

根皮苷对食管癌细胞系表达谱的影响

杨照环¹, 胡文倩², 贾祯贤², 谢俞宁², 张 志^{1*}, 龙月红³, 邢朝斌³, 张雪梅^{2,3*}

1. 华北理工大学附属唐山市工人医院, 河北 唐山 063000

2. 华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063210

3. 华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063210

摘要: **目的** 研究根皮苷对食管癌细胞系表达谱的影响, 探索根皮苷作用于食管癌细胞系的信号通路及其潜在功能。 **方法** 使用根皮苷处理人食管癌 KYSE450 细胞, 提取总 RNA 并建立测序文库, 进行转录组测序; 使用 DESeq2 程序鉴定差异表达基因, 对差异表达基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析; 使用 MCODE 进行差异基因核心模块筛选, 使用 GEPIA 数据库分析核心模块中的基因对食管癌生存的影响; 使用 TIMER 在线分析根皮苷对食管癌组织免疫细胞浸润的影响。 **结果** 转录组测序结果显示, 根皮苷处理后的食管癌细胞具有 4602 个差异表达基因, 其中 2407 个为上调基因, 2195 个为下调基因。通路富集分析显示, 根皮苷对蛋白质加工、胰岛素抵抗、基因复制和细胞周期等信号通路产生影响。在差异表达基因核心模块中, E3 泛素蛋白连接酶 2 (E3 ubiquitin ligase mind bomb 2, *MIB2*) 高表达可降低食管癌患者的总体生存率; 环指蛋白 19B (ring finger protein 19B, *RNF19B*)、三重基序蛋白 69 (tripartite motif-containing protein 69, *TRIM69*)、泛素连接酶 (ubiquitin conjugating enzyme, *UBC*) 和克隆 E3 泛素连接酶 (homologous to the E6-associated protein carboxyl terminus domain containing 2, *HECTD2*) 的表达水平可影响食管癌组织的纯度以及免疫细胞浸润的类型。 **结论** 根皮苷可影响食管癌细胞的转录谱, 其差异表达基因主要集中在细胞生长相关的信号通路。

关键词: 根皮苷; 食管癌; 转录组测序; 免疫浸润; E3 泛素蛋白连接酶 2; 环指蛋白 19B; 三重基序蛋白 69; 泛素连接酶; 克隆 E3 泛素连接酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)23-7236-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.23.018

Effect of phlorizin on expression profile of esophageal cancer cell lines

YANG Zhao-huan¹, HU Wen-qian², JIA Zhen-xian², XIE Yu-ning², ZHANG Zhi¹, LONG Yue-hong³, XING Zhao-bin³, ZHANG Xue-mei^{2,3}

1. Affiliated Tangshan Gongren Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China

2. College of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

3. School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of phlorizin on expression profile of esophageal cancer cells and further to reveal the signal pathways and potential functions that phlorizin involved in. **Methods** KYSE450 esophageal cancer cells were treated with phlorizin. Total RNA was extracted and RNA sequencing library was established to perform transcriptome sequencing. Differentially expressed genes were identified using DESeq2 package. Gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis of differentially expressed genes were performed. Moreover, hub model was evaluated using MCODE and survival analysis was performed using GEPIA. TIMER was used to online analyze effect of phlorizin on immune cell infiltration in esophageal cancer tissue. **Results** Total 4602 differentially expressed genes were identified of which 2407 were up-regulated and 2195 were down-regulated. Pathway enrichment analysis showed that phlorizin had impact on protein processing, insulin resistance, DNA replication and cell cycle signaling pathways. In the hub module, high expression of E3 ubiquitin ligase mind bomb 2 (*MIB2*)

收稿日期: 2021-06-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81272613)

作者简介: 杨照环 (1975—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要研究领域为肿瘤内科的综合治疗。Tel: 13831553045 E-mail: 244107878@qq.com

*通信作者: 张雪梅, 博士生导师, 主要从事肿瘤病因学与肿瘤流行病学研究。E-mail: jyxuemei@gmail.com

张 志, 硕士生导师, 主要从事肿瘤内科的综合治疗研究。E-mail: zhi1969@163.com

could reduce the overall survival rate of patients with esophageal cancer; Ring finger protein 19B (*RNF19B*), tripartite motif-containing protein 69 (*TRIM69*), ubiquitin conjugating enzyme (*UBC*) and homologous to the E6-associated protein carboxyl terminus domain containing 2 (*HECTD2*) expression levels could affect the purity of esophageal cancer tissue and type of immune cell infiltration. **Conclusion** Phlorizin could affect the transcription profile of esophageal cancer cells, of which differentially expressed genes were mainly involved in signal pathways related to cell growth.

Key words: phlorizin; esophageal cancer; RNA-Seq; immune infiltration; MIB2; RNF19B; TRIM69; UBC; HECTD2

当前癌症仍是重要的公共卫生问题,在我国食管癌发病人数居于第 6 位,死亡人数居于第 4 位,给人民健康带来巨大负担^[1]。食管癌致病因素复杂,抽烟^[2]、酗酒^[3]、胃食管反流^[4]和遗传因素^[5-7]均是食管癌发病的重要原因。食管癌是全世界最致命的恶性肿瘤之一,新辅助放化疗已被广泛用于食管癌治疗并取得了良好的效果^[8]。但是,依然有 60% 的患者对新辅助放化疗不敏感^[9-10],这无疑降低了手术的成功率,提示食管癌的治疗离不开药物的配合。

多穗石柯 *Lithocarpus polystachyus* (Wall.) Rehd. 在中国民间俗称“甜茶”,根皮苷是甜茶的主要成分,是二氢查耳酮家族的重要成员,也是苹果属植物中的主要酚类葡萄糖苷,具有抗氧化、抗高血压、抗糖尿病和抗肿瘤等作用。早在 1993 年, Nelson 等^[11]便发现了根皮苷具有抑制肿瘤细胞生长的作用; Chen 等^[12]发现三乙酰根皮苷能够抑制肿瘤细胞系 HepG2 的增殖活性;根皮苷能够通过抑制氧化应激和炎症反应来抑制顺铂对小鼠的肾毒性^[13],提示根皮苷具有抑制肿瘤和作为肿瘤治疗辅助药物的潜质。本课题组前期研究发现,根皮苷可显著抑制食管癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[14]。为了进一步探索根皮苷影响食管癌进展的作用机制,本研究使用高通量测序技术,考察经根皮苷处理的食管癌细胞的转录组变化,以揭示根皮苷作用于食管癌细胞的信号通路和生物学功能,为根皮苷应用于食管癌治疗提供转录组层面的证据。

1 材料

1.1 细胞株

人食管癌 KYSE450 细胞由日本兵库医学院的 Y. Shimada 博士馈赠。

1.2 药材

多穗石柯甜茶叶采自中国广西巴马县,经华北理工大学邢朝斌教授鉴定为壳斗科植物多穗石柯 *L. polystachyus* (Wall.) Rehd. 的叶。

1.3 药品与试剂

胎牛血清、RPMI 1640 完全培养基购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;二甲基亚砜(DMSO)

购自美国 Sigma 公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; Qubit RNA 检测试剂盒购自美国 Life Technologies 公司; NEBNext Ultra RNA 库制备试剂盒购自美国 New England Biolabs 公司。

1.4 仪器

细胞培养箱(中国力康生物医疗科技有限公司); Acquity 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); 分光光度计(美国 Implen 公司); 2100 Bioanalyzer 系统(美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 根皮苷的提取

将新鲜的甜茶叶干燥、过筛并浸入乙醇溶液中,超声提取 20 min,真空滤过,提取物浓缩去除乙醇,冷冻干燥得到粗产物。随后,将 5 g 粗产物于水中溶解,并上样于处理过的大孔树脂柱中 30 min。用去离子水洗涤大孔树脂柱以除去杂质,并用 75%乙醇洗涤根皮苷,将洗脱液浓缩,从乙醇中分离,于 0 °C 重结晶。结晶产物滤过,得到根皮苷单体。使用超高效液相色谱仪测定根皮苷单体的质量分数≥95%。

2.2 细胞培养

KYSE450 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱培养。

2.3 细胞 RNA 提取及测序

取处于对数生长期的 KYSE450 细胞接种于 6 孔板中,2×10⁵/孔,培养 12 h。根皮苷溶于 DMSO,由预实验可知根皮苷半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)为 0.6 mmol/L,故使用略小于 IC₅₀ 的 0.5 mmol/L 根皮苷进行后续实验。设置对照组和 3 个根皮苷(0.5 mmol/L)组,给药组加入药物,对照组加入不含药物的培养基,培养 48 h。

按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA,使用分光光度计和 Qubit 2.0 Fluorometer 中的 Qubit RNA 检测试剂盒测定 RNA 纯度和浓度;使用 2100 Bioanalyzer 系统评估 RNA 的完整性;使用 NEBNext Ultra RNA 库制备试剂盒构建 RNA 测序文库。使用 Illumina HiSeq 4000 测序平台对构建好的文库进行测序,测序完成后进行数据收集和处理,以上测序

服务由北京百奥生物科技有限公司完成。

2.4 数据处理和差异分析

FASTQ 格式的原始数据首先进行处理获得 clean data, 使用 TopHat 软件进行比对, 使用 Cufflinks 软件获得各个基因的数值用于后续分析。使用 R 包“DESeq2”进行差异分析, 将 $|\text{Log}_2 \text{ fold change}| > 1$ 和校正后 $P < 0.05$ 作为筛选差异基因的阈值, 进行差异表达基因 (differential expression genes, DEGs) 的筛选; 使用 R 包“ggplot2”“ggtree”进行热图绘制、聚类和各种可视化。

2.5 通路注释和功能富集分析

对于 DEGs, 使用 R 包“clusterProfiler”和“enrichplot”进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2.6 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建与关键 DEGs 的筛选

使用 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>) 进行网络构建, 使用 Cytoscape 软件进行后续分析。使用 Cytoscape 内插件 MCODE 选择包含做多节点数的基因集, 根据 MCODE 分析结果, 对各个 module 进行排序, 排序最前的即为关键 module, 并使用 Cytoscape 软件内置 ClueGo 插件对关键 module 内所含基因进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析。

2.7 DEGs 的数据库验证与预后的关系

GEPIA 包括了 TCGA 数据库的测序数据, 本研究使用 GEPIA 对 DEGs 在人群中的状况进行验证, 并使用 GEPIA 中的预后分析模块验证基因表达对食管癌预后的影响, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2.8 关键 DEGs 与免疫细胞之间的相关性

TIMER 数据库可用于计算 6 个浸润免疫细胞 (CD4^+ T 细胞、 CD8^+ T 细胞、B 细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞) 与 DEGs 表达的相关性, 对于与预后相关的 DEGs, 使用 TIMER 数据库进行 Spearman 相关性计算, 依次确认所研究基因与免疫细胞之间的相关性; 相关系数值 $r < 0.3$ 表示相关可忽略, 相关系数绝对值 ≥ 0.3 表示具有正/负相关性, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 根皮苷影响 KYSE450 细胞表达谱

通过测序和比对, 除去表达过低的转录本, 共

得到 15 339 个基因。进行表达量差异分析, 结果显示共计 4602 个 DEGs, 可见约 30% 的基因表达发生了改变; 其中 2407 个呈上调状态, 2195 个呈下调状态; DEGs 中表达上调基因略多于表达下调基因 (图 1-A)。基因表达聚类热图显示, 经过根皮苷处理后, 3 个重复的根皮苷处理组 KYSE450 细胞表达谱能够聚类, 且与对照组差异明显 (图 1-B), 提示根皮苷处理组表达谱与对照组表达谱具有异质性。上述结果显示, 根皮苷能够改变 KYSE450 细胞的表达谱。

3.2 DEGs 的 KEGG 通路分析

将差异基因分为表达上调组和表达下调组, 分别使用 R 包“clusterProfiler”进行 KEGG 通路分析, 上调组和下调组通路富集 $P < 0.05$ 的结果见图 2, 表达上调的 DEGs 主要影响了内质网中的蛋白质加工、胰岛素抵抗、动物线粒体、ErbB 信号通路和溶酶体等途径; 表达下调的 DEGs 主要影响了基因复制、细胞周期、同源重组、范可尼贫血途径和 Hippo 信号通路。上述结果显示, 使用根皮苷进行处理后, KYSE450 细胞的基因复制和细胞周期相关基因下调, 而溶酶体通路、ErbB 信号通路相关基因上调, 这些基因与细胞的增殖和凋亡密切相关, 提示根皮苷可能通过影响这些通路改变了 KYSE450 细胞的增殖水平, 发挥了抑制食管癌细胞生长的作用。

3.3 DEGs 的 GO 功能富集分析

使用 R 包“clusterProfiler”进行基因本体分析, GO 功能富集结果 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义, 按照 P 值进行排序, 各取前 5 进行展示 (表 1、2)。对表达上调的 DEGs 分析结果显示, 这些基因在分子功能 (molecular function, MF) 层面影响了 GTP 酶结合等, 细胞组分 (cellular component, CC) 层面影响了内质网-高尔基体中间区等, 生物过程 (biological process, BP) 层面影响了细胞对未折叠蛋白的作用等; 对于表达下调的 DEGs 分析结果显示, 在 MF 层面影响了单链 DNA 结合等, CC 层面影响了染色体区域等, BP 层面影响了基因复制等。

3.4 PPI 网络构建和关键模块筛选

使用 STRING 数据库构建了 DEGs 的 PPI 网络, 导入 Cytoscape 软件进行分析, 使用 MCODE 软件确定 PPI 网络中的核心模块, 前 3 个模块见图 3, 将排序第 1 的模块为核心模块, 核心模块 1 包含 36 个节点和 630 条边, 所含基因包括泛素结合酶 E2H (ubiquitin conjugating enzyme E2H, UBE2H)、环指

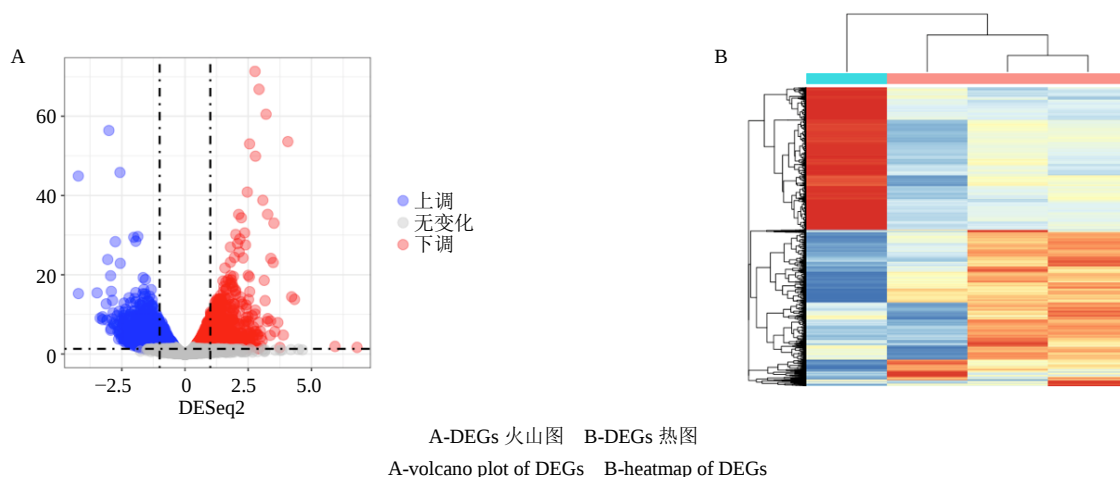


图 1 根皮苷对 KYSE450 细胞表达谱的影响

Fig. 1 Effect of phloridin on expression profile of KYSE450 cells

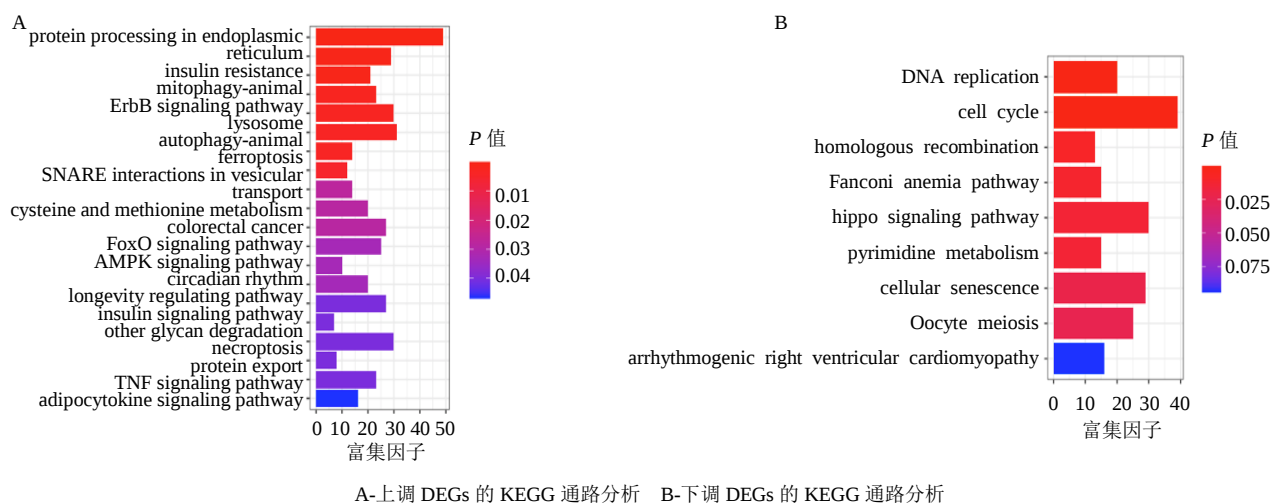


图 2 DEGs 的 KEGG 通路分析

Fig. 2 KEGG pathway analysis of DEGs

表 1 上调 DEGs 的 GO 功能富集分析

Table 1 GO function enrichment analysis of up-regulated DEGs

功能	ID	条目	P 值	P 校正
MF	GO: 0051020	GTPase binding	7.00×10^{-10}	6.11×10^{-7}
	GO: 0031267	small GTPase binding	3.98×10^{-8}	1.74×10^{-5}
	GO: 0017016	Ras GTPase binding	8.24×10^{-8}	2.40×10^{-5}
	GO: 0004842	ubiquitin-protein transferase activity	2.92×10^{-7}	6.38×10^{-5}
	GO: 0019787	ubiquitin-like protein transferase activity	5.43×10^{-7}	9.49×10^{-5}
CC	GO: 0005793	endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment	1.48×10^{-9}	9.48×10^{-7}
	GO: 0005795	Golgi stack	1.62×10^{-7}	5.19×10^{-5}
	GO: 0005798	Golgi-associated vesicle	3.44×10^{-7}	6.96×10^{-5}
	GO: 0099023	tethering complex	4.34×10^{-7}	6.96×10^{-5}
	GO: 0030662	coated vesicle membrane	9.80×10^{-7}	1.26×10^{-4}
BF	GO: 0034620	cellular response to unfolded protein	4.20×10^{-20}	1.69×10^{-16}
	GO: 0034976	response to endoplasmic reticulum stress	5.93×10^{-20}	1.69×10^{-16}
	GO: 0030968	endoplasmic reticulum unfolded protein response	4.97×10^{-19}	9.44×10^{-16}
	GO: 0035967	cellular response to topologically incorrect protein	1.13×10^{-18}	1.61×10^{-15}
	GO: 0006986	response to unfolded protein	4.22×10^{-18}	4.81×10^{-15}

表 2 下调 DEGs 的 GO 功能富集分析

Table 2 GO function enrichment analysis of down-regulated DEGs

功能	ID	条目	P 值	P 校正
MF	GO: 0003697	single-stranded DNA binding	1.39×10^{-6}	6.36×10^{-4}
	GO: 0015631	tubulin binding	1.43×10^{-6}	6.36×10^{-4}
	GO: 0043142	single-stranded DNA-dependent ATPase activity	3.21×10^{-6}	8.23×10^{-4}
	GO: 0008094	DNA-dependent ATPase activity	4.08×10^{-6}	8.23×10^{-4}
	GO: 0140097	catalytic activity, acting on DNA	4.63×10^{-6}	8.23×10^{-4}
CC	GO: 0098687	chromosomal region	3.70×10^{-16}	1.30×10^{-13}
	GO: 0000793	condensed chromosome	4.12×10^{-16}	1.30×10^{-13}
	GO: 0000775	chromosome, centromeric region	1.51×10^{-14}	3.17×10^{-12}
	GO: 0005819	spindle	1.35×10^{-12}	2.14×10^{-10}
	GO: 0000776	kinetochore	1.80×10^{-12}	2.27×10^{-10}
BF	GO: 0006260	DNA replication	2.84×10^{-25}	1.59×10^{-21}
	GO: 0006261	DNA-dependent DNA replication	5.16×10^{-18}	1.44×10^{-14}
	GO: 0007059	chromosome segregation	4.40×10^{-12}	8.20×10^{-9}
	GO: 0044839	cell cycle G ₂ /M phase transition	1.66×10^{-11}	2.33×10^{-8}
	GO: 0000086	G ₂ /M transition of mitotic cell cycle	5.26×10^{-11}	5.88×10^{-8}

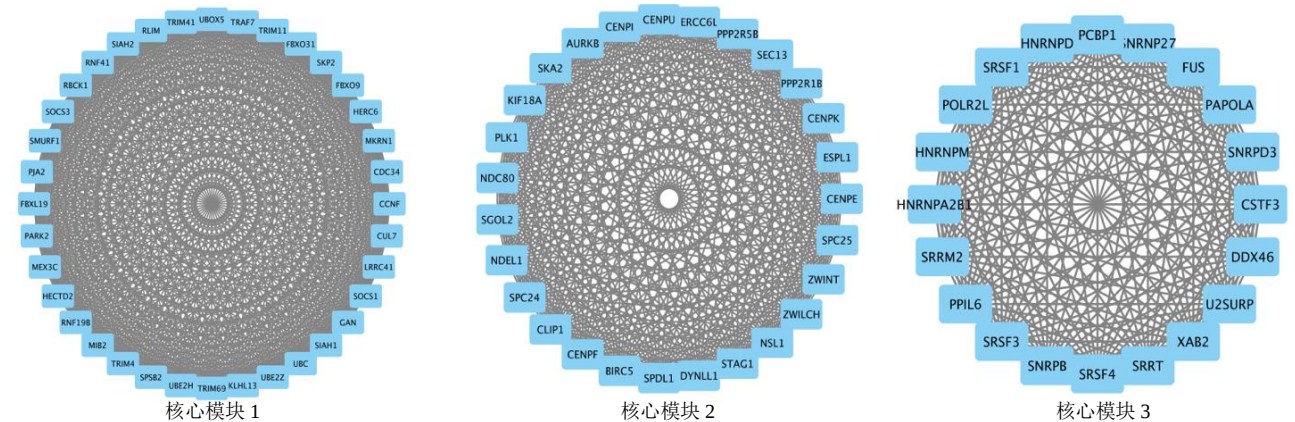


图 3 PPI 网络分析

Fig. 3 PPI networks analysis

蛋白 41 (ring finger protein 41, *RNF41*) 和细胞因子信号抑制因子 3 (suppressor of cytokine signaling 3, *SOCS3*) 等。

将核心模块 1 中的所有基因纳入 KEGG 和 GO 分析, 可见核心模块 1 所含基因影响了热量生成和蛋白质消化吸收相关信号通路 (图 4-A), 影响了细胞外基质强度结构成分、金属羧肽酶活性和细胞色素 C 氧化酶活性及相关功能 (图 4-B)。

3.5 关键模块中预后和免疫细胞浸润基因的鉴定

使用 GEPIA 数据库研究核心模块 1 中基因对食管癌预后的关系, 发现在 TCGA 数据库中, *E3* 泛素蛋白连接酶 2 (*E3* ubiquitin ligase mind bomb 2, *MIB2*) 基因呈高表达, 且 *MIB2* 高表达是食管癌不良预后因素 (图 5)。为了确定免疫细胞的肿瘤浸润与免疫相关基因表达之间是否存在相关性, 通过 TIMER 2.0 分析多个免疫细胞的肿瘤浸润的情况,

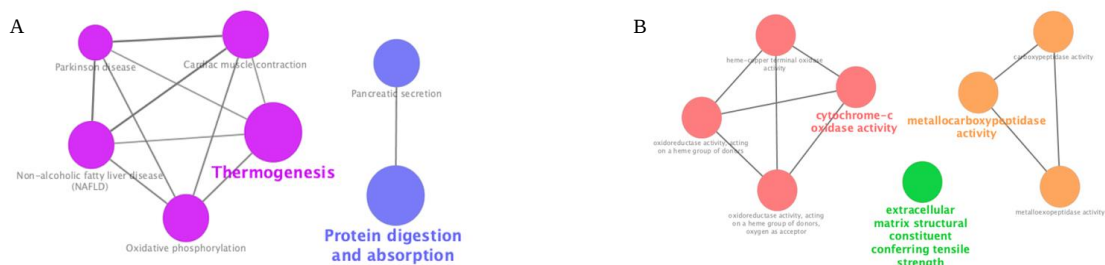


图 4 模块 1 中基因的 KEGG 通路 (A) 和 GO 功能 (B) 富集分析

Fig. 4 KEGG pathway (A) and GO function (B) enrichment analysis of genes of module 1

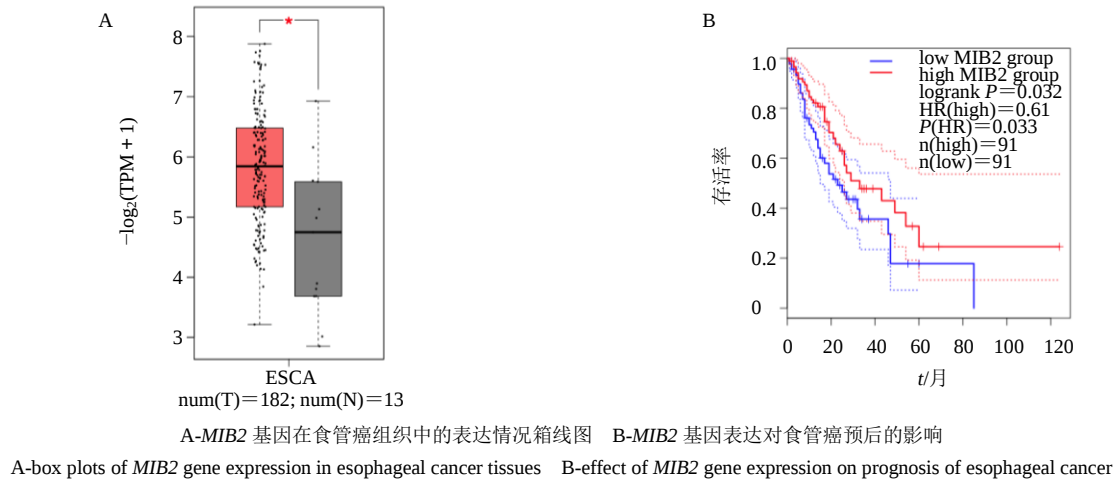


图 5 *MIB2* 基因在食管癌组织的表达及对预后的影响

Fig. 5 Expression of *MIB2* gene in esophageal cancer and its influence on prognosis

结果发现, *RNF19B* 表达与树突状细胞浸润水平呈正相关, 三重基序蛋白 69 (tripartite motif-containing protein 69, *TRIM69*) 表达与食管癌细胞纯度呈负相关, 泛素连接酶 (ubiquitin conjugating enzyme, *UBC*) 表达与树突状细胞浸润水平呈正相关, 克隆 E3 泛素连接酶 (homologous to the E6-associated protein carboxyl terminus domain containing 2, *HECTD2*) 与

巨噬细胞浸润水平呈正相关 (图 6)。

4 讨论

转录组测序是重要的生物信息学方法, 在癌症患者筛查中得到广泛应用^[15]。本研究使用转录组测序技术研究根皮苷对食管癌细胞系表达谱的影响。结果显示, 根皮苷能够改变 KYSE450 细胞的表达谱, 其中 2407 个基因上调, 2195 个基因下调。对

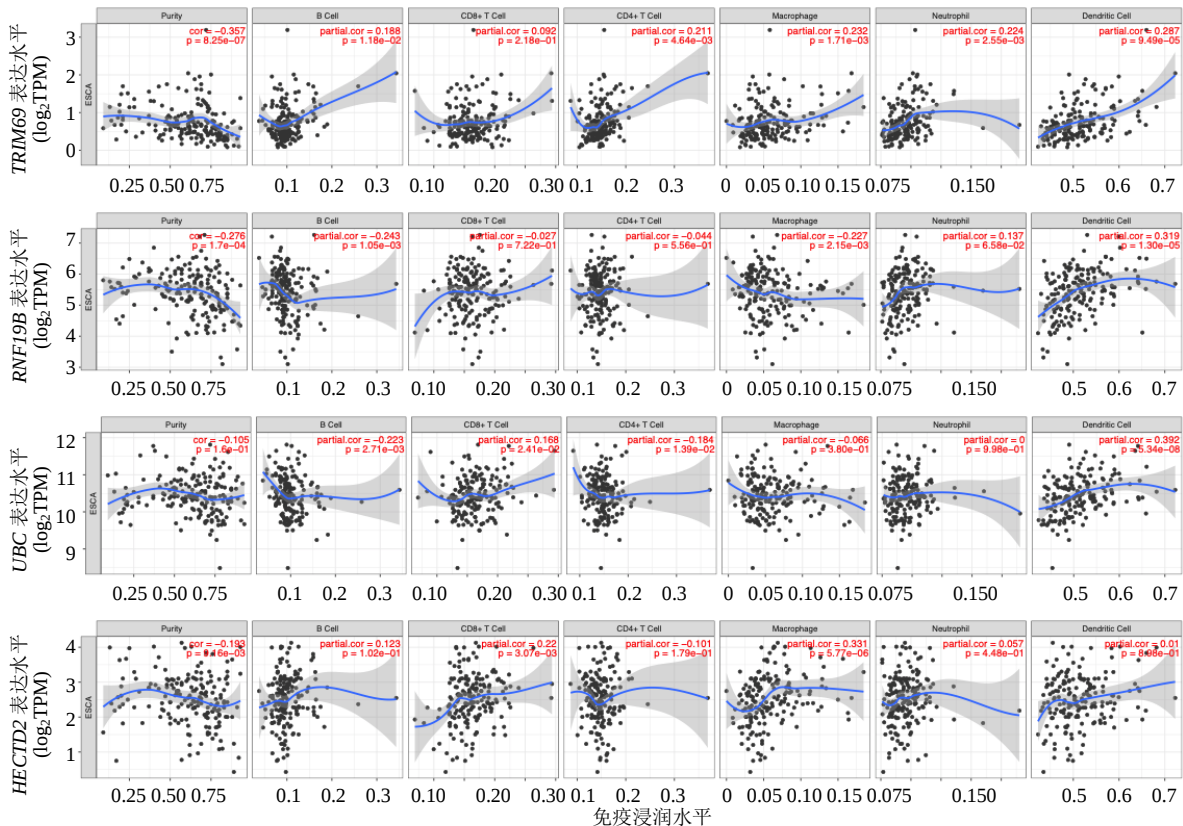


图 6 关键模块内基因表达与免疫浸润水平的相关性

Fig. 6 Correlation between gene expression in key modules and level of immune infiltration

DEGs 进行 KEGG 和 GO 分析, 确定了这些差异基因影响了内质网中的蛋白质加工、胰岛素抵抗、基因复制、细胞周期、GTP 酶结合和单链 DNA 结合等功能。基因复制和细胞周期相关基因下调, 提示根皮苷可能影响 KYSE450 细胞的复制过程, 具有抑制食管癌细胞生长的潜力。既往研究也发现根皮苷能够抑制皮肤癌细胞^[16]、肝癌细胞^[17]、乳腺癌细胞^[18-19]等的增殖和凋亡。

同时, 本研究还构建了 PPI 网络研究 DEGs 的相互作用情况, 核心模块 1 中, *MIB2* 高表达是食管癌不良预后因素, *MIB2* 可介导 Notch 信号通路中蛋白的泛素化, 并且能够作为黑色素瘤侵袭的抑制剂^[20]。Sahar 等^[21]研究发现, *MIB2* 在子宫平滑肌瘤中表达上调, 提示 *MIB2* 能够作为子宫平滑肌瘤治疗的潜在靶标, *MIB2* 在食管癌中研究甚少, 需要进一步探索。对核心模块 1 内部的基因进行功能挖掘, 发现细胞外基质强度结构成分、金属羧肽酶活性和细胞色素 C 氧化酶活性等功能受到了影响; 细胞色素 C 氧化酶作用失调被认为是癌症、糖尿病等的致病和进展因素之一^[22], 细胞色素 C 氧化酶相关基因在结直肠癌^[23]、肺腺癌^[24]和黑色素瘤^[25]中具有差异表达, 并具有一定的潜在治疗价值, 提示细胞色素 C 氧化酶相关功能的活性可能是食管癌进展的潜在生物标志物。

核心模块 1 中的基因能够影响食管癌的免疫微环境。本研究发现 *RNF19B*、*TRIM69*、*UBC* 和 *HECTD2* 对食管癌肿瘤组织浸润的细胞类型和肿瘤纯度均有影响。树突状细胞 (DC 细胞) 是抗原呈递细胞, 包含多种亚型, 可以驻留在器官中或在淋巴器官和非淋巴器官之间迁移。Sadeghzadeh 等^[26]认为 DC 细胞是刺激抗肿瘤免疫中的最关键的部分; 大量研究显示, DC 细胞及其衍生物能够应用于抗癌治疗^[27-30]。这些结果表明, 根皮苷治疗可能改变食管癌所处的免疫微环境, 进而影响食管癌的发展进程。

综上所述, 本研究发现根皮苷能够改变 KYSE450 细胞的表达谱, 影响 KYSE450 细胞的复制、细胞色素 C 氧化酶活性等与癌症进展关联密切的功能, 并影响食管癌免疫微环境。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Cao W, Chen H D, Yu Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary

analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J: Engl*, 2021, 134(7): 783-791.

- [2] Cook M B, Kamangar F, Whitman D C, et al. Cigarette smoking and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction: A pooled analysis from the international BEACON consortium [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(17): 1344-1353.
- [3] Pandeya N, Williams G, Green A C, et al. Alcohol consumption and the risks of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(4): 1215-1224.
- [4] Cook M B, Corley D A, Murray L J, et al. Gastroesophageal reflux in relation to adenocarcinomas of the esophagus: A pooled analysis from the Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium (BEACON) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103508.
- [5] Song Y M, Li L, Ou Y W, et al. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer [J]. *Nature*, 2014, 509(7498): 91-95.
- [6] Lin D C, Hao J J, Nagata Y, et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(5): 467-473.
- [7] Gao Y B, Chen Z L, Li J G, et al. Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(10): 1097-1102.
- [8] McNamara M J, Rybicki L A, Sohal D, et al. The relationship between pathologic nodal disease and residual tumor viability after induction chemotherapy in patients with locally advanced esophageal adenocarcinoma receiving a tri-modality regimen [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2016, 7(2): 196-205.
- [9] Allum W H, Stenning S P, Bancewicz J, et al. Long-term results of a randomized trial of surgery with or without preoperative chemotherapy in esophageal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(30): 5062-5067.
- [10] Skinner H D, Lee J H, Bhutani M S, et al. A validated miRNA profile predicts response to therapy in esophageal adenocarcinoma [J]. *Cancer*, 2014, 120(23): 3635-3641.
- [11] Nelson J A, Falk R E. The efficacy of phloridzin and phloretin on tumor cell growth [J]. *Anticancer Res*, 1993, 13(6A): 2287-2292.
- [12] Chen Y, Liu J, Geng S, et al. Lipase-catalyzed synthesis mechanism of tri-acetylated phloridzin and its antiproliferative activity against HepG2 cancer cells [J]. *Food Chem*, 2019, 277: 186-194.
- [13] Un H, Ugan R A, Gurbuz M A, et al. Phloretin and phloridzin guard against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through inhibiting oxidative stress and

- inflammation [J]. *Life Sci*, 2021, 266: 118869.
- [14] Jia Z X, Xie Y N, Wu H J, *et al.* Phlorizin from sweet tea inhibits the progress of esophageal cancer by antagonizing the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2021, 46: 137.
- [15] Koeppel F, Bobard A, Lefebvre C, *et al.* Added value of whole-exome and transcriptome sequencing for clinical molecular screenings of advanced cancer patients with solid tumors [J]. *Cancer J*, 2018, 24(4): 153-162.
- [16] Mantso T, Trafalis D, Botaitis S, *et al.* Novel docosahexaenoic acid ester of phloridzin inhibits proliferation and triggers apoptosis in an *in vitro* model of skin cancer [J]. *Antioxidants*, 2018, 7(12): 188.
- [17] Nair S V, Ziaullah, Rupasinghe H P. Fatty acid esters of phloridzin induce apoptosis of human liver cancer cells through altered gene expression [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107149.
- [18] Fernando W, Coyle K, Marcato P, *et al.* Phloridzin docosahexaenoate, a novel fatty acid ester of a plant polyphenol, inhibits mammary carcinoma cell metastasis [J]. *Cancer Lett*, 2019, 465: 68-81.
- [19] Fernando W, Coombs M R P, Hoskin D W, *et al.* Docosahexaenoic acid-acylated phloridzin, a novel polyphenol fatty acid ester derivative, is cytotoxic to breast cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2016, 37(10): 1004-1013.
- [20] Takeuchi T, Adachi Y, Sonobe H, *et al.* A ubiquitin ligase, skeletrophin, is a negative regulator of melanoma invasion [J]. *Oncogene*, 2006, 25(53): 7059-7069.
- [21] Sahar T, Nigam A, Anjum S, *et al.* Interactome analysis of the differentially expressed proteins in uterine leiomyoma [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2019, 19(10): 1293-1312.
- [22] Arnold S. The power of life—Cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival [J]. *Mitochondrion*, 2012, 12(1): 46-56.
- [23] Hewedi I H, Farid R M, Sidhom K F, *et al.* Differential expression of cytochrome C oxidase subunit I along the colorectal adenoma: Carcinoma progression [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2018, 26(9): 689-696.
- [24] Mishra N, Timilsina U, Ghimire D, *et al.* Downregulation of cytochrome c oxidase subunit 7A1 expression is important in enhancing cell proliferation in adenocarcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 713-719.
- [25] Gandhirajan R K, Rödder K, Bodnar Y, *et al.* Cytochrome C oxidase inhibition and cold plasma-derived oxidants synergize in melanoma cell death induction [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12734.
- [26] Sadeghzadeh M, Bornehdeli S, Mohammadrezakhani H, *et al.* Dendritic cell therapy in cancer treatment; the state-of-the-art [J]. *Life Sci*, 2020, 254: 117580.
- [27] Pitt J M, André F, Amigorena S, *et al.* Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1224-1232.
- [28] Saxena M, Bhardwaj N. Re-emergence of dendritic cell vaccines for cancer treatment [J]. *Trends Cancer*, 2018, 4(2): 119-137.
- [29] Giovanelli P, Sandoval T A, Cubillos-Ruiz J R. Dendritic cell metabolism and function in tumors [J]. *Trends Immunol*, 2019, 40(8): 699-718.
- [30] Li W, Song X, Yu H, *et al.* Dendritic cell-based cancer immunotherapy for pancreatic cancer [J]. *Arab J Gastroenterol*, 2018, 19(1): 1-6.

[责任编辑 李亚楠]