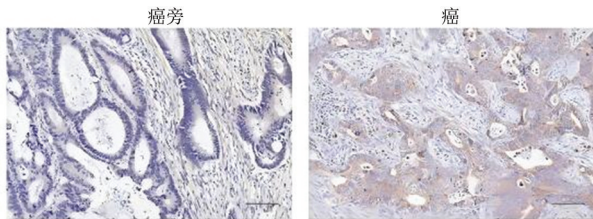


图 2 CBS 在食管癌和癌旁正常组织中免疫组织化学染色结果 ( $\times 100$ )

Figure 2 Immunohistochemical staining results of CBS in esophageal cancer and adjacent normal tissues ( $\times 100$ )

2.4 CBS 表达水平与 ESCC 患者临床特征的相关性 相关分析显示, 食管癌组织中 CBS mRNA 与患者性别、年龄、肿瘤位置及肿瘤分化程度无相关性 ( $P > 0.05$ ); CBS mRNA 表达水平与 T 分期、N 分期、TNM 临床分期及淋巴结转移情况显著相关, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 5。结果表明随着 T 分期、N 分期和 TNM 分期的进展, CBS mRNA 表达水平逐渐升高。

2.5 CBS 敲降细胞株构建及效果验证 与正常食管上皮细胞 HEEC 相比, 食管癌细胞系中 CBS 表达水平显著升高, 其中 KYSE-150 细胞株升高最明显(表 6), 因此选择 KYSE-150 进行后续实验。用含有 CBS 干扰序列 (sgRNA) 及其对照序列 (NC) 的慢病毒分别感染食管癌 KYSE-150 细胞 72 h 后, 利用 RT-qPCR 检测 CBS 敲降效果, 结果显示: sgRNA-CBS 组 CBS mRNA 及蛋白水平均显著降

低, 其中 sgRNA-CBS 组细胞中 CBS 蛋白表达水平为 sgRNA-NC 组的 ( $0.532 \pm 0.180$ ) 倍, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3、表 7、表 8。提示 CBS 基因敲降模型构建成功。

表 5 CBS 水平与临床病理指标的相关性分析

Table 5 Correlation analysis between CBS levels and clinicopathological indicators

指标	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
性别	0.012	0.511
年龄	0.504	0.440
肿瘤位置	0.079	0.236
分化程度	0.070	0.281
T 分期	0.438	0.006
N 分期	0.730	0.001
TNM 分期	0.788	< 0.001
淋巴结转移	0.355	< 0.001

表 6 不同食管癌细胞系中 CBS mRNA 表达情况

Table 6 Expression of CBS mRNA in different esophageal cancer cell lines

( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

组别	CBS mRNA
HEEC 组	1.113 ± 0.178
TE-1 组	7.803 ± 0.690 *
ECA-109 组	3.994 ± 0.532 *
KYSE-150 组	8.414 ± 0.885 *
<i>F</i> 值	29.840
<i>P</i> 值	< 0.001

\* *P* 值 < 0.05 与 HEEC 组比较 (Bonferroni 法)

表 7 KYSE150 细胞中 CBS mRNA 水平

Table 7 CBS mRNA levels in KYSE-150 cells

( $n=9, \bar{x} \pm s$ )

组别	CBS mRNA
KYSE-150 组	1.010 ± 0.047
sgRNA-NC 组	0.967 ± 0.064
sgRNA-CBS 组	0.172 ± 0.018 *
<i>F</i> 值	100.800
<i>P</i> 值	< 0.001

\* *P* 值 < 0.05 与 sgRNA-NC 组比较 (Bonferroni 法)

表 8 CBS 蛋白表达定量分析统计

Table 8 Quantitative statistical analysis of CBS protein expression

( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	CBS 蛋白表达水平
KYSE-150 组	1.000 ± 0.033
sgRNA-NC 组	1.081 ± 0.012
sgRNA-CBS 组	0.533 ± 0.104 *
<i>F</i> 值	21.590
<i>P</i> 值	0.002

\* *P* 值 < 0.05 与 sgRNA-NC 组比较 (Bonferroni 法)

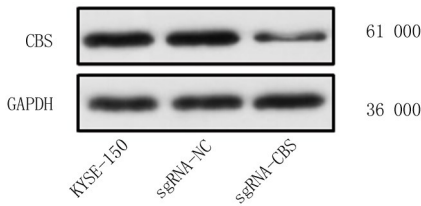


图3 转染 sgRNA 72 h 后, KYSE150 细胞中 CBS 蛋白表达水平

Figure 3 The expression level of CBS protein in KYSE150 cells at 72 h after transfection with sgRNA

2.6 CBS 对 ESCC 细胞生物学功能的影响 通过 CCK-8 和 Transwell 实验检测细胞增值、迁移及侵袭功能,结果显示:敲减 CBS 后细胞增值、迁移和侵袭能力均被显著抑制( $P < 0.05$ ),见表 9,表 10,图 4A、B;进一步通过流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果发现:相较于 sgRNA-NC 组,sgRNA-CBS 组的细胞凋亡比例升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 11、图 4C。说明敲减 CBS 表达可抑制 ESCC 细胞生物学功能。

表 9 敲减 CBS 对细胞增殖的影响

Table 9 The role of CBS knockdown in cell proliferation

( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	OD 值			
	0 h	24 h	48 h	72 h
sgRNA-NC 组	0.243±0.017	1.309±0.029	1.572±0.094	1.741±0.084
sgRNA-CBS 组	0.265±0.003	0.900±0.014	1.047±0.054	1.099±0.017
组间		$F$ 值=19.970	$P$ 值<0.001	
时点间		$F$ 值=265.300	$P$ 值<0.001	
组间·时点间		$F$ 值=78.044	$P$ 值<0.001	

表 10 敲减 CBS 对细胞迁移与侵袭的影响

Table 10 The role of CBS knockdown in cell migration and invasion

( $n=5, \bar{x} \pm s, \text{个}$ )

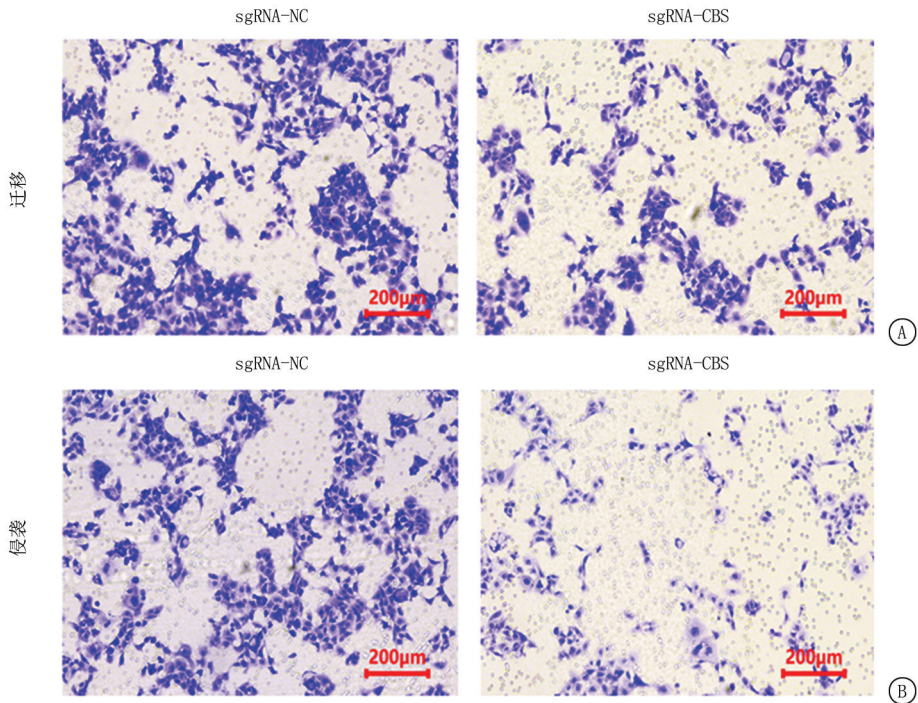
组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
sgRNA-NC 组	336.800±15.620	302.400±24.250
sgRNA-CBS 组	232.400±15.640	181.800±7.207
$t$ 值	4.723	4.768
$P$ 值	0.001	0.001

表 11 敲减 CBS 对细胞凋亡的影响

Table 11 The role of CBS knockdown in cell apoptosis

( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	细胞凋亡率
sgRNA-NC 组	24.340±1.354
sgRNA-CBS 组	37.580±2.046
$t$ 值	5.394
$P$ 值	0.006



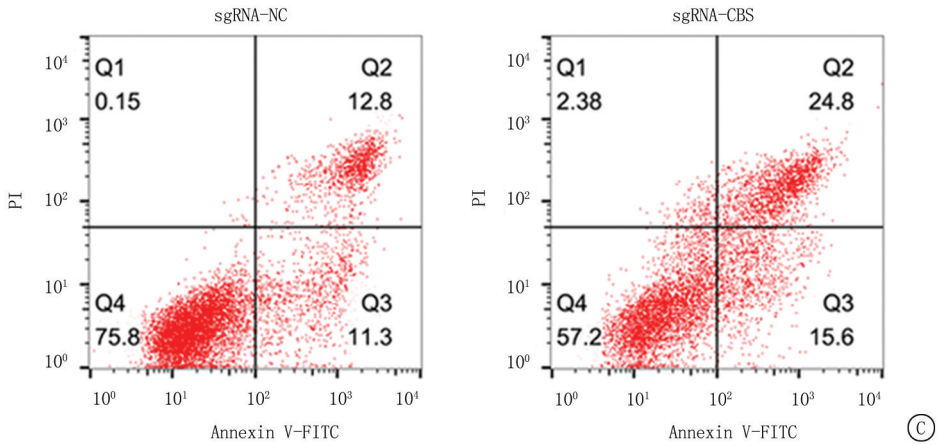


图4 CBS对ESCC细胞生物学功能的影响

A.细胞迁移检测(结晶紫染色);B.细胞侵袭检测(结晶紫染色);C.细胞凋亡检测

Figure 4 Effect of CBS on the biological functions of ESCC cells

2.7 CBS对体内ESCC细胞增殖的影响 为了研究CBS在体内的作用,我们通过慢病毒感染分别构建了稳定表达sgRNA-CBS和sgRNA-NC的KYSE-150细胞系,并将这些细胞注射到裸鼠皮下建立移植瘤模型。当实验中肿瘤最大体积达到 $1\ 000\ \text{mm}^3$ 时,处死全部小鼠并解剖收集肿瘤组织。通过测量肿瘤体积发现:当CBS表达被干扰后,体

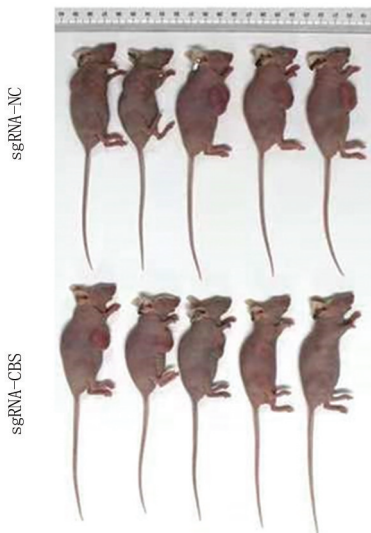
内肿瘤的生长受到显著抑制,见图5A、B,表12;通过对肿瘤组织进行HE染色及免疫组化染色发现:sgRNA-CBS组的肿瘤组织较sgRNA-NC组破坏减轻,sgRNA-CBS组的Ki67阳性染色面积较sgRNA-NC组明显减少,见图5C。以上结果表明,CBS基因的敲除显著抑制了肿瘤生长,即敲减CBS体内可促进ESCC细胞的增殖。

表12 2组不同时间肿瘤体积的变化比较

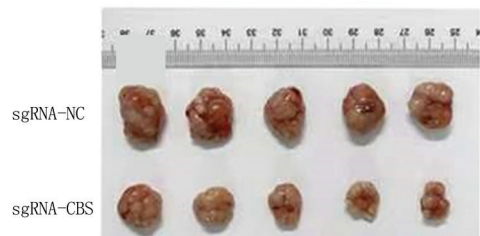
Table 12 Comparison of tumor volume changes between two groups at different time points

 $(n=5, \bar{x} \pm s, \text{mm}^3)$ 

组别	时间						
	1 d	7 d	10 d	12 d	15 d	18 d	22 d
sgRNA-NC组	0.00±0.00	190.80±28.05	246.50±27.39	370.20±51.31	580.90±72.76	889.70±49.20	974.20±60.01
sgRNA-CBS组	0.00±0.00	108.50±9.39	128.20±12.67	180.70±22.60	231.00±24.24	466.40±51.86	624.00±26.25
组间			$F$ 值=19.090	$P$ 值<0.001			
时点间			$F$ 值=251.800	$P$ 值<0.001			
组间·时点间			$F$ 值=38.700	$P$ 值<0.001			



A



B

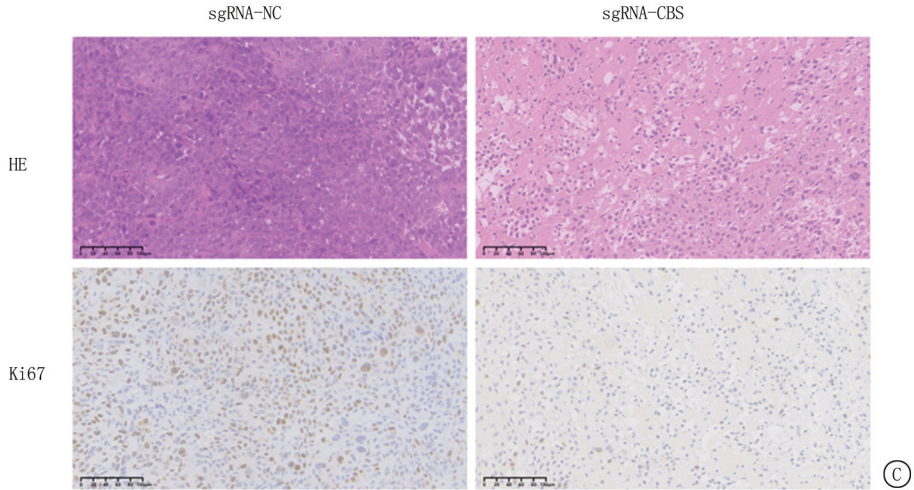


图5 CBS对体内ESCC细胞增殖的影响

A.裸鼠成瘤;B.瘤体;C.HE染色(×200)和Ki-67免疫组织化学染色(×200)

Figure 5 Effect of CBS on the proliferation of ESCC cells in vivo

### 3 讨 论

本研究的核心发现在于,通过整合临床组织样本分析、体外细胞模型及体内动物实验,首次系统地证实了CBS在ESCC中作为一个关键的促癌基因发挥作用。本研究数据清晰地描绘了一条从CBS表达上调到ESCC恶性表型加剧的因果链: CBS在mRNA和蛋白水平的显著高表达,与肿瘤的局部浸润深度、淋巴结转移及晚期临床分期紧密关联;而功能丧失性实验则证明,抑制CBS可同时从多个维度削弱肿瘤的恶性潜能——既抑制其增殖与克隆形成能力,又削弱其迁移与侵袭的动力学特征,同时还逆转了其抗凋亡特性。这一“多效性”特点提示,CBS很可能位于ESCC致病网络中的一个枢纽位置。

本研究将CBS的表达水平与精确的临床病理参数相联系,发现其与TNM分期及淋巴结转移呈显著正相关,这超越了简单的“表达差异”描述,提示CBS是推动ESCC侵袭性进展的主动因素,而非被动伴随现象。这一发现为将CBS开发为预后预测的生物标志物提供了强有力的临床依据。对于具有CBS高表达特征的ESCC患者,其肿瘤可能更具侵袭性,需要更密切的随访和更积极的干预策略。

从基础研究角度而言,本研究为ESCC的分子机制研究开辟了新的方向。虽然已有文献<sup>[21-26]</sup>报道与ESCC发生发展相关的多个分子标志物,但CBS在ESCC肿瘤演进过程中的确切作用机制仍存在空白。基于现有实验结果,提出科学假说: CBS可能通过调控细胞周期进程、运动能力或细胞间信号传导等关键生物学过程,促进肿瘤的恶性进展。

然而,这些推测需要后续实验的深入验证,特别是其具体的分子作用机制有待进一步阐明。特别值得关注的是,本研究对CBS表达谱的系统分析为其作为治疗靶点的可行性提供了实验依据。若能通过后续研究确证CBS在ESCC发生中的核心作用,针对该分子开发特异性靶向治疗方案,将为现有治疗效果欠佳的ESCC患者群体提供新的治疗选择。

在细胞模型研究中,本研究采用多株ESCC细胞系与HEEC进行对比分析,结果显示所有肿瘤细胞系中CBS表达均显著上调,其中KYSE-150细胞表现出最显著的表达差异,这一发现提示CBS在ESCC发生发展中可能发挥关键作用。通过CRISPR-Cas9基因编辑技术结合慢病毒转导系统,成功构建了CBS稳定敲降的KYSE-150细胞模型。RT-qPCR和免疫组织化学染色检测证实,实验组细胞中CBS在转录和翻译水平均被有效抑制,为后续功能研究提供了可靠的实验体系。综合应用CCK-8增殖检测、Transwell迁移实验、基质胶侵袭实验和凋亡检测等多种技术手段,发现CBS敲降可显著抑制肿瘤细胞的增殖活力、运动能力和侵袭潜能,同时诱导细胞凋亡。这些结果不仅证实CBS对肿瘤细胞生存的维持作用,更提示其可能参与调控ESCC的转移过程。

尽管本研究未直接解析下游信号通路,但基于本实验结果并整合最新文献,可以构建一个关于CBS在ESCC中潜在作用机制的综合性假说框架。

3.1 代谢重编程与能量/氧化应激稳态调控 CBS是含硫氨基酸代谢的核心酶,其最主要的生物学功能之一是内源性生成气体信号分子硫化氢(H<sub>2</sub>S)。在肿瘤细胞中,CBS的高表达可能通过H<sub>2</sub>S诱导一

种特殊的“代谢重编程”。一方面, H<sub>2</sub>S 可通过硫基化修饰激活关键的能量感受器 AMPK 和 mTORC1 信号轴, 优化肿瘤细胞在营养应激条件下的能量代谢<sup>[27]</sup>。另一方面, H<sub>2</sub>S 因其还原特性, 能够有效清除活性氧, 维持肿瘤细胞内的氧化还原平衡, 这不仅能保护细胞免受氧化应激诱导的损伤, 还可能通过创造一个适宜的微环境, 间接稳定 HIF-1 $\alpha$  等促癌转录因子, 从而促进血管生成和糖酵解。

**3.2 促生存与增殖信号通路的激活** 本研究观察到的增殖受抑和凋亡增加, 强烈指向经典促生存通路的介入。研究证实, CBS/H<sub>2</sub>S 轴能够通过硫基化修饰, 正调控 PI3K/Akt 和 MAPK/ERK 通路<sup>[28]</sup>。推测在 ESCC 中, CBS 衍生的 H<sub>2</sub>S 可能通过抑制 PTEN 等负调控因子的活性, 或直接激活 Akt, 进而磷酸化并抑制下游的促凋亡蛋白(如 Bad、Bax), 同时上调细胞周期蛋白 D1 和 c-Myc 的表达, 形成一个驱动细胞周期并抑制凋亡的信号网络。

**3.3 细胞骨架重塑与侵袭表型的获得** 对迁移和侵袭实验的结果提示 CBS 深刻影响着细胞的运动能力, 其机制可能涉及对“上皮-间质转化”(emergency-mesenchymal transition, EMT) 程序的调控。H<sub>2</sub>S 已被证明可上调 Snail、Slug 和 ZEB1 等 EMT 核心转录因子<sup>[29]</sup>, 导致 E-钙黏蛋白丢失和波形蛋白等间质标志物增加, 赋予细胞更强的迁移性。此外, CBS 还可能通过调控 Rho GTPase 家族成员(如 Rac1、Cdc42)的活性, 直接驱动细胞骨架的重排和伪足形成。在侵袭过程中, CBS/H<sub>2</sub>S 还可能通过激活转录因子如 AP-1, 促进基质金属蛋白酶(MMP-2, MMP-9)的表达与分泌, 从而降解细胞外基质屏障<sup>[30]</sup>。

**3.4 肿瘤微环境的塑造** CBS 的作用可能超越了肿瘤细胞自身, 其产生的 H<sub>2</sub>S 作为一种可扩散的气体分子, 能作用于肿瘤微环境中的其他组分。例如, H<sub>2</sub>S 是已知的血管舒张因子, 可促进内皮细胞增殖和迁移, 从而刺激肿瘤血管新生。同时, H<sub>2</sub>S 对免疫细胞功能具有复杂的调节作用, 可能通过诱导 T 细胞凋亡或促使巨噬细胞向 M2 促肿瘤表型极化, 从而帮助肿瘤细胞实现免疫逃逸。这或许能部分解释体内实验中观察到的强效抑瘤效果。

本研究的局限性在于对上述机制假说尚未进行直接的实验验证。未来的研究工作将围绕以下几个方向展开: 首先, 利用蛋白质组学和磷酸化蛋白质组学技术, 系统筛选 CBS 敲除后发生显著变化的信号通路和关键磷酸化位点; 其次, 通过回复性实验, 在敲低 CBS 的细胞中重新激活 Akt 或过表达 EMT

转录因子, 观察能否“挽救”其恶性表型, 从而确立因果联系; 最后, 探索靶向 CBS 的药物治疗潜力, 例如评估 CBS 特异性抑制剂(如 AOAA)在 ESCC 模型中的疗效, 并探索其与现有化疗药物的协同作用。

综上所述, 本研究不仅确立了 CBS 是 ESCC 一个重要的预后相关癌基因, 还从其多功能的生物学特性出发, 构建了一个整合了代谢调控、信号转导、细胞动力学及微环境互作的综合性分子机制框架。这一框架为全面理解 CBS 在 ESCC 中的核心作用提供了新的视角, 并将有力地推动针对 CBS/H<sub>2</sub>S 信号轴的靶向治疗策略的开发, 为改善 ESCC 患者的预后带来新的希望。

#### [参考文献]

- [1] Chen W, Wang Y, Wang L, et al. CKAP2L promotes esophageal squamous cell carcinoma progression and drug-resistance by modulating cell cycle[J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 2378253.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018; GLOBOCAN sources and methods[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.
- [4] Yamashina T, Ishihara R, Nagai K, et al. Long-term outcome and metastatic risk after endoscopic resection of superficial esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(4): 544-551.
- [5] He F, Wang J, Liu L, et al. Esophageal cancer: Trends in incidence and mortality in China from 2005 to 2015 [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(5): 1839-1847.
- [6] Liu Z, Kim MO. Evolving therapeutic strategies in esophageal squamous cell carcinoma; Advances and perspectives[J]. *J Cancer Prev*, 2024, 29(4): 99-104.
- [7] Simba H, Kuivaniemi H, Abnet CC, et al. Environmental and life-style risk factors for esophageal squamous cell carcinoma in Africa: A systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Public Health*, 2023, 23(1): 1782.
- [8] Murphy G, McCormack V, Abedi-Ardekani B, et al. International cancer seminars: A focus on esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(9): 2086-2093.
- [9] Huang FL, Yu SJ. Esophageal cancer: Risk factors, genetic association, and treatment[J]. *Asian J Surg*, 2018, 41(3): 210-215.
- [10] Zhao L, Li YC, Wu JP, et al. Increased risk of esophageal squamous cell carcinoma associated with frequent and long-term consumption of salted meat and salted fat[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(8): 3841-3849.

- [11] Shi F, Yan F, Jin M, et al. Pre-diagnosis consumption of preserved vegetables and prognosis of invasive oesophageal squamous cell carcinoma; A prospective cohort study in one high-risk area in China[J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(10): 4306-4314.
- [12] Zhang Z, Kang L, Gu Y, et al. Alcohol accelerates the development of esophageal squamous cell carcinoma through elevated Gram-negative bacteria in peripheral circulation[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2025, 14(1): 19.
- [13] Katada C, Yokoyama T, Mure K, et al. Risk factors for the development of second primary esophageal squamous-cell carcinoma after endoscopic resection for esophageal squamous-cell carcinoma according to genetic polymorphisms related to alcohol and nicotine metabolism[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2023, 53(9): 774-780.
- [14] Szabo C. Hydrogen sulfide, an endogenous stimulator of mitochondrial function in cancer cells[J]. *Cells*, 2021, 10(2): 220.
- [15] Zuhra K, Augsburger F, Majtan T, et al. Cystathionine- $\beta$ -synthase; Molecular regulation and pharmacological inhibition [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(5): 697.
- [16] Liu GJ, Hu XJ, Huo BJ, et al. Cystathionine  $\beta$ -synthase expression correlates with tumor development and poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the gastroesophageal junction[J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(4): 2739-2748.
- [17] Chen S, Zuo S, Zhu J, et al. Decreased expression of cystathionine  $\beta$ -synthase exacerbates intestinal barrier injury in ulcerative colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2019, 13(8): 1067-1080.
- [18] Cao X, Ding L, Xie ZZ, et al. A Review of hydrogen sulfide synthesis, metabolism, and measurement; Is modulation of hydrogen sulfide a novel therapeutic for cancer[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(1): 1-38.
- [19] Santos SS, Rodrigues LOCP, Martins V, et al. Role of cystathionine  $\beta$ -synthase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the regulation of proliferation, migration, and bioenergetics of murine breast cancer cells [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(3): 647.
- [20] Hu XJ, Sun Y, Liu GJ, et al. Cystathionine- $\beta$ -synthase expression correlates with tumour progression and adverse prognosis in patients with colon cancer[J]. *J Int Med Res*, 2024, 52(9): 3000605241263726.
- [21] Zhang S, Jin Y, Han Q, et al. FOXA3: A novel tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Gene Med*, 2025, 27(2): e700009.
- [22] Wen H, Liu XB, Zhu ZD, et al. TET2 is downregulated in early esophageal squamous cell carcinoma and promotes esophageal squamous cell malignant behaviors[J]. *Dig Dis Sci*, 2024, 69(7): 2462-2476.
- [23] Zhan J, Li M, Li L, et al. Targeting LTBP2 derived from cancer-associated fibroblasts sensitizes esophageal squamous cell carcinoma to chemotherapy [J]. *Cancer Res*, 2025, 85(13): 2412-2428.
- [24] Yuan Q, Shi Y, Wang J, et al. p38 mediated ACSL4 phosphorylation drives stress-induced esophageal squamous cell carcinoma growth through Src myristoylation [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 3319.
- [25] Zhou H, Gong H, Zeng X, et al. MTHFD2 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via m6A modification-mediated upregulation and modulation of the PEBP1-RAF1 interaction[J]. *Int J Mol Med*, 2025, 55(5): 68.
- [26] Xu JC, Wu LF, Chen TY, et al. Hypoxia-induced PGK1 expression promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via stimulating MYH9-mediated GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signalling[J]. *Clin Transl Med*, 2025, 15(6): e70376.
- [27] Sun HJ, Wu ZY, Nie XW, et al. Implications of hydrogen sulfide in liver pathophysiology; Mechanistic insights and therapeutic potential[J]. *J Adv Res*, 2020, 27: 127-135.
- [28] Frau M, Feo F, Pascale RM. Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(4): 830-841.
- [29] Zhang H, Hao LZ, Pan JA, et al. Microfluidic fabrication of inhalable large porous microspheres loaded with H<sub>2</sub>S-releasing aspirin derivative for pulmonary arterial hypertension therapy[J]. *J Control Release*, 2021, 329: 286-298.
- [30] Guo S, Li J, Huang Z, et al. The CBS-H<sub>2</sub>S axis promotes liver metastasis of colon cancer by upregulating VEGF through AP-1 activation[J]. *Br J Cancer*, 2022, 126(7): 1055-1066.

(本文编辑:王聪)