DOI:10.16016/j.1000-5404.202008083

敲低长链非编码 RNA GK-IT1 抑制食管鳞状癌细胞增殖和促进凋亡

杨 鑫,陈 力 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心胸外科

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)GK-IT1 在食管鳞状癌细胞株中的表达及对食管鳞状癌细胞株增殖行为的影响。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测 27 对食管鳞状癌组织和癌旁正常组织中 lncRNA GK-IT1 的表达。针对 lncRNA GK-IT1 设计构建小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA),在 TE1 细胞中转染构建 GK-IT1 敲低模型。采用细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)检测细胞增殖能力,流式细胞仪检测细胞周期的变化,Western blot 实验验证细胞周期相关蛋白的表达变化。**结果** 食管鳞状癌组织中 lncRNA GK-IT1 的表达量明显高于癌旁组织($P<0.01$)。在 TE1 和 TE10 细胞中,通过转染,成功构建了敲低 lncRNA GK-IT1 的细胞表达载体。平板克隆实验、EDU 实验以及 CCK-8 实验结果显示,与对照组相比,敲低 lncRNA GK-IT1 能够显著抑制细胞的增殖($P<0.01$)。流式细胞检测结果发现敲低 lncRNA GK-IT1 能够增加细胞的凋亡($P<0.01$)。使用荧光原位杂交实验探究 lncRNA GK-IT1 的亚细胞定位,发现 GK-IT1 主要分布在细胞质。流式细胞检测结果发现敲低 lncRNA GK-IT1 能够引起 TE-1、TE-10 细胞 G_1/S 期阻滞。通过生物信息学分析,lncRNA GK-IT1 可能与 CDK4、CCND1 蛋白结合,Western blot 实验验证结果显示,lncRNA GK-IT1 基因敲除后,CDK4 和 CCND1 蛋白表达降低。**结论** 敲低 lncRNA GK-IT1 可以导致细胞周期阻滞,抑制食管鳞状癌细胞增殖并且促进细胞凋亡,可能作为食管鳞状细胞治疗的潜在靶点。

[关键词] 长链非编码 RNA; GK-IT1;食管鳞状细胞癌;细胞增殖;细胞凋亡

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.1 [文献标志码] A

Knock-down of long non-coding RNA GK-IT1 inhibits proliferation and promotes apoptosis in esophageal carcinoma cells

YANG Xin, CHEN Li Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of long non-coding (lnc) RNA GK-IT1 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and explore its effect on the proliferation and apoptosis of ESCC cell lines. **Methods** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was carried out to detect the expression of lncRNA GK-IT1 in 27 pairs of ESCC tissues and adjacent normal tissues from the ESCC patients who had not received chemotherapy yet, and in different ESCC cell lines (KYSE-150, KYSE-510, Eca-109, TE-1 and TE-10) and normal human esophageal epithelioid cell line Het-1a, respectively. After small interference RNA (siRNA) of GK-IT1 was designed and constructed, and then transfected into TE-1 and TE-10 cells respectively to knockdown GK-IT1. Plate colony formation assay, EDU analysis and cell counting kit (CCK-8) assay were used to determine the proliferation of the cells. Flow cytometry was employed to detect the variations of apoptosis and cell cycle. Fluorescence *in situ* hybridization

[通信作者] 陈 力,E-mail:Drchenli@sina.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

(FISH) was used to explore the subcellular localization of GK-IT1, and Western blotting was performed to verify the expression of cell cycle-related proteins. **Results** The expression of GK-IT1 was significantly higher in the ESCC tissues when compared to para-cancerous tissues ($P<0.000\ 1$). GK-IT1 knockdown cells were successfully constructed in TE-1 and TE-10 cells, and knock-down of GK-IT1 could significantly inhibit the proliferation ($P<0.01$) and increase the apoptotic rate of the cells ($P<0.01$). The results of FISH assay indicated that GK-IT1 was mainly distributed in the cytoplasm. Flow cytometry showed that GK-IT1 knockdown induced the cells arrested in G_1/S phase. Finally, bioinformatics analysis suggested that GK-IT1 may bind to CDK4/CCND1 protein, and Western blotting results revealed that the expression of CDK4 and CCND1 was decreased after GK-IT1 knockdown ($P<0.05$). **Conclusion** Knockdown of GK-IT1 can induce cell cycle arrest, inhibit proliferation and promote apoptosis in ESCC cells. It may be used as a potential therapeutic target in treatment for ESCC.

[**Key words**] long non-coding RNA; GK-IT1; esophageal squamous cell carcinoma; cell proliferation; apoptosis

Corresponding author: CHEN Li, E-mail: Drchenli@sina.com

最新的癌症流行病学数据显示,国内食管癌发病率男性居第3位,女性居第5位;不仅如此,食管癌的死亡率在癌症致死率排名中居第4位[1]。尽管食管癌治疗近年来取得了极大的进展,但食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)的预后依旧不理想,5年生存率低于10%[2]。探究其原因,主要是食管癌发现时间较其他癌症晚,淋巴结转移较早,手术治疗难以根除,常常伴随治疗后复发和转移[3]。目前,对ESCC增殖、侵袭的作用机制仍不完全清楚。因此,研究ESCC发生增殖及其转移的分子机制,对改善治疗方式和策略以及预测临床预后具有深刻的科学意义和价值[4]。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)已被证实与肿瘤的发生、发展息息相关[5]。lncRNA通过在转录调控、转录后调控,以及表观遗传学等多个方面来调控编码基因的表达,从而在肿瘤的发生、发展、增殖、转移和侵袭中发挥相应的作用[6-7]。有研究通过TCGA数据库中长链非编码RNA的转录本测序文件筛选出lncRNA GK-IT1(甘油激酶-内含子转录本1)在食管癌中高表达,但lncRNA GK-IT1在食管癌及其他癌症中发挥的作用尚不清楚。本研究从细胞与分子生物学层面探究lncRNA GK-IT对ESCC增殖、周期和凋亡等生物学过程的调控,为ESCC的靶向治疗和患者的预后分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司;细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自东仁化学科技(上海)有限公司;lnc GK-IT1的小干扰RNA(siGK-IT1)及其阴性对照(siRNA negative control, si-NC)由上海汉恒基因股份有限公司合成;转染试剂Lipofectamine™2000购自美国Invitrogen公司;特异性引物(lncRNA GK-IT1, GAPDH)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;反转录试剂盒购自美国Thermo Scientific公司;聚合酶链反应(PCR)引物购自武汉金开瑞生物工程有限公司;Cell-Light™ EdU Apollo567 *In Vitro* Kit购自广州锐博生物科技有限公司;细胞计数试剂盒(CCK-8)购自武汉博士德生物工程有限公司;Anti-CDK4抗体购自美国R&D公司;Anti-CCND1抗体购自英国Abcam公司。

1.1.2 组织标本 27例未经放化疗的ESCC组织及其癌旁组织,均来自于重庆医科大学附属第一医院,患者均签署知情同意书后进行手术切除,样本通过病理学检查之后立即放入液氮,由重庆医科大学分子与肿瘤学中心保存。患者临床资料和ESCC标本的收集由重庆医科大学伦理委员会授权和监督(审批号:2020-732)。

1.1.3 细胞及培养 人ESCC细胞株KYSE-150、KYSE-510、EC109、TE-1、TE-10购自美国ATCC细胞库。DMEM培养基和胰蛋白酶购自美国Gibco公司;MEBM培养基套装购自瑞士Lonza公司;胎牛血清(FBS)购自重庆博全生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取 用无菌剪刀剪碎称取的组织(50 mg),置于冰上,并加入1 mL TRIzol试剂至匀浆

器中匀浆,待组织完全溶解后收集悬浮液,加入200 μL三氯甲烷后剧烈震荡混匀,静置15 min离心;取透明层置于离心管,加入等体积异丙醇,混匀,室温静置离心后,加入75%冰乙醇清洗晾干,加入适量DEPC水充分溶解RNA沉淀,使用Nanodrop -2000检测,并使用Agilent 2100 Bioanalzer对所提RNA完整度进行检测。

1.2.2 细胞培养及转染 细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM以及RPMI1640培养基中,静置于37 ℃、CO_2体积分数为5%的增湿环境中培养。取对数生长期的TE-1、TE-10细胞,按每孔4×10^5均匀铺到6孔板中。待细胞完全贴壁后,且其汇合度达到60%时,按照Lipofectamine™2000说明书,分别转染小干扰RNA(si-GK-IT1)及其阴性对照组(si-NC),24、48 h后收集细胞,进行下一步实验。

1.2.3 实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, RTFQ-PCR)检测lncRNA GK-IT1的表达

质粒转染24 h后,按照说明书用TRIzol法提取ESCC组织和癌旁组织、人正常食管上皮细胞(Het-1a)和ESCC细胞(TE-1和TE-10)总RNA,琼脂糖凝胶电泳判断提取RNA的完整性,酶标仪检测其浓度和纯度。利用PrimeScriptRT Reagent Kit将总RNA反转录为cDNA。利用美国Bio-Rad公司的RTFQ-PCR仪检测lncRNA GK-IT1在ESCC组织和细胞中的相对表达水平。该研究所用特异性引物如下:GAPDH上游引物序列:5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′,下游引物序列:5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′;lncRNA GK-IT1上游引物序列:5′-AGCGGTAGAGTCAGCTCTGTTTG-3′,下游引物序列:5′-CACCATGCCCAGCCGTAAC-3′。以GAPDH为内参,cDNA为模板,在95 ℃预变性3 min;然后在95 ℃变性5 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s的条件下扩增40个循环。每个样品设置3个复孔,lncRNA GK-IT1的相对表达量采用$2^{-\triangle\triangle CT}$法表示。实验重复3次。

1.2.4 克隆形成实验 将转染24 h后的各组细胞制备成细胞悬液(1×10^4/mL),按200 μL/孔接种于6孔板中,混匀后于温箱继续培养,于第5天进行半定量换液,第10天弃培养基,PBS洗涤3 min,取多聚甲醛15 min固定细胞,弃掉再加入0.5%结晶紫进行染色,最后使用PBS清洗。用显微镜拍照并进行克隆计数。

1.2.5 CCK-8实验 将转染后的各组细胞制成细胞悬液(密度为1×10^5/mL),按100 μL/孔接种至96孔板中,设置3个复孔/组,使96孔板常规培养于温箱内。待细胞完成贴壁后,取出1块96孔板,加入CCK-8溶液(10 μL/孔)于温箱内2 h避光孵育,用酶标仪测定450 nm处的光密度值,记录读数。之后分别将培养24、48、72、96 h后的各组细胞用同样的方法测光密度值,记录数值并绘制生长曲线。

1.2.6 流式细胞仪检测 收集转染48 h后的各组细胞,PBS洗涤后1 000 r/min,离心5 min,弃上清。加入Annexin结合液,使细胞重悬。再加入AnnexinV-PE 10 μL,避光室温15 min温育。各组细胞凋亡情况于流式细胞仪内检测。收集转染48 h后的各组细胞,PBS洗涤后1 000 r/min,离心5 min,弃上清,加入75%冰乙醇过夜,次日检测细胞周期分布情况。

1.2.7 Western blot检测 取转染48 h后的各组细胞,加入RIPA蛋白裂解液(PMSF∶RIPA=1∶100)进行裂解,4 ℃离心后提取蛋白。按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书步骤测定蛋白浓度。配置SDS-PAGE凝胶后,取样本(每个样本40 μg)进行恒压80 V电泳分离,再冰浴恒流200 mA转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉常温摇床封闭,再分别加入兔源CDK4抗体(1∶2 000)、兔来源CCND1抗体(1∶2 000)、兔来源GAPDH抗体(1∶5 000)后4 ℃低温摇床过夜,TBST缓冲液冲洗3次后,室温摇床孵育山羊抗兔二抗,最后曝光显影进行分析。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0和GraphPad Prism 6.0进行数据分析和作图。Student's t 检验运用于两样本均数比较,多组均数比较采用方差分析,$P<0.05$为差异有统计学意义。

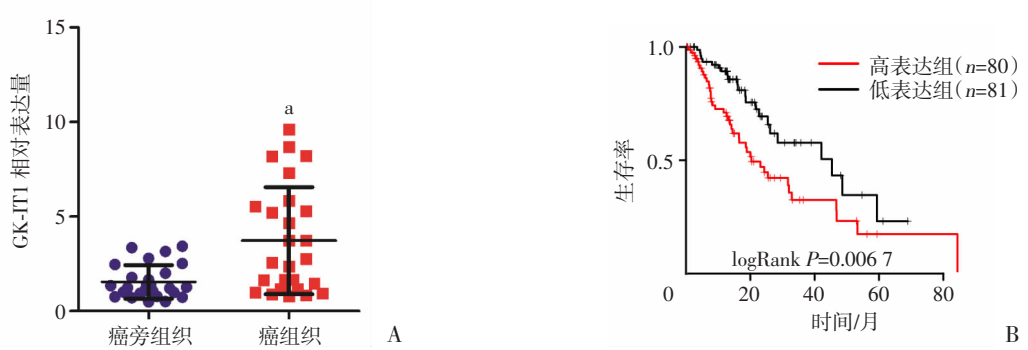
2 结果

2.1 lncRNA GK-IT1在ESCC组织中的表达

RTFQ-PCR检测结果显示,ESCC癌组织中lncRNA GK-IT1的表达显著高于癌旁组织($P<0.000\ 1$,图1A)。并且在TCGA数据库中,发现lncRNA GK-IT1的表达量与患者的预后相关($P=0.006\ 7$,图1B)。

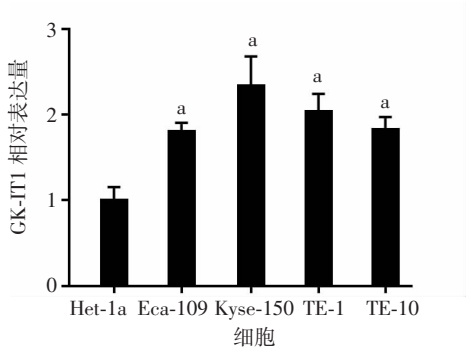
2.2 lncRNA GK-IT1在ESCC细胞株中的表达

RTFQ-PCR实验检测人上皮样食管细胞Het-1a以及ESCC细胞株(Eca-109,TE-1,TE-10,Kyse-510,Kyse-150)中lncRNA GK-IT1的相对表达水平。结果显示,与正常食管细胞Het-1a相比,Kyse-510的表达量并无明显差异,其中Eca-109、Kyse-150、TE-1、TE-10这4种ESCC细胞表达量明显升高($P<0.001$,图2)。



A:27 例 ESCC 患者癌组织和癌旁组织中 lncRNA GK-IT1 的表达 a: $P<0.000\ 1$,与癌旁组织比较;B:TCGA 数据库 lncRNA GK-IT1 表达水平与预后的关系

图 1 lncRNA GK-IT1 在 ESCC 癌组织与癌旁组织中的表达及预后的关系



a: $P<0.05$, 与正常食管上皮细胞 Het-1a 比较

图 2 RTFQ-PCR 检测 lncRNA GK-IT1 在 ESCC 细胞株中的表达

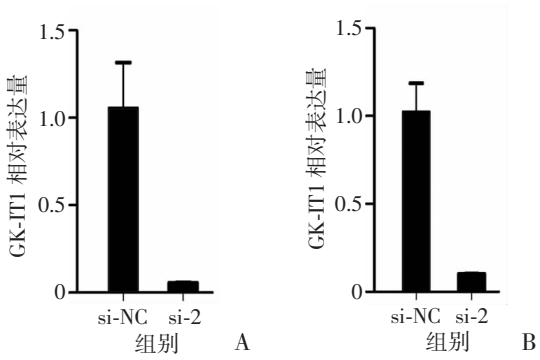


图 3 RTFQ-PCR 法检测 TE-1(A),TE-10(B)细胞中空载组(si-NC)与敲低组(si-2)中 GK-IT1 的表达

2.3 lncRNA GK-IT1 小干扰 RNA 的设计和敲低水平的鉴定

针对 lncRNA GK-IT1 序列,设计并合成了 3 条 siRNA,通过脂质体转染的方式,将 siRNA 转染至 TE1、TE10 细胞内,采用 RTFQ-PCR 检测 GK-IT1 的敲低效率。结果显示,TE-1 细胞中 siRNA 的敲低效率为 95%;TE-10 细胞中 siRNA 的敲低效率为 90%(图 3)。

2.4 lncRNA GK-IT1 对 ESCC 细胞增殖能力的影响

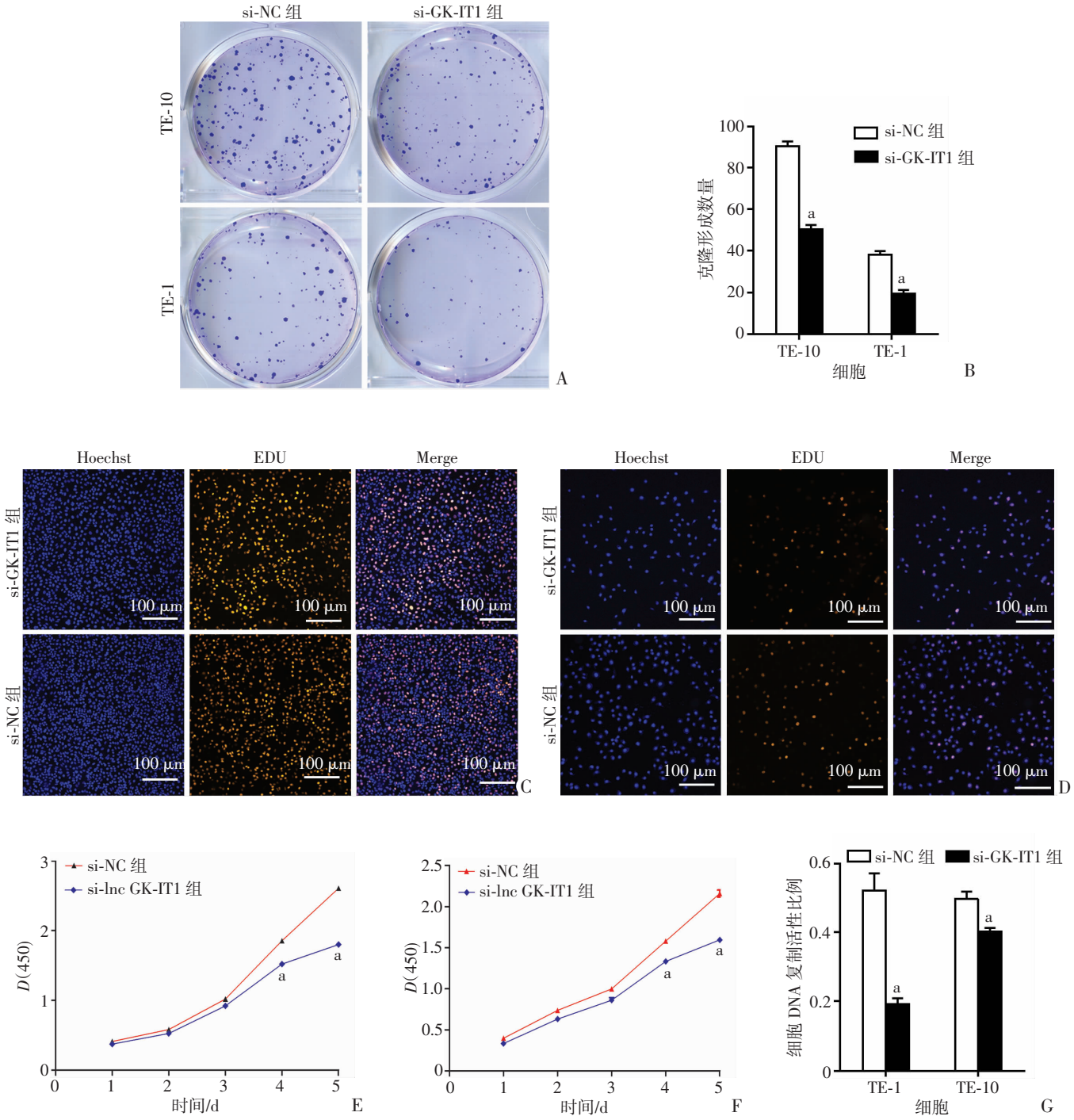
利用平板克隆实验、EDU 实验以及 CCK-8 实验分别检测 lncRNA GK-IT1 的表达差异对 ESCC 细胞增殖能力的影响。结果表明,在 TE1、TE10 细胞中 si-GK-IT1 组相对 si-NC 组的克隆形成能力明显降低($P<0.01$,图 4A、B);在 EDU 实验中,si-GK-IT1 组相对于 si-NC 组,细胞增殖活性差异有统计学意义($P<0.01$,图 4C、D);在 CCK-8 实验中,培养 48、72、96 h,si-NC 与 si-GK-IT1 组间差异均有统计学意义($P<0.01$,图 4E、F)。

2.5 lncRNA GK-IT1 对 ESCC 细胞凋亡的影响

TE-1、TE-10 细胞分别转染 si-NC、si-GK-IT1 后,采用流式细胞仪检测敲低 lncRNA GK-IT1 后对 ESCC 细胞凋亡情况的影响。流式细胞仪检测结果显示,与 si-NC 相比,TE-1、TE-10 细胞中 siGK-IT1 组凋亡率显著增加($P<0.01$,图 5)。

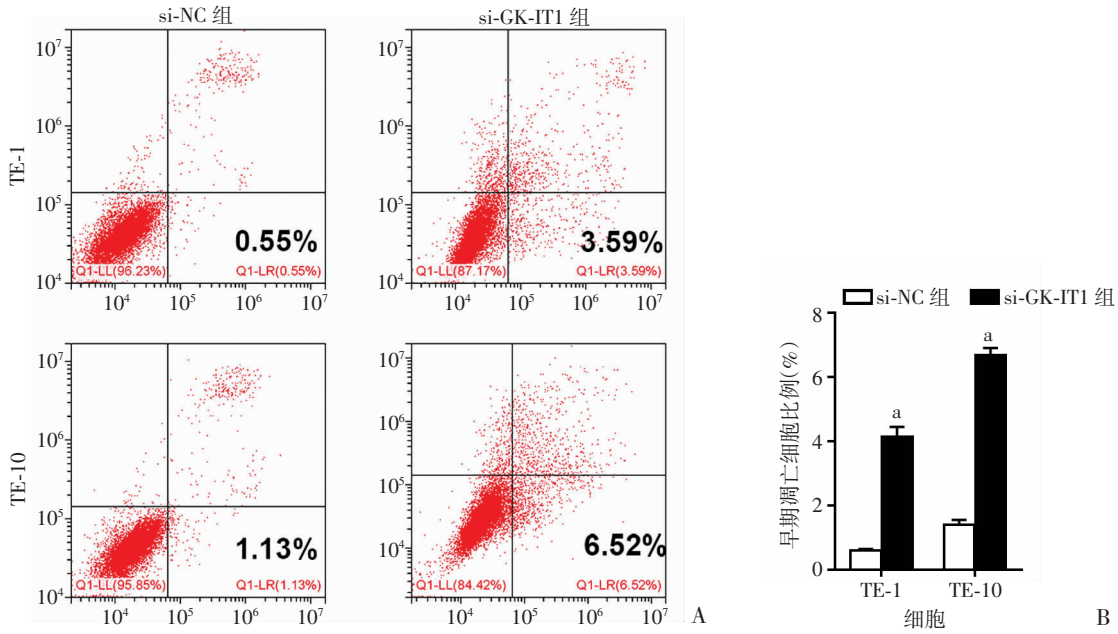
2.6 lnc GK-IT1 的亚细胞定位

利用 FISH 实验对细胞中的 lnc GK-IT1 进行荧光原位杂交,利用荧光显微镜观察红色荧光,根据红色荧光的强弱来确定 lncGK-IT1 的亚细胞定位。从图 6 中可得知,lnc GK-IT1 在胞质胞核中都存在,但主要分布于细胞质中。表明 lnc GK-IT1 可能在转录后水平调控癌症的发生、发展。



A:平板克隆实验;B: 细胞增殖能力比较 a: $P<0.05$,与 si-NC 组比较;C:CCK-8 实验检测 TE-10 细胞存活能力;D:CCK-8 实验检测 TE-1 细胞存活能力;E:TE-1 细胞增殖能力;F:TE-10 细胞增殖能力;G:EDU 实验检测细胞增殖比例 a: $P<0.05$,与 si-NC 组比较

图 4 敲低 GK-IT1 对 TE-1、TE-10 细胞增殖能力的影响



A:流式细胞检测细胞凋亡;B:两组细胞凋亡率比较 a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

图 5 敲低 GK-IT1 对 ESCC 细胞凋亡的影响

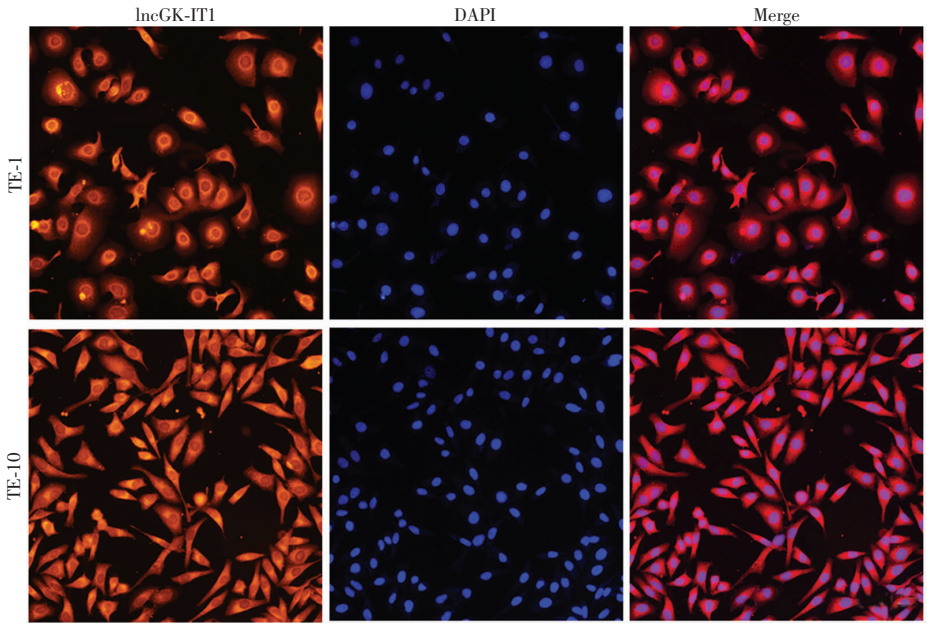


图 6 荧光原位杂交实验检测 lncGK-IT1 的亚细胞定位 (×200)

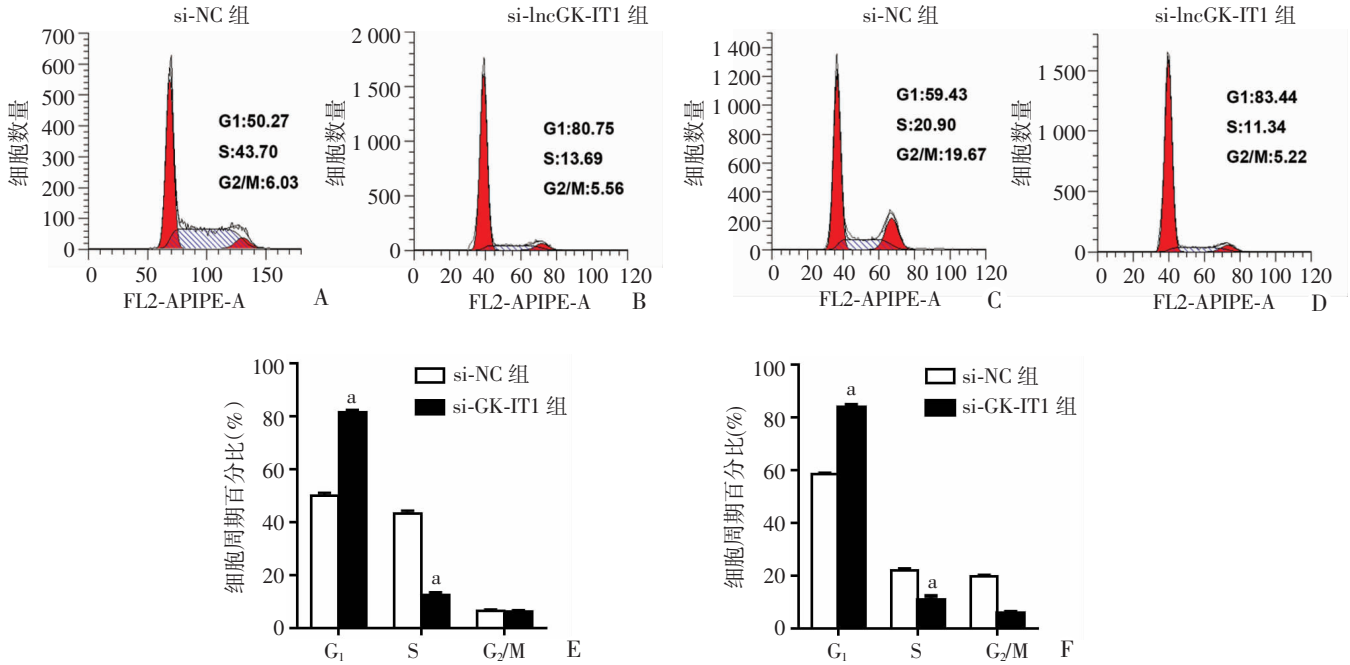
2.7 lncRNA GK-IT1 对细胞周期及 CDK4/CCND1 蛋白表达的影响

为了进一步探求 lncRNA GK-IT1 对 ESCC 细胞周期的调控作用,收集分别转染了 si-NC、si-GK-IT1 72 h 的 TE-1 和 TE-10 细胞后,应用流式细胞仪检测细胞周期分布,结果显示,与对照组相比,敲低 lncRNA GK-IT1 后 G_1 期明显增多,S 期减少。说明敲低 GK-IT1 能将细胞周期阻滞于 G_1 期($P<0.05$,图 7)。此外,通过 RTFQ-PCR 实验验证周期相关蛋白 CDK4 和 CCND1 mRNA 水平的变化,结果发现,lncGK-IT1 的敲低并未引起 CDK4 和 CCND1 mRNA 表达发生改变(图 8)。我们通过 RNA-蛋白质相互作用预测网站 RPIseq(http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq/)进行分析,发现 lncRNA GK-IT1 与 CDK4、CCND1 的 RF classifier 和 SVM clas-

sifier 均大于 0.5(图 9),提示 lncRNA GK-IT1 可能通过结合 CDK4 与 CCND1 蛋白来影响 ESCC 细胞增殖。通过 Western blot 实验检测 CDK4、CCND1 蛋白的表达变化,结果显示,si-NC 组相比于 si-GK-IT1 组,CDK4 和 CCND1 的水平均显著下降($P<0.05$,图 10)。

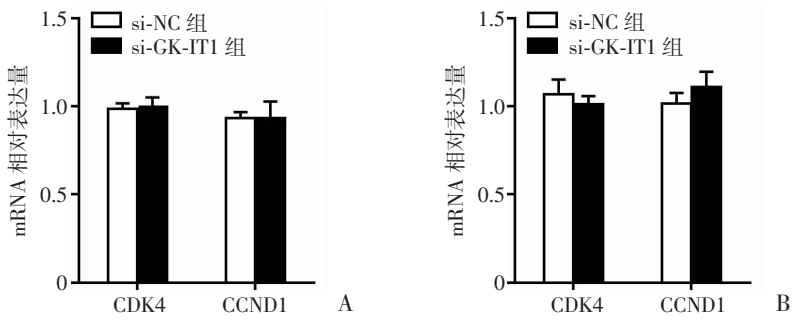
3 讨论

lncRNA 的异常调控在疾病的发生和发展以及许多人类癌症中很重要,尽管它们曾被认为是“垃圾 RNA”。据报道,lncRNA 在多种癌症中都扮演着重要角色。它们由 RNA 聚合酶Ⅱ(oⅡ)转录,但不翻译为蛋白质[8]。lncRNA 的失调与多种癌症发展中的细胞迁移、侵袭、转移及肿瘤发生有关[9]。lncRNA 既可以是肿瘤抑制基因也可以是癌基因,其通过直接结合 RNA、DNA 或蛋白质来发挥其生物学功能,包括细胞增殖、分化、凋亡、免疫应答和迁移。它们还参与基因转录后调控[10-14]。其中,ZHOU 等[15]发现 lncRNA SNHG7 在多种癌症如乳腺癌、结肠癌、膀胱癌等中高表达,对癌症的发生发展起着至关重要的作用。不仅如此,ZHANG 等[16]研究结果提示,lncRNA MIAT 通过与 miRNA-1301-3p 形成内源性竞争机制,调控 INCENP 的表达来促进食管鳞状细胞癌的发展。



A~D:流式细胞仪检测细胞周期;A、B:TE-细胞;C、D:TE-10 细胞;E:TE-1 细胞周期比例;F:TE-10 细胞周期比例 a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

图 7 流式细胞仪检测敲低 lncGK-IT1 后 ESCC 细胞周期变化



A:TE-1 细胞;B:TE-10 细胞

图 8 RTQF-PCR 检测 ESCC 细胞中 CDK4、CCND1 mRNA 水平变化

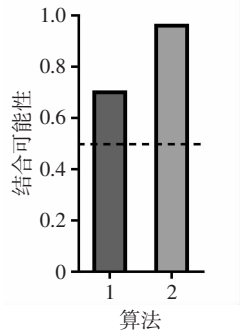
Input Sequences

Protein:
MATSRYEPVAEIGVGAYGTVYKARDPHSGHFVALKSVRVPNGGGGGGGLPISTVREVALL
RRLEAFEHPNVVRLMDVCATSRTDREIKVTLVFEHVDQDLRTYLDKAPPPGLPAETIKDL
MRQFLRGLDFLHANCIVHRDLKPENILVTSGGTVKLADFGLARIYSYQMALTPVVVTLWY
RAPEVLLQSTYATPVDMWSVGCIFAEMFRRKPLFCGNSEADQLGKIFDLIGLPPEDDWPR
DVSLPRGAFPPRGPRPVQSVVPEMEESGAQLLLEMLTFNPHKRISAFRALQHSYLHKDEG
NPE
RNA:
UGUUAUGCUUAUCUGACAGAAGGUUUGUUGAUUUCAAGUCACUAGGAACAGUGCCUCCAA
AAUUAAAAUUCACUCUCCAACUGAGCAGCACACACUAGCUCAAGGCAAUUAAAUAGACUG
CUUCUUUCCUUCUAGCGGUAGAGUCAGCUCUGUUUGCCUGUCACUGGGCUCAAGGAAUUA
CAAAGUAUAAAGAGUUACAGUAGCAAUUCCAAAAUACAAAGAGUUACGGCUGGGCAUGGU
GGCUCACACCUGUAAUCCCACUACUCAGGAGGCUGAAGCAGGAAAAACGCUUGAACCCAG
GAGGCAGAGGUAGCAGUGAGCCAAGAUCACGCCGAGCCGAGAUCAUGCCAUUGUACUCCA
GCCUGGGCAACAAGAGCAAAACUCCAUCUCAAAAAAA

Interaction probabilities

Prediction using RF classifier 0.7
Prediction using SVM classifier 0.96

A



B

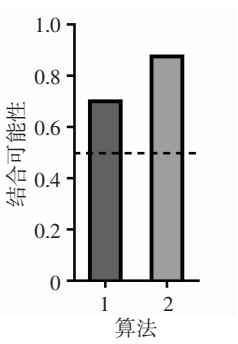
Input Sequences

Protein:
MEHQLLCCEVETIRRAYPDANLLNDRVLRAMLKAEETCAPSVSYFKCVQKEVLPSMRKIV
ATWMLEVCEEQKCEEEVFPLAMNYLDRFLSLEPVKKSRLQLLGATCMFVASKMKETIPLT
AEKLCIYTDNSIRPEELLQMELLLVNKLKWNLAAMTPHDFIEHFLSKMPEAEENKQIIRK
HAQTFVALCATDVKFISNPPSMVAAGSVVAAVQGLNLRSPNNFLSYYRLTRFLSRVIKCD
PDCLRACQEQIEALLESSLRQAQQNMDPKAAEEEEEEEEEVDLACTPTDVRDVDI
RNA:
UGUUAUGCUUAUCUGACAGAAGGUUUGUUGAUUUCAAGUCACUAGGAACAGUGCCUCCAA
AAUUAAAAUUCACUCUCCAACUGAGCAGCACACACUAGCUCAAGGCAAUUAAAUAGACUG
CUUCUUUCCUUCUAGCGGUAGAGUCAGCUCUGUUUGCCUGUCACUGGGCUCAAGGAAUUA
CAAAGUAUAAAGAGUUACAGUAGCAAUUCCAAAAUACAAAGAGUUACGGCUGGGCAUGGU
GGCUCACACCUGUAAUCCCACUACUCAGGAGGCUGAAGCAGGAAAAACGCUUGAACCCAG
GAGGCAGAGGUAGCAGUGAGCCAAGAUCACGCCGAGCCGAGAUCAUGCCAUUGUACUCCA
GCCUGGGCAACAAGAGCAAAACUCCAUCUCAAAAAAA

Interaction probabilities

Prediction using RF classifier 0.7
Prediction using SVM classifier 0.87

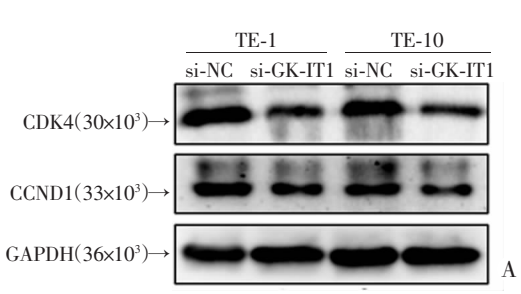
C



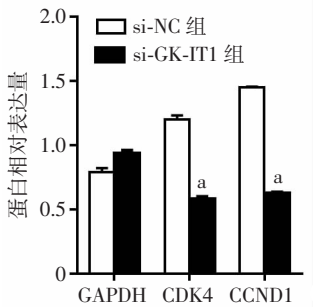
D

A:生物信息学预测 lncGK-IT1 与 CDK4 的结合可能性的基因序列;B:生物信息学预测 lncGK-IT1 与 CDK4 的结合可能性的相互作用概率;C: 生物信息学预测 lncGK-IT1 与 CCND1 的结合可能性的基因序列;D: 生物信息学预测 lncGK-IT1 与 CCND1 的结合可能性的相互作用概率 1: RF classifier; 2: SVM classifier

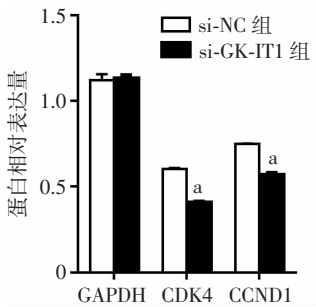
图 9 生物信息学预测 GK-IT1 与 CDK4、CCND1 相互结合关系



A



B



C

A:Western blot 结果;B:TE-1 蛋白表达量;C:TE-10 蛋白表达量 a: $P<0.05$,与 si-NC 组比较

图 10 敲低 GK-IT1 对 ESCC 细胞中 CDK4、CCND1 蛋白表达量的影响

然而,lncRNA GK-IT1 在癌症中的作用目前尚未探明,本研究使用 TCGA 数据库,筛选出在食管癌中具有明显差异表达的 lncRNA,采用 RTFQ-PCR 技术进一步验证得出 lncRNA GK-IT1 在 ESCC 组织和细胞中表达均升高。为了进一步研究 lncRNA GK-IT1 在 ESCC 中的作用,利用化学合成的 si-NC 和 si-GK-IT1,采用脂质体转染的方法转染 TE-1、TE-10 细胞。RTFQ-PCR 实验验证结果发现,si-GK-IT1 组相对 si-NC 组,lncGK-IT1 的表达水平明显降低。通过数个功能实验发现,敲低 lncGK-IT1 后,能明显抑制 ESCC 细胞的增殖,并能促进细胞凋亡。CDK4 与 CCND1 在肿瘤的发生、发展中起着至关重要的作用。目前,相关的 CDK4/6 抑制剂靶向治疗药物已经进入临床,用于治疗 HR+,HER2 晚期的乳腺癌患者[17]。CDK4 和 CCND1 通过形成复合体影响肿瘤细胞的周期变化,从而促进肿瘤细胞的生长和增殖[18-20]。其中 QI 等[21]研究证明,lncRNA SNHG7 敲低可以通过抑制 CDK4 和 CCND1 的表达导致细胞周期阻滞,进而显著抑制前列腺癌细胞的增殖。此外,YU 等[22]提出,lncRNA UFC1 通过稳定 RNA 结合蛋白 HuR 来调控 CDK4 和 CCND1 的表达,从而影响结肠癌细胞的周期变化,最终促进肿瘤进展。本研究运用流式细胞仪检测细胞周期,发现敲低 lncGK-IT1 能将 ESCC 细胞阻滞于 G_1 期,而调控细胞 G_1/S 期最重要的蛋白则为 CDK4 和 CCND1 以及它们的复合物。在敲低 lncRNA GK-IT1 后,通过 QTFQ-PCR 实验发现 CDK4/CCND1 mRNA 水平并未有明显变化,并使用生物信息学方法验证 lncRNA GK-IT1 与 CDK4/CCND1 蛋白具有结合的可能性。最后,在敲低 lncRNA GK-IT1 后,Western blot 检测结果显示,CDK4/CCND1 蛋白表达水平降低。推测 lncGK-IT1 可能通过调节 CDK4、CCND1 这两个周期相关蛋白而影响 ESCC 细胞周期,从而影响细胞增殖。但是,其具体的分子作用机制仍需进一步研究。综上所述,本研究结果表明 lncGK-IT1 在 ESCC 的发生、发展过程中起到了重要的作用。

参考文献:

[1] HOLMES R S, VAUGHAN T L. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer[J]. Semin Radiat Oncol, 2007, 17(1): 2-9. DOI: 10.1016/j.semradonc.2006.09.003.

[2] OHASHI S, MIYAMOTO S, KIKUCHI O, *et al*. Recent advances from basic and clinical studies of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Gastroenterol, 2015, 149(7): 1700-1715. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.08.054.

[3] OKUGAWA Y, GRADY W M, GOEL A. Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers[J]. Gastroenterology, 2015, 149(5): 1204-1225.e12. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.07.011.

[4] LOU Y, YU Y, XU X, *et al*. Long non-coding RNA LUCAT1 promotes tumourigenesis by inhibiting ANXA2 phosphorylation in hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(3): 1873-1884. DOI: 10.1111/jcmm.14088.

[5] XIAO Y, SU M, OU W, *et al*. Involvement of noncoding RNAs in epigenetic modifications of esophageal cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 1-7. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109192.

[6] LIANG M, PAN Z, YU F, *et al*. Long noncoding RNA SNHG12 suppresses esophageal squamous cell carcinoma progression through competing endogenous RNA networks[J]. Clin Transl Oncol, 2020, 22(10): 1786-1795. DOI: 10.1007/s12094-020-02317-7.

[7] CHENG J, MENG J, ZHU L, *et al*. Exosomal noncoding RNAs in glioma: biological functions and potential clinical applications[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 1-14. DOI: 10.1186/s12943-020-01189-3.

[8] DJEBALI S, DAVIS C, MERKEL A, *et al*. Landscape of transcription in human cells[J]. Nature, 2012, 489(7414): 101-108. DOI: 10.1038/nature11233.

[9] WU D D, CHEN X, SUN K X, *et al*. Role of the lncRNA ABHD11-AS1 in the tumorigenesis and progression of epithelial ovarian cancer through targeted regulation of RhoC[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 1-10. DOI: 10.1186/s12943-017-0709-5.

[10] CAI Q, WANG S, JIN L, *et al*. Long non-coding RNA GBCDRlnc1 induces chemoresistance of gallbladder cancer cells by activating autophagy[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 1-16. DOI: 10.1186/s12943-019-1016-0.

[11] LIU J, ZHAO S Y, JIANG Q W, *et al*. Long noncoding RNA MYLK-AS1 promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma through the EGFR/HER2-ERK1/2 signaling pathway[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(11): 1989-2000. DOI: 10.7150/ijbs.43062.

[12] XIE J J, JIANG Y Y, JIANG Y, *et al*. Super-enhancer-driven long non-coding RNA LINC01503, regulated by TP63, is over-expressed and oncogenic in squamous cell carcinoma[J]. Gastroenterol, 2018, 154(8): 2137-2151. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.02.018.

[13] PENG L, JIANG B Y, YUAN X Q, *et al*. Super-enhancer-associated long noncoding RNA HCCL5 is activated by ZEB1 and promotes the malignancy of hepatocellular carcinoma

[J]. Cancer Res, 2019, 79(3): 572-584. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0367.

[14] XU Y, LI Y, JIN J, *et al*. LncRNA PVT1 up-regulation is a poor prognosticator and serves as a therapeutic target in esophageal adenocarcinoma[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 1-15. DOI: 10.1186/s12943-019-1064-5.

[15] ZHOU Y, TIAN B, TANG J, *et al*. SNHG7: A novel vital oncogenic lncRNA in human cancers[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 124: 1-6. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.109921.

[16] ZHANG C Y, XIE L S, FU Y, *et al*. LncRNA MIAT promotes esophageal squamous cell carcinoma progression by regulating miR-1301-3p/INCENP axis and interacting with SOX2[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 7933-7944. DOI: 10.1002/jcp.29448.

[17] GUL A, LEYLAND-JONES B, DEY N, *et al*. A combination of the PI3K pathway inhibitor plus cell cycle pathway inhibitor to combat endocrine resistance in hormone receptor-positive breast cancer: a genomic algorithm-based treatment approach[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(12): 2359-2376.

[18] LI Y, XIAO X, CHEN H X, *et al*. Transcription factor NFYA promotes G1/S cell cycle transition and cell proliferation by transactivating cyclin D1 and CDK4 in clear cell renal cell carcinoma[J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(8): 2446-2463.

[19] GAN C P, SAM K K, YEE P S, *et al*. IFITM3 knockdown reduces the expression of CCND1 and CDK4 and suppresses the growth of oral squamous cell carcinoma cells[J]. Cell Oncol (Dordr), 2019, 42(4): 477-490. DOI: 10.1007/s13402-019-00437-z.

[20] WANG S H, WANG X B, GAO Y J, *et al*. RN181 is a tumour suppressor in gastric cancer by regulation of the ERK/MAPK-cyclin D1/CDK4 pathway[J]. J Pathol, 2019, 248(2): 204-216. DOI: 10.1002/path.5246.

[21] QI H, WEN B, WU Q, *et al*. Long noncoding RNA SNHG7 accelerates prostate cancer proliferation and cycle progression through cyclin D1 by sponging miR-503[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 326-332. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.011.

[22] YU T, SHAN T D, LI J Y, *et al*. Knockdown of linc-UFC1 suppresses proliferation and induces apoptosis of colorectal cancer[J]. Cell Death Dis, 2016, 7: 1-9. DOI: 10.1038/cddis.2016.124.

(**收稿**:2020-08-10;**修回**:2020-10-29)

(编辑 邓强庭)