

• 基础研究 •

超保守癌/睾丸-LINC01424 表达影响食管鳞癌的进展

曹 靖, 肖志寒, 王子辰, 张同禹, 卢美佑, 陈 亮, 许 晶*

南京医科大学第一附属医院胸外科, 江苏 南京 210029

[摘 要] 目的: 探究食管鳞癌特异的超保守癌/睾丸(cancer/testis, CT)-LINC01424 在食管鳞癌进展中的作用。方法: 利用TCGA(The Cancer Genome Atlas)及GTEx(Genotype-Tissue Expression)数据库系统筛选食管鳞癌特异的超保守CT特性的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA), 运用核质分离实验和cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA end, RACE)进行LINC01424细胞定位及序列鉴定; 利用118例食管鳞癌样本数据进行预后分析; 下调ECA109细胞系中LINC01424, 以及上调KYSE410细胞系中LINC01424后, 通过CCK-8实验、平板克隆法、Transwell实验和裸鼠成瘤动物实验研究CT-LINC01424在食管鳞癌细胞中的作用; 进一步应用MEM(Multi Experiment Matrix)数据库进行下游基因的探索。结果: 首次鉴定出食管鳞癌特异的超保守CT-LINC01424; 临床资料分析显示, CT-LINC01424与食管鳞癌较差的临床分期及预后显著相关; 降低LINC01424的表达可以抑制食管鳞癌细胞的增殖、侵袭能力, 过表达LINC01424则会导致相反结果; 此外, LINC01424与着丝粒相关1(kinetochore associated 1, KNTC1)基因存在显著共表达关系。结论: LINC01424在食管鳞癌组织中高表达, 促进食管鳞癌细胞增殖和侵袭, 并可能通过影响KNTC1的表达发挥其促癌作用。

[关键词] 食管鳞癌; 癌/睾丸基因; 超保守; 长链非编码RNA

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2024)12-1638-11

doi: 10.7655/NYDXBNSN240400

Effects of ultra - conserved cancer/testis - LINC01424 on the progression of esophageal squamous cell carcinoma

CAO Jing, XIAO Zhihan, WANG Zichen, ZHANG Tongyu, LU Meiyu, CHEN Liang, XU Jing*

Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of the esophageal squamous cell carcinoma (ESCC)-specific ultra-conserved cancer/testis (CT) - LINC01424 in ESCC progression. **Methods:** The TCGA (The Cancer Genome Atlas) and GTEx (Genotype - Tissue Expression) databases were used to screen the long non-coding RNA (lncRNA) with ultraconservative CT properties specific to ESCC, and the nucleoplasmic isolation assay and rapid amplification of cDNA end (RACE) were used for the cellular localization and sequence identification of LINC01424. A total of 118 cases of ESCC samples were used for the analysis of prognosis. After knocking down LINC01424 in ECA109 cell line or overexpressing LINC01424 in KYSE410 cell line, the effects of CT-LINC01424 on the ESCC was detected by CCK-8 assay, colony assay, Transwell assay, and nude micel assay; further application of MEM (Multi Experiment Matrix) database for downstream gene exploration. **Results:** An ultraconservative CT-LINC01424 specific for ESCC was identified. Analysis of clinical data showed that CT-LINC01424 was significantly associated with poor clinical stage and prognosis of ESCC. Knockdown of the expression of LINC01424 inhibited the proliferation and invasion of ESCC cells, while overexpression of LINC01424 resulted in the opposite result. Furthermore, the expression of LINC01424 was significantly co-expressed with kinetochore associated 1 (KNTC1) gene. **Conclusion:** LINC01424 is highly expressed in ESCC tissues, promotes the proliferation and invasion of ESCC cells, and may exert its pro-carcinogenic effects by affecting the expression of KNTC1.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma; cancer/testis gene; ultra-conserved; long non-coding RNA

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(12): 1638-1648]

[基金项目] 南京医科大学部省共建肿瘤个体化医学协同创新中心-恒瑞医药临床研究基金青年项目(2024-02); 南京医科大学第一附属医院“临床能力提升工程”面上项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jingxu@njmu.edu.cn

随着全球老龄化和人口增长,以及吸烟、饮酒等相关风险因素的流行,食管癌的发病率及病死率日益上升^[1-2],已成为全球第9位最常见的癌症,第6位最常见的癌症死亡原因,每年有超过50万人因其死亡^[3]。食管癌主要分为两种组织学亚型:食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)和食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EAC)^[4]。ESCC可在食管的整个解剖区域发生,而EAC常发生于食管远端^[5]。由于ESCC早期通常没有明显的临床症状,病情隐匿,患者在出现进行性加重的吞咽困难而就诊时,多数已进入中晚期,疾病治疗难度显著增加^[6]。目前针对ESCC的主要治疗方案是标准的术前新辅助化疗、根治性肿瘤切除手术和术后辅助化疗,由于患者就诊时分期偏晚,治疗后复发和转移的风险仍然较高,预后并不理想,5年生存率不到30%^[7-9]。近年来,分子靶向治疗和免疫治疗也被尝试应用于ESCC的辅助治疗,但其疗效仍难以使人满意。临床研究显示,分子靶向疗法联合同步化疗辅助治疗局部晚期ESCC的3年生存率仅为33.5%^[10],而程序性死亡因子配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)单抗辅助治疗局部晚期ESCC的中位无进展生存期也仅为3.2个月^[11]。

癌/睾丸(cancer/testis, CT)基因是一类独特的肿瘤特异性基因,其特征是在正常组织中不表达或低表达,而在肿瘤组织中高表达,使其成为肿瘤免疫治疗的理想靶点^[12]。研究证实,CT基因参与肿瘤的增殖、凋亡等过程,并影响侵袭、转移和预后,是肿瘤重要的驱动基因^[13]。近年来,长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)受到广大科研工作者的关注,研究表明,lncRNA作为一类长度>200 nt的非编码RNA,可通过转录沉默、转录激活、染色体修饰、核内运输等多种途径参与恶性肿瘤的进程^[14]。研究表明,与编码基因相比,lncRNA基因保守性普遍较差,而高度保守的lncRNA往往具有组织特异性,并且在肿瘤发生发展过程中起关键的调节作用^[15-19]。因此,筛选高度保守的CT-lncRNA进行研究可能更具功能学价值。

本研究系统筛选出了19个ESCC相关的超保守CT-lncRNA,生存分析结果显示,LINC01424与ESCC的预后显著相关。加州大学圣克鲁兹分校(University of California Santa Cruz, UCSC)Xena数据库显示,LINC01424位于染色体21q22区域,该区域是肿瘤研究的热点区域,该区域内基因遗传变异、拷贝数变异等改变与包括ESCC在内的多种恶性肿

瘤的易感性及进展预后相关。本研究系统鉴定了ESCC相关的超保守CT-lncRNA,揭示LINC01424在ESCC进展中的作用,为研究ESCC进展机制提供新思路,同时为ESCC诊疗提供新的潜在干预靶点。

1 资料和方法

1.1 资料

超保守CT基因的筛选所用样本数据均来源于GTEx (Genotype - Tissue Expression) 和TCGA (The Cancer Genome Atlas)数据库。118例ESCC样本均为2002年1月—2003年12月在南京医科大学第一附属医院接受治疗的患者。所有患者临床情况已根据美国癌症分期联合委员会手册(第8版)重新进行分析。所有患者均患有原发性ESCC(T1b~T4, N1~N3, M0),并且在手术前均未接受化疗或放射治疗。组织样本经过病理学诊断,将样品在液氮中快速冷冻并储存在-80℃冰箱中直至使用。ESCC患者术后通过门诊、电话等方式随访5年,第1年每3个月随访1次,后4年每6个月随访1次,患者均从手术日期随访至死亡或最后一次随访日期,总生存期(overall survival, OS)定义为首次手术至死亡或最后一次随访的时间。随访内容包括患者生存、病死、复发及转移情况。本研究经南京医科大学第一附属医院医学伦理委员会批准(编号:2022-SR-055)。

1.2 方法

1.2.1 ESCC特异性超保守CT-lncRNA的筛选

在既往研究^[20]的基础上系统筛选睾丸优势表达的lncRNA,随后基于UCSC网站公布的32个物种间phastCons评分以及phyloP评分,评价睾丸优势表达lncRNA的保守性。在phyloP>0且phastCons>0.3的标准下,筛选出超保守睾丸优势表达lncRNA;进一步基于Xena数据库标准化处理的TCGA及GTEx表达数据,分析lncRNA在ESCC组织及正常食管黏膜中的差异表达情况,最终鉴定出ESCC相关超保守CT-lncRNA。

1.2.2 细胞实验

KYSE30、KYSE70、KYSE150、KYSE180、KYSE-410、ECA109、TE-1和TE-10均为人源ESCC细胞系。HEEC为正常食管黏膜上皮细胞。所有细胞系在添加10%胎牛血清(Gibco BRL公司,美国)的DMEM或RPMI-1640中培养,并加入1%的抗生素/抗真菌溶液,细胞均在37℃、5% CO₂的培养箱中培养。

1.2.2.1 核质分离

细胞核质分离操作步骤参考试剂盒(货号:

P0028, 上海碧云天)说明书进行, 首先进行RNA抽提, 用PBS清洗1遍, 胰酶消化细胞并计数。PBS清洗, 低速离心收集细胞。每20 μL 细胞沉淀加入200 μL 添加了RNase Inhibitor(含未稀释的R0102 10 μL)的细胞浆蛋白抽提试剂A, 混匀, 冰浴10~15 min。加入细胞浆蛋白抽提试剂B 10 μL , 混匀, 冰浴1 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心5 min。吸取上清液加入TRIzol抽提细胞浆RNA。对于沉淀, 完全吸尽残余的上清, 加入TRIzol抽提细胞核RNA。所提取RNA即可用于下游LINC01424表达验证。

1.2.2.2 cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA end, RACE)实验

具体操作方法参考SMARTer试剂盒(货号: 634858, TaKaRa公司, 日本)说明书。针对3'RACE, 利用mRNA的3'末端poly(A)尾作为1个引物结合位点, 以连有SMART寡核苷酸序列通用接头引物的Oligo(dT)30作为锁定引物反转录合成标准第1链cDNA, 然后用1个基因特异引物GSP1作为上游引物, 用1个含有部分接头序列的通用引物(universal primer, UPM)作为下游引物, 以cDNA第1链为模板, 进行PCR循环, 把目的基因3'末端的DNA片段扩增出来。针对5'RACE实验, 先利用GSP作为1个引物结合位点, 在反转录酶MMLV作用下, 反转录合成标准第1链cDNA。利用该反转录酶具有的末端转移酶活性, 在反转录达到第1链的5'末端时自动加上3~5个(dC)残基, 退火后(dC)残基与含有SMART寡核苷酸序列Oligo(dG)通用接头引物配对后, 转换为以SMART序列为模板继续延伸而连上通用接头。随后1个含有部分接头序列的UPM作为上游引物, GSP2作为下游引物, 以SMART第1链cDNA为模板, 进行PCR循环, 把目的基因5'末端的cDNA片段扩增出来。最终, 通过分析RACE产物确定3'末端序列, 最终确定LINC01424序列。其中GSP1为5'-TCGGGTCCAGCACCTTCTACTC-3', GSP2为5'-ACACACTGGCTGCTCAGAG-3'。

1.2.2.3 细胞活力实验

取对数期生长细胞, 铺满24孔板培养48 h后, 每孔中加MTT溶液20 μL 孵育4 h后加入150 μL DMSO溶液, 轻轻振荡10 min, 使结晶物溶解充分。酶联免疫检测仪上选择490 nm波长处测定各孔的吸光度值。

1.2.2.4 慢病毒感染

分别构建LINC01424敲降及过表达慢病毒载体(上海吉玛基因), 将待感染细胞以 1×10^5 个/孔铺到

24孔板中, 放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜。待细胞进入对数生长期后, 加入polybrene 6~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加入3 μL 病毒, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4~6 h 换液, 继续培养, 嘌呤霉素筛选后进行后续实验研究。

1.2.2.5 集落形成实验

取各组对数生长期细胞, 胰酶消化后, 将细胞进行倍比稀释。按照每皿含50、100、200个细胞的浓度分别接种4 mL细胞悬液到培养皿中。培养皿置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养2周。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 甲醇固定15 min。用Giemsa染液染色10 min后进行计数。集落形成率=(集落数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.2.6 侵袭实验

无血清培养基和基质胶按1:5稀释, 配制细胞悬液, 每孔加入100 μL 细胞悬液, 下室加入500 μL 含20%胎牛血清的条件培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育24 h。取出Transwell板, 用5%戊二醛固定, 加入Giemsa染色。用棉球擦去上表面细胞, 置于显微镜下观察, 计数。

1.2.2.7 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)和免疫荧光染色

ECA109细胞用PBS洗涤3次, 每次5 min, 然后用0.5% Triton X-100渗透5 min, PBS洗涤3次, 每次5 min。在37 $^{\circ}\text{C}$ 下杂交过夜后DAPI孵育10 min。使用激光扫描共聚焦显微镜对细胞进行成像。转染ECA109和KYSE150细胞培养后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 用4%多聚甲醛覆盖固定后PBS清洗, 用含0.5% Triton X-100的PBS于冰上透化细胞5 min。在含有地高辛标记的LINC01424-AS探针(广州锐博)的预杂交液中进行杂交, 杂交温度为37 $^{\circ}\text{C}$, 过夜。杂交后, 样品与抗地高辛(Abcam公司, 美国)在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 并用DAB底物试剂盒(DA1010; 北京索莱宝)染色。用DAPI对载玻片进行反染色, 然后用激光扫描共聚焦显微镜进行观察。LINC01424-AS探针序列为: 5'-GACTTTTGTCACTTGAAGCTGAAGCTAATCCTGATAGAAGCTGTAAACCACATTTCTCACAGCGGGTCAA-TCGGGAAAGCACACCCACTCACTACAGCCATTA-3'。

1.2.2.8 实时定量PCR(qRT-PCR)

总RNA用TRIzol试剂(Invitrogen公司, 美国)提取。细胞核RNA和细胞质RNA分别用细胞质和细胞核RNA纯化试剂盒(上海贝博)分离。用NanoDrop 2000(Thermo Fisher公司, 美国)和琼脂糖凝胶电泳分析RNA的浓度和质量。使用PrimeScriptTM RT试剂盒(TaKaRa公司, 日本)进行反转录。采用

ChamQ SYBR qPCR Master Mix (南京诺唯赞)进行qRT-PCR。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。所用引物序列见表1。

1.2.3 动物实验

1.2.3.1 动物分组

实验动物为6~8周龄SPF级BALB/c雄性裸鼠，

购于北京维通利华公司。动物饲养环境按标准化清洁级环境进行饲养；恒温恒湿，每日12 h光照，保证充足的食物和水。定期更换鼠笼，满足饲养环境的要求。动物实验研究已获南京医科大学第一附属医院动物保护与利用机构委员会批准(编号：2022-SR-055)。

表1 PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR

Gene	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')
GAPDH	TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC	TGCTGACAATCTTGAGGGAG
LINC01424	TCCAGCACCTTCTACTCCGA	CTGCCCTGCAGTATCACACA
MALAT1	GCTCTGTGGTGTGGGATTGA	GTGGCAAAATGGCGGACTTT

将BALB/c裸鼠随机分为敲降组 and 对照组，分别取感染LINC01424敲降慢病毒的ECA109细胞和感染空载体病毒的ECA109细胞，按照分组，于每只BALB/c裸鼠的腋窝下注射等量的细胞悬液(细胞量约为 4×10^6 个)。动物在标准化SPF环境下饲养。待瘤体形成后每3 d测量1次瘤体体积，30 d后脊髓离断法处死小鼠，取瘤体称重，瘤体用于后续实验。

1.2.3.2 免疫组化染色

实验采用杭州图凌生物医药试剂盒进行操作(货号I10091)，样本首先在10%福尔马林缓冲液固定，随后经过石蜡包埋、脱蜡、水化后清洗切片，对切片进行组织抗原热修复；修复后的切片用自来水清洗。3%的过氧化氢封闭处理后，PBST清洗，Ki-67抗体孵育30 min后，PBST清洗，加酶标羊抗鼠IgG室温下孵育30 min，PBST缓冲液清洗切片。DAB显色液进行显色。自来水清洗，使用苏木素染液复染。切片经过脱水，透明，封片后在显微镜下观察拍摄。

1.3 统计学方法

所有统计分析均使用R软件(版本3.2.30)进行。采用卡方检验比较分类变量的组间分布差异，采用 t 检验比较连续型变量的组间差异。采用Cox比例风险回归模型评价与ESCC预后的关联，调整年龄、性别、吸烟、TNM分期、肿瘤分化程度及肿瘤部位等变量。采用GraphPad Prism 7软件绘制基因差异表达图及Kaplan-Meier图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ESCC超保守CT-lncRNA的系统性筛选

基于系统筛选的4 538个睾丸优势表达lncRNA，

应用UCSC网站公布的32个物种间phastCons评分以及phyloP评分，在phyloP>0且phastCons>0.3的条件下，筛选出74个超保守睾丸优势表达lncRNA；进一步采用Xena数据库标准化处理的TCGA及GTEx表达数据，对上述74个lncRNA在ESCC组织及正常食管黏膜中的差异表达情况进行分析，结果共鉴定出19个ESCC相关超保守CT-lncRNA(图1A)。基因差异表达分析显示，LINC01424在肿瘤组织中异常高表达(图1B)；生存分析结果显示，仅LINC01424与ESCC预后显著相关(图1C)。基于GTEx数据库信息分析，LINC01424在正常睾丸组织中高表达，而在其他正常组织中低表达甚至不表达(图1D)；此外，对小鼠各组织的检测也发现，LINC01424在正常小鼠睾丸组织中高表达，而在其他正常组织中低表达甚至不表达(图1E)。通过UCSC Xena数据库分析发现LINC01424上游启动子区域的保守性较高(图1F)。通过RACE实验鉴定LINC01424的全长序列，结果显示LINC01424全长为4 270 bp，5'端获得序列大小为2 329 bp，3'端获得序列大小为1 888 bp，从而确定LINC01424在ESCC细胞中的实际全长序列(图1G)。进一步通过RNA-FISH实验发现LINC01424在ESCC细胞核及细胞浆均有分布，且在细胞核中呈优势表达(图1H、I)，提示LINC01424可能主要参与细胞核内的转录调控机制。以上结果表明，超保守CT-LINC01424可能影响ESCC的进展。

2.2 LINC01424在ESCC组织及不同分期中的表达

利用课题组118对ESCC-癌旁组织进行qRT-PCR验证，LINC01424在ESCC组织中异常高表达(图2A)，与Xena数据库标准化处理的TCGA及GTEx数据分析结果一致(图1B)；生存分析结果进

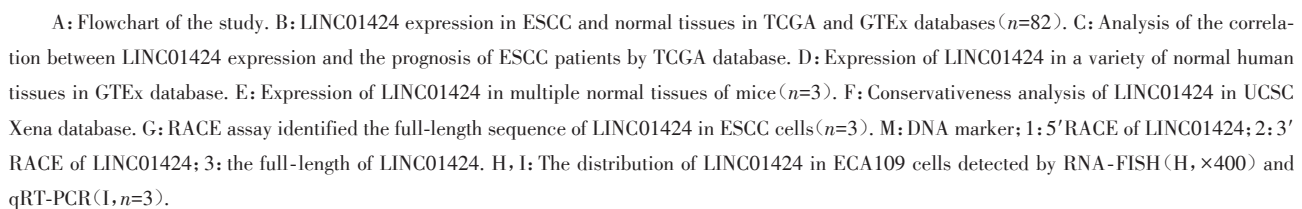


图1 ESCC 中CT-LINC01424的筛选
Figure 1 Screening of CT-LINC01424 in ESCC

一步确认 LINC01424 高表达与更差的 ESCC 预后显著相关(图 2B)。综合 118 例受试患者的临床病理特征与 LINC01424 的表达情况进行分析(表 2),结果显示 LINC01424 的表达与 ESCC 患者的 T 分期、N 分期及临床分期显著相关,且 LINC01424 的阳性表达预示着肿瘤分期较晚(图 2C~E)。以上结果提示 LINC01424 的表达量与 ESCC 的发生及进展相关。

2.3 LINC01424 体外功能研究

在正常食管黏膜上皮细胞及 8 个 ESCC 细胞系检测 LINC01424 的表达,发现 LINC01424 在 KYSE30、KYSE70、ECA109、KYSE180 细胞系中表达显著高于正常食管黏膜上皮细胞,且在 ECA109 细胞系中的表达上调最高(图 3A)。为了初步探索 LINC01424 对 ESCC 的作用,设计合成 LINC01424 敲降及过表达慢病毒载体,取对数生长期的 ECA109

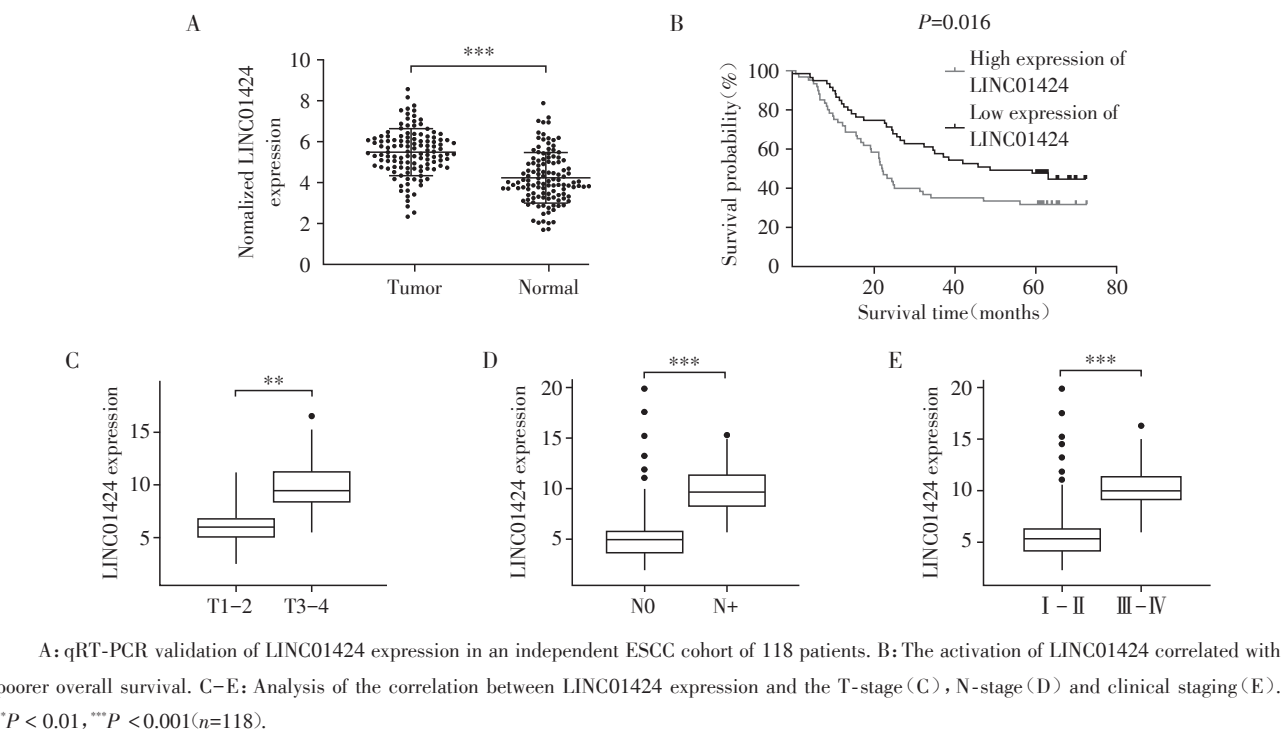


图2 LINC01424在ESCC组织的表达及对预后的影响
Figure 2 Expression of LINC01424 in ESCC and its effect on prognosis

表2 LINC01424表达与临床病理参数的关系

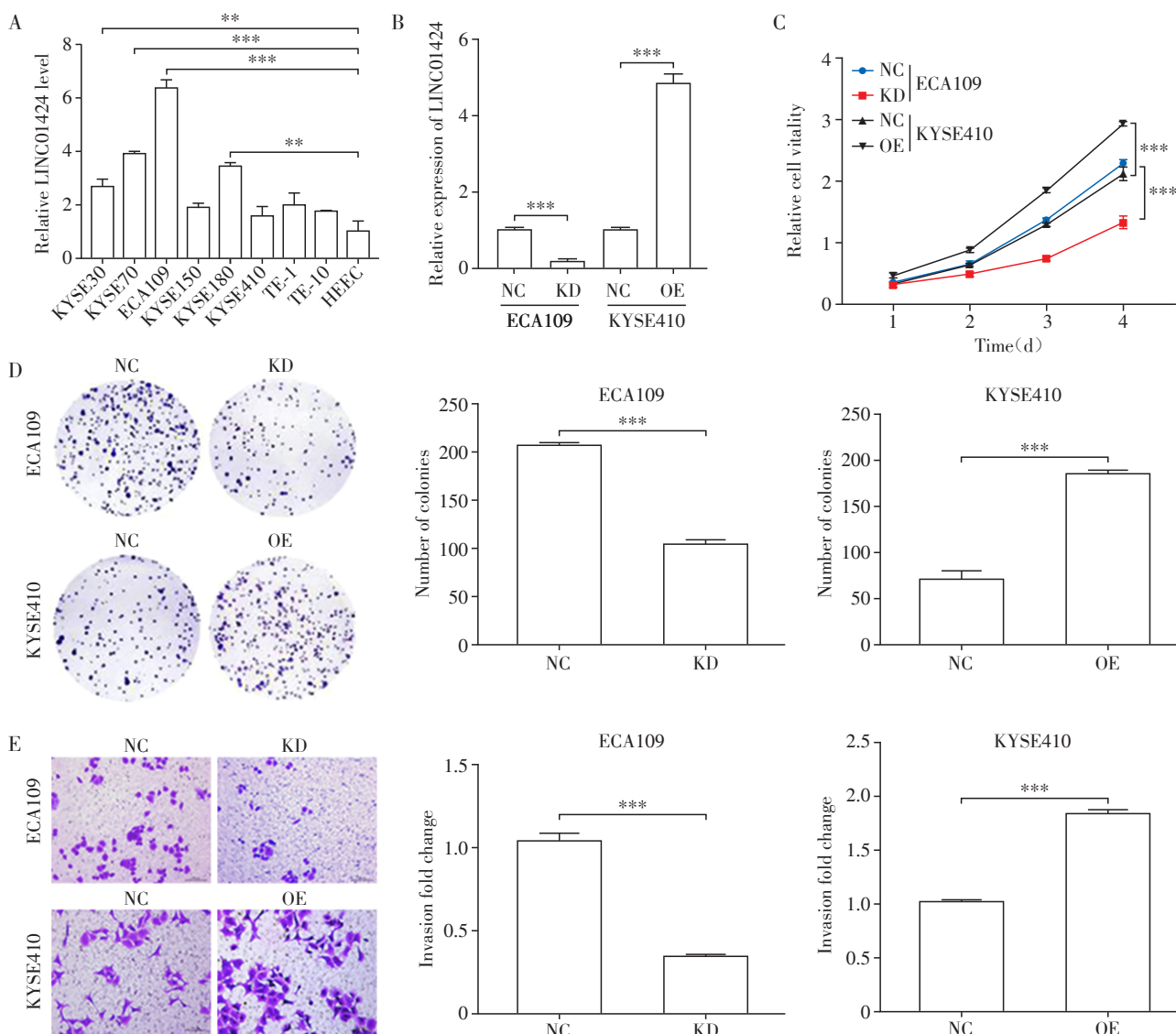
Table 2 Association between the expression of LINC01424 and clinicopathological parameters					[n(%)]				
Parameter	Total	LINC01424 expression		P	Parameter	Total	LINC01424 expression		P
		High(n=59)	Low(n=59)				High(n=59)	Low(n=59)	
Sex				0.336	Differentiation				0.501
Male	76	41(69.5)	35(59.3)		G1	46	26(44.1)	20(33.9)	
Female	42	18(30.5)	24(40.7)		G2	60	28(47.4)	32(54.2)	
Age				0.197	G3	12	5(8.5)	7(11.9)	
≤60 years	56	32(54.2)	24(40.7)		Location				0.793
> 60 years	62	27(45.8)	35(59.3)		Upper	5	3(5.1)	2(3.4)	
T stage				0.019	Middle	30	16(27.1)	14(23.7)	
T1-2	23	6(10.2)	17(28.8)		Lower	83	40(67.8)	43(72.9)	
T3-4	95	53(89.8)	42(71.2)		TNM stage				0.002
N stage				0.003	I - II	73	28(47.5)	45(76.3)	
N0	69	26(44.1)	43(72.9)		III-IV	45	31(52.5)	14(23.7)	
N+	49	33(55.9)	16(27.1)						

细胞,进行敲降慢病毒的感染,取对数生长期的 KYSE410细胞,进行过表达慢病毒感染,并通过 RT-PCR 确定各组 LINC01424 的表达情况(图 3B)。CCK-8、平板克隆、Transwell 实验结果表明,敲降 LINC01424 能够显著降低 ESCC 细胞增殖、侵袭能力;而过表达 LINC01424 后,其增殖、侵袭能力显著增强(图 3C~E)。以上细胞实验结果提示, LINC01424 能够作为致癌基因在 ESCC 增殖、侵袭中

发挥作用。

2.4 LINC01424 体内功能研究

为了进一步验证 LINC01424 在 ESCC 的作用,利用裸鼠移植瘤模型评价 LINC01424 对在体肿瘤生长的影响,结果表明敲降 LINC01424 明显抑制肿瘤的生长(图 4A~C)。RT-PCR 检测发现 LINC01424 敲降组中瘤体 LINC01424 的表达明显降低(图 4D),Ki-67 蛋白表达显著下调(图 4E)。



A: Expression of LINC01424 in HEEC and ESCC cell lines. B: qRT-PCR assay to verify the expression of LINC01424. C, D: CCK-8 assays (C) and colony formation assays (D) were performed to determine the cell viability of ESCC cells (×200). E: Invasion assays were used to detect the invasion abilities of ESCC cells (×200). NC: negative control; KD: knockdown; OE: overexpressin. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$).

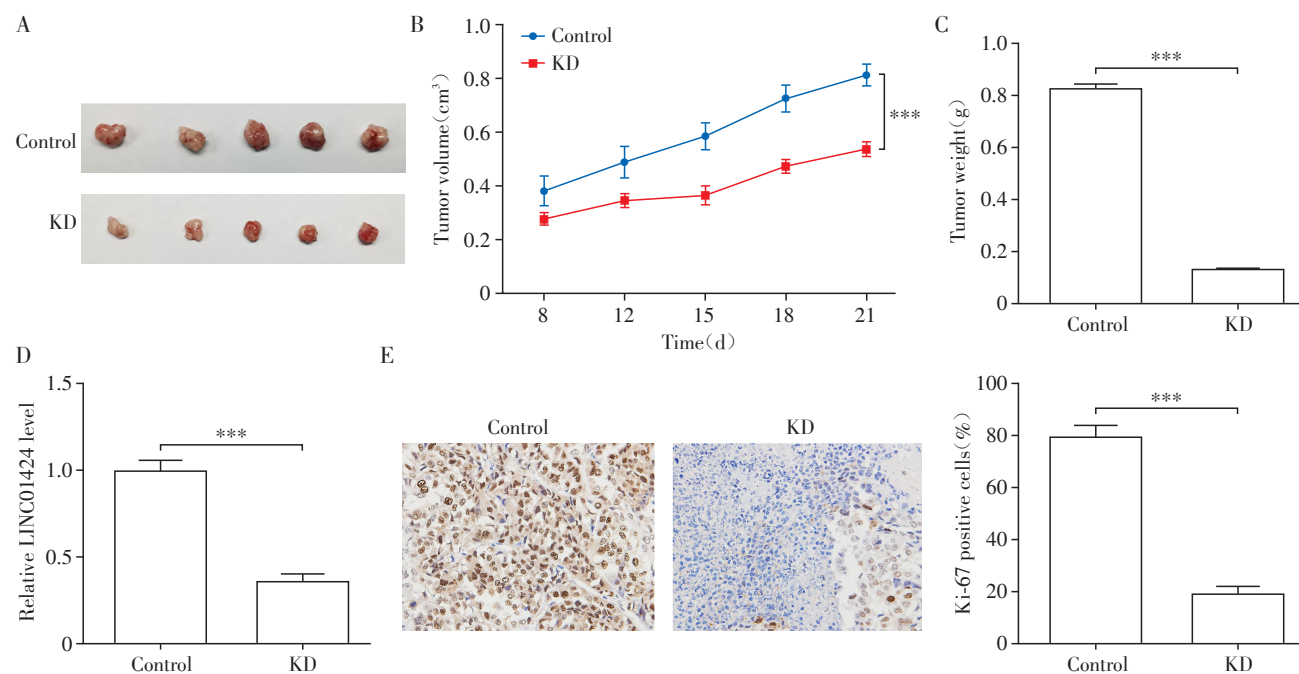
图3 敲低/过表达 CT-LINC01424 可以抑制/促进 ESCC 增殖和侵袭能力

Figure 3 Knockdown/overexpression of CT-LINC01424 inhibited/promoted the proliferation and invasive ability of ESCC

2.5 LINC01424 潜在靶基因预测

为进一步探索 LINC01424 对食管癌进展影响的具体机制,试图寻找其下游基因。基于 MEM 数据

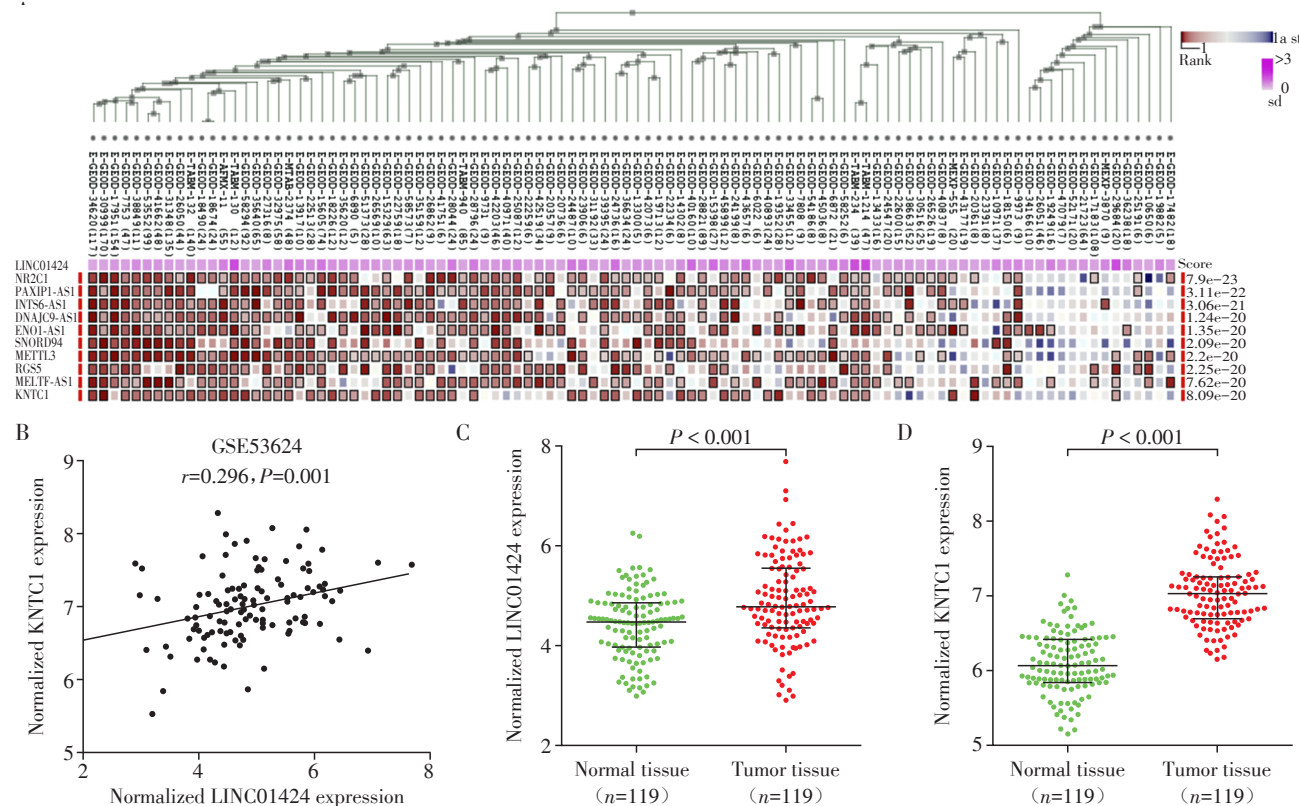
库,预测了 LINC01424 的潜在靶基因,相关性评分排名前 10 的基因如图 5A 所示。随后使用公共数据库 GSE53624 (119 对 ESCC 样本)分析结果进一步证实



A: Tumor formation in nude mice in LINC01424-knockdown and control groups. B: Tumor growth curves of xenografts in LINC01424-knockdown and control groups. C: The tumor weight was measured at the end point. D: qRT-PCR assay to verify of the expression of LINC01424 in tumors. E: Ki-67 staining in LINC01424-knockdown and control tumor tissues($\times 200$). KD: LINC01424-knockdown; *** $P < 0.001$ ($n=5$).

图4 敲降CT-LINC01424可以抑制ESCC的生长

Figure 4 Knockdown of CT-LINC01424 inhibited the growth of ESCC



A: TOP 10 genes associated with LINC01424 expression in MEM database. B: Correlation of LINC01424 with KNTC1 expression in GSE53624 database. C, D: Expression of LINC01424(C) and KNTC1(D) in ESCC tissue and pericarcinomatous normal tissue.

图5 LINC01424靶基因预测

Figure 5 Prediction of target gene for LINC01424

LINC01424与着丝粒相关1(kinetochore-associated 1, KNTC1)基因之间存在显著共表达关联(图5B)。同时, LINC01424及KNTC1在ESCC癌组织中的表达显著高于癌旁组织(图5C、D)。

3 讨论

食管癌目前已成为世界上最常见的恶性肿瘤之一, 而我国是世界上ESCC发病率和病死率最高的国家之一。外科治疗是ESCC的主要根治手段, 对于早期ESCC患者, 内镜下黏膜切除术或黏膜剥离术(T1a)或单纯手术治疗(T1b、T2N0M0)即可取得满意的疗效。然而, 大多数患者在确诊时已为局部晚期或存在远处转移, 故总体预后不佳。因此, 对于Ⅱ期及以上的患者, 单纯外科治疗模式已经被以手术为主, 包括术前新辅助与术后辅助治疗的多学科综合治疗模式替代^[21]。

现行指南推荐采用包括化疗或者放化疗在内的辅助治疗方案。在传统的紫杉醇+铂类化疗方案的基础上, 多种分子靶向药物, 如表皮生长因子受体信号通路抑制剂尼妥珠单抗、血管内皮生长因子抑制剂贝伐单抗以及纳武单抗、替雷利珠为代表的多种药物用于ESCC治疗的临床研究亦广泛开展^[22-27]。现行临床指南推荐卡瑞利珠单抗联合紫杉醇+顺铂为晚期ESCC的一线治疗方案, 一项包含了596例晚期或转移性ESCC患者的Ⅲ期临床试验ESCORT-1st显示, 虽然患者相比单纯化疗治疗有所获益, 但是其OS仍仅有15.3个月^[26]。因此, 深入研究ESCC的发病机制, 探寻ESCC发生进展过程中的关键分子, 为ESCC的治疗提供新的潜在干预靶点, 具有较大的科研及临床价值。

癌/睾丸抗原(cancer/testis antigen, CTA)是一组在恶性细胞和种系细胞中限制性表达的抗原, 最初是通过患者来源的细胞毒性T淋巴细胞识别肿瘤抗原而发现的, 这种表达特性使CTA成为疫苗或T细胞治疗靶点的潜在候选者^[28]。之后的研究表明, 多种CTA可以刺激上皮间充质转化和癌症干细胞样细胞的产生, 从而促进肿瘤的侵袭和转移^[29]。因此, CTA可以作为癌症治疗的靶点大力研发。本课题组既往根据CT基因的表达模式, 首先在全基因组范围内将睾丸特异性基因划分为6类, 其中C1和C2组被定义为具有较高可信度的睾丸特异性编码基因, C2组中即包含lncRNA^[30]。lncRNA可调控miRNA降解、染色质重构, 参与ESCC等多种肿瘤细胞的增殖、凋亡等生物学过程^[31], 在正常细胞和疾病状态

(包括多种类型的癌症)中都具有重要的生物学功能^[32]。

本研究系统筛选出19个ESCC相关的超保守CT-lncRNA, 其中有1个与ESCC预后显著相关的CT-lncRNA, 即LINC01424。检索文献发现, 尚未有关于LINC01424的研究报道。qRT-PCR实验对118对ESCC-癌旁组织中LINC01424的表达进行验证, 结果显示LINC01424在ESCC组织中较癌旁组织异常高表达, 生存分析结果进一步确认LINC01424高表达与ESCC预后较差显著相关。细胞功能学实验及裸鼠成瘤实验揭示LINC01424对ESCC细胞的增殖和转移存在明显的促进作用。通过MEM数据库预测了LINC01424的潜在靶基因, 结果发现LINC01424与KNTC1基因存在显著共表达关联。

KNTC1蛋白是着丝粒蛋白复合物的遗传保留成员, 对纺锤体构建和染色体分离至关重要^[33]。它触发一个抑制信号, 在纺锤体中的所有染色体都正确对齐之前排除晚期胞质分裂的发生。染色体分离和胞质分裂都是关键的生物学过程, 依赖于多种进化上保守的蛋白质复合物, 而KNTC1作为有丝分裂检查点的关键元件, 可确保胞质分裂过程中染色体的正确分离, 由KNTC1缺陷引起的染色体不稳定被认为是肿瘤形成的关键步骤之一^[34]。研究发现, KNTC1的高表达与某些癌症的进展相关。例如shRNA介导的KNTC1敲降可以显著抑制非小细胞肺癌及子宫颈癌的发展^[35], 而在肝细胞癌中, KNTC1的下调则表现出明显的细胞抑制活性, 引起细胞凋亡率上升^[36]。文献报道, KNTC1在ESCC中同样具有显著的促癌作用, 可能通过促进细胞有丝分裂及加重缺氧环境等方式发挥其生物学效应^[37]。

综上所述, 本研究首次在ESCC中进行超保守CT-lncRNA的系统筛选, 并成功鉴定出超保守CT-LINC01424与ESCC进展及生存显著相关。体内及体外实验证实其参与ESCC增殖及侵袭的过程, 通过数据库分析发现其与KNTC1基因存在共表达关系, 可能通过KNTC1发挥其生物学作用, 但具体作用机制需要进行更深入的研究。

[参考文献]

- [1] LAGERGREN J, SMYTH E, CUNNINGHAM D, et al. Esophageal cancer [J]. *Lancet*, 2017, (10110): 2383-2396
- [2] UHLENHOPP D J, THEN E O, SUNKARA T, et al. Epidemiology of esophageal cancer: update in global trends, etiology and risk factors [J]. *Clin J Gastroenterol*, 2020,

- 13(6): 1010-1021
- [3] 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): 209-249
- [4] WONG M C S, HAMILTON W, WHITEMAN D C, et al. Global incidence and mortality of oesophageal cancer and their correlation with socioeconomic indicators temporal patterns and trends in 41 countries [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4522
- [5] MORTENSEN M B. Esophageal cancer: biology, natural history, staging and therapeutic options [J]. *Minerva Med*, 2007, 98(4): 299-303
- [6] ALLEMANI C, MATSUDA T, DI CARLO V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. *Lancet*, 2018, 391(10125): 1023-1075
- [7] RILEY R S, JUNE C H, LANGER R, et al. Delivery technologies for cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 175-196
- [8] MIMURA K, YAMADA L, UJIE D, et al. Immunotherapy for esophageal squamous cell carcinoma: a review [J]. *Fukushima J Med Sci*, 2018, 64(2): 46-53
- [9] KUO H Y, GUO J C, HSU C H. Anti-PD-1 immunotherapy in advanced esophageal squamous cell carcinoma: a long-awaited breakthrough finally arrives [J]. *J Formos Med Assoc*, 2020, 119(2): 565-568
- [10] JING W, YAN W W, LIU Y G, et al. Slight advantages of nimotuzumab versus cetuximab plus concurrent chemoradiotherapy in locally advanced esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(8): 1121-1126
- [11] BANDO H, KOTANI D, TSUSHIMA T, et al. TENERGY: multicenter phase II study of atezolizumab monotherapy following definitive chemoradiotherapy with 5-FU plus cisplatin in patients with unresectable locally advanced esophageal squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 336
- [12] AI H H, YANG H, LI L, et al. Cancer/testis antigens: promising immunotherapy targets for digestive tract cancers [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1190883
- [13] GHAFOURI-FARD S, MODARRESSI M H. Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy [J]. *Arch Iran Med*, 2009, 12(4): 395-404
- [14] MARTÍNEZ-JIMÉNEZ F, MUIÑOS F, SENTÍIS I, et al. A compendium of mutational cancer driver genes [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(10): 555-572
- [15] LIN D C, DINH H Q, XIE J J, et al. Identification of distinct mutational patterns and new driver genes in oesophageal squamous cell carcinomas and adenocarcinomas [J]. *Gut*, 2018, 67(10): 1769-1779
- [16] DANESHMAND S. Advanced testis cancer [J]. *Eur Urol Focus*, 2019, 5(5): 710-712
- [17] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674
- [18] SINEATH R C, MEHTA A. Preservation of fertility in testis cancer management [J]. *Urol Clin North Am*, 2019, 46(3): 341-351
- [19] ZHANG Y J, ZHANG Y X, ZHANG L. Expression of cancer-testis antigens in esophageal cancer and their progress in immunotherapy [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(2): 281-291
- [20] WANG C, GU Y Y, ZHANG K, et al. Systematic identification of genes with a cancer-testis expression pattern in 19 cancer types [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10499
- [21] SHORT M W, BURGERS K G, FRY V T. Esophageal cancer [J]. *Am Fam Physician*, 2017, 95(1): 22-28
- [22] MENG X, ZHENG A P, WANG J, et al. Nimotuzumab plus concurrent chemo-radiotherapy in unresectable locally advanced esophageal squamous cell carcinoma (ESCC): interim analysis from a phase 3 clinical trial [J]. *Br J Cancer*, 2023, 129(11): 1787-1792
- [23] WANG J F, ZHAO Q, CAI L, et al. Efficacy of bevacizumab and gemcitabine in combination with cisplatin in the treatment of esophageal cancer and the effect on the incidence of adverse reactions [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 2317181
- [24] MAKINO T, NAKAI S, MOMOSE K, et al. Efficacy and survival of nivolumab treatment for recurrent/unresectable esophageal squamous-cell carcinoma: real-world clinical data from a large multi-institutional cohort [J]. *Esophagus*, 2024, 21(3): 319-327
- [25] XU T P, BAI J N, ZHAO K, et al. Induction therapy of tislelizumab combined with cisplatin and 5-fluorouracil and subsequent conversion surgery in patients with unresectable advanced esophageal squamous cell carcinoma: a phase 2, single center study [J]. *Ann Surg Oncol*, 2024; 31(13): 9321-9331
- [26] LUO H Y, LU J, BAI Y X, et al. Effect of camrelizumab vs. placebo added to chemotherapy on survival and progression-free survival in patients with advanced or metastatic esophageal squamous cell carcinoma: the ESCORT-1st randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2021, 326(10): 916-925

- [27] YAN F, CHEN L P, YING M Z, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab combined with albumin-bound paclitaxel and nedaplatin for advanced esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Immunotherapy*, 2024, 16(5): 305–317
- [28] MENG X Y, SUN X Q, LIU Z L, et al. A novel era of cancer/testis antigen in cancer immunotherapy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107889
- [29] SALMANINEJAD A, ZAMANI M R, POURVAHEDI M, et al. Cancer/testis antigens: expression, regulation, tumor invasion, and use in immunotherapy of cancers[J]. *Immunol Invest*, 2016, 45(7): 619–640
- [30] LIU L, CHEN H W, CHEN X N, et al. KNTC1 as a putative tumor oncogene in pancreatic cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(7): 3023–3031
- [31] WANG J P, CARVAJAL-CARMONA L G, CHU J H, et al. Germline variants and advanced colorectal adenomas: adenoma prevention with celecoxib trial genome-wide association study [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(23): 6430–6437
- [32] WU C, MIAO X P, HUANG L M, et al. Genome-wide association study identifies five loci associated with susceptibility to pancreatic cancer in Chinese populations [J]. *Nat Genet*, 2011, 44(1): 62–66
- [33] QI H, CAO M, CHEN Y, et al. KNTC1 functions as a potential biomarker and oncogene regulating proliferation, migration and apoptosis in gastric cancer[J]. *International Immunopharmacology*, 2024, 143: 113257
- [34] WANG C M, WANG Y Y, LIU C R, et al. Kinetochore-associated protein 1 promotes the invasion and tumorigenicity of cervical cancer cells via matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 9495–9507
- [35] LIU R J, LIU R L, GUO Z Y, et al. shRNA-mediated knockdown of KNTC1 inhibits non-small-cell lung cancer through regulating PSMB8 [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(8): 685
- [36] TONG H, LIU X H, PENG C H, et al. Silencing of KNTC1 inhibits hepatocellular carcinoma cells progression via suppressing PI3K/Akt pathway [J]. *Cell Signal*, 2023, 101: 110498
- [37] LIU C T, MIN L, WANG Y J, et al. shRNA-mediated knockdown of KNTC1 suppresses cell viability and induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(3): 1053–1060
- [收稿日期] 2024-04-18
(本文编辑: 蒋 莉)

(上接第 1628 页)

- cations, 2023, 14(1): 726
- [20] UYSAL F, AKKOYUNLU G, OZTURK S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos[J]. *Biochimie*, 2015, 116: 103–113
- [21] CHEN Z, ZHANG Y. Role of mammalian DNA methyltransferases in development [J]. *Annu Rev Biochem*, 2020, 89: 135–158
- [22] DI EMIDIO G, D' AURORA M, PLACIDI M, et al. Pre-conceptional maternal exposure to cyclophosphamide results in modifications of DNA methylation in F1 and F2 mouse oocytes: evidence for transgenerational effects [J]. *Epigenetics*, 2019, 14(11): 1057–1064
- [23] ECKERSLEY-MASLIN M A, ALDA-CATALINAS C, REIK W. Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(7): 436–450
- [24] YANG W, MA Y, JIN J, et al. Cyclophosphamide exposure causes long-term detrimental effect of oocytes developmental competence through affecting the epigenetic modification and maternal factors' transcription during oocyte growth [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 682060
- [25] DING C, LU J, LI J, et al. RNA-methyltransferase Nsun5 controls the maternal-to-zygotic transition by regulating maternal mRNA stability [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(12): e1137
- [26] WILKINSON A L, ZORZAN I, RUGG-GUNN P J. Epigenetic regulation of early human embryo development [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(12): 1569–1584
- [27] LI L, GUO F, GAO Y, et al. Single-cell multi-omics sequencing of human early embryos [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(7): 847–858
- [收稿日期] 2024-05-23
(本文编辑: 戴王娟)