

LINC01503 调控 ERK 磷酸化促进食管鳞状细胞癌放疗抵抗的机制研究

李智军^a, 姜海燕^b, 边超^a, 张浩伟^a, 张斯琴胡^a

(内蒙古自治区人民医院 a. 放射治疗科; b. 教学处, 呼和浩特 010017)

摘要:目的 探究长链非编码核糖核酸(LncRNA) LINC01503 调控细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路磷酸化促进食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)放疗抵抗的作用机制。方法 收集2014年6月~2017年12月内蒙古自治区人民医院ESCC患者癌组织及癌旁组织标本79例,采用实时荧光定量PCR检测LINC01503在ESCC组织中的表达水平,分析LINC01503与ESCC患者临床病理参数、放疗敏感性及其预后的关系。构建ESCC放疗抵抗细胞株KYSE150R,检测KYSE150R细胞中LINC01503的表达;转染siRNA下调KYSE150R中LINC01503的表达。CCK8实验检测各组细胞放疗敏感性;流式细胞试验检测各组细胞周期和细胞凋亡;Western blot检测各组细胞中ERK1/2, PERK1/2, 细胞周期蛋白D1(cyclin D1), 细胞周期素依赖性激酶4(cyclin dependent kinase 4, CDK4), 凋亡蛋白Bcl-2和Bax蛋白表达。结果 与癌旁组织相比,LINC01503在ESCC组织中表达上调(4.15 ± 1.21 vs 0.96 ± 0.43),差异有统计学意义($t=22.083$, $P<0.001$)。LINC01503高表达与患者T分期、淋巴结转移、TNM分期、放疗抵抗有关,差异均有统计学意义($t=2.322 \sim 2.939$, 均 $P<0.05$)。LINC01503预测预后的曲线下面积为0.780(95%CI: 0.676 ~ 0.884),灵敏度和特异度分别为81.58%, 67.05%。LINC01503高表达组5年生存率低于LINC01503低表达组[41.86%(18/43) vs 63.89%(23/36)],差异有统计学意义($\chi^2=4.430$, $P=0.035$)。与si-NC组相比,si-LINC01503组KYSE150R细胞的放疗敏感性增加,差异均有统计学意义($t=17.391 \sim 33.692$, 均 $P<0.001$);si-LINC01503组KYSE150R细胞周期阻滞在G0/G1期($61.47\% \pm 3.60\%$ vs $52.15\% \pm 2.11\%$),细胞凋亡增加($31.95\% \pm 2.40\%$ vs $3.68\% \pm 0.47\%$),差异均有统计学意义($t=4.602, 20.022$; $P=0.004, 0.002$);PERK1/2(0.24 ± 0.03 vs 1.25 ± 0.09), cyclin D1(0.18 ± 0.06 vs 1.40 ± 0.14), CDK4(0.87 ± 0.09 vs 1.37 ± 0.16)和Bcl-2(0.16 ± 0.03 vs 0.85 ± 0.07)蛋白表达降低,Bax蛋白表达增加(0.69 ± 0.06 vs 0.22 ± 0.05),差异均有统计学意义($t=4.718 \sim 18.440$, 均 $P<0.05$)。结论 LINC01503通过促进ERK磷酸化调控细胞周期和凋亡促进ESCC细胞放疗抵抗,是逆转ESCC放疗抵抗的潜在分子靶点。

关键词: 食管鳞状细胞癌; LINC01503; 放疗抵抗; 增殖; 凋亡

中图分类号: R735.1; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2023)02-025-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.02.005

Mechanism of LINC01503 Promotes Radiotherapy Resistance to Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Regulating ERK Phosphate Acidization

LI Zhi-jun^a, JIANG Hai-yan^b, BIAN Chao^a, ZHANG Hao-wei^a, ZHANG Si-qin-hu^a

(a. Department of Radiotherapy; b. Department of Teaching, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010017, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of long chain non coding RNA LINC01503 regulating the phosphorylation of extracellular signal regulated kinase (ERK) pathway to promote the radiotherapy resistance of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** 79 cases of cancer tissue and adjacent tissue samples from ESCC patients in People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region from June 2014 to December 2017 were collected. The expression level of LINC01503 in ESCC tissue was detected by real-time fluorescent quantitative PCR, and the relationship between LINC01503 and clinical pathological parameters, radiotherapy sensitivity and prognosis of ESCC patients was analyzed. ESCC radiation resistant cell line KYSE150R was constructed, and the expression of LINC01503 in KYSE150R cells was detected. Transfection of siRNA down regulated the expression of LINC01503 in KYSE150R. CCK8 assay was used to detect the radiosensitivity of cells in each group

基金项目: 内蒙古自治区科学技术厅科研项目(编号: 2018MS0115)。

作者简介: 李智军(1975-), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 食管癌放射治疗, E-mail: zhilijun5@163.com。

通讯作者: 姜海燕(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 放射治疗教学工作。

and cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the expression of ERK1/2, PERK1/2, cyclin D1, cyclin dependent kinase 4 (CDK4), apoptosis protein Bcl-2 and Bax in cells of each group. **Results** Compared with the adjacent tissues, LINC01503 was up-regulated in ESCC tissues (4.15 ± 1.21 vs 0.96 ± 0.43), with a statistically significant difference ($t=22.083$, $P<0.001$). The overexpression of LINC01503 was related to T stage, lymph node metastasis, TNM stage and radiotherapy resistance, and the differences were statistically significant ($t=2.322 \sim 2.939$, all $P<0.05$). The area under the curve of LINC01503 predicting prognosis was 0.780 (95%CI: 0.676 ~ 0.884), with sensitivity and specificity of 81.58% and 67.05%, respectively. The 5-year survival rate of LINC01503 overexpression group was lower than that of LINC01503 low expression group [41.86% (18/43) vs 63.88% (23/36)], the difference was statistically significant ($\chi^2=4.430$, $P=0.035$). Compared with the si-NC group, the radiosensitivity of KYSE150R cells in the si-LINC01503 group increased significantly ($t=17.391 \sim 33.692$, all $P<0.001$). In si-LINC01503 group, KYSE150R cell cycle was arrested in G0/G1 phase ($61.47\% \pm 3.60\%$ vs $52.15\% \pm 2.11\%$), apoptosis increased ($31.95\% \pm 2.40\%$ vs $3.68\% \pm 0.47\%$), the differences were statistically significant ($t=4.602, 20.022$, $P=0.004, 0.002$), respectively. PERK1/2 (0.24 ± 0.03 vs 1.25 ± 0.09), cyclin D1 (0.18 ± 0.06 vs 1.40 ± 0.14), CDK4 (0.87 ± 0.09 vs 1.37 ± 0.16), Bcl-2 (0.16 ± 0.03 vs 0.85 ± 0.07) protein expression decreased, while Bax protein expression increased (0.69 ± 0.06 vs 0.22 ± 0.05), the differences were statistically significant ($t=4.718 \sim 18.440$, all $P<0.05$). **Conclusion** LINC01503 is a potential molecular target to reverse ESCC radioresistance by promoting ERK phosphorylation, regulating cell cycle and apoptosis, and promoting ESCC radioresistance.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma; LINC01503; radiotherapy resistance; proliferation; apoptosis

食管癌是常见的恶性肿瘤之一，是世界上与肿瘤相关死亡的第六大原因，超过一半的食管癌患者位于我国等东亚国家^[1]。食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是食管癌的主要组织类型，占食管癌的80%。目前术前放射疗法是临床中ESCC的重要治疗方法，尤其是对于晚期影响手术的患者，但是ESCC细胞常常存在放疗抵抗，影响患者的临床疗效和预后^[2]。研究表明，ESCC细胞放疗抵抗性的存在与异常表达的分子有关，因此找到与ESCC放疗敏感性相关的异常表达分子至关重要^[3]。LINC01503是由XIE等^[4-6]学者新近鉴定出的长链非编码核糖核酸(LncRNA)，其在食管和头颈鳞状细胞癌中的表达较非肿瘤组织明显升高，并促进ESCC细胞的增殖、菌落形成、迁移、侵袭。LI等^[7]报道LINC01503在卵巢癌卡铂耐药细胞中表达上调，LINC01503敲低抑制其耐药性。LINC01503是否与ESCC放疗抵抗相关引起我们的关注。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路在包括食管癌在内的恶性肿瘤进展中发挥重要作用^[8]，包括促进ESCC的放疗抵抗^[9]，LINC01503是否也通过调控ERK信号通路促进ESCC放疗抵抗目前尚不清楚。本研究拟通过检测LINC01503在ESCC组织中的表达及在ESCC放疗抵抗中的作用，以期获得ESCC放疗抵抗的潜在分子靶点。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2014年6月~2017年12月内蒙古自治区人民医院收治的ESCC患者79例，纳入标准：①接受手术切除治疗；②手术前接受放射治疗，放射时长6~7周，总剂量为60~70

Gy，每次1.8~2.0 Gy；③病理学活检明确为ESCC；④患者临床资料完整，包括年龄、性别、肿瘤分化程度、肿瘤T分期、TNM分期的临床参数及随访预后资料；⑤获得患者书面知情同意书。排除标准：①发生远处转移；②并发其它恶性肿瘤；③患有威胁生命健康的慢性疾病。手术切除的ESCC癌组织及癌旁新鲜组织(距离肿瘤5cm)样本冻存于液氮中。本研究遵循赫尔辛基宣言，并获得医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 Trizol裂解液(美国Invitrogen公司)，逆转录试剂盒Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kits(加拿大Fermentas公司)，SYBR Green PCR试剂盒(日本Takara公司)，LINC01503和GAPDH引物均由上海生工公司设计和合成，DMEM-F12培养液、胰酶和胎牛血清(美国Gibco公司)，ESCC KYSE150细胞(美国ATCC细胞库)，LINC01503 siRNA(广州Gene公司)，CCK8试剂和细胞裂解缓冲液(北京索莱宝科技有限公司)，细胞周期和细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天试剂有限公司)，二甲酸蛋白检测试剂盒(美国Thermo试剂公司)，PVDF膜(美国BioRad公司)，增强型ECL™检测试剂盒(中国南京KeyGene公司)，cyclin D1, CDK4, Bcl-2, Bax, GAPDH、兔二抗、鼠二抗(英国Abcam公司)，低温高速离心机(德国Eppendorf公司)，Nanodrop2000分光光度计和细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)，7500实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystem公司)，FACSCanto II流式细胞仪(美国BD公司)，电泳仪(美国Bio-rad公司)。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量PCR (real time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR) 检测 ESCC 组织中 LINC01503 的表达: Trizol 裂解液将组织裂解后提取组织总 RNA, 采用逆转录试剂盒进行 RNA 的逆转录。采用 SYBR Green PCR 试剂盒以 cDNA 为模板进行 PCR 反应体系。采用 Applied Biosystems 7900 HT 序列检测系统检测 LINC01503 和 GAPDH 的 ΔC_t 值, 以 GAPDH 作为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 LINC01503 的相对表达量。引物序列: LINC01503 正向引物: 5'-GGGACGGAGACAAATGACGG-3', 反向引物: 5'-GCAGGCTCCCTGACACGTA-3'; GAPDH 正向引物: 5'-ATGTTGCAACCGGGAAGGAA-3', 反向引物: 5'-AGGAAAAGCATCA CCCGAG-3'。

1.3.2 细胞培养和放疗抵抗细胞株的构建: ESCC 细胞 KYSE150 采用 DMEM-F12 培养液培养, 并添加 10g/dl 的胎牛血清、100 U/ml 的青霉素和 100 mg/ml 的链霉素, 放置在 37℃ 含有 5ml/dl CO₂ 的湿润培养箱中培养。取生长对数期的 KYSE150 暴露于 Linac X 射线中。初始剂量为 1 Gy, 后续逐渐增加剂量 (1 Gy 持续 3 次, 2 Gy 持续 3 次, 4 Gy 持续 7 次)。最终获得具有放射抵抗的细胞系, 确定为 KYSE150R。采用 RT-qPCR 检测 KYSE150R 细胞中 LINC01503 的表达。

1.3.3 细胞转染: 2×10^5 个 KYSE150R 细胞重悬在 2ml 培养液中, 铺至六孔板中培养。随机分为对照组 (si-NC) 组和实验组 (si-LINC01503) 组。细胞贴壁后, 采用 LiPofectamine 2000 试剂进行转染, 首先将 LiPofectamine 2000 试剂分别与空培养液、LINC01503 siRNA 混匀后静置 5min, 然后再将两者混合静置 10min, 加入细胞培养液中, 并放置在 37℃ 含有 5ml/dl CO₂ 的湿润培养箱中。6h 后更换细胞培养液, 继续培养 48 h, RT-qPCR 检测 LINC01503 siRNA 转染效果。

1.3.4 CCK8 实验检测细胞放疗敏感度: 2 000 个 si-NC 组和 si-LINC01503 组细胞重悬在 200 μ l 培养液中, 铺至 96 孔板细胞中, 设置 0, 0.5, 1, 2, 4, 8Gy 放射剂量, 并每组设置 6 个平行复孔, 放置在 37℃ 含有 5 ml/dl CO₂ 的湿润培养箱中培养。细胞贴壁后分别给予对应的放射剂量进行辐射, 并放置培养箱中继续孵育 48h。更换 100 μ l 含有 10%(v/v) CCK8 的培养液, 混匀后在培养箱中继续培养 2h。采用酶标仪检测各孔细胞在 450 nm 处吸光度值 (*A* 值)。细胞的存活率 = 放射处理组的细胞 *A* 值 / 未处理组的细胞 *A* 值 $\times 100\%$ 。

1.3.5 流式细胞实验细胞周期分布检测: si-NC 组和 si-LINC01503 组细胞经 2Gy 放射剂量处理并培

养 48h 后, 收集各组细胞并用冷 PBS 冲洗 3 次。将细胞重悬在 PBS 中, 浓度调整为 1×10^5 个细胞/ml, 放置流式检测管中。将细胞用 1 ml 的 75ml/dl 乙醇 (-20℃ 中预冷处理过) 在 4℃ 下固定 1h, 并用冷 PBS 冲洗两次。加入 100 μ l 的 RNase A 及 400 μ l 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色液混匀后在 37℃ 孵育 30min。采用流式细胞仪记录在 488 nm 的激发波长下红色荧光, 并分析细胞周期的分布。

细胞凋亡检测: si-NC 组和 si-LINC01503 组细胞采用 2Gy 放射剂量处理并培养 48h 后, 采用无 EDTA 的胰酶收集各组细胞并用冷 PBS 冲洗 3 次。根据细胞凋亡检测试剂盒的说明书加入 5 μ l 的膜联蛋白-V-氟洛雷素异硫氰酸酯 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 和 10 μ l 的 PI, 混匀后于室温下孵育 15min。采用流式细胞仪, 在 525nm 和 620 nm 处的激发波长下检测 FITC 和 PI 荧光来分析细胞凋亡。

1.3.6 Western-blot 实验: 采用 RIPA 裂解缓冲液从细胞中提取细胞总蛋白质, 采用二甲酸试剂盒检测蛋白质的浓度。通过湿转移的方法将获得的蛋白质通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 并转移到 PVDF 膜上。并将膜放置在 5g/dl 牛血清清蛋白中室温下封闭 1h, 然后在 4℃ 下与一抗稀释液孵育过夜, 洗涤液中洗涤 3 次后, 膜与辣根过氧化物酶偶联的次级山羊抗兔抗体室温下孵育 1h, 洗涤液中洗涤 3 次。采用增强型 ECLTM 检测试剂盒蛋白质带, 并使用 Image J 软件对灰色值进行量化和分析。以 GAPDH 用作内部对照, 每种蛋白的相对表达表示为每个蛋白质与 GAPDH 的灰度值的比率。一抗抗体稀释液浓度: 抗 cyclin D1 1:500, 抗 CDK4 1:1 000, 抗 Bcl-2 1:500, 抗 Bax 1:500, 抗 GAPDH 1:1 000。

1.3.7 随访: 每三月以电话联系或门诊复查方式对患者进行术后随访, 随访五年, 记录患者生存情况, 随访截止时间为 2022 年 3 月。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计学软件处理数据, 正态分布计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 采用配对 *t* 检验比较 ESCC 癌组织和癌旁组织之间 LINC01503 表达的差异。绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线, 并计算曲线下面积 (area under curve, AUC) 评估 LINC01503 对预后 (死亡) 的预测价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验结果至少重复 3 次。

2 结果

2.1 LINC01503 在 ESCC 组织中的表达 见表 1。

LINC01503 在 ESCC 癌组织中的表达量显著高于癌旁组织 (4.15 ± 1.21 vs 0.96 ± 0.43), 差异有统计学意义 ($t=22.083$, $P<0.001$)。T 分期 T₃ 期、有淋巴结转移、TNM 分期 III ~ IV 期和放疗抵抗型 ESCC 癌组织 LINC01503 相对表达量高于在 T 分期 T₁ ~ T₂ 期、无淋巴结转移、TNM 分期 I ~ II 期和放疗敏感型 ESCC 组织, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 不同年龄、性别、分化程度 ESCC 组织 LINC01503 相对表达量比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

表 1 LINC01503 表达与 ESCC 患者临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

类别	n	LINC01503	t	P
年龄 (岁) ≤ 55	30	3.91 ± 1.06	1.489	0.141
> 55	49	4.30 ± 1.17		
性别 男性	41	4.27 ± 1.11	0.979	0.331
女性	38	4.02 ± 1.16		
分化程度 中高分化	51	4.04 ± 1.10	1.255	0.213
低分化	28	4.35 ± 0.95		
T 分期 T ₁ ~ T ₂ 期	43	3.82 ± 1.15	2.939	0.004
T ₃ 期	36	4.54 ± 1.00		
淋巴结转移 有	32	4.50 ± 1.19	2.322	0.023
无	47	3.91 ± 1.05		
TNM 分期 I ~ II 期	41	3.84 ± 1.04	2.574	0.012
III ~ IV 期	38	4.48 ± 1.17		
放疗疗效 敏感型	33	3.77 ± 1.08	2.397	0.019
抵抗型	46	4.42 ± 1.26		

2.2 LINC01503 对患者预后的预测价值 见图 1。随访期间, 患者死亡 38 例, 存活 41 例, 患者 5 年生存率为 51.90% (41/79)。ROC 曲线结果显示, LINC01503 预测预后 (死亡) 的 AUC 为 0.780 (95%CI: 0.676 ~ 0.884), 截断值为 4.53, 约登指数为 0.487, 灵敏度和特异度分别为 81.58%, 67.05%。

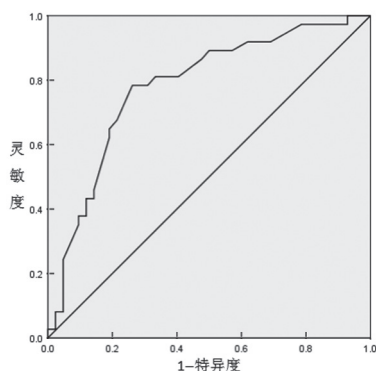


图 1 LINC01503 预测预后的 ROC 曲线

2.3 LINC01503 ESCC 组织中 LINC01503 表达水平对患者预后的影响 见图 2。以 ROC 曲线结果的截断值 4.53 为临界点, 将患者分为 LINC01503 高表达组 ($n=43$) 和低表达组 ($n=36$)。LINC01503 高表达组 5 年生存率 41.86% (18/43) 低于 LINC01503 低表达组 63.89% (23/36), 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.430$, $P=0.035$)。

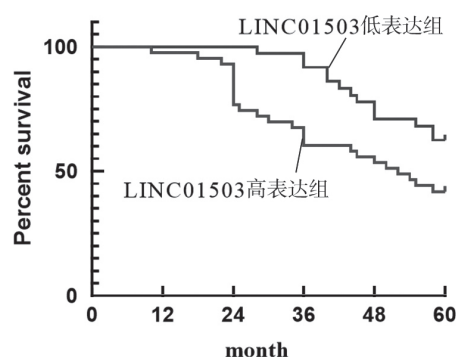


图 2 LINC01503 ESCC 组织中 LINC01503 表达水平对患者预后的影响

2.4 ESCC 放疗抵抗细胞株 KYSE150R 的构建 见表 2。采用放疗递增法诱导建立 ESCC 放疗抵抗细胞株 KYSE150R, CCK8 检测 KYSE150 和 KYSE150R 细胞对放疗的敏感性, 结果显示在相同放射剂量处理下, KYSE150R 细胞的存活率显著高于 KYSE150 细胞的存活率, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

RT-qPCR 检测结果 结果显示 LINC01503 在 KYSE150 细胞中的相对表达量显著低于 KYSE150R 细胞 (1.00 ± 0.04 vs 5.43 ± 0.49), 差异有统计学意义 ($t=23.720$, $P<0.001$)。

表 2 不同放射剂量对 KYSE150 和 KYSE150R 细胞存活率的影响 [$(\bar{x} \pm s)$ %]

放疗剂量 (Gy)	细胞存活率		t	P
	KYSE150	KYSE150R		
0	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00		
0.5	96.37 \pm 2.15	98.93 \pm 1.58	2.354	0.038
1	81.52 \pm 3.06	90.33 \pm 1.79	6.092	<0.001
2	62.47 \pm 2.99	78.05 \pm 3.65	8.087	<0.001
4	47.17 \pm 1.15	36.51 \pm 1.36	14.661	<0.001
8	19.07 \pm 0.87	21.31 \pm 0.77	4.728	0.001

2.5 LINC01503 siRNA 的干扰效果 LINC01503 siRNA 转染 KYSE150R 细胞, RT-qPCR 检测结果 结果显示 LINC01503 在 si-NC 组细胞的表达量显著高于 si-LINC01503 组 (1.03 ± 0.15 vs 0.39 ± 0.15), 差异有统计学意义 ($t=7.391$, $P<0.001$)。

2.6 干扰 LINC01503 的表达对 KYSE150R 细胞放疗敏感性的影响 见表 3。CCK8 实验结果显示在相同放射剂量处理下, si-LINC01503 组细胞的存活率显著低于 si-NC 组细胞的存活率, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

表 3 干扰 LINC01503 的表达对 KYSE150R 细胞放疗敏感性的影响 [($\bar{x} \pm s$) %]

放疗剂量 (Gy)	细胞存活率		<i>t</i>	<i>P</i>
	si-NC	si-LINC01503		
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00		
0.5	98.15 ± 1.50	87.03 ± 0.45	17.391	<0.001
1	87.44 ± 1.64	63.53 ± 1.78	24.189	<0.001
2	70.80 ± 1.55	44.04 ± 2.15	24.734	<0.001
4	50.18 ± 1.84	22.25 ± 3.35	17.907	<0.001
8	29.39 ± 0.17	20.15 ± 0.65	33.692	<0.001

2.7 干扰 LINC01503 的表达对 KYSE150R 细胞周期分布和凋亡的影响 见表 4。流式细胞实验结果显示 si-NC 组 G0/G1 细胞比率、细胞凋亡率低于 si-LINC01503 组, G2/M 期细胞比率高于 si-LINC01503 组, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

表 4 干扰 LINC01503 的表达对 KYSE150R 细胞周期分布和细胞凋亡的影响 [($\bar{x} \pm s$) , %]

项目	细胞百分比		<i>t</i>	<i>P</i>
	si-NC	si-LINC01503		
G0/G1	52.15 ± 2.11	61.47 ± 3.60	4.062	0.004
S	13.44 ± 1.40	9.67 ± 2.77	2.157	0.062
G2/M	34.41 ± 2.64	28.86 ± 1.78	3.813	0.005
细胞凋亡率	3.68 ± 0.47	31.95 ± 2.40	20.022	0.002

2.8 LINC01503siRNA 对放疗处理的 KYSE150R 细胞中 ERK 信号相关蛋白影响 见表 5。Western blotting 结果显示, 两组 ERK1/2 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), si-LINC01503 组 PERK1/2, cyclin D1, CDK4 和 Bcl-2 蛋白相对表达量低于 si-NC 组, Bax 蛋白相对表达量高于 si-NC 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 5 各组细胞中凋亡相关蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

项目	蛋白相对表达量		<i>t</i>	<i>P</i>
	si-NC	si-LINC01503		
ERK1/2	0.89 ± 0.11	1.06 ± 0.15	1.583	0.174
PERK1/2	1.25 ± 0.09	0.24 ± 0.03	18.440	<0.001
cyclin D1	1.40 ± 0.14	0.18 ± 0.06	13.873	<0.001
CDK4	1.37 ± 0.16	0.87 ± 0.09	4.718	0.005
Bcl-2	0.85 ± 0.07	0.16 ± 0.03	15.693	<0.001
Bax	0.22 ± 0.05	0.69 ± 0.06	10.423	<0.001

3 讨论

LncRNA 是非编码 RNA 的一种, 其长度大于 200 个核苷酸, 几乎没有蛋白质编码的能力。但是新兴证据表明, LncRNA 可以通过与各种生物分子的相互作用或募集染色质修饰复合物诱导基因调节, 被认为是多种癌症中的关键调节剂, 并参与了细胞增殖、细胞周期、侵袭及转移等广泛的生物学活动^[10]。研究发现 LncRNA 在肿瘤放疗抵抗中也发挥重要作用, 例如, LncRNA SBF2-AS1 低表达增加 ESCC 细胞的放射敏感度^[11]。随着测序技术的发展, 越来越多异常表达的 LncRNA 以及其在肿瘤的恶性进展中发挥的功能逐渐被发现, 因此研究这些特异度表达改变的 LncRNA 对探索增强肿瘤细胞放疗敏感性的分子靶点具有重要意义。

新近发现的 LncRNA-LINC01503 在肿瘤发生发展中报道发挥促癌作用, 例如 LINC01503 通过充当 miR-342-3P 的内源性海绵体, 并启动 miR-342-3P 介导 FXYD3 表达促进宫颈癌细胞增殖和迁移能力, 并抑制细胞凋亡, 可作为抗宫颈癌治疗的潜在分子靶点^[5]。LINC01503 在神经胶质瘤组织和细胞中表达上调, 其过表达与神经胶质瘤患者的 KPS, 肿瘤大小和 WHO 分级相关, 并且 LINC01503 水平较高的患者总生存率和无疾病生存率较差, 是神经胶质瘤患者的独立预后因素^[12]。同时, 有研究发现, LINC01503 是与鳞状细胞癌 (SCC) 密切相关的 LncRNA 之一, 头颈和食管 SCC 中 LINC01503 的高水平与患者的生存时间较短相关^[4]。已经观察到 LINC01503 与食管癌等多种肿瘤恶性进展相关, 同时本研究发现 LINC01503 在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 中高表达, 与 XIE 等^[4]的研究报道具有一致性, 那么 LINC01503 在 ESCC 放疗抵抗中是否发挥重要作用, 查阅文献显示未见有相关文献报道, 但是在卵巢癌卡铂耐药的细胞中 LINC01503 被报道表达升高, 并促进卵巢癌细胞卡铂的耐药性^[7]。肿瘤细胞对化学治疗的耐药机制也可导致肿瘤细胞的放疗抵抗, 这提示 LINC01503 可能与 ESCC 放疗抵抗相关。本研究检测显示在 ESCC 放疗抵抗患者中 LINC01503 高表达, 此外在 ESCC T 分期晚期、淋巴结转移、临床分期晚期和放疗抵抗中表达上调, LINC01503 高表达的 ESCC 患者预后较差, 且绘制 ROC 曲线显示, LINC01503 对患者预后 (死亡) 的预测价值较高, 表明 LINC01503 促进 ESCC 的恶性进展, 参与 ESCC 的放疗抵抗, 可能是 ESCC 患者放疗抵抗和预后不良的重要生物标志物。

为了进一步研究 LINC01503 在 ESCC 放疗抵抗中发挥重要作用, 本研究构建 ESCC 放疗抵抗细胞株, 并证实 LINC01503 在放疗抵抗细胞中表达

升高,与在人体组织标本中检测到的表达水平一致。而敲减 LINC01503 的表达后,ESCC 放疗抵抗细胞对放疗的敏感度增加,表明 LINC01503 促进 ESCC 放疗抵抗,那么其作用机制如何。MA 等^[13]研究显示敲减 LINC01503 的表达诱导胃癌周期阻滞在 G0/G1 期,促进细胞的凋亡,进而抑制胃癌细胞的增殖能力。研究显示细胞周期进程增加和细胞凋亡受抑制是肿瘤细胞放疗抵抗的重要作用机制,而细胞周期受细胞周期蛋白调控,细胞周期蛋白 cyclinD1 和 CDK4 形成复合物后,促进细胞周期由 G0 期进入 G1 期。在细胞凋亡的调控过程中,Bcl-2 家族凋亡蛋白是调控细胞凋亡的重要途径之一,其家族蛋白成员 Bcl-2 促进细胞凋亡的发生,而 Bax 蛋白抑制细胞凋亡的发生。我们敲减 LINC01503 的表达后,放射诱导放疗抵抗细胞的细胞周期阻滞在 G0/G1 期及细胞发生凋亡,并且细胞周期相关蛋白 cyclinD1, CDK4 及凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达降低,Bax 蛋白表达升高。表明 LINC01503 在 ESCC 中通过调控细胞周期和凋亡发挥放疗抵抗作用。此外,有报道在 ESCC 中转录因子 TP63 通过与 LINC01503 基因座的超级增强剂结合并激活 LINC01503 的转录,以上调 ERK 信号通路促进 ESCC 进展^[4]。以及 LINC01503 激活 MAPK/ERK 信号传导途径促进肝癌细胞增殖,抑制细胞凋亡^[15]。ERK 是调节正常细胞增殖、存活和分化的关键信号通路,在肿瘤信号的刺激作用下,ERK 蛋白发生磷酸化后被激活,导致下游靶基因的激活,以促使肿瘤的恶性进展^[16]。且有研究表明,ERK 在肿瘤放疗抵抗中同样发挥重要作用,可作为抗肿瘤治疗的靶点^[9]。本研究显示干扰 LINC01503 表达后,放疗抵抗 ESCC 细胞中 ERK 的磷酸化水平降低。表明 LINC01503 通过调控 ERK 磷酸化水平促进 ESCC 放疗抵抗。

此外,本研究存在一定的局限性,LINC01503 在 ESCC 组织中高表达,并在 T 分期晚期、临床分期晚期和放疗抵抗 ESCC 组织中的表达上调,但其在不同年龄、性别和肿瘤分化程度 ESCC 患者中的表达水平无差异,这可能局限于纳入标本的数量和地域性所造成。此外,我们研究显示 LINC01503 通过调控 ERK 磷酸化水平促进 ESCC 放疗抵抗,但是 LINC01503 直接作用的分子机制仍需后续深入研究。

综上所述,LINC01503 在 ESCC 中表达上调,并促进 ESCC 放疗抵抗,其可能是通过促进 ERK 信号通路调控细胞周期和细胞凋亡发挥作用,LINC01503 具有作为逆转 ESCC 放疗抵抗靶点的能力,这为 ESCC 的诊治提供了新的思路和理论依据。

参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] CHEN W K, CHEN C A, CHI C W, et al. Moscatilin inhibits growth of human esophageal cancer xenograft and sensitizes cancer cells to radiotherapy[J]. Journal of Clinical Medicine, 2019, 8(2): 187.
- [3] CUI Yongping, CHEN Hongyan, XI Ruibin, et al. Whole-genome sequencing of 508 patients identifies key molecular features associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cell Research, 2020, 30(10): 902-913.
- [4] XIE Jianjun, JIANG Yanyi, JIANG Yuan, et al. Super-enhancer-driven long non-coding RNA LINC01503, regulated by TP63, is Over-Expressed and oncogenic in squamous cell carcinoma[J]. Gastroenterology, 2018, 154(8): 2137-2151, e1.
- [5] PENG Xing, GAO Jinyu, CAI Chunyan, et al. LncRNA LINC01503 aggravates the progression of cervical cancer through sponging miR-342-3p to mediate FXYD3 expression[J]. Bioscience Reports, 2020, 40(6): BSR20193371.
- [6] SHEN Qiming, SUN Yanbin, XU Shun. LINC01503/miR-342-3p facilitates malignancy in non-small-cell lung cancer cells via regulating LASP1[J]. Respiratory Research, 2020, 21(1): 235.
- [7] LI Yao, ZHAI Yan, CHEN Yuxuan. GATA1-induced upregulation of LINC01503 promotes carboplatin resistance in ovarian carcinoma by upregulating PD-L1 via sponging miR-766-5p[J]. Journal of Ovarian Research, 2021, 14(1): 108.
- [8] GUO Jing, TONG Changyong, SHI Jianguang, et al. C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12)/C-X-C motif chemokine receptor 7(CXCR7) regulates epithelial-mesenchymal transition process and promotes the metastasis of esophageal cancer by activating signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway[J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 7425-7438.
- [9] WANG Ming, WANG Liang, HE Xiang, et al. LncRNA CCAT2 promotes radiotherapy resistance for human esophageal carcinoma cells via the miR-145/p70S6K1 and p53 pathway[J]. International Journal of Oncology, 2020, 56(1): 327-336.
- [10] 刘英华, 王玉霞, 卢海英, 等. 急性冠脉综合征患者血清 LncRNA XIST 和 miR-330-3p 水平表达与心脏自主神经功能的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(4): 64-68, 204.
- [11] LIU Yinghua, WANG Yuxia, LU Haiying, et al. Correlation between the expression of serum LncRNA XIST and miR-330-3p levels and cardiac autonomic nerve function in patients with acute coronary syndrome[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(4): 64-68, 204.
- [11] 查文娟, 李晓敏, 铁小伟, 等. LncRNA SBF2-AS1 低表达提高食管鳞癌的放射敏感度[J]. 医学研究杂志, 2021, 50(3): 49-54.

- ZHA Wenjuan, LI Xiaomin, TIE Xiaowei, et al. Low expression of LncRNASBF2 -AS1 increases radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Journal of Medical Research, 2021, 50(3): 49-54.
- [12] WANG H, SHENG Z G, DAI L Z. Long non-coding RNA LINC01503 predicts worse prognosis in glioma and promotes tumorigenesis and progression through activation of Wnt/ β -catenin signaling[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(4): 1600-1609.
- [13] MA Zhonghua, GAO Xiangyu, SHUAI You, et al. EGR1-mediated LINC01503 promotes cell cycle progression and tumorigenesis in gastric cancer[J]. Cell Proliferation, 2021, 54(1): e12922.
- [14] ASSANI G, ZHOU Yunfeng. Effect of modulation of epithelial-mesenchymal transition regulators Snail1 and Snail2 on cancer cell radiosensitivity by targeting of the cell cycle, cell apoptosis and cell migration/invasion[J]. Oncology Letters, 2019, 17(1): 23-30.
- [15] WANG Muru, FANG Dan, DI Muping, et al. Long non-coding RNA LINC01503 promotes the progression of hepatocellular carcinoma via activating MAPK/ERK pathway[J]. International Journal of Medical Sciences, 2020, 17(9): 1224-1234.
- [16] DEGIRMENCI U, WANG Mei, HU Jiancheng. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy[J]. Cells, 2020, 9(1): 198.
- 收稿日期: 2022-09-06
修回日期: 2022-11-30

(上接第17页)

- [5] KAMEDA M, OTSUKA M, CHIBA H, et al. CXCL9, CXCL10 and CXCL11 biomarkers of pulmonary inflammation associated with autoimmunity in patients with collagen vascular diseases-associated interstitial lung disease and interstitial pneumonia with autoimmune features[J]. PLoS One, 2020, 15(11): e0241719.
- [6] KOPER O M, KAMIŃSKA J, SAWICKI K, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11, and their receptor (CXCR3) in neuroinflammation and neurodegeneration[J]. Advances in Clinical and Experimental Medicine, 2018, 27(6): 849-856.
- [7] KARIN N. CXCR3 ligands in cancer and autoimmunity, chemoattraction of effector T cells, and beyond[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 976.
- [8] LU Huili, LIU Hongyu, WANG Jiaxian, et al. The chemokine CXCL9 exacerbates chemotherapy-induced acute intestinal damage through inhibition of mucosal restitution[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2015, 141(6): 983-992.
- [9] ZHAO Qihong, KIM T, PANG Jian, et al. A novel function of CXCL10 in mediating monocyte production of proinflammatory cytokines[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2017, 102(5): 1271-1280.
- [10] NAJJAR I, FAGARD R. STAT1 and pathogens, not a friendly relationship[J]. Biochimie, 2010, 92(5): 425-444.
- [11] AU K K, LE PAGE C, REN Runhan, et al. STAT1-associated intratumoural TH1 immunity predicts chemotherapy resistance in high-grade serous ovarian cancer[J]. The Journal of Pathology Clinical Research, 2016, 2(4): 259-270.
- [12] ZHANG Fan, MEARS J R, SHAKIB L, et al. IFN- γ and TNF- α drive a CXCL10⁺ CCL2⁺ macrophage phenotype expanded in severe COVID-19 lungs and inflammatory diseases with tissue inflammation[J]. Genome Medicine, 2021, 13(1): 64.
- [13] SUZUKI T, MARUYAMA J, COOK R, et al. Auditory function analysis in immunodeficient STAT1 knock-out mice: Considerations for viral infection models[J]. Neuroscience Letters, 2021, 740: 135427.
- [14] TOLOMEO M, CAVALLI A, CASCIO A. STAT1 and its crucial role in the control of viral infections [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(8):4095.
- [15] SAYOC-BECERRA A, KRISHNAN M, FAN Shujun, et al. The JAK-inhibitor tofacitinib rescues human intestinal epithelial cells and colonoids from Cytokine-induced barrier dysfunction[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2020, 26(3): 407-422.
- [16] KANG Yuhui, BISWAS A, FIELD M, et al. STAT1 signaling shields T cells from NK cell-mediated cytotoxicity[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 912.
- [17] DOLASIA K, BISHT M K, PRADHAN G, et al. TLRs/ NLRs: shaping the landscape of host immunity[J]. International Reviews of Immunology, 2018, 37(1): 3-19.
- [18] EL-ASMI F, MCMANUS F P, BRANTIS-DE-CARVALHO C E, et al. Cross-talk between SUMOylation and ISGylation in response to interferon[J]. Cytokine, 2020, 129: 155025.
- [19] YÁÑEZ D C, ROSS S, CROMPTON T. The IFITM protein family in adaptive immunity[J]. Immunology, 2020, 159(4): 365-372.
- [20] LUO Shuaihanian, WU Ruifang, LI Qianwen, et al. Epigenetic regulation of IFI44L expression in monocytes affects the functions of monocyte-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol Res, 2022, 2022: 4053038.
- [21] ZENG Yong, ZHANG Zhe, CHEN Hongqiang, et al. Comprehensive analysis of immune implication and prognostic value of IFI44L in non-small cell lung cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 798425.
- [22] DEDIEGO M L, MARTINEZ-SOBRIDO L, TOPHAM D J. Novel functions of IFI44L as a feedback regulator of host antiviral responses[J]. Journal of Virology, 2019, 93(21): e01159-19.
- [23] SCHOGGINS J W, WILSON S J, PANIS M, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response[J]. Nature, 2011, 472(7344): 481-485.
- 收稿日期: 2022-12-14
修回日期: 2023-01-10