

*IKBKE*调节Hippo-YAP信号通路对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

张振亮^{1*} 郝净² 赵兴龙³ 马广军¹ 徐博¹

(¹邢台市人民医院胰胆外科, 邢台 054000; ²邢台市人民医院肝胆外科, 邢台 054000;

³陆军第82集团军医院烧伤整形肿瘤外科, 保定 071000)

摘要 该文旨在探讨核因子kappa B激酶亚基epsilon的抑制剂(*IKBKE*)是否可通过调节Hippo-Yes相关蛋白(YAP)信号通路来影响胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。收集胰腺癌组织和癌旁组织, 免疫组化检测*IKBKE*表达情况, 并分析其表达水平与患者临床病理特征的关系。qRT-PCR检测胰腺导管上皮细胞和胰腺癌细胞中*IKBKE*基因的表达水平; 将胰腺癌SW1990细胞分为control组、si-NC组、si-*IKBKE*组、si-*IKBKE*+TDI-011536(Hippo-YAP信号通路抑制剂)组、Verteporfin组(Hippo-YAP信号通路激活剂); qRT-PCR检测各组细胞中*IKBKE*基因表达水平; MTT法、EdU染色检测细胞增殖情况; 细胞划痕实验检测细胞迁移情况; Transwell检测细胞侵袭情况; 流式细胞术检测细胞凋亡率; Western blot检测细胞中E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、切割型胱天蛋白酶-3(cleaved caspase-3)、增殖细胞核抗原(PCNA)、*IKBKE*、YAP、TAZ、p-YAP、p-TAZ、TEA结构域转录因子2(TEAD2)、酪氨酸蛋白激酶受体(Axl)、c-myc、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达水平。*IKBKE*在胰腺癌组织中高表达, 其表达水平与肿瘤大小、淋巴结转移、分化程度呈正相关($P<0.05$)。与胰腺导管上皮细胞相比, 几种胰腺癌细胞中*IKBKE* mRNA表达水平均升高($P<0.05$); 与control组和si-NC组相比, si-*IKBKE*组和Verteporfin组SW1990细胞 D_{490} 值、增殖率、划痕愈合率与细胞侵袭数, vimentin、N-cadherin、PCNA、Bcl-2、YAP、TAZ、TEAD2、Axl、c-myc蛋白表达水平下降, cleaved caspase-3、E-cadherin、Bax、p-TAZ、p-YAP蛋白表达水平及凋亡率增加($P<0.05$), si-*IKBKE*组*IKBKE* mRNA和*IKBKE*蛋白表达水平降低($P<0.05$), Verteporfin组*IKBKE* mRNA和*IKBKE*蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$); 与si-*IKBKE*组相比, si-*IKBKE*+TDI-011536组SW1990细胞 D_{490} 值、增殖率、细胞侵袭数、划痕愈合率和vimentin、N-cadherin、PCNA、Bcl-2、YAP、TAZ、TEAD2、Axl、c-myc蛋白表达水平增加, cleaved caspase-3、E-cadherin、Bax、p-TAZ、p-YAP蛋白表达水平和凋亡率下降($P<0.05$), *IKBKE*表达差异无统计学意义($P>0.05$), Verteporfin组*IKBKE* mRNA和*IKBKE*蛋白表达上调($P<0.05$), 其余指标均无统计学意义($P>0.05$)。下调*IKBKE*表达可能通过上调Hippo-YAP信号通路降低胰腺癌细胞的侵袭、迁移和增殖能力。

关键词 *IKBKE*; Hippo-YAP信号通路; 胰腺癌; 增殖; 迁移; 侵袭

Effects of *IKBKE* on Proliferation, Migration and Invasion of Pancreatic Cancer Cells by Regulating Hippo-YAP Signaling Pathway

ZHANG Zhenliang^{1*}, HAO Jing², ZHAO Xinglong³, MA Guangjun¹, XU Bo¹

(¹Department of Pancreatic and Biliary Surgery, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054000, China;

²Department of Hepatobiliary Surgery, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054000, China; ³Department of Burn, Plastic Surgery and Oncology, 82nd Group Army Hospital of the People's Liberation Army, Baoding 071000, China)

收稿日期: 2024-12-10

接受日期: 2025-03-10

河北省2024年度医学科学研究项目(编号: 20240263)资助的课题

*通信作者。Tel: 18831983750, E-mail: qgkl77@163.com

Received: December 10, 2024

Accepted: March 10, 2025

This work was supported by the Medical Science Research Project in Hebei Province in 2024 (Grant No.20240263)

*Corresponding author. Tel: +86-18831983750, E-mail: qgkl77@163.com

Abstract This study aims to investigate whether *IKBKE* (inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon) can regulate Hippo-YAP (Yes-associated protein) signaling pathway to affect the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells. Pancreatic cancer and paracancer tissues were collected, *IKBKE* expression was detected by immunohistochemistry, and the relationship between *IKBKE* expression and clinicopathological features of patients was analyzed. The expression of *IKBKE* gene in pancreatic duct epithelial cells and pancreatic cancer cells was detected by qRT-PCR. Pancreatic cancer SW1990 cells were grouped into control group, si-NC group, si-*IKBKE* group, si-*IKBKE*+TDI-011536 (Hippo-YAP signaling pathway inhibitor) group, and Verteporfin group (Hippo-YAP signaling pathway activator). qRT-PCR was used to detect the expression level of *IKBKE* mRNA in each group. MTT assay and EdU staining were used to detect cell proliferation. Cell scratch assay was used to detect cell migration. Transwell was used to detect cell invasion. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of cells. The expression levels of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, cleaved caspase-3, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), *IKBKE*, YAP, TAZ, p-YAP, p-TAZ, TEAD2 (TEA domain transcription factor 2), Axl (tyrosine protein kinase receptor), c-myc, Bcl-2 (B-cell lymphoblastoma-2), Bax (Bcl-2 associated X protein) proteins in cells were detected by Western blot. *IKBKE* was highly expressed in pancreatic cancer tissues, and its expression was positively correlated with tumor diameter, lymph node metastasis and differentiated status ($P<0.05$). Compared with pancreatic duct epithelial cells, the expression of *IKBKE* mRNA in several pancreatic cancer cells increased ($P<0.05$). Compared with the control group and si-NC group, the D_{490} (24 h, 48 h) values of SW1990 cells, proliferation rate, scratch healing rate, the number of cell invasions, and the expression levels of N-cadherin, vimentin, PCNA, Bcl-2, YAP, TAZ, TEAD2, Axl, and c-myc proteins were decreased in the si-*IKBKE* group and Verteporfin group, the apoptosis rate, and the expression levels of E-cadherin, cleaved caspase-3, Bax, p-YAP, and p-TAZ proteins were increased ($P<0.05$), the expression of *IKBKE* mRNA and *IKBKE* protein in the si-*IKBKE* group decreased ($P<0.05$), while there was no statistically significant difference in the expression of *IKBKE* mRNA and *IKBKE* protein in the Verteporfin group ($P>0.05$). Compared with the si-*IKBKE* group, the D_{490} (24 h, 48 h) values of SW1990 cells, proliferation rate, scratch healing rate, the number of cell invasions, and the expression levels of N-cadherin, vimentin, PCNA, Bcl-2, YAP, TAZ, TEAD2, Axl, and c-myc proteins were increased in the si-*IKBKE*+TDI-011536 group, the apoptosis rate, and the expression levels of E-cadherin, cleaved caspase-3, Bax, p-YAP, and p-TAZ proteins were reduced ($P<0.05$), the expression of *IKBKE* protein showed no statistical significance ($P>0.05$), the expression levels of *IKBKE* mRNA and *IKBKE* protein in SW1990 cells of Verteporfin group were increased ($P<0.05$), the other indexes were not statistically significant ($P>0.05$). Downregulation of *IKBKE* expression may decrease the invasion, migration and proliferation of pancreatic cancer cells by up-regulating Hippo-YAP signaling pathway.

Keywords *IKBKE*; Hippo-YAP signaling pathway; pancreatic cancer; proliferation; migration; invasion

胰腺癌是一种胃肠道恶性肿瘤,是最具侵袭性的癌症之一,总体五年生存率低于10%,胰腺癌的发病机制尚不清楚,其可能与吸烟、饮酒、肥胖、糖尿病、慢性胰腺炎等有关^[1]。近年来,虽然针对胰腺癌的研究有很大进展,但其发病率和死亡率仍呈现上升趋势,主要原因是由于其早期缺乏特异性症状,诊断困难,导致大多数患者诊断为晚期高转移和弥漫性恶性腹膜间皮瘤^[2]。目前,胰腺癌的主要治疗方法是手术切除,再配合化疗、放疗等辅助手段,但也

只有20%的患者适合手术切除,且切除的患者也有很高的复发风险^[3]。随着分子生物学的发展,新兴分子靶向疗法通过调控致癌基因的表达为癌症患者提供了新的治疗方向。核因子kappa B激酶亚基epsilon的抑制剂(inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon, *IKBKE*)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,研究显示其对肿瘤的发生发展有关键调控作用^[4]。据报道,*IKBKE*在胰腺癌组织中高表达,其表达与分化程度呈负相关,也可影响患者的总生存期;

细胞实验发现 *IKBKE* 可促进胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[5], 而沉默 *IKBKE* 表达可抑制胶质母细胞瘤生长和血管生成^[6]。 *IKBKE* 可促进肿瘤细胞活性, 但其具体调控机制尚不明确。 Hippo-Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)信号通路是一条丝氨酸激酶级联通路, YAP 是 Hippo 信号通路的主要效应因子, 具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ)是 YAP 的下游信号分子, 研究显示, 激活 Hippo 通路可抑制胰腺癌上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 促进细胞凋亡^[1]。 据报道, *IKBKE* 抑制剂 CYT387 在体外通过激活 Hippo 通路抑制胶质母细胞瘤恶性进展, 且敲低 *IKBKE* 可抑制前列腺癌增殖和迁移, 并通过 Hippo 通路降低雄激素受体水平^[7-8]。 *IKBKE* 是否可通过影响 Hippo-YAP 信号通路来影响胰腺癌生物学进展尚不清楚, 故本文探讨 *IKBKE* 对胰腺癌细胞迁移、增殖等恶性生物学行为的影响, 并进一步分析其与 Hippo-YAP 信号通路的作用关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织收集 从2020年6月1日至2024年6月1日在邢台市人民医院接受胰腺手术切除的患者中获得了63例人胰腺癌组织和相应的癌旁组织。收集胰腺癌患者的临床病理资料, 包括性别、肿瘤位置、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移情况、远处转移情况和病理分级。入组标准为: 初诊为胰腺导管腺癌; 无慢性感染; 无类风湿自身免疫性疾病; 无严重的心脏、肝脏或肾功能不全。邢台市人民医院临床研究伦理委员会批准了这项研究, 审批号: 2020[041]。入组患者均签署知情同意书。

1.1.2 实验细胞 人正常胰腺导管上皮细胞 HPNE 和人胰腺癌细胞 PANC-1、SW1990、AsPC-1、BxPC-3 均购自湖南丰晖生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂 Hippo-YAP 信号通路抑制剂 TDI-011536 和 Hippo-YAP 信号通路激活剂 Verteporfin 购自美国 MCE 公司; si-NC 和 si-*IKBKE* 质粒购自上海吉凯基因医学科技有限公司; BCA 试剂盒、qRT-PCR 试剂盒和总 RNA 提取试剂盒购自北京柏奥易思生物科技有限公司; MTT 试剂盒、Transwell 小室和细胞凋亡检测试剂盒购自上海镜缘点细胞技术有限公司; E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白

(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、切割型胱天蛋白酶-3(cleaved caspase-3)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、*IKBKE*、YAP、TAZ、p-YAP、p-TAZ、TEA 结构域转录因子 2(TEA domain transcription factor 2, TEAD2)、酪氨酸蛋白激酶受体(tyrosine protein kinase receptor, Axl)、c-myc、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、 β -actin 抗体购自英国 Abcam 公司; FlexStation 多功能酶标仪购自上海美谷分子仪器有限公司; SLan-96S 荧光定量 PCR 仪江苏晶创生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化(IHC)检测 *IKBKE* 表达情况 胰腺癌组织和癌旁组织用4%多聚甲醛室温固定, 梯度酒精(70%→80%→90%→95%→100%)脱水, 石蜡包埋。包埋的组织切片用阶梯式酒精(100%→95%→85%→70%)再水化。切片用 *IKBKE* 一抗(1:250)和二抗(1:500)分别在室温下孵育2 h 和1 h。显微镜下观察切片染色情况。两名病理学家独立采用盲法进行 IHC 评分。IHC 评分在0到3之间, 0、1、2、3 分分别为: 无染色(-)、弱染色(+)、中度染色(++)、强染色(+++)。

1.2.2 *IKBKE* 基因表达检测 采用总 RNA 提取试剂盒提取胰腺导管上皮细胞和胰腺癌细胞的总 RNA, 按试剂盒说明书操作。然后将 RNA 逆转录为 cDNA, 逆转录条件为: 42 °C 逆转录 60 min, 72 °C 灭活酶 5 min, 4 °C 终止反应。荧光定量 PCR(qRT-PCR)扩增 cDNA, 计算 *IKBKE* mRNA 的相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法)。荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 5 min, 40 个循环。 *IKBKE* 引物: 正向 5'-TGC GTG CAG AAG TAT CAA GC-3', 反向 5'-TAC AGG CAG CCA CAG AAC AG-3'; *GAPDH*: 正向 5'-TGC CAT CAC CAT CTT CCA-3', 反向 5'-CAT CAC GCC ACA GTT TCC-3'。

1.2.3 细胞培养与分组处理 SW1990 细胞置于含 1% 双抗、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。在对数期 SW1990 细胞中分别转染 si-*IKBKE*#1(5'-AGA UGA ACU UCA UCU ACA A-3')、si-*IKBKE*#2(5'-GGU GAA UUU CAG UCA UUU A-3')、si-*IKBKE*#3(5'-CCA CAG ACA GAA AGC AUA A-3')及阴性对照 si-NC(5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA A-3'), 通过 qRT-PCR 法

检测 *IKBKE* mRNA水平以筛选后续实验使用的 si-*IKBKE*。将对数期 SW1990 细胞分为 control 组 (正常培养)、si-NC 组 (转染 si-NC)、si-*IKBKE* 组 (转染 si-*IKBKE*)、si-*IKBKE*+TDI-011536 (转染 si-*IKBKE* 的同时用 3 $\mu\text{mol/L}$ 的 TDI-011536 干预 48 h^[9]) 组、Verteporfin 组 (5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Verteporfin^[10-11] 处理 48 h)。细胞贴壁后用 Lipofectamine 2000 试剂分别将对应质粒转染到 SW1990 细胞中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养 48 h 后进行后续实验。TDI-011536 和 Verteporfin 浓度和作用时间是依据参考文献 [9-11] 和前期预实验结果确定的。采用 qRT-PCR 法检测 *IKBKE* mRNA 水平, 以鉴定 si-*IKBKE* 的转染效率, 具体方法见 1.2.2。

1.2.4 MTT 法、EdU 染色检测细胞增殖情况 将 SW1990 细胞接种于 48 孔板 (5×10^4 个/孔), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养 24 h 后, 按 1.2.3 分组方法处理细胞。继续培养 24 h、48 h 后各加入 10 μL MTT 溶液, 4 h 后添加 150 μL DMSO 溶液, 利用酶标仪测定 490 nm 波长处的吸光度 (*D*) 值。

将 SW1990 细胞接种于 96 孔板 (1×10^4 个/孔), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养 24 h 后, 按 1.2.3 分组方法处理细胞, 继续培养 48 h, 添加 EdU, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 添加 DAPI 染色, 拍照, ImageJ 软件分析细胞阳性染色数量。细胞增殖率 = [EdU 阳性细胞数/总细胞数] $\times 100\%$ 。

1.2.5 划痕实验测定细胞迁移情况 收集各组 SW1990 细胞, 并将其制成细胞悬液 (1×10^5 个/mL), 接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 培养至融合率约 90% 时, 用无菌枪头对细胞层进行划痕, 测量划痕宽度, PBS 洗去不贴壁的细胞, 更换无血清培养基, 24 h 后测量划痕宽度, 计算细胞迁移率。细胞迁移率 = [(0 h 划痕宽度 - 24 h 后划痕宽度)/0 h 划痕宽度] $\times 100\%$ 。

1.2.6 Transwell 实验测定细胞侵袭情况 将经过 1.2.3 处理的各组细胞用无血清培养基重悬, 将 5×10^4 个细胞接种到含基质胶的 Transwell 上室中, 下室添

加 600 μL 完全培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后, 细胞用多聚甲醛室温固定, 并在室温下用结晶紫染色, 拍照计数。

1.2.7 流式细胞术分析细胞凋亡情况 SW1990 细胞用 Lipofectamine 2000 试剂转染 48 h 后, 收集细胞, 用结合缓冲液重悬, 用 Annexin V-FITC 与 PI 在室温避光条件下对细胞进行双重染色。采用流式细胞仪分析凋亡细胞的百分比。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达情况 使用 RIPA 裂解液提取各组 SW1990 细胞总蛋白质, 并采用 BCA 法对蛋白进行定量, 将 20 μg 蛋白热变性后电泳, 转膜, 室温封闭 2 h 后加入兔抗 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、cleaved caspase-3、PCNA、IKBKE、YAP、TAZ、p-YAP、p-TAZ、TEAD2、Axl、c-myc、Bax、Bcl-2、 β -actin 一抗 (1:1 000), 摇床 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h, ECL 显色, 用 Image-Pro Plus 分析蛋白灰度值。蛋白相对表达水平以目的蛋白与内参蛋白灰度值之比表示。

1.3 统计分析

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 Graphpad Prism 8.0.1 软件进行统计学分析并进行柱状图制作。采用卡方检验分析癌组织与癌旁组织中 IKBKE 表达差异以及 IKBKE 表达水平与胰腺癌患者临床病理特征的相关性。多组间差异比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较行 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IKBKE 蛋白在胰腺癌组织中的表达

免疫组化结果显示, IKBKE 在胰腺癌组织的导管中有不同程度的表达 (图 1)。根据 IHC 评分将胰腺癌组织分为低表达组 (-、+、++) 和高表达组 (+++)。如表 1 所示, 胰腺癌组织中 IKBKE 的表达水平显著高

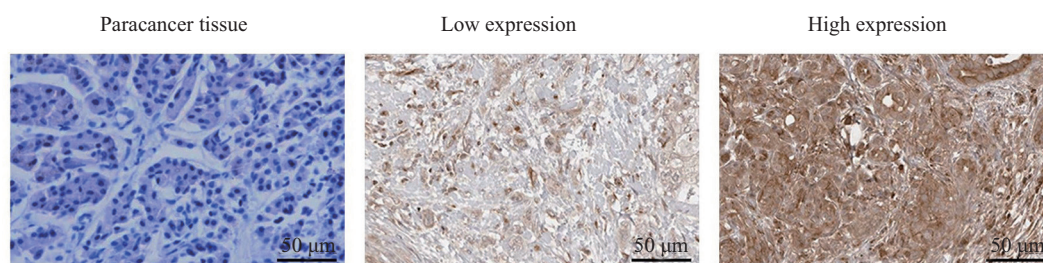


图1 IKBKE在癌旁组织及胰腺癌低、高表达组的免疫组化图

Fig.1 Immunohistochemical images of IKBKE in paracancer tissues and low and high expression groups of pancreatic cancer

表1 *IKBKE*在胰腺癌组织和癌旁组织中的表达情况

Table 1 Expression of *IKBKE* in pancreatic and paracancer tissues

组织 Tissues	低表达样本数 Number of samples with low expression	高表达样本数 Number of samples with high expression	χ^2	<i>P</i>
Paracancer tissue	42	21	7.208	0.007
Pancreatic cancer tissue	27	36		

表2 *IKBKE*在胰腺癌组织中的表达与临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between *IKBKE* expression in pancreatic cancer tissue and clinicopathological features

临床病理特征 Clinicopathological features	总样本数 Total number of samples	低表达样本数 Number of samples with low expression	高表达样本数 Number of samples with high expression	χ^2	<i>P</i>
Age (years)					
<70	40	16	24	0.365	0.546
≥70	23	11	12		
Location					
Head, neck	36	13	23	1.561	0.212
Body, tail	27	14	13		
Sex					
Male	48	23	25	1.329	0.249
Female	15	4	11		
Tumor size					
≤3 cm	31	18	13	5.763	0.016
>3 cm	32	9	23		
Lymph node metastasis					
No	42	22	20	4.667	0.031
Yes	21	5	16		
Distant metastasis					
No	53	23	30	0.040	0.842
Yes	10	4	6		
Pathologic grade					
Poor	28	7	21	6.563	0.010
Intermediate+high	35	20	15		

于癌旁组织($P<0.05$)。表2显示, *IKBKE*在胰腺癌组织中的表达水平与肿瘤大小、淋巴结转移、分化程度呈正相关($P<0.05$)。除此之外, 结果显示两组在年龄、性别、肿瘤位置或远处转移方面无显著差异($P>0.05$)。

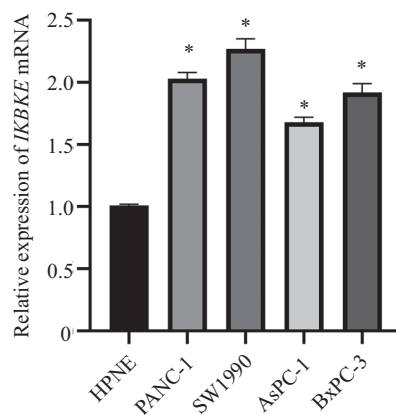
2.2 *IKBKE* mRNA在胰腺癌细胞中的表达

图2显示, 胰腺癌细胞系 PANC-1、SW1990、AsPC-1、BxPC-3中 *IKBKE* mRNA表达水平高于HPNE细胞($P<0.05$)。以变化最显著的SW1990细胞为后续探究细胞。

2.3 各组SW1990细胞中*IKBKE* mRNA表达比较

为了进一步确定 *IKBKE*异常表达与胰腺癌发病的关系, 本研究选择了3个不同特异性的siRNA干

扰片段(si-*IKBKE*#1、si-*IKBKE*#2、si-*IKBKE*#3)在SW1990细胞中进行*IKBKE*敲低。qRT-PCR结果显示, 3个siRNA干扰片段均能下调*IKBKE* mRNA表达, 其中si-*IKBKE*#1的下调作用最显著, 因此si-*IKBKE*#1被用于进一步的实验, 后续成为si-*IKBKE*(图3)。接着通过qRT-PCR检测各组细胞*IKBKE* mRNA表达情况, 结果显示, si-*IKBKE*组SW1990细胞*IKBKE* mRNA表达水平低于control组和si-NC组($P<0.05$); si-*IKBKE*+TDI-011536组SW1990细胞*IKBKE* mRNA表达水平与si-*IKBKE*组差异无统计学意义($P>0.05$); Verteporfin组SW1990细胞*IKBKE* mRNA表达水平高于si-*IKBKE*组($P<0.05$), 相较于control组差异无统计学意义($P>0.05$)(图3)。

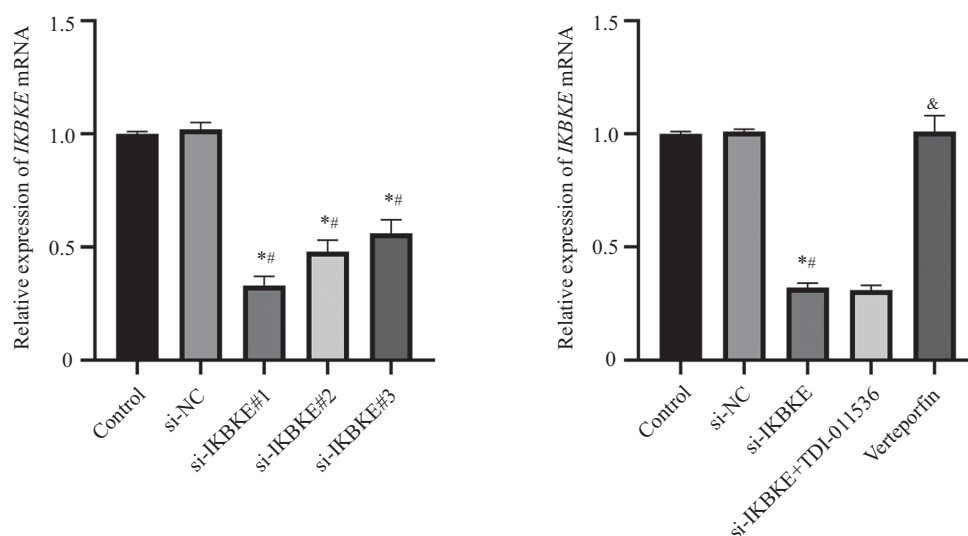


$n=6$; * $P<0.05$, 与HPNE细胞相比。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with HPNE cells.

图2 IKBKE mRNA在胰腺导管上皮细胞和胰腺癌细胞中的表达情况

Fig.2 IKBKE mRNA expression in pancreatic ductal epithelial cells and pancreatic cancer cells



$n=6$; * $P<0.05$, 与control组相比; # $P<0.05$, 与si-NC组相比; & $P<0.05$, 与si-IKBKE组相比。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with si-NC group; & $P<0.05$ compared with si-IKBKE group.

图3 IKBKE mRNA在各组SW1990细胞中的表达情况

Fig.3 IKBKE mRNA expression in SW1990 cells of each group

2.4 各组SW1990细胞增殖活力比较

MTT和EdU实验结果显示, si-IKBKE组和Verteporfin组SW1990细胞 D_{490} (24 h、48 h)值和增殖率低于control组和si-NC组($P<0.05$); 与si-IKBKE组相比, si-IKBKE+TDI-011536组SW1990细胞 D_{490} (24 h、48 h)值和增殖率升高, Verteporfin组SW1990细胞 D_{490} 值和增殖率差异均无统计学意义($P>0.05$)(图4)。

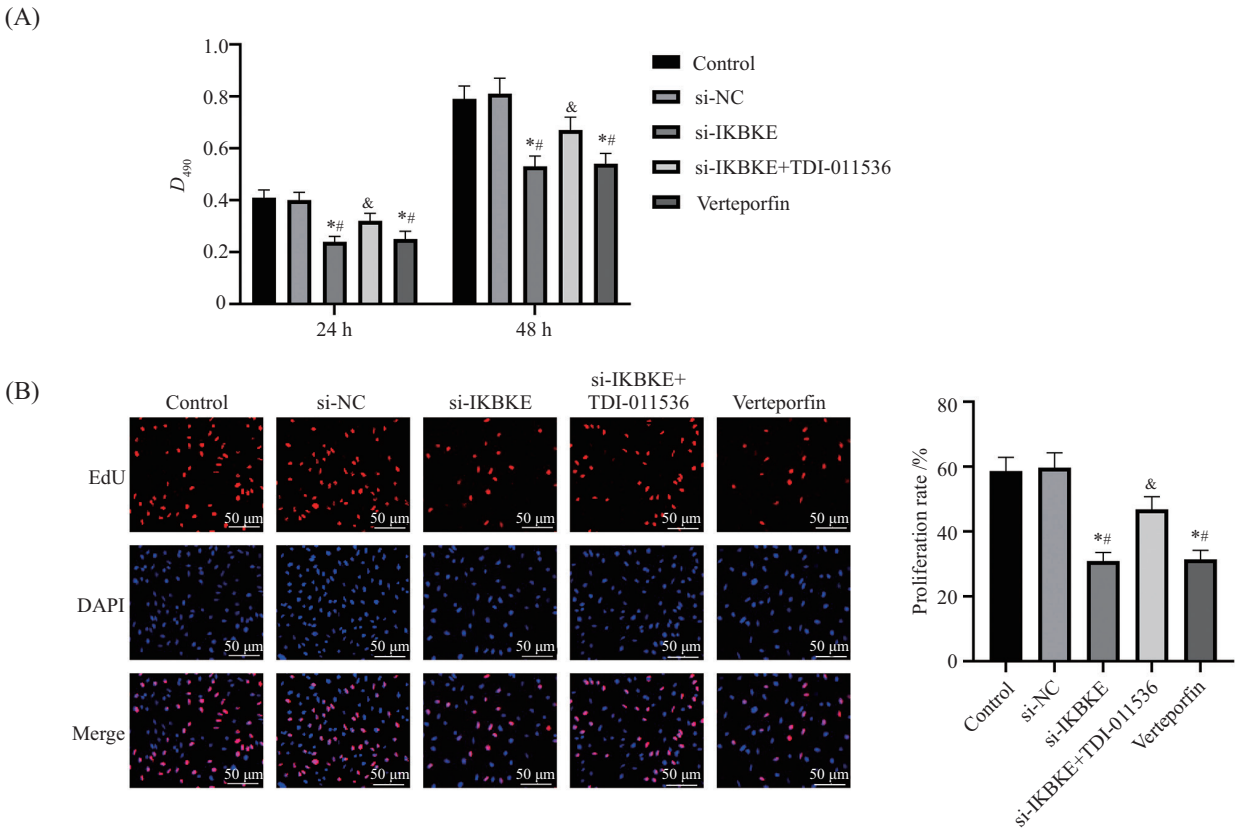
2.5 各组SW1990细胞迁移和侵袭能力比较

划痕实验和Transwell小室实验结果显示, si-IKBKE组和Verteporfin组SW1990细胞划痕愈合率与侵

袭数低于control组和si-NC组($P<0.05$); 与si-IKBKE组相比, si-IKBKE+TDI-011536组SW1990细胞划痕愈合率与侵袭数升高, Verteporfin组SW1990细胞划痕愈合率与侵袭数差异无统计学意义($P>0.05$)(图5和图6)。

2.6 各组SW1990细胞凋亡率比较

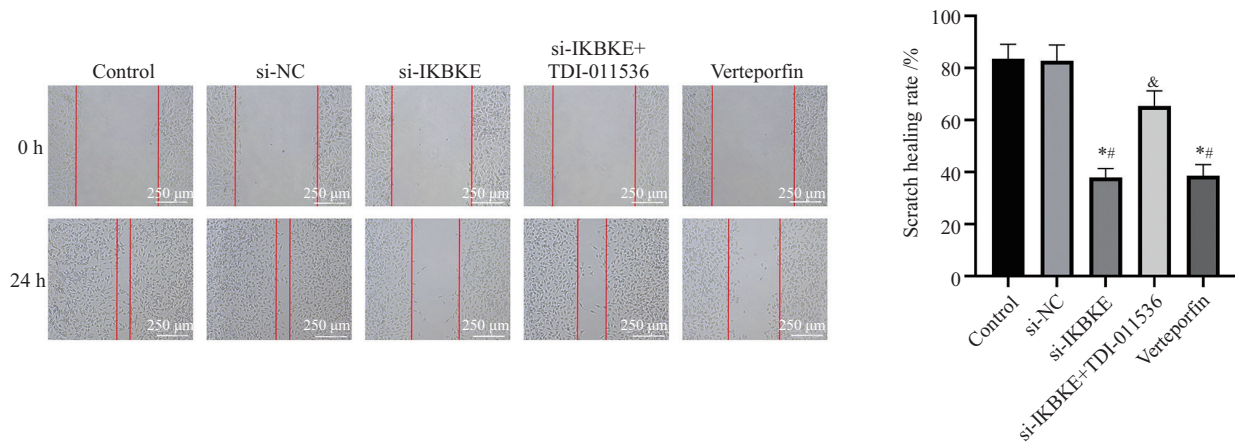
si-IKBKE组和Verteporfin组SW1990细胞凋亡率高于control组和si-NC组($P<0.05$); 与si-IKBKE组相比, si-IKBKE+TDI-011536组SW1990细胞凋亡率降低, Verteporfin组SW1990细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$)(图7)。



A: 各组SW1990细胞 D_{490} 和增殖率比较; B: 各组SW1990细胞增殖率比较(EdU染色)。* $P<0.05$, 与control组相比; # $P<0.05$, 与si-NC组相比; & $P<0.05$, 与si-*IKBKE*组相比。n=6。

A: comparison of D_{490} and proliferation rate of SW1990 cells in each group; B: comparison of SW1990 cell proliferation rate in each group (EdU staining). * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with si-NC group; & $P<0.05$ compared with si-*IKBKE* group. n=6.

图4 各组SW1990细胞 D_{490} 和增殖率比较
Fig.4 Comparison of D_{490} and proliferation rate of SW1990 cells in each group



n=6; * $P<0.05$, 与control组相比; # $P<0.05$, 与si-NC组相比; & $P<0.05$, 与si-*IKBKE*组相比。
n=6; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with si-NC group; & $P<0.05$ compared with si-*IKBKE* group.

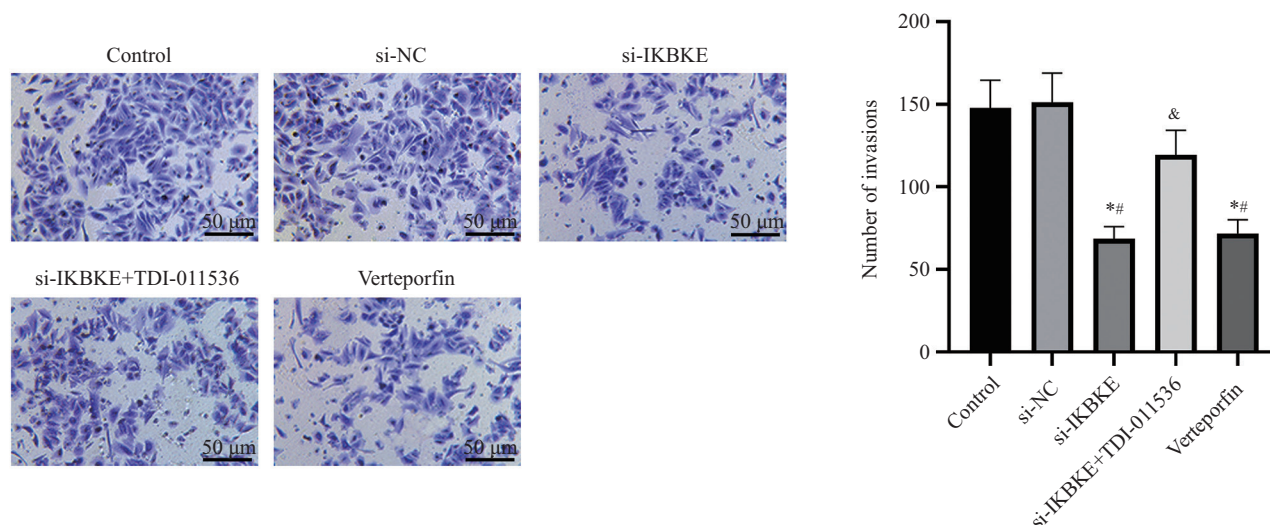
图5 划痕实验检测各组SW1990细胞划痕愈合率

Fig.5 The scratch healing rate of SW1990 cells in each group was measured by scratch test

2.7 各组SW1990细胞N-cadherin、E-cadherin、vimentin蛋白表达情况

图8显示, 相较于control组和si-NC组, si-

*IKBKE*组和Verteporfin组E-cadherin表达上调, N-cadherin和vimentin表达下调($P<0.05$); 相较于si-*IKBKE*组, si-*IKBKE*+TDI-011536组E-cadherin表

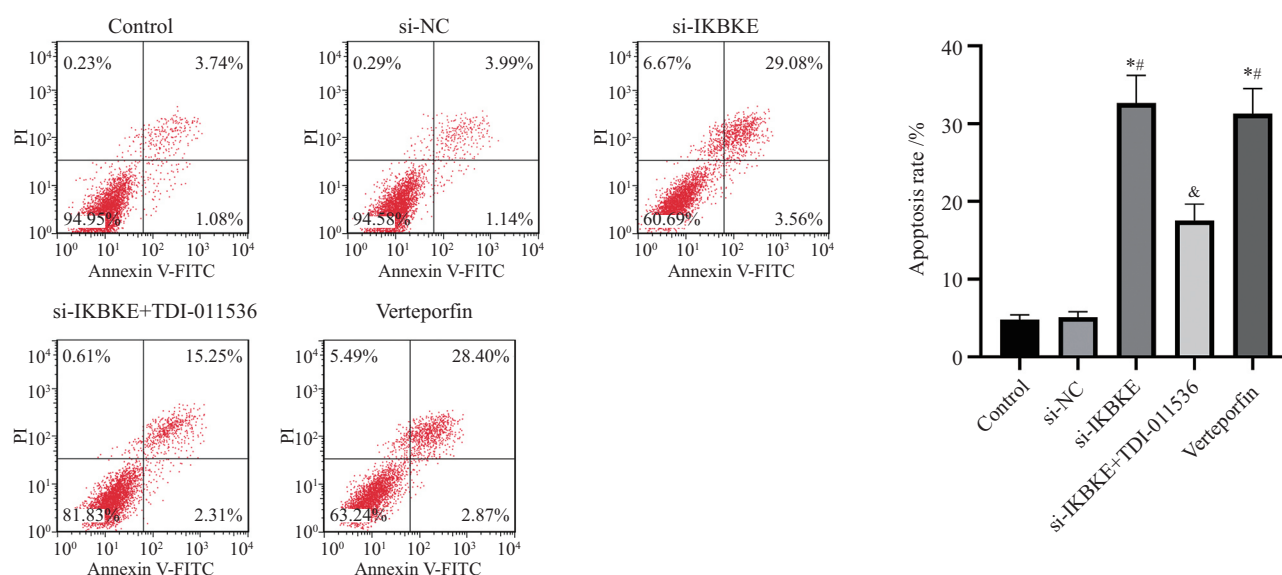


$n=6$; * $P<0.05$, 与control组相比; # $P<0.05$, 与si-NC组相比; & $P<0.05$, 与si-ICKBE组相比。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with si-NC group; & $P<0.05$ compared with si-ICKBE group.

图6 Transwell小室检测各组SW1990细胞侵袭数

Fig.6 The number of SW1990 cell invasion in each group was measured by Transwell chamber



$n=6$; * $P<0.05$, 与control组相比; # $P<0.05$, 与si-NC组相比; & $P<0.05$, 与si-ICKBE组相比。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with si-NC group; & $P<0.05$ compared with si-ICKBE group.

图7 各组SW1990细胞凋亡率比较

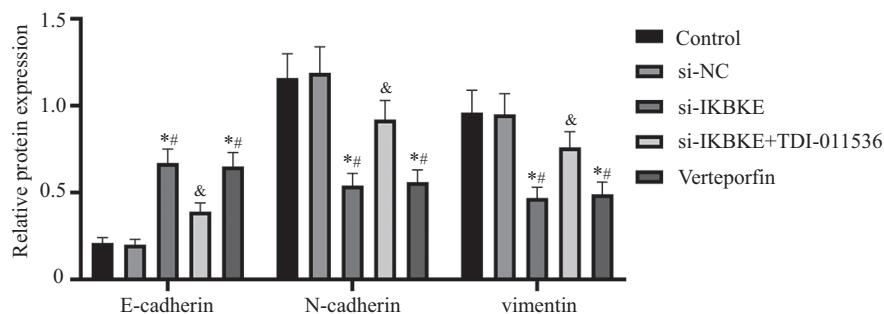
Fig.7 Comparison of apoptosis rate of SW1990 cells in each group

达下调, N-cadherin和vimentin表达上调($P<0.05$), Verteporfin组各蛋白表达差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.8 各组SW1990细胞增殖、凋亡及通路相关蛋白表达

si-ICKBE组和Verteporfin组SW1990细胞cleaved caspase-3、Bax、p-YAP、p-TAZ蛋白表达水平高于control组和si-NC组, PCNA、ICKBE、Bcl-

2、YAP、TAZ、TEAD2、Ax1、c-myc蛋白表达水平低于control组和si-NC组($P<0.05$); 与si-ICKBE组相比, si-ICKBE+TDI-011536组SW1990细胞cleaved caspase-3、Bax、p-YAP、p-TAZ蛋白表达水平降低, PCNA、Bcl-2、YAP、TAZ、TEAD2、Ax1、c-myc蛋白表达水平升高($P<0.05$), ICKBE蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$), Verteporfin组SW1990细胞cleaved caspase-3、Bax、PCNA、p-YAP、p-TAZ、

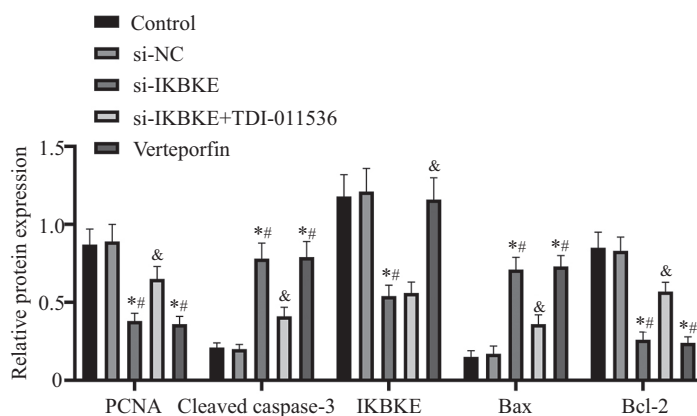


$n=6$; * $P<0.05$, 与control组相比; ^{##} $P<0.05$, 与si-NC组相比; [&] $P<0.05$, 与si-ICKBE组相比。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; ^{##} $P<0.05$ compared with si-NC group; [&] $P<0.05$ compared with si-ICKBE group.

图8 各组SW1990胞中N-cadherin、E-cadherin、vimentin蛋白表达比较

Fig.8 Comparison of protein expression of N-cadherin, E-cadherin and vimentin in SW1990 cells of each group

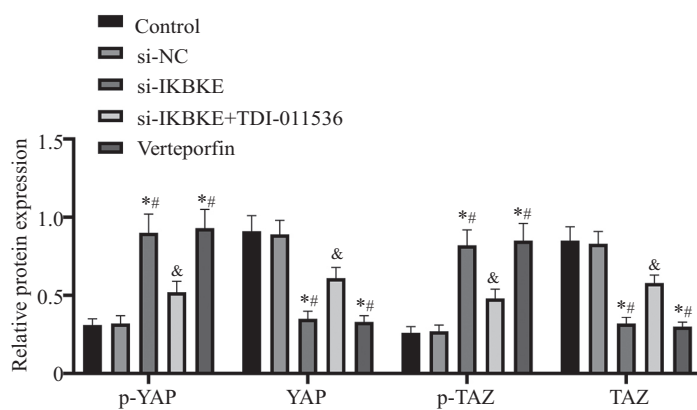


$n=6$; * $P<0.05$, 与control组相比; ^{##} $P<0.05$, 与si-NC组相比; [&] $P<0.05$, 与si-ICKBE组相比。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; ^{##} $P<0.05$ compared with si-NC group; [&] $P<0.05$ compared with si-ICKBE group.

图9 各组SW1990细胞PCNA、cleaved caspase-3、IKBKE、Bax、Bcl-2蛋白表达情况

Fig.9 Protein expression of PCNA, cleaved caspase-3, IKBKE, Bax, and Bcl-2 in SW1990 cells of each group



$n=6$; * $P<0.05$, 与control组相比; ^{##} $P<0.05$, 与si-NC组相比; [&] $P<0.05$, 与si-ICKBE组相比。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; ^{##} $P<0.05$ compared with si-NC group; [&] $P<0.05$ compared with si-ICKBE group.

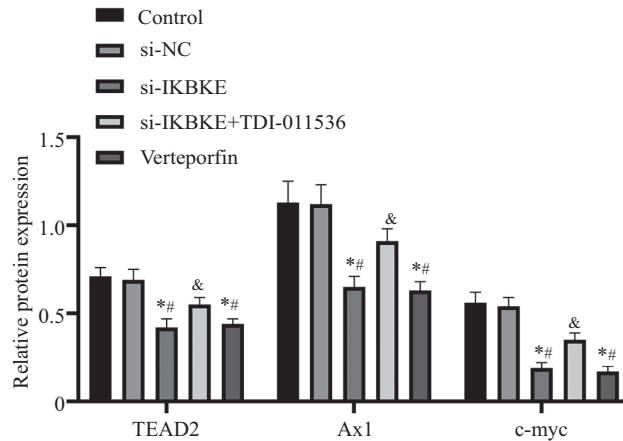
图10 各组SW1990细胞中YAP、TAZ、p-YAP、p-TAZ蛋白表达比较

Fig.10 Comparison of protein expression of YAP, TAZ, p-YAP and p-TAZ in SW1990 cells of each group

YAP、TAZ、TEAD2、Ax1、c-myc蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), IKBKE蛋白表达水平升高($P<0.05$)(图9~图11)。

3 讨论

胰腺癌是一种致命性极强的癌症, 具有高转移和高侵袭特性, 导致发病率和死亡率居高不下, 总体



$n=6$; * $P<0.05$, 与control组相比; # $P<0.05$, 与si-NC组相比; & $P<0.05$, 与si-IKBKE组相比。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with si-NC group; & $P<0.05$ compared with si-IKBKE group.

图11 各组SW1990细胞中TEAD2、Ax1、c-myc蛋白表达比较

Fig.11 Comparison of protein expression of TEAD2, Ax1 and c-myc in SW1990 cells of each group

生存率和五年生存率较低^[12]。目前胰腺癌的发病机制尚不完全清楚, 针对中晚期患者也无较好的治疗方式, 因此探究胰腺癌的发病机制, 从分子水平治疗胰腺癌可能是治疗胰腺癌的方向^[13]。IKBKE属于非经典I κ B激酶, 研究表明IKBKE可促进不同肿瘤细胞的生长、增殖、侵袭和耐药性^[14]。XIE等^[15]研究表明降低IKBKE表达水平可抑制乳腺癌细胞转移和侵袭。CHALLA等^[16]研究表明抑制IKBKE表达可诱导胰腺癌细胞凋亡, 并抑制肿瘤生长和转移。本研究结果显示, IKBKE在胰腺癌组织和细胞中高表达, 与其在肝癌^[17]、肾细胞癌^[18]、胶质瘤^[19]中的表达趋势抑制, 表明IKBKE作为癌基因参与胰腺癌的发展, 提示IKBKE可能在不同类型的肿瘤进展中发挥相同的促癌作用。本研究使用卡方检验分析胰腺癌患者的临床病理数据, 发现IKBKE表达与侵袭性临床病理特征(包括肿瘤大小、淋巴结转移和分化程度)呈正相关。临床病理数据显示, IKBKE在胰腺癌增殖、转移和侵袭中起重要作用。

EMT是使上皮细胞向间充质细胞转化的过程, 可提高癌细胞的迁移和侵袭能力。研究显示, EMT标志蛋白包括N-cadherin、E-cadherin和vimentin, 其中, N-cadherin可促进上皮-间质细胞的迁移, E-cadherin可维持细胞间黏附, vimentin为间质细胞特异性蛋白, 可加快细胞迁移^[20]。本实验发现, 沉默IKBKE可降低N-cadherin和vimentin表达水平, 增加E-cadherin表达水平, 进一步通过细胞划痕实验和侵袭实验证实下调IKBKE表达可通过抑制EMT进程进

而抑制SW1990细胞迁移和侵袭。癌细胞增殖能力强且不易凋亡, 这使得癌症进展迅速, 进而危及患者生命。PCNA为细胞核增殖抗原, 在癌细胞中高表达, 可促进癌细胞增殖, 是细胞增殖的标志蛋白^[21]; cleaved caspase-3作为一种凋亡相关蛋白, 可启动凋亡程序, 提高凋亡蛋白表达水平, 加快细胞凋亡^[22]。本实验中, 沉默IKBKE可下调PCNA、Bcl-2表达, 上调cleaved caspase-3、Bax表达, 进一步经增殖和凋亡实验表明沉默IKBKE可诱导SW1990细胞凋亡, 抑制增殖。以上结果提示, 沉默IKBKE可通过调控增殖、凋亡相关蛋白表达阻滞SW1990细胞恶性生物学行为。有研究显示, 包封IKBKE siRNA的脂质纳米颗粒可在体内抑制胰腺癌细胞增殖, 抑制肿瘤生长^[23], 本文的细胞实验结果与其对应, 表明IKBKE具有治疗胰腺癌的潜力, 未来可能被开发为治疗胰腺癌的靶向药物。

大量研究显示, Hippo-YAP信号通路与癌症的发生发展有关, 磷酸化的YAP一般存在于细胞质中, 而未磷酸化的YAP可进入细胞核, 参与调控核内靶基因转录和翻译, 进而调控细胞功能^[24]。激活Hippo-YAP信号通路可阻滞结肠癌进展^[22], 诱导胰腺癌细胞凋亡并抑制其增殖和EMT^[25]。本研究发现, 与control组和si-NC组相比, 下调IKBKE表达后p-YAP、p-TAZ蛋白表达水平升高, YAP及下游转录因子TEAD2、Ax1、c-myc蛋白表达水平下降, Hippo-YAP信号通路被激活, 与既往的研究结果^[26-27]一致, 提示沉默IKBKE可能通过促进YAP磷酸化, 抑制

YAP易位至细胞核,从而抑制胰腺癌进展。为进一步验证Hippo-YAP信号通路是否参与调控SW1990细胞生物学活性,本研究用Hippo-YAP信号通路激活剂Verteporfin进行干预,结果显示,Verteporfin可抑制SW1990细胞恶性生物学行为,抑制效果与下调*IKBKE*表达处于同一水平。Verteporfin是YAP抑制剂,其在抑制YAP表达的同时能够增加cleaved caspase-3表达^[28]。为进一步验证*IKBKE*作用靶点,本研究在下调*IKBKE*表达的同时用Hippo-YAP信号通路抑制剂TDI-011536进行干预,结果显示,TDI-011536可降低下调*IKBKE*表达对SW1990细胞的抑制作用。综合以上结果得出结论,下调*IKBKE*表达可抑制胰腺癌细胞的恶性生物学行为,这可能与激活Hippo-YAP信号通路有关。既往研究显示,敲低*IKBKE*通过抑制YAP1及下游CTGF、CYR61蛋白表达来激活Hippo-YAP信号通路,进而抑制胶质瘤进展^[29]。与此不同的是,本研究关注的是胰腺癌细胞,同时本研究检测的通路因子也有所不同,除了YAP外,还有TAZ及下游转录因子TEAD2、Axl、c-myc,通过Western blot检测和回复实验验证在胰腺癌细胞中敲低*IKBKE*可激活Hippo-YAP信号通路,进而抑制细胞的恶性生物学行为。

综上所述,下调*IKBKE*表达可抑制胰腺癌细胞迁移、侵袭和增殖,其机制可能与激活Hippo-YAP信号通路有关。然而,本研究仅在一株细胞系中进行功能验证,且机制研究较为浅显,缺乏TDI-011536的单独作用研究和体内实验验证,未来将在多个细胞系和动物实验中深入探究*IKBKE*调节胰腺癌进展的分子机制。

参考文献 (References)

- [1] TAO L, CHEN X, ZHENG Y, et al. Chinese propolis suppressed pancreatic cancer Panc-1 cells proliferation and migration via Hippo-YAP pathway [J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2803-15.
- [2] NIU N, SHEN X, WANG Z, et al. Tumor cell-intrinsic epigenetic dysregulation shapes cancer-associated fibroblasts heterogeneity to metabolically support pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(5): 869-84.e9.
- [3] WU Y, SEUFERT I, AL-SHAHERI F N, et al. DNA-methylation signature accurately differentiates pancreatic cancer from chronic pancreatitis in tissue and plasma [J]. *Gut*, 2023, 72(12): 2344-53.
- [4] LI S, GAO K, YAO D. Comprehensive analysis of autophagy associated genes and immune infiltrates in cervical cancer [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2024, 27(7): 813-24.
- [5] 余冬. *IKBKE*在胰腺癌中的表达及其对胰腺癌生物学行为的影响[D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
- [6] ZHU L, GUO G, JIN Y, et al. *IKBKE* regulates angiogenesis by modulating VEGF expression and secretion in glioblastoma [J]. *Tissue Cell*, 2023, 84(3): 102180-91.
- [7] WANG X, LU J, LI J, et al. CYT387, a potent *IKBKE* inhibitor, suppresses human glioblastoma progression by activating the Hippo pathway [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 396.
- [8] BAINBRIDGE A, WALKER S, SMITH J, et al. *IKBKE* activity enhances AR levels in advanced prostate cancer via modulation of the Hippo pathway [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(10): 5366-82.
- [9] 姬国凤, 崔红英, 刘玉瑰. 牛蒡子苷元通过调节Hippo-YAP信号通路对宫颈癌SiHa细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 成都医学院学报(JI G F, CUI H Y, LIU Y G. Effect of arctigenin on the proliferation, migration, and invasion of cervical cancer SiHa cells by regulating the Hippo-YAP signaling pathway [J]. *Journal of Chengdu Medical College*), 2024, 19(1): 8-13.
- [10] 鞠晓雨, 魏茜雪, 王兰. 根皮素调节YAP/TAZ信号通路对HPV阳性宫颈癌细胞恶性进展的影响[J]. 中国病原生物学杂志(JU X Y, WEI X X, WANG L. Effect of phloretin on the malignant progression of HPV positive cervical cancer cells by regulating the YAP/TAZ signaling pathway [J]. *Journal of Pathogen Biology*), 2024, 19(9): 1057-60,1065.
- [11] 陈芋洁, 黄霞, 邓铂林, 等. 金合欢素调节Hippo信号通路对糖尿病视网膜病变大鼠血管生成的影响[J]. 天津医药(CHEN Y J, HUANG X, DENG B L, et al. Effects of acacetin on angiogenesis in diabetes retinopathy rats by regulating Hippo signaling pathway [J]. *Tianjin Medical Journal*), 2024, 52(6): 578-83.
- [12] UDDIN M H, ZHANG D, MUQIBIL I, et al. Deciphering cellular plasticity in pancreatic cancer for effective treatments [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2024, 43(1): 393-408.
- [13] CHEN S Y, CHEN K L, DING L Y, et al. RNA bisulfite sequencing reveals NSUN2-mediated suppression of epithelial differentiation in pancreatic cancer [J]. *Oncogene*, 2022, 41(22): 3162-76.
- [14] YIN M, WANG X, LU J. Advances in *IKBKE* as a potential target for cancer therapy [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(1): 247-58.
- [15] XIE W, JIANG Q, WU X, et al. *IKBKE* phosphorylates and stabilizes Snail to promote breast cancer invasion and metastasis [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(8): 1528-40.
- [16] CHALLA S, HUSAIN K, KIM R, et al. Targeting the IκB kinase enhancer and its feedback circuit in pancreatic cancer [J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(2): 481-9.
- [17] GAO B, WU X, BU L, et al. Atypical inflammatory kinase *IKBKE* phosphorylates and inactivates FoxA1 to promote liver tumorigenesis [J]. *Sci Adv*, 2024, 10(6): eadk2285.
- [18] LIU S, LI J, ZHANG J, et al. *IKBKE* regulates renal cell carcinoma progression and sunitinib resistance through the RRM2-AKT pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(15): 6146-61.
- [19] LIU Y, GUO G, LU Y, et al. Silencing *IKBKE* inhibits the migration and invasion of glioblastoma by promoting Snail1 degradation [J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(5): 816-28.
- [20] JI Q, LI H, CAI Z, et al. PYGL-mediated glucose metabolism reprogramming promotes EMT phenotype and metastasis of pancreatic cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(6): 1894-909.
- [21] ZHAN J, ZHANG Q, TONG X, et al. HNF4G stimulates the development of pancreatic cancer by promoting IGF2BP2 transcription [J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(5): 1472-81.

- [22] TANG Z, NIU Y, XU Z, et al. Anti-tumor and anti-metastasis effects of berbamine-loaded lipid nanoparticles on pancreatic cancer [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(18): 3097-106.
- [23] PATEL P, FETSE J, LIN C Y, et al. Development of amino acid-modified biodegradable lipid nanoparticles for siRNA delivery [J]. *Acta Biomater*, 2022, 154: 374-84.
- [24] 郑成富, 周贵丰, 李青, 等. 连翘苷通过激活Hippo-YAP信号通路抑制结肠癌LS180细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志* (ZHENG C F, ZHOU G F, LI Q, et al. Phillyrin inhibits the malignant biological behaviors of colon cancer LS180 cells through activation of the Hippo/YAP signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*), 2024, 31(6): 566-72.
- [25] 王自闯, 张娟, 陈小永. 白花蛇舌草提取物通过Hippo-YAP信号通路抑制胰腺癌SW1990细胞上皮细胞间质转化[J]. *中国免疫学杂志* (WANG Z C, ZHANG J, CHEN X Y. Hedyotis diffusa extracts inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer SW1990 cells through Hippo-YAP signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Immunology*), 2020, 36(16): 1957-61, 1966.
- [26] ZHANG Z, LU J, GUO G, et al. IKBKE promotes glioblastoma progression by establishing the regulatory feedback loop of IKBKE/YAP1/miR-Let-7b/i [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317705575.
- [27] LU J, YANG Y, GUO G, et al. IKBKE regulates cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition of human malignant glioma via the Hippo pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49502-14.
- [28] 梁桂洪, 黄和涛, 潘建科, 等. 龙鳌胶囊含药血清对YAP抑制剂诱导人软骨细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. *中国药房* (LIANG G H, HUANG H T, PAN J K, et al. Study on protective effects of longbie capsule contained serum on the apoptosis of chondrocytes induced by YAP inhibitor [J] *China Pharmacy*), 2021, 32(12): 1442-8.
- [29] 郭高超. IKBKE通过磷酸化Amotl2促进YAP1的表达调控脑胶质瘤恶性进展的机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2020.