

LncRNA CCAT1 调节 miR-155 表达增强 CD8⁺T 细胞对食管癌抗肿瘤活性的机制研究

周立远, 叶玉祥, 林琳, 王东阳

(中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院仓山区普通胸泌外科, 福州 350002)

摘要: **目的** 研究长链非编码 RNA 结肠癌相关转录本 1(long non-coding RNA colon cancer-associated transcript-1, LncRNA CCAT1) 对 CD8⁺T 细胞抗食管癌肿瘤活性的影响及其作用机制。**方法** 分离食管癌患者和健康受试者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 用 qRT-PCR 法分别检测 PBMC 中 CCAT1 和 miR-155 的表达。分别下调 CCAT1 和 miR-155 表达, 采用流式细胞术检测 CD8⁺T 细胞凋亡率, Western blot 检测 Cleaved Caspase 3 蛋白表达, qRT-PCR 检测 IL-2 mRNA 和 IFN- γ mRNA 基因表达, 分析 CD8⁺T 细胞对食管癌细胞的杀伤作用。采用 miRanda 和双荧光素酶实验研究 CCAT1 与 miR-155 之间的相互作用。分析上调 LncRNA CCAT1 靶向 miR-155 对 CD8⁺T 细胞凋亡率、杀伤作用及其 Eca-109 细胞增殖和迁移的影响。**结果** 食管癌患者 PBMCs 中 CCAT1 表达 (2.58 ± 0.28) 高于健康受试者 (1.35 ± 0.34), miR-155 表达 (0.53 ± 0.09) 低于健康受试者 (1.54 ± 0.29), 差异具有统计学意义 ($t=12.04, 21.05$, 均 $P<0.05$)。下调 CCAT1 后, CD8⁺T 细胞凋亡率 ($12.05\% \pm 0.28\%$) 明显低于 si-control 组 (19.86 ± 0.45)%, CD8⁺T 细胞的细胞杀伤活性 (0.49 ± 0.05)% 明显高于 si-control 组 ($0.34\% \pm 0.02\%$), 差异具有统计学意义 ($t=9.82, -17.54$, 均 $P<0.05$)。si-CCAT1 组细胞内 Cleaved Caspase 3 蛋白表达 (0.32 ± 0.09) 低于 si-control 组 (1.37 ± 0.72), IL-2 mRNA (2.38 ± 0.47) 和 IFN- γ mRNA (3.28 ± 0.26) 表达高于 si-control 组 ($1.12 \pm 0.23, 1.28 \pm 0.37$), 差异具有统计学意义 ($t=-20.05, -18.29, -19.86$, 均 $P<0.05$)。CCAT1 和 miR-155 之间存在互补碱基对, 双荧光素酶实验结果显示 CCAT1 野生型和 miR-155 模拟物共转染后 miR-155 mimics 组细胞荧光素酶活性 (0.41 ± 0.08) 显著低于对照组 (1.24 ± 0.18), 差异具有统计学意义 ($t=17.92, P<0.01$)。下调 miR-155 后 CD8⁺T 细胞凋亡率 ($24.87\% \pm 0.95\%$) 明显高于 inhibitor control 组 ($18.24\% \pm 1.25\%$), CD8⁺T 细胞的细胞杀伤活性 ($0.26\% \pm 0.06\%$) 明显低于 inhibitor control 组 ($0.43\% \pm 0.05\%$), 差异具有统计学意义 ($t=10.03, 20.06$, 均 $P<0.05$)。miR-155 inhibitor 组细胞内 Cleaved Caspase 3 蛋白表达 (1.07 ± 0.23) 高于 inhibitor control 组 (0.42 ± 0.02), IL-2 mRNA (0.73 ± 0.26) 和 IFN- γ mRNA (0.54 ± 0.18) 表达低于 inhibitor control 组 ($1.39 \pm 0.08, 1.16 \pm 0.24$), 差异具有统计学意义 ($t=18.75, 19.27, 18.35$, 均 $P<0.01$)。上调 CCAT1 通过 miR-155 促进 CD8⁺T 细胞凋亡并降低细胞杀伤活性, 且促进了 Eca-109 细胞增殖和迁移。**结论** LncRNA CCAT1 在食管癌患者中表达显著上调, 敲低 CCAT1 通过调节 miR-155 表达可抑制 CD8⁺T 细胞凋亡, 增强细胞的抗肿瘤活性。

关键词: 长链非编码 RNA 结肠癌相关转录本 1(LncRNA CCAT1); 微小核糖核酸-155 (miR-155); CD8⁺T; 食管癌; 抗肿瘤活性

中图分类号: R735.1; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2023) 03-079-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.03.014

Mechanism of LncRNA CCAT1 Regulating miR-155 Expression and Enhancing Anti-tumor Activity of CD8⁺T Cells Against Esophageal Cancer

ZHOU Li-yuan, YE Yu-xiang, LIN Lin, WANG Dong-yang

(Department of General Thoracic and Urological Surgery, Cangshan Hospital of the Joint Logistics Support Force of the People's Liberation Army of China, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Objective To study the effect of long non-coding RNA colon cancer-associated transcript-1(LncRNA CCAT1) on the activity of CD8⁺T cells against esophageal cancer and its mechanism. **Methods** Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) determination of esophageal cancer patients and healthy subjects were isolated. The expression of CCAT1 and miR-155 in PBMC was detected by qRT-PCR. CCAT1 and miR-155 were down-regulated, respectively. The apoptosis rate of CD8⁺T cells was detected by flow cytometry. Expression of Cleaved Caspase 3 protein was detected by Western blot. The expression of IL-2 mRNA and IFN- γ mRNA gene was detected by qRT-PCR. The killing effect of CD8⁺T cells on esophageal carcinoma

作者简介: 周立远 (1993-), 男, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 肺癌靶向治疗, 恶性肿瘤生物学机制, E-mail: wal121537@126.com。

cells was analyzed. MiRanda and dual luciferase assay were used to study the interaction between CCAT1 and miR-155. The effect of upregulation of LncRNA CCAT1 targeting miR-155 on apoptosis rate of CD8⁺T cells, killing effect and proliferation and migration of Eca-109 cells was analyzed. **Results** The expression of CCAT1 (2.58 ± 0.28) in PBMCs cells of patients with esophageal cancer was higher than that of healthy subjects (1.35 ± 0.34), and the expression of miR-155 (0.53 ± 0.09) was lower than that of healthy subjects (1.54 ± 0.29), the difference was statistically significant ($t=12.04, 21.05$, all $P<0.05$). The apoptosis rate of CD8⁺T cells was significantly lower than that of si-control group ($12.05\% \pm 0.28\%$ vs $19.86\% \pm 0.45\%$) after CCAT1 downregulation, and the cytotoxic activity of CD8⁺T cells was significantly higher than that of si-control group ($0.49\% \pm 0.05\%$ vs $0.34\% \pm 0.02\%$), the differences were statistically significant ($t=9.82, -17.54$, all $P<0.05$). Cleaved Caspase 3 (0.32 ± 0.09) protein expression in si-CCAT1 group was lower than that in si-control group (1.37 ± 0.72), and IL-2 mRNA (2.38 ± 0.47) and IFN- γ mRNA (3.28 ± 0.26) expression were higher than that in si-control group ($1.12 \pm 0.23, 1.28 \pm 0.37$), the differences were statistically significant ($t=-20.02, -18.29, -19.86$, all $P<0.05$). There were complementary base pairs between CCAT1 and miR-155. The results of double luciferase experiment showed that the luciferase activity of miR-155 mimics group (0.41 ± 0.08) was significantly lower than that of control group (1.24 ± 0.18) after co-transfection of CCAT1 wild type and miR-155 mimics, the differences were statistically significant ($t=17.92, P<0.01$). The apoptosis rate of CD8⁺T cells after downregulation of miR-155 ($24.87\% \pm 0.95\%$) was significantly higher than that of inhibitor control group ($18.24\% \pm 1.25\%$), the cytotoxic activity of CD8⁺T cells ($0.26\% \pm 0.06\%$) was significantly lower than that of inhibitor control group ($0.43\% \pm 0.05\%$), and the differences were statistically significant ($t=10.03, 20.06$, all $P<0.05$). Intracellular Cleaved Caspase 3 protein (1.07 ± 0.23) expression was higher in miR-155 inhibitor group than in inhibitor control group (0.42 ± 0.02), the expressions of IL-2 mRNA (0.73 ± 0.26) and IFN- γ mRNA (0.54 ± 0.18) were lower than those of inhibitor control group ($1.39 \pm 0.08, 1.16 \pm 0.24$), and the differences were statistically significant ($t=18.75, 19.27, 18.35$, all $P<0.01$). Up-regulation of CCAT1 promoted apoptosis of CD8⁺T cells and decreased cytotoxic activity through miR-155, and promoted proliferation and migration of Eca-109 cells. **Conclusion** LncRNA CCAT1 expression was significantly up-regulated in patients with esophageal cancer. Knockdown of CCAT1 inhibited apoptosis of CD8⁺T cells and enhanced the antitumor activity of the cells by regulating miR-155 pathway.

Keywords: long non-coding RNA colon cancer-associated transcript-1(LncRNA CCAT1); micro RNA(miR-155); CD8⁺T; esophageal cancer; antitumor activity

食管癌位居癌症死亡第六位, 大多患者发现时已出现淋巴结转移, 其行手术切除患者术后复发率较高, 五年生存率仅为 5% ~ 15%^[1-2]。因此, 研究食管癌发生发展的分子机制, 寻找有效的分子靶标对食管癌的治疗具有重要意义。研究报道, 肿瘤微环境中免疫状态失衡会限制 T 细胞的抗肿瘤活性, 促进肿瘤进展^[3]。CD8⁺T 细胞是重要的 T 淋巴细胞亚群, 研究证实其与肿瘤细胞免疫及抗肿瘤效应相关, 由效应体 CD8⁺T 细胞介导的肿瘤相关抗原识别和细胞毒性杀伤在控制癌症发展中发挥重要作用^[4]。CD8⁺T 细胞凋亡通常可导致肿瘤微环境中细胞数量减少, 抑制肿瘤活性降低, 与癌症进展有关^[5]。研究发现, 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNAs) 广泛参与肿瘤微环境的各种免疫应答过程, 同时还可募集多种免疫抑制因子, 影响肿瘤微环境, 促进肿瘤细胞免疫逃逸^[6]。肿瘤细胞来源的 miRNAs 可通过多种途径参与调控免疫抑制性微环境的形成^[7]。结肠癌相关转录本 1(colon cancer-associated transcript-1, CCAT1) 是近年研究发现与多种癌症的发生发展及肿瘤细胞免疫逃逸有关的 LncRNA^[8]。miR-155 不仅是重要的肿瘤基因, 还是免疫系统和 T 淋巴细胞功能的调节因子^[9], 其通过

增强 CD8⁺T 细胞对稳态细胞因子的响应, 可增强其抗肿瘤活性^[10]。基于此, 本研究探究了食管癌中 LncRNA CCAT1 和 miR-155 对 CD8⁺T 细胞凋亡和抗肿瘤活性的影响及分子机制, 以期对食管癌的研究及免疫治疗提供更多参考。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集 2021 年 12 月 ~ 2022 年 12 月于中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院仓山区院区胸外科就诊的食管癌患者 ($n=30$) 和健康受试者 ($n=30$) 外周血。食管癌患者经病理学确诊, 研究前未接受任何放化疗治疗, 经过患者知情同意, 无其它肿瘤疾病史。本研究经过本院伦理委员会批准。人食管癌细胞 (Eca-109 细胞) 来自中国科学院上海细胞库, 在含 10 mmol/ml FBS 的 DMEM 培养基中进行培养。

1.2 仪器与试剂 Lipofectamine2000 (美国 Invitrogen 公司); RIPA 缓冲液 (中国 Beyotime); SuperScript 逆转录试剂盒 (美国 Invitrogen); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 Sigma); 7500 Fast RT-PCR System 仪, SYBR Green Master Mix (美国 Applied Biosystems); 流式细胞仪 (BD Biosciences 公司); 靶向 CCAT1 (si-CCAT1)

或其阴性对照 (si-control) 的小干扰 RNA, miR-155 模拟物和抑制剂 (中国上海 GenePharma 有限公司); 增强化学发光系统 (Thermo Fisher); 磁性珠细胞分选阴性选择试剂盒 (Miltenyi Biotech 公司)。

1.3 方法

1.3.1 收集外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC): 采集研究对象新鲜外周血标本 2 ml, 加入 Ficoll-Paque, 密度梯度离心, 2 500 r/min, 15 min 后弃上清, 收集 PBMCs, 以检测食管癌患者和健康受试者 PBMCs 中相关蛋白及 mRNA 表达。

1.3.2 食管癌患者和健康受试者 PBMCs 中 Cleaved Caspase 3 蛋白检测: 用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液对食管癌患者和健康受试者 PBMCs 进行 Western blot 处理, 离心获得含 Cleaved Caspase 3 的蛋白处理液。使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度, 用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, 蛋白在室温下被封闭过夜, 与特异性 Cleaved Caspase 3- 抗孵育过夜, PVDF 膜用常规 TBST 溶液洗涤, 室温下与辣根过氧化物酶结合的二抗孵育 2h。使用增强化学发光系统对膜进行可视化分析, 以比较食管癌患者和健康受试者 PBMCs 中 Cleaved Caspase 3 蛋白的表达差异。

1.3.3 食管癌患者和健康受试者 PBMCs 中 CCAT1 mRNA, miR-155 mRNA, IL-2 mRNA 和 IFN- γ mRNA 检测: 使用 RNA 提取试剂盒从 PBMCs 中提取总 RNA, 用分光光度法检测其浓度和纯度; 使用 SuperScript 逆转录试剂盒进行 cDNA 合成逆反应, 使用 SYBR Green Master Mix 在 7500 Fast RT-PCR 仪上进行 RT-qPCR 检测。由生工生物技术 (中国上海) 完成特定基因的寡核苷酸引物的设计和合成, 见表 1。反应体系为 20 μ l: 2xSYBR Green Master Mix 10 μ l, 上、下引物各 0.5 μ l, 模板 1 μ l, H₂O 8 μ l。分析 Ct 值, 并使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算相对定量, 对比食管癌患者和健康受试者 PBMCs 中 CCAT1 mRNA, miR-155, IL-2 mRNA 和 IFN- γ mRNA 表达差异。

1.3.4 CD8⁺T 细胞分离、培养和转染分组: 使用磁性珠细胞分选阴性选择试剂盒从两名健康供者的 PBMCs 中分离出 CD8⁺T 细胞, 用 anti-CD3 (2 μ g/ml, BD Biosciences) 和 anti-CD28 (1 μ g/ml, BD Biosciences) 在添加了重组人白细胞介素 -2 (recombinant human interleukin-2, rhIL-2) (120 IU/ml, Chiron) 的 RPMI-1640 培养液中激活 24 h。细胞分为三组: 第一组分别转染: ①下调 CCAT1 的 siRNA 序列 (si-CCAT1 组); ②下调阴性对照序列 (si-control 组)。第二组分别转染: ① miR-155

抑制物 (miR-155 inhibitor 组); ②抑制阴性对照 (inhibitor control 组)。第三组分别转染: ①过表达对照质粒 (pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组); ② CCAT1 过表达质粒 +miR-155 过表达阴性对照 (pcDNA-CCAT1+mimics NC 组); ③ CCAT1 过表达对照质粒 +miR-155 过表达模拟物 [pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组]; ④ CCAT1 过表达质粒和 miR-155 过表达模拟物 (pcDNA-CCAT1+miR-155 mimics 组)。使用 Lipofectamine 2000 按照说明书将以上质粒转染到 CD8⁺T 细胞中, 用于分析 CD8⁺T 细胞凋亡率, CD8⁺T 细胞杀伤活性, Eca-109 细胞增殖活力, Eca-109 细胞划痕愈合率, Cleaved Caspase 3 蛋白及 IFN- γ 和 IL-2 表达。

表 1 PBMCs 中 CCAT1 mRNA, miR-155 mRNA, IL-2 mRNA 和 IFN- γ mRNA 引物序列

类别		引物序列
CCAT1	F:	5'-CATTGGGAAAGGTGCCGAGA-3'
	R:	5'-ACGCTTAGCCATACAGAGCC-3'
miR-155	F:	5'-TGCCTCCAACCTGACTCCTAC-3'
	R:	5'-GCCAGCACAGAATAATACGAG-3'
GAPDH	F:	5'-AGGAGCGAGATCCCGCCAACA-3'
	R:	5'-CGGCCCTCAGCCACATCTT-3'
U6	F:	5'-CATTG-GGAAAGGTGCCGAGA-3'
	R:	5'-CATTG-GGAAAGGTGCCGAGA-3'
IL-2	F:	5'-TCTTGTCTTGCATTGCACTAAG-3'
	R:	5'-GCTTGAGGTTCTCGGGATT-3'
IFN- γ	F:	5'-CAGAGCCAAATTGTCTCC-3'
	R:	5'-TTCTCAGAGCTGTCGGTCAA-3'

1.3.5 下调 CCAT1, miR-155 表达对 CD8⁺T 细胞凋亡的影响: 使用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒检测 CD8⁺T 细胞凋亡, 然后行流式细胞仪分析。将上述不同质料转染的 CD8⁺T 细胞 (1 \times 10⁶/孔) 分别接种于 6 孔板, 用 200 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI 染色, 用流式细胞仪和 flow Jo V10 软件进行流式细胞分析, 比较下调 CCAT1 和 miR-155 表达对 CD8⁺T 细胞凋亡的影响。

1.3.6 CCAT1, miR-155 质粒转染 CD8⁺T 细胞对 Eca-109 细胞的杀伤作用: 细胞杀伤实验以 Eca-109 细胞为靶细胞。转染① si-CCAT1, si-control; ② inhibitor control, miR-155 inhibitor; ③ pcDNA-3.1(+)+mimics NC, pcDNA-CCAT1+mimics NC, pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics, pcDNA-CCAT1+miR-155 mimics 后的 CD8⁺T 细胞与 Eca-109 细胞混合在 96 孔培养板中孵育过夜。避光后每孔细胞分别加入 20 μ l MTS, 2h 后在酶标仪 490

nm下检测细胞的吸光度(A 值),重复三次。杀伤率(%)=[$A_{\text{靶细胞对照}} - (A_{\text{实验孔}} - A_{\text{效应细胞对照}})$]/ $A_{\text{靶细胞对照}} \times 100\%$ 。分析CCAT1和miR-155质粒转染CD8⁺T细胞对Eca-109细胞的杀伤作用。

1.3.7 CCAT1野生型、突变型对miR-155的调节作用:miRcode软件预测CCAT1靶基因,将CCAT1序列插入到psi-CHECKTM-2载体下游,构建CCAT1 wt表达载体,再利用点突变试剂盒构建CCAT1 mut表达载体。将CCAT1 wt+mimics NC, CCAT1 wt+miR-155 mimics, CCAT1 mut+mimics NC, CCAT1 mut+miR-155 mimics分别转染至Eca-109细胞中,48h后采用双荧光素酶试验分别检测相应Eca-109细胞荧光素酶活性,以了解CCAT1野生型、突变型对miR-155的调节作用。

1.3.8 CCAT1与miR-155质粒共转染对Eca-109细胞增殖活力的影响:采用CCK-8法检测Eca-109细胞的增殖活力。取对数生长期Eca-109细胞转染成功后以 5×10^5 细胞/孔的密度接种于96孔板,如前所述将70%汇合的细胞转染重组质粒,48h后在细胞中加入CCK-8溶液,孵育4h后应用酶标仪在450 nm处测量每个孔的 A 值,分析CCAT1与miR-155共同作用对Eca-109细胞增殖活力的影响。

1.3.9 CCAT1与miR-155质粒共转染对Eca-109细胞迁移的影响:采用细胞划痕实验检测Eca-109细胞迁移能力。取对数生长期Eca-109细胞转染成功后以 5×10^5 细胞/孔的密度接种于6孔板,在37℃,5%(v/v)CO₂培养箱中培养48h,用无菌吸管刮单层细胞中心,用PBS冲洗2次,形成宽度恒定的直线无细胞区(间隙),37℃,5%(v/v)CO₂放置0h和48h,采用倒置显微镜观察创面闭合情况并拍照,图像采用ImageJ软件进行分析。在显微镜视野中随机采集6个部位,测量间隙之间的距离,并计算细胞划痕愈合率,分析CCAT1与miR-155共同作用对Eca-109细胞迁移的影响。

1.4 统计学分析 使用GraphPad Prism7.0进行分析,符合正态分布的数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异比较采用 t 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析,LSD检验行多组间两两差异比较;不符合正态分布采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

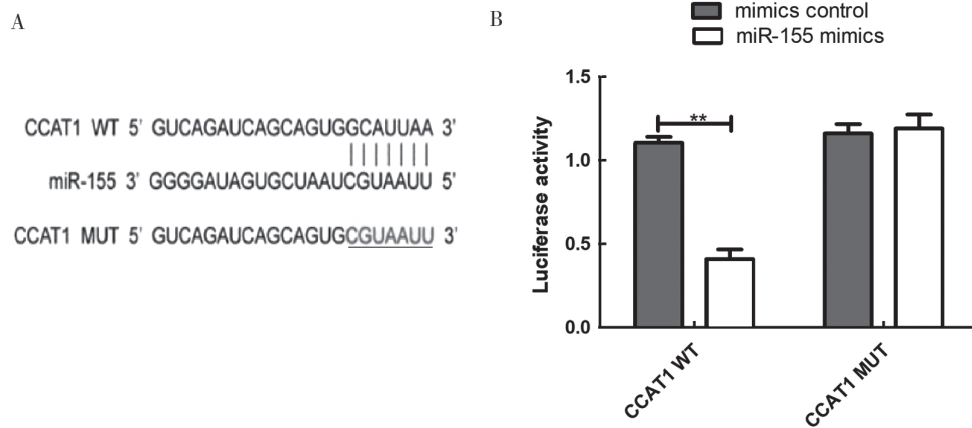
2 结果

2.1 CCAT1及miR155在食管癌患者外周血细胞中的差异表达 qRT-PCR检测结果表明:食管癌患者PBMCs中CCAT1表达(2.58 ± 0.28)高于健康受试者(1.35 ± 0.34),miR-155表达(0.53 ± 0.09)低于健康受试者(1.54 ± 0.29),组间比较差异具有统计学意义($t=12.04, 21.05$,均 $P < 0.05$)。

2.2 下调CCAT1对CD8⁺T细胞凋亡、细胞杀伤活性及Cleaved Caspase 3蛋白及IL-2 mRNA, IFN- γ mRNA表达的影响 qRT-PCR结果显示,si-CCAT1组细胞内CCAT1 mRNA(0.47 ± 0.08)表达明显低于si-control组(1.17 ± 0.27),差异具有统计学意义($t=23.12, P < 0.05$),提示下调CCAT1表达细胞系构建成功。流式细胞术检测显示:下调CCAT1后CD8⁺T细胞凋亡率($12.05\% \pm 0.28\%$)明显低于si-control组($19.86\% \pm 0.45\%$),CD8⁺T细胞($0.49\% \pm 0.05\%$)的细胞杀伤活性明显高于si-control组($0.34\% \pm 0.02\%$),差异具有统计学意义($t=9.82, -17.54$,均 $P < 0.05$)。Western blot和qRT-PCR检测结果显示,si-CCAT1组细胞内Cleaved Caspase 3蛋白(0.32 ± 0.09)表达低于si-control组(1.37 ± 0.72),IL-2 mRNA(2.38 ± 0.47)和IFN- γ mRNA(3.28 ± 0.26)表达高于si-control组($1.12 \pm 0.23, 1.28 \pm 0.37$),差异具有统计学意义($t=-20.05, -18.29, -19.86$,均 $P < 0.05$)。

2.3 CCAT1野生型、突变型对miR-155的调节作用 见图1。生物信息学分析显示,CCAT1和miR-155之间存在互补碱基对(图1A)。双荧光素酶实验检测CCAT1与miR-155的相互作用,结果显示:CCAT1野生型和miR-155模拟物共转染后miR-155 mimics组细胞荧光素酶活性(0.41 ± 0.08)显著低于对照组(1.24 ± 0.18),差异具有统计学意义($t=17.92, P < 0.01$,图1B),而CCAT1突变型和miR-155模拟物共转染后荧光素酶活性与对照组比较无明显差异。

2.4 下调miR155对CD8⁺T细胞凋亡、细胞杀伤活性、Cleaved Caspase 3蛋白、IL-2 mRNA与IFN- γ mRNA表达的影响 见表1。qRT-PCR结果显示,miR-155 inhibitor组细胞内miR-155 mRNA(0.73 ± 0.18)表达明显低于inhibitor control组(1.52 ± 0.17),差异具有统计学意义($t=19.25, P < 0.05$),提示下调miR-155表达细胞系构建成功。流式细胞术检测显示:下调miR-155后CD8⁺T(24.87%±0.95%)细胞凋亡率明显高于inhibitor control组(18.24%±1.25%),CD8⁺T细胞(0.26%±0.06%)的细胞杀伤活性明显低于inhibitor control组(0.43%±0.05%),差异具有统计学意义($t=10.03, 20.06$,均 $P < 0.01$)。Western blot和qRT-PCR检测结果显示,miR-155 inhibitor组细胞内Cleaved Caspase 3蛋白(1.07 ± 0.23)表达高于inhibitor control组(0.42 ± 0.02),IL-2 mRNA(0.73 ± 0.26)和IFN- γ mRNA(0.54 ± 0.18)表达低于inhibitor control组($1.39 \pm 0.08, 1.16 \pm 0.24$),差异均具有统计学意义($t=18.75, 19.27, 18.35$,均 $P < 0.01$)。



A. CCAT1 与 miR-155 之间的互补碱基对预测; B. 荧光素酶活性测定

图1 CCAT1 与 miR-155 的相互作用

2.5 CCAT1 与 miR155 共作用对 CD8⁺T 细胞凋亡、细胞杀伤活性及 Cleaved Caspase 3 蛋白和 IL-2 mRNA, IFN- γ mRNA 表达的影响 见表1。流式细胞术检测显示: pcDNA-CCAT1+mimics NC 组 CD8⁺T 细胞凋亡率明显高于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组 CD8⁺T 细胞凋亡率明显低于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, pcDNA-CCAT1+miR-155 mimics 组 CD8⁺T 细胞凋亡率明显高于 pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组; pcDNA-CCAT1+mimics NC 组 CD8⁺T 细胞的细胞杀伤活性明显低于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组 CD8⁺T 细胞的细胞杀伤活性明显高于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, pcDNA-CCAT1+miR-155 mimics 组 CD8⁺T 细胞的细胞杀伤活性明显低于 pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.01$)。

表1 CCAT1 与 miR-155 共同作用对 CD8⁺T 细胞凋亡、细胞杀伤活性及 Cleaved Caspase 3 蛋白和 IL-2 mRNA, IFN- γ mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

类别	pcDNA-3.1(+)+ mimics NC 组	pcDNA-CCAT1+ mimics NC 组	pcDNA-3.1(+)+ miR-155 mimics 组	pcDNA-CCAT1+ miR-155 mimics 组	F	P
CD8 ⁺ T 细胞凋亡率 (%)	17.86 \pm 2.34	25.87 \pm 1.23	6.58 \pm 0.15	16.87 \pm 1.92	17.98	<0.01
CD8 ⁺ T 细胞的细胞杀伤活性 (%)	0.45 \pm 0.07	0.35 \pm 0.07	0.82 \pm 0.08	0.58 \pm 0.07	21.37	<0.01
Cleaved Caspase 3 蛋白表达	0.86 \pm 0.15	1.47 \pm 0.12	0.23 \pm 0.06	1.02 \pm 0.18	19.65	<0.01
IL-2 mRNA 表达	1.56 \pm 0.16	0.53 \pm 0.35	2.68 \pm 0.14	1.43 \pm 0.08	20.48	<0.01
IFN- γ mRNA 表达	1.52 \pm 0.29	0.68 \pm 0.32	2.37 \pm 0.48	1.32 \pm 0.43	17.98	<0.01

2.6 CCAT1 与 miR155 共同作用对 Eca109 细胞增殖和迁移的影响 CCK-8 法和细胞划痕愈合实验检测显示: pcDNA-CCAT1+mimics NC 组细胞增殖活力和细胞划痕愈合率明显高于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组 (80.30% \pm 1.98% vs 58.29% \pm 2.18%, 75.26% \pm 1.36% vs 52.43% \pm 1.48%)。pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组细胞增殖活力和细胞划痕愈合率明显低于

Western blot 结果显示, pcDNA-CCAT1+mimics NC 组 Cleaved Caspase 3 蛋白表达明显高于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组 Cleaved Caspase 3 蛋白表达明显低于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, pcDNA-CCAT1+miR-155 mimics 组 Cleaved Caspase 3 蛋白表达明显高于 pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.01$)。qRT-PCR 检测显示, pcDNA-CCAT1+mimics NC 组 IL-2 和 IFN- γ mRNA 表达明显低于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组 IL-2 和 IFN- γ mRNA 表达明显高于 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, pcDNA-CCAT1+miR-155 mimics 组 IL-2 和 IFN- γ mRNA 表达明显低于 pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$)。

pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组, pcDNA-CCAT1+miR-155 mimics 组细胞增殖活力和细胞划痕愈合率明显高于 pcDNA-3.1(+)+miR-155 mimics 组 (57.92% \pm 3.24% vs 37.54% \pm 1.23%, 50.29% \pm 1.68% vs 31.92% \pm 1.02%), 差异具有统计学意义 ($F=19.86, 20.26$, 均 $P<0.01$)。

3 讨论

近年研究发现, LncRNA CCAT1 具有诱导上皮-

间充质细胞转化和调节细胞生长、侵袭和迁移的作用,被认为是一种普遍的肿瘤启动子^[11-13]。本研究初步强调了CCAT1对免疫细胞抗肿瘤功能的影响,发现抑制CCAT1可通过调节miR-155表达抑制CD8⁺T细胞凋亡并增强细胞的抗肿瘤活性,这些发现为食管癌治疗提供了一个有效的治疗靶点,并为提高免疫治疗的结果提供了新的见解。

大量证据表明,LncRNAs在各种癌症中普遍存在异常表达,参与了癌症的发生进展,这意味着LncRNAs可能成为一种新的潜在的癌症生物标志物^[14]。此外最新研究表明,LncRNAs可以作为ceRNA,通过与miRNA竞争性结合,可调控基因转录^[4]。在数百种LncRNAs中,CCAT1在细胞周期调控中发挥作用,通过调控肿瘤细胞凋亡,参与调控肿瘤的恶性发展进程。现有研究表明,LncRNA CCAT1在多种人类癌症中表达上调,作为致癌基因存在,如HU等^[15]发现,LncRNA CCAT1/miR-143/PLK1/BUBR1轴是食管癌增殖和耐药的生物标志物。LÜ等^[16]人也曾指出,LncRNA CCAT1通过抑制miR-33a表达促进了黑色素瘤细胞的增殖和侵袭。以上研究均表明LncRNA CCAT1在肿瘤发展过程中发挥了至关重要的作用。此外研究证实,LncRNAs与肿瘤细胞免疫逃逸有关^[17]。然而,CCAT1在食管癌发生发展中的作用以及是否和食管癌免疫逃逸之间存在关系尚未被研究报道。

本研究首先检测了食管癌患者与健康受试者PBMCs细胞中CCAT1的表达,结果发现食管癌患者PBMCs中CCAT1表达显著上调,提示CCAT1的异常表达可能与食管癌的进展有关系。进一步探究发现,下调CCAT1表达增强了CD8⁺T细胞的抗肿瘤功能,提示CCAT1具有诱导食管癌细胞免疫逃逸的能力。鉴于CD8⁺T细胞在控制癌症发展中的普遍作用,CCAT1可能与许多其他癌症免疫反应有关,在免疫治疗中作为免疫检查点具有广阔的前景,因此深入研究CCAT1的作用机制具有重要意义。研究发现,CCAT1通过作用不同的靶点参与了肿瘤的发展,如LncRNA CCAT1负向调控miR-181a-5p促进子宫内膜癌细胞增殖和迁移^[18]。LncRNA CCAT1通过抑制miR-218/ZFX信号通路促进三阴性乳腺癌进展^[19]。LncRNA CCAT1通过与DDX5和MIR-28-5P相互作用促进了前列腺癌细胞的增殖^[20]。而本研究经生物信息学方法分析发现,miR-155是CCAT1的下游作用靶点,两者之间存在互补碱基对;双荧光素酶实验证实了CCAT1与miR-155的相互作用。有证据表明,miR-155与乳腺癌、直肠癌、肝癌、肺癌和膀胱癌的发生有关^[8, 21-22]。miR-155通过靶向H3F3A激活CDK2加

速人肝癌细胞的生长^[23]。除了参与癌症,miR-155还是免疫系统和T淋巴细胞功能的调节因子^[9]。陈倩云等^[10,24]研究报道,miR-155通过增强CD8⁺T细胞对稳态细胞因子的响应增强其抗肿瘤活性。而本研究证实了食管癌患者PBMCs细胞中miR-155表达下调,下调miR-155表达诱导了CD8⁺T细胞凋亡,抑制了CD8⁺T细胞的抗肿瘤功能,进一步表明其在食管癌中的抗肿瘤作用。本实验从新的角度揭示了CCAT1与食管癌细胞免疫逃逸之间的关系,为防控食管癌进展提供了理论基础,然而本文也存在一定的局限之处,如本文未进行裸鼠成瘤实验检测CCAT1的临床效果,CCAT1调控miR-155的具体作用机制还需要进一步深入探讨。

综上所述,LncRNA CCAT1在食管癌患者中表达显著上调,敲低CCAT1通过调节miR-155表达抑制CD8⁺T细胞凋亡并增强细胞的抗肿瘤活性,为食管癌发病机制的复杂调控网络提供了新的思路和借鉴。

参考文献:

- [1] 尹周一,王梦圆,游伟程,等. 2022美国癌症统计报告解读及中美癌症流行情况对比[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2022, 8(2): 54-63.
YIN Zhouyi, WANG Mengyuan, YOU Weicheng, et al. Interpretation on the report of American Cancer Statistics, 2022 and comparison of cancer prevalence in China and America[J]. Journal of Multidisciplinary Cancer Management(Electronic Version), 2022, 8(2): 54-63.
- [2] 邹小农,贾漫漫,王鑫,等.《2020全球癌症报告》要点解读[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2021, 28(1): 11-18.
ZOU Xiaonong, JIA Manman, WANG Xin, et al. Interpretation of the World Cancer Report 2020[J]. Chinese Journal of Clinical Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2021, 28(1): 11-18.
- [3] CHEN Xingyu, CHEN Haotian, YAO Honghui, et al. Turning up the heat on non-immunoreactive tumors: pyroptosis influences the tumor immune microenvironment in bladder cancer[J]. Oncogene, 2021, 40(45): 6381-6393.
- [4] 张思佳,徐彩娜,陈杰,等. 通过调控肿瘤代谢增强T细胞抗肿瘤活性[J]. 应用化学, 2020, 37(9): 977-984.
ZHANG Sijia, XU Caina, CHEN Jie, et al. Enhancing T cell antitumor activity by regulating tumor metabolism[J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 2020, 37(9): 977-984.
- [5] 黄柱华,苏文,韩正全,等. 非小细胞肺癌患者的肿瘤转移与肿瘤浸润的CD8⁺T细胞数量负相关[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(3): 266-270.

- HUANG Zhuhua, SU Wen, HAN Zhengquan, et al. Tumor metastasis in patients with non-small cell lung cancer is inversely correlated with the number of tumor-infiltrating CD8⁺T cells[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2019, 35(3): 266-270.
- [6] 李翠霞, 苏秀兰. 长链非编码 RNA (LncRNAs) 参与肿瘤细胞免疫逃逸的研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(9): 817-822.
- LI Cuixia, SU Xiulan. Research progress of long-chain non-coding RNAs (LncRNAs) involved in tumor cell immune escape[J]. Immunological Journal, 2019, 35(9): 817-822.
- [7] ZHANG Zhengjia, HUANG Qingcai, YU Liuchunyang, et al. The role of miRNA in tumor immune escape and miRNA-based therapeutic strategies[J]. Front Immunol, 2021, 12: 807895.
- [8] ZHANG Caixiang, WANG Wenying, LIN Jun, et al. LncRNA CCAT1 promotes bladder cancer cell proliferation, migration and invasion[J]. International Braz J Urol, 2019, 45(3): 549-559.
- [9] 李聪聪, 赵金艳, 吴姣, 等. miR-155 研究进展 [J]. 生物技术通报, 2018, 34(11): 70-82.
- LI Congcong, ZHAO Jinyan, WU Jiao, et al. Research progress on miR-155[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(11): 70-82.
- [10] 陈倩云, 范恒. miR-155 调控 T 细胞分化与功能的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(7): 1065-1069.
- CHEN Qianyun, FAN Heng. Research progress of miR-155 regulation of T cell differentiation and function[J]. Chinese Journal of Immunology, 2016, 32(7): 1065-1069.
- [11] 白盈盈, 朱光旭, 潘兴华. 长链非编码 RNA 对结直肠癌潜在诊断价值的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(1): 161-164.
- BAI Yingying, ZHU Guangxu, PAN Xinghua. Research progress on the potential diagnostic value of long non-coding RNA in colorectal cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(1): 161-164.
- [12] LI J L, LI R, GAO Y, et al. LncRNA CCAT1 promotes the progression of preeclampsia by regulating CDK4[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(5): 1216-1223.
- [13] ZHANG Shouhua, XIAO Juhua, CHAI Yong, et al. LncRNA-CCAT1 promotes migration, invasion, and EMT in intrahepatic cholangiocarcinoma through suppressing miR-152[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2017, 62(11): 3050-3058.
- [14] SUN W, SHEN N M, FU S L. Involvement of LncRNA-mediated signaling pathway in the development of cervical cancer[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(9): 3672-3687.
- [15] HU Min, ZHANG Qi, TIAN Xiaohui, et al. LncRNA CCAT1 is a biomarker for the proliferation and drug resistance of esophageal cancer via the miR-143/PLK1/BUBR1 axis[J]. Molecular Carcinogenesis, 2019, 58(12): 2207-2217.
- [16] LÜLi, JIA Jianqin, CHEN Jin. The LncRNA CCAT1 upregulates proliferation and invasion in melanoma cells via suppressing miR-33a[J]. Oncology Research, 2018, 26(2): 201-208.
- [17] 胡诗芸, 奕天飞, 王家立, 等. 长链非编码 RNA 在肿瘤免疫微环境中的作用 [J]. 生命科学, 2022, 34(2): 212-219.
- HU Shiyun, YI Tianfei, WANG Jiali, et al. Research progress on long non coding RNA in tumor immune microenvironment[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2022, 34(2): 212-219.
- [18] YU Jing, JIANG Lijuan, GAO Yutao, et al. LncRNA CCAT1 negatively regulates miR-181a-5p to promote endometrial carcinoma cell proliferation and migration[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2019, 17(5): 4259-4266.
- [19] HAN Chunyong, LI Xuebiao, FAN Qian, et al. CCAT1 promotes triple-negative breast cancer progression by suppressing miR-218/ZFX signaling[J]. Aging, 2019, 11(14): 4858-4875.
- [20] YOU Zonghao, LIU Chunhui, WANG Can, et al. LncRNA CCAT1 promotes prostate cancer cell proliferation by interacting with DDX5 and miR-28-5P[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2019, 18(12): 2469-2479.
- [21] BAYRAKTAR R, VAN ROOSBROECK K. MiR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics[J]. Cancer Metastasis Reviews, 2018, 37(1): 33-44.
- [22] SHAO Chuchu, YANG Fengming, QIN Zhiqiang, et al. The value of miR-155 as a biomarker for the diagnosis and prognosis of lung cancer: A systematic review with meta-analysis[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 1103.
- [23] XIN Xiaoru, LU Yanan, XIE Sijie, et al. MiR-155 accelerates the growth of human liver cancer cells by activating CDK2 via targeting H3F3A[J]. Molecular Therapy Oncolytics, 2020, 17: 471-483.
- [24] JI Yun, WRZESINSKI C, YU Zhiya, et al. MiR-155 augments CD8⁺ T-cell antitumor activity in lymphoreplete hosts by enhancing responsiveness to homeostatic γ c cytokines[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(2): 476-481.

收稿日期: 2022-09-27

修回日期: 2023-03-21