

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.008

· 临床研究 ·

## linc00941 通过 miR-203/CCL2 轴调控食管鳞状细胞癌细胞增殖、侵袭和糖酵解

乔飞<sup>1</sup>, 李柏钧<sup>2</sup>, 李晓明<sup>1</sup>, 黄国胜<sup>1</sup>, 陈鸿运<sup>1</sup>, 张要盛<sup>3</sup>(1. 南阳医学高等专科学校第一附属医院 胸外二科, 河南南阳 473000; 2. 广西壮族自治区人民医院 胸外科, 广西 南宁 168600; 3. 南阳医学高等专科学校第一附属医院 肿瘤内科, 河南 南阳 473000)

**[摘要]** **目的:** 探究 linc00941 作为 ceRNA 吸附 miR-203 上调 CC-趋化因子配体 2(CC chemokine ligand 2, CCL2) 的表达在食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中的作用机制。**方法:** 选取南阳医学高等专科学校第一附属医院 58 例 ESCC 患者的癌组织和癌旁组织, 其中, 男性患者 33 例, 年龄(49.3±18.6)岁, 女性患者 25 例, 年龄(44.6±20.7)岁。qPCR 法检测 linc00941、miR-203、CCL2 在 ESCC 组织和 4 株人 ESCC 细胞系(EC9706、KYSE30、ECA109 和 TE1)以及人正常食管上皮细胞株 HET-1A 细胞系中的表达。构建 linc00941-wt、linc00941-mut、CCL2-wt、CCL2-mut 质粒并分别与 miR-203 NC 或 miR-203 模拟物共转染到 293T 细胞中。双荧光素酶报告基因实验验证 linc00941、miR-203、CCL2 之间的相互作用。CCK-8 和 Transwell 实验检测细胞的增殖与侵袭能力。乳酸含量检测评价细胞的糖酵解能力。流式细胞术检测细胞的凋亡情况。糖酵解抑制剂 2-DG 以及 linc00941 共同干预 ESCC 细胞, 以进一步观察 linc00941 对 ESCC 细胞的调控作用。**结果:** 在 ESCC 组织中和细胞系中 linc00941、CCL2 表达均上调, miR-203 表达下调(均  $P < 0.05$ )。linc00941 与 miR-203、miR-203 与 CCL2 的相互作用在 ECA109 细胞中得到证实。下调 linc00941 能够抑制 ECA109 细胞的增殖、侵袭和糖酵解, 并诱导细胞凋亡, 该作用被 miR-203 抑制剂部分逆转(均  $P < 0.05$ )。过表达 CCL2 可以部分逆转敲减 linc00941 对 ECA109 细胞增殖、侵袭、糖酵解和凋亡的影响(均  $P < 0.05$ )。**结论:** linc00941 能够吸附 miR-203 而上调 CCL2 的表达, 促进 ESCC 细胞的增殖、侵袭和糖酵解, 诱导细胞凋亡。linc00941 对 ESCC 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响可能是通过调控糖酵解实现的。

**[关键词]** linc00941; miR-203; CC-趋化因子配体 2(CC chemokine ligand 2, CCL2); 食管鳞癌; 增殖; 凋亡; 侵袭; 糖酵解  
**[中图分类号]** R730.54; R735.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2021)10-1005-10

## linc00941 regulates the proliferation, invasion and glycolysis of esophageal squamous cell carcinoma via miR-203/CCL2 axis

QIAO Fei<sup>1</sup>, LI Baijun<sup>2</sup>, LI Xiaoming<sup>1</sup>, HUANG Guosheng<sup>1</sup>, CHEN Hongyun<sup>1</sup>, ZHANG Yaosheng<sup>3</sup> (1. The Second Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, Henan, China; 2. Department of Thoracic Surgery, The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 168600, Guangxi, China; 3. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of linc00941 adsorbing miR-203 as ceRNA and up-regulating the expression of CC chemokine ligand 2 (CCL2) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods:** The cancer tissues and adjacent tissues of 58 ESCC patients in the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College were selected, including 33 male patients aged (49.3±18.6) years and 25 female patients aged (44.6±20.7) years. The differential expression of linc00941, miR-203 and CCL2 in ESCC tissue, four human ESCC cell lines (EC9706, KYSE30, ECA109 and TE1) and human normal esophageal epithelial cell line HET-1A were detected by qRT-PCR. linc00941-wt, linc00941-mut, CCL2-wt and CCL2-mut plasmids were constructed and co transfected into 293T cells with miR-203 NC or miR-203 mimic, respectively. Dual luciferase reporter gene assay was implemented to verify the interaction between linc00941, miR-203 and CCL2. In addition, CCK-8 and Transwell experiments were used to detect the proliferation and invasion of cells. The lactic acid (LA) content was measured to evaluate the glycolysis ability of the cells. The cell apoptosis was detected by flow cytometry. Glycolysis inhibitor 2-DG and linc00941 were used to intervene ESCC cells to further observe the regulatory effect of

**[基金项目]** 广西壮族自治区卫健委重点项目(No. 2020030)。Project supported by the Key Project of Health Commission of Guangxi Zhuang Autonomous Region(No. 2020030)

**[作者简介]** 乔飞(1982—),男,本科,副主任医师,主要从事胸外科相关疾病方面的基础与临床研究,E-mail:qiwei151664@163.com

**[通信作者]** 乔飞(QIAO Fei, corresponding author), E-mail:qiwei151664@163.com

linc00941 on ESCC cells. **Results:** The expressions of linc00941 and CCL2 were up-regulated while the expression of miR-203 was down-regulated in ESCC tissues and cell lines (all  $P < 0.05$ ). The interactions of linc00941 with miR-203 and miR-203 with CCL2 were both confirmed in ECA109 cells. Knockdown of linc00941 could inhibit the proliferation, invasion, glycolysis of ECA109 cells and induce their apoptosis, which was partly reversed by miR-203 inhibitor (all  $P < 0.05$ ). At the same time, CCL2 overexpression could partly reverse the effects of knockdown of linc00941 on the proliferation, invasion, glycolysis and apoptosis of ECA109 cells (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** linc00941 can increase the expression of CCL2 via absorbing miR-203, subsequently promote the proliferation, invasion, glycolysis of ESCC cells and induce their apoptosis. The effects of linc00941 on the proliferation, invasion and apoptosis of ESCC cells may be realized by regulating glycolysis.

**[Key words]** linc00941; miR-203; CC chemokine ligand 2 (CCL2); esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); proliferation; apoptosis; invasion; glycolysis

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(10): 1005-1014. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.008]

食管癌以食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)最为常见,占食管癌的90%以上<sup>[1]</sup>。早期ESCC患者不易被诊断,直到晚期发生转移才被发现。尽管癌症治疗手段多样,但ESCC患者存活率依然很低<sup>[2]</sup>,因此寻找早期诊断ESCC的生物学标志物是目前研究热点。lncRNA是一种不具有编码蛋白质功能的RNA,在调控癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移过程中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。比如lncRNA LUCAT1可以促进结直肠癌细胞的增殖<sup>[4]</sup>,基因区间的lncRNA (large intergenic noncoding RNA) linc00337激活E2F1进而促进胰腺癌细胞的增殖<sup>[5]</sup>。在ESCC中也有表达异常的lncRNA,比如linc00673<sup>[6]</sup>、lncFAM225A<sup>[7]</sup>、lncSNAG22<sup>[8]</sup>等。linc00941位于12号染色体NC\_000012.12,在大肠癌和胃癌中被发现发挥促癌因子的作用<sup>[9-10]</sup>,但在ESCC中的具体功能尚少见报道。

lncRNA发挥作用的机制有很多,最常见的是作为竞争性内源RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)竞争性结合miRNA, miRNA同样也是一类不具有蛋白质编码功能的RNA,被lncRNA吸附使其表达被抑制<sup>[11]</sup>。miR-203曾被发现可以抑制ESCC的进展,生物学预测网站预测结果显示linc00941与miR-203存在结合位点<sup>[12]</sup>。CC-趋化因子配体2(CC chemokine ligand 2, CCL2)可参与癌症的发生过程,促进前列腺癌中前脂肪细胞和TAM的浸润<sup>[13-14]</sup>。ESCC中CCL2的高表达和TAM的集聚均与ESCC预后不良有关<sup>[15]</sup>。本研究探讨linc00941调控miR-203/CCL2轴从而在ESCC发展中发挥生物学作用的具体机制,为ESCC的诊断与治疗提供新的潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

RPMI 1640培养基(31870082)、Lipofectamine 3000(L3000001)、TRIzol试剂(15596026)、Transwell小室(A1142802)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司,原位荧光杂交实验试剂盒(C002)购自上海歌凡

生物科技有限公司,聚凝胺(H8761)、嘌呤霉素(P8230)、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(CA1020)、乳酸(LA)含量检测试剂盒(BC2235)均购自北京索莱宝科技有限公司,PGL3基本载体(HG-VQP0121)购自美国Promega公司,双荧光素酶报告基因试剂盒(ab32503)购自英国Abcam公司,CCK-8试剂盒(C0038)购自上海碧云天生物科技有限公司,紫外可见光分光光度计购自梅特勒-托利多国际有限公司,反转录试剂盒(RR037A)购自北京智杰方远科技有限公司,SYBR预混料Ex-Taq-II(RR820A)购自武汉科昊佳生物科技有限公司,基质凝胶(354480)购自上海研卉生物科技有限公司,CCL2免疫组化抗体(14-7096-81)购自Thermo Fisher Scientific公司,有氧糖酵解抑制剂2-DG(S4701)购自Selleck(中国)公司。

### 1.2 生物信息学分析

Gene Expression Omnibus(GEO)数据库(<http://ncbi.nlm.nih.gov>)搜索有关ESCC芯片。RNA22在线预测网站(<https://cm.jefferson.edu/rna22/>)与TargetScan在线预测工具([http://targetscan.org/vert\\_72/](http://targetscan.org/vert_72/))预测基因之间的靶向结合位点。GEPIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php?gene>)预测在ESCC组织中的基因表达。DisGeNET网站(<http://disgenet.org/search>)搜索ESCC发病风险基因,String在线分析工具([https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bQ1pVjvgOs39&input\\_page\\_show\\_search=on](https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bQ1pVjvgOs39&input_page_show_search=on))分析蛋白相互作用。

### 1.3 ESCC临床标本的收集

从南阳医学高等专科学校第一附属医院获取58例ESCC患者的癌组织和癌旁组织(距肿瘤原发灶边缘至少3 cm),男性患者33例,年龄(49.3±18.6)岁,女性患者25例,年龄(44.6±20.7)岁。将组织储存在液氮中备用。接受过放疗或其他任何形式治疗的ESCC患者不纳入本次研究。本研究经医院伦理委员会审批同意且术前所有受试者均签署了书面知情同意书。

### 1.4 细胞培养和转染

4株人ESCC细胞系(EC9706、KYSE30、ECA109

和 TE1) 和人正常食管上皮细胞株 HET-1A 由美国 ATCC 组织细胞培养库提供。所有细胞用含有 10% 胎牛血清和双抗的 RPMI 1640 培养基在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。待细胞生长至约 80% 汇合时进行分组、转染, 转染步骤按照 Lipofectamine™ 3000 试剂盒说明书进行。siRNA 质粒 (si-NC、si-linc00941)、miR-203 抑制剂、miR-203 模拟物以及阴性对照均由上海吉玛基因有限公司构建完成, 过表达 linc00941 与过表达 CCL2 及阴性对照由上海汉恒生物工程有限公司构建。2-DG+vector 组为加入 5 mmol/L 2-DG, linc00941+2-DG 组为转染 linc00941 并加入 5 mmol/L 2-DG。

### 1.5 qPCR 检测 linc00941、miR-203 和 CCL2 的表达

使用 TRIzol 试剂分别从 ESCC 组织和细胞系中提取出总 RNA 并检测总 RNA 的纯度。以总 RNA 为样本用 PrimerScript RT 试剂盒合成第一链 cDNA。采用 SYBR 预混料 Ex-Taq-II 进行 qPCR 反应。以上详细操作步骤均按照说明书进行。linc00941 和 CCL2 的相对表达量以 GAPDH 作为内参照物计算, miR-203 的相对表达量以 U6 作为内参照物计算, 目的基因的相对表达量使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法计算。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司提供 (表 1)。

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequences

Gene	Sequence(5'→3')
linc00941	Forward TCAAGAATCAGTCAGCAAGGAGG
	Reverse CTAGGGAGGCTTCAACTAGGATG
miR-203	Forward ACACTCCAGCTGGCGTGAAATGTTT AGGACCA
	Reverse CTCAACTGGTGTCGTGGA
CCL2	Forward AGCAGCAGGTGTCCAAA
	Reverse CTGAAGACCTTAGGGCAGAT
GAPDH	Forward TCTCTGCTCCTCCTGTTCGA
	Reverse GCGC-CCAATACGACCAAATC
U6	Forward ACGTCACGAGCCGTCTCTCGTGA
	Reverse GGCTCCAACGTACCGATCAGTA

### 1.6 双荧光素酶报告分析 miR-203 与 linc00941、CCL2 mRNA 的结合

RNA22 在线预测网站 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/>) 和 TargetScan 在线预测工具 ([http://targetscan.org/vert\\_72/](http://targetscan.org/vert_72/)) 上分别找到 linc00941 与 miR-203、miR-203 与 CCL2 的碱基互补配对序列, 根据这些序列设计了 linc00941/CCL2 野生型 (WT)、linc00941/CCL2 突变体 (MUT) 序列并克隆到 PGL3 基本载体上, 命名为 linc00941-WT、linc00941-MUT、CCL2-WT、CCL2-MUT。使用 Lipofectamine™ 3000 试剂将这些质粒分别与 miR-203 NC 或 miR-203 模拟物共转染到 293T 细胞中; 转染 48 h 后, 应用双荧光素酶报告基因试剂盒和紫外可见分光光度计观察荧光素酶活性, 以海肾荧光素酶活性为标准化参考。

1.7 FISH 技术检测 miR-203 与 linc00941 在细胞中的定位

细胞爬片经多聚甲醛固定好, 使用 PBS 洗涤, 梯度乙醇脱水, 加入预杂交液, 65 °C 孵育 1 h; 加入含 miR-203 与 linc00941 探针的杂交液, 65 °C 避光孵育 48 h; 依次使用 SSC、PBS 洗涤; 加入 DAPI 试剂进行复染, PBS 洗涤后使用指甲油封片, 最后使用荧光显微镜观察荧光信号, 红色荧光为阳性信号, 细胞核显示为蓝色, 从而确定 miR-203 与 linc00941 RNA 在细胞中的定位。

### 1.7 FISH 技术检测 miR-203 与 linc00941 在细胞中的定位

1.8 免疫组织化学法检测 CCL2 在 ESCC 组织中的表达

取保存好的 ESCC 患者的癌及癌旁组织切片, 脱蜡至水后微波抗原修复, PBS 冲洗后加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 室温孵育。PBS 冲洗后加入一抗 CCL2, 37 °C 孵育 60 min。再次 PBS 冲洗后加入二抗, 室温孵育 30 min。DAB 显色, 苏木精复染, 盐酸乙醇分化, 自来水冲洗, 乙醇脱水, 电风吹干组织表面残留的乙醇, 树脂封片。

### 1.8 免疫组织化学法检测 CCL2 在 ESCC 组织中的表达

1.9 CCK-8 法检测 linc00941 对 ESCC 细胞增殖的影响

在 96 孔板中植入经过转染分组的细胞, 每孔 1×10<sup>4</sup> 个细胞, 并设置对照。在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 环境中培养, 分别在 24、48、72、96 h 时向每孔加入 15 mol/L 的 CCK-8 溶液, 避光孵育 4 h 后, 酶标仪测定每孔溶液在 450 nm 波长下的光密度 (D) 值。

### 1.9 CCK-8 法检测 linc00941 对 ESCC 细胞增殖的影响

1.10 Transwell 实验检测 linc00941 对 ESCC 细胞侵袭的影响

用 Transwell 小室进行实验。首先在上腔室预先涂上基质凝胶, 室温下水化 30 min, 将细胞与无血清培养基放入上腔室 (每孔 4×10<sup>5</sup> 个细胞)。同时, 在下腔室加入添加 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基。37 °C、含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中放置 24 h 后, 轻轻划去腔室表面未侵袭的细胞, 下表面细胞用甲醇固定, 使用 0.1% 结晶紫溶液染色。在显微镜下随机选取 5 个视野, 用 Image J 软件对穿膜细胞进行计数。

### 1.10 Transwell 实验检测 linc00941 对 ESCC 细胞侵袭的影响

1.11 乳酸含量检测试剂盒检测 linc00941 对 ESCC 细胞中乳酸含量的影响

使用 LA 含量检测试剂盒对细胞中产生的 LA 进

### 1.11 乳酸含量检测试剂盒检测 linc00941 对 ESCC 细胞中乳酸含量的影响

使用 LA 含量检测试剂盒对细胞中产生的 LA 进

行检测。详细操作步骤按照试剂盒说明书进行。

### 1.12 流式细胞术检测 linc00941 对 ESCC 细胞凋亡的影响

收集转染细胞,加入 100 μl 1×结合缓冲液重悬;加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI 染液并混匀,暗室孵育 10~15 min;加入 400 μl 1×结合缓冲液,置于冰上,用流式细胞仪对细胞凋亡情况进行检测。

### 1.13 统计学处理

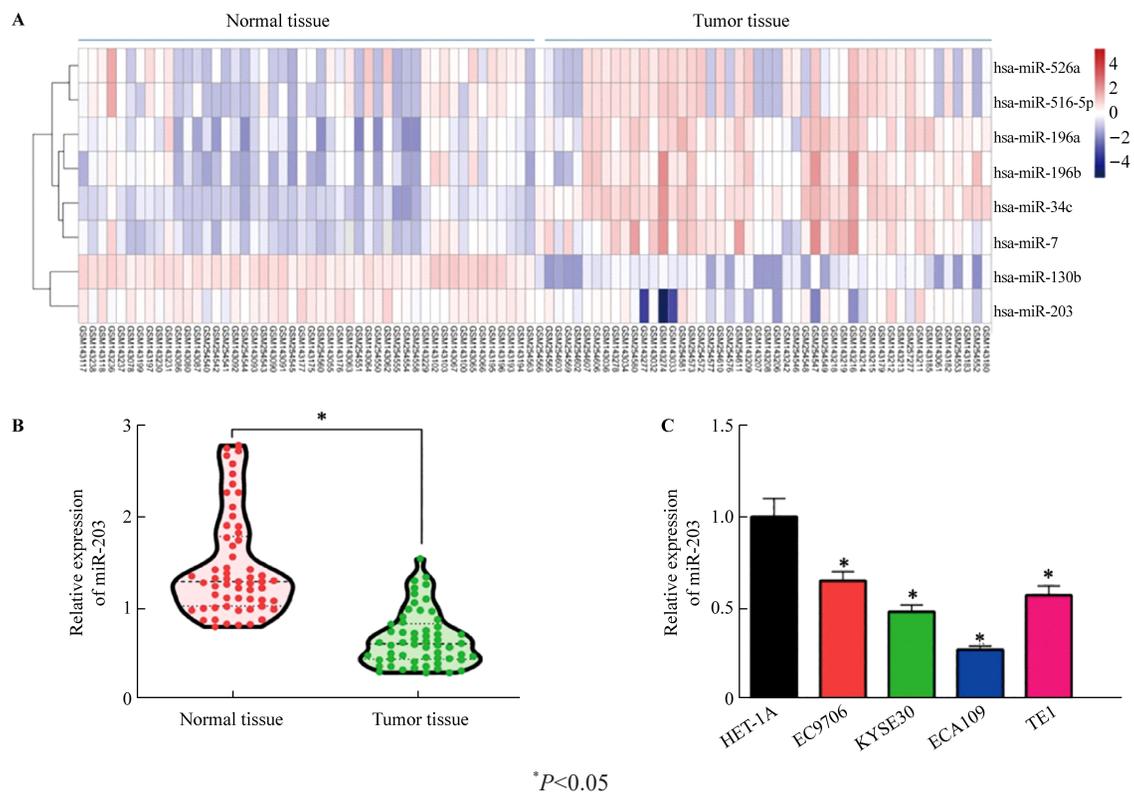
使用 SPSS 22.0 软件分析,正态分布的计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用独立样本的 *t* 检验进行分析两组间的数据差异,采用单因素分析法联合 LSD-*t* 两两比较分析多组间的数据差异。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-203 在 ESCC 组织和细胞系中表达下调

GEO 数据库中获取 ESCC 组织中 miRNA 的表达谱,分析了在 ESCC 组织和正常组织中表达有差异化的前 8 个 miRNA,绘制成热图(图 1A),包括 miR-203。

已有文献<sup>[12]</sup>报道 miR-203 可抑制 ESCC 的发展,因此采用 qPCR 方法检测 ESCC 组织和细胞系中 miR-203 的表达。结果显示,与正常组织和细胞相比,ESCC 组织和细胞中 miR-203 的表达都是降低的,ECA109 细胞株 miR-203 的表达最低,故作为后续研究的细胞株(图 1B、C,均  $P < 0.05$ )。



A : Heatmap of the differential expression of the first 8 miRNA in ESCC and normal tissues; B : Relative expression of miR-203 in ESCC and normal tissues; C: Relative expression of miR-203 in ESCC cell lines and normal esophageal epithelial cell line. Compared with HET-1A cell

图 1 miR-203 在 ESCC 组织和细胞系中的表达  
Fig.1 miR-203 expression in ESCC tissues and cell lines

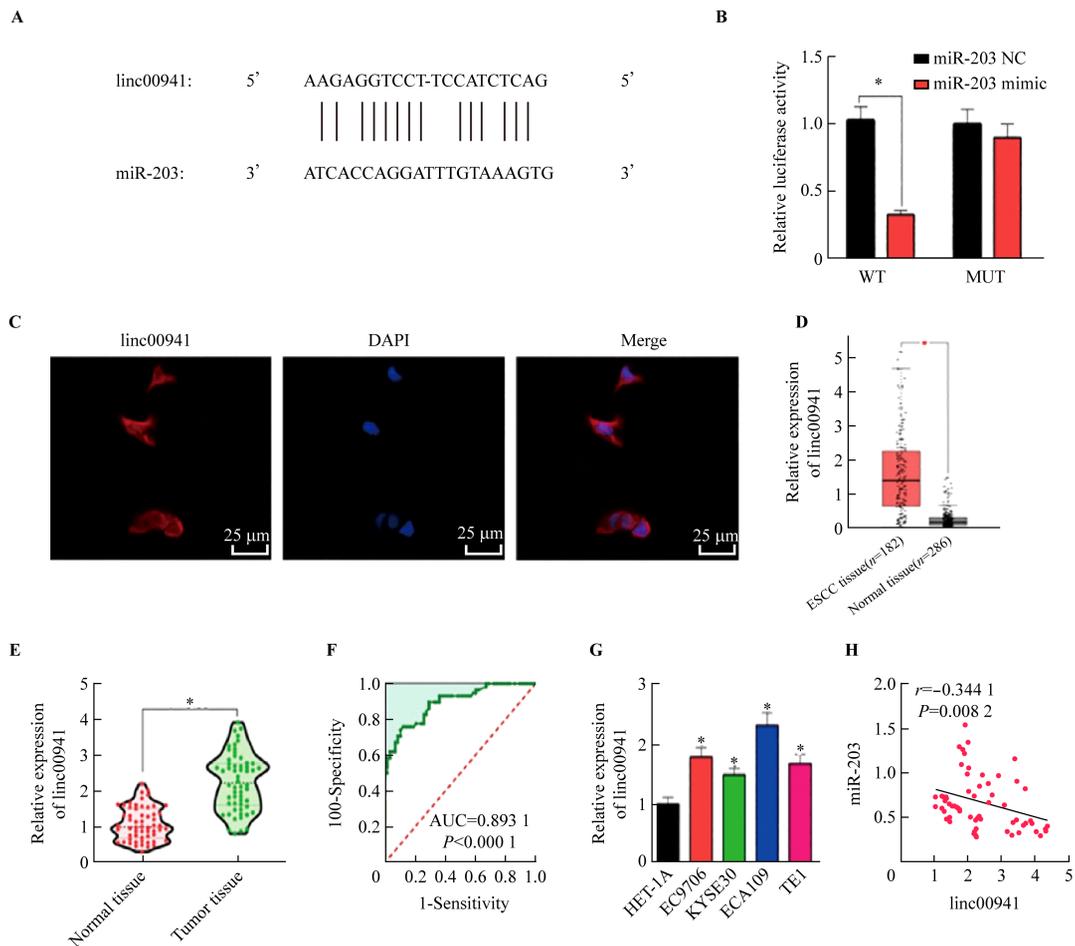
### 2.2 miR-203 与 linc00941 相互作用且 linc00941 在 ESCC 组织和细胞中表达上调

RNA22 在线预测结果显示 miR-203 与 linc00941 存在结合位点(图 2A),使用双荧光素酶报告基因实验结果显示两者存在结合(图 2B)。FISH 实验进一步验证 linc00941 在细胞质和细胞核中均有表达且主要定位在细胞质,可以结合 miR-203 从而发挥 ceRNA 的作用(图 2C),并且在 GEPIA 数据库中发现 linc00941 在 ESCC 组织中表达升高(图 2D)。qPCR

检测结果显示,与正常组织和细胞相比,ESCC 组织和细胞中 linc00941 的表达升高(图 2E、2G,均  $P < 0.05$ )。通过 ROC 曲线分析结果显示 linc00941 对于 ESCC 的诊断具有敏感性(图 2F,  $P < 0.05$ ),linc00941 的表达与 miR-203 呈负相关(图 2H,  $P < 0.05$ )。

### 2.3 敲低 linc00941 表达可抑制 ECA109 细胞的增殖、侵袭和糖酵解而促进凋亡

为了探究 linc00941 在 ESCC 中的潜在生物学作用,在 ECA109 细胞中下调 linc00941 的表达(图 3A,



A: Binding site between miR-203 and linc00941 predicted by RNA22 online website; B: Dual luciferase reporter gene assay showed miR-203 could be combined with linc00941; C: FISH showed linc00941 was expressed in both cytoplasm and nucleus, and mainly located in the cytoplasm; D: Relative expression of linc00941 in ESCC and normal tissues predicted by GEPIA website; E: Relative expression of linc00941 in ESCC and normal tissues; F: ROC curve analysis showed that linc00941 was sensitive to the diagnosis of ESCC; G: Relative expression of linc00941 in ESCC cell lines and normal esophageal epithelial cell line; H: Expression of linc00941 was negatively correlated with miR-203 in ESCC tissues

图2 linc00941 在 ESCC 组织和 ECA109 细胞中呈高表达且可以吸附 miR-203

Fig.2 linc00941 could adsorb miR-203 and up-regulate its expression in ESCC tissue and ECA109 cells

$P < 0.05$ )。CCK-8 法实验结果显示, 下调 linc00941 抑制 ECA109 细胞的增殖能力(图 3B,  $P < 0.05$ ); 乳酸含量检测显示下调 linc00941 减少 ECA109 细胞的乳酸含量, 糖酵解被抑制(图 3C,  $P < 0.05$ ); Transwell 实验显示下调 linc00941 抑制 ECA109 细胞的侵袭能力(图 3D,  $P < 0.05$ ); Annexin V-FITC/PI 双染实验显示下调 linc00941 促进 ECA109 细胞的凋亡(图 3E,  $P < 0.05$ )。

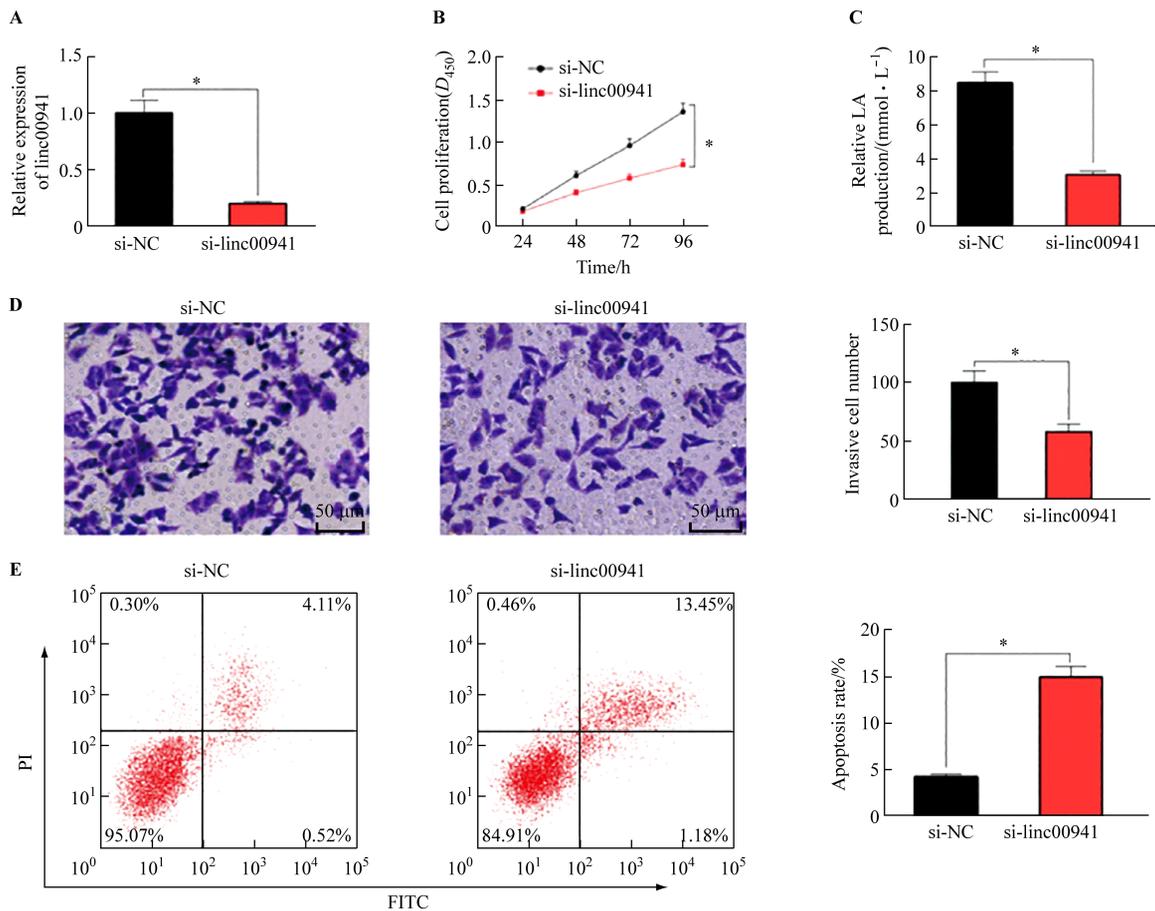
2.4 miR-203 可以部分逆转 linc00941 对 ECA109 细胞增殖、侵袭、糖酵解、凋亡的作用

由于 linc00941 可以作为 miR-203 的海绵因子, 所以在 ECA109 细胞中共转染 si-linc00941 和 miR-203 抑制剂, 进一步检测 linc00941 与 miR-203 在 ECA109 中联合的生物学功能。结果显示, 与 si-NC 组相比, si-linc00941 可以明显抑制 ECA109 细胞的增殖、侵袭和糖酵解, 并诱导细胞加快凋亡(均  $P < 0.05$ ); 与 si-linc00941+inhibitor NC 组相比,

si-linc00941+ miR-203 inhibitor 促进 ECA109 细胞的增殖、侵袭与糖酵解, 抑制细胞凋亡(图 4, 均  $P < 0.05$ )。

2.5 CCL2 是 miR-203 的靶点并接受 linc00941 的调控

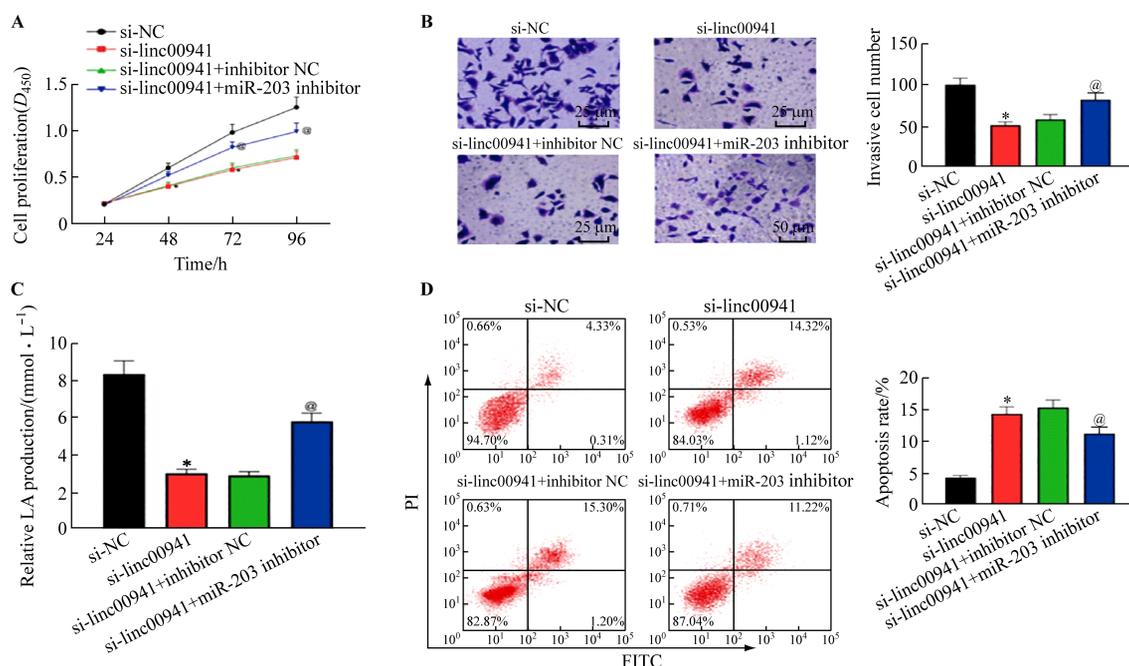
接下来探索 miR-203 在 ESCC 中的调控机制, 应用 TargetScan 在线预测工具找到 miR-203 与 CCL2 的结合序列(图 5A), 并通过双荧光素酶报告基因实验证实了两者的靶向关系(图 5B,  $P < 0.05$ )。将 CCL2 与 DisGeNET 网站查到的前 10 个 ESCC 发病风险基因通过 String 数据库做蛋白质相互作用分析, 结果(图 5C)显示, CCL2 和 ESCC 风险基因存在蛋白质相互作用。接着应用 qPCR 检测 CCL2 在 ESCC 组织和细胞中的表达, 结果(图 5D)显示, 与正常组织相比 ESCC 组织中 CCL2 的表达上调( $P < 0.05$ )。免疫组化实验结果(图 5E)显示, 癌组织中 CCL2 阳性表达显著



A: The results of linc00941 knockdown; B: Proliferation ability of ESCC cells in each group; C: The detection results of LA content of cells in each group; D: The detection results of cell invasion ability in each group; E: The detection results of cell apoptosis in each group

图3 linc00941 下调对 ECA109 细胞增殖、侵袭、糖酵解和凋亡的影响

Fig.3 Effects of down-regulation of linc00941 on proliferation, invasion, glycolysis and apoptosis of ECA109 cells



\* $P < 0.05$  vs si-NC group; @ $P < 0.05$  vs linc00941+inhibitor NC group

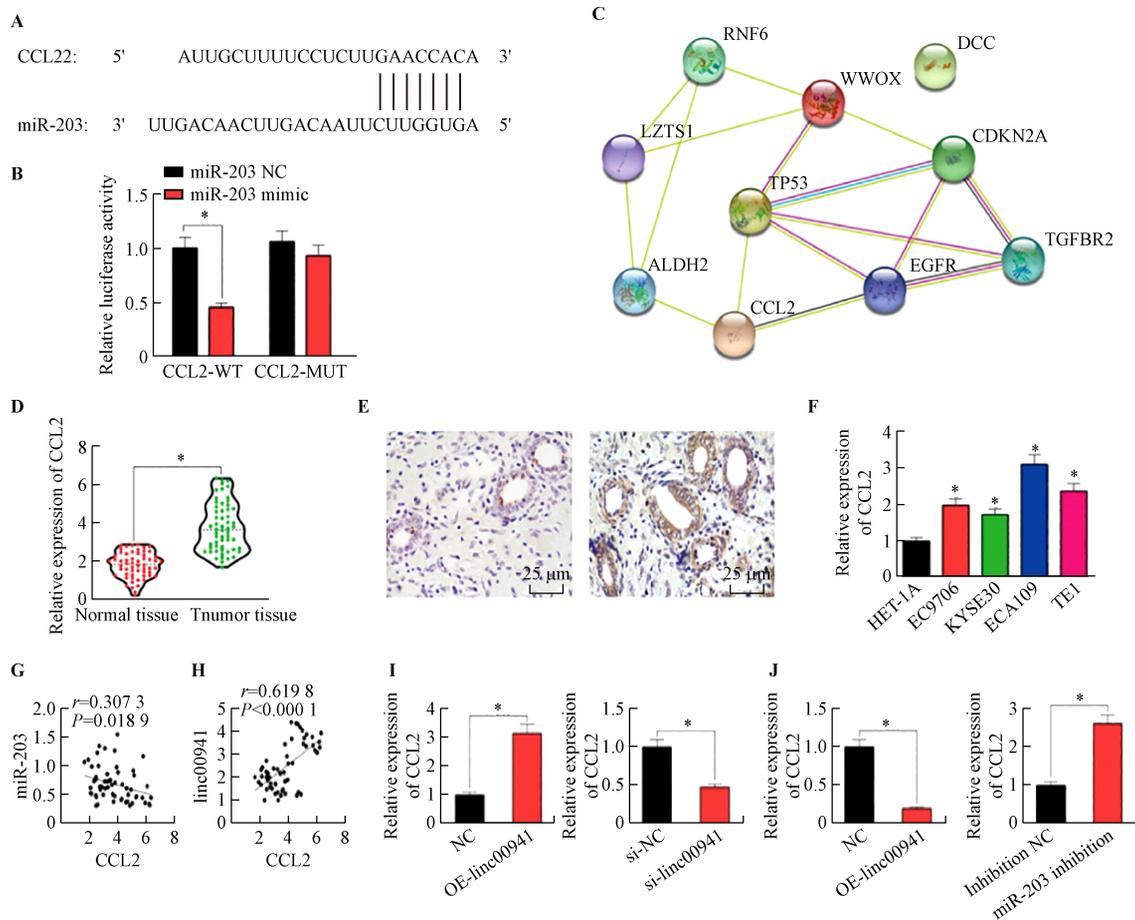
A: Proliferation ability of ESCC cells in each group; B: The detection results of cell invasion ability in each group; C: The detection results of LA content of cells in each group; D: Cell apoptosis detected in each group

图4 miR-203 inhibitor 部分挽救 si-linc00941 对 ECA109 细胞生物学行为的作用

Fig.4 The effects of si-linc00941 on biological behavior of ECA109 cells can be partially saved by miR-203 inhibitor

高于癌旁组织 ( $75.24 \pm 6.91$  vs  $18.65 \pm 3.57$ ,  $P < 0.05$ )。CCL2 在 ESCC 细胞中表达也显著增强 (图 5F)。相关性分析结果 (图 5G) 显示, 在 ESCC 组织中, CCL2 的表达与 miR-203 呈负相关 ( $P < 0.05$ ), 与 linc00941 的表达呈正相关 (图 5H,  $P < 0.05$ )。qPCR 检测结果 (图

5I) 显示, 上调 linc00941 的表达可以促进 CCL2 mRNA 的表达, 下调 linc00941 则与之相反 (均  $P < 0.05$ ), 而上调 miR-203 则可以抑制 CCL2 mRNA 的表达, 下调 miR-203 促进了 CCL2 mRNA 的表达 (图 5J,  $P < 0.05$ )。



\* $P < 0.05$  vs HET-1A group

A: TargetScan website showed that there were binding sites between CCL2 and miR-203; B: Dual luciferase reporter gene assay results; C: Protein interaction analysis of CCL2 and ESCC risk genes; D: Expression of CCL2 in ESCC and adjacent normal tissue; E: Positive expression of CCL2 in ESCC and adjacent normal tissue detected by immunohistochemical method; F: Expression of CCL2 in ESCC cell line and normal esophageal epithelial cell line; G: Correlation analysis between CCL2 and miR-203 expression; H: Correlation analysis between CCL2 and linc00941 expression; I: Effects of linc00941 on CCL2 expression; J: Effects of miR-203 on CCL2 expression

图5 CCL2是miR-203的靶点并接受linc00941的调控

Fig.5 CCL2 is a target gene of miR-203 and is regulated by linc00941

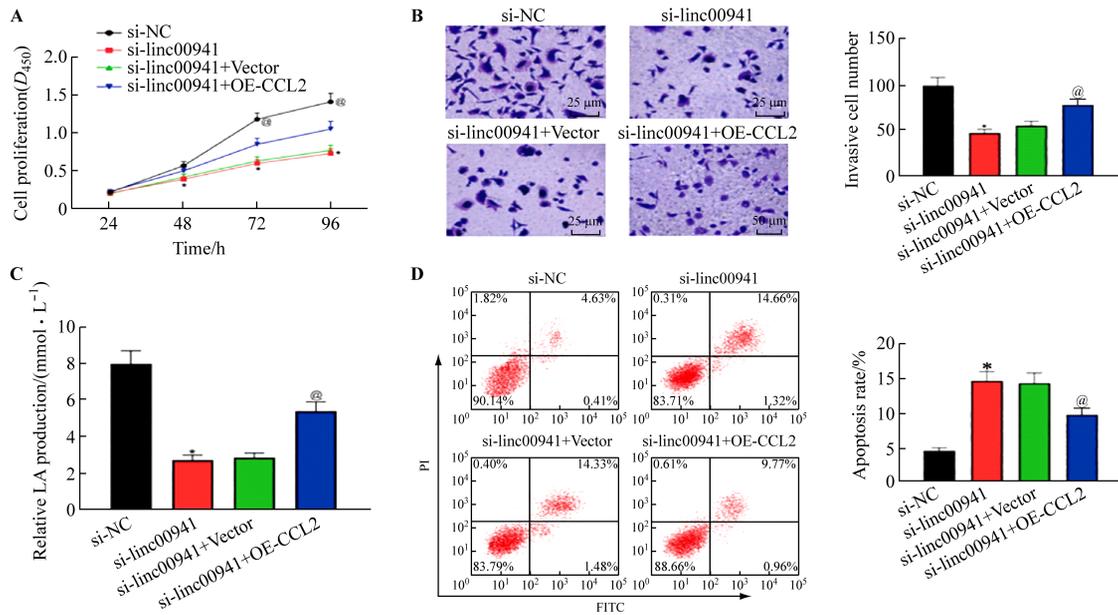
### 2.6 过表达 CCL2 可以部分逆转敲低 linc00941 对 ESCC 细胞的抑制作用

由于 linc00941 可以通过 miR-203 调控 CCL2, 所以在细胞中共转染过表达 CCL2 (OE-CCL2) 和 si-linc00941, 探讨 CCL2 和 linc00941 在 ESCC 中的联合作用。结果显示, 与 si-NC 组相比, si-linc00941 抑制细胞的增殖、侵袭和糖酵解, 并诱导细胞加快凋亡 (图 6,  $P < 0.05$ ), 与 si-linc00941+Vector 组相比, si-linc00941+OE-CCL2 组细胞的增殖、侵袭与糖酵解程度增强, 细胞凋亡减少 (图 6, 均  $P < 0.05$ )。该实验结果显示, OE-CCL2 部分抵消 si-linc00941 对 ESCC

的抑制作用。

### 2.7 linc00941 对 ESCC 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响可能是通过对有氧糖酵解进行调控实现的

为进一步明确 linc00941 在 ESCC 中发挥作用的途径, 将 ESCC 细胞中加入糖酵解抑制剂, 结果 (图 7) 显示, 相对于 Vector 组, linc00941 组细胞增殖、侵袭增强, 凋亡减少, 但是 2-DG 组细胞增殖和侵袭被抑制, 凋亡率增强。相对于 2-DG+Vector 组, 加入 linc00941 后, 2-DG 对 ESCC 细胞的作用则被部分挽救, 提示 linc00941 能够对糖酵解进行影响进而调控 ESCC 细胞生物学行为。

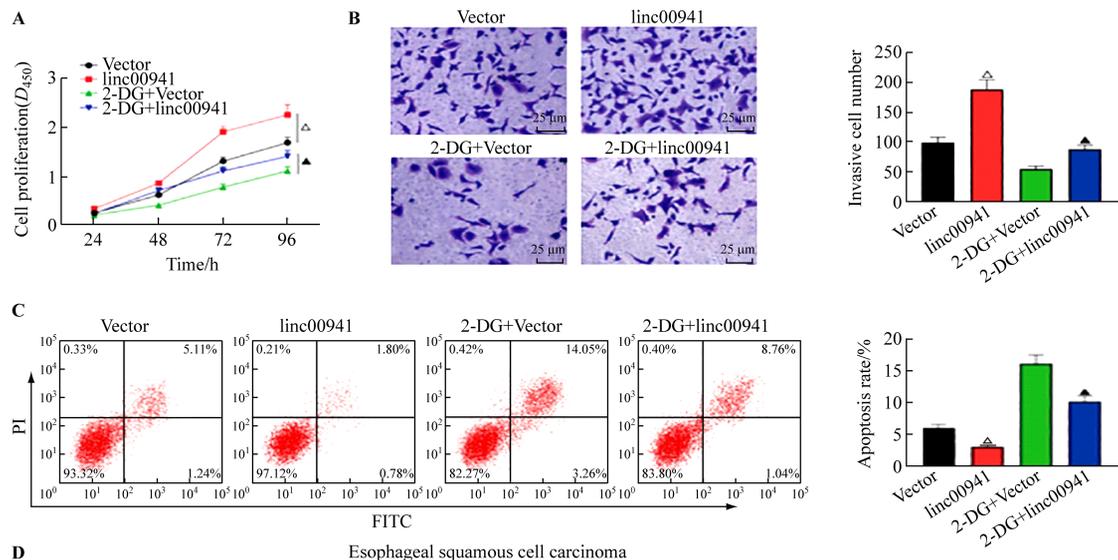


\* $P < 0.05$  vs si-NC group; @ $P < 0.05$  vs si-linc00941+Vector group

A: Proliferation ability of ESCC cells in each group; B: The detection results of cell invasion ability in each group; C: The detection results of LA content of cells in each group; D: Cell apoptosis detected in each group

图6 OE-CCL2能够部分挽救si-linc00941对ESCC细胞生物学行为的影响

Fig.6 The effects of si-linc00941 on biological behavior of ESCC cells can be partially saved by OE-CCL2



Esophageal squamous cell carcinoma

$\Delta P < 0.05$  vs vector group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs 2-DG+Vector

A: Proliferation ability of ESCC cells in each group; B: The detection results of cell invasion ability in each group; C: Cell apoptosis detected in each group was detected; D: Mechanism diagram of linc00941 regulating proliferation, invasion and apoptosis of ESCC cells

图7 linc00941调控有氧糖酵解影响ESCC细胞增殖、侵袭、凋亡

Fig.7 linc00941 affects proliferation, invasion and apoptosis of ESCC cells via regulating aerobic glycolysis

### 3 讨论

癌细胞具有无限增殖的能力, 凋亡数量较少, 且可通过侵袭和转移的方式累及全身脏器, 而糖酵解不仅仅可以给正常细胞提供能量, 也是癌细胞的能量来源。糖酵解过程中的产物有利于癌细胞的增殖, 而糖酵解增强是癌细胞适应低氧环境的一种方式, 在为癌细胞提供能量的同时会产生大量的乳酸使细胞外基质酸化, 利于癌细胞的侵袭转移<sup>[16-18]</sup>。

lncRNA 的异常表达调节癌症不同的生物学功能, 具有很大的潜力成为癌症早期诊断和治疗的靶点, 因此成为近些年来研究的一大热点<sup>[19]</sup>。在 ESCC 中, 发现了很多发挥不同作用的 lncRNA, 比如 LOC440173 过表达在体外促进 ESCC 细胞的增殖、迁移与侵袭, 并促进上皮间质转化<sup>[20]</sup>; LncRAN BC200 通过调控 ATF4 的表达促进 ESCC 细胞的迁移与侵袭<sup>[21]</sup>; lncRNA PTCSC1 激活 Akt 信号促进 ESCC 的进展<sup>[22]</sup>。本研究首次探讨了 linc00941 在 ESCC 中的生物学功能。借助 GEPIA 数据库结合实验发现, linc00941 在 ESCC 组织和细胞中均表达升高, 低表达 linc00941 的患者生存率更高, 随后敲减 linc00941 的表达, 发现 ESCC 细胞的增殖与侵袭被抑制, 凋亡被促进。

lncRNA/miRNA/mRNA 通路在调控癌症的过程中是一个十分重要的机制通路, lncRNA 通过吸附 miRNA、下调 miRNA 的表达、减弱 miRNA 对下游靶基因 mRNA 的调控, 来影响癌症的进展。例如 lncRNAs MAFG-AS1 通过吸附 miR-143 调控 LASP1 参与 ESCC 的发展<sup>[23]</sup>; lncRNA TTTY15 吸附 miR-337-3p 上调 JAK2 表达促进 ESCC 的进展<sup>[24]</sup>。在本研究中, 通过实验分析发现 linc00941 可以海绵吸附 miR-203, GEO、dbDEMC 数据库以及实验证明 miR-203 在 ESCC 中的低表达, 并且上调 miR-203 的表达后发现可以抑制 ESCC 细胞的增殖与侵袭, 并促进细胞凋亡。在这之前, miR-203 已经被证明在 ESCC 中发挥抑癌因子的作用<sup>[25]</sup>, 在本研究中又得到进一步的验证。

另外, 通过在线预测网站寻找到 miR-203 的下游靶基因 CCL2 并通过实验验证他们的靶向关系。CCL2 是 CC 趋化因子的一个亚类, 趋化因子的主要功能是使细胞定向迁移, 可分为体内平衡趋化因子和促炎趋化因子两大类<sup>[26]</sup>。CCL2 作为促炎趋化因子的配体, 可以参与到多种癌症的进展中, 如其在成胶质细胞瘤<sup>[27]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[28]</sup>等肿瘤中都发挥着促癌作用。在 ESCC 中检测到 CCL2 的表达升高, 并且过表达 CCL2 可以部分挽救 miR-203 对 ESCC 的作

用。这与之前对 CCL2 在 ESCC 中的研究趋势一致<sup>[15]</sup>。最后通过对 ESCC 细胞同时以 linc00941 和糖酵解抑制剂 2-DG 干预, 结果显示, linc00941 能够部分挽救 2-DG 对 ESCC 细胞增殖、侵袭的抑制作用, 提示 linc00941 对 ESCC 细胞的调控可能是通过影响有氧糖酵解这一过程实现的。

综上所述, 本研究证明 linc00941 在 ESCC 中发挥的促癌作用, 且其机制可能是通过 linc00941/miR-203/CCL2 通路实现, linc00941 对于 ESCC 的诊断和靶向治疗有潜在价值。但是本研究也存在一定局限性, 如样本量受限, 未将 miR-203/CCL2 纳入糖酵解检测和更多糖酵解相关指标, 以及尚未进行相关体内实验等, 这些将在后续的研究中进一步完善。

### [参考文献]

- [1] WANG A, LU L, FAN J, et al. Lymph node metastatic patterns and its clinical significance for thoracic superficial esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Cardiothorac Surg*, 2020, 15(1): 262. DOI: 10.1186/s13019-020-01302-z.
- [2] 薛亚军, 杜雅彦, 黄文华, 等. miR-143-3p 可能经 MAPK7 途径抑制食管癌细胞的增殖、迁移与侵袭[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 035(18): 2177-2180. DOI: 10.3969/j. issn. 1000-484X.2019.18.001.
- [3] ZHANG Q Z, CHEN Z S. ncRNA UASR1 sponges miR-107 in colorectal cancer to upregulate oncogenic CDK8 and promote cell proliferation[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(6): 305. DOI: 10.3892/ol.2020.12168.
- [4] WU R L, LI L, BAI Y, et al. The long noncoding RNA LUCAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation by antagonizing Nucleolin to regulate MYC expression[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 908. DOI: 10.1038/s41419-020-03095-4.
- [5] WANG H K, YU S Y, PENG H, et al. Long noncoding RNA Linc00337 functions as an E2F1 co-activator and promotes cell proliferation in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 216. DOI: 10.1186/s13046-020-01725-5.
- [6] ZHOU M H, MAO Y H, YU S L, et al. LINC00673 Represses CDKN2C and promotes the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells by EZH2-Mediated H3K27 trimethylation[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1546. DOI: 10.3389/fonc.2020.01546.
- [7] ZHANG C Y, LUO Y, CAO J J, et al. Exosomal lncRNA FAM225A accelerates esophageal squamous cell carcinoma progression and angiogenesis via sponging miR-206 to upregulate NETO2 and FOXP1 expression[J/OL]. *Cancer Med*, 2020, 9(22): 8600-8611 [2021-01-03]. <https://doi.org/10.1002/cam4.3463>. DOI:10.1002/cam4.3463.
- [8] LI Z W, ZHANG T Y, YUE G J, et al. Small nucleolar RNA host gene 22 (SNHG22) promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma by miR-429/SES3 axis[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(16): 1007. DOI: 10.21037/atm-20-5332.

- [9] WU N, JIANG M Z, LIU H, et al. linc00941 promotes CRC metastasis through preventing SMAD4 protein degradation and activating the TGF- $\beta$ /SMAD2/3 signaling pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(1):219-232. DOI: 10.1038/s41418-020-0596-y.
- [10] LUO C, TAO Y, ZHANG Y W, et al. Regulatory network analysis of high expressed long non-coding RNA linc00941 in gastric cancer[J]. *Gene*, 2018, 662: 103-109. DOI: 10.1016/j.gene.2018.04.023.
- [11] TENG L L, LIU P P, SONG X, et al. Long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1 (NEAT1) represses proliferation of trophoblast cells in rats with preeclampsia via the microRNA-373/FLT1 axis[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e927305. DOI: 10.12659/MSM.927305.
- [12] XIA Y, WANG Y H, WANG Q, et al. Increased miR-203-3p and reduced miR-21-5p synergistically inhibit proliferation, migration, and invasion in esophageal cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2019, 30(1): 38-45. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000687.
- [13] WU LY, SAXENA S, GOEL P, et al. Breast cancer cell-neutrophil interactions enhance neutrophil survival and pro-tumorigenic activities[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(10): E2884. DOI: 10.3390/cancers12102884.
- [14] GWAK J, JEONG H, LEE K, et al. SFMBT2-mediated infiltration of preadipocytes and TAMs in prostate cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(9): E2718. DOI: 10.3390/cancers12092718.
- [15] YANG H, ZHANG Q, XU M, et al. CCL2-CCR2 axis recruits tumor associated macrophages to induce immune evasion through PD-1 signaling in esophageal carcinogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 41. DOI: 10.1186/s12943-020-01165-x.
- [16] 李媛媛, 程斌, 王韵. 长链非编码RNA lnc-p26090 对口腔鳞状细胞癌细胞糖酵解及增殖的影响[J]. *国际口腔医学杂志*, 2018, 45(6): 4-20. DOI: 10.7518/gjkq.2018.06.002.
- [17] UHL FRANZISKA M, CHEN S, O'SULLIVAN D, et al. Metabolic reprogramming of donor T cells enhances graft-versus-leukemia effects in mice and humans[J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(567): eabb8969. DOI: 10.1126/scitranslmed.abb8969.
- [18] ZHANG K, HU H, XU J, et al. Circ\_0001421 facilitates glycolysis and lung cancer development by regulating miR-4677-3p/CDCA3[J]. *Diagn Pathol*, 2020, 15(1): 133. DOI: 10.1186/s13000-020-01048-1.
- [19] GUO R, CHEN Y, BORGARD H, et al. The function and mechanism of lipid molecules and their roles in the diagnosis and prognosis of breast cancer[J]. *Molecules*, 2020, 25(20): E4864. DOI:10.3390/molecules25204864.
- [20] WANG G Y, FENG B, NIU Y F, et al. A novel long noncoding RNA, LOC440173, promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma by modulating the miR-30d-5p/HDAC9 axis and the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(12): 1392-1408. DOI: 10.1002/mc.23264.
- [21] ZHAO R H, CAO X G, JIN S L, et al. LncRNA BC200 promotes esophageal squamous cell cancer migration and invasion and can regulate ATF4 expression[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1392. DOI: 10.3389/fonc.2020.01392.
- [22] LIU T, LIANG X S, YANG S Z, et al. Long noncoding RNA PTCSC1 drives esophageal squamous cell carcinoma progression through activating Akt signaling[J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 117: 104543. DOI: 10.1016/j.yexmp.2020.104543.
- [23] QU Y H, LIU J B. lncRNA MAFG-AS1 contributes to esophageal squamous-cell carcinoma progression via regulating miR143/LASP1[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 8359-8370. DOI: 10.2147/OTT.S258157.
- [24] WANG W, YANG J B. Long noncoding RNA TTTY15 promotes growth and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by sponging microRNA-337-3p to upregulate the expression of JAK2[J]. *Anticancer Drugs*, 2020, 31(10): 1038-1045. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000960.
- [25] ZHANG K, DAI L M, ZHANG B, et al. miR-203 is a direct transcriptional target of E2F1 and causes G1 arrest in esophageal cancer cells[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(4): 903-910. DOI: 10.1002/jcp.24821.
- [26] LOWE P P, MOREL C, AMBADE A, et al. Chronic alcohol-induced neuroinflammation involves CCR2/5-dependent peripheral macrophage infiltration and microglia alterations[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 296. DOI: 10.1186/s12974-020-01972-5.
- [27] KASEMSUK T, PHUAGKHAOPONG S, YUBOLPHAN R, et al. Cadmium induces CCL2 production in glioblastoma cells via activation of MAPK, PI3K, and PKC pathways[J]. *J Immunotoxicol*, 2020, 17(1): 186-193. DOI: 10.1080/1547691X.2020.1829211.
- [28] WANG Z X, ZHAO Y, XU H Y, et al. CtBP1 promotes tumour-associated macrophage infiltration and progression in non-small-cell lung cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(19): 11445-11456. DOI: 10.1111/jcmm.15751.

[收稿日期] 2021-02-01

[修回日期] 2021-07-02

[本文编辑] 韩丹