

抑制BRD4可促进ACC1低表达的食管鳞癌细胞迁移

贾文鑫^{1,2,3}, 霍书华^{1,2,3}, 唐家萍^{1,2,3}, 刘玉珍^{1,2,3}, 赵宝生^{1,2,3}

¹河南中医药大学第一附属医院胸外科, 河南 卫辉 453100; ²河南省卫生健康委员会食管癌转移及转化重点实验室, 河南 卫辉 453100; ³河南中医药大学食管癌研究所, 河南 卫辉 453100

摘要:目的 探究抑制BRD4对乙酰辅酶A羧化酶1(ACC1)低表达食管鳞癌(ESCC)细胞迁移的影响。方法 慢病毒转染法构建对照组细胞系shNC和敲低ACC1组细胞系shACC1。分别设置BRD4抑制剂组:shNC-DMSO, shNC-JQ1, shACC1-DMSO, shACC1-JQ1; 转染组:shNC-siNC, shNC-siBRD4, shACC1-siNC, shACC1-siBRD4; 组蛋白乙酰转移酶抑制剂组:shNC-siNC-DMSO, shACC1-siNC-DMSO, shACC1-siBRD4-DMSO, shACC1-siBRD4-C646; 自噬抑制剂组:shNC-JQ1-Veh, shACC1-JQ1-Veh, shACC1-JQ1-3-MA。RT-qPCR实验测定BRD4在ESCC细胞中mRNA水平。CCK-8实验、Transwell迁移实验、Western blotting实验检测抑制BRD4对ACC1低表达细胞的影响。结果 BRD4在shACC1组中表达水平差异无统计学意义; 与shNC组对比, shACC1组对JQ1更敏感; 1 μmol/L和2 μmol/L JQ1抑制ESCC细胞增殖($P<0.05$), 0.2 μmol/L和2 μmol/L JQ1促进ESCC细胞迁移($P<0.01$); 与shNC-JQ1组对比, shACC1-JQ1组细胞迁移Vimentin($P<0.0001$)、Slug($P<0.001$, $P<0.0001$)表达升高, E-cadherin($P<0.0001$)表达降低; 敲低BRD4促进ESCC细胞迁移, 与shNC-siBRD4组对比, shACC1-siBRD4组细胞Vimentin($P<0.0001$)、Slug($P<0.0001$)表达升高, E-cadherin($P<0.0001$)表达降低; 与shACC1-siBRD4-DMSO组对比, shACC1-siBRD4-C646组乙酰化水平降低, Vimentin($P<0.0001$, $P<0.001$)、Slug($P<0.0001$)表达降低, E-cadherin($P<0.0001$, $P<0.05$)表达升高; 与shNC-DMSO组对比, shNC-JQ1组LC3A/BII水平升高($P<0.0001$); 与shACC1-DMSO组对比, shACC1-JQ1组LC3A/BII水平升高($P<0.0001$); 与shACC1-JQ1-Veh组对比, shACC1-JQ1-3-MA组细胞Vimentin($P<0.0001$)、Slug($P<0.0001$)表达降低, E-cadherin($P<0.0001$, $P<0.001$)表达升高, LC3A/BII水平降低。结论 抑制BRD4通过依赖组蛋白乙酰化机制促进自噬, 进而促进上皮-间质转化(EMT), 最终增强ACC1低表达所致的ESCC细胞迁移。

关键词:食管鳞癌; 乙酰辅酶A羧化酶1; BRD4; 迁移

Inhibition of BRD4 promotes migration of esophageal squamous cell carcinoma cells with low ACC1 expression

JIA Wenxin^{1,2,3}, HUO Shuhua^{1,2,3}, TANG Jiaping^{1,2,3}, LIU Yuzhen^{1,2,3}, ZHAO Baosheng^{1,2,3}

¹Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Henan Medical University, Weihui 453100, China; ²Key Laboratory of Esophageal Cancer Metastasis and Transformation of Henan Provincial Health Commission, Weihui 453100, China; ³Institute of Esophageal Cancer, Henan Medical University, Weihui 453100, China

Abstract: Objective To investigate the effect of BRD4 inhibition on migration of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells with low acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) expression. **Methods** ESCC cell lines with lentivirus-mediated ACC1 knockdown or transfected with a negative control sequence (shNC) were treated with DMSO, JQ1 (a BRD4 inhibitor), co-transfection with shNC-siBRD4 or siNC with additional DMSO or C646 (an histone acetyltransferase inhibitor) treatment, or JQ1 combined with 3-MA (an autophagy inhibitor). BRD4 mRNA expression in the cells was detected using RT-qPCR. The changes in cell proliferation, migration, autophagy, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) were examined with CCK8 assay, Transwell migration assay, and Western blotting. **Results** ACC1 knockdown did not significantly affect BRD4 expression in the cells but obviously increased their sensitivity to JQ1. JQ1 treatment at 1 and 2 μmol/L significantly inhibited ESCC cell proliferation, while JQ1 at 0.2 and 2 μmol/L promoted cell migration. The cells with ACC1 knockdown and JQ1 treatment showed increased expressions of vimentin and Slug and decreased expression of E-cadherin. BRD4 knockdown promoted migration of ESCC cells, and co-transfection with shACC1 and siBRD4 resulted in increased vimentin and Slug expressions and decreased E-cadherin expression in the cells. C646 treatment of the co-transfected cells reduced acetylation levels, decreased vimentin and Slug expressions, and increased E-cadherin expression. Treatment with JQ1 alone obviously increased LC3A/B-II levels in the cells either with or without ACC1 knockdown. In the cells with ACC1 knockdown and JQ1 treatment, additional 3-MA treatment significantly decreased the expressions of vimentin, Slug and LC3A/B-II and increased the expression of E-cadherin. **Conclusion** BRD4 inhibition promotes autophagy of ESCC cells via a histone acetylation-dependent mechanism, thereby enhancing EMT and ultimately increasing cell migration driven by ACC1 deficiency.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma; acetyl-CoA carboxylase 1; BRD4; migration

收稿日期: 2025-03-06

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(242102311124); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGI20240490); 河南省医学科技攻关联合共建计划项目(LHGJ20230506); 新乡医学院研究生科研创新支持计划项目(YJSCX202407Z)

作者简介: 贾文鑫, 在读硕士研究生, E-mail: 1005339926@qq.com

通信作者: 赵宝生, 主任医师, 教授, 硕士生导师, E-mail: drbszhaoh@xxmu.edu.cn

食管癌是最常见的恶性肿瘤之一, 我国食管癌患者以食管鳞癌为主^[1]。尽管食管癌在诊断和治疗方面取得了很大进展, 但患者5年生存率约20%^[2], 肿瘤转移是导致患者死亡的关键因素, 然而其转移机制尚不明确, 因此探究食管癌转移机制对于改善患者预后具有重要临床意义。

过往研究发现诸多因素与食管癌转移相关,我们前期研究表明,在食管鳞癌(ESCC)细胞中敲低乙酰辅酶A羧化酶1(ACC1)可通过上调组蛋白乙酰化水平促进细胞迁移^[3]。BRD4作为乙酰化组蛋白的“阅读器”,在基因表达调控中发挥重要作用,通过结合乙酰化组蛋白调控包括细胞周期、增殖、凋亡和迁移在内的多种生物学过程^[4-6],BRD4在包括ESCC在内的多种恶性肿瘤中呈现高表达,且其表达水平与患者不良预后呈正相关,是潜在的肿瘤治疗靶点^[7]。尽管已有研究报告抑制BRD4可影响ESCC细胞的增殖和迁移能力^[8],然而,在ACC1下调导致组蛋白乙酰化修饰水平增高的特定背景下,BRD4如何调控ESCC细胞迁移目前尚不清楚。为此,本研究在ACC1敲低的ESCC细胞模型基础上,应用BRD4抑制剂和siRNA干扰,探究抑制BRD4对ACC1低表达所致ESCC细胞迁移能力的影响,重点关注组蛋白乙酰化、自噬水平与上皮-间质转化(EMT)等关键过程,以期ACC1低表达的ESCC患者提供更为精准的BRD4靶向干预理论依据和治疗策略。

1 材料和方法

1.1 材料

人食管鳞癌细胞KYSE-150(中国科学院上海生命科学研究所)、KYSE-450和KYSE-510(南京科佰生物科技有限公司);RPMI 1640培养基、FBS、Transwell小室(Corning);1%青霉素-链霉素混合液、DMSO(Solarbio);BRD4抑制剂JQ1(碧云天);选择性乙酰转移酶p300/CBP抑制剂C646(Selleck);自噬抑制剂3-MA(Selleck);BRD4引物(金斯瑞);shACC1及其对照组shNC(GenePharma);人源性BRD4小干扰RNA(siBRD4)及其阴性对照(siNC)(Santa);Green 2×Qpcr MasterMix(Abm);PrimerScript RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR Premix Ex Taq II(Takara);Trizol(Invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞所用完全培养基为RPMI 1640、10% FBS和1%青霉素链霉素混合液,放置于37℃、饱和湿度下5% CO₂的培养箱中培养。3 d/次传代。应用0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数期细胞进行试验。

1.2.2 细胞转染 取对数期且生长状态好的细胞,常规铺板2个小皿17 h后进行转染。使用Polybrene试剂转染对照组shNC、实验组shACC1(5'-TACAAGGGATA CAGGTA-TTTA-3'),嘌呤霉素2 μg/mL连续筛选3代,建立稳定细胞系,进行后续实验。在shNC和shACC1细胞系中,使用Lipofectamine™ 2000转染siRNA BRD4(sc-43639),步骤严格按照试剂说明书进行,分别

获得对照组siNC细胞和实验组siBRD4细胞,继续培养24 h进行后续实验。

1.2.3 CCK-8 取对数生长期的敲低ACC1的KYSE-150、KYSE-450细胞,以1×10³/孔接种于96孔板,每组5个复孔。将细胞置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养48 h后,加入5 mg/mL的CCK-8试剂10 μL/孔,37℃培养箱孵育2 h,酶标仪检测吸光度A_{450nm}值。

1.2.4 RT-qPCR 测定 用Trizol试剂分离细胞中总RNA,并逆转成cDNA。根据说明书要求进行仪器设置如下:95℃:10 min;95℃:15 s;60℃:1 min;40个循环。通过阈值比较(Ct)法比较目的基因的相对表达量。引物用引物5.0设计,由金斯瑞生物科技公司合成,引物序列(表1)。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
ACC1-F	ATCCCGTACCTTCTTCTACTG
ACC1-R	CCCAAACATAAGCCTTCACTG
BRD4-F	TGGATGCCGTCAAGCTGAAC
BRD4-R	GTTTCTTCTGTGGGTAGCTCATT
GAPDH-F	AATGGGACGCCGTTAGGAAA
GAPDH-R	GCGCCCAATACGACCAAATC

1.2.5 Transwell 迁移实验 取对数生长期细胞,采用无血清RPIM 1640培养基重悬细胞,调整细胞密度为1×10⁴/mL,下室600 μL含10% FBS培养基,将小室放入培养板中,取100 μL加入Transwell上室,放入37℃、5% CO₂培养箱中培养。27 h后4%多聚甲醛固定15 min,0.1%的结晶紫染色8 min,使用棉签擦去上室面未迁移的细胞,于显微镜下观察细胞,取5个不同视野进行拍照计数。

1.2.6 Western blotting 收集细胞,提取总蛋白,进行SDS-PAGE分析。取等量蛋白样品进行电泳,电泳完成后将凝胶转移至PVDF膜。转膜后将其浸入封闭液中封1 h。加入一抗稀释液并在4℃冰箱摇床过夜孵育。次日3次洗膜后,二抗室温孵育1 h,完成后再洗膜3次。检测PVDF膜上的蛋白印迹信号。抗ACC1抗体(CST 1:1000)、抗E-cadherin抗体(CST 1:1000)、抗Slug抗体(CST 1:1000)、抗H3抗体(CST 1:1000)、抗H3K9ac抗体(CST 1:1000)、抗LC-3A/B II抗体(CST 1:1000)、抗β-actin抗体(Proteintech 1:5000);抗Vimentin抗体(Proteintech 1:20 000)、抗BRD4抗体(Abcam 1:1000);辣根过氧化物酶标记的二抗(鼎国 1:10 000)。

1.3 统计学分析

所有统计数据采用Prism 9.0(GraphPad

Software)、ImageJ软件进行分析。采用单因素方差分析检验、两样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BRD4在ESCC细胞中的表达水平

RT-qPCR 结果显示,与对照组 shNC 组对比, BRD4 在 shACC1 组中的 mRNA 水平差异无统计学意义(图 1A); Western blotting 实验显示, BRD4 在 shACC1 组的表达水平与 shNC 组对比差异无统计学意义(图 1B)。

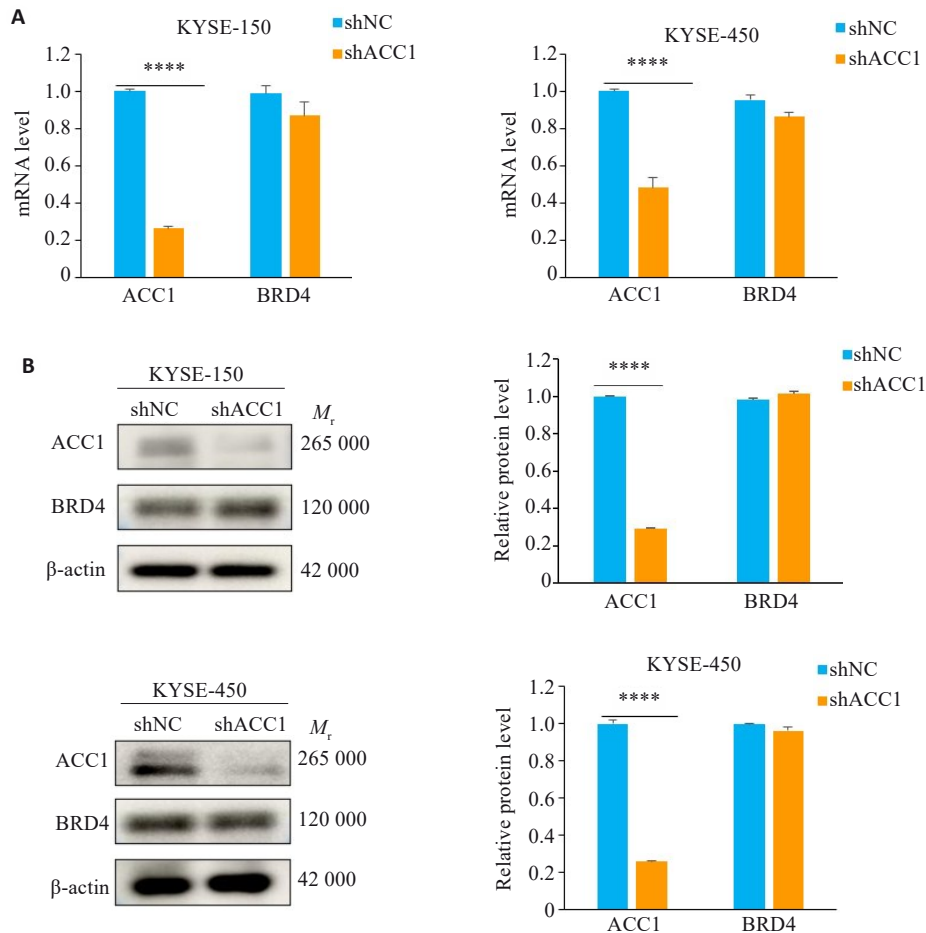


图1 BRD4在ACC1低表达的ESCC细胞中表达水平无差异

Fig.1 Expression levels of BRD4 mRNA and protein in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells with and without ACC1 knockdown. **A:** RT-qPCR for detecting BRD4 mRNA level. **B:** Western blotting for determining the protein expression level of BRD4. **** $P < 0.0001$.

2.2 抑制BRD4拮抗ESCC细胞增殖

CCK-8 显示, BRD4 抑制剂 JQ1 对 shNC 组和 shACC1 组 ESCC 细胞的增殖具有剂量依赖性抑制作用。在 KYSE-150 细胞系中, 与 shNC 对照组 (IC_{50} 为 $43.35 \mu\text{mol/L}$) 相比, shACC1 组对 JQ1 的敏感性更高, 其 IC_{50} 值为 $35.87 \mu\text{mol/L}$; 在 KYSE-450 细胞系中, shACC1 组 (IC_{50} 为 $50.81 \mu\text{mol/L}$) 相较于 shNC 组 (IC_{50} 为 $58.88 \mu\text{mol/L}$) 也表现出对 JQ1 更高的敏感性(图 2A)。CCK-8 显示, 在 KYSE-150、KYSE-450 细胞系中, $2 \mu\text{mol/L}$ JQ1 抑制 shNC 细胞增殖 ($P < 0.05$, 图 2B), $1 \mu\text{mol/L}$ JQ1 抑制 shACC1 细胞增殖 ($P < 0.05$, 图 2B)。

2.3 BRD4 抑制剂促进 ESCC 细胞迁移

当 JQ1 浓度为 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 时, Transwell 结果显示, 在 KYSE-150、KYSE-450 和 KYSE-510 细胞系中, JQ1 促进 shNC 细胞迁移 (shNC-DMSO vs shNC-JQ1, $P < 0.01$, 图 3), 也促进 shACC1 细胞迁移 (shACC1-DMSO vs shACC1-JQ1, $P < 0.0001$), 且 shACC1-JQ1 组比 shNC-JQ1 组细胞迁移能力强 ($P < 0.0001$)。当 JQ1 浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$ 时, JQ1 仍然促进 shNC 细胞迁移 (shNC-DMSO vs shNC-JQ1, $P < 0.0001$, 图 3), 也促进 shACC1 细胞迁移 (shACC1-DMSO vs shACC1-JQ1, $P < 0.0001$), shACC1-JQ1 组同样比 shNC-JQ1 组细胞细胞

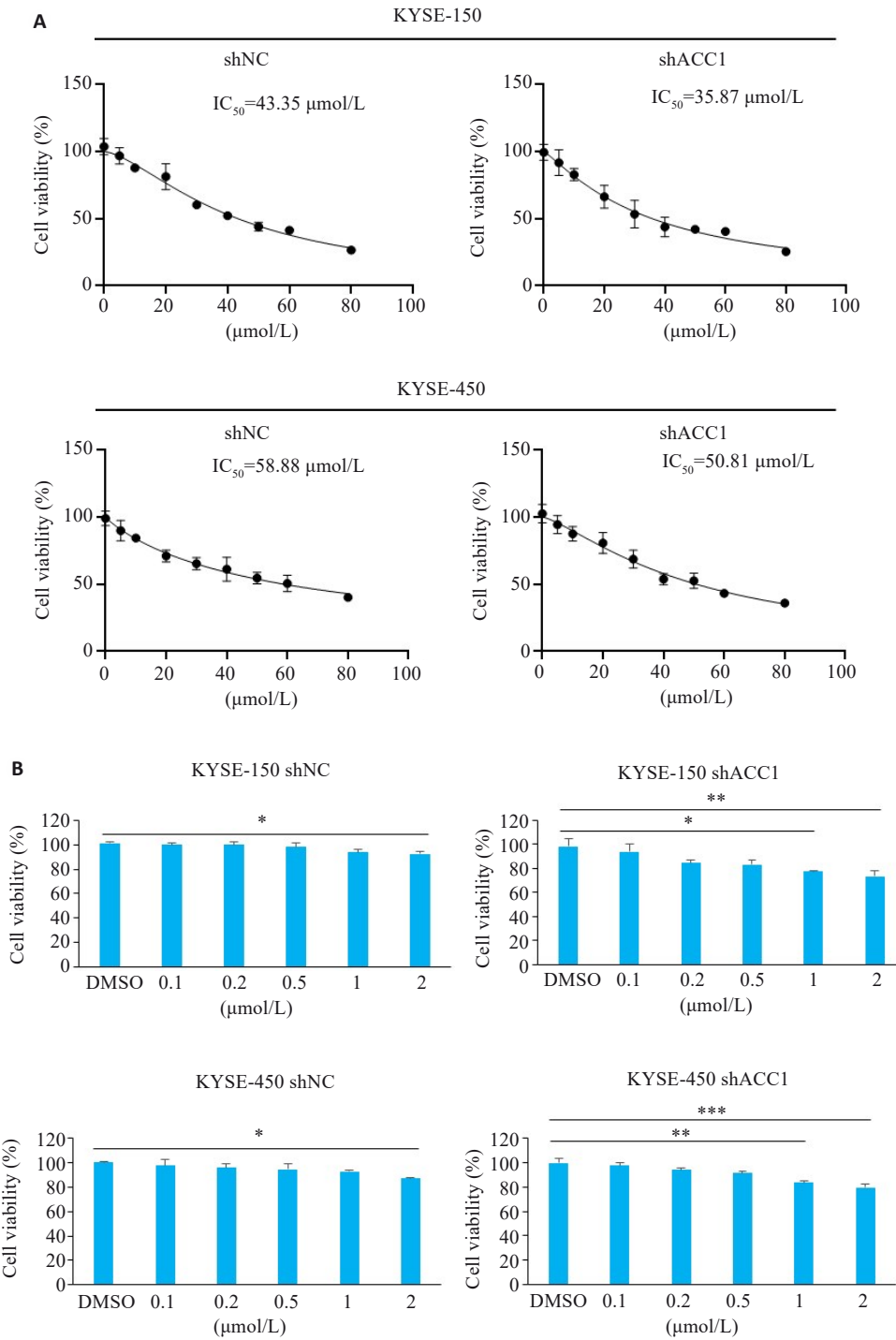


图2 抑制BRD4拮抗ESCC细胞增殖

Fig. 2 BRD4 inhibitors antagonize the proliferation of ESCC cells. **A**: Effect of JQ1 on proliferation of KYSE-150/KYSE-450 (shNC, shACC1) cells detected by CCK-8 assay. **B**: CCK-8 assay for assessing the effect of different concentrations of JQ1 on proliferation of ESCC cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

迁移能力更强($P<0.01$)。

2.4 抑制BRD4促进ESCC细胞EMT转化

Western blotting实验显示,在KYSE-150和KYSE-450细胞系中,与shNC-DMSO组相比,shNC-JQ1组Vimentin ($P<0.05$,图4)、Slug ($P<0.05$)的表达升高,E-cadherin($PP<0.001$)的表达降低;与shACC1-DMSO组相比,shACC1-JQ1组Vimentin ($P<0.001$)、Slug

($P<0.05$)的表达升高,E-cadherin($P<0.001$)的表达降低;shACC1-JQ1组比shNC-JQ1组的Vimentin ($P<0.0001$)、Slug($P<0.001$)表达高、E-cadherin($P<0.0001$)表达低。

2.5 敲低BRD4促进ESCC细胞迁移

Transwell结果显示,敲低BRD4促进ESCC细胞迁移(shNC-siNC vs shNC-siBRD4, $P<0.001$; shACC1-

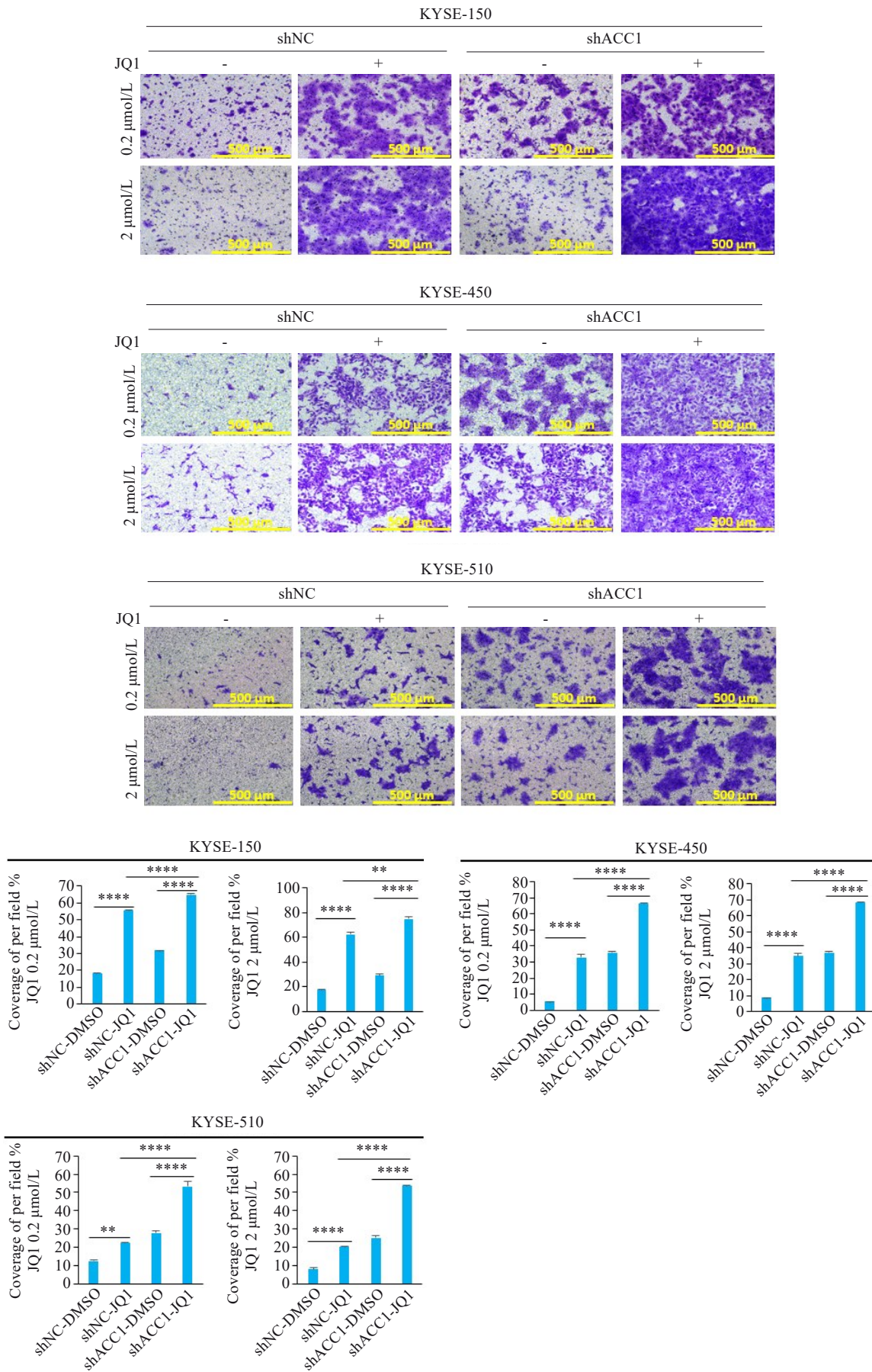


图3 BRD4抑制剂促进ESCC细胞迁移

Fig.3 The promotion of ESCC cell migration by BRD4 inhibitors. Transwell migration assay for evaluating the effect of different concentrations of JQ1 on migration of ESCC cells (Original magnification: ×100). **P<0.01, ****P<0.0001.

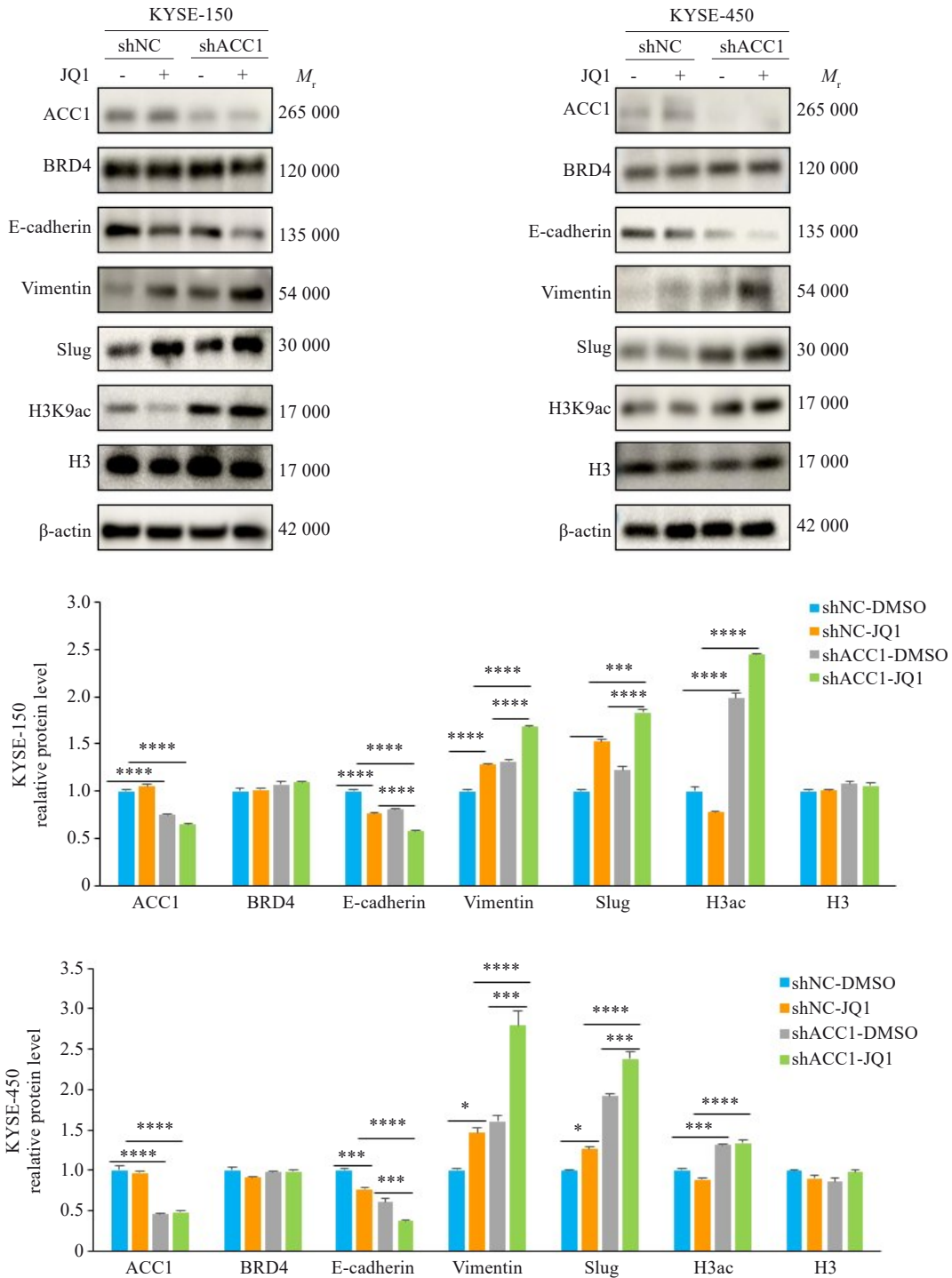


图4 抑制BRD4促进ESCC细胞EMT转化

Fig. 4 Inhibition of BRD4 promotes EMT in ESCC cells. The results of the Western blotting experiment showed that JQ1 inhibited the expression of E-cadherin protein and promoted the expression of vimentin and Slug. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

siNC vs shACC1-siBRD4, $P < 0.001$, 图 5A); ACC1 低表达细胞敲低 BRD4 后迁移能力更强 (shNC-siBRD4 vs shACC1-siBRD4, $P < 0.01$)。Western blotting 结果显示, 与 shNC-siNC 组对比, shNC-siBRD4 组的 Vimentin ($P < 0.01$, 图 5B)、Slug ($P < 0.01$) 表达升高, E-cadherin ($P < 0.0001$) 表达降低; 与 shACC1-siNC 组相比,

shACC1-siBRD4 组的 Vimentin ($P < 0.01$)、Slug ($P < 0.0001$) 表达升高, E-cadherin ($P < 0.0001$) 表达降低; shACC1-siBRD4 组比 shNC-siBRD4 组的 Vimentin、Slug ($P < 0.0001$) 表达高、E-cadherin ($P < 0.0001$) 表达低。

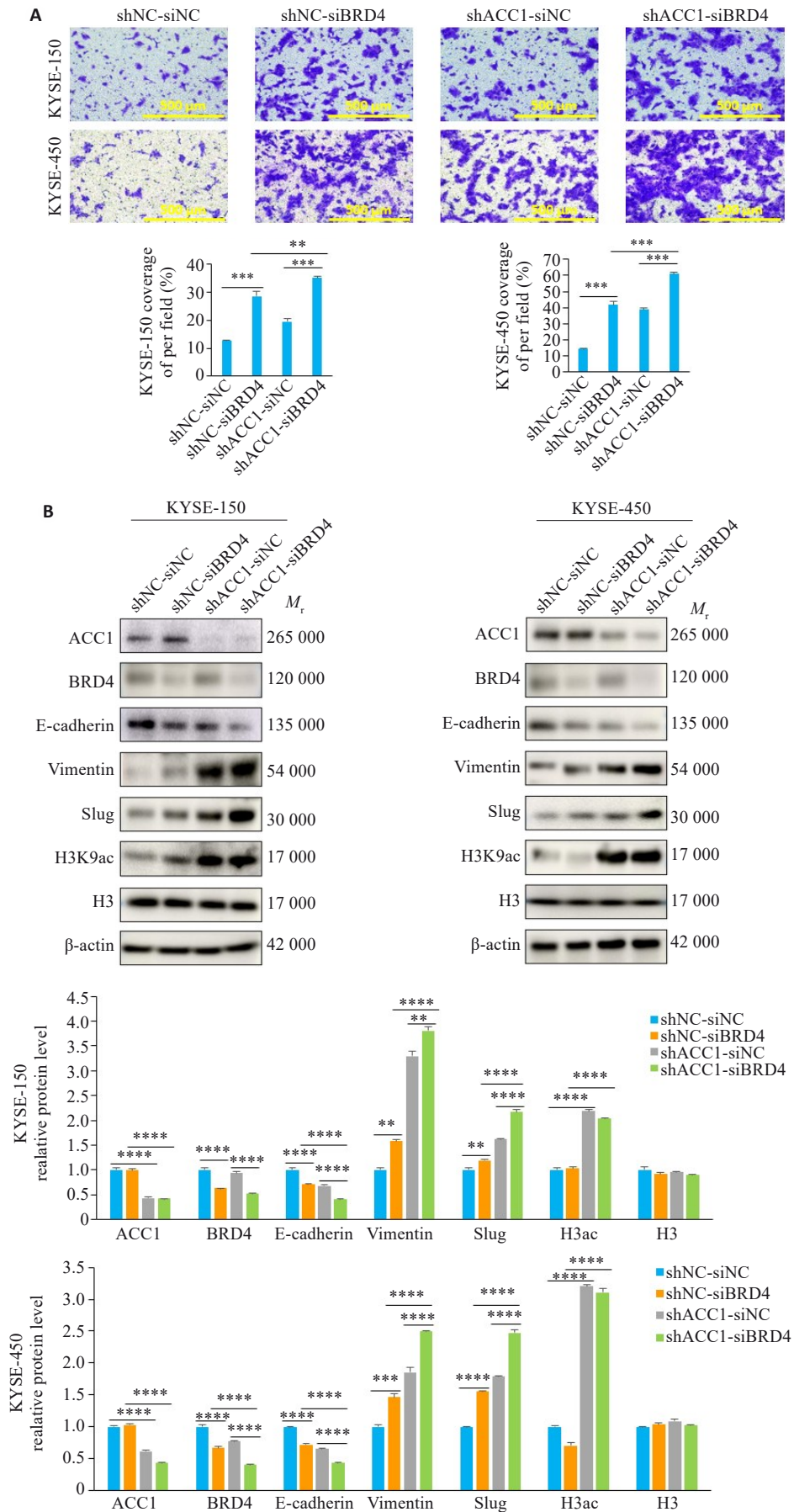


图5 敲低BRD4促进ESCC细胞迁移

Fig. 5 Knockdown of BRD4 promotes migration of ESCC cells. **A:** Transwell migration assay for assessing the effect of BRD4 knockdown on migration of ESCC cells ($\times 100$). **B:** Western blotting for detecting expression levels of BRD4 and EMT-related proteins. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

2.6 组蛋白乙酰基转移酶抑制剂拮抗敲低BRD4背景下ACC1低表达细胞迁移

C646抑制敲低BRD4对shACC1组细胞迁移的促进作用($P<0.01$,图6A)。Western blotting结果显示,在KYSE-150和KYSE-450细胞系中,C646降低了shACC1组细胞H3乙酰化修饰水平($P<0.001$,图6B),且Vimentin($P<0.001$)、Slug($P<0.0001$)表达降低,E-cadherin($P<0.05$)表达升高。

2.7 抑制BRD4促进ACC1低表达ESCC细胞迁移与自噬有关

Western blotting实验显示,在KYSE-150和KYSE-450细胞系中,与shNC-DMSO组对比,shNC-JQ1组LC3A/B II水平升高($P<0.0001$,图7A);与shACC1-DMSO组对比,shACC1-JQ1组LC3A/B II水平升高($P<0.0001$)。Transwell结果显示,与shACC1-JQ1-Veh组对比,shACC1-JQ1-3-MA组细胞迁移减少($P<0.001$,图7B)。

2.8 抑制自噬可拮抗抑制BRD4对ACC1低表达ESCC细胞的EMT转化

与shACC1-JQ1-Veh组对比,shACC1-JQ1-3-MA组LC3A/B II($P<0.001$,图8)、Slug($P<0.0001$)、Vimentin($P<0.0001$)蛋白水平降低,E-cadherin表达升高($P<0.001$)。

3 讨论

ESCC是我国常见的消化道恶性肿瘤,我们前期通过检测ESCC患者组织标本发现,ACC1低表达与患者肿瘤转移早显著相关,敲低ACC1通过增加组蛋白乙酰化促进ESCC细胞迁移。BRD4作为乙酰化组蛋白的“阅读器”,促进染色质解聚和转录启动,乙酰化水平的增高使得BRD4更容易结合到染色质上,从而增强其在基因转录和DNA修复中的作用^[9]。研究表明,BRD4调节MMP2启动子并抑制巨噬细胞介导的吞噬作用,以调节黑色素瘤的侵袭和迁移,使用其抑制剂可显著抑制细胞迁移和侵袭^[10]。BRD4抑制剂JQ1通过扰乱线粒体功能,诱导线粒体碎片化和代谢失调,促进凋亡^[11]。BRD4在结直肠癌中高表达,使用其抑制剂可抑制细胞的增殖、迁移及侵袭^[12]。我们前期研究发现,抑制BRD4可抑制ESCC细胞的增殖,但促进细胞迁移^[8]。因此,本研究进一步探究了在敲低ACC1条件下,抑制BRD4对ESCC细胞的影响是否会发生改变。

本研究发现,BRD4在ACC1低表达的ESCC细胞系中的mRNA及蛋白水平均无显著差异,抑制BRD4可有效抑制细胞增殖,而且对敲低ACC1的细胞抑制效果更显著。研究表明,组蛋白乙酰化增加虽然不影响BRD4的总蛋白量,但会增加BRD4的结合位点,导致其

在染色质上重新分布^[13]。JQ1可通过竞争性取代BRD4结合核染色质,抑制BRD4控制的下游基因(MYC)的转录而表现出抗癌活性^[14,15]。抑制BRD4可使原癌基因(c-Myc、BCL-2)的表达下降,导致肿瘤细胞凋亡^[16],当组蛋白乙酰化修饰增加时,BRD4与组蛋白的结合更为紧密,在染色质上的定位更加稳定,从而增强对癌基因表达的调控作用。然而,这种增强的结合也可能导致BRD4过度参与染色质重塑和基因激活,当抑制BRD4时,乙酰化修饰增加的细胞其原癌基因表达更低,导致细胞凋亡更显著^[17,18],并且抑制BRD4可促进凋亡基因(BIM)的表达^[19],在乙酰化修饰增加的肿瘤细胞中,BRD4的降低可能进一步增强促凋亡基因的表达,使细胞凋亡信号通路更易被激活,导致更多细胞死亡。

本研究发现,尽管JQ1可减少ESCC细胞增殖,但无论其浓度是否会抑制细胞增殖均可显著促进ESCC细胞迁移,敲低BRD4亦可导致ESCC细胞迁移增加,且在抑制BRD4的背景下,与不敲低ACC1的细胞相比,敲低ACC1的细胞迁移更显著。ESCC转移与上皮-间质转化(EMT)的动态调控密切相关,Slug、E-cadherin和Vimentin是肿瘤细胞EMT启动的关键分子,Slug作为重要转录因子,其高表达可通过抑制上皮标志物E-cadherin的表达和促进间充质标志物Vimentin的表达,从而增强EMT转化^[20,21]。本研究发现,C646可减少抑制BRD4对敲低ACC1细胞迁移的影响。研究表明,C646可抑制P300的乙酰转移酶活性,使乙酰基无法与组蛋白H3结合,从而抑制染色质乙酰化修饰^[22]。因此,在抑制BRD4条件下,组蛋白乙酰化修饰水平增加可能是引起敲低ACC1的细胞迁移更加明显的原因。我们前期研究发现,乙酸可增加ESCC细胞的组蛋白乙酰化水平。为了进一步探究在组蛋白乙酰化水平升高的情况下,抑制BRD4对ESCC细胞迁移的影响,我们使用乙酸处理细胞后应用JQ1,发现JQ1能促进经乙酸处理的ESCC细胞的迁移能力。

本研究发现,抑制BRD4增加了ESCC细胞的自噬相关蛋白LC3A/B II的水平,自噬抑制剂3-MA可减少抑制BRD4对敲低ACC1细胞的促迁作用,说明抑制BRD4促进敲低ACC1的ESCC细胞迁移可能是由自噬增强引起的。研究表明,抑制BRD4通过增加AMPK的磷酸化激活自噬起始信号,同时抑制mTORC1活性,解除p-mTOR对ULK1复合物的抑制作用,显著增加LC3A/B II的水平自噬体数量^[23],从而增强自噬。本研究发现,3-MA抑制LC3A/B II的水平,上调E-cadherin,下调Vimentin及Slug,减弱了EMT的转化。研究表明,自噬可通过激活NF- κ B,促进炎症因子(如IL-6、TNF- α)

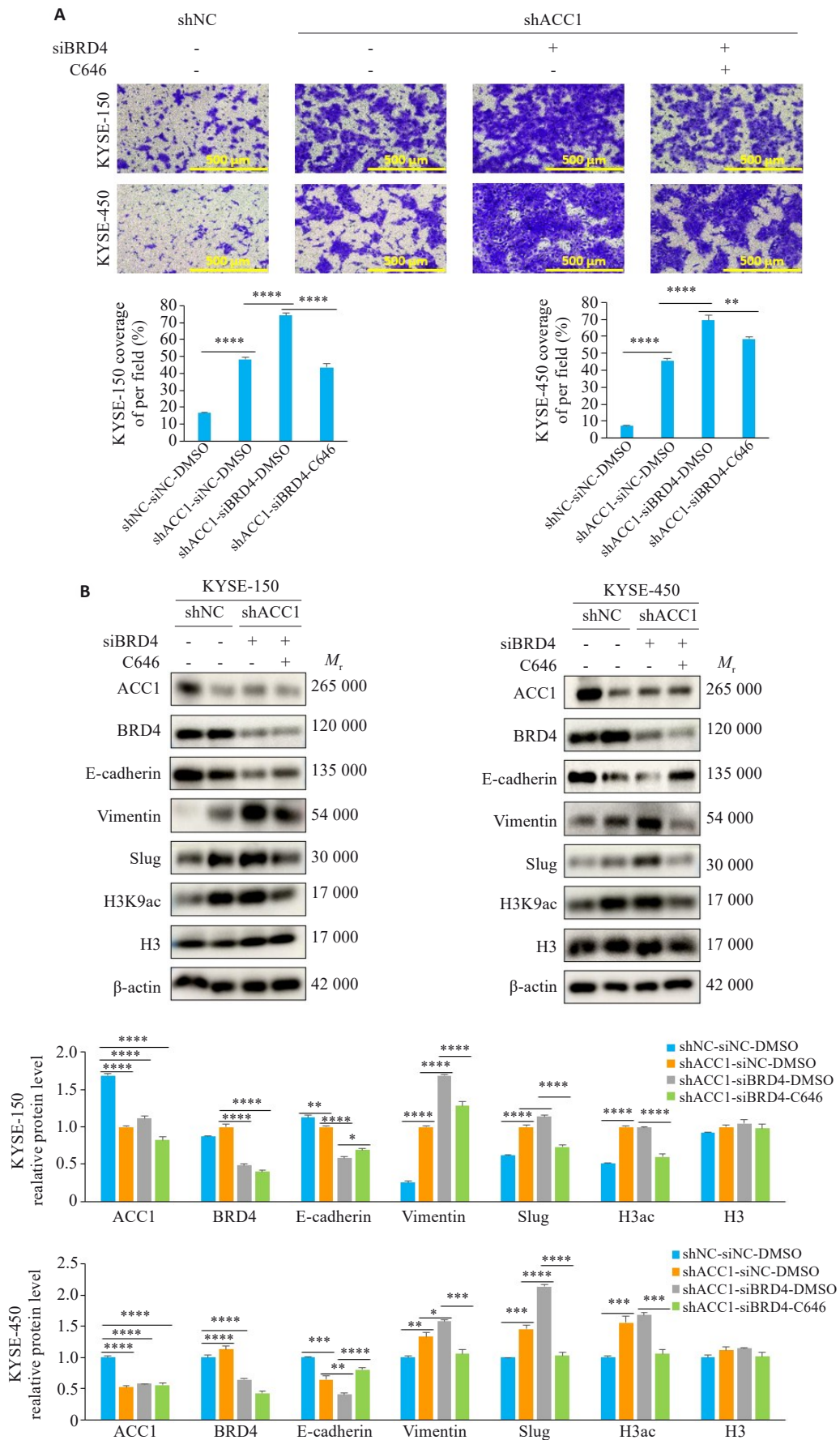


图6 组蛋白乙酰转移酶抑制剂拮抗敲低BRD4背景下ACC1低表达细胞迁移

Fig.6 Histone acetyltransferase inhibitors antagonize migration of shACC1 cells after BRD4 knockdown. **A:** Transwell migration assay for assessing the effect of C646 on migration of ESCC cells with both ACC1 and BRD4 knockdown ($\times 100$). **B:** Western blotting for detecting expression levels of BRD4 and EMT-related proteins in the cells after treatment with C646. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

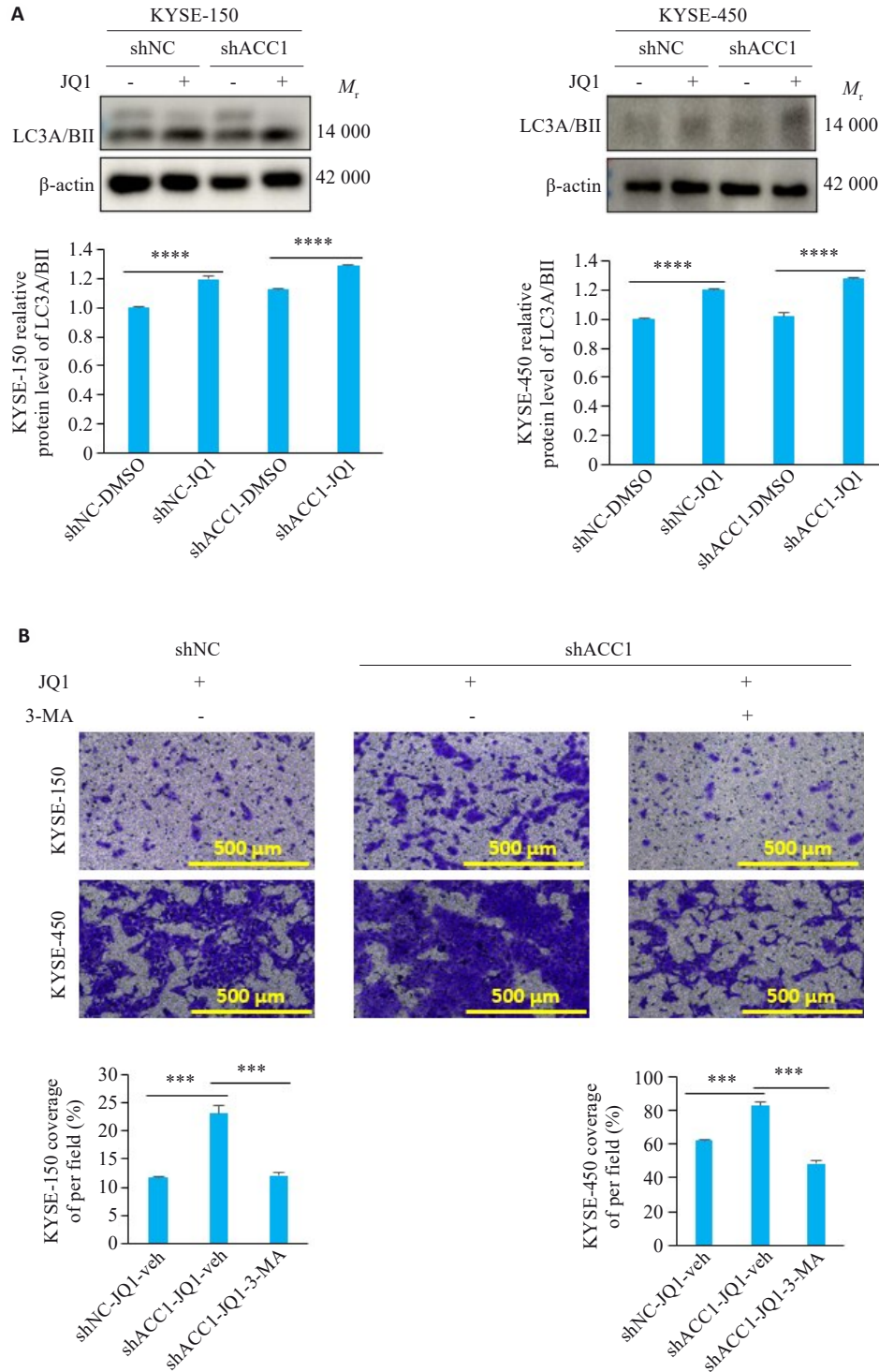


图7 抑制BRD4通过自噬促进ACC1低表达ESCC细胞迁移

Fig. 7 Inhibition of BRD4 promotes migration of ESCC cells with low ACC1 expression through autophagy. A: Western blotting showing that 2 μmol/L JQ1 promotes expressions of LC3A/BII in KYSE-150 and KYSE-450 cells. B: 4 mmol/L 3-MA inhibits migration of the cells with ACC1 knockdown and JQ1 treatment (×100). *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

分泌,诱导EMT,也可通过降解抑制性蛋白(如p62/SQSTM1)富集转录因子(如HIF-1α、Twist),直接驱动EMT基因表达^[24]。

综上所述,BRD4作为治疗恶性肿瘤的重要靶点,在ESCC中抑制其表达虽然可减少细胞增殖,但

增加细胞迁移的风险,在敲低ACC1细胞中这种作用更为明显,所以本研究提示,使用BRD4抑制剂治疗ACC1低表达的ESCC患者时,须同时给予有效的生物学干预,阻止用BRD4抑制剂对肿瘤转移的负面影响。

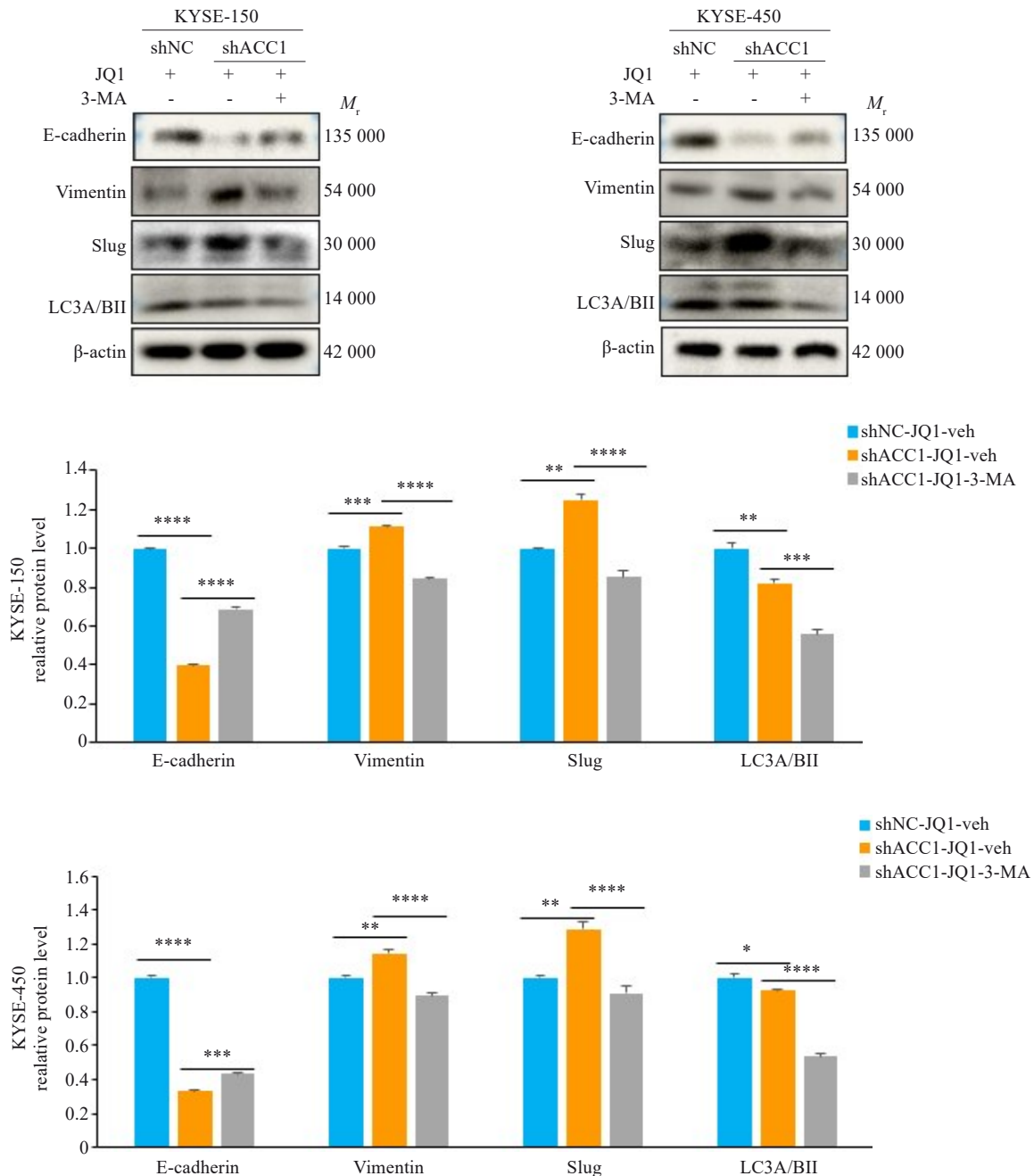


图8 抑制自噬可拮抗抑制BRD4对ACC1低表达ESCC细胞的EMT转化
 Fig.8 Inhibition of autophagy counteracts the effect of BRD4 inhibition on EMT of ESCC cells with low expression of ACC1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

[1] Mao YS, Gao SG, Wang Q, et al. Analysis of a registry database for esophageal cancer from high-volume centers in China[J]. Dis Esophagus, 2020, 33(8): doz091.

[2] Zhang JL, Dong YX, Di SY, et al. Tumor associated macrophages in esophageal squamous carcinoma: Promising therapeutic implications [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115610.

[3] 钱河, 谷城威, 刘玉珍, 等. 敲低乙酰辅酶A羧化酶1通过上调热休克蛋白27促进食管鳞状细胞癌迁移[J]. 中华肿瘤杂志, 2023, 45(06): 482-9.

[4] Guo JW, Zheng QQ, Peng Y. BET proteins: Biological functions and therapeutic interventions[J]. Pharmacol Ther, 2023, 243: 108354.

[5] Liu L, Lin BC, Yin SS, et al. Arginine methylation of BRD4 by PRMT2/4 governs transcription and DNA repair[J]. Sci Adv, 2022, 8(49): eadd8928.

[6] Kotekar A, Singh AK, Devaiah BN. BRD4 and MYC: power couple in transcription and disease [J]. FEBS J, 2023, 290(20): 4820-42.

[7] Jin WK, Tan HD, Wu JH, et al. Dual-target inhibitors of bromodomain-containing protein 4 (BRD4) in cancer therapy: Current situation and future directions[J]. Drug Discov Today, 2022, 27(1): 246-56.

[8] Yang WQ, Liang R, Gao MQ, et al. Inhibition of bromodomain-containing protein 4 enhances the migration of esophageal

- squamous cell carcinoma cells by inducing cell autophagy[J]. World J Gastrointest Oncol, 2022, 14(12): 2340-52.
- [9] Zhu HH, Wei T, Cai Y, et al. Small molecules targeting the specific domains of histone-mark readers in cancer therapy[J]. Molecules, 2020, 25(3): 578.
- [10] Le K, Matar H, Gupta M. Bromodomain epigenetic protein promotes metastatic potential in melanoma cells through increased invasiveness and decreased macrophage-mediated phagocytosis[J]. J Invest Dermatol, 2021, 141(2): 454-8.e2.
- [11] Li LY, Meng Y, Wu XL, et al. Bromodomain-containing protein 4 inhibitor JQ1 promotes melanoma cell apoptosis by regulating mitochondrial dynamics[J]. Cancer Sci, 2021, 112(10): 4013-25.
- [12] Hu Y, Zhou JQ, Ye F, et al. BRD4 inhibitor inhibits colorectal cancer growth and metastasis[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(1): 1928-48.
- [13] Karagiannis D, Wu W, Li A, et al. Metabolic reprogramming by histone deacetylase inhibition preferentially targets NRF2-activated tumors[J]. Cell Rep, 2024, 43(1): 113629.
- [14] Gibbons HR, Mi DJ, Farley VM, et al. Bromodomain inhibitor JQ1 reversibly blocks IFN- γ production[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10280.
- [15] 吕倩倩, 梁嘉杰, 季红. 基于PROTACs技术的表观遗传抗肿瘤药物研究进展[J]. 化学试剂, 2024, 46(5): 1-9.
- [16] Wu XC, Liu D, Gao XM, et al. Inhibition of BRD4 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in renal cell carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(5): 1947-56.
- [17] Kanno T, Kanno Y, LeRoy G, et al. BRD4 assists elongation of both coding and enhancer RNAs by interacting with acetylated histones[J]. Nat Struct Mol Biol, 2014, 21(12): 1047-57.
- [18] Rhyasen GW, Yao Y, Zhang JW, et al. BRD4 amplification facilitates an oncogenic gene expression program in high-grade serous ovarian cancer and confers sensitivity to BET inhibitors[J]. PLoS One, 2018, 13(7): e0200826.
- [19] Hu JF, Pan D, Li G, et al. Regulation of programmed cell death by Brd4[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(12): 1059.
- [20] Zhang JC, Fan XK, Zhou YF, et al. The PRMT5-LSD1 axis confers Slug dual transcriptional activities and promotes breast cancer progression[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 191.
- [21] Sterneck E, Poria DK, Balamurugan K. Slug and E-cadherin: stealth accomplices[J]? Front Mol Biosci, 2020, 7: 138.
- [22] Shrimp JH, Sorum AW, Garlick JM, et al. Characterizing the covalent targets of a small molecule inhibitor of the lysine acetyltransferase P300[J]. ACS Med Chem Lett, 2015, 7(2): 151-5.
- [23] Zhang GZ, Chen HW, Deng YJ, et al. BRD4 inhibition suppresses senescence and apoptosis of nucleus pulposus cells by inducing autophagy during intervertebral disc degeneration: an *in vitro* and *in vivo* study[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 9181412.
- [24] Strippoli R, Niayesh-Mehr R, Adelipour M, et al. Contribution of autophagy to epithelial mesenchymal transition induction during cancer progression[J]. Cancers (Basel), 2024, 16(4): 807.

(编辑: 经 媛)