[文章编号] 1671-587X(2026)04-0999-12 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260412

ETV4对食管癌细胞生物学行为的调控作用及其分子机制

麻丽霞，汪 悦，郝相端，郭 颖
（长治医学院中心实验室，山西 长治 046000）

[摘 要] **目的：**探讨ETS易位变异体4（ETV4）对食管癌细胞生物学行为的调控作用，并阐明其可能的分子机制。**方法：**采用基因表达谱交互式分析2（GEPIA2）数据库分析食管癌组织和正常食管组织中*ETV4* mRNA表达水平。从高通量基因表达综合数据库（GEO）获取食管癌转录组测序数据集GSE199967，采用R软件统计*ETV4* mRNA表达水平。基于TCGA-ESCA数据集，利用UALCAN在线分析平台按临床分期、病理分级及组织学亚型分层评估*ETV4*的表达分布特征。将人食管癌KYSE-150细胞分为对照组和*ETV4*干扰组（shETV4组），分别转染对照慢病毒和靶向*ETV4*的短发夹RNA（shRNA）慢病毒，经嘌呤霉素筛选得到对照细胞及稳定干扰*ETV4*表达的细胞。采用实时定量PCR（RT-qPCR）法检测2组细胞中*ETV4* mRNA表达水平，Werstern blstting法检测2组细胞中ETV4蛋白表达水平，细胞计数试剂盒8（CCK-8）法检测2组细胞增殖活性，Transwell小室实验检测2组迁移细胞数，划痕愈合实验检测2组细胞划痕愈合率。通过TF-Target Finder平台预测ETV4的靶基因，利用JASPAR数据库筛选MDM2结合蛋白（MTBP）启动子区ETV4的潜在结合位点，采用双荧光素酶报告基因实验验证ETV4对*MTBP*启动子的调控作用。建立稳定干扰*MTBP*表达的KYSE-150-shMTBP细胞，采用RT-qPCR法检测2组细胞中*MTBP*、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A（*CDKN1A*）和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1B（*CDKN1B*）mRNA表达水平，流式细胞术检测不同细胞周期细胞百分率。**结果：**生物信息学分析，与正常食管组织比较，食管癌组织中*ETV4*表达水平升高（$P<0.05$）。TCGA-ESCA队列中Ⅰ～Ⅳ期食管癌组织、G_1～G_3级分化肿瘤组织及腺癌、鳞状细胞癌亚型组织中*ETV4* mRNA表达水平均高于正常组织（$P<0.001$）；而*ETV4* mRNA表达水平在不同临床分期、病理分级及组织学亚型患者组间比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。成功构建干扰*ETV4*表达的KYSE-150-shETV4细胞株，与对照组比较，shETV4组细胞中*ETV4* mRNA和蛋白表达水平均降低（$P<0.001$）；CCK-8法检测，与对照组比较，shETV4组细胞增殖活性降低（$P<0.001$）；Transwell小室实验，与对照组比较，shETV4组迁移细胞数减少（$P<0.01$）；划痕愈合实验，与对照组比较，shETV4组细胞划痕愈合率降低（$P<0.001$）。成功构建干扰*MTBP*表达的KYSE-150-shMTBP细胞，与对照组比较，shMTBP组细胞中*MTBP* mRNA表达水平降低（$P<0.001$）。生物信息学分析和双荧光素酶报告基因实验验证*MTBP*为ETV4下游靶基因，其启动子区TFBS2是ETV4的关键结合位点。RT-qPCR法检测，与对照组比较，shMTBP组细胞中*CDKN1A*和*CDKN1B* mRNA表达水平升高（$P<0.001$）；流式细胞术检测，与对照组比较，shMTBP组G_0/G_1期细胞百分率升高（$P<0.001$），S期细胞百分率降低（$P<0.001$）。**结论：**转录因子ETV4通过结合*MTBP*启动子激活其表达，调控细胞周期，促进食管癌细胞增殖与迁移，其机制与ETV4/MTBP轴有关。

[关键词] 食管肿瘤；转录因子；ETS易位变异体4；细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A；细胞周期
[中图分类号] R735.1 [文献标志码] A

[收稿日期] 2025-10-31 [录用日期] 2025-12-23
[基金项目] 山西省科技厅自然科学基金项目（202303021212231）；长治医学院博士科研启动基金项目（BS202213）
[作者简介] 麻丽霞（1986－），女，山西省大同市人，讲师，医学博士，主要从事肿瘤细胞分子生物学方面的研究。
[通信作者] 麻丽霞，讲师，硕士研究生导师（E-mail：datong19861125@163.com）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

Regulatory effect of ETV4 on biological behavior of esophageal cancer cells and its molecular mechanism

MA Lixia, WANG Yue, HAO Xiangduan, GUO Ying
(Central Laboratory, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

ABSTRACT **Objective**: To discuss the regulatory role of ETS translocation variant 4 (ETV4) in the biological behavior of esophageal cancer cells, and to clarify its possible molecular mechanism. **Methods**: The expression levels of *ETV4* mRNA in esophageal cancer tissue and normal esophageal tissue were analyzed using the Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) database. The esophageal cancer transcriptome dataset GSE199967 was obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database, and the *ETV4* mRNA expression level was analyzed using R software. Based on the TCGA-ESCA dataset, the expression distribution characteristics of ETV4 were systematically evaluated according to clinical stage, pathological grade, and histological subtype using the UALCAN online platform. The human esophageal cancer KYSE-150 cells were divided into control group and *ETV4* interference group (shETV4 group); the cells were transfected with control lentivirus or ETV4-targeted short hairpin RNA (shRNA) lentivirus, and after puromycin selection, the control cells and cells with stable ETV4 interference were established. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the *ETV4* mRNA expression level in the cells in two groups; Western blotting method was used to detect the ETV4 protein expression levels in the cells in two groups; cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the proliferation activities of the cells in the two groups; Transwell chamber assay was used to count the numbers of migration cells in two groups; wound healing assay was used to detect the wound healing rates of the cells in two groups. The target genes of ETV4 were predicted using the TF-Target Finder platform; potential binding sites of ETV4 in the promoter region of MDM2 binding protein (MTBP) were screened using the JASPAR database; dual-luciferase reporter assay was used to verify the regulatory effect of ETV4 on the MTBP promoter. The KYSE-150-shMTBP cells with stable MTBP interference was established; RT-qPCR method was used to detect the expression levels of *MTBP*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A*), and cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (*CDKN1B*) mRNA in the cells in two groups; flow cytometry was used to detect the percentages of the cells at different cell cycles. **Results**: The bioinformatics analysis results showed that compared with normal esophageal tissue, the expression level of *ETV4* mRNA in esophageal cancer tissues was increased ($P<0.05$). In the TCGA-ESCA cohort, the expression levels of *ETV4* mRNA in esophageal cancer tissues at clinical stages Ⅰ-Ⅳ, in tumor tissues with pathological grades G_1-G_3, and in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma subtypes were all higher than those in normal tissue ($P<0.001$); however, there was no statistically significant difference in *ETV4* mRNA expression levels among the subgroups stratified by clinical stage, pathological grade, and histological subtype ($P>0.05$). The KYSE-150-shETV4 cells with stable ETV4 interference was successfully constructed. Compared with control group, the *ETV4* mRNA and protein expression levels in the cells in shETV4 group were decreased ($P<0.001$). The CCK-8 assay results showed that compared with control group, the proliferation activity of the cells in shETV4 group was decreased ($P<0.001$). The Transwell chamber assay results showed that compared with control group, the number of migration cells in shETV4 group was decreased ($P<0.01$). The wound healing assay results showed that compared with control group, the wound healing rate of the cells in shETV4 group was decreased ($P<0.001$). The KYSE-150-shMTBP cells with stable MTBP interference was successfully constructed. Compared with control group, the *MTBP* mRNA expression level in the cells in

shMTBP group was decreased ($P<0.001$). The bioinformatics analysis and dual-luciferase reporter assay results confirmed that MTBP was a downstream target gene of ETV4, and TFBS2 in its promoter region was the key binding site for ETV4. The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression levels of *CDKN1A* and *CDKN1B* mRNA in the cells in shMTBP group were increased ($P<0.001$). The flow cytometry results showed that compared with control group, the percentage of cells in shMTBP group at G_0/G_1 phase was increased ($P<0.001$), and the percentage of the cells at S phase was decreased ($P<0.001$). **Conclusion**: The transcription factor ETV4 activates the expression of MTBP by binding to its promoter, regulates the cell cycle, and promotes the proliferation and migration of esophageal cancer cells; its mechanism is related to the ETV4/MTBP axis.

KEYWORDS Esophageal neoplasm; Transcription factor; ETS translocation variant 4; Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; Cell cycle

食管癌是全球高致死率恶性肿瘤之一。研究[1]显示：其发病机制涉及基因突变[2-3]、表观遗传修饰[4-5]、免疫细胞浸润不足[6-7]和细菌病毒感染[8]等多因素相互作用，但具体机制至今尚未完全阐明，为临床防治带来挑战。转录因子作为基因表达的关键调控蛋白，在维持细胞稳态中起着重要作用[9]。而其异常激活通过调控下游靶基因，促进肿瘤发生发展、产生耐药[10-11]。ETS转录因子家族成员ETS易位变异体4（ETS translocation variant 4，ETV4）是当前肿瘤领域的研究热点之一[12]。ETV4在乳腺癌、结直肠癌和肺癌等多种恶性肿瘤中异常表达，且与肿瘤的发生发展[13-14]和转移[15]密切相关。本研究通过对癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）和高通量基因表达（Gene Expression Omnibus，GEO）数据库等公共数据库分析，发现ETV4在食管癌组织中同样呈现显著高表达特征，提示其可能参与食管癌发病进程。但截至目前，国内外针对*ETV4*在食管癌中作用的研究报道极少，因此ETV4在食管癌中的具体功能仍不明确。本研究结合生物信息学分析和细胞生物学技术，通过体外功能实验探讨ETV4对食管癌细胞生物学行为的影响，挖掘其下游靶基因与调控通路，进而阐明ETV4参与食管癌发生发展的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人食管癌KYSE-150细胞、HEK293T细胞和HeLa细胞以及载体pcDNA3.1-His、pLKO.1-puro和pGL3-Basic均由长治医学院中心实验室保存。RPMI-1640培养基和DMEM培养基购自美国Gibco公司，胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自上海逍鹏生物科技有限公司，细胞计数试剂盒8（cell counting kit-8，CCK-8）试剂购自赛文创新（北京）生物科技有限公司，脂质体转染试剂、10 g·L^{-1}嘌呤霉素和8 mg·L^{-1}聚凝胺购自翌圣生物科技（上海）股份有限公司，DNA聚合酶、cDNA反转录试剂盒、SYBR Green试剂盒和限制性内切酶均购自日本TaKaRa公司，T4 DNA连接酶购自塞维尔生物技术有限公司，ETV4抗体购自美国Thermo公司，双荧光素酶检测试剂盒购自美国Promega公司，细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司，1%结晶紫染色液购自北京索莱宝科技有限公司。实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）仪（型号：Archimed X4）购自鲲鹏基因（北京）科技有限责任公司，全能成像分析系统（型号：ChemiDoc™ MP）购自美国Bio-Rad公司，酶标仪（型号：Infinite M plex）购自瑞士TECAN公司，倒置荧光显微镜（型号：DMi8）购自德国LEICA公司，流式分析细胞仪（型号：CytoFLEX LX）购自美国Beckman公司。

1.2 生物信息学分析 为系统探讨*ETV4*基因表达特征及其与食管癌临床病理参数的关联性、下游靶基因及*ETV4*与靶基因的潜在结合位点，本研究开展以下生物信息学分析：利用基因表达谱交互分析2（Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2，GEPIA2）网站（http://gepia.cancer-pku.cn/）分析食管癌组织与癌旁正常组织中*ETV4* mRNA表达差异；通过GEO数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）获取数据集GSE199967，以R软件（v4.0.3）统计该数据集中*ETV4* mRNA表达情况；借助UALCAN在线工具（https://ualcan.path.uab.edu/）整合TCGA-ESCA转录组及临床数据，按肿瘤临床分期（Ⅰ～Ⅳ期）、病理

分级（G_1～G_3级）、组织学亚型（腺癌*vs*鳞状细胞癌）分组，统计*ETV4*表达水平并绘制分布图；通过TF-Target Finder在线工具（https：//jingle.shinyapps.io/TF_Target_Finder/）筛选*ETV4*下游靶基因，ETV4下游有4个高置信度靶基因，分别为核糖体生物发生调节因子同源蛋白（ribosome biogenesis regulator homolog，*RRS1*）、MDM2结合蛋白（MDM2 binding protein，*MTBP*）、剪接因子3A亚基2（splicing factor 3a subunit 2，*SF3A2*）和血清应答因子结合蛋白1（serum response factor binding protein 1，*SRFBP1*）。选取位置权重矩阵富集分析（Position Weight Matrix Enrichment，PWMEnrich）、基于敲除的转录因子数据库（Knockout-based Transcription Factor Database，KnockTF）、基因转录调控数据库（Gene Transcription Regulation Database，GTRD）、染色质免疫沉淀图谱数据库（Chromatin ImmunoPrecipitation Atlas，ChIP-Atlas）、人类转录因子靶标数据库（human Transcription Factor target Database，hTFtarget）、独立基序匹配位点检索数据库（Find Individual Motif Occurrences，FIMO）6个数据库交叉验证，构建高置信度候选靶基因集合；从美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）检索*MTBP*基因转录起始位点（transcription start site，TSS）上游2 000 bp启动子序列，以JASPAR在线平台（https：//jaspar.elixir.no/）设95%相对评分阈值，预测该区域中ETV4的潜在结合位点。

1.3 载体构建 本研究构建3种载体用于后续实验，所用引物均由擎科生物股份有限公司合成。首先，将*ETV4*和*MTBP*基因特异性干扰引物退火形成的双链与经*Age*Ⅰ和*Eco*RⅠ双酶切的pLKO.1-puro载体骨架连接，连接产物转化*Stbl3*感受态细胞后提取质粒，经Sanger测序验证完成ETV4-shRNA和MTBP-shRNA慢病毒干扰载体构建；其次，以人cDNA为模板，采用引物ETV4-F（*Bam*HⅠ）/ETV4-R（*Eco*RⅠ）扩增*ETV4*基因片段，将经*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ双酶切的片段与同样双酶切处理的pcDNA3.1-His载体连接，转化*DH5α*感受态细胞后提取质粒并测序鉴定，获得*ETV4*过表达载体pcDNA3.1-ETV4；最后，以人基因组DNA为模板，利用引物MTBP pro-F（*Kpn*Ⅰ）/MTBP pro-R（*Mlu*Ⅰ）扩增*MTBP*转录起始位点上游约2 000 bp的启动子区，将其与经*Kpn*Ⅰ和*Bgl*Ⅱ双酶切的pGL3-Basic载体连接，转化*DH5α*感受态细胞，测序验证正确后命名为pGL3-MTBP。以pGL3-MTBP为模板，设计针对目标区域的特异性突变引物，采用重叠延伸PCR法引入突变，构建获得pGL3-MTBP Mut1～Mut4四个启动子突变体。载体构建所用引物见表1，测序工作均由擎科生物股份有限公司完成。

1.4 细胞培养和稳定细胞株构建 食管癌KYSE-150细胞用含10% FBS的RPMI-1640培养基培养，HEK293T和HeLa细胞用含10% FBS的DMEM培养基培养，所有细胞均置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。慢病毒包装：待10 cm培养板中HEK293T细胞密度达70%时，按pLKO.1-puro∶PMD2.G∶psPAX2=2∶1∶1的比例，将载体与包装质粒分别溶于Opti-MEM后，与脂质体转染试剂混合孵育，轻柔滴加至细胞中，培养4～6 h后更换新鲜完全培养基；转染48 h后收集含病毒的上清，离心去除碎片并经0.45 μm滤器过滤，分装后于－80 ℃保存。稳定细胞株构建：取对数生长期KYSE-150细胞接种于6孔细胞培养板，待密度达80%时加入慢病毒，8 h后更换培养基，感染48 h后改用含3 mg·L^{-1}嘌呤霉素的培养基筛选，每日更换筛选液直至空白对照组细胞全部死亡，最终获得KYSE-150-shETV4、KYSE-150-shMTBP及对照KYSE-150-shNC细胞。

1.5 RT-qPCR法检测细胞中MTBP、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A（*CDKN1A*）和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1B（*CDKN1B*）mRNA表达水平 使用TRIzol试剂提取细胞总RNA，取1 μg RNA经逆转录试剂盒合成cDNA模板。反应体系参照SYBR Green试剂盒说明书配制：2×TB Green Premix Ex Taq Ⅱ 10 μL、cDNA模板100 ng、上下游引物各0.8 μmol·L^{-1}（终浓度），ddH_2O补足至20 μL。反应程序：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s、60 ℃退火30 s，共40个循环。以*GAPDH*为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因mRNA表达水平。引物序列见表2。

1.6 Western blotting法检测2组KYSE-150细胞中ETV4蛋白表达水平 将KYSE-150-shETV4及对照KYSE-150-shNC细胞接种于6孔细胞培养

表1 载体构建引物信息

Tab. 1 Primer informations for vector construction

Primer name	Primer sequence(5′－3′)
ShETV4-F	CCGGCCCTGTGTACATATAAATGAACTCGAGTTCATTTATATGTACACAGGGTTTTTG
ShETV4-R	AATTCAAAAACCCTGTGTACATATAAATGAACTCGAGTTCATTTATATGTACACAGGG
ShMTBP-F	CCGGGGAGAGTGTTCTAGCTATTATCTCGAGATAATAGCTAGAACACTCTCCTTTTTG
ShMTBP-R	AATTCAAAAAGGAGAGTGTTCTAGCTATTATCTCGAGATAATAGCTAGAACACTCTCC
Scrambled shRNA-F	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTTG
Scrambled shRNA-R	AATTCAAAAACAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTG
ETV4-F (*Bam*HⅠ)	AAAGGATCCGGATCCGATGGAGCGGAGGATGAA
ETV4-R (*Eco*RⅠ)	CCCGAATTCCTAGTAAGAGTAGCCACC
MTBP pro-F (*Kpn*Ⅰ)	AAAGGTACCGGTGGCTGCATTTTCCCATC
MTBP pro-R (*Mlu*Ⅰ)	CCCACGCGTCGTCGGTTTTCCGCAGTTTT
TFBS1 mut-F	AAAATTTTTATTTTACTTTGGTGTATTTATCTCATCA
TFBS1 mut-R	TGATGAGATAAATACACCAAGTAAAATAAAAATTTT
MTBP TFBS2-R *Mlu*Ⅰ	AAAACGCGTTATGACGCATTTTCGGTTCCCTTCGT
TFBS3 mut-F	AACACAGTAATTATTCCTTGGTGGTTTCCTGTTAGC
TFBS3 mut-R	GCTAACAGGAAACCACCAAGGAATAATTACTGTGTT
TFBS4 mut-F	CCTATACTCAATATTCACCAAGTCCTACTGGCTCCAC
TFBS4 mut-R	GTGGAGCCAGTAGGACTTGGTGAATATTGAGTATAGG

表2 RT-qPCR引物序列

Tab. 2 RT-qPCR primer sequences

Gene name	Primer sequence(5′－3′)
qETV4	F:CAGTGCCTTTACTCCAGTGCC
qETV4	R:CTCAGGAAATTCCGTTGCTCT
qMTBP	F:TCGTCGGGTGAGGGTACTG
qMTBP	R:AACCACTTCTTGGAACCAGGT
qCCND1	F:GCTGCGAAGTGGAAACCATC
qCCND1	R:CCTCCTTCTGCACACATTTGAA
qCDKN1A	F:TGTCCGTCAGAACCCATGC
qCDKN1A	R:AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC
qCDKN1B	F:TAATTGGGGCTCCGGCTAACT
qCDKN1B	R:TGCAGGTCGCTTCCTTATTCC
qGAPDH	F:ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG
qGAPDH	R:GCCATCACGCCACAGTTTC

板，培养48 h后收集细胞，加入含苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF)的放射性免疫沉淀分析(radioimmunoprecipitation assay，RIPA)裂解液冰上裂解30 min。二辛可宁酸(bicinchoninic acid，BCA)检测法测定总蛋白浓度，取25 μg蛋白样品经5×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE)上样缓冲液处理后，100 ℃变性10 min后进行SDS-PAGE：浓缩胶80 V电泳30 min，分离胶120 V电泳70 min。20 V恒压转膜至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride，PVDF)膜，5%脱脂奶粉室温封闭1 h。磷酸盐吐温缓冲液(phosphate-buffered saline with Tween，PBST)[含0.1% Tween-20的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline，PBS)]洗膜后，加入抗ETV4抗体(1∶2 000)及抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH)抗体(1∶2 000)4 ℃孵育过夜；次日PBST洗膜5次(每次5 min)，加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase，HRP)标记二抗(1∶5 000)室温孵育1 h，PBST洗膜后增强化学发光(enhanced chemiluminescence，ECL)法显影。以GAPDH为内参，采用Image J软件分析条带灰度值，计算ETV4蛋白表达水平。ETV4蛋白表达水平＝ETV4条带灰度值/GAPDH条带灰度值。

1.7 CCK-8法检测2组KYSE-150细胞增殖活性

取对数生长期的KYSE-150-shETV4和KYSE-150-shNC细胞制备单细胞悬液，细胞计数仪计数后调整细胞浓度至2×10^4 mL^{-1}。按每孔100 μL的密度接种至96孔细胞培养板，设置0、24、48、72和96 h共5个时间点，每个时间点设6个复孔(含细胞)及1个空白对照孔(仅培养基)。各时间点避

光条件下向对应孔中加入10 μL CCK-8溶液，37 ℃孵育2 h，酶标仪检测450 nm处吸光度（A）值。每个时间点6个复孔的A值均先扣除空白对照孔的A值进行校正，再计算校正后A值的平均值，作为该时间点的细胞增殖活性，独立实验重复3次。以平均A值代表细胞增殖活性。

1.8 细胞划痕实验检测2组KYSE-150细胞划痕愈合率 将处于对数生长期的KYSE-150细胞以每孔5×10^5个的密度接种于6孔细胞培养板中，置于培养箱中培养至细胞融合度达100%。使用200 μL无菌枪头在细胞单层划制划痕，PBS缓冲液漂洗去除细胞碎片后更换为无血清RPMI-1640培养基。分别于0、24和48 h在倒置显微镜下对相同标记位置进行拍照，采用Image J软件分析划痕宽度，计算细胞划痕愈合率。细胞划痕愈合率＝（0 h划痕宽度－24 h/48 h划痕宽度）/0 h划痕宽度×100%。

1.9 Transwell小室实验检测2组KYSE-150细胞迁移细胞数 将Transwell小室置于24孔细胞培养板，取200 μL细胞悬液2×10^5 mL^{-1}接种于8 μm孔径上室，下室加600 μL含20% FBS的完全培养基，37 ℃培养24 h。弃培养基后PBS缓冲液冲洗2～3次，4%多聚甲醛固定30 min，1%结晶紫染色5 min，水洗去浮色；用棉棒擦去上室未穿膜的细胞，晾干后在倒置显微镜下随机选5个视野统计迁移细胞数。

1.10 双荧光素酶报告基因实验检测ETV4对*MTBP*启动子的调控作用并计算细胞中荧光素酶活性 将HeLa细胞以每孔1×10^5个的密度接种于24孔细胞培养板，细胞融合度达70%时按分组转染。共有6组报告载体：①pGL3-Basic空载体；②pGL3-MTBP-WT（野生型启动子）；③～⑥pGL3-MTBP-Mut1～Mut4。每组设对照组与实验组：对照组共转染相应报告载体＋pcDNA3.1（空载体）＋pRL-TK（海肾荧光素酶内参）；实验组共转染相同报告载体＋pcDNA3.1-ETV4＋pRL-TK内参。转染24 h后裂解细胞，采用双荧光素酶检测试剂盒测定荧光强度，计算荧光素酶活性。细胞荧光素酶活性＝萤火虫荧光素酶荧光强度/海肾荧光素酶荧光强度。

1.11 流式细胞术检测2组不同细胞周期KYSE-150细胞百分率 将KYSE-150-shMTBP细胞株和对照KYSE-150-shNC细胞株以70%融合度接种至6孔细胞培养板，培养48 h后收集细胞。预冷PBS缓冲液洗涤2次，4 ℃、70%（体积分数）乙醇固定过夜，碘化丙啶（propidium iodide，PI）/核糖核酸酶染色缓冲液室温避光染色30 min，使用流式细胞仪检测细胞周期分布，采用FlowJo软件进行细胞周期曲线拟合（采用Dean-Jett-Fox拟合模型），分析G_0/G_1、S和G_2/M期细胞百分率。

1.12 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析。各组细胞中*ETV4* mRNA和蛋白表达水平、细胞增殖活性、穿膜细胞数、细胞划痕愈合率、荧光素酶活性、细胞中*CCDM*、*CDKMA*和*CDRMB* mRNA表达水平均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用Tukey检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

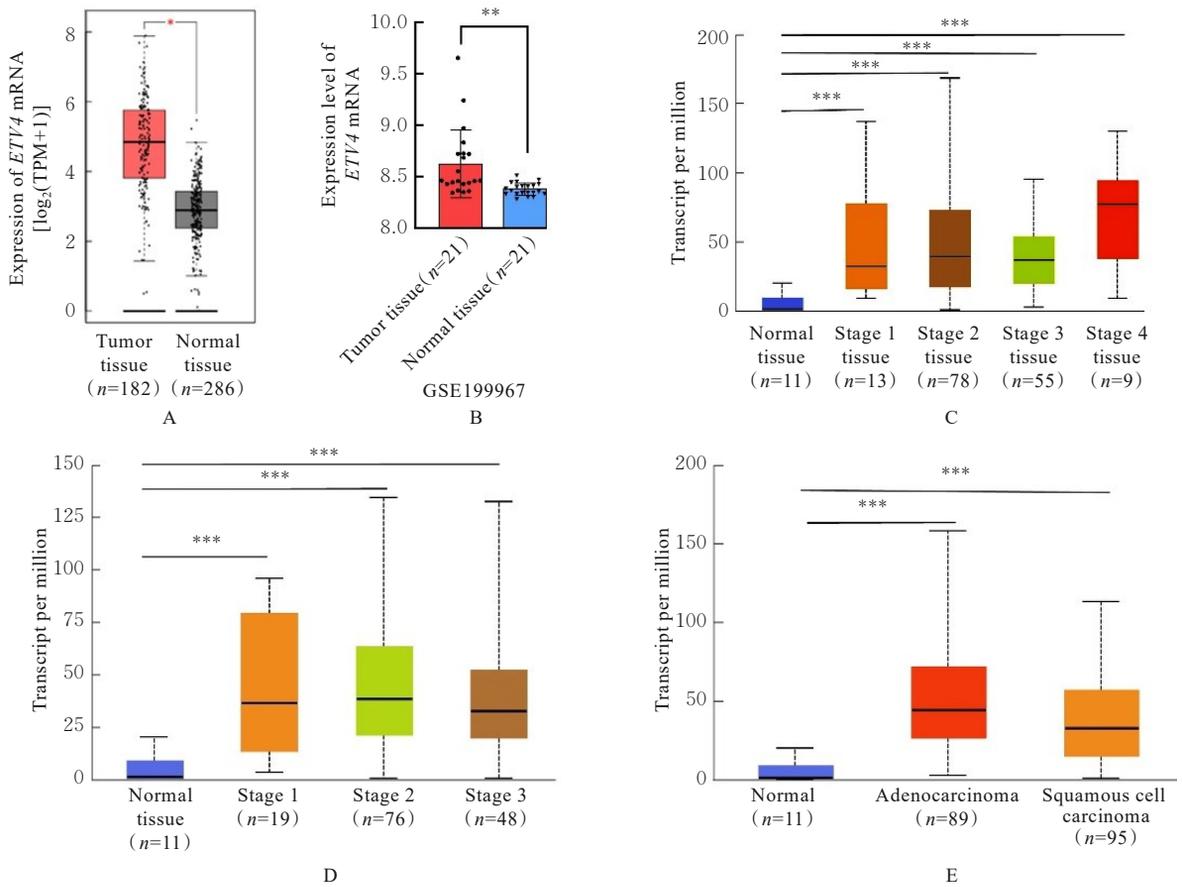
2 结 果

2.1 *ETV4*在食管癌中的表达及其与患者临床病理的相关性 GEPIA2分析显示：*ETV4*在TCGA食管癌肿瘤组织中表达水平高于GTEx正常对照组（$P<0.05$），见图1A。GSE199967数据集分析结果进一步证实了这种趋势，肿瘤组织中*ETV4*表达水平较配对正常组织升高（$P<0.01$），见图1B。基于TCGA-ESCA数据库的UALCAN分析显示：Ⅰ～Ⅳ期食管癌患者癌组织中*ETV4*表达均高于正常组织（$P<0.001$），而各临床分期组间*ETV4*表达水平比较差异无统计学意义（$P>0.05$），见图1C；高、中和低分化肿瘤（G_1～G_3级）*ETV4*表达均高于正常组织（$P<0.001$），但不同分化程度食管癌患者组间ETV4表达水平表达比较差异无统计学意义（$P>0.05$），见图1D。食管腺癌与鳞状细胞癌间*ETV4*表达水平比较差异无统计学意义（$P>0.05$），且表达水平均高于正常组织（$P<0.001$），见图1E。

2.2 ETV4下游靶基因的生物信息学预测 TF-Target Finder在线工具预测结果显示：ETV4下游有4个高置信度靶基因，分别为*RRS1*、*MTBP*、*SF3A2*和SRFBP1。见图2。

2.3 *MTBP*基因启动子区ETV4潜在结合位点的生物信息学预测 通过JASPAR平台分析ETV4的结合基序，并在*MTBP*基因启动子区2 000 bp范围内进行结合位点预测，结果显示该区域共存在4个潜在的ETV4转录因子结合位点（transcription factor binding site，TFBS）。见图3。

2.4 干扰*ETV4*基因表达后KYSE-150细胞的增殖活性、迁移细胞数和细胞划痕愈合率 RT-qPCR法检测结果显示：与对照组（1.04±0.08）比较，



A：Expression level of *ETV4* mRNA in esophageal cancer tissue and normal tissue from GEPIA；B：Expression level of *ETV4* mRNA in ESCA tissue and normal tissue from GSE19967 dataset； C：Expression level of *ETV4* mRNA in ESCA based on clinical stages；D：Expression level of *ETV4* mRNA based on pathological grades；E：Expression level of *ETV4* mRNA basced on histological grade. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

图1 和正常食管组织中*ETV4* mRNA表达水平及其与患者临床病理特征的相关性

Fig. 1 Expression level of *ETV4* mRNA in esophageal cancer tissue and mormal esophageal tissue and its correlation with clinicopathological fetures of patients

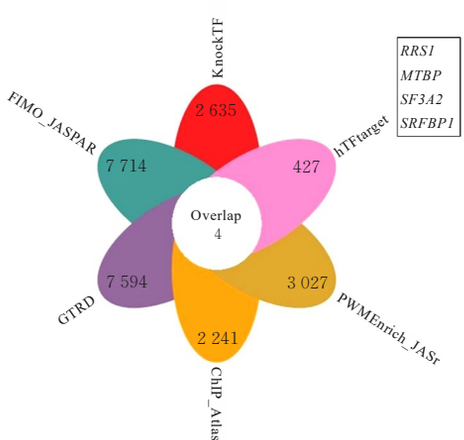
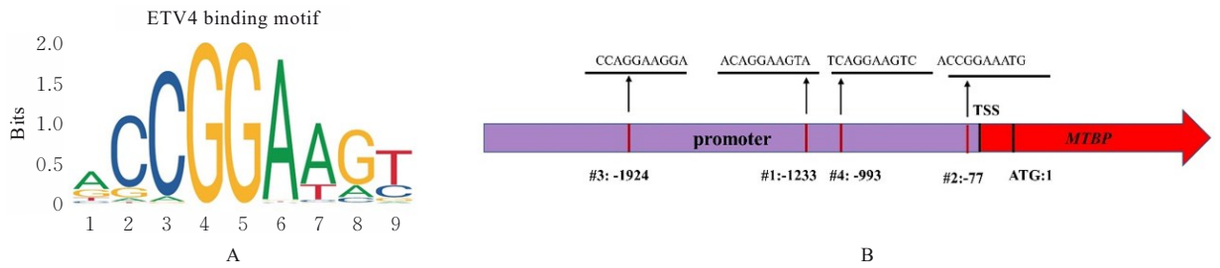


图2 多数据库中ETV4靶基因的交集分析

Fig. 2 Overlap analysis of ETV4 target genes across multiple databases

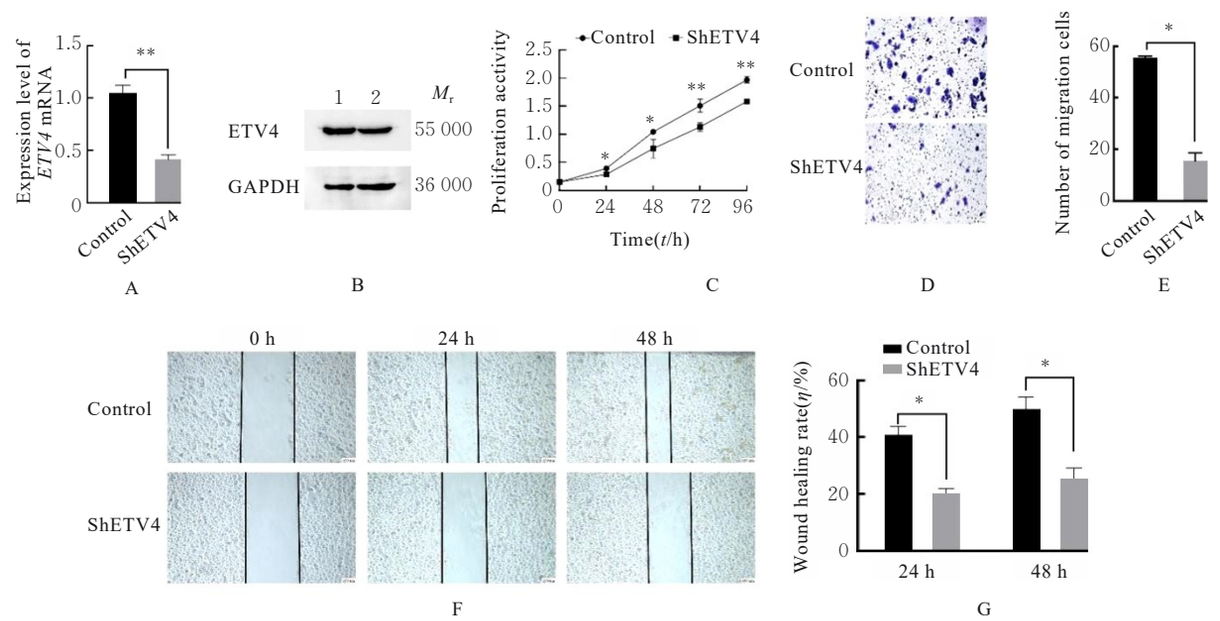
shETV4组（0.41±0.05）细胞中*ETV4* mRNA表达水平降低（$P<0.001$）。Western blotting法检测结果显示：与对照组比较，shETV4组细胞中ETV4蛋白表达水平降低。CCK-8法检测结果显示：与对照组（0.39±0.05、1.04±0.02、1.50±0.12和1.97±0.06）比较，不同时间点（24、48、72和96 h） shETV4组（0.28±0.04、0.74±0.16、1.13±0.08和1.58±0.05）细胞增殖活性均降低（$P<0.01$或$P<0.001$）。Transwell小室实验检测结果显示：与对照组［（55.58±0.83）个］比较，shETV4组迁移细胞数［(15.30±4.67)个］减少（$P<0.01$）。细胞划痕实验进一步证实：与对照组（40.81%±5.09%， 49.90%±7.29%）比较，干扰ETV4后细胞（划痕愈合率20.17%±3.06%，25.54%±6.16%）降低（$P<0.01$）。见图4。



A: Binding motif of transcription factor ETV4; B: Distribution of potential ETV4-binding sites in MTBP promoter.

图3 *MTBP*基因启动子区ETV4潜在结合位点的生物信息学预测

Fig. 3 Bioinformatics prediction of potential ETV4-binding sites in *MTBP* gene promoter region



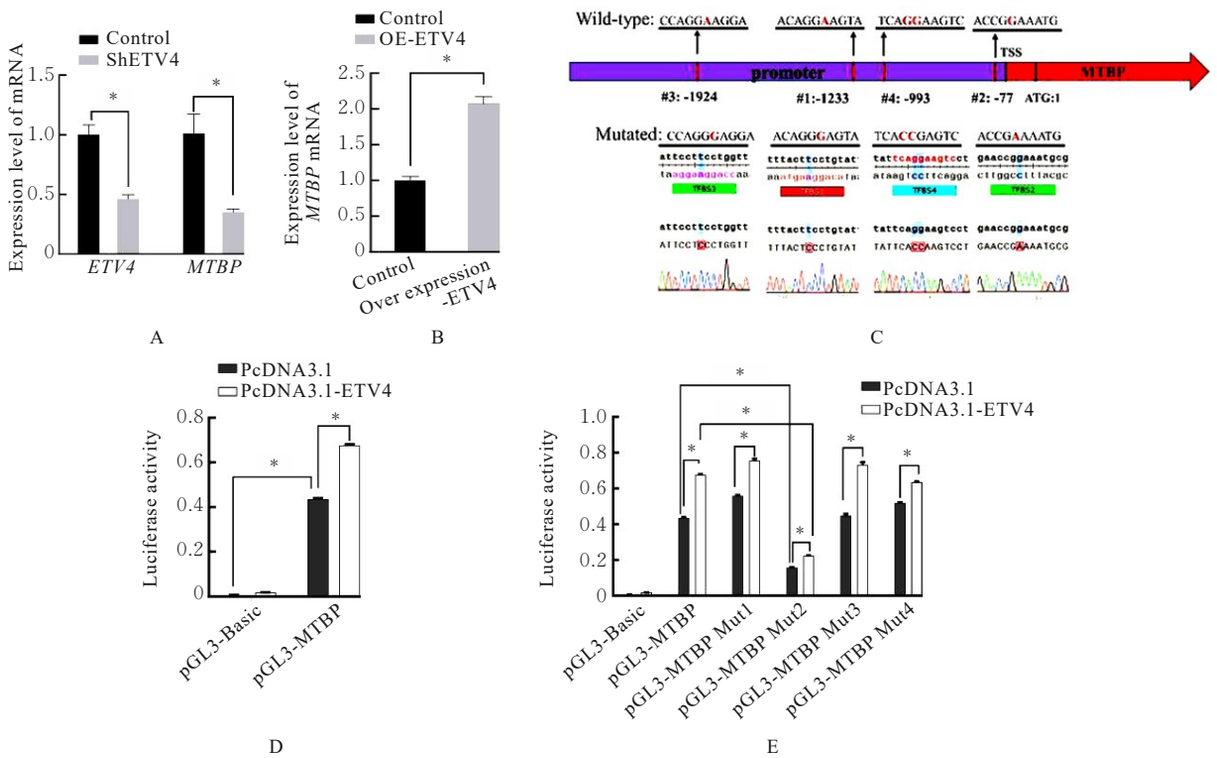
A: *ETV4* mRNA expression levels in control and shETV4 groups; B: Electrophoregram of ETV4 protein expression in control and shETV4 groups (Lane 1: Control groups; Lane 2: ShETV4 group); C: Cell proliferation curves; D: Morphology of cell migration; E: Number of migration cells; F: Morphology of cell wound healing; G: Wound healing rate of cells. $^{*}P<0.01$, $^{**}P<0.001$.

图4 敲低*ETV4*后食管癌细胞形态表现和细胞恶性表型表达

Fig. 4 Cell morphology and malignant phenotype expression of esophageal cancer cells after *ETV4* knockdown

2.5 ETV4与*MTBP*的靶向关系验证 RT-qPCR法检测结果显示：与对照组（1.01±0.17）比较，shETV4组（0.35±0.03）细胞中*MTBP* mRNA表达水平降低（$P<0.001$）；与对照组（1.00±0.05）比较，过表达ETV4组细胞中*MTBP*表达水平（2.07±0.10）升高（$P<0.001$）。为验证其功能，分别构建了包含野生型及4个突变位点（Mut1～Mut4）的*MTBP*启动子萤火虫荧光素酶报告载体。双荧光素酶检测结果表明：与pGL3-Basic空载体对照组（0.01±0.00）比较，pGL3-MTBP野生型启动子组荧光素酶活性（0.44±0.01）升高（$P<0.001$）；在野生型启动子中，与对照组（0.44±0.01）比较，ETV4过表达实验组细胞中荧光毒酶较活性（0.68±0.01）升高（$P<0.001$）。对预测的4个ETV4转录因子结合位点进行突变分析，结果显示：在Mut2突变体组中，对照组（0.16±0.00）和ETV4过表达组（0.22±0.00）细胞中荧光素酶活性较野生型对应组（0.44±0.01和0.68±0.01）均降低（$P<0.001$）；Mut1、Mut3和Mut4突变体组细胞中荧光素酶活性与野生型组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图5。

2.6 干扰*MTBP*基因表达后不同细胞周期KYSE-150细胞百分率 RT-qPCR法检测结果显示：与对照组（1.00±0.03）比较，shMTBP组（0.45±0.01）食管癌细胞中*MTBP* mRNA表达水平降低（$P<0.001$）。与对照组（1.04±0.14、1.00±0.11



A: Expression levels of *ETV4* and *MTBP* mRNA after *ETV4* knockdown; B:Expression level of *MTBP* mRNA after *MTBP* overexpression; C: Sequencing before and after results of four mutated *MTBP* promoter binding sites; D: Luciferase activity of *MTBP* promoter before and after ETV4 over expression; E:Luciferase activity of *MTBP* promoter binding site mutants before and after *ETV4* overexpression.

图5 *ETV4*与*MTBP*的靶向关系

Fig. 5 Targeting relationship between *ETV4* and *MTB*

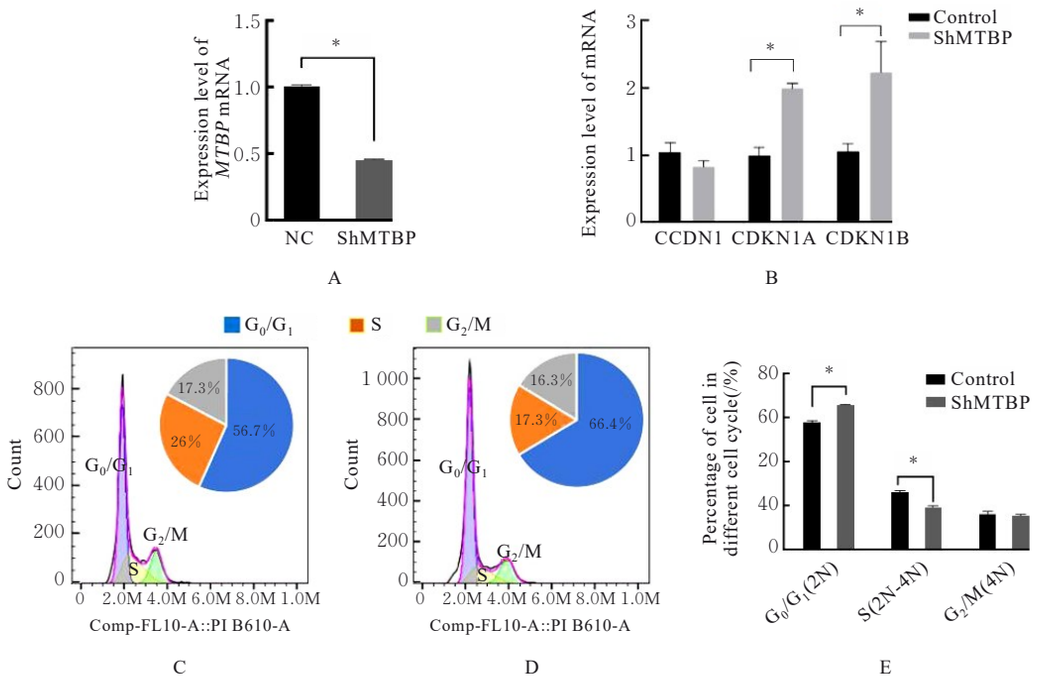
和1.06±0.12）比较，shMTBP组关键周期调控因子*CCND1* mRNA表达水平（0.83±0.09）无明显变化，而*CDKN1A* mRNA(2.00±0.07)和*CDKN1B* mRNA(2.24±0.46)表达水平升高($P<0.001$)。流式细胞术检测进一步证实：与对照组比较，shMTBP组食管癌细胞的G_0/G_1期细胞百分率升高，同时S期细胞百分率（$P<0.001$）降低。见图6。

3 讨 论

食管癌作为消化系统高发恶性肿瘤，其发病机制与亚硝胺类化合物暴露和吸烟饮酒等不良生活习惯及遗传易感性密切相关。在我国，食管癌发病率呈现显著地域差异，且整体发病率与死亡率长期处于较高水平，严重威胁居民健康，因此深入探讨其发病机制并挖掘潜在治疗靶点具有重要临床意义。

转录因子作为基因表达调控的核心分子，在肿瘤发生发展中起关键作用，其异常表达或功能失调与癌症的增殖、转移及治疗抵抗密切相关。Sine oculis同源框蛋白1（Sine oculis homeobox homolog 1，SIX1）作为一种转录因子，在乳腺癌等多种肿瘤中呈上调表达，其与癌症干细胞的相互作用可能是调控乳腺癌发生与转移的关键环节[16]；叉头框转录因子家族成员叉头框蛋白C2基因（Forkhead boxC2，FOXC2）作为新兴癌基因，可帮助多种癌症细胞逃避化疗药物杀伤[17]；肺腺癌中FIBP蛋白表达上调且与患者总生存期缩短相关，信号转导与转录激活因子3（signal transducer and activator of trans cription 3，STAT3）可通过与FIBP相互作用诱导EME1表达，进而驱动肺腺癌的放射抵抗性[18]；在食管鳞状细胞癌（esophageal squamous cell carcinoma,ESCC）中，转录因子3（transcription factor 3，TCF3）高表达且与癌症分期及预后相关，其可通过激活DNA结合抑制蛋白1（inhibitor of DNA binding 1，ID1）表达促进ESCC细胞迁移和侵袭能力并维持癌症干性特征[19]。

在众多与肿瘤相关的转录因子中，ETV4的致癌作用近年来受到广泛关注。已有泛癌研究[20-21]显示：ETV4在28种肿瘤中均呈显著上调表达，且其高表达与多种癌症患者总生存期缩短、无进展生存期及无病生存期减少、疾病特异性生存期变差密



A：Expression level of *MTBP* mRNA in control and shMTBP groups；B：Expression levels of *CCDN1*, *CDKN1A* and *CDKN1B* mRNA in control and shMTBP groups；C，D：Cell cycle distribution control（Left：flow cytometry plots；right：quantitative analysis）；C：Control group；D：ShMTBP group；E：Percentage of cells at different cell cycle. $^{*}P<0.01$.

图 6　干扰 *MTBP* 基因表达后不同细胞周期 KYSE-150 细胞百分率

Fig. 6　Percentages of KYSE-150 cells at different cell cycles after *MTBP* gene expression interference

切相关；同时，ETV4 表达还与免疫细胞浸润、肿瘤异质性、错配修复基因表达、DNA 甲基化及肿瘤干性显著相关，提示其在肿瘤发生发展中的多维度调控作用。在人类肝细胞癌中，ETV4 表达与更高的肿瘤-淋巴结-转移分期、肿瘤低分化程度、微血管侵犯及不良预后呈正相关，其过表达可激活程序性死亡配体 1（Programmed death-ligand 1，PD-L1）和趋化因子配体 2（C-C motif chemokine ligand 2，CCL2）表达，增加肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophage，TAM）和髓系抑制性细胞（myeloid-derived suppressor cells，MDSC）浸润并抑制 $CD8^{+}$ T 淋巴细胞聚集，最终促进肝细胞癌转移[15]；另有研究[22]显示：ETV4 在肝细胞癌中高表达且预示患者预后不良，其可通过激活肿瘤坏死因子 α（Tumor necrosis factor-α，TNF-α）和丝裂原活化蛋白激酶 11（mitogen-activated protein kinase 11，MAPK11）转录，推动肝脏炎症反应及肝细胞癌发生发展；在头颈部鳞状细胞癌（head and neck squamous cell carcinoma，HNSC）中，ETV4 同样显著过表达且与临床病理特征及预后密切相关，基因集富集分析显示其在多个免疫抑制通路中显著富集，而敲低 *ETV4* 可显著抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移与侵袭能力[23]。本研究通过生物信息学分析发现：ETV4 在食管癌组织中的表达水平高于正常对照组织；体外功能实验进一步证实：降低 ETV4 表达可显著抑制食管癌细胞的增殖与迁移能力，这一结果与上述 ETV4 在其他癌种中的致癌作用一致，进一步验证了 ETV4 在人类肿瘤中的广谱致癌特性。

为明确 ETV4 调控食管癌发生发展的下游分子机制，本研究通过综合多个转录因子靶基因预测数据库，共筛选出包含 MTBP 在内的 4 个潜在下游靶基因。其中，MTBP 编码蛋白可通过与 MDM2 蛋白结合参与细胞生长与分裂调控，且已有研究[24]证实 MTBP 异常表达或功能失调与多种癌症的发生发展密切相关。研究[25]显示：MTBP 高表达与乳腺癌的侵袭性和不良预后相关；在三阴性乳腺癌中，C9orf142 可通过转录激活 MTBP，调控下游 MDM2/p53/p21 信号轴及细胞周期 G_1 期向 S 期转换，最终驱动三阴性乳腺癌进展及对 CDK4/6 抑制剂的耐药性。本研究中，通过干扰 ETV4 表达发现 MTBP 表达水平亦降低；进一步通过生物信息学

预测明确MTBP启动子区存在ETV4结合位点，并利用双荧光素酶报告系统证实了ETV4与MTBP启动子关键位点的特异性结合，最终证实ETV4是调控肿瘤中MTBP异常表达的上游转录调控因子。

已有研究[26]证实：MTBP是动物细胞中已鉴定的最后一个核心DNA复制起始因子，作为酵母Sld7的同源物，其对复制起点激活、复制前复合物向复制体的成熟过程至关重要；此外，MTBP还可与Treslin形成复合物，通过独特机制将DNA复制完成过程与S/G_2期转换相偶联，确保细胞周期有序推进[27-28]。CDKN1A（p21）和CDKN1B（p27）是细胞周期进程中的关键抑制因子，分别通过阻滞细胞周期G_1期向S期转换、抑制G_1期细胞周期蛋白-CDK复合物活性调控细胞增殖[29-30]。本研究结果显示：干扰MTBP表达后食管癌细胞中CDKN1A和CDKN1B表达量上升，提示MTBP可能通过下调CDKN1A和CDKN1B表达、促进G_1/S期转换，进而增强食管癌细胞的增殖能力，这一结果也与MTBP在细胞周期调控中的已知功能相符。

本研究仍存在一定局限性：首先，研究主要基于KYSE-150细胞系的体外实验开展，缺乏动物模型验证及临床样本的体内机制探究，后续需通过构建动物移植瘤模型及扩大临床样本检测，进一步验证ETV4/MTBP轴在食管癌中的调控作用；其次，尽管本研究初步证实ETV4通过特异性结合MTBP启动子调控其表达，但MTBP下游具体作用的分子通路及调控网络尚未完全明确，例如MTBP是否通过其他信号分子而非仅CDKN1A/CDKN1B影响细胞周期，仍需后续实验深入探索。

综上所述，本研究证实*ETV4*作为致癌基因在食管癌组织中高表达，其可通过特异性结合*MTBP*启动子区激活MTBP表达，进而可能通过调节CDKN1A/CDKN1B表达、影响G_1/S期转换调控细胞周期进程，最终促进食管癌细胞的增殖与迁移能力。该研究结果不仅丰富了食管癌发生发展的分子机制理论，也为食管癌的临床治疗提供了ETV4和MTBP这2个潜在靶点及相关实验依据。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

麻丽霞参与实验设计、数据分析和论文撰写，汪悦、郝相端和郭颖参与实验操作及论文审阅。

[参考文献]

[1] LIU C Q, MA Y L, QIN Q, et al. Epidemiology of esophageal cancer in 2020 and projections to 2030 and 2040[J]. Thorac Cancer, 2023, 14(1): 3-11.

[2] CHANG J, ZHAO X, WANG Y C, et al. Genomic alterations driving precancerous to cancerous lesions in esophageal cancer development[J]. Cancer Cell, 2023, 41(12): 2038-2050.e5.

[3] LU Z H, DU W T, JIAO X, et al. *NOTCH1* mutation and survival analysis of tislelizumab in advanced or metastatic esophageal squamous cell carcinoma: a biomarker analysis from the randomized, phase Ⅲ, RATIONALE-302 trial[J]. J Clin Oncol, 2025, 43(16): 1898-1909.

[4] CUI Y B, HU Z Y, ZHANG C Y. RNA methyltransferase NSUN5 promotes esophageal cancer *via* 5-methylcytosine modification of METTL1[J]. Mol Carcinog, 2025, 64(3): 399-409.

[5] ZOU J, MA Q, GAO C L, et al. WTAP promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma *via* m^6A-dependent epigenetic promoting of PTP4A1[J]. Cancer Sci, 2024, 115(7): 2254-2268.

[6] XIONG G, CHEN Z, LIU Q W, et al. CD276 regulates the immune escape of esophageal squamous cell carcinoma through CXCL1-CXCR2 induced NETs[J]. J Immunother Cancer, 2024, 12(5): e008662.

[7] YUAN J Y, WENG Z L, TAN Z H, et al. Th1-involved immune infiltrates improve neoadjuvant chemoradiotherapy response of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2023, 553: 215959.

[8] LIU X Y, LI B, LIANG L P, et al. From microbes to medicine: harnessing the power of the microbiome in esophageal cancer[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1450927.

[9] MALAYMAR PINAR D, GÖÖS H, TAN Z L, et al. Nuclear factor Ⅰ family members are key transcription factors regulating gene expression[J]. Mol Cell Proteom, 2025, 24(1): 100890.

[10] KOCH S. The transcription factor FOXQ1 in cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2025, 44(1): 22.

[11] BIERSACK B, HÖPFNER M. Emerging role of MYB transcription factors in cancer drug resistance[J]. Cancer Drug Resist, 2024, 7: 15.

[12] OH S, SHIN S, JANKNECHT R. ETV1, 4 and 5: an oncogenic subfamily of ETS transcription factors[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1826(1): 1-12.

[13] ZHANG Q, LIU S, WANG H J, et al. ETV4

mediated tumor-associated neutrophil infiltration facilitates lymphangiogenesis and lymphatic metastasis of bladder cancer[J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(11): e2205613.

[14] LI D, ZHAN Y, WANG N T, et al. ETV4 mediates dosage-dependent prostate tumor initiation and cooperates with p53 loss to generate prostate cancer[J]. Sci Adv, 2023, 9(14): eadc9446.

[15] XIE M, LIN Z Y, JI X Y, et al. FGF19/FGFR4-mediated elevation of ETV4 facilitates hepatocellular carcinoma metastasis by upregulating PD-L1 and CCL2[J]. J Hepatol, 2023, 79(1): 109-125.

[16] GUO L T, LI F, LIU H Q, et al. SIX1 amplification modulates stemness and tumorigenesis in breast cancer [J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 866.

[17] HARGADON K M, STRONG E W. The FOXC2 transcription factor: a master regulator of chemoresistance in cancer [J]. Technol Cancer Res Treat, 2023, 22: 15330338231155284.

[18] XU Y H, LI J, ZHU K K, et al. FIBP interacts with transcription factor STAT3 to induce EME1 expression and drive radioresistance in lung adenocarcinoma[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(12): 3816-3829.

[19] LI Z X, SUN M C, FANG K, et al. Transcription factor 3 promotes migration and invasion potential and maintains cancer stemness by activating ID1 expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2023, 24(1): 2246206.

[20] ZHANG R, PENG Y F, GAO Z, et al. Oncogenic role and drug sensitivity of ETV4 in human tumors: a pan-cancer analysis[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1121258.

[21] HUANG L L, LI X J, HUANG S L, et al. Comprehensive analysis of the functional and immunological significance of ETV4 in pan-cancer and its validation in digestive tumors [J]. Front Immunol, 2025, 16: 1595850.

[22] QI D D, LU M, XU P F, et al. Transcription factor ETV4 promotes the development of hepatocellular carcinoma by driving hepatic TNF-α signaling [J]. Cancer Commun (Lond), 2023, 43(12): 1354-1372.

[23] TANG Y L, XIE W Y, HU T, et al. Identification of ETV4 as a prognostic biomarker and correlates with immune cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 7044.

[24] GRIEB B C, EISCHEN C M. MTBP and MYC: a dynamic Duo in proliferation, cancer, and aging [J]. Biology, 2022, 11(6): 881.

[25] LIAO L, DENG L, ZHANG Y L, et al. C9orf142 transcriptionally activates MTBP to drive progression and resistance to CDK4/6 inhibitor in triple-negative breast cancer[J]. Clin Transl Med, 2023, 13(11): e1480.

[26] ZAFFAR E, FERREIRA P, SANCHEZ-PULIDO L, et al. The role of MTBP as a replication origin firing factor[J]. Biology, 2022, 11(6): 827.

[27] NOBLE T D, SANSAM C G, WITTIG K A, et al. Cell cycle-dependent TICRR/TRESLIN and MTBP chromatin binding mechanisms and patterns [J]. BioRxiv, 2024: 2024.02.02.578516.

[28] ZONDERLAND G, VANZO R, GADI S A, et al. The TRESLIN-MTBP complex couples completion of DNA replication with S/G2 transition [J]. Mol Cell, 2022, 82(18): 3350-3365.e7.

[29] TICLI G, CAZZALINI O, STIVALA L A, et al. Revisiting the function of $p21^{CDKN1A}$ in DNA repair: the influence of protein interactions and stability [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 7058.

[30] GARCÍA-OSTA A, DONG J Y, MORENO-ALIAGA M J, et al. p27, the cell cycle and Alzheimer's disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1211.