

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.006

LINC01140 通过 miR-452-5p/Wnt/ β -catenin 轴调控食管鳞状细胞癌 Eca109 细胞的增殖与侵袭

郭艳丽, 尹倩, 韩俊淑, 郭炜, 沈素朋, 梁佳, 董稚明(河北医科大学第四医院 河北省肿瘤研究所, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码RNA(lncRNA)LINC01140在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织及细胞中的表达及其对Eca109细胞增殖与侵袭的影响及其分子机制。**方法:** 选取2012年3月至2015年5月河北医科大学第四医院收治的133例ESCC患者的临床资料和GEPIA数据库中收集的182例ESCC组织及286例食管正常黏膜组织的LINC01140表达数据,以及ESCC细胞系Kyse150、Eca109和TE13。用qPCR法检测癌组织和细胞中LINC01140的表达水平,分析其表达水平与患者临床病理特征及预后的关系。分别将pcDNA3.1-LINC01140、阴性对照(pcDNA3.1-NC)或miR-452-5p mimic及阴性对照(miR-NC)转染到Eca109细胞,MTS、Transwell实验分别检测细胞的增殖与侵袭能力。用双荧光报告基因实验及TOP/FOP报告基因系统检测LINC01140与miR-452-5p的靶向结合作用及LINC01140对Wnt/ β -catenin通路活化水平的影响。**结果:** LINC01140在ESCC组织和细胞中表达均显著下调(均 $P<0.01$),LINC01140低表达与ESCC患者年龄、淋巴结转移、TNM分期及OS密切相关(均 $P<0.05$)。LINC01140过表达明显抑制Eca109细胞的增殖及侵袭能力(均 $P<0.01$)。机制研究表明,LINC01140可能通过竞争结合miR-452-5p影响Wnt/ β -catenin信号通路的活化水平继而调控Eca109细胞的恶性生物学行为。**结论:** LINC01140通过靶向miR-452-5p/Wnt/ β -catenin轴促进ESCC细胞的增殖与侵袭能力,其有望成为ESCC患者靶向治疗的潜在靶点及预后评估的标志物。

[关键词] 食管鳞状细胞癌;Eca109细胞;LINC01140;miR-452-5p;Wnt/ β -catenin信号通路;增殖;侵袭

[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)09-0900-08

LINC01140 regulates the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma Eca109 cells via miR-452-5p/Wnt/ β -catenin axis

GUO Yanli, YIN Qing, HAN Junshu, GUO Wei, SHEN Supeng, LIANG Jia, DONG Zhiming (Hebei Provincial Cancer Institute, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] Objective: To investigate the expression of lncRNA LINC01140 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues and cell lines, and to explore its effect on the proliferation and invasion of Eca109 cells as well as the possible molecular mechanism. **Methods:** The clinical data of 133 ESCC patients who were treated in the Fourth Hospital of Hebei Medical University from March 2012 to May 2015 and the data of 182 ESCC tissues and 286 normal esophageal mucosa tissues included in GEPIA database, as well as ESCC cell lines (Kyse150, Eca109, TE13) were collected for this study. The expression level of LINC01140 in ESCC tissues and cell lines was detected by qPCR method, and the relationship between its expression level and clinicopathological features as well as the prognosis of ESCC patients was further analyzed. pcDNA3.1-LINC01140, negative control (pcDNA3.1-NC) or miR-452-5p mimics and negative control (miR-NC) were respectively transfected into Eca109 cells. Then, MTS and Transwell assay were performed to assess the effect of LINC01140 on proliferation and invasion of transfected cells. The interaction between LINC01140 and miR-452-5p, as well as the effect of LINC01140 on the activation of Wnt/ β -catenin pathway was detected by Dual-luciferase reporter gene assay and TOP/FOP reporter gene system. **Results:** The expression of LINC01140 was downregulated in ESCC tissues and cell lines (all $P<0.01$). Low expression of LINC01140 was closely correlated with the age, lymph node metastasis, TNM stage and the OS of ESCC patients

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(No. H2020206368);河北省医学科学研究重点课题计划项目(No. 20210399);河北省人才工程培养资助项目(No. 201901035)。Project supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2020206368), the Key Project of Medical Science Research in Hebei Province (No. 20210399), and the Talent Engineering Training Project of Hebei Province (No.201901035)

[作者简介] 郭艳丽(1980—),女,博士,副主任医师,主要从事肿瘤病因学研究,E-mail: yanli800224@163.com

[通信作者] 董稚明(DONG Zhiming, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事上消化道肿瘤的分子病因及表观遗传学发病机制的研究,E-mail: dongzhiming2000@163.com

(all $P < 0.01$). Overexpression of LINC01140 significantly reduced the proliferation and invasion ability of Eca109 cells (all $P < 0.01$). Mechanistic analysis indicated that LINC01140 affected the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway possibly *via* competitively sponging miR-452-5p to further regulate the malignant biological behaviors of Eca109 cells. **Conclusion:** LINC01140 affects proliferation and invasion of ESCC cells *via* regulating miR-452-5p/Wnt/ β -catenin axis. LINC01140 is expected to be a potential target for the targeted therapy and the molecular marker for the prognosis evaluation of ESCC patients.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); Eca109 cell; LINC01140; miR-452-5p; Wnt/ β -catenin signaling pathway; proliferation; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(9): 900-907. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.006]

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是最具侵袭性的恶性肿瘤之一,其病死率高、预后差。食管癌的两个主要亚型是ESCC和食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EAC)。全球约70%的食管癌患者在中国,ESCC是中国患者的主要组织学类型,约占90%^[1]。尽管现有治疗方法不断改进,但由于ESCC早期易转移的特性,致使ESCC患者的5年总生存(overall survival, OS)率仍低于20%^[2]。多种长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在ESCC中异常表达,并可通过多种机制参与ESCC的发生和转移过程^[3-5],如染色质修饰、转录和转录后调控等^[6-7]。LINC01140最早是由SONG等^[8]在对胃癌表达谱数据挖掘时发现的与胃癌预后密切相关的一种lncRNA,随后在乳腺癌^[9]、胶质瘤^[10]、膀胱癌^[11]、胃癌^[8]中均发现该lncRNA的异常表达,并参与了肿瘤的发生发展,但其在ESCC中的作用及其机制尚未完全阐明。本研究通过检测LINC01140在ESCC组织与细胞中的表达,分析其表达水平与患者临床病理特征的关系,探讨LINC01140过表达对Eca109细胞增殖、侵袭的影响及其可能的分子机制,旨在为ESCC患者的分子靶向治疗和预后评估提供候选分子靶点及有价值的标志物。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 临床标本 收集2012年3月至2015年5月河北医科大学第四医院收治的133例ESCC患者的临床资料。其中临床分期依据美国癌症联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)及国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)标准;肿瘤病理分级依据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)标准。每例患者均切取癌组织原发灶及距癌灶边缘2~5 cm处的癌旁组织标本,标本一部分保存在-80℃低温冰箱用于提取RNA,另一部分进行石蜡包埋、常规H-E染色,经病理医师诊断证实癌组织均为ESCC、癌旁组织均为正常黏膜组织。133例ESCC患者全部进行了随访,共有9人失访。本研究方案经医院伦理委员会审查

批准,所有入选患者均被告知研究程序并签署知情同意书。

1.1.2 数据库中LINC01140表达数据 经GEPIA(Gene Expression Profiling Interactive Analysis)网站(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)自动分析来自TCGA和GTEx项目的9 736个肿瘤组织和8 587个正常组织样本的RNA表达数据,包括肿瘤/正常组织差异表达分析、根据癌症类型或病理分期进行分析、患者生存分析等。并应用该网站分析了数据库收录的182例ESCC组织及286例食管正常黏膜组织中LINC01140的表达情况。

1.2 细胞系及主要试剂

人ESCC细胞系Kyse150、Eca109和TE13由本院肿瘤研究所留存并传代。TRIzol购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒Reverse Transcription System A3500、双荧光报告基因检测试剂盒、Lipofectamine™2000转染试剂、MTS细胞增殖与毒性检测试剂盒均购自美国Promega公司,RPMI 1640细胞培养基购自美国Gibco公司,Transwell小室、matrigel胶均购自美国Corning公司,蛋白质和RNA分离系统PARIS™试剂盒购自美国Invitrogen公司,miR-452-5p mimic购自吉玛制药技术有限公司, TOP-FLASH、FOP-FLASH质粒均购自美国Millipore Corporation公司。本研究用全部引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 细胞培养及转染

复苏Kyse150、Eca109和TE13细胞,并在含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,置于37℃、5%CO₂的加湿培养箱中培养。取对数生长期、状态良好的Eca109细胞,常规消化并接种于6孔板(2×10⁵个/孔)中继续培养,待细胞汇合度达70%~80%时,按照Lipofectamine™2000转染试剂说明书分别将pcDNA3.1-LINC01140、阴性对照(pcDNA3.1-negative control, pcDNA3.1-NC)或者miR-452-5p mimic及相应阴性对照(miR-NC)转染到Eca109细胞。

1.4 qPCR法检测ESCC组织及细胞中LINC01140及miR-452-5p等的表达

利用TRIzol试剂说明书提取组织及细胞总

RNA, 分别参照 Promega 的逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA, 用于检测 LINC01140、c-Myc、MMP7、cyclin D1 等基因及 miR-452-5p 的表达水平, 并以 GAPDH 或 U6 作为内参照。引物序列见表 1。反应条件: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 及 miR-452-5p 的相对表达量。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Primer	Sequence
LINC01140	F: 5'-CAGGAGAGACACAGACTTGGGG-3' R: 5'-CACCCCGAGCGATGGAGTA-3'
c-Myc	F: 5'-GGCTCCTGGCAAAGGTC-3' R: 5'-CTGCGTAGTTGTGCTGATGT-3'
MMP7	F: 5'-GAGTGAGCTACAGTGGGAACA-3' R: 5'-CTATGACGCGGGAGTTTAACAT-3'
Cyclin D1	F: 5'-GCTGCGAAGTGGAAACATC-3' R: 5'-CCTCCTTCTGCACACATTTGAA-3'
U6	F: 5'-CTCGTTCGGCAGCACA-3' R: 5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'
GAPDH	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' R: 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'
miR-452-5p	5'-AACUGUUUGCAGAGGAAACUGA-3'

F: Forward primer; R: Reverse primer

1.5 MTS 实验检测 Eca109 细胞的增殖能力

按 3×10^3 个/孔的转染后各组将 Eca109 细胞接种于 96 孔板中, 每组设置 6 个复孔。分别于细胞贴壁后 0、24、48、72 和 96 h 时, 在每孔加入 20 μ l (500 μ g/ml) MTS 试剂, 置于 37 °C、5%CO₂ 的加湿培养箱中培养 2 h。用酶标仪在 490 nm 波长处检测各孔的光密度(D)值, 绘制细胞增殖曲线。

1.6 Transwell 实验检测 Eca109 细胞的侵袭能力

Transwell 小室在实验前预铺 matrigel 胶常规消化并悬浮转染后各组 Eca109 细胞于无血清培养基中, 调整细胞密度接种于小室上腔 (1×10^5 个/孔), 下腔加入 600 μ l 含 10%FBS 的 RPMI 1640。培养 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞, 并用 0.1% 结晶紫染色后, 在光学显微镜 ($\times 400$) 下对 5 个随机视野的细胞进行计数。

1.7 双荧光素酶报告基因实验验证 LINC01140 与 miR-452-5p 之间的靶向关系

利用 LncBase 预测 LINC01140 与 miR-452-5p 之间潜在结合位点。将含有结合位点区域片段插入荧光素酶报告基因载体 pmirGLO, 构建 pmirGLO-LINC01140 载体。将 pmirGLO-LINC01140

与 miR-452-5p-mimic 共转染 Eca109 细胞, 继续培养 48 h 后收集细胞, 用双荧光素酶报告基因系统测定转染细胞的相对荧光素酶活性。

同时, 为了检测 Wnt 通路活性, 将 TOP-FLASH 或 FOP-FLASH 与内参照质粒一起转染 Eca109 细胞, 并于转染 48 h 后用双荧光素酶报告基因检测系统测定转染细胞的相对荧光素酶活性。结果以 TOP/FOP 比值表示, 其中 TOP 值为转染有 TOP-Flash 和内参照质粒的样本中采集得到的萤火虫荧光值/海肾荧光值, FOP 值为转染有 FOP-Flash 和内参照质粒的样本中采集得到的萤火虫荧光值/海肾荧光值。3 次独立转染实验的 TOP/FOP 比值的平均值作为最终数据。

1.8 qPCR 法检测 LINC01140 在 Eca109 细胞中的分布情况

为确定 LINC01140 的亚细胞分布, 根据 PARIS™ 试剂盒说明书操作要求, 收集 1×10^7 个 Eca109 细胞, PBS 清洗后用 500 μ l 分离缓冲液重悬细胞, 冰上放置 5~10 min, 低速离心分离细胞核和细胞质, 并分别抽提细胞质与细胞核 RNA, 逆转录为 cDNA 后进行 qPCR 分析, GAPDH 为细胞质表达的内参照, U6 为细胞核表达的内参照, 以确定 LINC01140 在细胞质和细胞核的表达分布情况。

1.9 统计学处理

qPCR、MTS、Transwell 等实验均重复 3 次。采用 SPSS19.0 统计学软件对实验数据进行统计分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异比较采用独立样本均数 *t* 检验, LINC01140 表达与患者临床病理特征的关系采用两样本均数 *t* 检验比较; Log-Rank 检验用于分析 LINC01140 表达对 ESCC 患者生存期的影响。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ESCC 患者的临床资料

本研究选取的 133 例 ESCC 患者中, 男性 80 例、女性 53 例, 中位年龄 57.6 (39~78) 岁。所有患者术前均未经化疗和放疗, 患者的临床资料见表 2。

2.2 ESCC 组织中 LINC01140 低表达

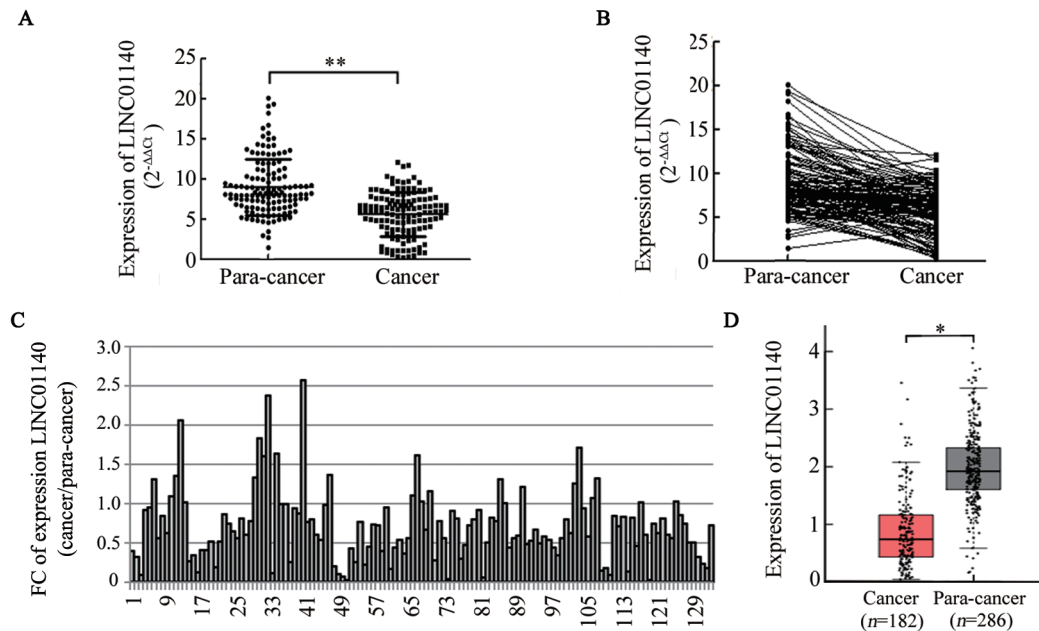
qPCR 检测结果 (图 1A、1B) 显示, ESCC 组织中 LINC01140 表达明显低于正常黏膜组织 ($t=8.742$, $P < 0.01$)。133 例 ESCC 组织中, 有 106 例表达下调, 其中 42 例表达下调达 50% 以上, 17 例表达下调超过 80% (图 1C)。GEPIA 网站数据分析结果 (图 1D) 显示, ESCC 组织中 LINC01140 表达显著下调。

分析 LINC01140 表达与 ESCC 患者临床病理特征的关系发现, LINC01140 低表达与 ESCC 患者的年龄、淋巴结转移、浸润深度及 TNM 分期密切相关 (均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 2)。

2.3 LINC01140 高表达的 ESCC 患者 OS 明显长于低表达患者

根据 ESCC 组织中 LINC01140 表达的均值, 将 ESCC 患者分为高表达组 (73 例) 和低表达组 (60 例)。

LINC01140 高表达组患者 5 年 OS 率为 33.5% (中位 OS 为 46 个月), 低表达组患者 5 年 OS 率为 14.8% (中位 OS 为 23 个月)。Log-Rank 检验分析显示, LINC01140 高表达的 ESCC 患者 OS 明显延长 ($\chi^2=10.230, P<0.01$; 图 2)。



* $P<0.05$; ** $P<0.01$

A: The expression level of LINC01140 in cancer and para-cancer tissues by qPCR; B: The expression of LINC01140 in cancer and para-cancer tissues of each ESCC patient; C: The fold change (FC) of LINC01140 expression in cancer tissues compared with para-cancer tissues; D: Relative expression of LINC01140 in cancer and para-cancer tissues analyzed by GEPIA dataset

图 1 ESCC 及癌旁组织中 LINC01140 的表达

Fig.1 The expression of LINC01140 in ESCC and para-cancer tissues

表 2 ESCC 组织中 LINC01140 表达与患者临床病理特征的关系

Tab.2 Correlation of the expression level of LINC01140 with clinicopathologic features of ESCC patients

Clinicopathological feature	n	LINC01140	t	P
Age (t/a)				
<50	35	4.839±2.716	-2.003	0.047
≥50	98	5.910±2.715		
Gender				
Male	80	5.641±2.786	0.065	0.948
Female	53	5.609±2.710		
Histological grade				
Well/ Medium	78	5.565±2.595	-0.318	0.751
Poor	55	5.719±2.968		
Lymphatic metastasis				
No	31	7.310±2.292	4.122	<0.001
Yes	102	5.118±2.676		
Depth of invasion				
T1+T2	57	6.559±2.635	3.530	0.001
T3+T4	76	4.930±2.633		
TNM stage				
I + II	68	6.395±2.621	3.423	0.001
III+IV	65	4.827±2.661		

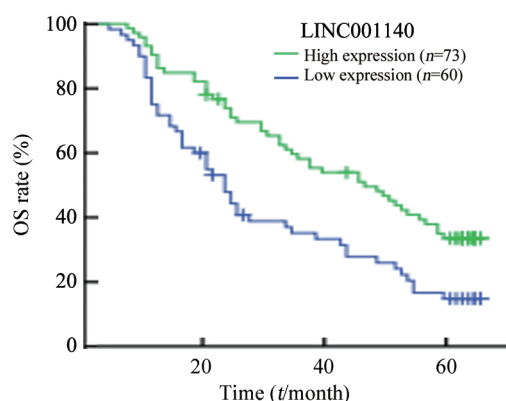
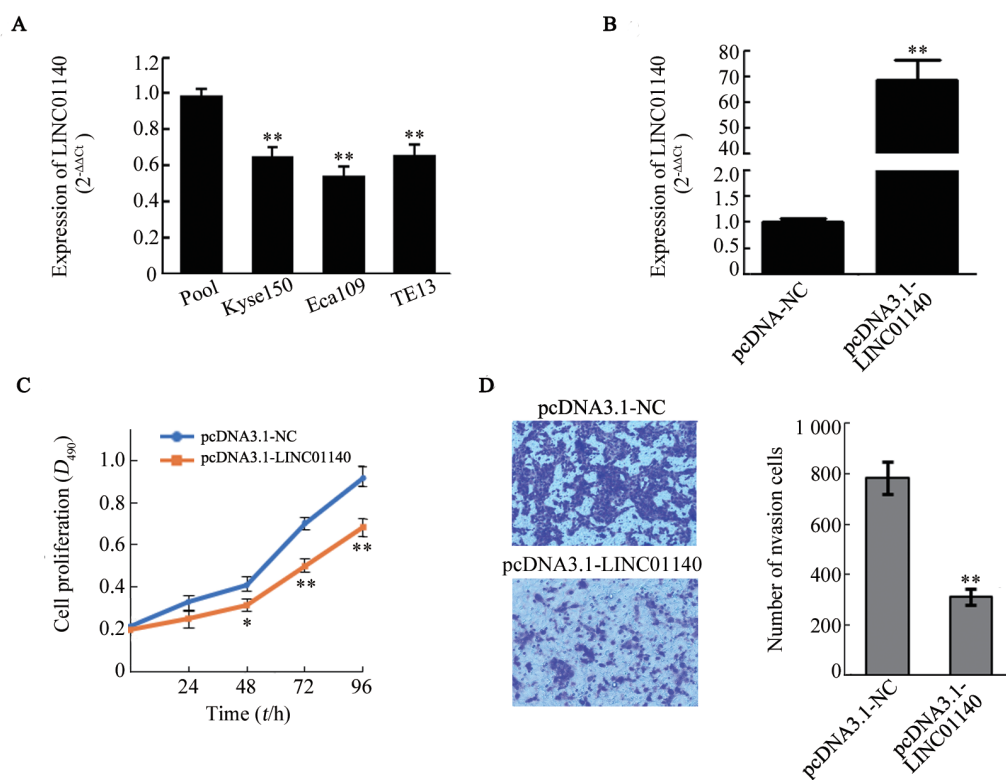


图2 LINC01140 表达水平对 ESCC 患者 OS 的影响
Fig.2 Effect of LINC01140 expression on the OS of ESCC patients

2.4 LINC01140 在 ESCC 细胞中的表达及其对 Eca109 细胞增殖及侵袭能力的影响

随机取 10 例食管正常黏膜组织行 qPCR 法检测组织中 LINC0140 的表达,取 10 例表达量的平均值作为对照组 (Pool)。qPCR 检测结果 (图 3A) 显示, LINC01140 在 ESCC 细胞系 Kyse150、Eca109 和 TE13 中表达水平均显著低于对照组 ($t=10.470, 12.815, 9.149$, 均 $P<0.01$), 尤以 Eca109 细胞中表达水平最低 ($t=12.815, P<0.01$)。

转染 pcDNA3.1-LINC01140 后,与 pcDNA3.1-NC 组比较,转染组 Eca109 细胞中 LINC01140 的表达水平明显升高 ($t=14.479, P<0.01$; 图 3B), 细胞增殖能力明显降低 ($t_{24h}=2.765, P>0.05; t_{48h}=3.544, P<0.05; t_{72h}=-8.184, P<0.01; t_{96h}=5.883, P<0.01$; 图 3C), 细胞侵袭能力明显降低 ($t_{24h}=11.186, P<0.01$; 图 3D)。结果表明, LINC01140 过表达可显著降低 Eca109 细胞的增殖与侵袭能力。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs pcDNA3.1-NC group

A: Relative expression of LINC01140 in ESCC cell lines detected by qPCR (Pool: Average expression in 10 normal tissues was used as normal control); B: The transfection efficiency of pcDNA3.1-LINC01140 detected by qPCR; C: The proliferation of Eca109 cells was detected by MTS assay; D: The effect of LINC01140 on invasiveness of Eca109 cells was detected by Transwell assay (×400)

图3 LINC01140 对 Eca109 细胞增殖及侵袭的影响
Fig.3 The effect of LINC01140 on proliferation and invasion of Eca109 cells

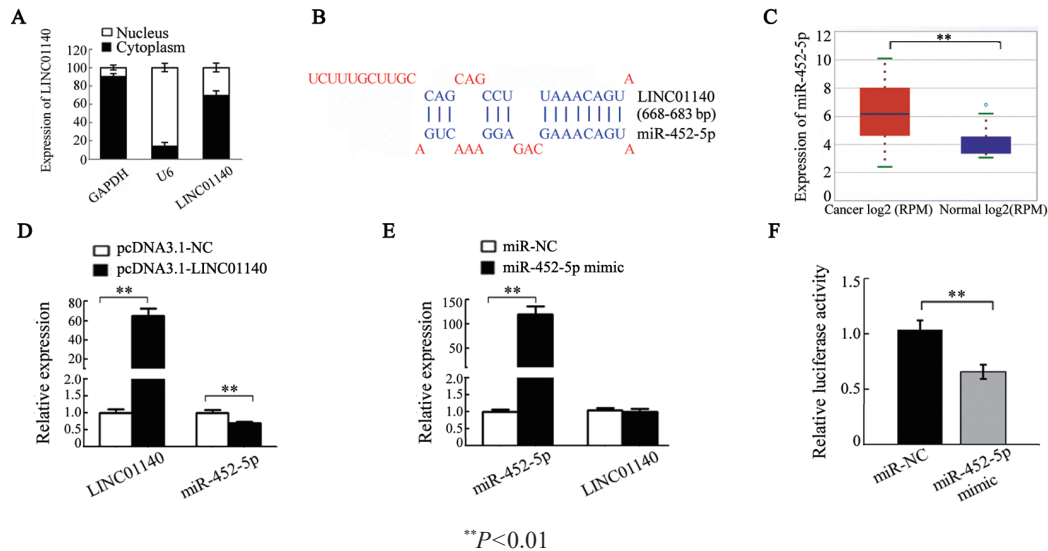
2.5 LINC01140 靶向结合 miR-452-5p 并降低其在 Eca109 细胞中的表达

LINC01140 亚细胞定位结果 (图 4A) 显示, Eca109 细胞中 LINC01140 表达主要分布于的细胞质。在线生

物信息学分析网站 LncBase (http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=lncbase2%2Ffinde) 预测到 miR-452-5p 与 LINC01140 的 3'UTR 区存在结合位点 (图 4B)。进一步探讨了 LINC01140 通

过海绵吸附 miR-452-5p 发挥其作用的可能性。在线工具 Starbase V 3.0 (<https://starbase.sysu.edu.cn/>) 分析显示, miR-452-5p 在食管癌中表达上调(图 4C)。LINC01140 过表达可明显降低 Eca109 细胞中 miR-452-5p 的表达水平($t=5.515, P<0.01$; 图 4D); 而 miR-452-5p 过表达则并不影响 LINC01140 的表达

($t=0.541, P>0.05$; 图 4E)。双荧光素酶报告基因实验结果(图 4F)显示, miR-452-5p 过表达显著降低 pmirGLO-LINC01140 的荧光素酶活性($t=6.250, P<0.01$)。结果表明, LINC01140 可靶向结合 miR-452-5p。



A: The subcellular localization of LINC01140 in Eca109 cells detected by qPCR method; B: The potential binding sites between LINC01140 and miR-452-5p was predicted by LncBase; C: The expression of miR-452-5p was predicted in ESCC patients by StarBase3.0 online tool; D: The regulation of LINC01140 on miR-452-5p expression detected by qPCR method; E: miR-452-5p mimics had no effect on LINC01140 expression in Eca109 cells; F: The effect of miR-452-5p mimics on the luciferase activity of LINC01140 testified by Dual-luciferase reporter assay

图 4 LINC01140 靶向结合 miR-452-5p

Fig.4 Targeted binding between LINC01140 and miR-452-5p

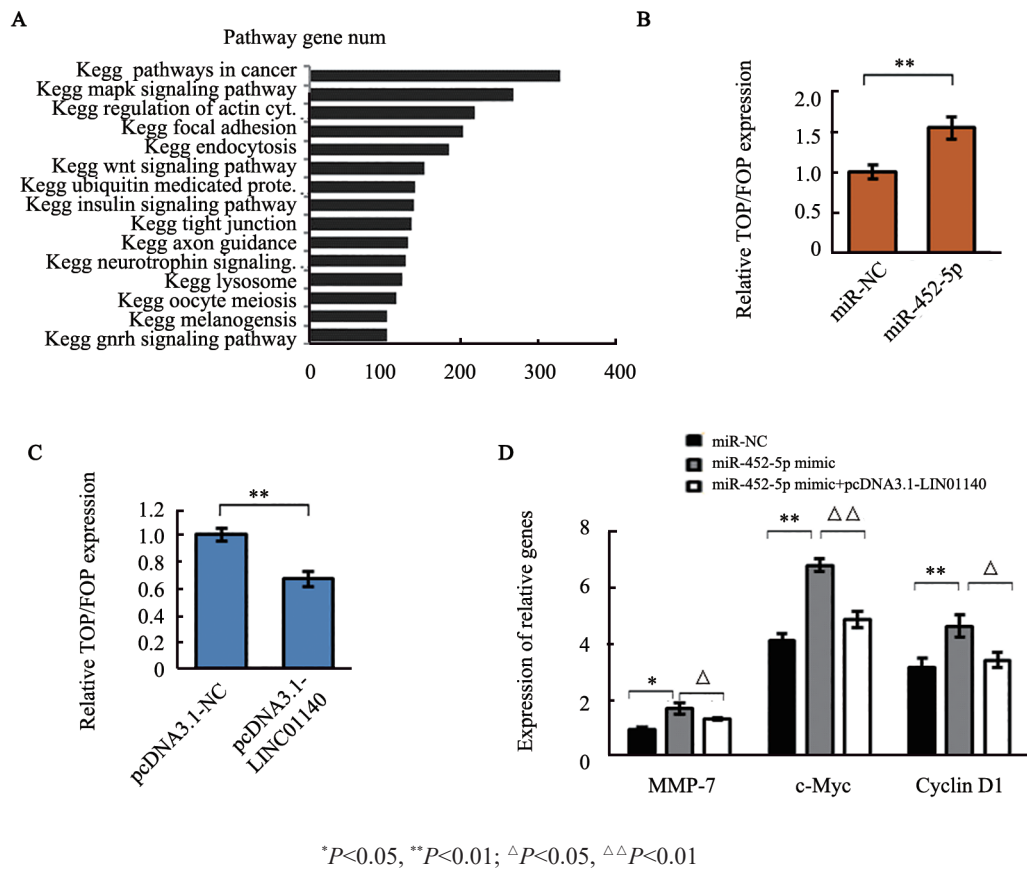
2.6 LINC01140 通过靶向 miR-452-5p 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性

利用 StarBase v3.0 在线工具对 miR-452-5p 下游靶基因进行了 KEGG 通路分析, 结果如图 5A 所示, 其中 Wnt/ β -catenin 信号通路富集了 151 个 miR-452-5p 的下游靶基因。由于该通路在肿瘤发生发展中具有重要作用, 于是进一步探讨了 LINC01140 通过靶向 miR-452-5p 影响该通路活性的可能性。TOP/FOP 荧光素酶报告基因系统检测结果显示, miR-452-5p mimic 显著增强 TOP/FOP 荧光素酶活性($t=-5.902, P<0.01$; 图 5B), 而 LINC01140 过表达可导致 TOP/FOP 荧光素酶活性降低($t=7.476, P<0.01$; 图 5C)。此外, 对 Wnt/ β -catenin 信号通路相关基因检测结果(图 5D)发现, miR-452-5p mimic 明显上调 MMP7、c-Myc 和 cyclin D1 的表达水平($t=-5.884, -14.182, -4.913, 均 P<0.01$), 而 LINC01140 过表达则显著抑制 miR-452-5p 对 c-Myc、MMP7 和 cyclin D1 的上调作用($t=3.120, 8.911, 4.238, P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果表明, LINC01140 通过靶向 miR-452-5p 从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性。

3 讨论

LINC01140 作为一种新的 lncRNA, 在多种肿瘤的发生和发展中起重要作用。LINC01140 具有竞争内源性 RNA (ceRNA) 功能, 可通过 miR-140-5p/FGF9 轴及 miR-199a-3p/ZHX1 轴分别促进膀胱癌^[11]及胶质瘤^[10]的恶性进程; 在对胃癌^[8]及乳腺癌^[9]的研究中也发现, LINC01140 与患者的 OS 率显著相关, 并可能是胃癌及乳腺癌患者预后的潜在标志物。本研究着重探讨了 LINC01140 在 ESCC 细胞增殖、侵袭中的作用及其可能的分子机制。

LINC01140 在 ESCC 组织和细胞系中表达均下调, 并且其低表达与 ESCC 患者的侵袭性临床病理特征密切相关, 包括淋巴结转移、浸润深度和 TNM 分期。同时, 生物学功能检测显示 LINC01140 在体外促进 ESCC 细胞的增殖及侵袭能力。生存分析进一步表明, LINC01140 高表达预示着 ESCC 患者较好的预后。以上结果提示, LINC01140 可能在 ESCC 发生发展过程中发挥着抑癌基因的作用。



A: The KEGG pathway analysis on the target genes of miR-452-5p using StarBase 3.0 online tool; B and C: The effect of miR-452-5p or LINC01140 on the TOP/FOP luciferase activity; D: The effect of miR-452-5p or LINC01140 on the relative genes in Wnt pathway

图5 LINC01140通过靶向miR-452-5p抑制Wnt/ β -catenin信号通路的活性

Fig.5 LINC01140 inhibited the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway via targeting miR-452-5p

为阐明 LINC01140 在 ESCC 中发挥抑癌作用的分子机制,本研究检测了 LINC01140 在 Eca109 细胞的亚细胞分布,结果发现其主要分布在细胞质中,提示其可能在细胞质中通过竞争结合 miRNA 发挥其功能^[12]。通过生物信息学预测发现,miR-452-5p 与 LINC01140 之间存在潜在的结合位点。miR-452-5p 在多数肿瘤中高表达,如肺癌^[13]、肝癌^[14-15]、结肠癌^[16]、肾细胞癌^[17]等,并促进肿瘤的恶性进展。在 ESCC 中 miR-452-5p 则罕有报道,仅见 LIU 等^[18]报道,以食管癌芯片检测发现食管癌组织中 miR-452-5p 表达较癌旁组织明显上调,差异倍数高达 24.59 倍;StarBase v3.0 数据库分析也同样显示,miR-452-5p 在食管癌中表达上调,提示 miR-452-5p 在食管癌中可能发挥促癌基因的功能。本研究细胞实验结果显示,LINC01140 过表达明显降低 Eca109 细胞中 miR-452-5p 的表达水平,结合双荧光报告基因实验进一步证明了 miR-452-5p 与 LINC01140 的结合作用,提示 LINC01140 可能通过结合 miR-452-5p 发挥作用。

KEGG 通路分析显示,Wnt/ β -catenin 通路是下游基

因 miR-452-5p 主要富集的信号通路之一。Wnt/ β -catenin 通路调控细胞的许多生命过程,该通路的异常活化在肿瘤的发生发展中扮演着非常重要的角色。 β -catenin 是 Wnt 通路的中心因子,其入核与转录因子 TCF/LEF 结合形成复合物,共同起始下游靶基因的转录^[19-20]。依据此特性设计的含有数个拷贝的 TCF/LEF 结合位点的 TOP-Flash 质粒及含有突变 TCF/LEF 结合位点的对照质粒 FOP-Flash,可依据荧光素酶表达水平高低反映出 Wnt 通路的活化水平。本研究应用 TOP/FOP 双荧光素酶报告基因检测发现,miR-452-5p mimic 能够明显提高 Wnt 通路的活化水平,而 LINC01140 过表达可使 Wnt 通路活化水平降低。此外,通过对 Wnt/ β -catenin 信号通路基因的检测也同样发现 miR-452-5p mimic 可上调 Wnt 通路相关基因的表达,而 LINC01140 过表达则抑制了 miR-452-5p 对靶基因的上调作用。研究结果表明,LINC01140 通过靶向 miR-452-5p 抑制了 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的活性。

综上所述,本研究揭示了 LINC01140 在 ESCC 组织和细胞中表达下调,LINC01140 高表达抑制了 ESCC 细胞的增殖和侵袭能力,并可通过与 miR-452-5p

的相互作用调控 Wnt/ β -catenin 信号通路影响 ESCC 细胞的恶性进程。LINC01140 有望成为 ESCC 靶向治疗的潜在靶点及预后评估的分子标志物。

[参 考 文 献]

- [1] XU Y P, YU X M, CHEN Q X, et al. Neoadjuvant versus adjuvant treatment: which one is better for resectable esophageal squamous cell carcinoma?[J/OL]. *World J Surg Oncol*, 2012, 10: 173[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3495900/>. DOI:10.1186/1477-7819-10-173.
- [2] 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. DOI:10.1038/nature13176.
- [3] 郭艳丽, 牛云峰, 梁晓亮, 等. TGF- β 诱导的 linc01503 促进食管鳞状细胞癌细胞的增殖、侵袭及 EMT 过程[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(7): 764-769. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.07.007.
- [4] 段玉青, 贾云珑, 王佳丽, 等. lncRNA DGCR5 通过上调 EGFR 表达促进食管鳞状细胞癌 TE1 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(9): 1006-1011. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.09.007.
- [5] FENG B, WANG G Y, LIANG X L, et al. LncRNA FAM83H-AS1 promotes oesophageal squamous cell carcinoma progression via miR-10a-5p/Girdin axis[J/OL]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(16): 8962-8976[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7417701/>. DOI:10.1111/jcmm.15530.
- [6] ZHANG H, CHEN Z H, WANG X X, et al. Long non-coding RNA: a new player in cancer[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 37[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3693878/>. DOI:10.1186/1756-8722-6-37.
- [7] MERCER T R, DINGER M E, MATTICK J S. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3): 155-159. DOI:10.1038/nrg2521.
- [8] SONG P, JIANG B, LIU Z J, et al. A three-lncRNA expression signature associated with the prognosis of gastric cancer patients [J/OL]. *Cancer Med*, 2017, 6(6): 1154-1164[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5463065/>. DOI: 10.1002/cam4.1047.
- [9] LI D H, LI L D, CAO Y Q, et al. Downregulation of LINC01140 is associated with adverse features of breast cancer[J/OL]. *Oncol Lett*, 2020, 19(2): 1157-1164[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6955654/>. DOI:10.3892/ol.2019.11147.
- [10] XIN Y C, ZHANG W Z, MAO C C, et al. LncRNA LINC01140 inhibits glioma cell migration and invasion via modulation of miR-199a-3p/ZHX1 axis[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 1833-1844[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7053821/>. DOI: 10.2147/OTT.S230895.
- [11] WU S Q, XU R, ZHU X, et al. The long noncoding RNA LINC01140/miR-140-5p/FGF9 axis modulates bladder cancer cell aggressiveness and macrophage M2 polarization[J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(24): 25845-25864[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7803526/>. DOI:10.18632/aging.202147.
- [12] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?[J/OL]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3235919/>. DOI:10.1016/j.cell.2011.07.014.
- [13] GAN X N, GAN T Q, HE R Q, et al. Clinical significance of high expression of miR-452-5p in lung squamous cell carcinoma[J/OL]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 6418-6430[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5876433/>. DOI:10.3892/ol.2018.8088.
- [14] YANG W, JU H Y, TIAN X F. Circular RNA-ABCB10 suppresses hepatocellular carcinoma progression through upregulating NRP1/ABL2 via sponging miR-340-5p/miR-452-5p[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(5): 2347-2357. DOI: 10.26355/eurrev_202003_20501.
- [15] ZHENG J X, CHENG D M, WU D Y, et al. MiR-452-5p mediates the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via targeting COLEC10[J]. *Per Med*, 2021, 18(2): 97-106. DOI:10.2217/pme-2020-0027.
- [16] LIN X, HAN L, GU C C, et al. MiR-452-5p promotes colorectal cancer progression by regulating an ERK/MAPK positive feedback loop[J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(5): 7608-7626[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7993669/>. DOI:10.18632/aging.202657.
- [17] ZHAI W, LI S Y, ZHANG J, et al. Sunitinib-suppressed miR-452-5p facilitates renal cancer cell invasion and metastasis through modulating SMAD4/SMAD7 signals[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 157[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6231268/>. DOI:10.1186/s12943-018-0906-x.
- [18] LIU S G, QIN X G, ZHAO B S, et al. Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue[J/OL]. *Oncol Lett*, 2013, 5(5): 1639-1642[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3678876/>. DOI:10.3892/ol.2013.1251.
- [19] KRISHNAMURTHY N, KURZROCK R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: update on effectors and inhibitors[J/OL]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 62: 50-60[2021-05-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5745276/>. DOI:10.1016/j.ctrv.2017.11.002.
- [20] ZHAN T, RINDTORFF N, BOUTROS M. Wnt signaling in cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(11): 1461-1473. DOI:10.1038/onc.2016.304.

[收稿日期] 2021-05-23

[修回日期] 2021-09-01

[本文编辑] 党瑞山