

长链非编码 RNA ANO1-AS1 对食管鳞癌 细胞增殖及凋亡的影响

邵生辉¹, 张 健¹, 彭雅琼¹, 向 辉², 赵 敏², 谢元茂², 郑 勇², 陈卫刚²

摘要 **目的** 探讨长链非编码 RNA(LncRNA) 钙离子激活氯离子通道蛋白 1 反义 RNA1(ANO1-AS1) 对食管鳞癌(ESCC) 细胞增殖和凋亡的影响及其可能的机制。**方法** 在 ESCC 细胞 TE-1 和 EC109 中转染沉默 ANO1-AS1 慢病毒, qRT-PCR 检测其和钙离子激活氯离子通道蛋白 1(ANO1) 表达情况。CCK-8 实验和平板克隆形成实验检测增殖能力; 通过 LinkedOmics 数据库获取 ANO1 正相关表达基因集并进行通路富集及可能通路的验证; Western blot 检测增殖细胞核抗原(PCNA)、抑癌基因 P53 蛋白、促凋亡蛋白(Bax)、抑凋亡蛋白(Bcl-2)、ANO1 蛋白和磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt) 通路相关蛋白的表达情况。**结果** 转染沉默慢病毒后, ANO1-AS1 的表达减低($P < 0.05$); 与阴性对照组相比, 下调 ANO1-AS1 后 ESCC 细胞增殖能力降低($P < 0.05$), 克隆形成率下降($P < 0.05$); Western blot 结果显示, 实验组 PCNA 和 Bcl-2 蛋白表达降低($P < 0.05$), P53 和 Bax 蛋白表达升高($P < 0.05$), 通路蛋白 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平降

低($P < 0.05$)。**结论** 沉默 ANO1-AS1 可能通过影响 PI3K/Akt 通路活性从而降低 ESCC 细胞的增殖能力并促使其发生凋亡。

关键词 长链非编码 RNA; ANO1-AS1; 食管鳞癌; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1578-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.013

目前, 我国仍是食管癌发病率最高的国家^[1]。食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 是食管癌最常见的组织学亚型^[2]。由于 ESCC 起病晚, 缺乏早期疾病标志物, 通常被诊断已为晚期, 其总的 5 年生存率仅有 20% 左右^[3]。研究^[4-5]显示, 食管癌的发生发展与基因的表达失衡密切相关, 因此, 探寻与其相关的分子标志物, 对食管癌的防治具有一定意义。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA) 因其转录本长度超过 200 个核苷酸且不编码蛋白质而得名^[6]。近年来, 大量 LncRNA 被发现并证实参与肿瘤的多项生理和病理过程^[7]。课题组前期通过基因芯片技术, 发现食管鳞癌组织中有大量 LncRNAs 存在异常表达, 其中钙离子激活氯离子通道蛋白 1 反义 RNA1(anoctamin 1 antisense RNA-1, ANO1-AS1) 在 ESCC 组织中表达上调^[8]。目前 ANO1-AS1 在食管癌中的作用鲜有报道, 为探究该基因在食管癌中所发挥的功能, 该研究通过转染沉默慢病毒下调食管癌细胞 TE-1 和

2022-05-26 接收

基金项目: 中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(编号:2020-PT330-003); 国家重点研发计划项目(编号:2016YFC1303601); 兵团财政科技计划项目(编号:2020CB002); 石河子大学成果转化与技术推广计划项目(编号:CGZH201704)

作者单位:¹ 石河子大学医学院, 石河子 832000;

² 石河子大学医学院第一附属医院消化内科, 石河子 832008

作者简介: 邵生辉, 男, 硕士研究生;

陈卫刚, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: cwg_sh@126.com

GABA inhibitory axons. **Results** Prethalamic GABA cells were adjacent to the FGF3 + hypothalamas, located above the hypothalamus. DiI tracing experiments revealed that prethalamic GABA inhibitory axons had already extended into the thalamus at E6. Compared with the blank control group, FGF3 not only significantly promoted the growth of prethalamic GABA inhibitory nerve fibers in the prethalamus, but also repelled the newborn prethalamic axons to the dorsal thalamus. The number of prethalamic axons was significantly less in proximal section (towards FGF3 beads) than that in distal section (away from FGF3 beads) ($P < 0.01$). Moreover, the guidance effects of FGF3 on prethalamic axons could be blocked by the FGF pathway inhibitor SU5402. **Conclusion** FGF3, an axon guidance molecule expressed in hypothalamus, exerts guidance effects on the pathway selection of adjacent prethalamic GABA inhibitory nerve fibers.

Key words FGF3; GABA neurons; axon guidance

EC109 中 ANO1-AS1 的表达,观察食管癌细胞增殖及凋亡等生物学功能的变化并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人食管鳞状细胞癌细胞株(TE-1、EC109)由石河子大学医学院新疆地方与民族高发疾病重点实验室留存。

1.1.2 主要试剂 沉默慢病毒由上海吉玛制药技术有限公司制备;胎牛血清购自以色列 BI 公司;高糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;双抗及胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自上海生物工程技术有限公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;反转录试剂盒购自美国 Thermo 公司;引物均购自上海生工生物工程股份有限公司;qRT-PCR 试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;CCK-8 试剂盒购自日本东仁公司;Bcl-2 和 Bax 兔抗人单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;其他兔抗人多克隆抗体购自美国 CST 公司;小鼠抗人 β -actin 抗体、山羊抗兔 IgG 二抗、山羊抗小鼠 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 荧光倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;酶联免疫检测仪、垂直电泳槽、电泳仪、电转印仪均购自美国 Bio-Rad 公司;全自动化学发光成像仪购自上海天能科技有限公司;梯度 PCR 仪器购自日本 Takara 公司;实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司。

1.2 细胞培养与转染筛选 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液的高糖 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂、湿度 95% 的培养箱内进行培养。待细胞融合度达到 80% ~ 90% 时进行传代、冻存或功能实验。细胞转染所用沉默 ANO1-AS1 慢病毒载体和空载体浓缩液由上海吉玛制药技术有限公司制备完成。其中 sh-ANO1-AS1 序列为 5'-GGAACCG-GAATCAATCATTAT-3', sh-NC 序列为 5'-TTCTC-CGAACGTGTCACGT-3'。参照吉玛基因慢病毒使用手册进行慢病毒转染,嘌呤霉素筛选后传代保存稳转株并进行下一步实验。分组情况:sh-ANO1-AS1(实验组)即转染沉默 ANO1-AS1 慢病毒载体;sh-NC(阴性对照组)即转染沉默慢病毒空载体;Blank(空白对照组)即未转染慢病毒。

1.3 总 RNA 提取及 qRT-PCR 用 TRIzol 试剂裂解各组细胞,提取细胞总 RNA,参照反转录试剂盒说明书合成 cDNA,按 SYBR Green PCR 试剂盒说明

进行 qRT-PCR 检测。引物序列见表 1, β -actin 为内参。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量。

表 1 引物序列

基因名称	序列
ANO1-AS1	F:5'-CCAGTCCACAAAGTCGCTCA-3' R:5'-AGAGGTCAGGAGCACTTCCC-3'
ANO1	F:5'-GCTGTCTGGCCAGGCTTT-3' R:5'-CATCAGCCAGCAGATCCACA-3'
β -actin	F:5'-AACCCTGGGAGGAGATGACCCAG-3' R:5'-GGATAGCACAGCCTGGATAGCA-3'

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力 按分组消化收集细胞,计数按分组以 2 000 个/孔接种于 96 孔板,每组设置 5 个复孔。培养 0、24、48、72、96 h 时,在每孔中加入 10 μ l CCK-8 试剂,继续培养箱孵育 2 h,用酶联免疫检测仪测量各孔 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)值。

1.5 平板克隆形成实验 按分组收集细胞并计数,接种于 6 孔板中(300 个/孔),每 2 ~ 3 d 换液,培养 12 ~ 14 d。当出现肉眼可见的克隆时,使用 PBS 洗涤细胞 2 ~ 3 次,用 4% 多聚甲醛固定 45 min,结晶紫染色 20 min,大于 50 个细胞为 1 个克隆,显微镜下计数克隆形成数并计算克隆形成率。

1.6 Western blot 收集细胞并提取细胞总蛋白,加入上样缓冲液混匀,100 °C 煮 10 min 变性,取 8 ~ 10 μ l 上样,根据目的蛋白制备适宜浓度 SDS-PAGE 胶进行电泳,转至 PVDF 膜上,5% BSA 室温封闭 3 h,加入一抗(1:1 000 稀释),4 °C 摇床过夜,洗膜后加入二抗(1:20 000 稀释),室温孵育 1 h。洗膜后加入化学发光液使用化学发光成像仪进行曝光。 β -actin 蛋白条带作为内参对照。采用 Image J 软件测算各蛋白条带灰度值。

1.7 LinkedOmics 数据库 LinkedOmics 数据库(www.linkedomics.org)是利用 TCGA 数据库进行在线分析的工具。具体步骤:① 肿瘤类型:TCGA_ESCA;② 数据类型:RNAseq;③ 目的基因名:ANO1;④ 靶标数据类型:RNAseq;⑤ 统计方法:Pearson 相关性分析,即可获取 ANO1 正相关表达基因集,选择 GSEA 富集分析工具,对 ANO1 正相关基因进行 KEGG pathway 富集,FDR 值小于 0.05 的纳入条件。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布数据三组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法,不符合正态分布则采用非参数秩和检验。以 P

<0.05 为差异有统计学意义。

组,差异有统计学意义 ($F = 26.584, P = 0.001$), 见图 2A、2B。

2 结果

2.1 转染沉默慢病毒后 ANO1-AS1 的表达降低

在食管癌 EC109 和 TE-1 细胞株中转染 ANO1-AS1 沉默慢病毒后,通过 qRT-PCR 验证各组沉默效率。结果如图 1 所示,TE-1 和 EC109 两组细胞中 sh-ANO1-AS1 组 ANO1-AS1 表达水平均低于 sh-NC 组及 Blank 组,差异有统计学意义 ($F = 109.957, P < 0.001; F = 94.943, P < 0.001$)。

2.2 沉默 ANO1-AS1 可抑制食管癌细胞增殖和克隆形成能力

CCK-8 实验结果显示,转染沉默慢病毒后,TE-1 细胞系 sh-ANO1-AS1 组从 24 h 开始 OD 值较 sh-NC 组及 Blank 组减小,差异有统计学意义 ($F = 149.835, P < 0.001$);EC109 细胞系 sh-ANO1-AS1 组 OD 值从 24 h 开始低于 sh-NC 组及 Blank

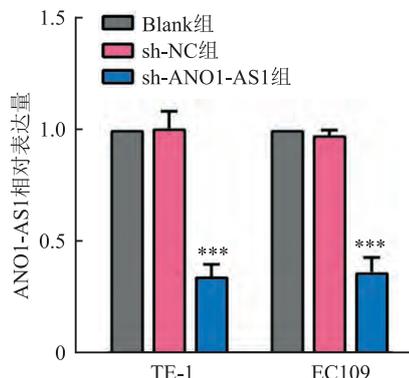


图 1 qRT-PCR 检测转染沉默慢病毒后食管癌细胞中 ANO1-AS1 的表达与 sh-NC 组比较; *** $P < 0.001$

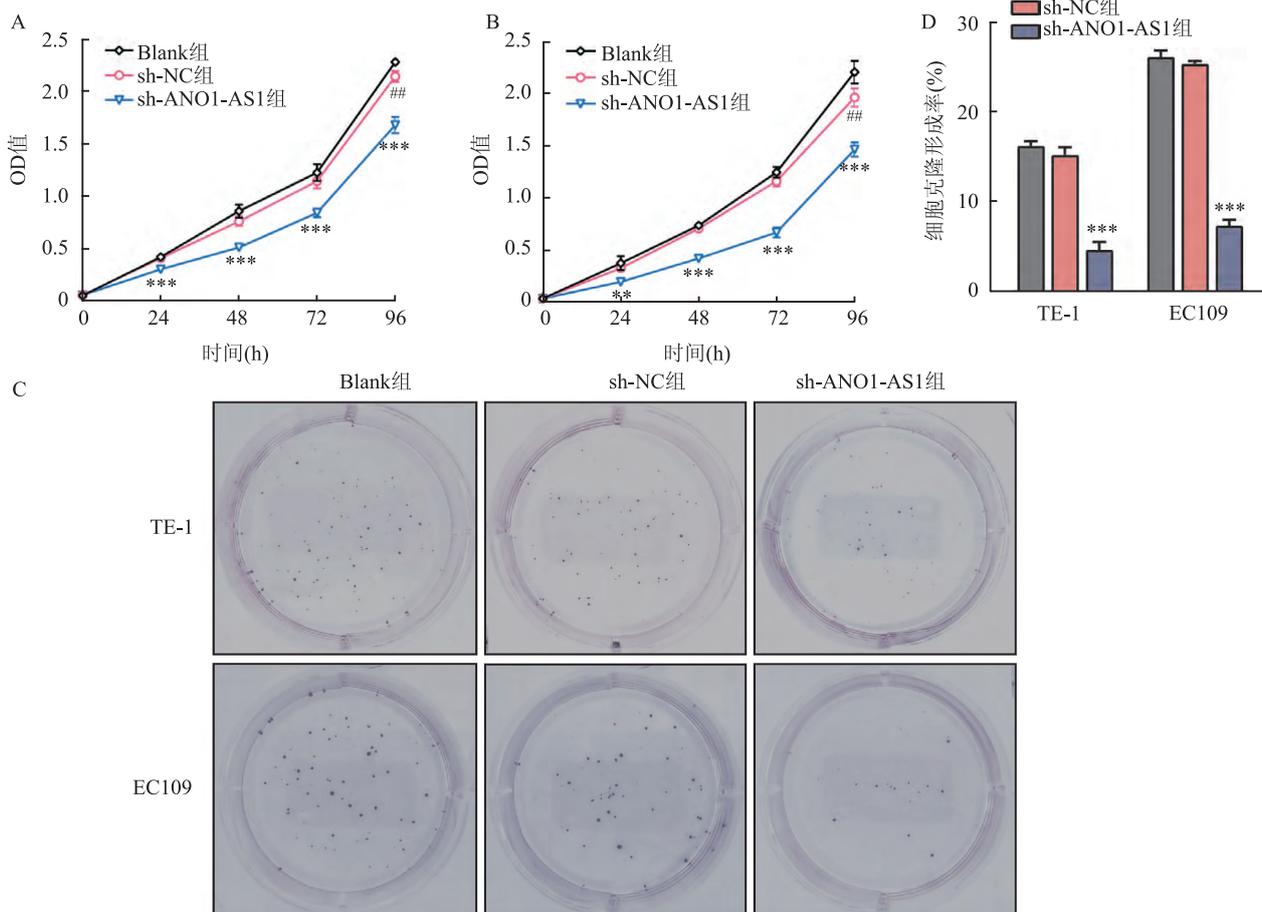


图 2 敲低 ANO1-AS1 对食管癌细胞 TE-1 和 EC109 增殖的影响

A;CCK-8 法检测 TE-1 细胞系各组细胞增殖情况;B;CCK-8 法检测 EC109 细胞系各组细胞增殖情况;C、D;TE-1 及 EC109 两细胞系各组细胞克隆形成情况;与 sh-NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 Blank 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

平板克隆形成实验结果显示,沉默 ANO1-AS1 后,TE-1 细胞系 sh-ANO1-AS1 组克隆形成率低于 sh-NC 组和 Blank 组,差异有统计学意义($F = 211.858, P < 0.001$);同样,EC109 细胞系 sh-ANO1-AS1 组克隆形成率低于 sh-NC 组及 Blank 组,差异有统计学意义($F = 979.284, P < 0.001$),见图 2C、2D。

2.3 敲低 ANO1-AS1 表达对 PCNA 及 P53 蛋白表达的影响 Western blot 检测沉默 ANO1-AS1 后,PCNA 和 P53 蛋白的表达情况,结果显示,与 sh-NC 组及 Blank 组相比,TE-1 和 EC109 两细胞系中 sh-ANO1-AS1 组 PCNA 的表达减少($F = 241.638, P < 0.001$; $F = 500.044, P < 0.001$),P53 的表达增加($F = 141.118, P < 0.001$; $F = 205.268, P < 0.001$),sh-NC 组及 Blank 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。

2.4 下调 ANO1-AS1 对凋亡相关蛋白的影响

Western blot 检测沉默 ANO1-AS1 后细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达变化,结果显示 TE-1 和 EC109 两细胞系中,与 sh-NC 组及 Blank 组相比,sh-ANO1-AS1 组 Bax 表达增加,差异均有统计学意义

($F = 652.139, P < 0.001$; $F = 28.672, P = 0.001$);与 sh-NC 组及 Blank 组相比,两细胞系 sh-ANO1-AS1 组 Bcl-2 的表达均减少,差异有统计学意义($F = 206.288, P < 0.001$; $F = 55.445, P < 0.001$),见图 4。

2.5 沉默 ANO1-AS1 后 ANO1 的表达降低 qRT-PCR 及 Western blot 结果均显示:沉默 ANO1-AS1 后,TE-1 细胞系 sh-ANO1-AS1 组 ANO1 的 mRNA 及蛋白表达低于 sh-NC 组及 Blank 组,差异有统计学意义($F = 55.766, P < 0.001$; $F = 1183.685, P < 0.001$);同样,EC109 细胞系 sh-ANO1-AS1 组 ANO1 的表达低于 sh-NC 组及 Blank 组,差异有统计学意义($F = 170.199, P < 0.001$; $F = 191.339, P < 0.001$),见图 5。

2.6 ANO1 正相关基因及相关通路富集 通过 LinedOmics 在线数据库,筛选到食管癌数据集中与 ANO1 表达正相关基因,并根据相关性由高到低进行排序并展示 Pearson 相关系数 > 0.5 的基因(图 6A)。通过 GSEA 富集分析工具,对 ANO1 正相关表达的基因可能调节的通路进行富集(图 6B),并选择 PI3K/Akt 通路进行验证。

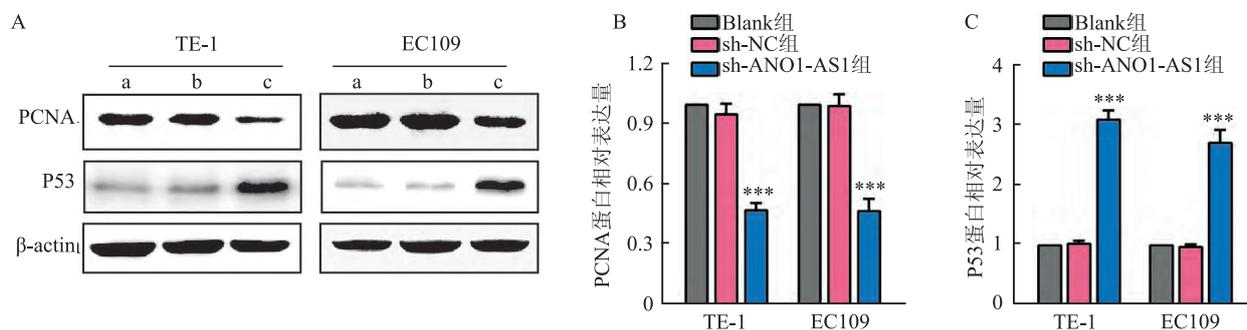


图3 下调 ANO1-AS1 对食管癌细胞 TE-1 和 EC109 中 PCNA 和 P53 蛋白表达的影响

A: Western blot 检测两细胞系各组 PCNA 和 P53 蛋白表达情况;B: PCNA 蛋白相对表达量;C: P53 蛋白相对表达量;a: Blank 组;b: sh-NC 组;c: sh-ANO1-AS1 组;与 sh-NC 组比较:*** $P < 0.001$

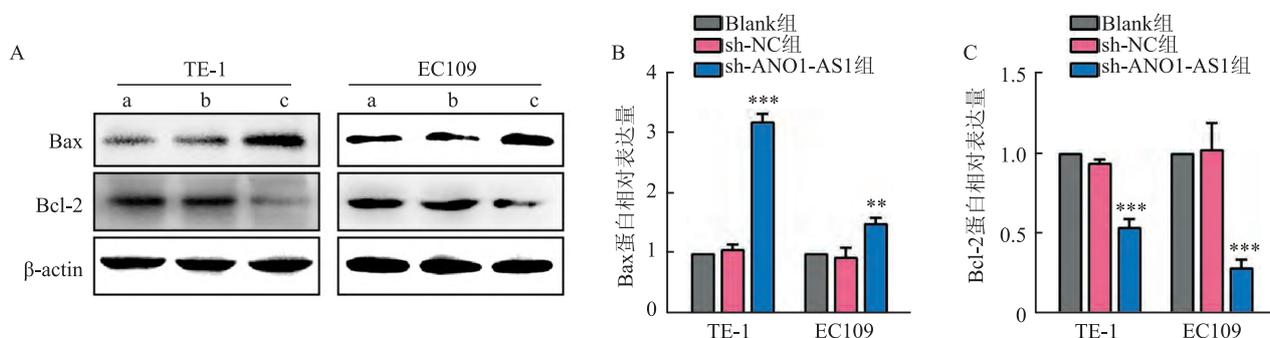


图4 沉默 ANO1-AS1 对食管癌细胞 TE-1 和 EC109 凋亡相关蛋白表达的影响

A: Western blot 检测两细胞系各组细胞 Bax 和 Bcl-2 的表达;B: Bax 蛋白相对表达量;C: Bcl-2 蛋白相对表达量;a: Blank 组;b: sh-NC 组;c: sh-ANO1-AS1 组;与 sh-NC 组比较:** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

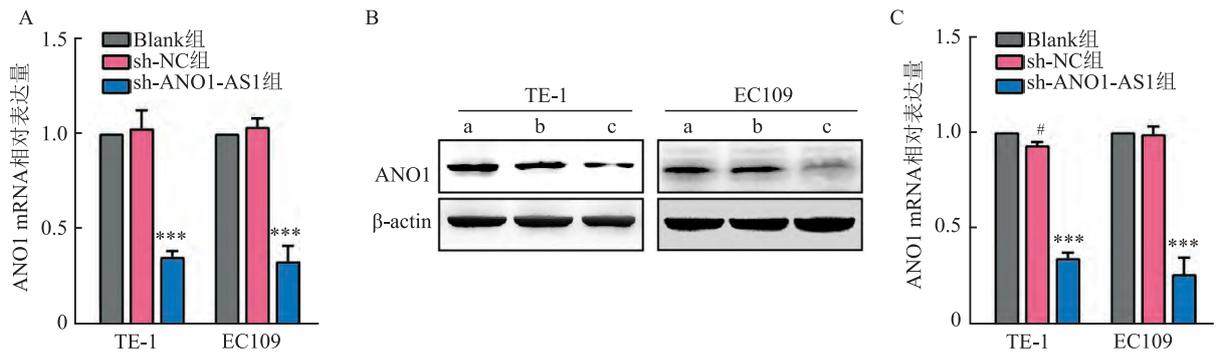


图5 沉默 ANO1-AS1 表达后 ANO1 表达降低

A: qRT-PCR 检测下调 ANO1-AS1 后 TE-1 和 EC109 细胞中 ANO1 mRNA 的表达; B: Western blot 检测下调 ANO1-AS1 后 TE-1 和 EC109 细胞中 ANO1 蛋白的表达; C: ANO1 蛋白相对表达量; a: Blank 组; b: sh-NC 组; c: sh-ANO1-AS1 组; 与 sh-NC 组比较: *** $P < 0.001$; 与 Blank 组比较: # $P < 0.05$

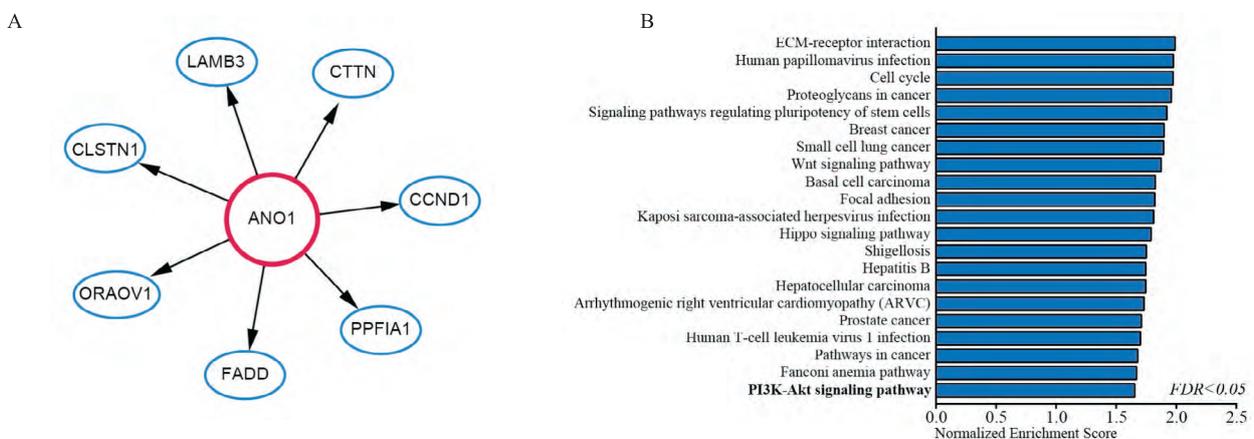


图6 LinedOmics 在线数据库食管癌中 ANO1 正相关表达基因 (A) 和 GSEA 通路富集情况 (B)

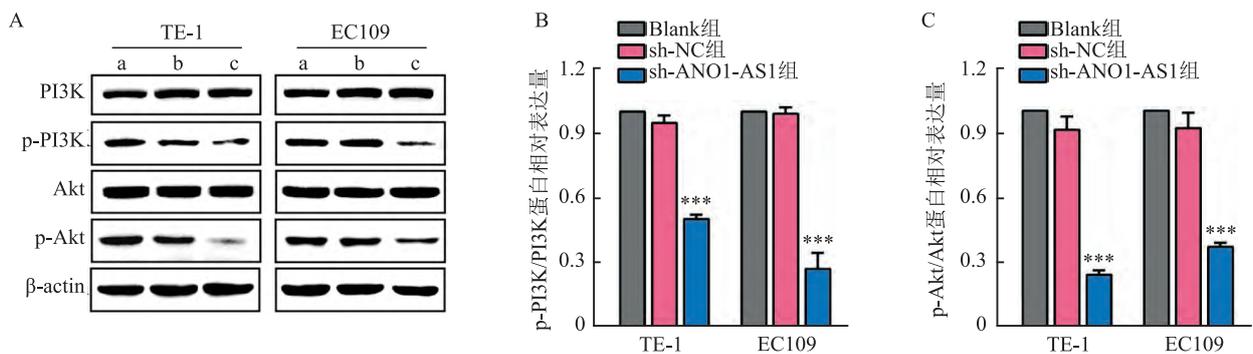


图7 下调 ANO1-AS1 表达对 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

A: Western blot 检测两细胞系各组细胞 PI3K/Akt 通路相关蛋白的表达; B: PI3K 蛋白磷酸化水平 (p-PI3K/PI3K); C: Akt 蛋白磷酸化水平 (p-Akt/Akt); a: Blank 组; b: sh-NC 组; c: sh-ANO1-AS1 组; 与 sh-NC 组比较: *** $P < 0.001$

2.7 敲低 ANO1-AS1 可能影响 PI3K/Akt 通路蛋白的表达 Western blot 检测沉默 ANO1-AS1 后, PI3K/Akt 通路蛋白的表达和磷酸化修饰情况, 结果显示: 下调 ANO1-AS1 后, TE-1 及 EC109 两细胞系中均发现, 与 sh-NC 组及 Blank 组相比, sh-ANO1-AS1 组 PI3K 和 Akt 蛋白磷酸化水平均降低, 差异有

统计学意义 ($F = 536.088, P < 0.001$; $F = 418.073, P < 0.001$), 见图 7。

3 讨论

近年来, 大量研究证实, 非编码 RNA 的异常表达与 ESCC 等消化道肿瘤的发生发展密切相关, 并

在其增殖、转移、凋亡等多种生物学过程中发挥重要作用^[9-10],其中包括许多反义 LncRNA^[7],例如:KRüppel 样因子 3 反义 RNA 1 (KLF3-AS1^[11]) 在 ESCC 表达上调从而使其正义链 KLF3 发生激活,进而抑制食管癌细胞的迁移和侵袭。锌指蛋白 667 反义 RNA 1 (ZNF667-AS1^[12]) 与其正义链 ZNF667 在食管癌中均高表达,并抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭,ZNF667-AS1 的过度表达增加了 ZNF667 的 mRNA 和蛋白表达水平。本课题组通过芯片筛选发现多个 LncRNAs 在 ESCC 中表达上调^[8],其中高表达的 ANO1-AS1 在 ESCC 中发挥何种生物学功能尚无明确报道,故本研究通过体外实验进行了探究。

ANO1-AS1 位于人类染色体 11q13.3 上,大小为 722 个碱基,由钙离子激活氯离子通道蛋白 1 (anoctamin 1, ANO1) 基因反义链转录,为 ANO1 的反义 LncRNA。Yu et al^[13] 发现,ANO1 在 ESCC 中表达上调。有研究^[14] 证实敲除 ESCC 细胞系中的 ANO1 可抑制细胞增殖、诱导凋亡和减少肿瘤生长。ANO1-AS1 的异常表达,提示其可能在 ESCC 的发生发展中发挥重要作用。为了进一步探究其对 ESCC 细胞生物学功能的影响,本研究同时向 ESCC 细胞系 TE-1 和 EC109 中转染沉默 ANO1-AS1 慢病毒抑制其表达水平并在此基础上进行后续功能学实验。结果显示,下调 ANO1-AS1 后,TE-1 及 EC109 ESCC 细胞增殖能力及克隆形成能力降低。PCNA 是肿瘤细胞异常增殖的标志性蛋白,可反映肿瘤细胞增殖情况;P53 则为抑癌基因,其失活将导致细胞获得无限增殖能力,从而发生恶性癌变。本研究表明,沉默 ANO1-AS1 后,PCNA 蛋白表达降低,同时抑癌基因 P53 蛋白表达升高,进一步证明敲除 ANO1-AS1, ESCC 细胞的增殖能力受到抑制。同时,下调 ANO1-AS1 后,ESCC 细胞中促凋亡蛋白 Bax 表达增加,而抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低,说明沉默 ANO1-AS1 可能促进食管癌细胞发生凋亡。本研究还发现,下调 ANO1-AS1 的表达,ANO1 的 mRNA 和蛋白表达均降低。以上结果提示,ANO1-AS1 可能发挥促癌基因作用,影响 ESCC 细胞的增殖和凋亡,且 ANO1-AS1 与 ANO1 存在正相关表达。

有研究^[14] 显示,高表达的 ANO1 通过激活 EGF 受体(EGFR)和钙调素依赖性蛋白激酶 II (CAMK II),从而诱导 Akt 和丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK) 信号的激活,促进 ESCC 的发生。为进一步探究 ANO1-AS1 在 ESCC 细胞中发挥功能的可能机制,本研究通过对食管癌中与 ANO1 正相关表达

的基因进行通路富集,结果提示可能影响 PI3K/Akt 信号通路。活化的 PI3K 通过刺激其下游因子 Akt 来调节细胞的存活、增殖及代谢等过程。通过体内实验证实,该通路的 PI3K、Akt 及 mTOR 等关键分子在 ESCC 中均有高表达和激活^[15]。本研究显示,沉默 ANO1-AS1 后,PI3K 及 Akt 蛋白磷酸水平下降,提示 PI3K/Akt 信号通路活性降低。以上结果提示抑制 ANO1-AS1 表达可能影响 PI3K/Akt 通路的活化进而降低 ESCC 细胞增殖能力,促进其发生凋亡。结合以上结果,推测其作用机制有以下可能:① ANO1-AS1 本身具有直接调控 PI3K/Akt 信号通路关键分子表达和磷酸化修饰的作用进而影响食管癌生物学行为;② ANO1-AS1 与 ANO1 两者之间存在直接或间接调控作用进而调节通路活性影响食管癌进程。这为 ANO1-AS1 在 ESCC 中作用机制的进一步研究提供了方向。

综上所述,抑制 ANO1-AS1 可能影响 PI3K/Akt 通路活性从而降低 ESCC 细胞增殖能力,诱导其发生细胞凋亡。提示 ANO1-AS1 可能通过影响 ESCC 的增殖及凋亡,发挥促癌基因作用,为 ANO1-AS1 的进一步研究及 ESCC 的早期诊治提供一定理论依据。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] Lagergren J, Smyth E, Cunningham D, et al. Oesophageal cancer [J]. *Lancet*, 2017, 390(10110): 2383-96.
- [3] Huang L M, Yang W J, Huang Z Y, et al. Artificial intelligence technique in detection of early esophageal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(39): 5959-69.
- [4] Zhao Y, Gao J, Xie X, et al. BACH1 promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma by inducing the epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(10): 3413-26.
- [5] Li J, Jin C, Sun L, et al. HDAC2 enhances esophageal squamous cell carcinoma development through down-regulating microRNA-503-5p and promoting CXCL10 [J]. *Clin Epigenetics*, 2021, 13(1): 96.
- [6] Kopp F, Mendell J T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393-407.
- [7] Zhao Y, Teng H, Yao F, et al. Challenges and strategies in ascribing functions to long noncoding RNAs [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(6): 1458.
- [8] 李光华, 郑勇, 史贵军, 等. 新疆汉族食管鳞癌差异表达长

- 链非编码 RNA 的筛选与分析[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(11): 1805-10.
- [9] 向辉, 唐明, 李阳, 等. miR-664b-5p 对食管癌细胞 EC9706 和 TE-1 生物学行为的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(11): 1746-53.
- [10] Luan S, Yang Y, Zhou Y, et al. The emerging role of long non-coding RNAs in esophageal carcinoma: from underlying mechanisms to clinical implications[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(7): 3403-22.
- [11] Liu J Q, Deng M, Xue N N, et al. lncRNA KLF3-AS1 suppresses cell migration and invasion in ESCC by impairing miR-185-5p-targeted KLF3 inhibition[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20: 231-41.
- [12] Dong Z, Li S, Wu X, et al. Aberrant hypermethylation-mediated downregulation of antisense lncRNA ZNF667-AS1 and its sense gene ZNF667 correlate with progression and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 930.
- [13] Yu Y, Cao J, Wu W, et al. Genome-wide copy number variation analysis identified ANO1 as a novel oncogene and prognostic biomarker in esophageal squamous cell cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(10): 1198-208.
- [14] Britschgi A, Bill A, Brinkhaus H, et al. Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(11): E1026-34.
- [15] Shi N, Yu H, Chen T. Inhibition of esophageal cancer growth through the suppression of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 7637-47.

Effect of long non-coding RNA ANO1-AS1 on proliferation and apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma cells

Shao Shenghui¹, Zhang Jian¹, Peng Yaqiong¹, Xiang Hui², Zhao Min²,
Xie Yuanmao², Zheng Yong², Chen Weigang²

(¹School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000; ²Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008)

Abstract Objective To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA) anoctamin 1 antisense RNA-1 (ANO1-AS1) on the proliferation and apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells and its possible mechanisms. **Methods** Silenced ANO1-AS1 lentivirus was transfected in ESCC cells TE-1 and EC109. Subsequently, the expression levels of ANO1-AS1 and calcium-activated chloride channel protein 1 (ANO1) in the cells were detected by qRT-PCR. CCK-8 and colony formation assays were used to detect the proliferation of TE-1 and EC109 cells. ANO1 positively related expressed genes were obtained from the LinkedOmics database and then the gene set was enriched for pathways and possible pathways were validated. The expression levels of proliferating cell nuclear antigen(PCNA), P53 protein, apoptosis-related protein (Bax and Bcl-2), ANO1 protein and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway-related protein were assessed by Western blot. **Results**

After transfection of lentivirus with silent expression function, the expression level of ANO1-AS1 was significantly reduced in TE-1 and EC109 cells ($P < 0.05$); After down-regulation of ANO1-AS1, compared with the negative control group, the proliferation ability of ESCC cells was reduced ($P < 0.05$) and the rate of clone formation decreased ($P < 0.05$); Western blot results showed that, compared with negative controls, the expression of PCNA decreased, the expression of oncogene P53 protein increased ($P < 0.05$), the expression of proteins (Bax) increased, Bcl-2 decreased and the levels of phosphorylation of the pathway proteins PI3K and Akt decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Knockdown of ANO1-AS1 can decrease proliferation and promote apoptosis in ESCC, which may be achieved by affecting PI3K/Akt pathway activation.

Key words long non-coding RNA; ANO1-AS1; esophageal squamous cell carcinoma; proliferation; apoptosis