

УДК 577.218

ЛИЗИН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ГИСТОНОВАЯ ДЕМЕТИЛАЗА 1 СПОСОБСТВУЕТ ОНКОГЕНЕЗУ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПИЩЕВОДА ПУТЕМ АКТИВАЦИИ DUSP4

© 2022 J. Han^{1,2#}, S. Ye^{3#}, J. Chen^{1,2}, K. Wang^{1,2}, J. Jin^{1,2}, Z. Zeng^{3*}, S. Xue^{1,2*}

¹ Department of Immunization, Fujian Academy of Medical Sciences, 350003 Fuzhou, Fujian, China; e-mail: fjykyxsj@126.com

² Fujian Institute of Medical Sciences, Fujian Provincial Key Laboratory of Medical Analysis, 350003 Fuzhou, Fujian, China

³ Department of Cardiothoracic Surgery, 900 Hospital of the Joint Logistics Team, 350025 Fuzhou, Fujian, China; e-mail: 13809542597@139.com

Поступила в редакцию 06.05.2021

После доработки 20.10.2021

Принята к публикации 21.11.2021

Плоскоклеточный рак пищевода (ПРП) преобладает среди существующих подтипов рака пищевода (РП) и имеет неблагоприятный прогноз из-за агрессивного характера протекания болезни. Поэтому поиск новых прогностических биомаркеров и терапевтических мишеней при ПРП является актуальной задачей. Лизин-специфическая гистоновая деметилаза 1 (LSD1) играет ключевую роль в регуляции онкогенеза ПРП. Тем не менее на текущий момент подробный механизм регулируемого LSD1 развития ПРП не установлен. Настоящее исследование направлено на изучение молекулярного механизма, лежащего в основе онкогенеза ПРП, регулируемого LSD1. Путем секвенирования транскриптома на фоне сайленсинга гена *LSD1* мы обнаружили дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) в линии клеток ПРП человека TE-1. Далее мы исследовали паттерны экспрессии выбранных молекул в тканях и клеточных линиях ПРП с помощью RT-qPCR и вестерн-блоттинга. Кроме того, мы исследовали роль выбранных молекул в развитии ПРП с помощью сайленсинга и анализа сверхэкспрессии генов. Секвенирование транскриптома показало, что экспрессия фосфатазы 4 с двойной специфичностью (DUSP4) в TE-1 была значительно снижена после подавления экспрессии LSD1. Кроме того, уровень экспрессии мРНК DUSP4 был значительно выше в тканях ПРП, в особенности полученных от пациентов с инвазией или метастазами. Более того, экспрессия DUSP4 положительно коррелировала с экспрессией LSD1 в тканях ПРП. Сверхэкспрессия DUSP4 способствовала пролиферации, инвазии и миграции клеток ПРП, тогда как сайленсинг гена *DUSP4* имел противоположный эффект. Сверхэкспрессия DUSP4 также способствовала онкогенности клеток ПРП *in vivo*, в то время как подавление экспрессии DUSP4 ингибировало рост опухоли. Важно отметить, что подавление пролиферации, инвазии и миграции клеток ингибитором LSD1 (ZY0511) обращалось при сверхэкспрессии DUSP4. Таким образом, мы обнаружили, что LSD1 способствует онкогенезу ПРП, активируя DUSP4, которая является потенциальной терапевтической и диагностической мишенью при ПРП.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фосфатаза 4 с двойной специфичностью, плоскоклеточный рак пищевода, лизин-специфическая гистоновая деметилаза 1.

DOI: 10.31857/S0320972522010079

ВВЕДЕНИЕ

Рак пищевода (РП) занимает 8-е место среди наиболее распространенных злокачественных новообразований и является одним из основных видов опухолей желудочно-кишечного тракта. Данный вид рака характеризуется в основном

высокой инвазивностью и плохим клиническим прогнозом, что представляет серьезную угрозу для здоровья людей [1, 2]. Плоскоклеточный рак пищевода (ПРП) является основным подтипом РП. Из-за его злокачественности, в частности высокой инвазивности и уровня метастазирования в лимфатические узлы, протекание ПРП зачастую приводит к плохому клиническому исходу [3]. Следовательно, основным направлением онкологических исследований у пациентов с ПРП является повышение терапевтической эффективности и улучшение прогноза болезни.

Лизин-специфическая гистоновая деметилаза 1 (LSD1) представляет собой ядерную гистоновую деметилазу, которая является членом семейства аминоксидаз (АО). LSD1 — флавин-

Принятые сокращения: ССК-8 — набор для подсчета клеток 8; ДЭГ — дифференциально экспрессируемые гены; DUSP4 — фосфатаза 4 с двойной специфичностью; РП — рак пищевода; ПРП — плоскоклеточный рак пищевода; H3K4me2 — гистон H3 с диметилированным лизинном в четвертом положении; LSD1 — лизин-специфическая гистоновая деметилаза 1.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

содержащая АО, которая катализирует деметилирование гистона H3 по лизину в 4-м положении посредством ФАД-зависимого окисления. LSD1 участвует в эмбриональной дифференцировке, пролиферации плюрипотентных стволовых клеток и развитии ВИЧ-инфекции [4–6]. Известно, что экспрессия LSD1 повышается в различных раковых тканях и вносит большой вклад в онкогенез множества опухолей [7–10]. Более того, экспрессия LSD1 при ПРП и ее влияние на пролиферацию, инвазию и миграцию клеток ПРП описаны во многих исследованиях. Yu et al. выявили, что экспрессия LSD1 повышалась в тканях ПРП, что, в свою очередь, ассоциировалось с метастазированием в лимфатические узлы и плохой выживаемостью [11]. Исследование *in vitro* также показало, что регуляция экспрессии LSD1 в инвазивных клеточных линиях ПРП нарушена, а подавление экспрессии и фармакологическое ингибирование LSD1 ассоциированы со снижением миграции и инвазии клеток ПРП [11]. Проведенные ранее исследования также подтвердили подавляющее действие ингибитора LSD1 на рост клеток, а также индуцирование им апоптоза в клетках ПРП [12, 13]. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях [14, 15]. Если объединить все полученные результаты, становится очевидно, что действие LSD1 имеет важное значение в диагностике и лечении ПРП. Hou et al. показали, что LSD1 положительно регулирует передачу сигналов в путях Notch и PI3K/Akt/mTOR за счет связывания с промоторными областями соответствующих генов пути Notch в клетках ПРП [16]. Однако в вышеупомянутом исследовании не обсуждалась подробно роль сигнальных путей, регулируемых LSD1, при онкогенезе ПРП. Следовательно, детальный механизм регулируемого LSD1 развития ПРП остается неясным.

В настоящем исследовании путем сайленсинга *LSD1* в клеточной линии ПРП TE-1 мы обнаружили при помощи секвенирования транскриптома, что уровень экспрессии фосфатазы 4 двойной специфичности (DUSP4) был значительно снижен. Кроме того, была подтверждена сверхэкспрессия DUSP4 в опухолевых тканях и ее влияние на пролиферацию, функцию и онкогенность клеток ПРП. Также была подтверждена способность DUSP4 компенсировать ингибирование LSD1. Таким образом, наше исследование предоставляет первые доказательства, демонстрирующие, что LSD1 способствует развитию ПРП, вероятно, посредством нижестоящих сигналов, что улучшает наше понимание процесса LSD1-регулируемого развития ПРП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии и культуры. Линия нормальных эпителиальных клеток пищевода человека Het-1A и линии ПРП, TE-1, TE-13 и KYSE-450, были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, American Type Culture Collection). Het-1A инкубировали в бессывороточной среде для кератиноцитов (Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM), «Invitrogen», США). TE-1, TE-13 и KYSE-450 инкубировали в среде RPMI-1640 («Invitrogen») с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Invitrogen»). Все клетки культивировали в увлажненной атмосфере при 37 °C с 5%-ным CO₂. Для обработки клеток TE-1 был использован новый ингибитор LSD1, ZY0511 (предоставленный Государственной лабораторией биотерапии, Сычуаньский университет, Сычуань, Китай), в концентрации 2 мкМ [17, 18].

Клинические образцы тканей. В общей сложности 43 пары образцов ПРП и прилегающих доброкачественных тканей были получены путем хирургической резекции в больнице провинции Фуцзянь (Фучжоу, Фуцзянь, Китай) с письменного информированного согласия пациентов, среди которых было 28 мужчин и 15 женщин. До операции пациенты не получали ни химиотерапию, ни лучевую терапию. Все образцы тканей были гистопатологически исследованы тремя независимыми патологами. Образцы свежих тканей замораживали в жидком азоте и до использования хранили при температуре –80 °C. Все пациенты дали согласие на данное исследование в соответствии с установленными больницей этическими нормами. Данное исследование было рассмотрено и одобрено Экспертным советом больницы провинции Фуцзянь [No. (DL) 2019-01]. Все клинические исследования проводились в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации.

Трансфекция миРНК. Контрольные малые интерферирующие РНК (миРНК, siRNA) и миРНК к LSD1 и к DUSP4 человека были приобретены в компании «Invitrogen». Целевые последовательности были следующими:

Контроль, 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',
LSD1, 5'-CCGGAUGACUUCUCAAGAATT-3';

Контроль, 5'-CCCATCCTTCAACGAGCAT-3',
DUSP4, 5'-CCCAGTACCTTACCAGCAT-3'.

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах, а затем трансфицировали миРНК (100 пмоль/лунку) с использованием реагента RNAiMAX

(«Invitrogen») в соответствии с протоколом производителя. Через 48 ч проводили определения уровней эндогенного LSD1 или DUSP4 с помощью qRT-PCR.

Конструирование и трансфекция векторов. Экспрессионный вектор DUSP4 (pCMV-мус-DUSP4) был получен в лаборатории «BioVector Science» (Пекин, Китай). Вектор стабильно экспрессировался в клетках TE-1. В качестве отрицательного контроля использовали pCMV-мус-control. Трансфекцию выполняли с помощью липофектамина 3000 («Invitrogen») в соответствии с протоколом производителя. Экспрессию DUSP4 оценивали с помощью qRT-PCR.

Секвенирование РНК. Тотальную РНК получали из приблизительно 5 млн клеток TE-1 с сайленсингом *LSD1* и из контрольных клеток с использованием тризола («Ambion», США) в соответствии с инструкциями производителя. Затем тотальную РНК (2 мкг) использовали для приготовления библиотеки RNA-seq с использованием набора «NEBNext Ultra™ RNA Library Prep Kit» («Illumina», США) в соответствии с протоколом производителя. Образцы из библиотеки секвенировали на платформе Illumina HiSeq 4000 с длиной парноконцевых прочтений 150 нуклеотидов (2 × 150). «Сырые данные» в формате FASTQ обрабатывали с помощью собственных скриптов на Perl. Прочтения выравнивали на геном человека (сборка GRCh38) с использованием TopHat 2 (версия 2.1.0). Уровни экспрессии генов (FPKM, количество фрагментов на килобазу транскрипта на миллион картированных прочтений) рассчитывали с помощью HTSeq (версия 0.5.4 r3). Все последующие статистические анализы, включая PCA (анализ главных компонентов), были выполнены с помощью программного пакета edgeR.

Вестерн-блоттинг. Цельноклеточные лизаты клеток, обработанные как указано выше, были отобраны из 6-луночных планшетов. Лизаты разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата (SDS-PAAG), затем переносили на мембраны из поливинилиденфторида, которые инкубировали с антителами к LSD1 (# 2139), DUSP4 (# 5149), диметилированного по лизину 4 гистона H3 (H3K4me2, # 9725) и GAPDH (# 5174) («Cell Signaling Technology», США). Вторичные антитела, связанные с пероксидазой хрена (# 3999), использовали для визуализации иммунореактивности с использованием системы хемилюминесценции Amersham Image 600 («General Electric», США).

Количественный анализ методом ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Тотальную РНК экстрагировали и очищали с использованием

тризола. Синтез кДНК и qRT-PCR были проведены по ранее описанному протоколу [19]. Последовательности праймеров для qRT-PCR были следующими:

LSD1, 5'-CCAGAGATATTACTGCCGAGTT-3' (смысловой праймер) и 5'-GCTTTCCTTGTGTTTCAGCTAA-3' (антисмысловой праймер);

DUSP4, 5'-CTACATCCTAGGTTCCGGTCAAC-3' (смысловой праймер) и 5'-TAGACGATGACC-GCCGAGTA-3' (антисмысловой праймер);

β-актин, 5'-GGGAAATCGTGCGTGACATTAAG-3' (смысловой праймер) и 5'-TGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3' (антисмысловой праймер).

Относительную экспрессию рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

qRT-PCR выполняли с использованием набора «SYBR Premix Ex Taq™» («Takara», Япония) и системы ПЦР ABI7500 («Applied Biosystems», США).

Измерение жизнеспособности клеток. Для оценки пролиферации клеток использовали набор для подсчета клеток 8 (ССК-8). Для этого обработанные указанным выше образом клетки помещали в 96-луночные планшеты (2000 клеток/луночку). По истечении указанного времени обработанные клетки инкубировали с 10 мкл реагента ССК-8 («Dojindo», Япония). После 2-часовой инкубации измеряли оптическую плотность с помощью ридера Varioskan Flash («Thermo Fisher Scientific») при длине волны 450 нм (OD450).

Анализ способности клеток к инвазии. Способность клеток TE-1 к инвазии оценивали с помощью миграционного анализа в Transwell-системе. Для этого клетки, суспендированные в бессывороточной питательной среде DMEM с добавлением 1 мг/мл митомицина С (ингибитора пролиферации клеток) и ZY0511 (добавленного в соответствии с планом эксперимента), высевали в верхнюю камеру Transwell-системы. В нижнюю камеру добавляли среду DMEM, содержащую 20% FBS. После 36-часовой инкубации клетки, мигрировавшие в нижнюю часть системы, фиксировали, затем окрашивали 1%-ным кристаллическим фиолетовым и фотографировали. Степень инвазии измеряли путем подсчета числа окрашенных клеток.

Анализ миграционной активности клеток. Способность клеток TE-1 к миграции измеряли с помощью скретч-теста. Для этого клетки высевали в 12-луночные планшеты и культивировали до 75%-ного уровня конfluence. Затем создавали царапину на поверхности клеточного монослоя с помощью кончика 200-микро-

литровой пипетки. Для удаления плавающих клеток культуры промывали, а затем прикрепленные клетки инкубировали в среде DMEM, содержащей 1% FBS и ZY0511 (добавленные в соответствии с планом эксперимента). Миграцию клеток в область царапины определяли через 36 ч для каждой группы. Площадь царапины рассчитывали с помощью программы ImageJ.

Эксперименты с использованием животных. Самцы бестимусной линии мышей BALB/c nude возрастом 4–5 недель (весом 20–22,5 г) были предоставлены Центром животных «Gem Pharmatech Co., Ltd.» (Нанкин, Китай). Клетки, трансфицированные DUSP4-миРНК, вектором DUSP4, и соответствующие контрольные клетки линии TE-1 инокулировали подкожно на вентральную сторону правого ребра; плотность инокуляции составляла 5×10^6 клеток на мышь (6 мышей на группу). Чтобы проследить рост опухоли, объем опухоли измеряли каждые три дня у всех мышей. Для определения объема опухоли самый маленький диаметр (А) и самый большой диаметр (В) измеряли штангенциркулем. Объем (V) рассчитывали по формуле $V = (A^2 \times B) / 2$. Через 30 дней всех мышей анестезировали изофлураном (2%, ингаляционная анестезия), а затем умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Все мыши считались мертвыми после остановки сердца и дыхания. Опухоли мышей были удалены и взвешены. Все протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по уходу за животными и их использованию Академии медицинских наук Фуцзянь. Мышей содержали в специальном помещении, свободном от патогенов (specific pathogen-free, SPF) и ограниченном барьером, при температуре 20–30 °С, влажностью 60–80%, кормили SPF-кормом для мышей, вода была доступна *ad libitum*.

Статистическая обработка полученных результатов. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6. Были выполнены следующие тесты: Т-критерий Вилкоксона, односторонний тест ANOVA или *t*-критерий Стьюдента (в соответствующих случаях). Тест Бонферрони применялся для апостериорного множественного сравнения. Для анализа корреляций применяли метод Пирсона и критерий хи-квадрат Пирсона. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

LSD1 способствует экспрессии DUSP4 в клетках ПРП. Для исследования механизмов LSD1-

регулируемого канцерогенеза при ПРП мы анализировали глобальную экспрессию в клетках TE-1 в условиях сайленсинга *LSD1*. Для анализа клеток TE-1, трансфицированных контрольной и миРНК-LSD1, использовали RNA-seq (рис. 1, *a*). Транскриптомный анализ выявил большое количество дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) (рис. 1, *a* и *b*). По сравнению с контролем в клетках TE-1, трансфицированных миРНК-LSD1, было обнаружено 439 генов с повышенной и 69 генов – с пониженной экспрессией (рис. 1, *b*).

Следует отметить, что мы обнаружили значительное снижение экспрессии DUSP4 в клетках с сайленсингом *LSD1* (рис. 1, *c* и табл. 1). Снижение экспрессии DUSP4 в клетках TE-1 с сайленсингом *LSD1* было подтверждено при помощи анализа вестерн-блот и qRT-PCR (рис. 1, *d*). Кроме того, в присутствии ингибитора LSD1, ZY0511, экспрессия LSD1 не изменилась, однако экспрессия DUSP4 значительно снизилась (рис. 1, *e*). Предыдущие исследования показали, что деметилирование H3K4me2 может быть использовано для определения активности LSD1 [20, 21]. Отмечено, что ZY0511 приводит к повышению уровня H3K4me2 (рис. 1, *e*), что указывает на надежность экспериментальной системы. В целом, данные результаты продемонстрировали ингибирующий эффект LSD1 на экспрессию DUSP4 в клетках ПРП.

Сверхэкспрессия DUSP4 в образцах ПРП. Уровни DUSP4 в 43 парах тканей ПРП и соседних доброкачественных определяли с помощью qRT-PCR. На рис. 2, *a* продемонстрирована значительная сверхэкспрессия DUSP4 в образцах ткани ПРП по сравнению с расположенными рядом доброкачественными тканями. Анализ корреляции между уровнями DUSP4 и клинико-патологическими характеристиками пациентов с ПРП показал, что высокий уровень экспрессии DUSP4 положительно коррелировал с размером опухоли при ПРП и патологической стадией T/N (табл. 2). Более того, 18 образцов ПРП с метастазами характеризовались более высокой экспрессией DUSP4, чем 25 нематастатических образцов ПРП (рис. 2, *b*). Кроме того, по сравнению с 21 образцом ПРП диаметром менее 3 см, 22 образца ПРП диаметром более 3 см характеризовались более высокой экспрессией DUSP4 (рис. 2, *c*). Важно отметить, что корреляционный анализ между уровнями DUSP4 и LSD1 в тканях ПРП показал, что уровни экспрессии DUSP4 были положительно ассоциированы с уровнем экспрессии LSD1 в тканях ПРП ($r = 0,8996$, $p < 0,0001$) (рис. 2, *d*), что свидетельствует о положительном эффекте LSD1 на

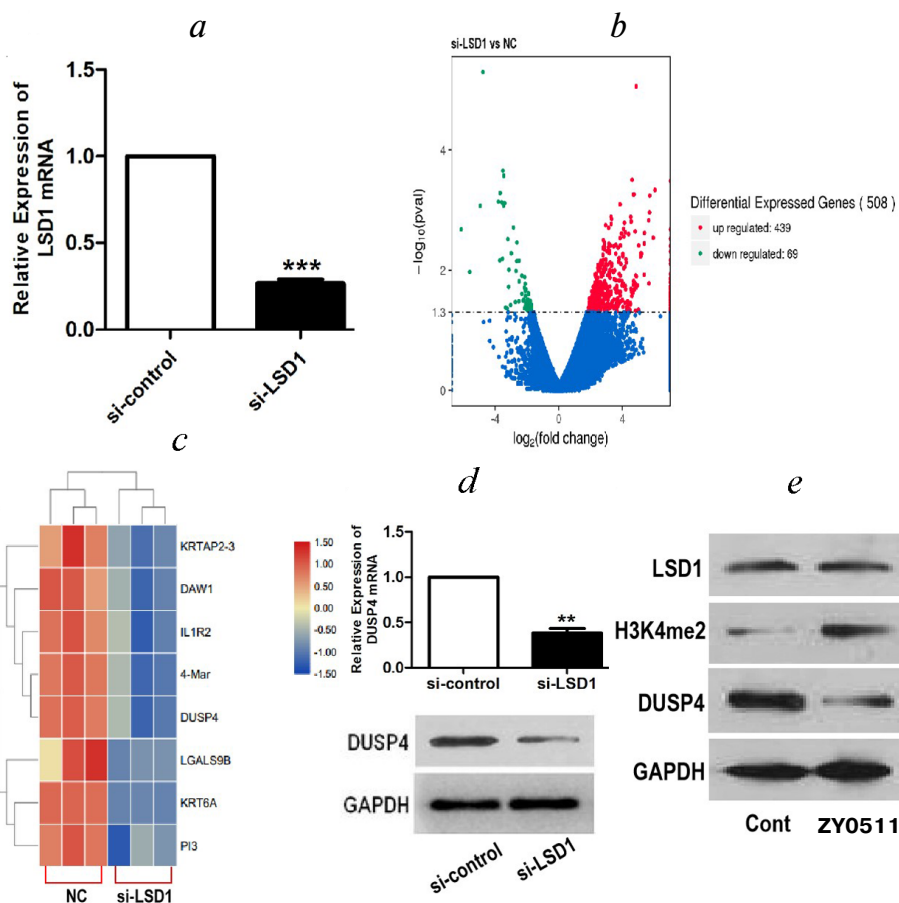


Рис. 1. LSD1 способствует экспрессии DUSP4 в клетках ПП. *a* – Уровни мРНК LSD1 в клетках TE-1, трансфицированных указанными миРНК, через 48 часов после трансфекции. *b* – Диаграмма Volcano, представляющая анализ дифференциальной экспрессии 508 генов, основанный на результатах секвенирования РНК клеток TE-1, трансфицированных миРНК-контролем и миРНК-LSD1 ($n = 3$ в каждой группе). По оси X показано изменение в логарифмическом масштабе (\log_2), по оси Y – отрицательный логарифм значения p (\log_{10}). Каждый ген представлен одной точкой на графике; красные точки – повышенная экспрессия (439 генов), зеленые – пониженная (69 генов). *c* – Тепловая карта, представляющая анализ дифференциальной экспрессии нескольких репрезентативных генов между клетками TE-1, трансфицированными миРНК-контролем и миРНК-LSD1 ($n = 3$ в каждой группе). *d* – Уровни мРНК или белка DUSP4 в клетках TE-1, трансфицированных миРНК-контролем и миРНК-LSD1. *e* – После обработки 2 мкМ ZY0511 или без нее через 48 ч оценивали уровни белка LSD1, H3K4me2 и DUSP4 с помощью вестерн-блоттинга. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего трех независимых экспериментов. *** $p < 0,001$ по t -критерию Стьюдента. Примечание: NC – клетки, трансфицированные миРНК-контролем (si-control); Cont – контрольная группа, ZY0511 – в присутствии ингибитора LSD1

экспрессию DUSP4 *in vivo*. Кроме того, были определены уровни экспрессии мРНК DUSP4 и белков LSD1, DUSP4 и H3K4me2 в нормальной эпителиальной линии клеток пищевода Het-1A и клеточных линиях ПП: TE-1, TE-13 и KYSE-450. Как показано на рис. 2, *e–i*, LSD1 и DUSP4 были значительно сверхэкспрессированы в клеточных линиях ПП. Тем не менее изменение уровня экспрессии H3K4me2 было противоположным таковому для LSD1 (рис. 2, *f–i*), что указывает на деметилирование H3K4me2 в клеточных линиях ПП, что подтверждает функцию LSD1. Примечательно, что уровни DUSP4 были самыми высокими в линии

агрессивных раковых клеток KYSE-450 (рис. 2, *f–i*), что доказывает вклад DUSP4 в злокачественность ПП.

Сверхэкспрессия DUSP4 способствует пролиферации, инвазии и миграции клеток ПП, тогда как нокаун DUSP4 имеет противоположный эффект. Чтобы исследовать роль DUSP4 в онкогенезе ПП, мы активировали или ингибировали экспрессию DUSP4 путем трансфекции клеток TE-1 вектором, кодирующим DUSP4 (DUSP4-вектор) или миРНК-DUSP4 соответственно (рис. 3, *a*). Анализ ССК-8 показал, что сверхэкспрессия DUSP4 усиливала пролиферацию клеток TE-1 (рис. 3, *b*). Кроме того, результаты ана-

Таблица 1. Репрезентативные ДЭГ при анализе транскриптома (число прочтений)

Группа	si-Cont-1	si-Cont-2	si-Cont-3	si-LSD1-1	si-LSD1-2	si-LSD1-3	log ₂ (FC)	Значение <i>p</i>
Гены со сниженной экспрессией								
<i>DUSP4</i>	3360	2597	2840	232	307	585	-3,407	0,000771
<i>KRTAP2-3</i>	118	69	57	4	8	12	-3,8013	0,000728
<i>DAW1</i>	252	151	250	11	21	38	-3,6926	0,000521
<i>IL1R2</i>	302	196	232	12	24	50	-3,595	0,000744
<i>MARCHF4</i>	648	522	524	36	54	125	-3,4751	0,000845
<i>KRT6A</i>	1911	1707	1824	84	80	72	-4,7817	5,10E-06
<i>PI3</i>	988	710	658	109	82	31	-3,5168	0,000222
Гены с повышенной экспрессией								
<i>AGXT</i>	1	3	7	120	51	50	4,2234	0,020883
<i>VTCN1</i>	4	6	10	116	394	274	4,8795	8,79E-06
<i>TRANK1</i>	2	10	17	42	119	214	3,1454	0,001990
<i>FOXN1</i>	1	2	1	32	37	19	4,2008	0,002346
<i>ZCCHC12</i>	6	22	19	191	271	105	3,3335	0,001416

Примечание. log₂ (FC, Fold Change) – изменение в логарифмическом масштабе по основанию 2; si-Cont – клетки, трансфицированные миРНК-контролем; si-LSD1 – клетки, трансфицированные миРНК-LSD1.

лиза миграции в Transwell-системе показали, что сверхэкспрессия DUSP4 увеличивает количество инвазивных клеток. Скретч-тест показал, что сверхэкспрессия DUSP4 приводит к увеличению числа мигрирующих клеток (рис. 3, *c–f*). Нокдаун DUSP4 дает противоположные результаты (рис. 3, *b–f*). В целом, DUSP4 играет значительную роль в усилении пролиферации, инвазии и миграции клеток ПРП. Также мы проводили сайленсинг *DUSP4* в клеточной линии ПРП KYSE-450 посредством трансфекции миРНК (рис. S1, *a* в Приложении). Как показано на рис. S1, *b–f* в Приложении, клетки KYSE-450 с сайленсингом DUSP4 демонстрируют более низкий уровень пролиферации, инвазии и миграции, что дополнительно подтверждает результаты, представленные выше.

Сверхэкспрессия DUSP4 способствует онкогенности клеток ПРП, в то время как сайленсинг DUSP4 имеет обратный эффект. Влияние DUSP4 на онкогенность клеток ПРП также исследовали *in vivo*. Как показано на рис. 4, *a* и *b*, активацию или ингибирование экспрессии DUSP4 оценивали путем определения уровней мРНК или белка. Примечательно, что размеры и масса опухолей, сформированных DUSP4-сверхэкспрессирующими TE-1 клетками у мышей линии *nude*, были значительно больше, чем у мышей, инокулированных соответствующими контрольными TE-1 клетками (рис. 4, *c* и *e*). Кроме того, увеличение объема опухоли у мышей *nude*, инокулированных TE-1 со сверхэкспрессией

Таблица 2. Корреляция между DUSP4 и клинико-патологическими характеристиками у пациентов с ПРП

Характеристики	Число случаев	Число случаев с соответствующим уровнем DUSP4		Значение <i>p</i>
		низкий	высокий	
Всего	43	21	22	<i>p</i> = 0,2838
Пол				
Мужской	28	12	16	<i>p</i> = 0,2797
Женский	15	9	6	
Возраст				<i>p</i> = 0,0223
≥65	20	8	12	
<65	23	13	10	<i>p</i> = 0,0191
Диаметр опухоли ПРП				
≥3,0 см	22	7	15	<i>p</i> = 0,0075
<3,0 см	21	14	7	
Патологическая стадия (Т)				<i>p</i> = 0,0075
Т2	25	16	9	
Т3-Т4	18	5	13	<i>p</i> = 0,0075
Патологическая стадия (N)				
N0	30	18	12	<i>p</i> = 0,0075
N1-N3	13	3	10	

Примечание. В качестве порогового значения использовали средний уровень экспрессии DUSP4. Значение *p* определяли с помощью критерия хи-квадрат Пирсона.

DUSP4, было более значительным, чем у соответствующей контрольной группы, инокулированной TE-1 (рис. 4, *d*). Тем не менее клетки TE-1 с сайленсингом DUSP4 демонстрировали более слабую онкогенность по сравнению с соответствующими контрольными TE-1, основываясь из вышеупомянутых параметрах (рис. 4, *c–e*). Эти результаты позволяют предположить, что DUSP4 способствует онкогенезу клеток ППП *in vivo*.

Сверхэкспрессия DUSP4 частично восстанавливает уровень пролиферации, инвазии и миграции, которые были снижены ингибитором LSD1 в

клетках ППП. Может ли DUSP4 опосредовать онкогенез ППП, регулируемый LSD1? При применении ZY0511 для ингибирования активности LSD1 было обнаружено, что пролиферация, инвазия и миграция клеток TE-1 значительно снижались, аналогично результатам нокдауна DUSP4 (рис. 5, *a–e*). Сверхэкспрессия DUSP4 в значительной степени обратила ингибирующее влияние ZY0511 на пролиферацию, инвазию и миграцию клеток TE-1 (рис. 5, *a–e*). Полученные результаты позволяют предполагать, что DUSP4 является нижестоящим эффектором при онкогенезе ППП, регулируемом LSD1 *in vitro*.

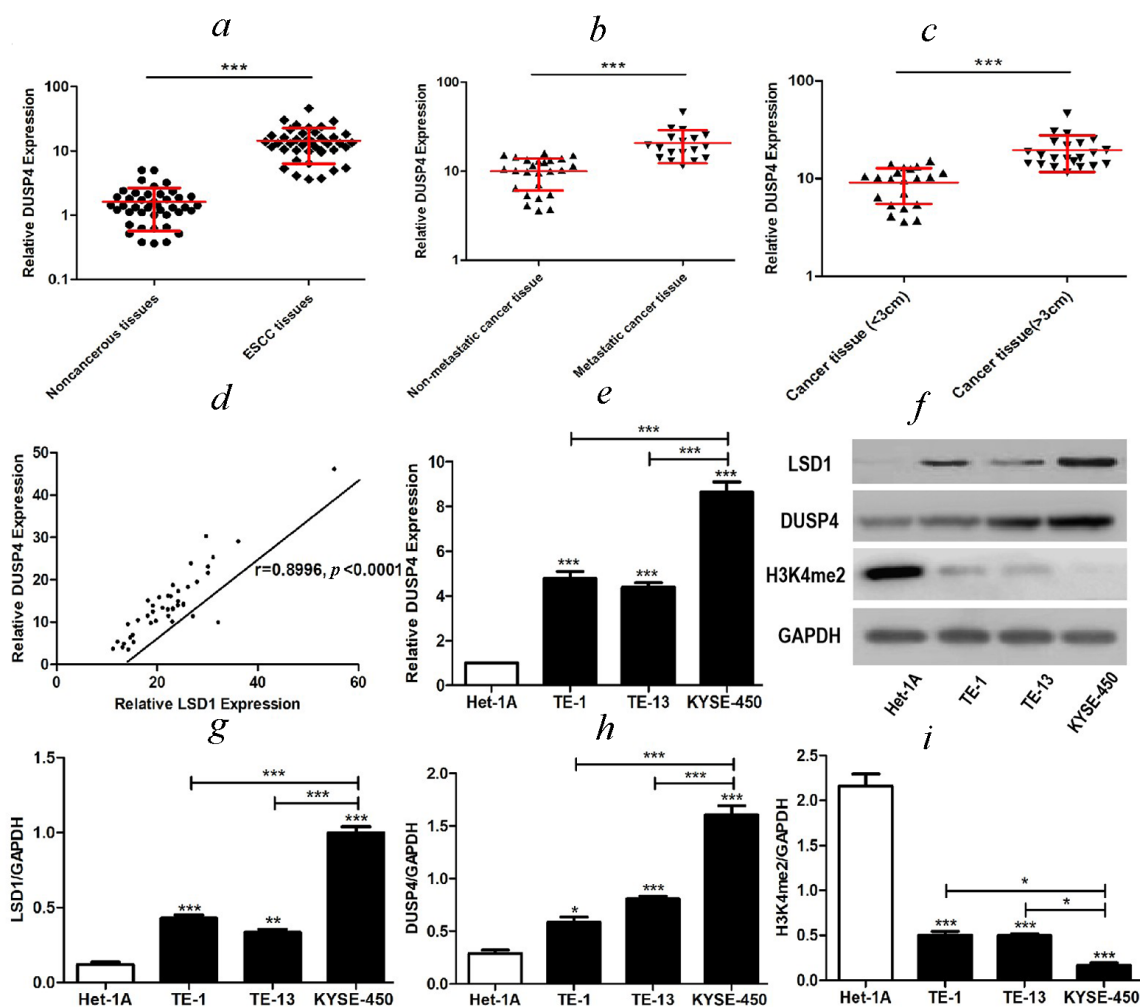


Рис. 2. Экспрессия DUSP4 в образцах ППП (ESCC). *a* – Уровни мРНК DUSP4 в 43 парах тканей ППП и прилегающих доброкачественных. *b* – Уровни мРНК DUSP4 в 18 образцах ППП с метастазами и 25 неметастатических образцах ППП. *c* – Уровни мРНК DUSP4 в 22 образцах ППП диаметром более 3 см и 21 образце ППП диаметром менее 3 см. Результаты *a–c* представлены в виде медианы с межквартильным размахом. *** $p < 0,001$ по критерию Вилкоксона. *d* – Ассоциация между уровнями мРНК LSD1 и DUSP4 в тканях ППП (проанализировано с помощью корреляционного анализа Пирсона, $n = 43, r = 0,8996, p < 0,0001$). *e* – Уровни мРНК DUSP4 в нормальной линии эпителиальных клеток пищевода, Het-1A и клеточных линиях ППП, TE-1, TE-13 и KYSE-450. *f–i* – Уровни белков LSD1, DUSP4 и H3K4me2 в Het-1A, TE-1, TE-13 и KYSE-450 оценивали с помощью вестерн-блоттинга. Результаты *e–i* представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего из трех независимых экспериментов. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по однофакторному анализу ANOVA

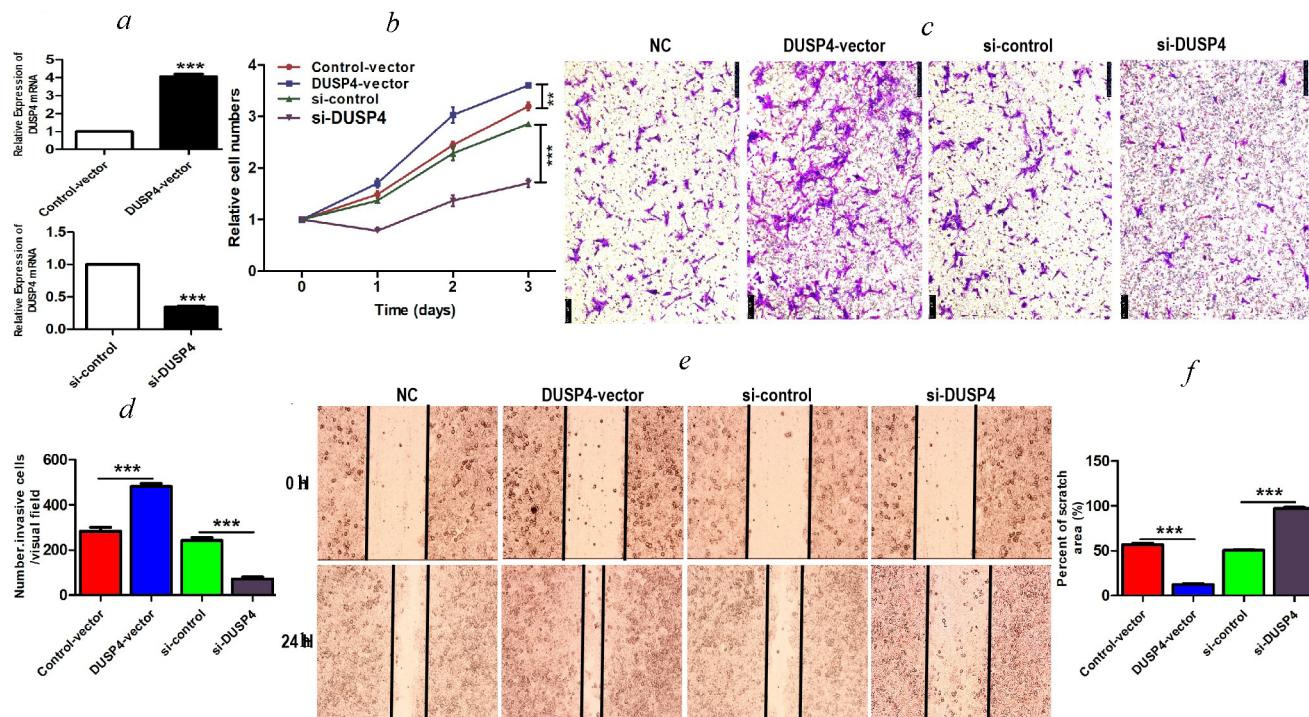


Рис. 3. Сверхэкспрессия DUSP4 способствует пролиферации, инвазии и миграции клеток ПРП, тогда как нокдаун DUSP4 имеет противоположный эффект. *a* – Уровни мРНК DUSP4 в клетках TE-1, трансфицированных указанными миРНК (si-) или плазмидами, через 48 ч. *b* – Пролиферация клеток TE-1, трансфицированных указанными миРНК или плазмидами, оцениваемая с помощью анализа ССК-8. *c, d* – Инвазия клеток TE-1, трансфицированных указанными миРНК или плазмидами, оцениваемая с помощью анализа миграции в Transwell-системе (масштаб 200 мкм). *e* – Миграция клеток TE-1, трансфицированных указанными миРНК или плазмидами, оцениваемая с помощью скретч-тестов. Изображения получали под микроскопом через 0 и 24 часа. *f* – Коэффициенты миграции клеток (24 ч / 0 ч) показаны на гистограмме. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего из трех независимых экспериментов. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по однофакторному анализу ANOVA. Примечание. NC – группа с контрольным вектором; DUSP4 – группа с DUSP4-вектором

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Важность роли LSD1/KDM1A в онкогенезе привлекает большое внимание [7–10]. Примечательно, что все большее количество исследований, касающихся ПРП, также сосредоточивается на LSD1 [11–16]. Проведенные ранее исследования продемонстрировали критическую роль LSD1 в патогенезе ПРП [11–16], однако конкретный механизм LSD1-регуляции возникновения и развития ПРП не был установлен; исследование этого механизма составляет интересную научную проблему.

В условиях сайленсинга *LSD1* с помощью транскриптомного анализа мы обнаружили, что экспрессия *DUSP4* в клетках ПРП также была значительно ингибирована; данный факт подтверждает, что LSD1 положительно регулирует экспрессию *DUSP4* в клетках ПРП. Те же выводы были получены при анализе уровней мРНК и белка. *DUSP4* известен как биологический маркер множества злокачественных опухолей. Этот

белок является членом семейства фосфатаз с двойной специфичностью и может негативно регулировать активность MAP-киназ [22]. Изменения экспрессии *DUSP4* вовлечены в онкогенез множества опухолей. Уровень экспрессии *DUSP4* повышается при карциномах толстой кишки, молочной железы, прямой кишки, печени и поджелудочной железы, поэтому повышение экспрессии *DUSP4* может быть маркером неблагоприятного прогноза при различных злокачественных опухолях [23–26].

Zhang et al. показали, что сангвинарин подавляет рост и инвазию клеток рака желудка посредством ингибирования передачи сигналов *DUSP4* [27]. Xu et al. продемонстрировали, что miR-122-5p ингибирует миграцию и инвазию клеток рака желудка, воздействуя на *DUSP4* [28]. De et al. подтвердили, что высокая экспрессия *DUSP4* ассоциирована со сниженной общей выживаемостью и с клиническими характеристиками, типичными для высокоинвазивного колоректального рака (КРР) [29]. Бо-

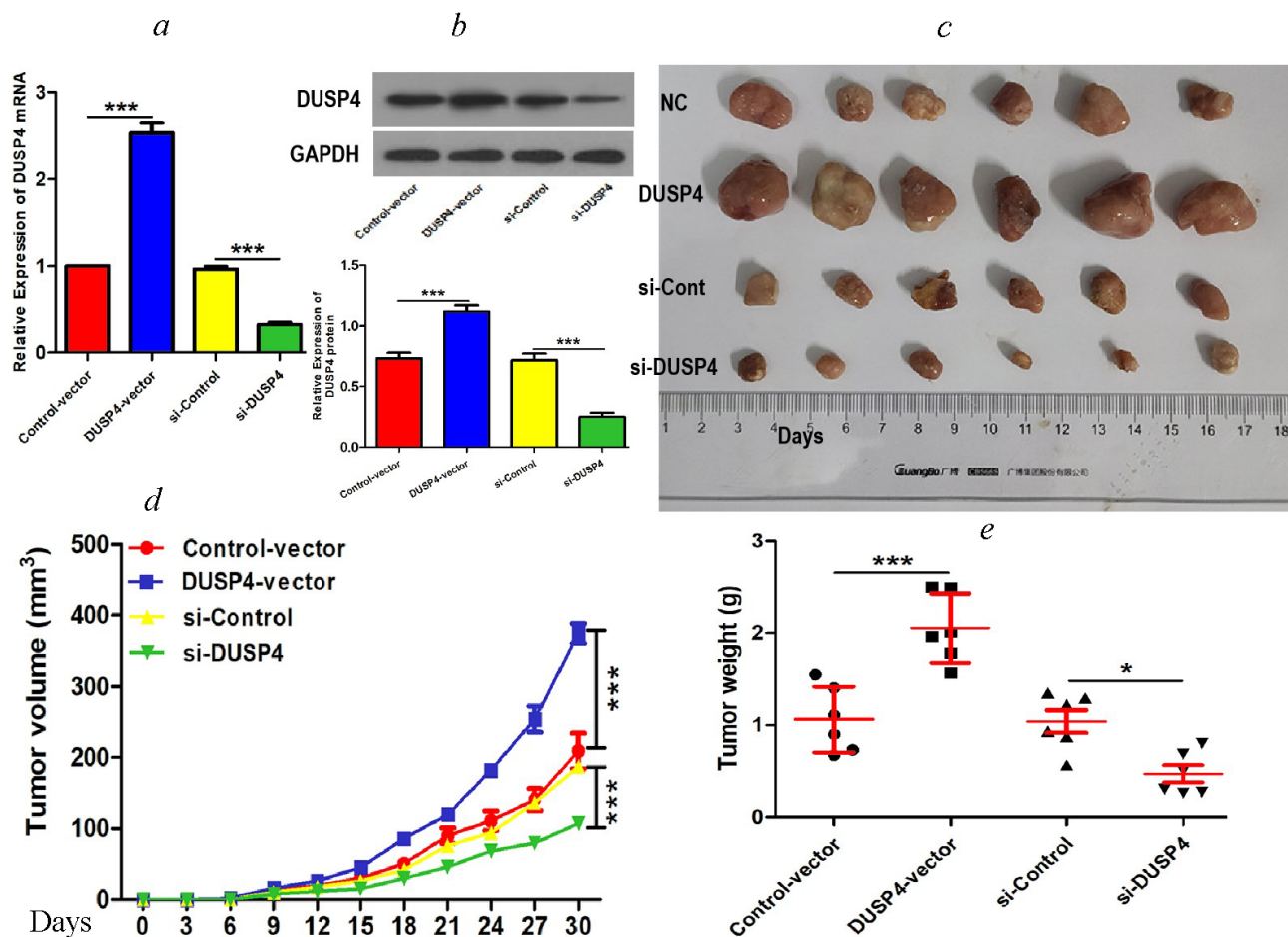


Рис. 4. Сверхэкспрессия DUSP4 способствует онкогенности клеток ППП, в то время как нокдаун DUSP4 имеет противоположный эффект. Трансфицированные вектором DUSP4, трансфицированные миРНК-DUSP4 или соответствующие контрольные клетки ТЕ-1 инокулировали бестимусным мышам. Спустя 30 дней мышей с опухолями умерщвляли, все опухоли удаляли и взвешивали. *a* – Экспрессия мРНК DUSP4 в опухолевых тканях 4 групп мышей, оцениваемая с помощью количественной ПЦР ($n = 6$). *b* – Экспрессия белка DUSP4 в опухолевых тканях из четырех групп мышей, оцениваемая с помощью вестерн-блоттинга ($n = 6$). *c* – Репрезентативные изображения удаленных у мышей опухолей. *d* – Объем опухоли измеряли каждые три дня для каждой мыши и строили кривую роста объема опухоли ($n = 6$). *e* – Сравнение веса опухолей ($n = 6$). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ по однофакторному анализу ANOVA. Примечание. NC – удаленные у мышей опухоли с клетками, трансфицированными контрольным вектором; DUSP4 – удаленные опухоли с клетками, трансфицированными вектором DUSP4

лее того, сверхэкспрессия DUSP4 приводит к повышенной пролиферации клеток линий КРР [23]. Таким образом, становится ясно, что DUSP4 не только активно экспрессируется в различных опухолевых тканях, но также служит промотором роста и распространения некоторых опухолей пищеварительного тракта. Тем не менее публикаций о роли DUSP4 в развитии РП (особенно ППП) не так много. Как и ожидалось, уровень экспрессии DUSP4 был повышен в тканях и клеточных линиях ППП по сравнению с доброкачественными тканями и нормальной линией эпителиальных клеток пищевода. Также следует отметить, что экспрессия DUSP4 в раковых тканях также усиливалась с ростом и метастазированием ППП. Корреляционный анализ

между экспрессией DUSP4 и клинико-патологическими особенностями показал, что повышенная экспрессия DUSP4 ассоциирована с более низкой общей выживаемостью. Соответственно, приведенные выше данные позволяют рассматривать DUSP4 в качестве нового прогностического биомаркера при ППП.

Функциональные анализы *in vitro* и *in vivo* показали, что сверхэкспрессия DUSP4 способствует пролиферации, инвазии, миграции и канцерогенности клеток ППП в моделях на животных. Напротив, нокдаун DUSP4 подавляет пролиферацию, инвазию, миграцию и онкогенность клеток ППП в моделях на животных. Эти результаты предполагают, что DUSP4 может служить потенциальной терапевтической ми-

шению при ПРП. DUSP4 может играть двойную роль в ингибировании и стимулировании канцерогенеза; при этом DUSP4 оказывает положительное влияние на некоторые опухоли пищеварительного тракта. Канцерогенез ПРП, стимулируемый DUSP4, может быть связан с конкретными характеристиками опухоли, что требует дальнейшего исследования. Основываясь на анализе клинических образцов ткани и исследованиях *in vivo*, стоит отметить, что повышенная экспрессия DUSP4 является признаком большего размера опухоли. Хорошо известно, что уровень гипоксии может положительно коррелировать с ростом опухоли. В проведенном ранее исследовании было продемонстрировано, что гипоксия может приводить к ингибированию активности деметилазы, что, в свою очередь, приводит к метилированию генов, что в конечном итоге препятствует экспрессии генов-супрессоров опухоли и способствует росту опухоли [30]. Примечательно, что сверхэкспрессия DUSP4 может предотвращать гибель клеток, вызванную гипоксией/реоксигенацией, за счет активации эндотелиальной синтазы оксида азо-

та (eNOS) [31]. Соответственно, мы предполагаем, что DUSP4 способствует росту опухоли ПРП при гипоксии, что может быть потенциальным механизмом регулируемого DUSP4 онкогенеза при ПРП. Взаимосвязь между экспрессией DUSP4, уровнем гипоксии и онкогенезом при ПРП требует всестороннего и глубокого исследования в будущем.

Мы продемонстрировали стимулирующий эффект LSD1 на экспрессию DUSP4 в ПРП и вклад DUSP4 в рост и развитие ПРП. LSD1 также может играть ключевую роль в патогенезе ПРП посредством DUSP4-сигналинга. Как и ожидалось, ZY0511 ингибировал пролиферацию, инвазию и миграцию клеток ПРП до уровня, аналогичного наблюдаемому при нокдауне DUSP4. Важно отметить, что сверхэкспрессия DUSP4 могла быть обращена ингибирующим действием ZY0511 на вышеуказанные параметры в клетках ПРП. Приведенные выше данные указывают на то, что положительная регуляция DUSP4, по крайней мере частично, опосредует роль LSD1 в патогенезе ПРП. Тем не менее результаты настоящей работы ограничены отсут-

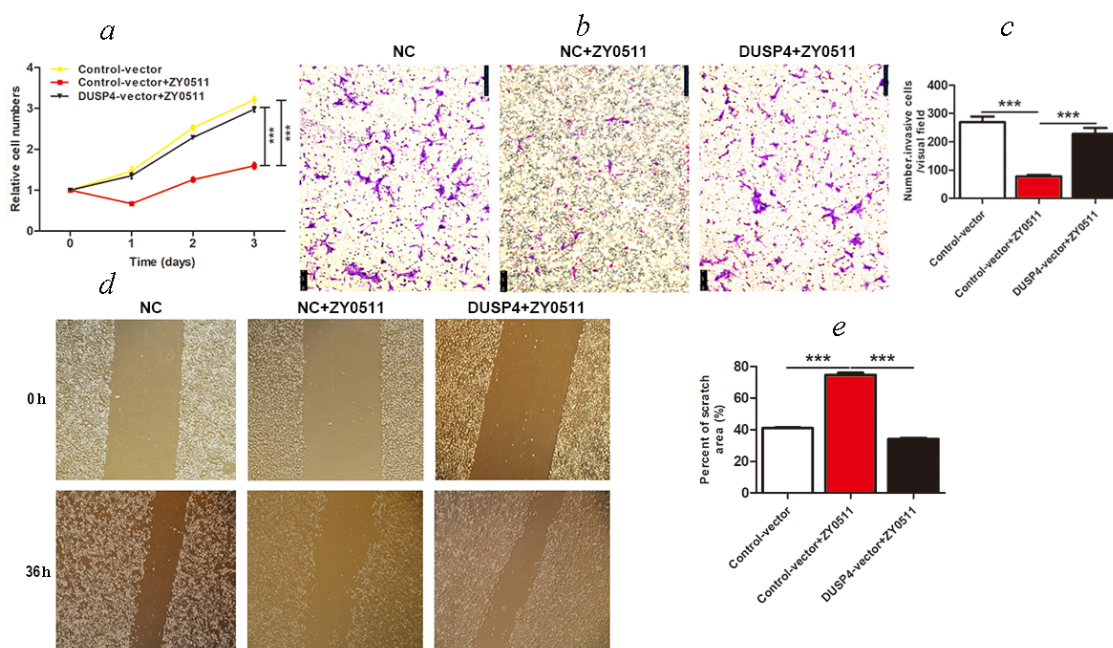


Рис. 5. Сверхэкспрессия DUSP4 обращает ZY0511-ингибирующее действие на пролиферацию, инвазию и миграцию клеток ПРП. *a* – Пролиферация клеток TE-1, трансфицированных указанными плазмидами, оцениваемая с помощью анализа ССК-8 в присутствии или в отсутствие 2 мкМ ZY0511. *b, c* – Инвазия клеток TE-1, трансфицированных указанными плазмидами, оцениваемая путем анализа миграции в Transwell-системе в присутствии или в отсутствие 2 мкМ ZY0511 (масштаб 200 мкм). *d* – Миграция клеток TE-1, трансфицированных указанными плазмидами, оцениваемая с помощью скретч-тестов в присутствии или в отсутствие 2 мкМ ZY0511. Изображения получали под микроскопом через 0 и 36 ч. *e* – Коэффициенты миграции клеток (36 ч/0 ч) показаны на гистограмме. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего из трех независимых экспериментов. *** $p < 0,001$ по результатам однофакторного дисперсионного анализа. Примечание. NC – группа клеток, трансфицированных контрольным вектором; NC + ZY0511 – клетки, трансфицированные контрольным вектором, обработанные ZY0511; DUSP4 + ZY0511 – клетки, трансфицированные вектором DUSP4, обработанные ZY0511

ствием исследований, показывающих насколько сверхэкспрессированный LSD1 способствует экспрессии DUSP4 в ППП. Подробные механизмы, лежащие в основе регулируемой LSD1 экспрессии DUSP4 в ППП, требуют дальнейшего изучения. Деметилирующая функция LSD1 делает HIF-1 α устойчивым к деградации, опосредованной метилированием [32]. Кроме того, LSD1 косвенно репрессирует деградацию, опосредованную гидроксилированием HIF-1 α [32]. Более того, деметилирование RACK1 с помощью LSD1 ингибирует RACK1-опосредованную деградацию HIF-1 α [32]. Соответственно, LSD1 также является ключевым регуляторным сигналом для раковых клеток при адаптации к гипоксическому микроокружению [32]. Следовательно, усиление адаптации клеток ППП к гипоксии является возможным механизмом онкогенеза ППП, регулируемым осью LSD1/DUSP4; это также требует дополнительных исследований.

В заключение, настоящее исследование продемонстрировало роль DUSP4 как нижестоящего по отношению к LSD1 онкогенного фактора при ППП, что в некоторой степени объясняет регуляцию патогенеза ППП, ассоциированную с LSD1. Что еще более важно, благодаря выявлению нижестоящих молекул, регулируемых LSD1, наши экспериментальные данные не только позволяют рассматривать DUSP4 в качестве многообещающего прогностическо-

го биомаркера при ППП, но также указывают на возможные пути улучшения терапевтических стратегий при лечении ППП – таким образом, DUSP4 может быть потенциально эффективной мишенью для подавления онкогенеза при ППП.

Финансирование. Настоящая работа поддержана проектами фундаментальных научных исследований Научно-исследовательских институтов общественного благосостояния провинции Фуцзянь (2016R1029-2, 2019R1011-3) и Проектом обучения талантов в области научных исследований в области здравоохранения и планирования семьи провинции Фуцзянь (2018-ZQN-20).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. Были соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные инструкции по уходу и использованию лабораторных животных.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 12, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pennathur, A., Gibson, M. K., Jobe, B. A., and Luketich, J. D. (2013) Oesophageal carcinoma, *Lancet*, **38**, 400-412.
- Umar, S. B., and Fleischer, D. E. (2018) Esophageal cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention, *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, **5**, 517-526.
- Matsuda, T., Ajiki, W., Marugame, T., Ioka, A., Tsukuma, H., et al. (2011) Population-based survival of cancer patients diagnosed between 1993 and 1999 in Japan: a chronological and international comparative study, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **41**, 40-51.
- McGraw, S., Vigneault, C., and Sirard, M. A. (2007) Temporal expression of factors involved in chromatin remodeling and in gene regulation during early bovine *in vitro* embryo development, *Reproduction*, **133**, 597-608.
- Wang, Q., Xu, X., Li, J., Liu, J., Gu, H., et al. (2011) Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells, *Cell. Res.*, **21**, 1424-1435.
- Sakane, N., Kwon, H. S., Pagans, S., Kaehlecke, K., Mizusawa, Y., et al. (2011) Activation of HIV transcription by the viral Tat protein requires a demethylation step mediated by lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1), *PLoS Pathog.*, **7**, e1002184.
- Ly, T., Yuan, D., Miao, X., Lv, Y., Zhan, P., et al. (2012) Overexpression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer, *PLoS One*, **7**, e35065.
- Amente, S., Lania, L., and Majello, B. (2013) The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1829**, 981-986.
- Ding, J., Zhang, Z. M., Xia, Y., Liao, G. Q., Pan, Y., et al. (2013) LSD1-mediated epigenetic modification contributes to proliferation and metastasis of colon cancer, *Br. J. Cancer*, **109**, 994-1003.
- Wu, Y., Wang, Y., Yang, X. H., Kang, T., Zhao, Y., et al. (2013) The deubiquitinase USP28 stabilizes LSD1 and confers stem-cell-like traits to breast cancer cells, *Cell. Rep.*, **5**, 224-236.
- Yu, Y., Wang, B., Zhang, K., Lei, Z., Guo, Y., et al. (2013) High expression of lysine-specific demethylase 1 correlates with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **437**, 192-198.
- Hoshino, I., Akutsu, Y., Murakami, K., Akanuma, N., Isozaki, Y., et al. (2016) Histone demethylase LSD1 inhibitors prevent cell growth by regulating gene expression in esophageal squamous cell carcinoma cells, *Ann. Surg. Oncol.*, **23**, 312-320.
- Wang, B., Zhao, B., Pang, L. P., Zhao, Y. D., Guo, Q., et al. (2017) LPE-1, an orally active pyrimidine derivative, inhibits growth and mobility of human esophageal cancers by targeting LSD1, *Pharmacol. Res.*, **122**, 66-77.
- Alsaqer, S. F., Tashkandi, M. M., Kartha, V. K., Yang, Y. T., Alkheriji, Y., et al. (2017) Inhibition of LSD1 epigenetically attenuates oral cancer growth and metastasis, *Oncotarget*, **8**, 73372-73386.
- Lu, Z., Ren, Y., Zhang, M., Fan, T., Wang, Y., et al. (2018) FLI-06 suppresses proliferation, induces apoptosis and cell cycle arrest by targeting LSD1 and Notch pathway in esophageal squamous cell carcinoma cells, *Biomed. Pharmacother.*, **107**, 1370-1376.

16. Hou, G., Zhao, Q., Zhang, M., Wang, P., Ye, H., et al. (2019) LSD1 regulates Notch and PI3K/Akt/mTOR pathways through binding the promoter regions of Notch target genes in esophageal squamous cell carcinoma, *Onco Targets Ther.*, **12**, 5215-5225.
17. Peng, W., Zhang, H., Tan, S., Li, Y., Zhou, Y., et al. (2020) Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil with the novel LSD1 inhibitor ZY0511 in colorectal cancer, *Ther. Adv. Med. Oncol.*, **12**, 1758835920937428.
18. Li, Y., Tao, L., Zuo, Z., Zhou, Y., Qian, X., et al. (2019) ZY0511, a novel, potent and selective LSD1 inhibitor, exhibits anticancer activity against solid tumors via the DDIT4/mTOR pathway, *Cancer Lett.*, **454**, 179-190.
19. Li, S., Lin, Z., Zheng, W., Zheng, L., Chen, X., et al. (2019) IL-17A inhibits autophagic activity of HCC cells by inhibiting the degradation of Bcl2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **509**, 194-200.
20. Popova, E. Y., Pinzon-Guzman, C., Salzberg, A. C., Zhang, S. S., and Barnstable, C. J. (2016) LSD1-mediated demethylation of H3K4me2 is required for the transition from late progenitor to differentiated mouse rod photoreceptor, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 4563-4581.
21. Liu, Y. W., Xia, R., Lu, K., Xie, M., Yang, F., et al. (2017) LincRNAFEZF1-AS1 represses p21 expression to promote gastric cancer proliferation through LSD1-Mediated H3K4me2 demethylation, *Mol. Cancer*, **16**, 39.
22. Gaedcke, J., Grade, M., Jung, K., Camps, J., Jo, P., et al. (2010) Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas, *Genes Chromosomes Cancer*, **49**, 1024-1034.
23. Gröschl, B., Bettstetter, M., Giedl, C., Woenckhaus, M., Edmonston, T., et al. (2013) Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation, *Int. J. Cancer*, **132**, 1537-1546.
24. Wang, H. Y., Cheng, Z., and Malbon, C. C. (2003) Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer, *Cancer Lett.*, **191**, 229-237.
25. Yin, Y., Liu, Y. X., Jin, Y. J., Hall, E. J., and Barrett, J. C. (2003) PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signaling apoptosis and growth suppression, *Nature*, **422**, 527-531.
26. Yip-Schneider, M. T., Lin, A., and Marshall, M. S. (2001) Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 992-997.
27. Zhang, R., Wang, G., Zhang, P. F., Zhang, J., Huang, Y. X., et al. (2017) Sanguinarine inhibits growth and invasion of gastric cancer cells via regulation of the DUSP4/ERK pathway, *J. Cell. Mol. Med.*, **21**, 1117-1127.
28. Xu, X. F., Gao, F., Wang, J. J., Tao, L., Ye, J. S., et al. (2018) MiR-122-5p inhibits cell migration and invasion in gastric cancer by down-regulating DUSP4, *Cancer. Biol. Ther.*, **19**, 427-435.
29. De Vriendt, V., De Roock, W., Di Narzo, A. F., Tian, S., et al. (2013) DUSP 4 expression identifies a subset of colorectal cancer tumors that differ in MAPK activation, regardless of the genotype, *Biomarkers*, **18**, 516-524.
30. Thienpont, B., Steinbacher, J., Zhao, H., D'Anna, F., Kuchnio, A., et al. (2016) Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity, *Nature*, **537**, 63-68.
31. Dougherty, J. A., Kilbane Myers, J., Khan, M., Angelos, M. G., and Chen, C. A. (2017) Dual-specificity phosphatase 4 overexpression in cells prevents hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis via the upregulation of eNOS, *Front. Cardiovasc. Med.*, **4**, 22.
32. Kim, D., Kim, K. I., and Baek, S. H. (2021) Roles of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in homeostasis and diseases, *J. Biomed. Sci.*, **28**, 41.

LYSINE-SPECIFIC HISTONE DEMETHYLASE 1 PROMOTES ONCOGENESIS OF THE ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA BY UPREGULATING DUSP4

J. Han^{1,2#}, S. Ye^{3#}, J. Chen^{1,2}, K. Wang^{1,2}, J. Jin^{1,2}, Z. Zeng^{3*}, and S. Xue^{1,2*}

¹ Department of Immunization, Fujian Academy of Medical Sciences, 350003 Fuzhou, Fujian, China; e-mail: fyykxysj@126.com

² Fujian Institute of Medical Sciences, Fujian Provincial Key Laboratory of Medical Analysis, 350003 Fuzhou, Fujian, China

³ Department of Cardiothoracic Surgery, 900 Hospital of the Joint Logistics Team, 350025 Fuzhou, Fujian, China; e-mail: 13809542597@139.com

Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is a predominant subtype of esophageal cancer (EC) and has a poor prognosis due to its aggressive nature. Accordingly, it is necessary to find novel prognostic biomarkers and therapeutic targets for ESCC. Lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1) plays a core role in the regulation of ESCC oncogenesis. However, the detailed mechanism of LSD1-regulated ESCC growth has not been elucidated. This study aims to explore molecular mechanism underlying the LSD1-regulated ESCC's oncogenesis. After LSD1 silencing, we detected differentially expressed genes (DEGs) in human ESCC cell line, TE-1, by transcriptome sequencing. Subsequently, we investigated expression pattern of the selected molecules in the ESCC tissues and cell lines by qRT-PCR and Western blotting. Furthermore, we explored the roles of selected molecules in ESCC using gene silencing and overexpression assays. Transcriptome sequencing showed that the expression of dual specificity phosphatase 4 (DUSP4) in TE-1 was significantly attenuated after the *LSD1* silencing. In addition, the *DUSP4* mRNA expression level was significantly higher in the ESCC tissues, especially in those derived from patients with invasion or metastasis. Moreover, the *DUSP4* expression was positively associated with the *LSD1* expression in the ESCC tissues. *DUSP4* overexpression promoted proliferation, invasion, and migration of the ESCC cells, while *DUSP4* silencing had an opposite effect. *DUSP4* overexpression also enhanced tumorigenicity of the ESCC cells *in vivo*, while *DUSP4* silencing inhibited tumor growth. Importantly, inhibition of cell proliferation, invasion, and migration by the LSD1 inhibitor (ZY0511) was reversed by *DUSP4* overexpression. Conclusively, we found that LSD1 promotes ESCC's oncogenesis by upregulating *DUSP4*, the potential therapeutic and diagnostic target in ESCC.

Keywords: dual specificity phosphatase 4, esophageal squamous cell carcinoma, lysine-specific histone demethylase 1