

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.12.013

· 临床研究 ·

lncRNA NUP50-AS1 在食管鳞癌组织中的表达及其对 Eca109 细胞恶性生物学行为的影响

梁佳¹, 吴璇¹, 邝钢¹, 任利兵², 沈素朋¹, 郭炜¹, 郭艳丽¹, 朱景云¹, 董稚明¹ (1. 河北医科大学 第四医院 肿瘤研究所 病理研究室, 河北 石家庄 050011; 2. 邯郸市中心医院 胸外科, 河北 邯郸 056001)

[摘要] **目的:**探讨长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) NUP50-AS1 在食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell cancer, ESCC) 组织及细胞株中的表达及其对人食管癌 Eca109 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法:**选取自 2015 年 1 月至 2016 年 12 月河北医科大学第四医院生物标本库的 49 例 ESCC 手术患者的癌组织和相应癌旁组织, qRT-PCR 检测 ESCC 癌组织、癌旁组织及 5 种食管癌细胞株 (TE1、TE13、Eca109、Kyse150 和 Kyse170) 中 NUP50-AS1 表达水平。shRNA 转染 NUP50-AS1 后, 选用 sh2-NUP50-AS1 进行后续功能实验。采用 MTS 法、克隆形成实验检测敲减 NUP50-AS1 表达对 Eca109 细胞增殖的影响, 划痕实验检测敲减 NUP50-AS1 表达对细胞迁移的影响, Transwell 小室实验检测敲减 NUP50-AS1 表达对细胞侵袭的影响。**结果:** NUP50-AS1 在 ESCC 组织中的相对表达量显著高于癌旁组织 (2.003 ± 0.870 vs 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$); NUP50-AS1 在 ESCC 组织中的表达水平与淋巴结转移及 TNM 分期相关 (均 $P < 0.01$), NUP50-AS1 在 5 株食管癌细胞系中相对表达量均明显上调 ($P < 0.05$), 其中 Eca109 细胞的 NUP50-AS1 表达水平最高。转染后, sh2-NUP50-AS1 转染组干扰效率最高, 敲低 NUP50-AS1 可明显抑制 Eca109 细胞增殖、迁移和侵袭能力。**结论:** ESCC 组织中 lncRNA NUP50-AS1 表达明显高于癌旁组织, 且与癌症分期和淋巴结转移有关, 敲减其表达明显抑制食管癌细胞增殖、迁移和侵袭能力, NUP50-AS1 的高表达可能与 ESCC 的发生发展密切相关。

[关键词] 长链非编码 RNA; NUP50-AS1; 食管鳞状细胞癌; Eca109 细胞; 生物学行为

[中图分类号] R730.51; R735.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)12-1290-06

Expression of lncRNA NUP50-AS1 in esophageal squamous cell carcinoma tissues and its effect on malignant biological behaviors of Eca109 cells

LIANG Jia¹, WU Xuan¹, KUANG Gang¹, REN Libing², SHEN Supeng¹, GUO Wei¹, GUO Yanli¹, ZHU Jingyun¹, DONG Zhiming¹ (1. Pathology Laboratory, Institute of Oncology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Central Hospital of Handan City, Handan 056001, Hebei, China)

[Abstract] Objective: To investigate the expression of long non-coding RNA NUP50-AS1 (lncRNA NUP50-AS1) in esophageal squamous cell carcinomas (ESCC) tissues and cell lines, and to explore its effect on proliferation, migration and invasion of human esophageal cancer Eca109 cells. **Methods:** 49 pairs of ESCC tissues and corresponding para-cancerous tissues obtained from the Biological Specimen Base of the Fourth Hospital of Hebei Medical University during Jan. 2015 to Jan. 2016 were used in this study. qRT-PCR method was applied to detect the expression of NUP50-AS1 in collected tissues samples and five esophageal cancer cell lines (TE1, TE13, Eca109, Kyse150 and Kyse170). ShRNAs were transiently transfected into Eca109 cells to interfere the expression of NUP50-AS1 gene, and finally, sh2-NUP50-AS1 was used for the following experiments. The effect of NUP50-AS1 gene knockdown on the proliferation of Eca109 cells was detected by MTS and colony formation assay; the effect of NUP50-AS1 gene knockdown on the migration of Eca109 cells was detected by scratch test, and the effect on cell invasion was detected by Transwell assay. **Results:** The expression of NUP50-AS1 in ESCC was correlated with the lymphnode metastasis and TNM stage (all $P < 0.01$). The expression of NUP50-AS1 in ESCC tissues was significantly higher than that in corresponding normal tissues (2.003 ± 0.870 vs 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$). The expression of NUP50-AS1 in five esophageal cancer cell lines was significantly up-regulated ($P < 0.05$), and it had the highest expression in Eca109 cell line. After transfection, sh2-NUP50-AS1 had the highest transfection efficiency, and knocking down NUP50-AS1 gene

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81572441); 河北省医学科学研究重点课题资助项目 (No. 20170700)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81572441), and the Key Project of Medical Science Research of Hebei Province (No.20170700)

[作者简介] 梁佳 (1987-), 女, 硕士生, 助理研究员, 主要从事肿瘤病因机制的研究, E-mail: liangjia603@163.com

[通信作者] 董稚明 (DONG Zhiming, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤病因机制的研究, E-mail: dongzhiming2000@163.com

significantly inhibited the proliferation, invasion and migration of the Eca109 cells. **Conclusion:** The expression of lncRNA NUP50-AS1 in ESCC tissues was significantly higher than that in the para-cancerous tissues, and correlated with the TNM stage and lymphnode metastasis. The down-regulation of NUP50-AS1 inhibited the proliferation, invasion and migration of esophageal cancer cells. The high expression of NUP50-AS1 gene may be closely related to the occurrence and development of ESCC.

[Key words] long non-coding RNA (lncRNA); NUP50-AS1; esophageal squamous cell carcinomas (ESCC); Eca109 cell; biological behavior

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(12): 1290-1295. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2018.12.013]

食管癌是消化系统常见的恶性肿瘤,我国食管癌主要以食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)为主,由于缺少可靠的早期诊断标志物和抑制肿瘤转移的治疗靶标,中、晚期患者5年生存率很低。长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNA)是指长度大于200 nt并且缺乏蛋白质编码能力的RNA分子^[1]。研究^[2-3]发现,lncRNA与食管癌的发生、发展、转移、复发存在密切关系。核孔蛋白50-反义RNA1(nucleoporin 50 antisense RNA 1, NUP50-AS1)位于人类染色体22q13.31,其在ESCC中的表达及其功能在国内外文献中尚未见报道。本研究检测了lncRNA NUP50-AS1在人食管癌细胞系及ESCC组织中的表达情况,分析了其表达与患者临床病理参数之间的关系,同时应用shRNA干扰Eca109细胞NUP50-AS1的表达,检测其对Eca109细胞体外增殖、迁移以及侵袭能力的影响,分析NUP50-AS1在ESCC发生发展中作用及其特点,旨在为ESCC的靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

食管癌细胞系TE1、TE13、Eca109、Kyse150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。TRIzol购自SBS公司,逆转录试剂盒购自Promega公司,胎牛血清购自PAN公司,RPMI 1640培养基购自Gibco公司,Lipofectamine2000购自Thermo公司,MTS试剂购自Promega公司,Transwell小室、Matrigel胶购自Corning公司。

1.2 标本来源

选取2015年1月至2016年12月河北医科大学第四医院生物标本库的ESCC手术患者49例(患者一般资料见表1)标本,全部患者术前均未接受任何放、化疗。每例患者均取ESCC原发灶组织及距原发灶边缘3~5 cm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;另一部分在新鲜状态放入-80℃低温冰箱保存,用于提取总RNA。所有组织标本经H-E染色,并由3位病理医师共同确定为ESCC组织,且癌旁组织均未见癌细胞浸润。同时随机取10例癌旁组织的cDNA混合后作为细胞表达的

对照组。

1.3 qRT-PCR实验检测NUP50-AS1的表达水平

根据TRIzol试剂说明书步骤提取总RNA,之后将提取的总RNA逆转录成cDNA,再以cDNA为模板进行qRT-PCR用于检测NUP50-AS1的表达。NUP50-AS1上游引物为F:5'-GGAATGTGCATGTGCTCCCA-3',下游引物为R:5'-AGTCCCAAAGTCGGGACAGT-3',片段大小为138 bp,反应条件:95℃预变性10 min后,95℃变性15 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环后,72℃延伸7 min。NUP50-AS1以GAPDH作为内参,每个样本设3个复孔。根据每孔荧光信号达到阈值时经历的循环数作为Ct值,采用相对定量法: $\Delta CT = CT_{\text{目的分子}} - CT_{\text{内参分子}}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{癌组织}} - \Delta CT_{\text{配对癌旁组织}}$,以 $N = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示目的分子的相对表达量,其数值表示癌组织相对于配对癌旁正常组织的相对倍数。实验重复3次。

1.4 构建特异性shRNA、细胞培养及转染

4条靶序列shRNA-NUP50-AS1s由上海吉玛基因公司设计合成,分别命名为sh1-NUP50-AS1(序列为GCCTGGACTTTATCCTGAATA)、sh2-NUP50-AS1(序列为GCTGTCTTTGCCTTTCTACA)、sh3-NUP50-AS1(序列为GCCATGGGCTTTGCTAGACT)和sh4-NUP50-AS1(序列为ACCCAGCTAATTCAGTGTGTT),另外以sh-NC作为对照。细胞系常规培养于含10% FBS的RPMI 1640培养基,置于温度37℃、5% CO₂的条件下培养。转染前1 d选择生长状态良好的细胞均匀铺于6孔板内,待细胞汇合度至70%左右开始转染,利用Lipofectamine 2000转染试剂盒分别将4条shRNA-NUP50-AS1s及sh-NC转染至ESCC细胞Eca109中,6 h后更换含血清培养基继续培养,培养24 h,并用荧光倒置显微镜观察各组转染效率。提取各组细胞总RNA,用于观察转染4条shRNA-NUP50-AS1s后NUP50-AS1的表达水平,选取干扰效率最高的shRNA-NUP50-AS1进行后续功能试验。

1.5 MTS法检测下调NUP50-AS1表达对Eca109细胞增殖的影响

转染细胞培养24 h后用胰酶消化悬浮于含10%胎牛血清的培养基中,调整Eca109细胞浓度接种于96孔

板,每孔 100 μ l 培养基含有 1×10^3 个细胞。分别在细胞贴壁后 0、24、48、72、96 h 后,每孔中加入 MTS 试剂 20 μ l (500 μ g/ml),孵育 4 h 后酶标仪测定 492 nm 处的光密度(D)值。每组实验设 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.6 克隆形成实验检测下调 NUP50-AS1 表达对细胞克隆形成的影响

转染细胞培养 24 h 后用胰酶消化悬浮于含 10% 胎牛血清的培养基中,调整细胞密度接种于 6 孔板,每孔 3×10^3 个细胞,常规培养 1 周,PBS 洗 2 遍后 4% 的多聚甲醛固定 20 min,风干。使用结晶紫染液染色 20 min,在显微镜下计数克隆数,以大于 50 个细胞的集落认为是 1 个克隆,并计算克隆形成率。实验重复 3 次。

1.7 划痕实验检测下调 NUP50-AS1 表达对细胞迁移的影响

实验开始前用直尺和 Marker 笔在 6 孔板背面均匀划横线。转染细胞培养 24 h 后,调整细胞密度接种于 6 孔板,待细胞长至完全融合时,用 200 μ l 加样枪头比着直尺,垂直于横线划痕。使用 PBS 冲洗 2 遍,分别于划痕后的 0、24 h 在倒置显微镜下观察划痕的间距,计算细胞迁移的百分率。实验重复 3 次。

1.8 Transwell 小室实验检测下调 NUP50-AS1 表达对细胞侵袭的影响

将 Matrigel 胶稀释后,向小室上层加入 50 μ l 稀释好的 Matrigel 胶,37 $^{\circ}$ C 放置过夜。细胞首先使用无血清培养基饥饿 24 h,胰酶消化并收集细胞,无血清培养基重悬细胞并调整细胞密度为 1×10^5 /ml,每孔上室加入 200 μ l 细胞悬液,下室加入 600 μ l 含 20% 牛清的完全培养基。常规培养 24 h 后取出小室,PBS 洗 3 次。染色固定,将小室上的聚碳酸酯膜轻轻剪下,放于载玻片上,树脂封片,显微镜下计数 5 个随机视野内的细胞数,比较各组每个视野穿膜细胞数量来判断细胞的侵袭性。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计学软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验和近似 *t* 检验,多组间的均数比较采用单因素方差分析,多组内的两两比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NUP50-AS1 在 ESCC 癌组织及食管癌细胞中的表达情况

qRT-PCR 检测结果显示,NUP50-AS1 在 ESCC 组织中的相对表达量显著高于癌旁组织(2.003 ± 0.870 vs 1.000 ± 0.000 , $P < 0.05$, 图 1A);NUP50-AS1 在 5 株食管

管癌细胞系中相对表达量均明显上调($P < 0.05$, 图 1B),Eca109 细胞的 NUP50-AS1 表达水平最高,进而选取 Eca109 细胞构建敲低 NUP50-AS1 的细胞株。

2.2 NUP50-AS1 在 ESCC 中的表达及其与临床病理特征的关系

发生淋巴结转移的 ESCC 组织中 NUP50-AS1 表达水平明显高于未发生淋巴结转移 ESCC 组织 [(2.345 ± 0.880) vs (1.674 ± 0.736) , $P < 0.01$];在 III-IV 期 ESCC 组织中的表达高于 I-II 期 [(2.491 ± 0.807) vs (1.667 ± 0.754) , $P < 0.01$]。按照年龄、性别、分化程度分组进行统计分析,各组 ESCC 中 NUP50-AS1 的表达水平差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见表 1。

表 1 NUP50-AS1 在 ESCC 中的表达及与临床病理特征的关系 (N=49)

Tab.1 The relationship between expression of NUP50-AS1 gene in ESCC tissues and clinicopathologic features of patients (N=49)

Feature	n	Expression of NUP50-AS1		
		$\bar{x} \pm s$	t/F	P
Gender			0.220	0.827
Male	34	1.985 \pm 0.818		
Female	15	2.045 \pm 1.007		
Age(t/a)			1.152	0.255
<61	19	2.182 \pm 0.723		
\geq 61	30	1.889 \pm 0.945		
Lymph node			2.900	0.006
+	25	1.674 \pm 0.736		
-	24	2.345 \pm 0.880		
Histological grade			0.559	0.576
Well	14	1.951 \pm 0.851		
Moderate	25	1.927 \pm 0.880		
Poor	10	2.264 \pm 0.910		
TNM stage			3.654	0.001
I+II	29	1.667 \pm 0.754		
III+IV	20	2.491 \pm 0.807		

2.3 shRNA-NUP50-AS1 转染对食管癌细胞系 NUP50-AS1 表达的干扰效率

qRT-PCR 检测结果(图 2)显示,Eca109 细胞转染后 sh1-NUP50-AS1、sh2-NUP50-AS1、sh3-NUP50-AS1 和 sh4-NUP50-AS1 的相对表达量均低于 sh-NC 组 (0.612 ± 0.095 、 0.495 ± 0.085 、 0.747 ± 0.063 、 0.794 ± 0.055 vs 0.993 ± 0.007 , 均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且 sh2-NUP50-AS1 转染组干扰效率最高,故选用 sh2-NUP50-AS1 进行后续功能实验。

2.4 敲低 NUP50-AS1 明显抑制 Eca109 细胞增殖能力

MTS 法检测结果(图 3)显示,72、96 h 时 sh2-

NUP50-AS1 转染组 D 值明显低于 sh-NC 组和 Eca109 细胞组 ($P<0.05$)。克隆形成实验结果(图 4)显示,转染组克隆形成率显著低于 sh-NC 组 $[(14.50\pm 1.90)\%$

$vs (31.07\pm 1.53)\%$, $P<0.05$], 表明敲低 NUP50-AS1 可抑制食管癌细胞系 Eca109 的增殖能力。

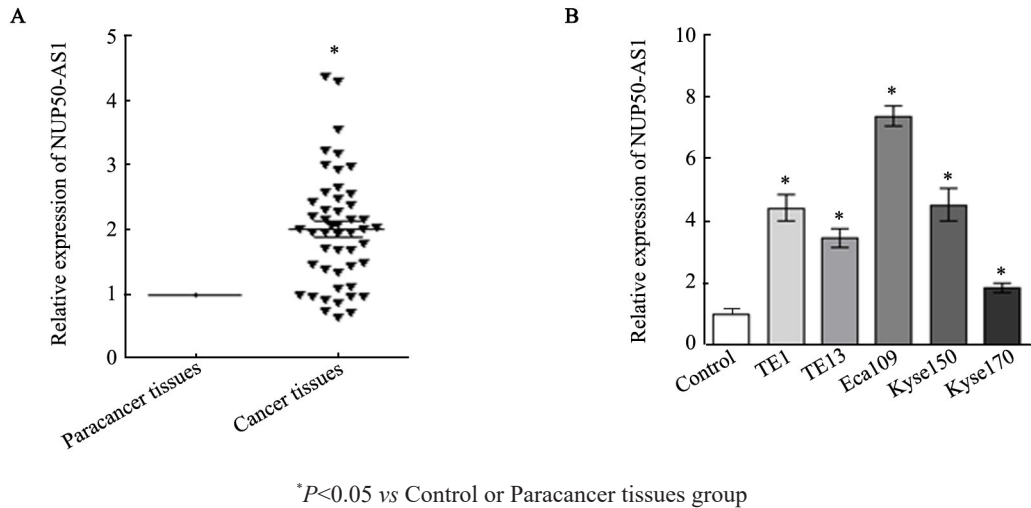


图 1 NUP50-AS1 在 ESCC 组织(A)和细胞系(B)中的表达水平

Fig.1 Expression of NUP50-AS1 in ESCC tissues (A) and esophageal cancer cell lines (B) of Eca109 cells

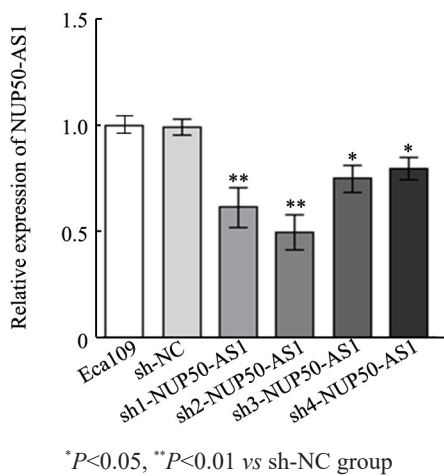


图 2 shRNA- NUP50-AS1 转染对 NUP50-AS1 表达的干扰效率
Fig.2 Interference efficiency of shRNA- NUP50-AS1 plasmid on NUP50-AS1 expression

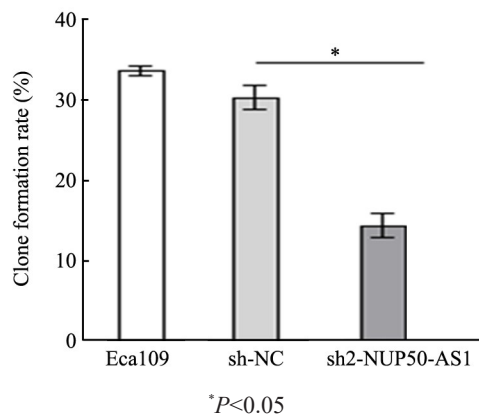


图 4 敲低 NUP50-AS1 对 Eca109 细胞克隆形成率的影响
Fig. 4 Effect of knocking down NUP50-AS1 on the clone formation rate of Eca109 cells

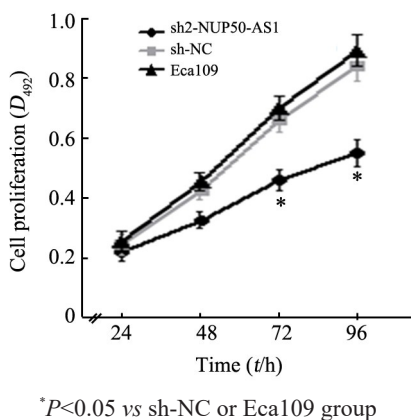


图 3 敲低 NUP50-AS1 对 Eca109 细胞增殖的影响
Fig. 3 Effect of knocking down NUP50-AS1 on proliferation

2.5 敲低 NUP50-AS1 抑制 Eca109 细胞迁移能力

划痕实验结果(图 5)显示,在 24 h 时 sh2-NUP50-AS1 转染组 Eca109 细胞的迁移率显著低于 sh-NC 对照组 $[(42.13\pm 4.93)\% vs (65.53\pm 5.73)\%$, $P<0.05$], 表明敲低 NUP50-AS1 后可以抑制 Eca109 细胞体外迁移能力。

2.6 敲低 NUP50-AS1 明显抑制 Eca109 细胞侵袭能力

Transwell 实验结果(图 6)显示,sh2-NUP50-AS1 转染组 Eca109 细胞每视野中穿过人工基底膜的细胞数明显低于 sh-NC 对照组 $[(120.70\pm 4.23) vs (218.00\pm 18.08)$ 个, $P<0.05$], 表明敲低 NUP50-AS1 可以抑制 Eca109 细胞的体外侵袭能力。

3 讨论

lncRNA 是一类超过 200 个核苷酸组成的, 没有蛋白质编码能力 RNA 分子^[1]。根据 lncRNA 与蛋白质编码基因的位置关系, 其分为正义 lncRNA、反义 lncRNA、基因内 lncRNA、基因间 lncRNA 和双向 lncRNA 等四种^[4]。其中反义 lncRNA 因其结构特殊而备受关注, 它

们通过与其他 RNA 形成 RNA 互补双链、改变染色质重塑等形式调控靶基因的表达, 并有可能在疾病发生中发挥独特的作用^[5-7]。QI 等^[8]研究发现, AGAP2-AS1 通过与 LSD1 和 EZH2 相互作用抑制 CDKN1A(p21) 和 E-钙黏蛋白转录, 从而起到致癌基因的作用。CFLAR-AS1、HNF1A-AS1 及 TP73-AS1 等的高表达与食管癌的不良预后密切相关^[9-11]。

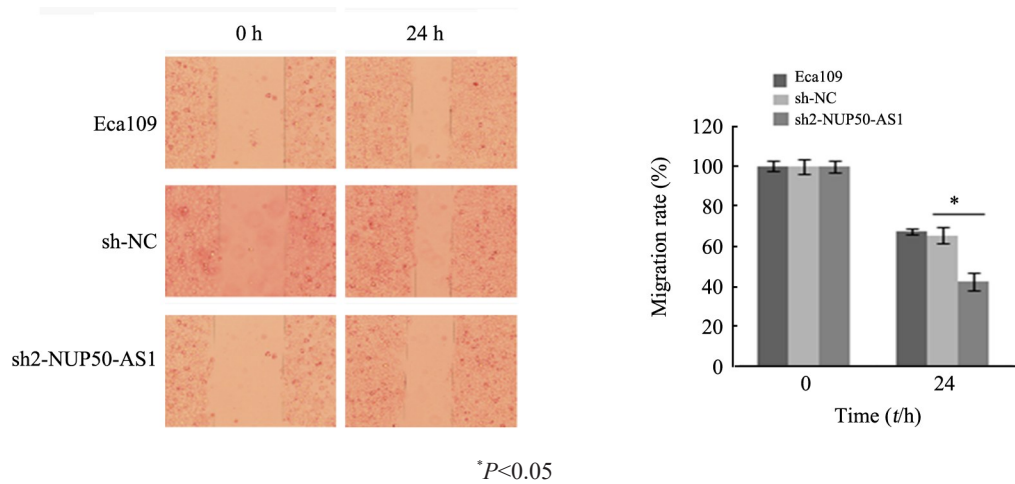


图5 敲低NUP50-AS1对Eca109细胞迁移能力的影响

Fig. 5 Effect of knocking down NUP50-AS1 on migration of Eca109 cells

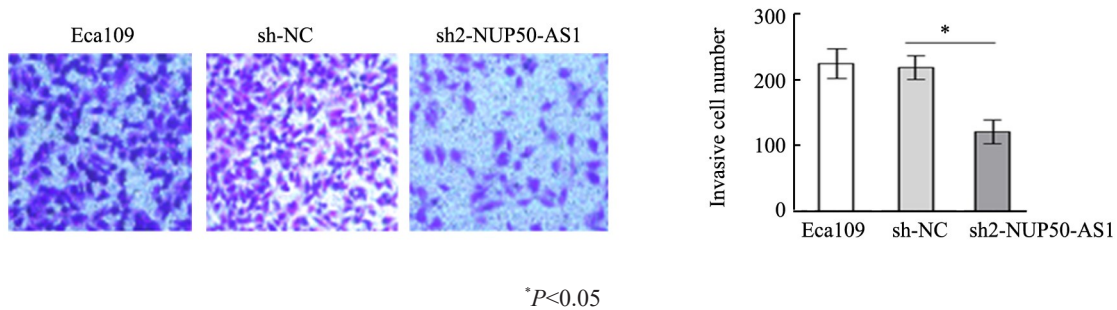


图6 敲低NUP50-AS1对Eca109细胞侵袭能力的影响(×10)

Fig. 6 Effect of knocking down NUP50-AS1 on invasion of Eca109 cells(×10)

lncRNA NUP50-AS1 位于 *NUP50* 的反义链上, 有 2 个 mRNA 转录本序列, 是一个新型的、未研究过的 lncRNA^[12-13]。本研究首先在 ESCC 组织及其癌旁组织中检测了 NUP50-AS1 的表达水平, 并分析了 NUP50-AS1 表达水平与性别、年龄、分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期等临床特征的关系, 结果显示, NUP50-AS1 在 ESCC 组织中表达高于癌旁组织。同时本研究检测了 5 株食管癌细胞系中 NUP50-AS1 的表达水平, 发现在 5 株食管癌细胞中 NUP50-AS1 表达水平均上调, 在食管癌细胞 Eca109 中上调倍数最高, 提示 NUP50-AS1 在 ESCC 中发挥癌基因的作用。分析 NUP50-AS1 表达水平与患者临床病理资料显示, NUP50-AS1 表达水平与淋巴结转移和临床分期

相关, 提示 NUP50-AS1 的高表达可能与 ESCC 发生发展密切相关。

YANG 等^[14]通过体外敲低 MIR31HG 表达水平后, 胰腺癌细胞生长减慢, 迁移和侵袭能力降低, 凋亡增加。EZR-AS1 通过上调 EZR 的表达促进食管癌细胞的迁移^[15]。为了更好地了解 NUP50-AS1 在食管癌中的生物学作用, 本研究通过 RNA 干扰技术将 sh2-NUP50-AS1 成功转染至食管癌细胞 Eca109 中, 使 NUP50-AS1 表达下调, 应用 MTS、克隆形成实验、划痕实验和 Transwell 实验检测 NUP50-AS1 下调后对食管癌细胞生物学行为的影响, 结果显示 NUP50-AS1 敲低后抑制 Eca109 细胞增殖、迁移及侵袭能力, 提示 NUP50-AS1 在 ESCC 中可能发挥癌基因的作

用,并在ESCC的发展和进展中发挥促进作用。

总之,本研究显示lncRNA NUP50-AS1在ESCC组织中表达升高,特异性地敲低NUP50-AS1的表达会抑制食管癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力,提示lncRNA NUP50-AS1可能在ESCC中是一种促癌基因,同时在食管癌细胞增殖、迁移及侵袭过程中发挥重要的调控作用,有望成为ESCC治疗的新靶标,为食管癌的基因治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] ULITSKY I, BARTEL D P. lncRNAs: genomics, evolution, and mechanisms[J]. *Cell*, 2013, 154(1): 26-46. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.020.
- [2] JIANG C, LI X, ZHAO H, et al. Long non-coding RNAs: potential new biomarkers for predicting tumor invasion and metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 62-67. DOI:10.1186/s12943-016-0545-z.
- [3] FANG Y, FULLWOOD M J. Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer[J]. *Genomics Proteomics Bioinf*, 2016, 14(1): 42-54. DOI:10.1016/j.gpb.2015.09.006.
- [4] FAGHIHI M A, WAHLESTEDT C. Regulatory roles of natural antisense transcripts[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(9): 637-643. DOI:10.1038/nrm2738.
- [5] HALLEY P, KHORKOVA O, WAHLESTEDT C. Natural antisense transcripts as therapeutic targets[J]. *Drug Discov Today Ther Strat*, 2013, 10(3): 119-125. DOI:10.1016/j.ddstr.2013.03.001.
- [6] QI P, DU X. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine[J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(2): 155-165. DOI:10.1038/modpathol.2012.160.
- [7] ZHAO J, OHSUMI T K, KUNG J T, et al. Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(6): 939-953. DOI:10.1016/j.molcel.2010.12.011.
- [8] QI F, LIU X, WU H, et al. Long non-coding AGAP2-AS1 is activated by SP1 and promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 48-56. DOI: 10.1186/s13045-017-0420-4.
- [9] HU H B, JIE H Y, ZHENG X X. Three circulating lncRNA predict early progress of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(1/2): 117-125. DOI:10.1159/000452529.
- [10] YANG X, SONG J H, CHENG Y, et al. Long non-coding RNA HNF1A-AS1 regulates proliferation and migration in oesophageal adenocarcinoma cells[J]. *Gut*, 2014, 63(6): 881-890. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305266.
- [11] ZANG W, WANG T, WANG Y, et al. Knockdown of long non-coding RNA TP73-AS1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 19960-19974. DOI:10.18632/oncotarget.6963.
- [12] 梁佳, 邝钢, 徐凤楼, 等. miR-6867及其宿主基因RAPGEFL1在食管鳞状细胞癌组织和细胞系中的表达及甲基化状态[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(10): 1051-1057. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.10.002.
- [13] 沈素朋, 徐凤楼, 刘江惠, 等. miR-6803和PPP6R1在食管鳞状细胞癌组织和细胞系中的表达及其甲基化状态与患者临床病理特征的关系[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(9): 972-978. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.008.
- [14] YANG H, LIU P, ZHANG J, et al. Long non-coding RNA MIR31HG exhibits oncogenic property in pancreatic ductal adenocarcinoma and is negatively regulated by miR-193b[J]. *Oncogene*, 2016, 35(28): 3647-3657. DOI:10.1038/nc.2015.430.
- [15] ZHANG X D, HUANG G W, XIE Y H, et al. The interaction of lncRNA EZR-AS1 with SMYD3 maintains overexpression of EZR in ESCC cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(4): 1793-1809. DOI: 10.1093/nar/gkx1259.

[收稿日期] 2018-08-02

[修回日期] 2018-11-18

[本文编辑] 王映红