

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.07.002

· 专题报道(基础研究) ·

## 长链非编码 RNA XLOC\_005009 对食管鳞状细胞癌生物学特性的影响

刘胜男, 徐凤楼, 卢帆, 董稚明, 邝钢, 郭艳丽, 沈素朋, 梁佳, 郭炜(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 *XLOC\_005009* 基因对食管鳞状细胞癌(ESCC)的体外增殖、迁移、侵袭和细胞周期与细胞凋亡等生物学特性的影响。**方法:** 收集2015-2016年河北医科大学第四医院肿瘤研究所57例ESCC患者手术切除的癌组织及癌旁组织标本。应用实时荧光定量PCR检测*XLOC\_005009*基因在人ESCC细胞系Eca109、Kyse170与ESCC组织及其癌旁组织的表达,构建pcDNA3.1-*XLOC\_005009*过表达质粒并转染Eca109、Kyse170细胞,应用MTS法、克隆形成实验、划痕实验、Transwell小室、流式细胞术分别检测转染前后细胞增殖、克隆形成、迁移、侵袭、细胞周期与凋亡的变化。**结果:** *XLOC\_005009* mRNA在食管癌组织中的表达明显低于癌旁组织( $0.06 \pm 0.06$  vs  $0.21 \pm 0.19$ ,  $P < 0.05$ ),且食管癌细胞*XLOC\_005009* mRNA表达亦均低于对照组( $P < 0.05$ )。转染过表达质粒的Eca109和Kyse170细胞*XLOC\_005009*基因表达显著高于对照组(Eca109细胞:  $0.39 \pm 0.17$  vs  $0.02 \pm 0.00$ ; Kyse170细胞:  $0.35 \pm 0.08$  vs  $0.01 \pm 0.01$ , 均 $P < 0.05$ )。与对照组相比,*XLOC\_005009*基因过表达Eca109和Kyse170细胞增殖能力细胞显著减弱( $P < 0.05$ );克隆形成率显著减少( $P < 0.05$ );穿膜细胞数显著减少[Eca109细胞: ( $146.40 \pm 34.47$ ) vs ( $193.00 \pm 26.33$ ); Kyse170细胞: ( $157.80 \pm 32.51$ ) vs ( $269.00 \pm 29.89$ ), 均 $P < 0.05$ ];Eca109细胞迁移率无显著变化,Kyse170细胞迁移率明显减小( $P < 0.05$ );S期细胞比例增加,细胞凋亡影响不明显。**结论:** *XLOC\_005009*低表达与食管癌的发生发展密切相关,*XLOC\_005009*过表达可抑制食管癌细胞的体外增殖、侵袭与迁移能力。

**[关键词]** 食管鳞癌;*XLOC\_005009*基因;长链非编码RNA

**[中图分类号]** R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)07-0700-08

### Effect of lncRNA XLOC\_005009 on biological properties of esophageal cancer cell

LIU Shengnan, XU Fenglou, LU Fan, DONG Zhiming, KUANG Gang, GUO Yanli, SHEN Supeng, LIANG Jia, GUO Wei (The 4<sup>th</sup> Hospital of Hebei Medical University and Hebei Tumor Institute, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

**[Abstract] Objective:** To explore effect of long non coding RNA (lncRNA) of *XLOC\_005009* gene on biological properties, proliferation, migration, invasion, cell cycle and apoptosis *in vitro*, of esophageal cancer cell. **Methods:** The surgically resected cancer and para-cancerous tissues of 25 patients with esophageal cancer who hospitalized in the Tumor Institute of the 4<sup>th</sup> Hospital of Hebei Medical University during 2015 to 2016 were collected. Expressions of *XLOC\_005009* gene in human esophageal cancer Eca109 and Kyse170 line cells, the esophageal cancer and para-cancerous tissues were detected by RT-PCR. pcDNA3.1-*XLOC\_005009* over-expression plasmid was structured and transfected into the Eca109 and Kyse170 cells. MTS, colony forming, scratching, Transwell chamber and flow cytometry assays were used respectively to check proliferation, cloning efficiency, migration, invasion, cell cycle and apoptosis of the cells, before and after transfection of the over-expression plasmid. **Results:** Expression of *XLOC\_005009* mRNA in the esophageal cancer tissue was obviously lower than that in the para-cancerous normal tissue ( $0.06 \pm 0.06$  vs  $0.21 \pm 0.19$ ,  $P < 0.05$ ), and expressions of *XLOC\_005009* mRNA in the esophageal cancer cells

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81472335),河北省自然科学基金资助项目(No. H2015206196)。Project supported by the National Natural Science Foundation (No. 81472335), and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2015206196)

**[作者简介]** 刘胜男(1990-),女,硕士研究生,主要从事肿瘤分子病因学的研究,E-mail:1290123723@qq.com

**[通信作者]** 郭炜(GUO Wei, corresponding author),博士,博士生导师,教授,主要从事肿瘤的分子病因学、分子遗传学及表观遗传学的研究,E-mail:guowei7303@163.com

**[优先发表]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170707.1518.004.html>

were all lower than that in the control group. In the Eca109 and Kyse170 cells transfected with the over-expression plasmid, expressions of *XLOC\_005009* gene were higher than those in the control groups (Eca109 cell:  $0.39 \pm 0.17$  vs  $0.02 \pm 0.00$ ; Kyse170 cell:  $0.35 \pm 0.08$  vs  $0.01 \pm 0.01$ , all  $P < 0.05$ ). And comparing with the control group, proliferation abilities of the Eca109 and Kyse170 cells with over-expression of *XLOC\_005009* gene were significantly weakened ( $P < 0.05$ ), their cloning efficiency evidently reduced, transmembrane cell numbers of the cells remarkably decreased (Eca109 cell:  $146.40 \pm 34.47$  vs  $193.00 \pm 26.33$ ; Kyse170 cell:  $157.80 \pm 32.51$  vs  $269.00 \pm 29.89$ , all  $P < 0.05$ ), migration efficiency of the Eca109 cell didn't markedly change, but that of the Kyse170 cell obviously reduced; S phase cell ratio of the cells increased; effecting on apoptosis of the cells was not obvious. **Conclusion:** Low-expression of *XLOC\_005009* might be closely related to occurrence and development of the esophageal cancer. Over-expression of *XLOC\_005009* could inhibit proliferation, invasion and migration *in vitro* of the esophageal cancer cells.

**[Key words]** esophageal squamous cell carcinoma; *XLOC\_005009* gene; long non coding RNA (lncRNA)

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(7): 700-707. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.002]

食管癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,我国是食管癌高发区,其中90%是食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinomas, ESCC),但是,科学技术及化疗和放疗技术的进步并没有显著改善ESCC的预后,患者5年生存率只有15%~25%<sup>[1]</sup>。过去研究者一直关注蛋白编码基因在肿瘤发生发展中的作用,并未注意到非编码RNA对肿瘤的影响。然而近年来研究发现,长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)可能在肿瘤的形成和进展过程中发挥着重要的生物学作用,并有研究<sup>[2]</sup>证明,lncRNA对肿瘤的侵袭和转移也产生一定影响。本课题组查阅相关lncRNA数据库lncipedia(<https://lncipedia.org/db/search>),筛选出长链非编码基因*XLOC\_005009*,该基因位于人染色体5q31.1,有4个转录本,有研究<sup>[3]</sup>证明,*XLOC\_005009*在膀胱癌中的表达与其对应的癌旁组织相比呈现下调趋势。本课题组前期研究<sup>[4]</sup>证明,*XLOC\_005009*基因在ESCC组织中表达呈现下调趋势,并且与淋巴结转移、分化程度和临床分期密切相关。为了进一步探讨*XLOC\_005009*在食管癌中的生物学作用,本研究通过构建pcDNA3.1-*XLOC\_005009*表达载体,转染人ESCC Eca109、Kyse170系细胞,并检测其对ESCC细胞体外增殖、侵袭、迁移和细胞周期与细胞凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与主要试剂

6株ESCC细胞系(TE1、TE13、T.Tn、YES2、Eca109和Kyse170)由河北医科大学第四医院肿瘤研究所病理研究室留存并传代;pUC57-*XLOC\_005009*质粒由上海生工公司合成;EX5 $\alpha$ 感受态细胞由北京庄盟生物科技有限公司提供;表达载体pcDNA3.1由

美国Invitrogen公司提供。逆转录试剂盒、T4连接酶、HD转染试剂,MTS试剂均购自美国Promega公司;TRIzol试剂购自美国SBS公司;内切酶购自美国Thermo公司;胎牛血清购自德国PAN公司;RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司;Transwell小室、Matrigel胶均购自美国Corning公司。

### 1.2 病理标本

标本取自2015-2016年河北医科大学第四医院肿瘤研究所标本库57例ESCC手术患者,术前均未接受放疗和化疗。每例患者取ESCC原发灶组织及距原发灶边缘3~5cm以上的相应癌旁组织。手术切除标本一部分常规制作蜡块行H-E染色;一部分新鲜标本放入-80℃低温冰箱保存,用于提取总RNA。所有组织标本经H-E染色,由3位病理医师确诊为ESCC组织,癌旁组织未见癌细胞浸润。

### 1.3 ESCC细胞系培养

ESCC细胞培养用含10%胎牛血清、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100  $\mu$ g/ml)和8% NaHCO<sub>3</sub>的RPMI 1640培养液,于37℃、5% CO<sub>2</sub>孵箱培养。

### 1.4 实时荧光定量PCR检测ESCC细胞系和ESCC组织中*XLOC\_005009*的表达

根据TRIzol试剂说明书步骤提取TE1、TE13、T.Tn、YES2、Eca109和Kyse170细胞和ESCC组织及相应癌旁正常组织的总RNA,反转录成cDNA,再以cDNA为模板进行实时荧光定量PCR检测,选用GAPDH作为内参照。其引物序列及产物大小见表1。反应条件为:95℃预变性10 min;95℃变性45 s、57℃退火45 s、72℃延伸50 s(35个循环);72℃延伸7 min,4℃保存。将PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳检测,并用Gel Pro Analyzer 3.1软件测定条带的灰度值,计算*XLOC\_005009* mRNA的相对表达量。

实验重复3次,取平均值。

表1 *XLOC\_005009*基因实时荧光定量PCR引物及产物大小  
Tab. 1 Primer sequences and product size of Real time-PCR for *XLOC\_005009*

Gene	Primer sequence	Product size (bp)
<i>XLOC_005009</i>	F:5'-GATGTAGCGAACCAGCAG-3'	329
	R:5'-AACGAACGAACGAACGAA-3'	
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	104
	R: 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'	

### 1.5 构建 *XLOC\_005009* 基因过表达载体

大量扩增克隆载体 pUC57-*XLOC\_005009* 和 pcDNA3.1 质粒,分别包含 *EcoR* I 和 *Hind*III 内切酶位点。将 pUC57-*XLOC\_005009* 和 pcDNA3.1 质粒分别进行酶切,并行 1%琼脂糖凝胶电泳,回收预期大小 DNA 片段。利用 T4 连接酶连接纯化后的基因片段并转化感受态细胞,挑取单克隆菌落于含 0.1%氨苄青霉素的 LB 培养液中培养过夜后进行酶切纯化。将含有目的基因序列的表达载体 pcDNA3.1-*XLOC\_005009* 大量扩增并提取,于 -20 °C 保存备用。

### 1.6 表达载体 pcDNA3.1-*XLOC\_005009* 转染 Eca109 和 Kyse170 细胞

选择生长状态良好的 Eca109 和 Kyse170 细胞用胰酶消化并计数,将两株细胞均匀铺于 6 孔板(2×10<sup>5</sup> 个/孔),细胞长至 80%左右时转染,在 EP 管中加入无血清培养基与表达载体 pcDNA3.1-*XLOC\_005009*,室温孵育 5 min;按转染试剂 HD(体积):质粒(质量)=2:1 的比例加入转染试剂,室温孵育 15 min;其中 1 孔加 200 μl 转染试剂质粒混合液作为实验组(experimental group),1 孔加等量空质粒作为空质粒对照组(empty plasmid group),1 孔加等量转染试剂作为空白试剂对照组(empty reagent group),1 孔为常规细胞培养对照组(Eca109 或 Kyse170 细胞)。培养 24~48 h 后,收集 Eca109 和 Kyse170 细胞提取总 RNA,用于观察两株细胞转染 *XLOC\_005009* 基因后 mRNA 的表达情况。

### 1.7 MTS 实验检测过表达 *XLOC\_005009* 对 Eca109 和 Kyse170 细胞增殖的影响

将上述实验组、空质粒对照组、空白试剂对照组和常规细胞培养对照组的 Eca109 和 Kyse170 细胞培养 24 h 后常规消化并悬浮于培养基中,调整细胞浓度分别接种于 96 孔板(1 000 个/孔),每组设置 3 个复孔。分别于细胞贴壁后 0、24、48、72 和 96 h 在每孔加

入 MTS 试剂 20 μl(500 μg/ml),孵育 4 h 后用酶标仪测定 492 nm 处的光密度(D)值,代表细胞增殖水平。

### 1.8 克隆形成实验检测过表达 *XLOC\_005009* 对 Eca109 和 Kyse170 细胞增殖的影响

将上述实验组、空质粒对照组、空试剂对照组和常规细胞培养组的 Eca109 和 Kyse170 细胞培养 24 h 后,常规消化并悬浮于培养基中,调整细胞浓度分别接种于 6 孔板(3 000 个/孔),常规培养 1 周。4%多聚甲醛固定后结晶紫染色,显微镜下计数克隆形成数,大于 50 个细胞为 1 个克隆,分别计算 4 组细胞克隆形成率。

### 1.9 划痕实验检测过表达 *XLOC\_005009* 对 Eca109 和 Kyse170 细胞迁移能力的影响

将上述实验组、空质粒对照组、空白试剂对照组和常规细胞培养组 Eca109 和 Kyse170 细胞培养 24 h 后,常规消化悬浮于培养基中,调整细胞浓度分别接种于 6 孔板(5×10<sup>5</sup> 个/孔)。待细胞完全融合时,用 200 μl 移液枪头垂直划痕。用 PBS 洗去划落细胞,并加入 2 ml 无血清培养基继续常规培养。分别于划痕后 0、12 和 24 h 在倒置显微镜下观察细胞的划痕间距,计算细胞迁移百分率。

### 1.10 Transwell 侵袭实验检测过表达 *XLOC\_005009* 对 Eca109 和 Kyse170 细胞侵袭能力的影响

将上述实验组、空质粒对照组、空白试剂对照组和常规细胞培养组 Eca109 和 Kyse170 细胞常规消化悬浮于无血清培养基,调整细胞浓度接种于小室(1×10<sup>5</sup> 个/孔),小室上层加 20 μl Matrigel 胶,下层加 600 μl 含 20%胎牛血清的完全培养基。常规培养 24 h 后取出小室,用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,PBS 洗两次,4%多聚甲醛固定后结晶紫染液染色,显微镜下计数 5 个随机视野内的细胞数,比较实验组和对照组的差异。

### 1.11 PI 染色流式细胞术检测过表达 *XLOC\_005009*



### 对Eca109和Kyse170细胞周期及凋亡的影响

将上述实验组、空质粒对照组、空白试剂对照组和常规细胞培养组Eca109和Kyse170细胞培养48 h后用不含EDTA的胰酶消化后收集细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/ml。70%乙醇4℃固定过夜。离心收集细胞,预冷的PBS洗涤细胞两次,加入PI染液,4℃避光孵育30 min,流式细胞仪检测4组细胞分别在G0/G1期,S期和G2/M期所占比例,以及细胞的凋亡率。

#### 1.12 统计学处理

采用SPSS21.0统计软件进行数据分析,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用SNK- $q$ 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ESCC细胞和组织中XLOC\_005009基因低表达

实时荧光定量PCR法分析结果显示,XLOC\_005009基因在ESCC组织中的表达量显著低于相应癌旁组织( $0.06 \pm 0.06$  vs  $0.21 \pm 0.19$ ,  $P < 0.05$ ) (图1A)。随机取10例癌旁组织的cDNA混合后作为细胞表达的对照组(Pools),XLOC\_005009基因在6株食管癌细胞的表达均低于对照组( $P < 0.05$ ),并且在这6株食管癌细胞中,Eca109和Kyse170细胞的表达最低(图1B、C),故选用Eca109和Kyse170细胞进行后续实验。

### 2.2 转染表达载体的Eca109和Kyse170细胞XLOC\_005009基因过表达

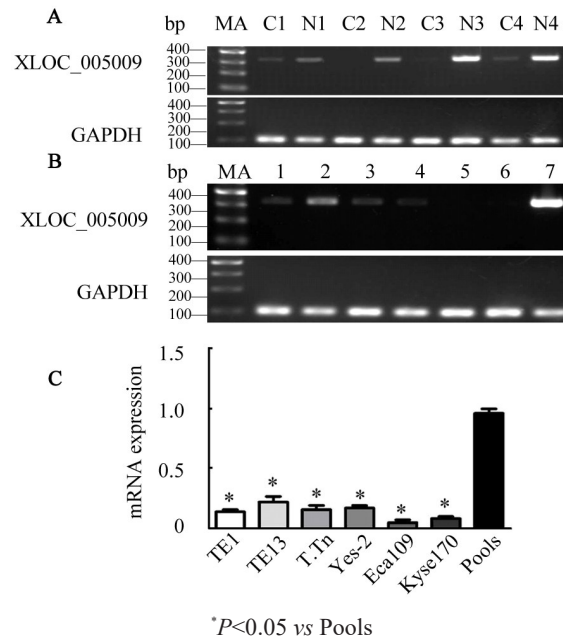
实验组Eca109和Kyse170细胞的XLOC\_005009基因表达均明显高于其他对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ) (图2)。这两株细胞的转染效率较高,故可以进行后续实验。

### 2.3 XLOC\_005009基因过表达抑制Eca109和Kyse170细胞的增殖能力

MTS实验结果表明,实验组XLOC\_005009基因过表达Eca109细胞D值比空质粒对照组,空白试剂对照组及常规细胞培养组明显减小,并且在72 h后具有统计学差异( $P < 0.05$ ),两对照组与常规细胞培养组无统计学差异( $P > 0.05$ ) (图3A);实验组XLOC\_005009基因过表达Kyse170细胞D值也比空质粒对照组、空白试剂对照组及常规细胞培养组明显减小,但在48 h后具有统计学差异( $P < 0.05$ ),两对照组与常规细胞培养组差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ ) (图3B)。

克隆形成试验结果显示,实验组XLOC\_005009

基因过表达Eca109细胞克隆形成率显著低于常规细胞培养组[( $11.88 \pm 0.98$ )% vs ( $16.90 \pm 1.94$ )%,  $P < 0.05$ ],空质粒对照组、空白试剂对照组与常规细胞培养组细胞克隆形成率无统计学差异( $P > 0.05$ ) (图4A)。实验组XLOC\_005009基因过表达Kyse170细胞克隆形成率显著低于常规细胞培养组[( $15.60 \pm 4.04$ )% vs ( $30.95 \pm 4.36$ )%,  $P < 0.05$ ],空质粒对照组、空白试剂对照组与常规细胞培养组细胞克隆形成率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) (图4B)。



C(1-3): ESCC tissues; N(1-4): corresponding noncancerous tissues; A: mRNA expression images in tissues; B: mRNA expression images in cell lines, 1:TE1; 2:TE13; 3: T.Tn; 4: Yes-2; 5: Eca109; 6: Kyse170; 7: Pools;

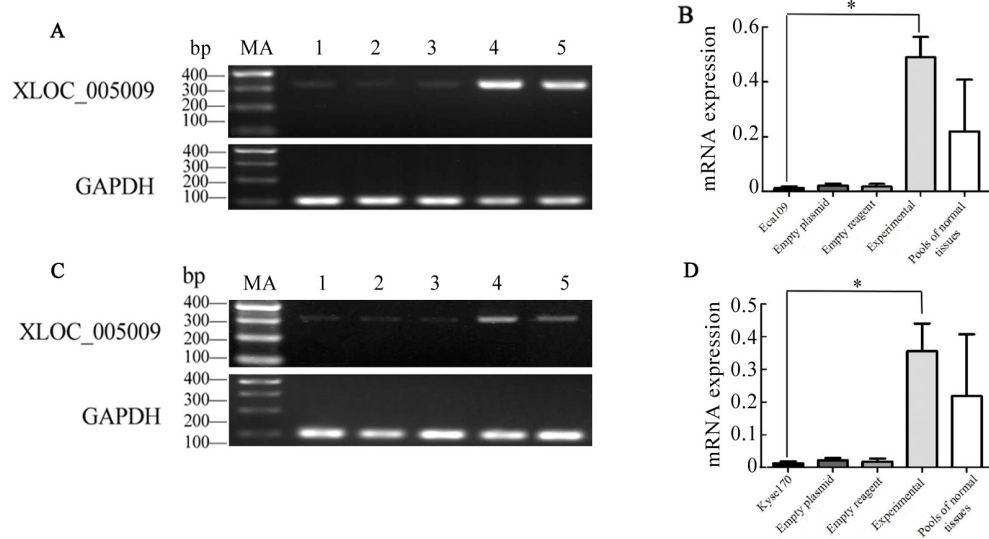
C: Statistical results of mRNA expression in cell lines

图1 XLOC\_005009基因在组织及细胞中的表达

Fig. 1 Expression of XLOC\_005009 gene in tissues and the cell lines

### 2.4 XLOC\_005009基因过表达抑制Kyse170细胞迁移能力

划痕实验结果(图5)显示实验组XLOC005009基因过表达Eca109细胞12和24 h划痕间距占原始间距的百分比与常规细胞培养组差异无统计学意义[12 h: ( $75.69 \pm 6.41$ )% vs ( $66.90 \pm 8.10$ )%; 24 h: ( $48.70 \pm 4.17$ )% vs ( $42.15 \pm 4.72$ )%, 均 $P > 0.05$ ];而实验组XLOC\_005009基因过表达Kyse170细胞24 h划痕间距占原始间距的百分比显著高于常规细胞培养组[( $50.35 \pm 4.08$ )% vs ( $35.40 \pm 2.25$ )%,  $P < 0.05$ ].



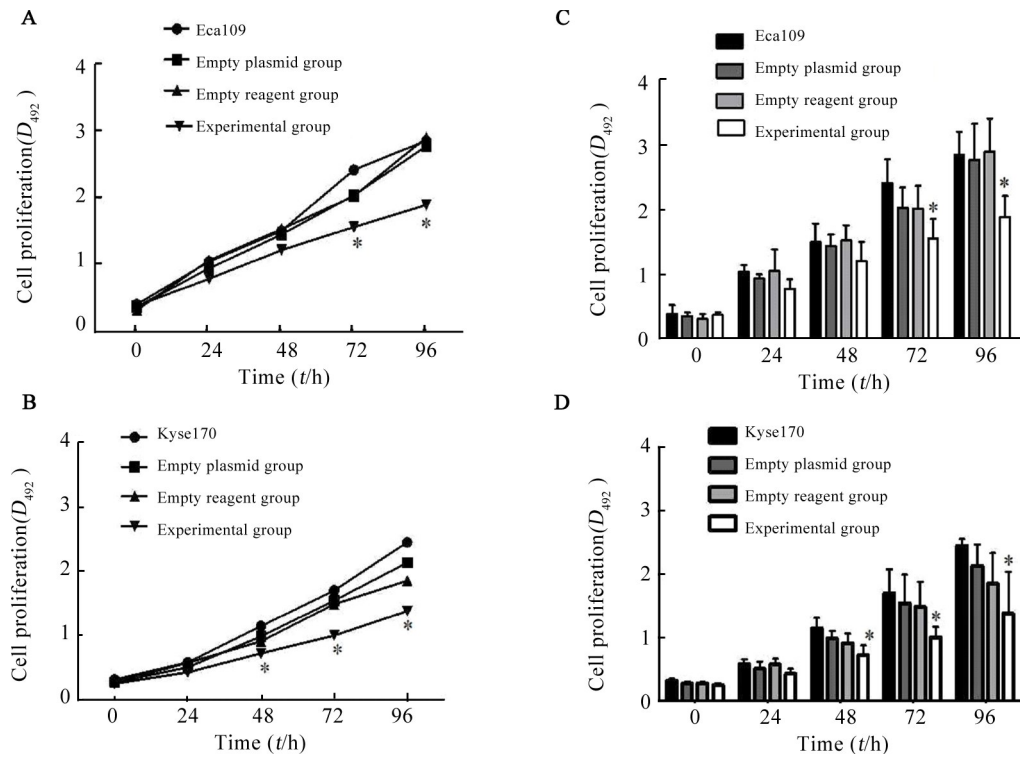
\* $P < 0.05$  vs Eca109, Kyse170, Empty plasmid group, Empty reagent group;

1: Eca109/Kyse170; 2: Empty plasmid group; 3: Empty reagent group; 4: Experimental group; 5: Pools of normal tissues

A: mRNA expression images of the Eca109 cell. B: Statistical results of mRNA expression of the Eca109 cell.  
C: mRNA expression images of the Kyse170 cell. D: Statistical results of mRNA expression of the Kyse170 cell

图2 各组 Eca109 细胞及 Kyse170 细胞 XLOC\_005009 基因的表达

Fig.2 Expressions of XLOC\_005009 gene in the Eca109 and the Kyse170 cells of the various groups

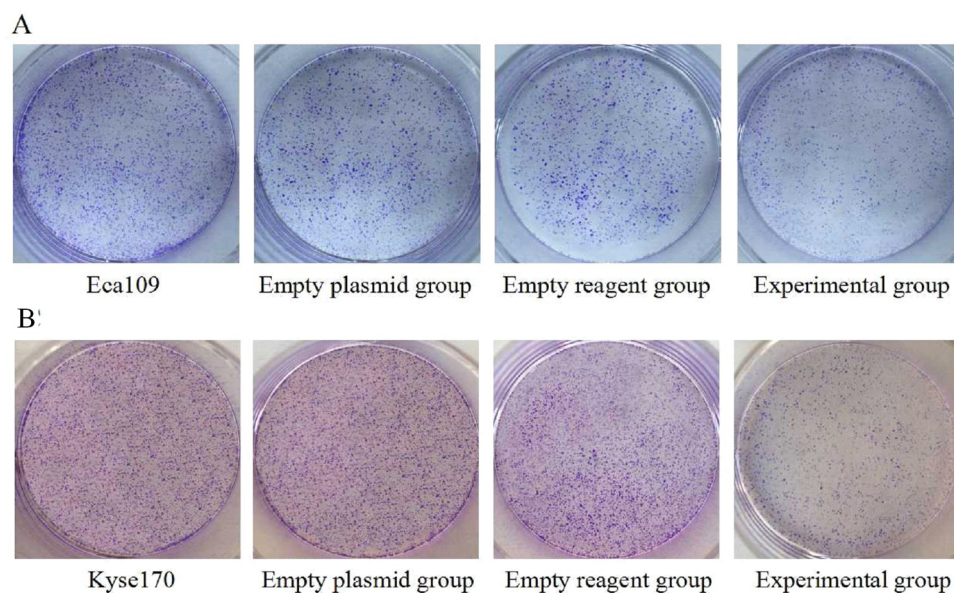


\* $P < 0.05$  vs Eca109, Kyse170, Empty plasmid group, Empty reagent group

A, C: Statistical results of MTS of the Eca109 cell; B, D: Statistical results of MTS of the Kyse170 cell.

图3 MTS 检测各组 Eca109 和 Kyse170 细胞增殖能力结果

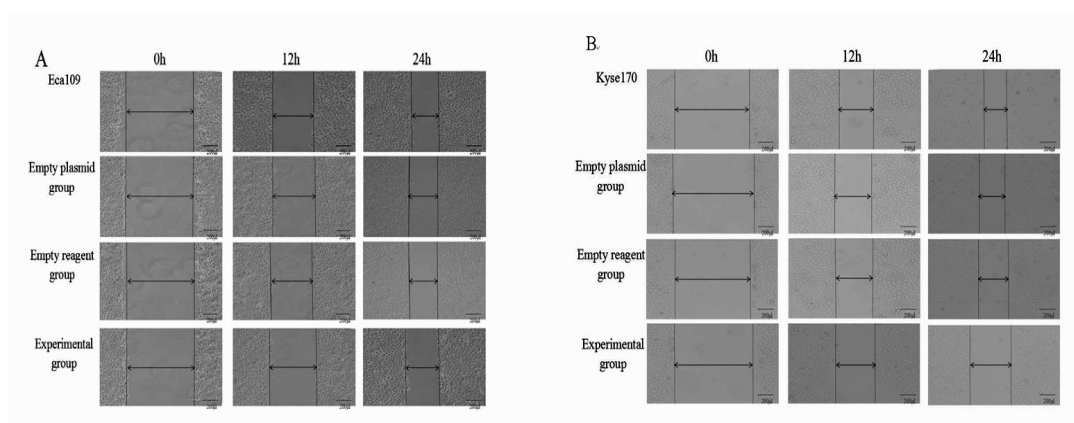
Fig.3 The results of proliferation abilities of the Eca190 and the Kyse170 cells in the various groups



A: Cell clone images of the Eca109 cell; B: Cell clone images of the Kyse170 cell

图4 各组 Eca109 和 Kyse170 细胞克隆形成实验结果

Fig. 4 The results of clone formation experiment of the Eca109 and the Kyse170 cells in the various groups



A: The Eca109 cell; B: The Kyse170 cell

图5 各组 Eca109 和 Kyse170 细胞划痕实验结果( $\times 100$ )

Fig. 5 The results of scratching experiment of the Eca109 and the Kyse170 cells in the various groups( $\times 100$ )

### 2.5 XLOC\_005009 基因过表达抑制 Eca109 和 Kyse170 细胞的侵袭能力

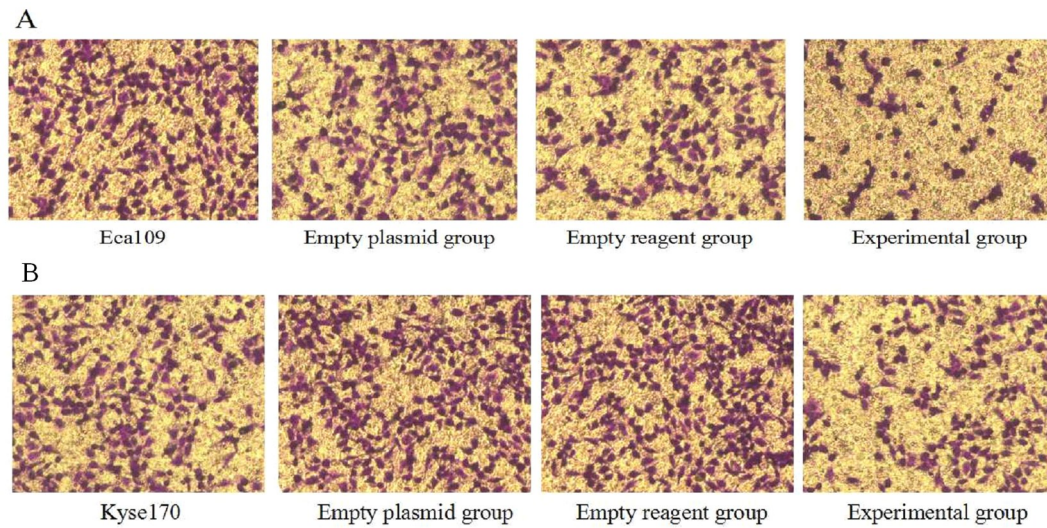
Transwell 侵袭实验结果(图6)显示,实验组 XLOC\_005009 基因过表达 Eca109 细胞通过人工基底膜的数量显著低于常规细胞培养组[(146.40 $\pm$ 34.47) vs (193.00 $\pm$ 26.33),  $P < 0.05$ ],空质粒对照组、空白试剂对照组和常规细胞培养组通过人工基底膜细胞数量差异无统计学意义( $P > 0.05$ );实验组 XLOC\_005009 基因过表达 Kyse170 细胞通过人工基底膜细胞数量也显著低于常规细胞培养组[(157.80 $\pm$ 32.51) vs

(269.00 $\pm$ 29.89),  $P < 0.05$ ],空质粒对照组、空白试剂对照组和常规细胞培养组通过人工基底膜细胞数量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.6 XLOC\_005009 基因过表达可使 Kyse170 细胞周期阻滞于 S 期

流式细胞术结果(图7)显示,实验组 XLOC\_005009 基因过表达 Eca109、Kyse170 细胞 G0/G1 期和 G2/M 期所占比例并没有明显改变,S 期细胞所占比例高于常规细胞培养组,且 Kyse170 细胞 S 期细胞比例差异显著( $P < 0.05$ )。

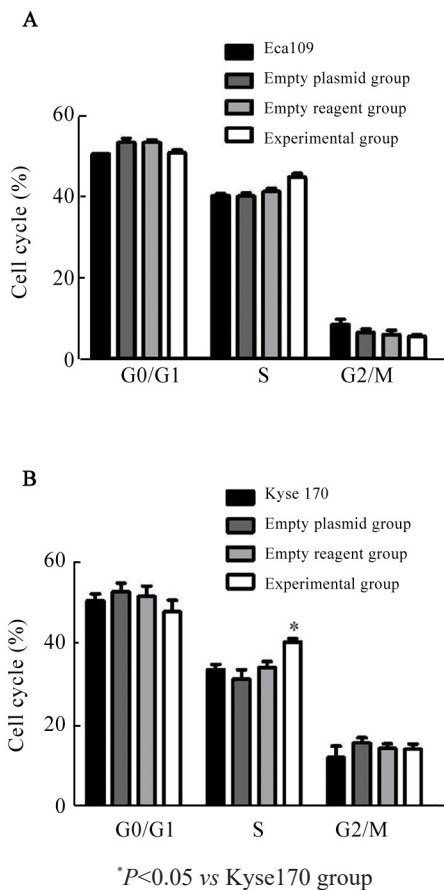




A: the Eca109 cell; B: the Kyse170 cell

图6 各组 Eca109 和 Kyse170 细胞 Transwell 实验结果(×200)

Fig. 6 The results of Transwell assays of the Eca109 and the Kyse170 cells in the various groups(×200)



A: Statistical results of cell cycle of the Eca109 cell;

B: Statistical results of cell cycle of the Kyse170 cell

图7 *XLOC\_005009* 基因过表达对食管癌细胞周期的影响

Fig. 7 The effect of *XLOC\_005009* gene overexpression on cell cycle of the esophageal cancer cells

### 2.7 *XLOC\_005009* 基因过表达对细胞凋亡的影响不明显

流式细胞学分析结果显示, 实验组 *XLOC\_005009* 基因过表达的 Eca109、Kyse170 细胞并没有明显的凋亡峰, 表明细胞中 DNA 片段没有出现明显的断裂和固缩, *XLOC\_005009* 基因过表达对食管癌 Eca109、Kyse170 细胞凋亡没有明显影响。

### 3 讨论

随着基因测序技术的发展, 人们发现绝大多数人类基因组的转录产物为非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 而其中 lncRNA 越来越受到人们的关注<sup>[5]</sup>。有研究者<sup>[6]</sup>认为, lncRNA 长度超过 200 个核苷酸, 并且没有蛋白编码能力, 不具备任何生物学功能, 被称为是基因组转录的“噪音”。然而现在越来越多的研究表明, lncRNA 具有类似 mRNA 的结构, 通常由 RNA 聚合酶 II 转录而来, 呈现出组织特异性表达<sup>[7]</sup>, 并且 lncRNA 具有与核酸和蛋白质相互作用的独特能力, 作为调节编码基因组的重要部分, 发挥了重要的生物学作用<sup>[8]</sup>。尤其是一些 lncRNA 在肿瘤发生过程中作为肿瘤启动子或抑制子发挥其生物学特性<sup>[9]</sup>, 并且 lncRNA 在癌症侵袭和转移的过程中也发挥着重要作用<sup>[10]</sup>。例如, H19 在各种癌症中表达上调, 影响肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移<sup>[11-12]</sup>; 肺癌转移相关转录本 1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1) 在癌症中高表达, 并且参与各种通路的调节, 影响癌细胞增殖和肿瘤转移<sup>[13-14]</sup>。

*XLOC\_005009*基因位于人染色体5q31.1,有4个转录本,长度分别为836、477、838和843 bp,其中转录本1、3和4的mRNA序列差异仅为几个碱基,考虑应是主要的转录本,故本实验选取其共同序列设计RT-PCR引物,检测其在ESCC组织及细胞系中表达情况,并以*XLOC\_005009*基因转录本1为目的基因构建克隆载体,成功构建pcDNA3.1-*XLOC\_005009*表达载体,转染人ESCC Eca109和Kyse170细胞系,发现转染后的Eca109和Kyse170细胞的增殖和侵袭能力降低。并且发现*XLOC\_005009*基因过表达的Kyse170细胞迁移能力有所降低,但是*XLOC\_005009*基因过表达对Eca109细胞迁移能力影响不明显。*XLOC\_005009*基因过表达仅对Kyse170细胞在S期细胞周期有明显的阻滞作用,但对两株细胞凋亡影响作用都不明显。出现这些结果的可能原因有:(1)Eca109细胞是高分化细胞株,而Kyse170细胞是中分化细胞株,由于细胞株本身分化程度不同而导致*XLOC\_005009*基因过表达对迁移能力的影响不同;(2)实验发现,Eca109细胞的迁移能力弱于Kyse170细胞,所以转染*XLOC\_005009*后虽然可抑制Eca09细胞的迁移,但是没有如抑制Kyse170细胞迁移那么明显;(3)由于Eca109和Kyse170细胞系的来源不同,各自的生物学特性也不尽一致,细胞癌变过程是多基因多步骤共同作用的结果,*XLOC\_005009*基因有可能与其他基因协同作用共同影响ESCC细胞系的生物学特性。Eca109和Kyse170细胞系的生物学特性不同可能会导致*XLOC\_005009*在细胞迁移过程中所起的作用不尽相同。综上所述,*XLOC\_005009*基因对ESCC细胞的体外增殖和侵袭能力具有一定的影响,并且使细胞阻滞于S期从而影响细胞增殖,这与本课题组前期研究<sup>[4]</sup>*XLOC\_005009*基因在ESCC组织中表达呈现下调趋势,并且与淋巴结转移、分化程度和临床分期相关的结论相一致。

总之,本研究提示*XLOC\_005009*基因可抑制ESCC细胞的增殖和侵袭能力,在食管癌的发生发展中有着非常重要的作用,对其深入研究可以进一步揭示*XLOC\_005009*基因在ESCC发生发展中发挥抑癌作用的机制。

#### [参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, 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] JIANG C, 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[2017-01-01]. <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-016-0545-z>. DOI: 10.1186/s12943-016-0545-z.
- [3] ZHU Y P, BIAN X J, YE D W, et al. Long noncoding RNA expression signatures of bladder cancer revealed by microarray [J]. Oncol Lett, 2014, 7(4): 1197-1202. DOI: 10.3892/ol.2014.1843.
- [4] 刘胜男,董稚明,邝钢,等.长链非编码RNA XLOC\_005009在食管鳞状细胞癌中的表达及甲基化状态[J].中国肿瘤,2017,26(3): 219-225. DOI: 10.11735/j.issn.1004-0242.2017.03.A011.
- [5] SANTOSH B, VARSHNEY A, YADAVA P K. Non-coding RNAs: biological functions and applications[J]. Cell Biochem Funct, 2015, 33(1): 14-22. DOI: 10.1002/cbf.3079.
- [6] LI X, WU Z, FU X, et al. Long Noncoding RNAs: insights from biological features and functions to diseases [J]. Med Res Rev, 2013, 33(3): 517-553. DOI: 10.1002/med.21254.
- [7] ZHANG H, CHEN Z, WANG X, et al. Long non-coding RNA: a new player in cancer[J/OL]. J Hematol Oncol, 2013, 6: 37 [2017-01-01]. <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-6-37>. DOI: 10.1186/1756-8722-6-37.
- [8] ZHAO X Y, LIN J D. Long noncoding RNAs: a new regulatory code in metabolic control [J]. Trends Biochem Sci, 2015, 40(10): 586-596. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.08.002.
- [9] SUN M, KAUS W L. From discovery to function: the expanding roles of long noncoding RNAs in physiology and disease [J]. Endocr Rev, 2015, 36(1): 25-64. DOI: 10.1210/er.2014-1034.
- [10] XIONG X D, REN X, CAI M Y, et al. Long non-coding RNAs: an emerging powerhouse in the battle between life and death of tumor cells [J/OL]. Drug Resist Updat, 2016, 26: 28-42 [2017-01-01]. [http://www.drugjournal.com/article/S1368-7646\(16\)30001-2/fulltext](http://www.drugjournal.com/article/S1368-7646(16)30001-2/fulltext). DOI: 10.1016/j.drug.2016.04.001.
- [11] LIU F T, PAN H, XIA G F, et al. Prognostic and clinicopathological significance of long noncoding RNA H19 overexpression in human solid tumors: evidence from a meta-analysis [J]. Oncotarget, 2016, 7(50): 83177-83186. DOI: 10.18632/oncotarget.13076.
- [12] LI S, YU Z, CHEN S S, et al. The YAP1 oncogene contributes to bladder cancer cell proliferation and migration by regulating the H19 long noncoding RNA [J/OL]. Urol Oncol, 2015, 33(10): 427.e1-427.e10 [2017-01-01]. [http://www.urologiconcology.org/article/S1078-1439\(15\)00291-4/fulltext](http://www.urologiconcology.org/article/S1078-1439(15)00291-4/fulltext). DOI: 10.1016/j.urolonc.2015.06.003.
- [13] CHEN L, FENG P, ZHU X, et al. Long non-coding RNA Malat1 promotes neurite outgrowth through activation of ERK/MAPK signalling pathway in N2a cells [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(11): 2102-2110. DOI: 10.1111/jcmm.12904.
- [14] FAN Y, SHEN B, TAN M, et al. TGF- $\beta$ -induced upregulation of malat1 promotes bladder cancer metastasis by associating with suz12 [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(6): 1531-1541. DOI: 10.1158/1078-0432.

[收稿日期] 2017-02-28

[修回日期] 2017-05-13

[本文编辑] 宋关鸿