

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.04.003

· 基础研究 ·

lncRNA NORAD 促进食管鳞状细胞癌 EC9706 细胞的增殖和迁移

李欢^a, 张评梅^a, 王郁^a, 王佳丽^a, 段玉青^a, 刘丽华^{ab} (河北医科大学 a. 第四医院 肿瘤免疫科; b. 国际合作研究干细胞实验室, 河北 石家庄 050035)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) DNA 损伤激活的非编码 RNA (non-coding RNA-activated by DNA damage, NORAD) 对食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 细胞株 EC9706 增殖和迁移能力的影响及其机制。 **方法:** 采用 RT-PCR 法检测不同 ESCC 细胞 (EC9706、TE1、YES-2、KYSE150) 中 NORAD mRNA 表达水平, 通过 RNA 干扰技术将 NORAD 的小干扰 RNA (siRNA) 转染到 EC9706 细胞 (si-NORAD 组) 以建立 NORAD 低表达细胞, 另设置空白对照组 (Ctrl 组, 不转染任何序列) 及阴性对照组 (NC 组, 转染 siRNA 阴性对照序列), qPCR 验证其转染效果。用 MTT、平板克隆形成和划痕愈合实验检测敲低 NORAD 前后 EC9706 细胞增殖和迁移能力的变化, Western blotting 检测敲低 NORAD 前后 EC9706 细胞中上皮钙黏蛋白 (E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (N-cadherin) 和锌指转录因子 Snail 的表达变化。 **结果:** 在 4 种 ESCC 细胞中 NORAD mRNA 均呈高表达状态, 同时与 TE1、YES-2、KYSE150 细胞相比, EC9706 细胞中 NORAD mRNA 呈显著高表达 ($P < 0.01$)。与 Ctrl 组和 NC 组比较, 转染 NORAD-siRNA 后, si-NORAD 组 EC9706 细胞中 NORAD 表达水平显著降低 (均 $P < 0.01$), EC9706 细胞的增殖和迁移能力显著降低 (均 $P < 0.05$); 敲低 NORAD 表达后, EC9706 细胞中 E-cadherin 表达升高而 N-cadherin 和 Snail 表达降低 (均 $P < 0.05$)。 **结论:** NORAD 在 EC9706 细胞中呈高表达状态, 敲低 NORAD 表达可通过上调 E-cadherin、下调 N-cadherin 和 Snail 表达而抑制 EC9706 细胞的增殖和迁移能力。

[关键词] DNA 损伤激活的非编码 RNA; 食管鳞状细胞癌; EC9706 细胞; 增殖; 迁移

[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)04-0359-06

lncRNA NORAD promotes the proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells

LI Huan^a, ZHANG Pingmei^a, WANG Yu^a, WANG Jiali^a, DUAN Yuqing^a, LIU Lihua^{ab} (a. Department of Tumor Immunology, the Fourth Hospital; b. International Cooperation Research Laboratory of Stem Cell, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050035, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanisms of long non-coding RNA (lncRNA) non-coding RNA-activated by DNA damage (NORAD) on the proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) EC9706 cells. **Methods:** RT-PCR was used to detect the mRNA expression level of NORAD in different ESCC cells (EC9706, TE1, YES-2, KYSE150). Small interfering RNA (siRNA) targeting NORAD gene was transfected into EC9706 cells (as si-NORAD group) with RNA interference technique to knockdown NORAD expression; in addition, blank control group (as Ctrl group, without any transfection) as well as negative control group (as NC group, transfected with siRNA negative control sequence) were also established. qPCR was used to verify the transfection efficiency. MTT, Colony formation assay and Wound-healing test were used to detect the abilities of proliferation and migration of EC9706 cells before and after NORAD knockdown. Western blotting was used to detect the expressions of E-cadherin, N-cadherin and Snail in EC9706 cells before and after NORAD knockdown. **Results:** NORAD mRNA was highly expressed in 4 ESCC cell lines. Comparing with TE1, YES-2 and KYSE150 cells, the expression of NORAD mRNA was significantly higher in EC9706 cells ($P < 0.01$). After transfection of NORAD-siRNA into EC9706 cells, the expression of NORAD was down-regulated significantly as comparing with Ctrl group and NC group (all $P < 0.01$), in the meanwhile, the proliferation and migration abilities of EC9706 cells were also significantly suppressed ($P < 0.05$). After NORAD knockdown, the expression of E-cadherin was up-regulated while the expressions of N-cadherin and Snail were down-regulated in EC9706 cells (all $P < 0.05$). **Conclusion:** NORAD is highly expressed in EC9706 cells;

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81871894); 河北省自然科学基金资助项目 (No. H2018206318)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81871894), and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2018206318)

[作者简介] 李欢 (1993-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫治疗的临床与基础研究, E-mail: vandol_lh@163.com

[通信作者] 刘丽华 (LIU Lihua, corresponding author), 博士, 教授、主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗基础研究与临床应用, E-mail: lihualiu567@hotmail.com

knockdown of NORAD expression can inhibit the proliferation and migration ability of EC9706 probably through up-regulating E-cadherin and down-regulating N-cadherin and Snail.

[Key words] non-coding RNA-activated by DNA damage (NORAD); esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); EC9706 cell; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(4): 459-364. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.04.003]

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,在中国恶性肿瘤发病率和病死率中分别位居第5位和第4位,其中90%以上的病理类型为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC),中晚期ESCC患者的5年生存率不到30%^[1]。肿瘤细胞侵袭和转移是影响ESCC患者预后的主要因素^[2],因此探讨ESCC细胞侵袭和迁移的相关机制对于建立精准治疗方法具有重要意义。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是指长度大于200个核苷酸、缺乏蛋白质编码能力的RNA分子。DNA损伤激活的非编码RNA(non-coding RNA-activated by DNA damage, NORAD)是位于细胞核中具有促癌作用的lncRNA^[3-4]。国内外诸多研究^[5-8]证实,NORAD在非小细胞肺癌、结直肠癌、宫颈癌、胃癌等发生发展中发挥重要的作用。有研究^[9]表明,NORAD在ESCC组织中高表达,其表达水平与ESCC患者的不良预后相关。然而,尚未见NORAD在ESCC细胞中的表达和作用机制的研究报道。本研究通过检测NORAD在不同ESCC细胞中的表达水平,进一步探讨其对EC9706细胞增殖和迁移能力的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人ESCC细胞系EC9706、TE1、YES-2、KYSE150由河北医科大学第四医院科研中心提供,置于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI 1640培养基中,在37 °C、5%CO₂培养箱中常规培养。

RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清购自美国Gemini公司,胰蛋白酶、TRIzol试剂及一步法逆转录试剂盒均购自美国Thermo公司,qPCR试剂盒购自爱博泰克生物公司,MTT试剂盒购自迈瑞尔公司,转染试剂Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司。NORAD引物由上海生工公司设计合成,NORAD的干扰序列、阴性对照寡核苷酸均由上海吉玛基因公司设计合成。兔抗人神经钙黏蛋白(E-cadherin)、上皮钙黏蛋白(N-cadherin)、Snail抗体购自华安生物公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔二抗购自Abcam公司。

1.2 RT-PCR法检测ESCC细胞系中NORAD mRNA

的表达

采用TRIzol试剂提取细胞总RNA,检测RNA的浓度及纯度后合成cDNA。以cDNA为模板,按照RT-PCR试剂盒说明书对NORAD进行扩增。引物序列:NORAD(362 bp)F为5'-TCCCATCACCATCTTCCAGG-3',R为5'-CCGTTGTCGTCAGGACTAGGTAGG-3'; GAPDH(100 bp)F为5'-TCCCATCACCATCTTCCAGG-3',R为5'-CCATCACGCCACAGTTTC C-3'。取5 μl maker和8 μl PCR扩增产物,分别加样于1.2%琼脂糖凝胶加样孔中做水平电泳40 min,用凝胶成像系统拍摄图像并分析,根据目的片段NORAD mRNA与GAPDH mRNA灰度值的比值对其进行半定量分析。

1.3 RNA干扰技术敲低EC9706细胞NORAD基因的表达

选取对数生长期的EC9706细胞,接种到6孔板(细胞密度为5×10⁵个/ml),并继续培养24 h,待细胞汇合度至80%时分为NORAD敲低组(si-NORAD组,转染NORAD干扰序列)、阴性对照组(NC组,转染RNA干扰阴性对照序列)及空白对照组(Ctrl组,不转染任何序列)。3对干扰片段及阴性对照序列分别为NORAD siRNA-1:5'-GGAAGAUUUACUGGC CGUUTT-3'; NORAD siRNA-2:5'-CCUGACAACG-GACAAATT-3'; NORAD siRNA-3:5'-GCGGUUGGU CUUCAUUCUATT-3'。RNA干扰阴性对照(interfering negative control):5'-UUCUCCGAACGUGUCUTT-3'; 5'-AUGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。转染步骤均按照Lipofectamine™2000转染试剂说明书进行操作。转染48 h后,抽提各组细胞内的RNA和总蛋白。

1.4 qPCR法检测NORAD-siRNA转染效果

提取各组细胞总RNA后逆转录为cDNA进行扩增,cDNA扩增反应条件:95 °C预变性2 min;95 °C变性15 s、59 °C退火15 s、72 °C延伸30 s,进行35个循环;72 °C延伸10 min。根据每孔荧光信号达到阈值时经历的循环数作为Ct值,以2^{-ΔΔCt}法计算NORAD mRNA的相对表达量。

1.5 MTT实验检测敲低NORAD对EC9706细胞克隆形成能力的影响

将各细胞按照3×10³个/孔细胞量接种于96孔板中,于接种后不同时间点分别向每孔加入100 μl培养基和10 μl MTT溶液,37 °C培养箱孵育4 h,后加入

110 μ l DMSO 于培养箱继续培养 30 min, 然后使用酶标仪检测波长在 492 nm 处的光密度(D)值, 绘制细胞生长曲线, D 值设为纵坐标, 时间设为横坐标。

1.6 平板克隆形成实验检测敲低 NORAD 对 EC9706 细胞增殖的影响

将各组细胞按照 5×10^2 个/孔细胞量接种于 6 孔板中于培养箱中培养。更换培养液时, 在光学显微镜下($\times 100$)计数每孔细胞的克隆数, 克隆形成的标准为每个细胞团的细胞数 ≥ 50 个。克隆形成后, 4% 多聚甲醛固定 30 min 后用吉姆萨溶液染色 30 min, 计数染色的克隆数, 并拍照、绘制数据图。

1.7 划痕愈合实验检测敲低 NORAD 对 EC9706 细胞迁移的影响

细胞转染 24 h 后, 用 200 μ l 枪头在各组细胞中划 2 条垂直于背面平行线的直线, 后加入 2 ml 含 1% 胎牛血清的 1640 培养基, 此后不同时间在倒置显微镜下观察细胞向致伤区域的迁移距离并拍照。

1.8 Western blotting (WB) 检测敲低 NORAD 对 EC9706 细胞 E-cadherin、N-cadherin 及 Snail 表达的影响

分别提取各组细胞总蛋白, 行 10% SDS-PAGE 分离蛋白后电转移至 PVDF 膜。加入兔抗人 E-cadherin (1:7 000)、N-cadherin (1:1 000)、Snail (1:500) 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:20 000) 孵育 1 h 后, 采用 ECL 行放射自显影。用 Quantity One 4.6 软件分析图像, 以 β -actin 为内参, 与各个检测蛋白条带的灰度值之比表示蛋白的相对表达量。

1.9 统计学处理

RT-PCR、qPCR、MTT、平板克隆形成、划痕愈合和 WB 实验均重复 3 次。用 SPSS 25.0 软件对所有数据进行统计学处理。正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 t 检验; 方差齐时用最小显著差法 (least significant difference, LSD) 作两两比较, 方差不齐时采用近似 t 检验作两两比较。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NORAD 在 EC9706 细胞系中呈高表达状态

RT-PCR 检测结果 (图 1) 显示, NORAD mRNA 在不同 ESCC 细胞 EC9706、TE1、YES-2 和 KYSE150 中均呈高表达状态, 与 TE1、YES-2、KYSE150 细胞比较, 以 EC9706 细胞中 NORAD 表达水平最显著 ($F=78.95$, 均 $P < 0.01$), 所以, 后续实验选用该细胞株。

2.2 成功构建 NORAD 低表达的 EC9706 细胞

qPCR 检测结果 (图 2) 显示, 与 NC 组比较, 转染

NORAD-siRNA 后, EC9706 细胞中 NORAD 表达水平显著降低 ($F=65.46$, 均 $P < 0.01$), 表明已成功构建 NORAD 低表达的 EC9706 细胞。其中, 以 si-NORAD-1 组 EC9706 细胞 NORAD 下降水平最显著, 所以后续实验选取该序列细胞。

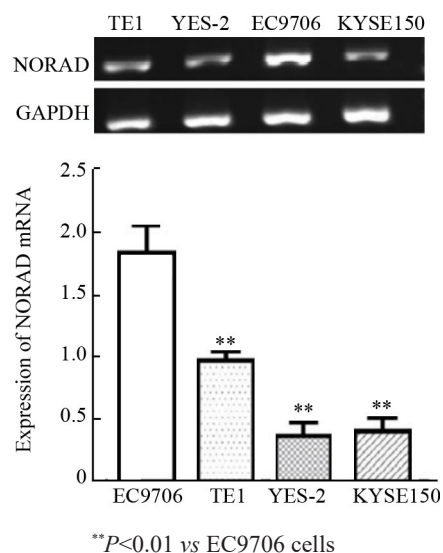


图 1 不同 ESCC 细胞系中 NORAD mRNA 的表达

Fig.1 Expression of NORAD mRNA in different ESCC cell lines

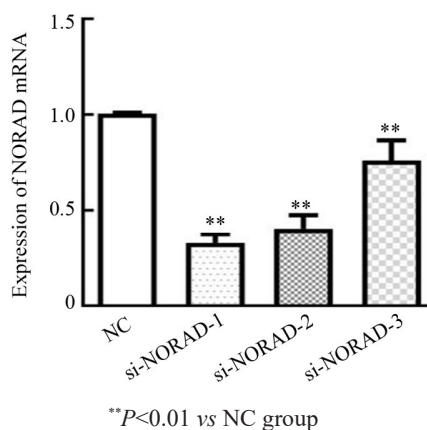


图 2 转染 NORAD-siRNA 后 EC9706 细胞中 NORAD mRNA 的表达

Fig.2 Expression of NORAD mRNA in EC9706 cells transfected with NORAD-siRNA

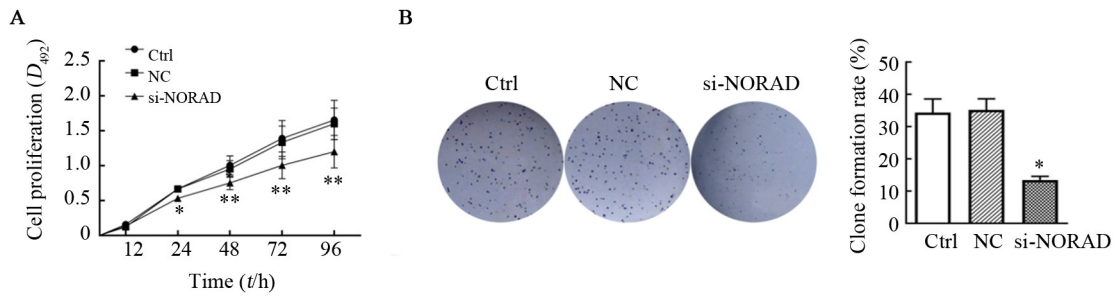
2.3 敲低 NORAD 后抑制 EC9706 细胞的增殖能力

MTT 实验结果 (图 3A) 显示, 与 Ctrl 组和 NC 组比较, 自 24 h 起 si-NORAD 组细胞的增殖能力显著降低 ($F=29.16$, $P < 0.05$), 48 至 96 h 时差异更为显著 ($F=3.53$ 、13.83、50.26, 均 $P < 0.01$)。平板克隆形成实验结果 (图 3B) 显示, si-NORAD 组细胞的克隆形成率显著低于 Ctrl 组和 NC 组 ($F=43.98$, $P < 0.05$), 而 Ctrl 组和 NC 组差异比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, 敲低 NORAD 可以抑制 EC9706 细胞的增殖能力。

2.4 敲低NORAD后抑制EC9706细胞的迁移能力

划痕愈合实验结果(图4)显示,与Ctrl组和NC组相比,在24和48 h时 si-NORAD组EC9706细胞的迁移率显著降低($F=14.08, 19.52$, 均 $P<0.01$),而Ctrl

组和NC组差异比较无统计学意义($P>0.05$)。结果表明,敲低NORAD能够显著抑制EC9706细胞的迁移能力。

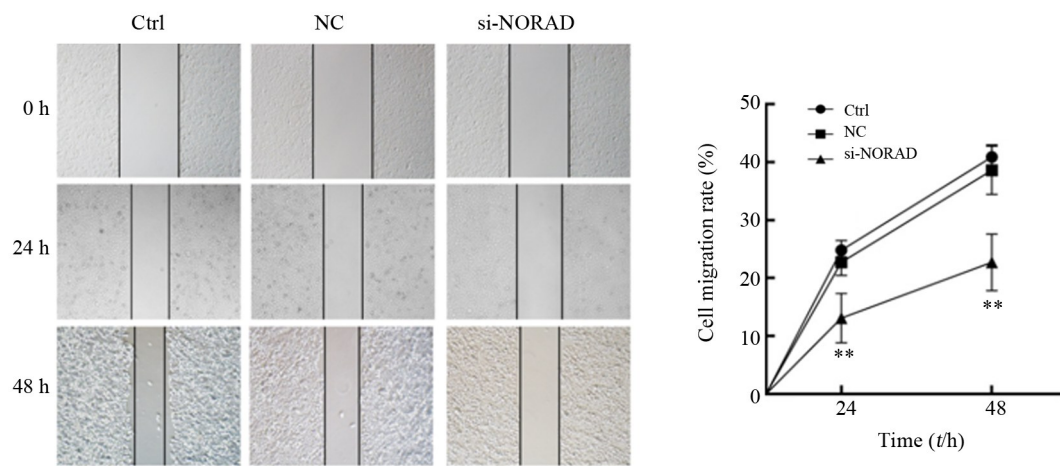


* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Ctrl or NC group

A: The proliferation ability of cells was detected by MTT assay; B: Clonogenesis of cells was detected by colony formation assay

图3 敲低NORAD表达抑制EC9706细胞的增殖能力

Fig.3 NORAD knockdown inhibited proliferation of EC9706 cells



** $P<0.01$ vs Ctrl or NC group

图4 敲低NORAD表达抑制EC9706细胞的迁移能力

Fig.4 NORAD knockdown inhibited migration of EC9706 cells

2.5 敲低NORAD上调EC9706细胞中E-cadherin表达而下调N-cadherin及Snail表达

WB实验结果(图5)显示,与Ctrl组和NC组相比,si-NORAD组EC9706细胞中E-cadherin表达水平显著升高($F=24.57, P<0.01$),而N-cadherin($F=8.86, P<0.05$)及Snail($F=57.6, P<0.01$)表达水平显著降低,而Ctrl组和NC组差异比较无统计学意义($P>0.05$)。结果表明,敲低NORAD可上调E-cadherin表达同时下调N-cadherin及Snail表达。

3 讨论

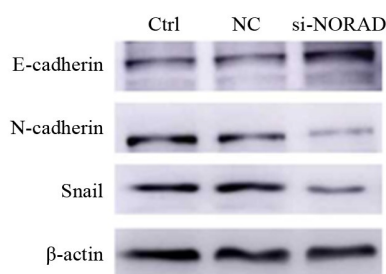
肿瘤的发生发展是一个多因素、多步骤的复杂过程,表观遗传调控在其中发挥着重要作用。lncRNA

因其不具有蛋白质编码能力,曾被定义为转录噪声,但随着新一代高通量测序技术的应用和发展,越来越多的研究^[10-14]表明,lncRNA能够通过多种机制调控基因和蛋白表达,参与肿瘤进展,其表达水平可作为肿瘤早期诊断、预测复发转移及预后的生物标志物^[10-11]。本研究通过体外实验证实,lncRNA NORAD与ESCC细胞的增殖和迁移密切相关。

lncRNA NORAD是一种长度为5 378个核苷酸,由DNA损伤激活的高度保守的ncRNA,其定位于染色体20q11.23,在维持基因组稳定性中发挥调控功能^[3]。研究^[5-8]表明,NORAD在非小细胞肺癌、结肠直肠癌、宫颈癌、胃癌等肿瘤组织及细胞中高表达,并且可通过调控抑癌基因表达、转录干扰及转录后

调控等多种机制发挥致癌功能。有研究^[9]证实, NORAD 在 ESCC 组织中高表达, 但是其在 ESCC 细胞中的表达水平及其对 ESCC 细胞恶性生物学行为的影响机制的研究尚无报道。因此, 本研究首先通过 RT-PCR 检测 4 种 ESCC 细胞中 NORAD 的表达水平, 结果发现其在 EC9706、TE1、YES-2 和 KYSE150 细胞中均呈高表达状态, 以 EC9706 细胞中表达水平

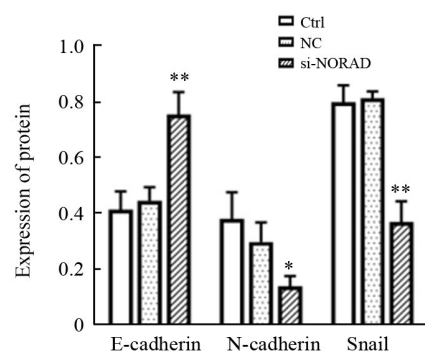
最高。进一步利用 RNA 干扰技术建立 NORAD 低表达的 EC9706 细胞, 通过 MTT、平板克隆形成实验证明敲低 NORAD 表达可以显著抑制 EC9706 细胞的增殖, 同时划痕实验证明敲低 NORAD 显著抑制 EC9706 细胞的迁移, 说明 NORAD 可以调控 ESCC 细胞的恶性生物学行。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl or NC group

图5 敲低NORAD后对EC9706细胞E-cadherin、N-cadherin和Snail蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of NORAD knockdown on the protein expressions of E-cadherin, N-cadherin and Snail in EC9706 cells



转移是恶性肿瘤最显著的生物学特征之一^[15], 在 ESCC 进展中发挥至关重要的作用。上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞逐渐失去上皮分化表型同时获得间质表型的过程, 与肿瘤转移密切相关。EMT 进程中, 上皮细胞极性消失, 上皮细胞间黏附作用下降, 从而发生细胞骨架和形态改变、细胞侵袭和迁移能力提高^[16]。发生 EMT 的重要标志是上皮标志物 (如 E-cadherin、ZO-1 等) 表达下调而间质标志物 (如 N-cadherin、Snail、Twist 等) 表达上调^[17]。其中 E-cadherin 是上皮细胞表面的黏附分子, 对细胞间的黏附起重要作用, 其表达下调使细胞间黏附能力下降, 细胞的侵袭和迁移能力增强; Snail 是 EMT 过程中的关键转录因子, 其通过与 E-cadherin 的启动子区 E-box 结构结合, 抑制 E-cadherin 的转录表达, 致使细胞间黏附力降低, 诱导 EMT 发生, 促进肿瘤细胞迁移^[18-19]。为了明确 NORAD 调控 ESCC 的发展和转移的作用机制, 本研究发现, 敲低 EC9706 细胞中 NORAD 表达后, 可以显著升高 E-cadherin 表达而下调 N-cadherin 和 Snail 的表达, 结果说明 NORAD 或可通过上调 N-cadherin 和 Snail 表达而下调 E-cadherin 表达促进 EC9706 细胞的迁移能力。

综上所述, 本研究证实 lncRNA NORAD 在 ESCC 细胞中呈高表达状态, 敲低 NORAD 基因可以显著抑制 EC9706 细胞的增殖, 并通过上调 E-cadherin 表

达、下调 N-cadherin 和 Snail 的表达抑制 EC9706 细胞的迁移能力。本研究为深入探讨 NORAD 在 ESCC 转移中的作用及逆转治疗奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] JIA Y L, WANG H Y, WANG Y, et al. Low expression of Bin1, along with high expression of IDO in tumor tissue and draining lymph nodes, are predictors of poor prognosis for esophageal squamous cell cancer patients[J]. Int J Cancer, 2015, 137(5): 1095-1106. DOI:10.1002/ijc.29481.
- [3] LEE S, KOPP F, CHANG T C, et al. Noncoding RNA NORAD regulates genomic stability by sequestering PUMILIO proteins[J/OL]. Cell, 2016, 164(1/2): 69-80[2019-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4715682/>. DOI:10.1016/j.cell.2015.12.017.
- [4] MILES W O, LEPESANT J M, BOURDEAUX J, et al. The LSD1 family of histone demethylases and the pumilio posttranscriptional repressor function in a complex regulatory feedback loop[J/OL]. Mol Cell Biol, 2015, 35(24): 4199-4211[2019-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4648826/>. DOI: 10.1128/MCB.00755-15.
- [5] HUO H C, TIAN J, WANG R Y, et al. Long non-coding RNA NORAD upregulate SIP1 expression to promote cell proliferation and invasion in cervical cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 1454-1460. DOI:10.1016/j.biopha.2018.07.101.
- [6] KAWASAKI N, MIWA T, HOKARI S, et al. Long noncoding RNA NORAD regulates transforming growth factor-β signaling and epithelial-

- to-mesenchymal transition-like phenotype[J/OL]. *Cancer Sci*, 2018, 109(7): 2211-2220[2019-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6029837/>. DOI:10.1111/cas.13626.
- [7] MIAO Z G, GUO X Z, TIAN L. The long noncoding RNA NORAD promotes the growth of gastric cancer cells by sponging miR-608[J]. *Gene*, 2019, 687: 116-124. DOI:10.1016/j.gene.2018.11.052.
- [8] WANG L L, DU L T, DUAN W L, et al. Overexpression of long non-coding RNA NORAD in colorectal cancer associates with tumor progression[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 6757-6766[2019-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6188072/>. DOI:10.2147/OTT.S176354.
- [9] WU X L, LIM Z F, LI Z W, et al. NORAD expression is associated with adverse prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Res Treat*, 2017, 40(6): 370-374. DOI:10.1159/000464465.
- [10] 刘天旭, 王梦杰, 田聪, 等. lncRNA NEAT1 通过抑制 DNA 损伤促进肺腺癌 PC-9 细胞的增殖[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(8): 845-849. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2019.08.003.
- [11] CHEN Y, YU X, XU Y C, et al. Identification of dysregulated lncRNAs profiling and metastasis-associated lncRNAs in colorectal cancer by genome-wide analysis[J/OL]. *Cancer Med*, 2017, 6(10): 2321-2330[2019-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5633553/>. DOI:10.1002/cam4.1168.
- [12] FANG Y W, FULLWOOD M J. Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer[J/OL]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(1): 42-54[2019-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4792843/>. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.09.006.
- [13] JIANG C Y, LI X, ZHAO H, et al. Long non-coding RNAs: potential new biomarkers for predicting tumor invasion and metastasis[J/OL]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 62[2019-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5043609/>. DOI:10.1186/s12943-016-0545-z.
- [14] LIU X G, DAI C C, JIA G M, et al. Microarray analysis reveals differentially expressed lncRNAs in benign epithelial ovarian cysts and normal ovaries[J/OL]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2): 799-808[2019-09-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5562051/>. DOI:10.3892/or.2017.5741.
- [15] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [16] INOUE T, UMEZAWA A, TAKENAKA T, et al. The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models[J]. *Kidney Int*, 2015, 87(1): 233-238. DOI: 10.1038/ki.2014.235.
- [17] ZHANG Z L, CHE X M, YANG N, et al. MiR-135b-5p Promotes migration, invasion and EMT of pancreatic cancer cells by targeting NR3C2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 1341-1348. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.11.074.
- [18] CANO A, PÉREZ-MORENO M A, RODRIGO I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(2): 76-83. DOI:10.1038/35000025.
- [19] 王佳丽, 张翔宇, 邓佳, 等. Bin1 基因通过 NF-κB 途径抑制非小细胞肺癌 A549 细胞的迁移和侵袭能力[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(4): 481-485. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.04.004.

[收稿日期] 2019-11-08

[修回日期] 2020-02-02

[本文编辑] 党瑞山