doi:10.11659/jjssx.07E023011

·基础研究·

lncRNA LINC01612促进食管鳞状细胞癌细胞恶性生长的机制研究

乔勃伟,杨尧庆 (空军军医大学第二附属医院胸外科,陕西 西安 710038)

[摘 要] **目的** 探讨lncRNA LINC01612(LINC01612)对食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞生物学功能的影响及机制。**方法** 收集42例ESCC患者的肿瘤组织和癌旁组织,采用RT-qPCR法分别检测ESCC肿瘤组织、癌旁组织及ESCC细胞系和正常食管上皮细胞(Het-1A细胞)中LINC01612相对表达水平。将KYSE30细胞分为对照组(不进行转染)、shRNA-NC组(转染shRNA-NC)、sh-LINC01612组(转染LINC01612 shRNA)、Vector组(转染Vector)、ALKBH5组(转染ALKBH5过表达载体)、IGF2BP1组(转染IGF2BP1过表达载体)和ALKBH5+LINC01612组(共转染ALKBH5和LINC01612过表达载体)。甲基化RNA免疫沉淀(MeRIP)分析评估LINC01612的m6A修饰水平;RIP分析评估m6A修饰的LINC01612与ALKBH5或IGF2BP1的结合;放线菌素D实验检测LINC01612的稳定性;CCK-8和Transwell实验检测细胞的增殖和侵袭能力,流式细胞术分析细胞凋亡率。**结果** 与癌旁组织相比,LINC01612在ESCC组织中表达显著上调($P<0.01$)。此外,ESCC细胞LINC01612表达水平较人正常食管上皮细胞Het-1A显著上调($P<0.01$)。沉默LINC01612显著抑制KYSE30细胞增殖和侵袭,诱导细胞凋亡和Caspase-3活性升高($P<0.05$)。ALKBH5通过与LINC01612结合去除LINC01612的m6A修饰,从而下调LINC01612的表达。过表达ALKBH5抑制细胞增殖和侵袭,诱导细胞凋亡,而过表达LINC01612抵消了ALKBH5过表达对KYSE30细胞的影响($P<0.05$)。RIP分析结果显示,IGF2BP1通过识别m6A修饰的LINC01612并与其结合,增强LINC01612稳定性,促进其表达。**结论** LINC01612在ESCC中的表达显著上调。ALKBH5-m6A-IGF2BP1以m6A依赖性介导LINC01612上调,促进ESCC细胞增殖和侵袭,抑制细胞凋亡。

[关键词] 食管鳞状细胞癌;lncRNA LINC01612;ALKBH5;IGF2BP1;m6A修饰

[中图分类号] R34;R394.3 [文献标志码] A [收稿日期] 2023-07-04

Mechanism of lncRNA LINC01612 promoting malignant growth of esophageal squamous cell carcinoma cells

QIAO Bo-wei, YANG Yao-qing (Department of Thoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an Shaanxi 710038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of lncRNA LINC01612 (LINC01612) in the biological function of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells and its mechanism. **Methods** Tumor tissues and adjacent tissues from 42 ESCC patients were collected, and the relative expression levels of LINC01612 in ESCC tissues, adjacent tissues, ESCC cell lines and normal esophageal epithelial cells (Het-1A cell) were detected by RT-qPCR, respectively. KYSE30 cells were divided into the control group (without transfection), the shRNA-NC group (transfected with shRNA-NC), the sh-LINC01612 group (transfected with LINC01612 shRNA), the Vector group (transfected with vector), the ALKBH5 group (transfected with ALKBH5 overexpression vector), the IGF2BP1 group (transfected with IGF2BP1 overexpression vector) and ALKBH5+LINC01612 group (co-transfected with ALKBH5 and LINC01612 overexpression vectors). Methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP) assay was used to evaluate the m6A modification level of LINC01612; RIP analysis was used to evaluate the binding of m6A modified LINC01612 to ALKBH5 or IGF2BP1; actinomycin D experiment was used to detect the stability of LINC01612; CCK-8 assay and Transwell assay were used to detect the cell proliferation and invasion abilities; and the flow cytometry was used to detect the cell apoptosis rate. **Results** The expression of LINC01612 was significantly upregulated in the ESCC tissues compared with the adjacent tissues ($P<0.01$). Moreover, the expression levels of LINC01612 in ESCC cells were significantly higher than that in human normal esophageal epithelial cells of Het-1A ($P<0.01$). Silencing LINC01612 significantly inhibited the proliferation and invasion of KYSE30 cells, induced cell apoptosis and increased Caspase-3 activity ($P<0.05$). ALKBH5 abrogated m6A modification of LINC01612 by binding to LINC01612, thereby downregulating the expression of LINC01612. Overexpression of ALKBH5 inhibited cell proliferation and invasion, and induced cell apoptosis ($P<0.01$), while overexpression of LINC01612 counteracted the effects of ALKBH5 overexpression on KYSE30 cells ($P<0.05$). RIP analysis showed that IGF2BP1 enhanced the stability of LINC01612 and promoted its expression by recognizing and binding LINC016122 modified by m6A. **Conclusion** LINC01612 was significantly upregulated in ESCC. ALKBH5-m6A-IGF2BP1 mediated LINC01612 upregulation in an m6A dependent manner, thereby promoting the proliferation and invasion of ESCC cell, and inhibiting cell apoptosis.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma; lncRNA LINC01612; ALKBH5; IGF2BP1; m6A modification

[通信作者] 杨尧庆,E-mail:gugoudi124408@163.com

食管癌包括食管腺癌和食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC),其中ESCC占食管癌的90%以上[1-2]。遗传学和表观遗传学改变在ESCC的发生和发展中发挥关键作用[3]。N6-甲基腺苷(m6A)是真核生物中普遍存在的一种RNA化学修饰,在癌症发展中起着至关重要的作用[4-6]。m6A由甲基转移酶复合物编辑,由去甲基化酶清除,然后由识别蛋白选择性地识别m6A修饰的RNA,并执行特定的生物学功能,包括RNA降解、运输、定位和翻译[7-8]。然而,m6A的去甲基化酶ALKBH5和识别蛋白IGF2BP1在ESCC中的作用和分子机制尚不完全清楚。LncRNAs被报道通过与mRNA、microRNA和蛋白质等内源性生物分子的直接相互作用来调节肿瘤发生,为肿瘤的研究及新药开发的靶向治疗药物提供了一定参考依据[9-10]。有研究通过RNA测序筛选发现,lncRNA LINC01612(LINC01612)是一个m6A相关的lncRNA,可以预测ESCC患者的预后[11]。但LINC01612在ESCC中的作用和分子调控机制仍不清楚。特别是m6A如何调节ESCC中的LINC01612,以及m6A/LINC01612在ESCC发生中的作用有待进一步研究。本研究通过探讨LINC01612对ESCC细胞生物学功能的影响及机制,以期为ESCC的治疗寻找新的靶标。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自美国Gibco公司;Lipofectamine 3000转染试剂、DMEM培养基、青霉素、链霉素和庆大霉素购自美国Invitrogen公司;LINC01612干扰序列(sh-LINC01612)、对照序列(shRNA-NC)和过表达载体(pcDNA-LINC01612),ALKBH5过表达载体(pcDNA-ALKBH5)和对照质粒(Vector)及IGF2BP1过表达载体(pcDNA-IGF2BP1)和对照质粒(Vector)购自上海生物工程科技有限公司;PrimeScript RT-PCR试剂盒购自日本Takara公司;BCA蛋白含量测定试剂盒和CCK-8试剂盒购自美国Thermo Scientific公司;Caspase-3活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;anti-GAPDH抗体、anti-IGF2BP1抗体、anti-ALKBH5抗体、anti-m6A抗体购自美国Abcam公司;Magna RIP RNA结合蛋白免疫沉淀试剂盒、Magna甲基化RNA免疫沉淀(methylated RNA immunoprecipitation, MeRIP) m6A试剂盒购自美国Millipore公司;放线菌素D购自武汉艾美捷科技有限公司。实时荧光定量PCR仪购自德国Eppendorf公司;蛋白电泳仪及配套电泳槽和Western blot转膜仪购自美国Bio-Rad公司;凝胶成像仪购自英国Uvitec Cambridge公司;Thermo Varioskan™ LUX多功能酶标仪购自北京凯元信瑞仪器有限公司。

1.2 临床标本收集和细胞来源

获取空军军医大学第二附属医院2020年9月至2022年12月收诊并行根治术的42例ESCC患者的肿瘤组织及癌旁组织,所有患者术前无放化疗史,无免疫系统疾病。人ESCC细胞系(KYSE30、KYSE140、KYSE150和TE-1细胞)和正常食管上皮细胞(Het-1A细胞)购自中国(上海)细胞工程库并经该公司验证。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人ESCC细胞系(KYSE30、KYSE140、KYSE150和TE-1细胞)和正常食管上皮细胞(Het-1A细胞)在含青霉素-链霉素和10% FBS的DMEM培养基中,于5% CO_2、37 ℃培养箱中进行培养。

1.3.2 细胞处理 敲低LINC01612实验:将KYSE30细胞分为对照组、shRNA-NC组和sh-LINC01612组。shRNA-NC组和sh-LINC01612组细胞分别采用shRNA-NC和sh-LINC01612序列转染48 h,对照组不处理。

过表达ALKBH5实验:将KYSE30细胞分为对照组、Vector组和ALKBH5组。Vector组和ALKBH5组细胞分别采用Vector和pcDNA-ALKBH5转染48 h,对照组不处理。

同时过表达ALKBH5和LINC01612实验:将KYSE30细胞分为Vector组、ALKBH5组和ALKBH5+LINC01612组。Vector组和ALKBH5组细胞转染Vector和pcDNA-ALKBH5,ALKBH5+LINC01612组细胞转染pcDNA-ALKBH5和pcDNA-LINC01612。

过表达LINKCO612实验:将KYSE30细胞分为对照组、Vector组和IGF2BP1组。Vector组和IGF2BP1组细胞分别采用Vector和pcDNA-IGF2BP1转染48 h,对照组不处理。

所有转染均按照说明书使用Lipofectamine 3000转染试剂进行。

1.3.3 RT-qPCR检测 使用TRIzol试剂提取总RNA,并用Prime Script RT试剂盒反转录成cDNA。使用SYBR Premix Ex Taq Ⅱ在ABI 7500实时PCR系统中进行RT-qPCR。PCR反应条件为95 ℃ 1 min;95 ℃ 20 s,56 ℃ 10 s,72 ℃ 15 s,35个循环。以GAPDH为内参基因,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算RNA的相对表达水平。

1.3.4 Western blot检测 提取总蛋白后使用BCA蛋白含量测定试剂盒进行蛋白定量。通过SDS-PAGE分离蛋白并转移至PVDF膜。将膜于5%脱脂牛奶中

封闭1 h,TBST清洗,然后加入特异性一抗anti-GAPDH(1∶1 000,ab8245)、anti-ALKBH5(1∶1 000,ab195377)和anti-IGF2BP1(1∶1 000,ab100999),4 ℃孵育过夜。TBST清洗,加入辣根过氧化物酶标记的二抗山羊抗鼠IgG抗体(1∶1 000,ab109489)室温孵育1 h。以GAPDH为内参蛋白,使用ECL Plus化学发光试剂盒进行曝光,化学发光成像系统拍片,Image J软件进行定量分析。

1.3.5 CCK-8检测 将细胞以1.5×10⁴/孔接种至96孔板中,分别于转染24 h、48 h、72 h后,弃去上清液,并向每个孔中加入10 μL CCK-8溶液。在37 ℃下孵育2 h后,通过酶标仪测定450 nm波长处的吸光度值。

1.3.6 Transwell检测 将细胞悬液(1×10⁵/mL)添加至Transwell板上室,下室加500 μL含10% FBS的DMEM。孵育24 h后,去除下室中含有迁移或侵袭细胞的培养基,并在倒置光学显微镜下计数细胞数量。

1.3.7 流式细胞术分析 转染48 h后,用不含EDTA的胰蛋白酶分离并收集细胞。将细胞在4 ℃下以1 000 r/min离心5 min,弃去上清液。通过Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡水平。将细胞悬浮在Annexin V-FITC和结合缓冲液的混合物中,并在室温下孵育30 min。然后加入PI和结合缓冲溶液混匀,在室温孵育15 min。通过流式细胞仪检测荧光,并计算细胞凋亡率。

1.3.8 ELISA检测 按照试剂盒使用说明书操作,通过Caspase-3活性检测试剂盒测定Caspase-3活性水平。

1.3.9 mRNA稳定性实验 转染pcDNA3.1 vector或pcDNA-IGF2BP1 16 h后,使用转录抑制剂放线菌素D干预,收集干预0 h、2 h、4 h、8 h的细胞,提取总RNA,用酶标仪检测RNA浓度,反转录得到cDNA,通过RT-qPCR检测LINC01612表达水平,分析降解速率。

1.3.10 MeRIP检测 使用TRIzol方法从ESCC细胞中分离总RNA,并使用PolyATtract®mRNA分离系统分离和纯化总RNA中的mRNA。将m6A抗体(1:500,ab151230)或IgG(1:500,ab109489)添加到免疫沉淀缓冲液[20 mmol/L Tris(pH 7.5)、140 mmol/L NaCl、1% NP-40、2 mmol/L EDTA],与蛋白A/G磁珠孵育1 h。将分离纯化的mRNA和磁珠-抗体复合物加入到含有核糖核酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的免疫沉淀缓冲液中,并在4 ℃下孵育过夜。用洗脱缓冲液洗脱RNA,提取并用苯酚-氯仿纯化。将洗脱和纯化的m6A修饰的RNA逆转录成cDNA,并通过RT-qPCR分析m6A的富集情况。

1.3.11 RNA结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)测定 采用Magna RIP RNA试剂盒进行实验。转染的细胞用裂解缓冲液裂解,裂解物与anti-ALKBH5或阴性对照IgG抗体偶联的磁珠孵育。用蛋白酶K消化小珠子中的蛋白和RNA,然后用RT-qPCR检测免疫沉淀RNA。

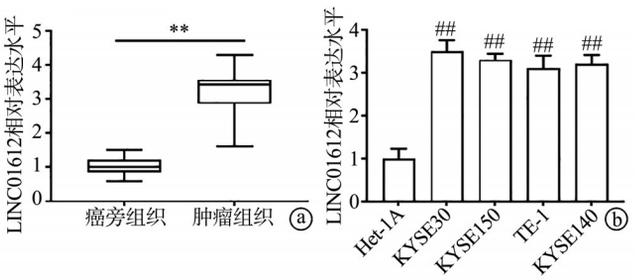
1.4 统计学分析

采用SPSS 22.0统计学软件进行分析,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用*Student's t*检验进行2组间的差异性分析,采用方差分析进行多组间差异性分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。所有实验重复3次。

2 结果

2.1 LINC01612在ESCC组织和细胞中的表达显著上调

通过RT-qPCR分析发现,与癌旁组织相比,ESCC患者肿瘤组织中LINC01612的表达水平显著升高($P<0.01$,图1a);与正常食管上皮细胞Het-1A相比,ESCC细胞系KYSE30、KYSE140、KYSE150和TE-1中LINC01612表达水平均显著升高($P<0.01$,图1b)。在4种ESCC细胞中,KYSE30细胞中LINC01612表达水平最高,因此将KYSE30细胞用于后期研究。



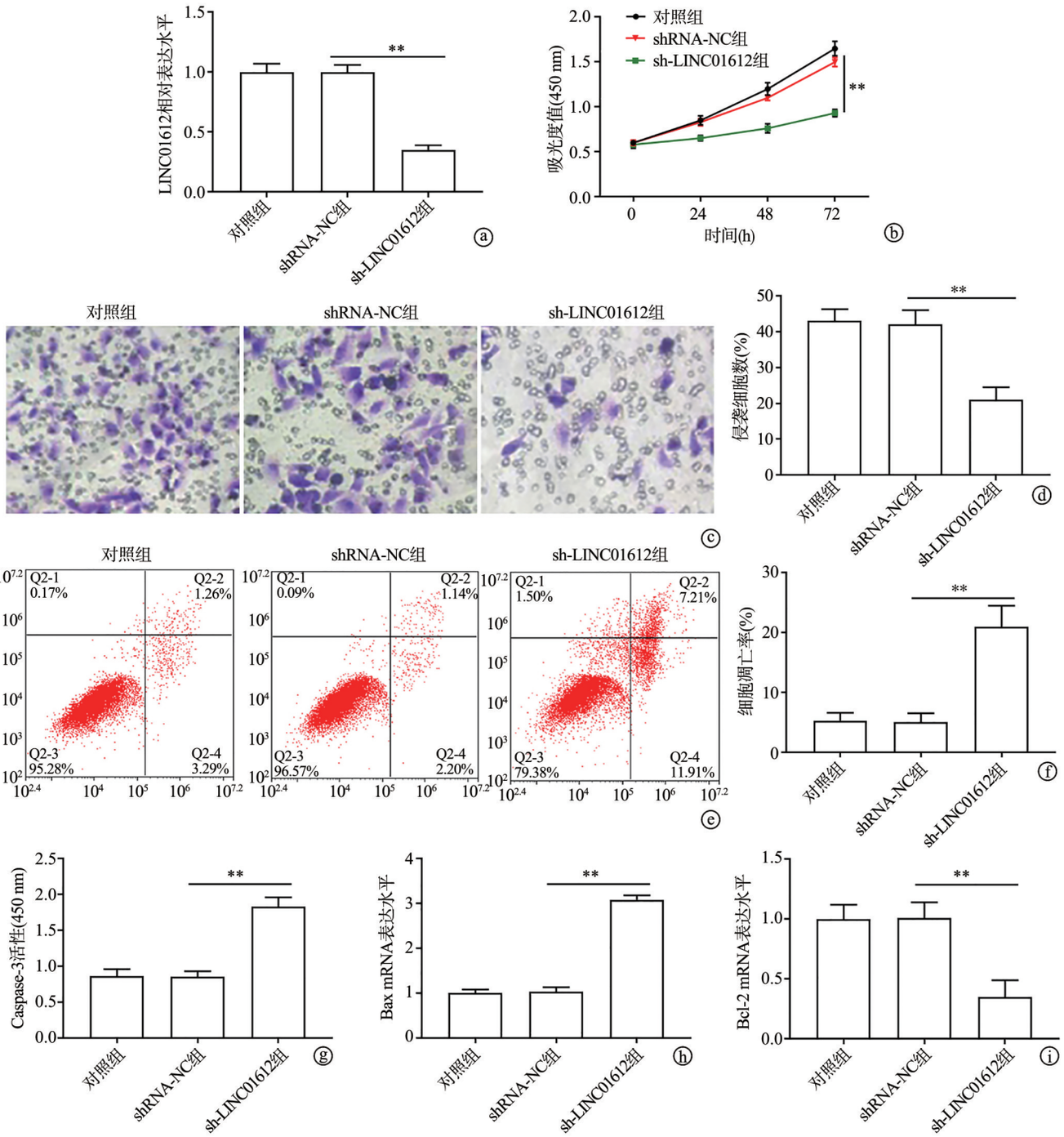
a:RT-qPCR检测ESCC患者肿瘤组织和癌旁组织中LINC01612的表达水平;b:正常食管上皮细胞Het-1A和ESCC细胞系(KYSE30、KYSE150、KYSE140和TE-1)中LINC01612的表达水平 **:$P<0.01$;##:与Het-1A细胞比较,$P<0.01$

图1 LINC01612在ESCC患者肿瘤组织和细胞中的表达

2.2 敲低LINC01612抑制ESCC细胞的恶性增殖

RT-qPCR结果显示,转染sh-LINC01612后KYSE30细胞中的LINC01612的表达水平显著降低($P<0.01$),见图2a。CCK-8和Transwell结果显示,沉默LINC01612显著抑制KYSE30细胞增殖和侵袭($P<0.01$),见图2b~d。流式细胞术结果显示,沉默LINC01612显著诱导KYSE30细胞凋亡($P<0.01$),见图2e、f。ELISA和RT-qPCR结果显示,KYSE30细胞中Caspase-3活性和凋亡相关因子Bax mRNA表达水平在沉默LINC01612

后显著升高,而抗凋亡因子Bcl-2的mRNA表达水平显著降低($P<0.01$),见图2g~i。以上结果提示,LINC01612可能在ESCC中作为一个致癌基因发挥作用。



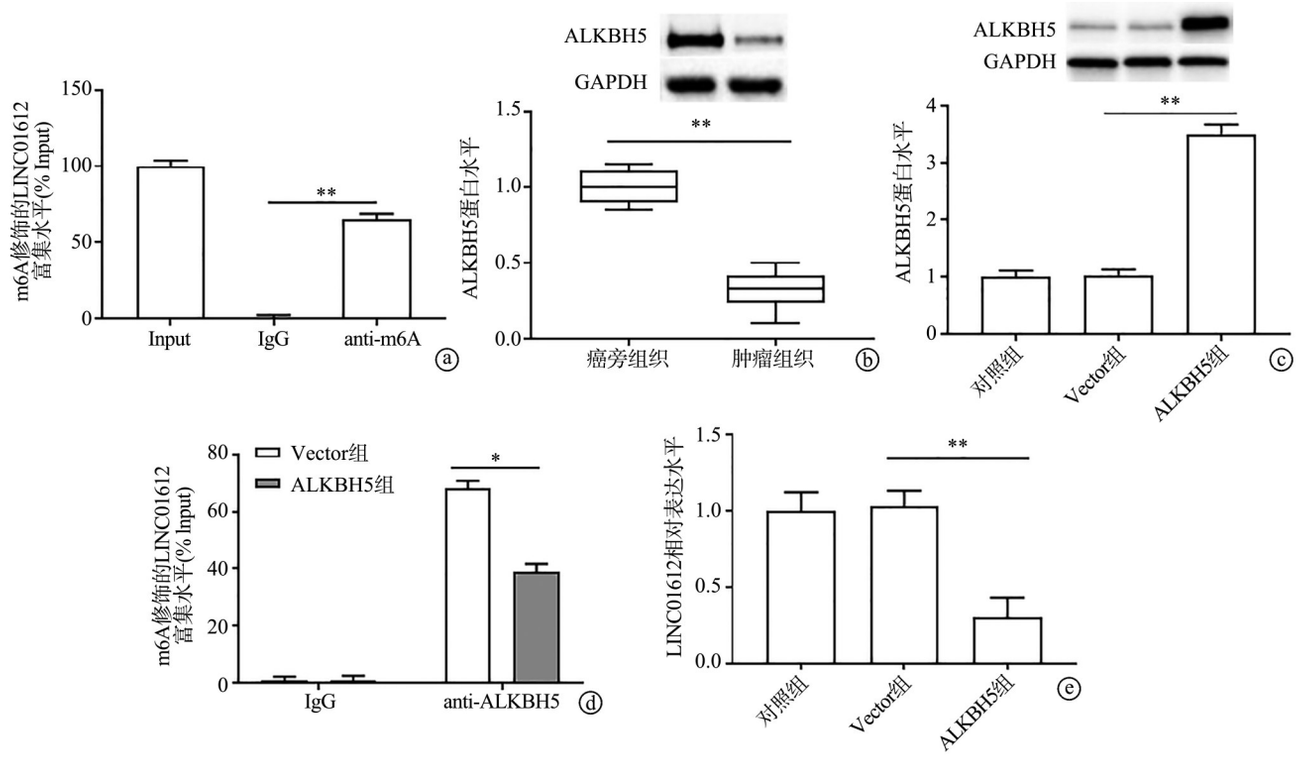
a:RT-qPCR检测LINC01612的相对表达水平;b:CCK-8检测细胞的增殖能力;c:Transwell检测细胞的侵袭能力(×200);d:侵袭细胞数统计结果;e:流式细胞术分析凋亡细胞数;f:细胞凋亡率统计结果;g:ELISA检测细胞中Caspase-3活性;h、i:RT-qPCR检测细胞中Bax和Bcl-2的mRNA表达水平　**:$P<0.01$

图2　LINC01612对KYSE30细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

2.3　ALKBH5介导m6A去甲基化修饰抑制LINC01612表达

MeRIP分析显示,LINC01612在anti-m6A抗体下拉的RNA-蛋白复合物中显著富集($P<0.01$),见图3a。Western blot结果显示,ESCC肿瘤组织中ALKBH5蛋白表达水平显著低于癌旁组织($P<0.01$),见图3b;ALKBH5组ALKBH5蛋白水显著高于Vector组($P<0.01$),见图3c。RIP分析显示,与Vector组相比,ALKBH5组

Anti-ALKBH5抗体下拉的RNA-蛋白复合物中m6A修饰的LINC01612富集水平显著降低($P<0.05$),图3d。RT-qPCR结果显示,ALKBH5组LINC01612表达显著低于Vector组($P<0.01$),见图3e。以上结果显示,ALKBH5介导的m6A去甲基化抑制ESCC中LINC01612的上调。



a:MeRIP分析LINC01612的m6A修饰;b:Western blot检测ESCC患者的肿瘤组织和癌旁组织中ALKBH5蛋白表达水平;c:Western blot检测ALKBH5蛋白表达水平;d:RIP分析m6A修饰的LINC01612与ALKBH5的结合;e:RT-qPCR检测LINC01612的表达水平 *:$P<0.05$;**:$P<0.01$

图3 ALKBH5在ESCC中通过去m6A修饰上调LINC01612表达

2.4 ALKBH5通过下调LINC01612抑制ESCC细胞的恶性增殖

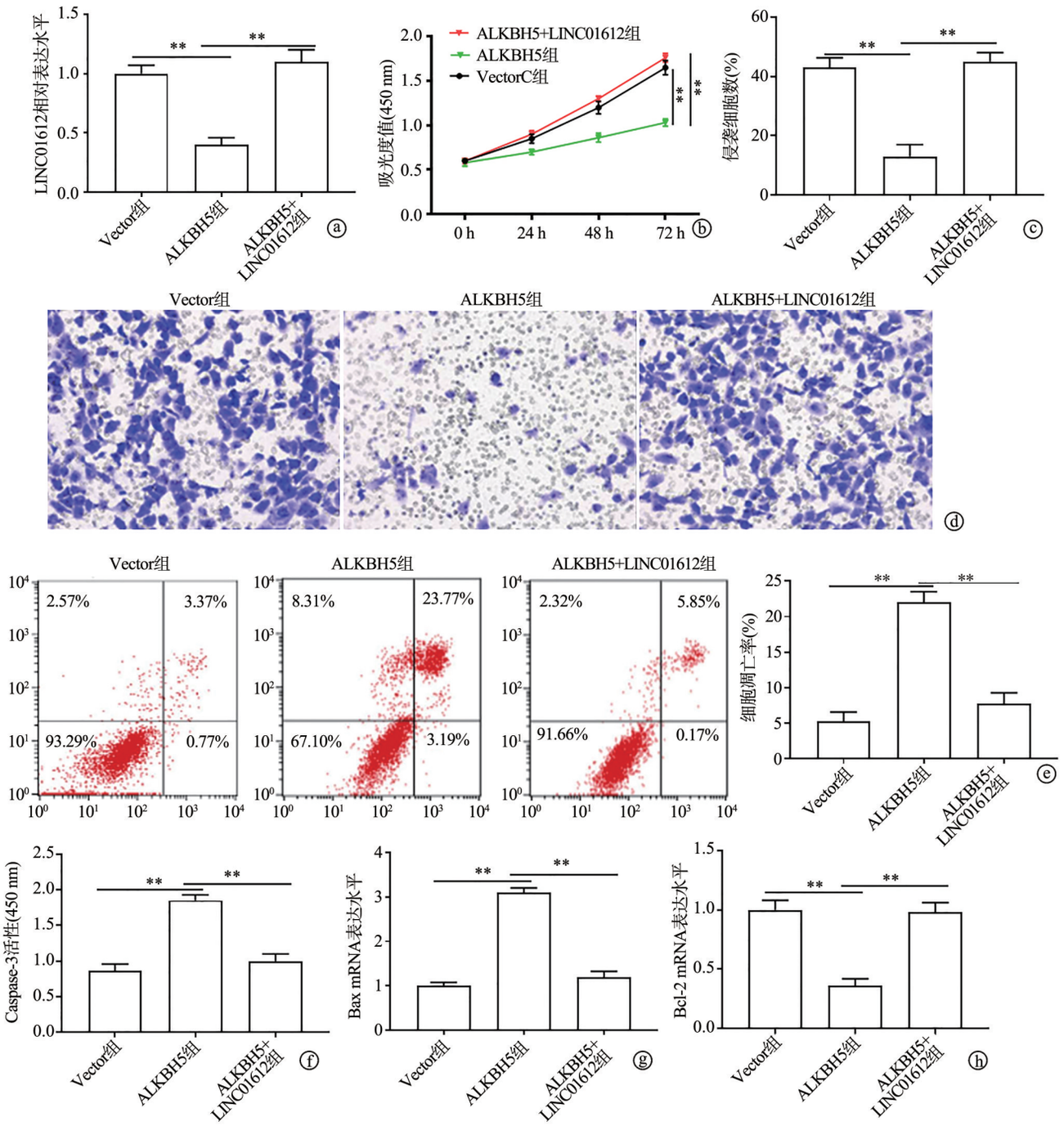
RT-qPCR结果显示,与Vector组相比,过表达ALKBH5显著降低LINC01612表达水平,而同时过表达ALKBH5和LINC01612使LINC01612表达水平升高($P<0.01$),见图4a。CCK-8和Transwell结果显示,过表达ALKBH5显著抑制KYSE30细胞增殖和侵袭,而过表达LINC01612逆转了ALKBH5过表达对细胞增殖和侵袭的抑制作用($P<0.01$),见图4b~d。流式细胞术分析结果显示,过表达ALKBH5显著诱导KYSE30细胞凋亡,Caspase-3活性升高,Bax mRNA表达增加,Bcl-2 mRNA表达降低,而过表达LINC01612逆转了ALKBH5过表达诱导的上述作用($P<0.01$),见图4e~h。以上结果提示,ALKBH5通过下调LINC01612表达抑制ESCC细胞增殖和侵袭,诱导细胞凋亡。

2.5 IGF2BP1通过识别m6A修饰的LINC01612促进其稳定

RIP分析结果显示,m6A修饰的LINC01612在anti-IGF2BP1抗体下拉的RNA-蛋白复合物中显著富集($P<0.01$),见图5a。过表达IGF2BP1后KYSE30细胞中IGF2BP1的蛋白水平显著升高($P<0.01$),图5b、c。而过表达IGF2BP1对anti-IGF2BP1抗体下拉的RNA-蛋白复合物中m6A修饰的LINC01612的富集无明显影响($P>0.05$),见图5d。过表达IGF2BP1显著延长了LINC01612的半衰期,增强LINC01612的稳定性($P<0.01$),图5e。过表达IGF2BP1促进LINC01612表达($P<0.01$),见图5f。以上结果提示,IGF2BP1以m6A依赖性促进ESCC细胞中LINC01612的上调。

3 讨论

LncRNA是癌症的重要参与者,对于ESCC等多种癌症的发生发展具有调节功能[10]。研究显示,LINC01612在肝细胞癌组织中表达显著下调,通过调节miR-494/ATF3/p53轴促进YBX1泛素化,从而抑制肝细胞癌的进展[12];此外,研究显示,LINC01612在食管癌中显著上调,可预测食管癌患者的预后[11]。本研

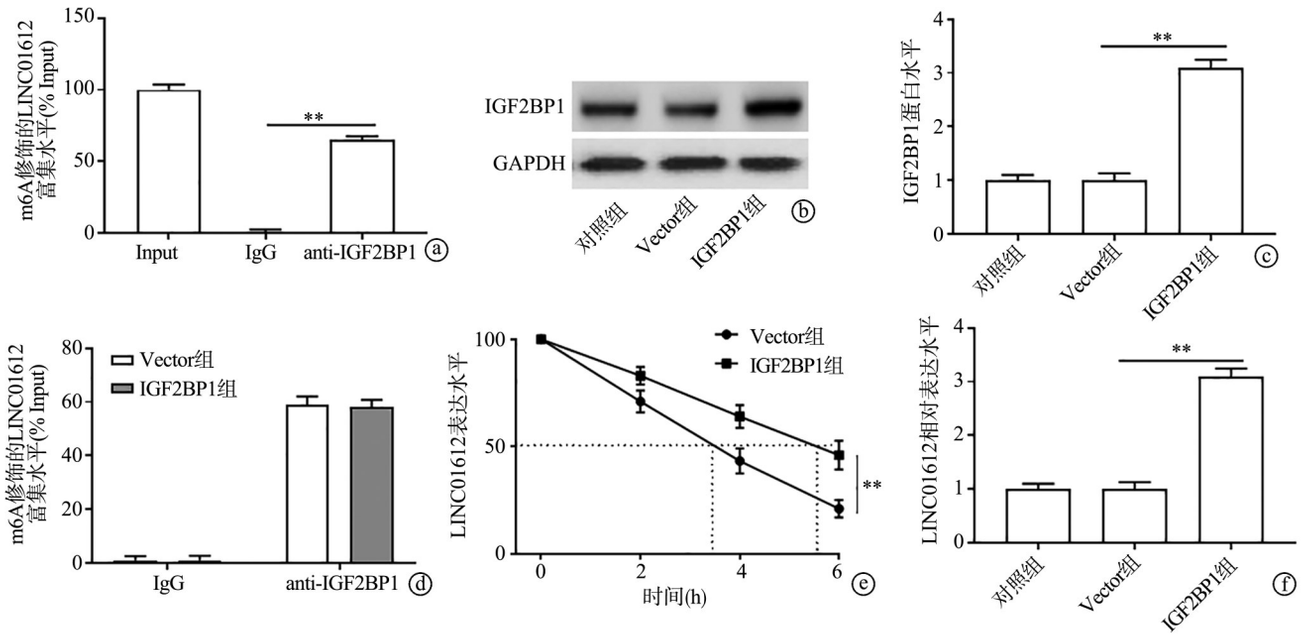


a:RT-qPCR检测LINC01612的表达;b:CCK-8检测细胞的增殖能力;c、d:Transwell检测细胞的侵袭能力(×200);e:流式细胞术检测细胞凋亡情况;f:ELISA检测Caspase-3活性;g、h:RT-qPCR检测Bax、Bcl-2的mRNA表达水平　**:$P<0.01$

图4　ALKBH5通过下调LINC01612抑制ESCC细胞增殖和侵袭并诱导细胞凋亡

究的结果与既往研究一致,表明LINC01612在ESCC的发生发展过程中可能作为一个致癌基因发挥作用。

为了更进一步探究LINC01612参与ESCC进展的分子机制,我们评估了LINC01612的m6A修饰,发现LINC01612在anti-m6A抗体下拉的RNA-蛋白复合物中显著富集。m6A修饰在多个细胞过程和多种疾病的发病机制中具有重要调节作用,尤其是癌症[5,8]。然而,关于RNA修饰在癌症进展中的调节机制的了解仍然有限。m6A作为最普遍的RNA修饰之一,可调节RNA的剪接、翻译、输出和稳定性,尤其是对lncRNA和mRNA的调节[7]。此外,负责m6A修饰的蛋白质包括甲基化酶(如METTL3/14)、去甲基化酶(如FTO和ALKBH5)和识别蛋白(如YTHDF1/2/3),这些调节酶的表达失调与多种癌症的发生发展密切相关[5,7]。越



a:RIP分析m6A修饰的LINC01612与IGF2BP1的结合;b、c:Western blot检测IGF2BP1蛋白表达水平;d:RIP分析IGF2BP1过表达对LINC01612和IGF2BP1结合的影响;e:放线菌素D实验检测LINC01612的稳定性;f:RT-qPCR检测LINC01612的表达水平 **:$P<0.01$

图5 IGF2BP1通过识别m6A修饰参与ALKBH5介导的LINC01612上调

来越多的研究表明,ALKBH5是一种负责消除RNA的m6A修饰的去甲基化蛋白,可调节细胞转移、增殖、分化和炎症等多种生物学过程,参与人类多种癌症的发生发展过程[13-14]。ALKBH5在食管癌中的作用存在争议。有报道显示,m6A去甲基化酶ALKBH5在ESCC中低表达,抑制ALKBH5有助于ESCC进展[15];过表达ALKBH5可抑制ESCCC细胞的恶性增殖和侵袭[16];也有报道显示,高表达的m6A去甲基酶ALKBH5与ESCC患者的不良预后相关,并且敲低ALKBH5会显著抑制人类ESCC细胞的增殖和迁移[17]。此外,有报道显示ALKBH5介导的m6A去甲基化通过稳定CASC8转录物导致CASC8上调,进而上调hnRNPL,促进ESCC的增殖和化疗耐药[18]。本研究结果显示,ALKBH5在ESCC的肿瘤组织中表达显著下调,过表达ALKBH5通过下调LINC01612表达,抑制ESCC细胞增殖和侵袭,诱导细胞凋亡。

m6A修饰的RNA在细胞中的功能主要由m6A识别蛋白决定,如IGF2BP、YTHDC、HNRNP、YTHDF1和YTHDF3,可促进RNA稳定、剪接或翻译[7,19]。本研究发现在ESCC中,过表达ALKBH5可以通过m6A依赖的方式下调LINC01612表达,但参与此过程的m6A识别蛋白却不清楚。

既往研究显示,RNA结合蛋白IGF2BP1可调节多个生物过程,参与多种癌症的发生发展[20-21]。MIR210HG通过IGF2BP1介导的m6A修饰促进乳腺癌进展[22];IGF2BP1过表达以m6A依赖性方式稳定PEG10 mRNA,并促进子宫内膜癌进展[23];在ESCC中,RNA结合蛋白IGF2BP1通过增强INHBA mRNA稳定性,促进ESCC细胞的侵袭和迁移,从而促进ESCC的发展[24];此外,IGF2BP1还可以通过识别m6A修饰的RPS15,并与其相互作用,促进ESCC的发展[25]。本研究结果证实,IGF2BP1通过识别m6A修饰的LINC01612调节其稳定性,上调LINC01612表达水平,从而促进ESCC进展。

综上所述,LINC01612是ESCC发生的促癌基因。m6A去甲基化酶ALKBH5以m6A-IGF2BP1依赖性方式介导LINC01612在ESCC细胞中的表达上调,从而促进ESCC细胞的增殖和侵袭,抑制细胞凋亡。本研究可为ESCC新治疗靶点的开发提供一定的参考依据。

[参考文献]

[1] Morgan E, Soerjomataram I, Rumgay H, et al. The global landscape of esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma incidence and mortality in 2020 and projections to 2040: new estimates from GLOBOCAN 2020[J]. Gastroenterology, 2022, 163(3):649-658.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2022.05.054.

[2] Zhu H, Ma X, Ye T, et al. Esophageal cancer in China: practice and research in the new era[J]. Int J Cancer, 2023, 152(9):1741-1751. doi: 10.1002/ijc.34301.

[3] Codipilly DC, Wang KK. Squamous cell carcinoma of the esophagus

[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2022, 51(3): 457-484. doi: 10.1016/j.gtc.2022.06.005.

[4] Wang H, Zhang Y, Chen L, et al. Identification of clinical prognostic features of esophageal cancer based on m6A regulators[J]. Front Immunol, 2022, 13:950365. doi: 10.3389/fimmu.2022.950365.

[5] Zhuang H, Yu B, Tao D, et al. The role of m6A methylation in therapy resistance in cancer[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1):91. doi: 10.1186/s12943-023-01782-2.

[6] Pan J, Huang T, Deng Z, et al. Roles and therapeutic implications of m6A modification in cancer immunotherapy[J]. Front Immunol, 2023, 14:1132601. doi: 10.3389/fimmu.2023.1132601.

[7] Petri BJ, Klinge CM. m6A readers, writers, erasers, and the m6A epitranscriptome in breast cancer[J]. J Mol Endocrinol, 2023, 70(2):e220110. doi: 10.1530/jme-22-0110.

[8] Fernandez Rodriguez G, Cesaro B, Fatica A. Multiple roles of m6A RNA modification in translational regulation in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16):8971. doi: 10.3390/ijms23168971.

[9] Herman AB, Tsitsipatis D, Gorospe M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. Mol Cell, 2022, 82(12):2252-2266. doi: 10.1016/j.molcel.2022.05.027.

[10] Adnane S, Marino A, Leucci E. LncRNAs in human cancers: signal from noise[J]. Trends Cell Biol, 2022, 32(7): 565-573. doi: 10.1016/j.tcb.2022.01.006.

[11] Lin C, Wang Y, Dong Y, et al. N6-methyladenosine-mediated SH3BP5-AS1 upregulation promotes GEM chemoresistance in pancreatic cancer by activating the Wnt signaling pathway[J]. Biol Direct, 2022, 17(1):33. doi: 10.1186/s13062-022-00347-5.

[12] Liu P, Zhong Q, Song Y, et al. Long noncoding RNA Linc01612 represses hepatocellular carcinoma progression by regulating miR-494/ATF3/p53 axis and promoting ubiquitination of YBX1[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(7):2932-2948. doi: 10.7150/ijbs.69514.

[13] Qu J, Yan H, Hou Y, et al. RNA demethylase ALKBH5 in cancer: from mechanisms to therapeutic potential[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1):8. doi: 10.1186/s13045-022-01224-4.

[14] Wei C, Wang B, Peng D, et al. Pan-cancer analysis shows that ALKBH5 is a potential prognostic and immunotherapeutic biomarker for multiple cancer types including gliomas[J]. Front Immunol, 2022, 13:849592. doi: 10.3389/fimmu.2022.849592.

[15] Xiao D, Fang TX, Lei Y, et al. m(6)A demethylase ALKBH5 suppression contributes to esophageal squamous cell carcinoma progression[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(17): 21497-21512. doi: 10.18632/aging.203490.

[16] Li J, Liu H, Dong S, et al. ALKBH5 is lowly expressed in esophageal squamous cell carcinoma and inhibits the malignant proliferation and invasion of tumor cells[J]. Comput Math Methods Med, 2021, 2021:1001446. doi: 10.1155/2021/1001446.

[17] Nagaki Y, Motoyama S, Yamaguchi T, et al. m(6)A demethylase ALKBH5 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma associated with poor prognosis[J]. Genes Cells, 2020, 25(8):547-561. doi: 10.1111/gtc.12792.

[18] Wu Q, Zhang H, Yang D, et al. The m6A-induced lncRNA CASC8 promotes proliferation and chemoresistance via upregulation of hnRNPL in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(13):4824-4836. doi: 10.7150/ijbs.71234.

[19] Jiang X, Liu B, Nie Z, et al. The role of m6A modification in the biological functions and diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1):74. doi: 10.1038/s41392-020-00450-x.

[20] Zhu S, Wang JZ, Chen D, et al. An oncopeptide regulates m(6)A recognition by the m(6)A reader IGF2BP1 and tumorigenesis[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):1685. doi: 10.1038/s41467-020-15403-9.

[21] Huang X, Zhang H, Guo X, et al. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) in cancer[J]. J Hematol Oncol, 2018, 11(1):88. doi: 10.1186/s13045-018-0628-y.

[22] Shi W, Tang Y, Lu J, et al. MIR210HG promotes breast cancer progression by IGF2BP1 mediated m6A modification[J]. Cell Biosci, 2022, 12(1):38. doi: 10.1186/s13578-022-00772-z.

[23] Zhang L, Wan Y, Zhang Z, et al. IGF2BP1 overexpression stabilizes PEG10 mRNA in an m6A-dependent manner and promotes endometrial cancer progression[J]. Theranostics, 2021, 11(3): 1100-1114. doi: 10.7150/thno.49345.

[24] Wang JJ, Chen DX, Zhang Y, et al. Elevated expression of the RNA-binding protein IGF2BP1 enhances the mRNA stability of INHBA to promote the invasion and migration of esophageal squamous cancer cells[J]. Exp Hematol Oncol, 2023, 12(1): 75. doi: 10.1186/s40164-023-00429-8.

[25] Zhao Y, Li Y, Zhu R, et al. RPS15 interacted with IGF2BP1 to promote esophageal squamous cell carcinoma development via recognizing m(6)A modification[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1):224. doi: 10.1038/s41392-023-01428-1.

(编辑:刘 艺)