

敲低 CASC9 表达对食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

李倩倩,唐茂林,赵世圣,胡为民

(川北医学院基础医学与法医学院免疫学教研室,四川南充 637000)

【摘要】目的:探讨 lncRNA CASC9 对食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭及相关调控因子的影响。**方法:**采用 RT-qPCR 检测 3 种食管鳞癌细胞株中 CASC9 的表达情况。采用 si-CASC9 沉默 Eca109、Kyse150 细胞中 CASC9 的表达,采用 RT-qPCR 检测 si-CASC9 沉默效率;采用 CCK-8 检测 NC 组及 si-CASC9 组细胞的增殖活力;采用细胞划痕实验检测 NC 组及 si-CASC9 组的细胞迁移速度;采用 Transwell 侵袭实验检测 NC 组及 si-CASC9 组细胞侵袭能力;采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测 RhoA 的 mRNA 及蛋白的表达情况。**结果:**CASC9 在 Eca109、TE-1 和 Kyse150 3 种食管鳞癌细胞株中的表达水平比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),Eca109 和 Kyse150 中表达量较高;沉默 CASC9 表达后,Eca109、Kyse150 细胞增殖、迁移和侵袭能力减弱 ($P < 0.05$)。沉默 CASC9 表达后,RhoA 的 mRNA 和蛋白的表达均上调 ($P < 0.05$)。**结论:**沉默 CASC9 的表达,可抑制 Eca109 和 Kyse150 细胞的增殖和迁移和侵袭能力,可能与调节 RhoA 的表达相关。

【关键词】食管鳞癌;CASC9;RhoA;增殖;迁移

【中图分类号】R735.1 **【文献标志码】**A

Effect of down-regulating CASC9 expression on proliferation, migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma

LI Qian-qian, TANG Mao-lin, ZHAO Shi-sheng, HU Wei-min

(Department of Immunology, School of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of CASC9 on proliferation, migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods:** The CASC9 mRNA expression of three kinds of ESCC cell lines were detected by RT-qPCR. The expression of CASC9 was inhibited by si-CASC9 technology in Eca109 and Kyse150 cell-lines, silencing efficiency of si-CASC9 detected by RT-qPCR. The proliferation activity of NC group and si-CASC9 group was detected by CCK8. The cell migration ability of NC group and si-CASC9 group was detected by wound healing assay. The cell invasion ability of NC group and si-CASC9 group was detected by Transwell. RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of RhoA. **Results:** The expression levels of CASC9 in three esophageal squamous cell carcinoma cell lines (Eca109, TE-1, and Kyse150) were statistically significant ($P < 0.05$). Eca109 and Kyse150 had higher expression. After interfering the expression of CASC9, the proliferation, migration, and invasion abilities of Eca109 and Kyse150 cells decreased ($P < 0.05$), the mRNA and protein expression of RhoA were upregulated ($P < 0.05$). **Conclusion:** Interfering the expression of CASC9 can inhibit the proliferation, migration, and invasion ability of Eca109 and Kyse150 cells, which may be related to regulating the expression of RhoA.

【Key words】 Esophageal squamous cell carcinoma; CASC9; RhoA; Proliferation; Migration

食管癌是一个全球的重大健康挑战。最新的全球统计数据显示,食管癌是导致癌症相关死亡的第六大原因,也是全球第七大常见癌症^[1]。在我国,尤其是川东北地区发病率及死亡率居高不下。长链非编码核糖核酸(long noncoding ribonucleic acid, lncRNA)是近十多年来肿瘤研究的新热点,部分 lncRNA

与肿瘤的密切相关性被越来越多的认识,其可在染色体重构、转录、转录后和表观遗传学水平上发挥重要调控作用,影响肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭、转移、耐药、复发等过程,在不同肿瘤中可表现出抑癌或促癌作用^[2]。目前已发现癌症易感候选蛋白 9(cancer susceptibility candidate 9, CASC9)与口

腔鳞癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、肺鳞癌等不同肿瘤的发生发展及耐药、预后都存在密切相关性^[3]。本研究拟探讨 CASC9 对相关分子 RAS 同源家族成员 A (RAS homolog family member A, RhoA) 的表达调控情况,为进一步厘清食管鳞癌的病机开拓思路,亦可为临床诊断、治疗、预后判断找到更为安全有效的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人食管鳞癌细胞系 Eca109、TE-1、Kyse150 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。RPMI 1640 培养基 (Gibco);胎牛血清 (四季青);无脂肪牛血清白蛋白 (FAF-BSA, Sigma);RNA 提取试剂盒 SV Total RNA Isolation System (Promega);逆转录试剂盒 (Perfect Real Time)、荧光定量 PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司);Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司);兔抗人 RhoA 多克隆抗体 (Proteintech 公司);RIPA、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 化学发光试剂盒 (碧云天公司)。引物由上海生工生物工程有限公司合成,其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞生物信息学分析 从 TCGA 数据库中下载食管癌数据集,提取 CASC9 表达信息,分析数据集中 CASC9 在 ESCC 癌组织、癌旁组织和正常组织中的表达差异。使用 TCGA 数据进行 CASC9 与 RhoA 进行相关性分析,相关性采用 Pearson 系数检验。

1.2.2 细胞培养 Eca109、TE-1、Kyse150 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素 G 和 100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育中饱和湿度培养。

1.2.3 RT-qPCR 检测 si-CASC9 的沉默效率及 RhoA 的 mRNA 表达水平 si-CASC9 由上海吉玛制药技术有限公司合成,靶序列为:5'-GCCUGUGAUAGCAGAACAATT-3'。阴性对照 (negative control, NC) 序列为 5'-UUCUUCGAACGUGU-CACGUTT-3'。取 CASC9 高表达细胞株接种于 6 孔板 (2 × 10⁵ 个/孔),次日细胞融合度达 50% 时,用 Lipofectamine™ 2000 作为转染试剂,将 NC 和 si-CASC9 瞬时转染 Eca109 和 Kyse150 细胞,培养 48 h 后提取总 RNA。反转录后采用 RT-qPCR 检测 CASC9 表达情况和 RhoA 的 mRNA 表达水平。见表 1。

1.2.4 CCK8 检测细胞活性 取对数生长期细胞消化并计数,接种于 96 孔板 (10 000 个/孔),次日

细胞融合度达 50% 时,NC 和 si-CASC9 瞬时转染 Eca109 和 Kyse150 细胞,每孔设置 4 个复孔,置于培养箱中培养,分别于转染后 0、24、48、72 h 按 10 μL/孔加入 CCK-8 溶液,轻敲混匀,培养箱培养 2 h 后在酶标仪中检测 450 nm 波长下的吸光度。连续检测 4 d 后,绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	序列	产物长度 (bp)
CACS9	F 5'-AGCAGCAAATGTGTCCATC-3'	70
	R 5'-CAGACAGCAGCAAAGCAAT-3'	
HPRT	F 5'-TGAGGATTTGAAAGGGTGT-3'	18
	R 5'-GAGCACACAGAGGGCTACAA-3'	
RhoA	F 5'-GAAGAGGCTGGACTCGGATT-3'	8
	R 5'-AGCAAGCATGCTTTCCACA-3'	

1.2.5 细胞划痕实验 接种细胞前在 12 孔板背面标记两条直线。将对数生长期的 Kyse150 细胞以 2.5 × 10⁵ 个/孔浓度接种入 12 孔板。24 h 后用 100 μL 无菌枪头垂直于两条记号线划痕,磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 润洗两次,倒置显微镜拍照记录 0 h 的划痕宽度。随后将 NC 和 si-CASC9 瞬时转染 Eca109 和 Kyse150 细胞,分别于转染后 24 h、48 h 再次拍摄划痕愈合情况,Image J 软件分析划痕愈合百分比。实验重复 3 次,根据收集图片数据分析实验结果。

1.2.6 细胞侵袭实验 将 NC 和 si-CASC9 瞬时转染 Eca109 和 Kyse150 细胞,转染 48 h 后消化收集洗涤细胞,含 0.1% BSA 的 1640 培养液调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个/mL,以 100 μL/孔接种于铺胶后的 Transwell 上室,下室为完全培养基,培养箱培养 24 h,固定后用结晶紫染色后计数拍照。实验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 将 si-CASC9 组及 NC 组 Eca109 细胞瞬时转染 72 h 后收集细胞,提取总蛋白,取上清进行 BCA 总蛋白浓度测定。蛋白变性处理后 SDS-PAGE 电泳分离 (每孔 40 g 等体积上样),半干转至 PVDF 膜 (15 V, 23 min),5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗 (1:1 000) 4 °C 摇床孵育过夜,二抗 (1:1 000) 室温孵育 60 min, ECL 化学发光显色,用 Image J 图像分析软件进行数据分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较使用成组 *t* 检验;等级资料以频数表示,组间比较使用 *U* 检验;计数资料以 [*n* (%)] 表示,组间比较使用独立样本 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-qPCR 检测 3 种食管鳞癌细胞株中 CASC9 的表达水平及 si-CASC9 的沉默效率

利用来自 TCGA 食管鳞癌数据集中 CASC9 表达量绘制箱型图,结果显示 ESCA 和 ESCC 组织中 SAA1 的表达高于正常组织。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较 3 种食管鳞癌细胞株中 CASC9 表达量, Kyse150 表达量最高, TE-1 中的表达量最低。3 种细胞株间 CASC9 表达水平有统计学差异 ($P < 0.05$)。故选择 Kyse150

和 Eca109 两株细胞系进行后续实验。瞬时转染 Kyse150 和 Eca109 两株细胞后, 荧光定量 PCR 检测 NC 组和 si-CASC9 组中 CASC9 的相对表达量。与 NC 组比较, si-CASC9 组中 CASC9 表达量下降, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 沉默 CASC9 对 Eca109 和 Kyse150 迁移能力的影响

Kyse150 和 Eca109 细胞系 si-CASC9 组划痕愈合百分比在 24 及 48 h 均小于 NC 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

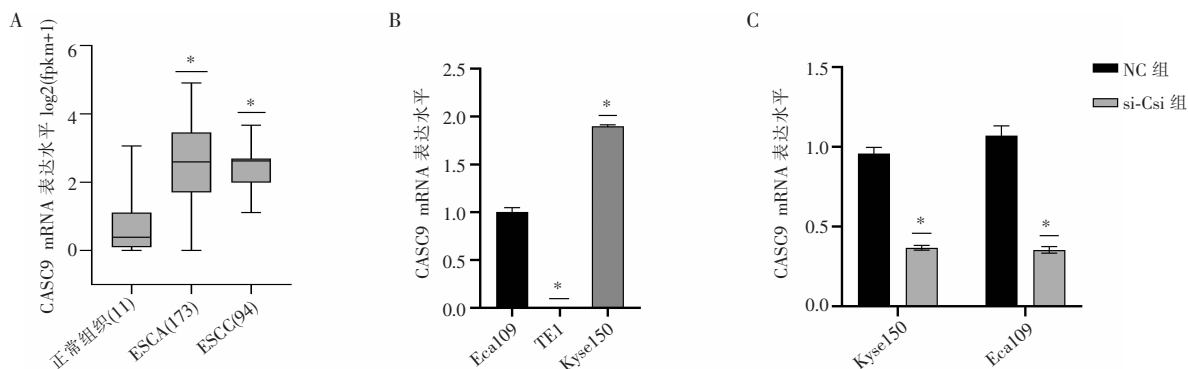


图1 CASC9 在人食管癌组织和细胞株中的表达

A. TCGA 食管鳞癌数据集中 ESCA 和 ESCC 组织中 CASC9 的表达水平, $*P < 0.05$, 与正常组织比较; B. CASC9 在人 ESCC 细胞系中的表达情况, $*P < 0.05$, 与 Eca109 比较; C. RT-qPCR 检测 Eca109 和 Kyse150 细胞中 CASC9 的沉默效率, $*P < 0.05$, 与 NC 组相比。

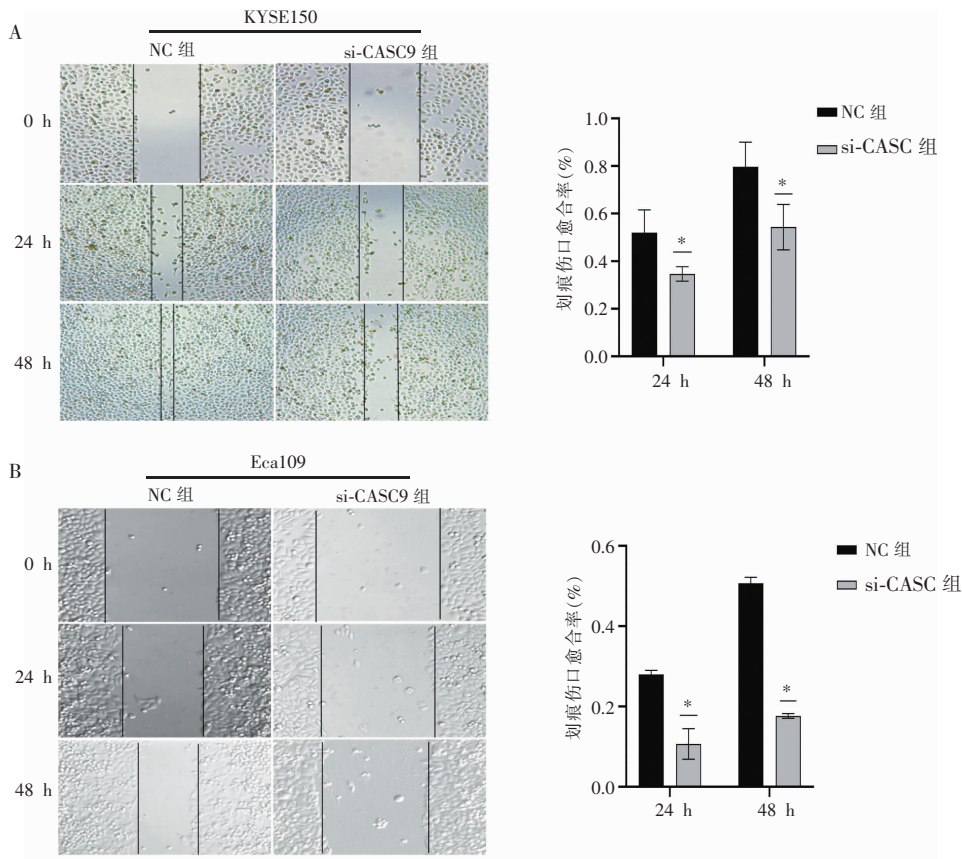


图2 转染 si-CASC9 后细胞的迁移能力

A. 转染 si-CASC9 24 及 48 h 后 Kyse150 细胞的迁移能力和划痕愈合面积柱状分析图; B. 转染 si-CASC9 24 及 48 h 后 Eca109 细胞的迁移能力和划痕愈合面积柱状分析图。 $*P < 0.05$, 与 NC 组比较。

2.3 沉默 CASC9 对 Eca109 和 Kyse150 细胞体外增殖活力和侵袭能力的影响

si-CASC9 组的 Kyse150 和 Eca109 细胞体外增殖活力低于 NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。si-CASC9 组穿膜细胞数低于 NC 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

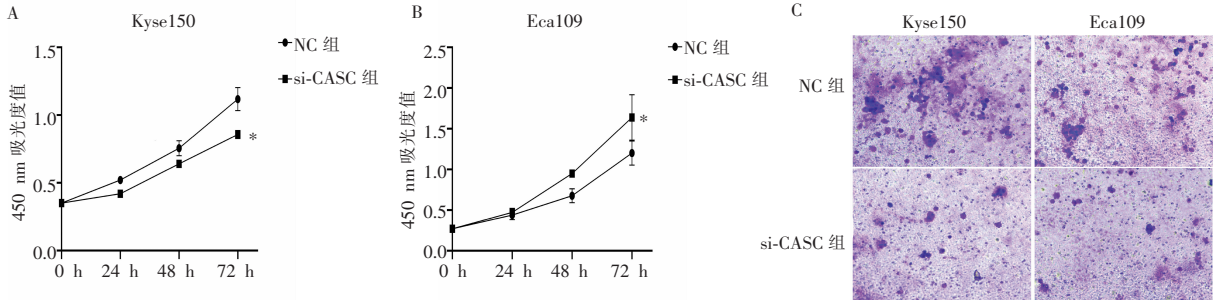


图 3 沉默 CASC9 的表达可抑制 Eca109 和 Kyse150 细胞的增殖活力和侵袭能力

A. 沉默 CASC9 的表达后, 两组 Kyse150 细胞增殖活性比较; B. 沉默 CASC9 的表达后, 两组 Eca109 细胞增殖活性比较; C. 沉默 CASC9 的表达两组 Eca109 和 Kyse150 细胞侵袭能力比较。* $P < 0.05$, 与 NC 组相比。

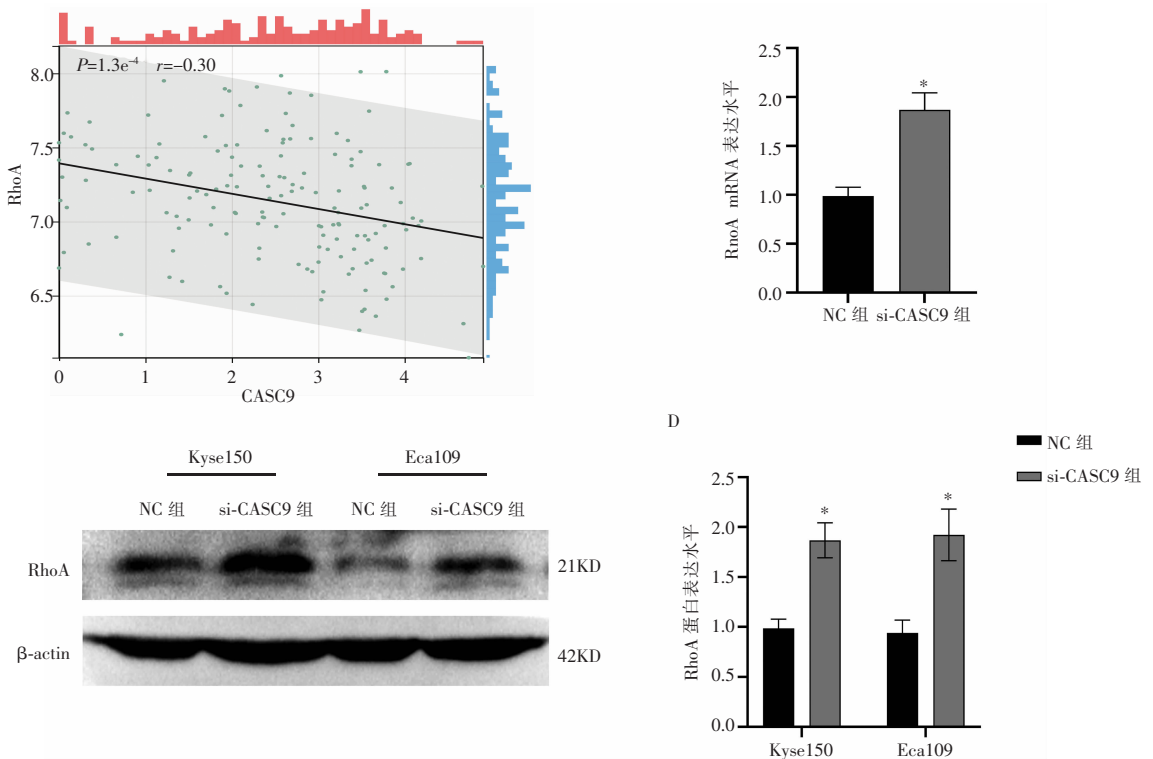


图 4 CASC9 调控食管鳞癌细胞系 Eca109 和 Kyse150 中 RhoA 的表达

A. TCGA 食管鳞癌数据集中 CASC9 和 RhoA 的相关性分析; B. 沉默 CASC9 的表达对 RhoA mRNA 表达的影响; C. 沉默 CASC9 的表达对 RhoA 蛋白表达的影响; D. 蛋白表达量柱状分析图。* $P < 0.05$, 与 NC 组比较。

3 讨论

lncRNA 占据人类基因组的 90%, 虽然不具有蛋白质编码潜力, 但可通过调节转录和表观遗传等过程, 在个体生长发育、细胞增殖分化、肿瘤的发生

2.4 沉默 CASC9 后 RhoA 的 mRNA 和蛋白的表达情况

来自 TCGA 食管鳞癌数据集相关性分析显示 CASC9 与 RhoA 表达量呈负相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 检测显示, 与 NC 相比, si-CASC9 组中 RhoA mRNA 及蛋白表达水平均上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

发展等生理病理过程中均发挥重要的调控作用, 是细胞功能的重要参与者^[4], 尤其是 lncRNA 与食管癌的相关研究颇受关注^[5-8]。CASC9 在肝癌、肺鳞癌、口腔鳞癌、胃癌、卵巢癌等不同肿瘤中均存在显著过表达, 并且参与调控多种肿瘤恶性生物学行为、

癌症复发、化疗耐药等过程^[9-11]。Wu 等^[5]研究显示,CASC9 在食管鳞癌组织中的表达水平是癌旁组织的 355 倍,且 CASC9 表达量与肿瘤大小、TNM 分期正相关,干扰 CASC9 表达可抑制癌细胞的侵袭和转移能力;Pan 等^[6]也提示,ESCC 中 CASC9 的表达情况与肿瘤细胞分化程度相关,并通过下调 CASC9 的表达发现其可降低肿瘤细胞的转移能力;Liang 等^[7]也证实了 CASC9 在食管鳞癌中促进了肿瘤细胞的转移。

本研究显示,在 3 种不同食管鳞癌细胞株中 CASC9 表达水平存在差异,分化程度最低的 Kyse150 表达水平远高于另外两种高分化细胞株,表明 CASC9 的高表达与 ESCC 的低分化有关。而一般认为肿瘤细胞的分化程度与其增殖和转移能力呈负相关,而肿瘤转移潜能与肿瘤细胞在体内或体外的迁移能力呈正相关。本研究通过合成特异性 siRNA 成功干扰 CASC9 在 Eca109 和 Kyse150 中的表达后发现,肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力受到明显抑制,说明 CASC9 对肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭发挥重要的调控作用,可促进肿瘤细胞的恶性生物学行为,与 Pan 等^[6]研究结果一致。Gramantieri 等^[10]在肝细胞癌的体外研究中同样采用干扰 CASC9 表达的方法,但肿瘤细胞的增殖率并没有出现明显差异;同时,干扰 CASC9 的表达反而促进了肿瘤细胞的迁移。究其原因可能是由于非编码 RNA 在不同的肿瘤和不同肿瘤亚型中表达情况不一致,调节模式亦存在不同。因此,CASC9 在不同的肿瘤类型中发挥致癌或抑癌功能需要具体讨论,而 lncRNA 的这种调节特点在同为非编码 RNA 的 microRNAs 中已得到了广泛的证实。

Rho GTPases 家族在细胞的迁移中发挥重要作用,RhoA 是 Rho GTPases 家族中研究较多的分子之一。近年研究^[12-14]显示,RhoA 可能是一种抑癌基因。Lawson 等^[12]在小鼠乳腺癌模型的相关研究中发现 RhoA 基因敲减后增加了乳腺癌淋巴结和肺转移,提示 RhoA 在乳腺癌中具有潜在的肿瘤转移抑制能力;Alkasalias 等^[13]研究结果也发现敲除 RhoA 的成纤维细胞在体外失去了正常的抑制能力,在体内诱导肿瘤生长,在体外诱导肿瘤细胞迁移和增殖;Rodrigues 等^[14]指出 RhoA 失活导致肿瘤细胞迁移显著增加,且 RhoA 蛋白水平降低与肿瘤分化不良相关。本研究发现,CASC9 沉默表达后,通过上调 RhoA 的表达显著抑制 Kyse150 细胞的增殖和迁移能力,与上述研究^[14]结果相似。CASC9 的表达与食管鳞癌 Eca109 和 Kyse150 细胞的增殖、迁移和侵袭能力密切相关,且可能通过调节 RhoA 的表达来

实现。

综上,CASC9 是一种重要的致癌因子,沉默 CASC9 在 Eca109 和 Kyse150 中的表达能明显抑制肿瘤细胞的增殖和迁移和侵袭能力,可能与调节 RhoA 的表达相关。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Liu SJ, Dang HX, Lim DA, *et al.* Long noncoding RNAs in cancer metastasis[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2021, 21(7): 446-460.
- [3] Noh JH, Gorospe M. AKTions by cytoplasmic lncRNA CASC9 promote hepatocellular carcinoma survival[J]. *Hepatology*, 2018, 68(5): 1675-1677.
- [4] Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393-407.
- [5] Wu Y, Hu L, Liang Y, *et al.* Up-regulation of lncRNA CASC9 promotes esophageal squamous cell carcinoma growth by negatively regulating PDCD4 expression through EZH2[J]. *Molecular Cancer*, 2017, 16(1): 150.
- [6] Pan Z, Mao W, Bao Y, *et al.* The long noncoding RNA CASC9 regulates migration and invasion in esophageal cancer[J]. *Cancer Medicine*, 2016, 5(9): 2442-2447.
- [7] Liang Y, Chen X, Wu Y, *et al.* LncRNA CASC9 promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis through upregulating LAMC2 expression by interacting with the CREB-binding protein[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2018, 25(11): 1980-1995.
- [8] 蒲文杰. 长链非编码 RNA THOR 在食管鳞状细胞癌中的表达及作用机制研究[D]. 南充: 川北医学院, 2021.
- [9] 方正月, 杨凯, 赵丹, 等. LncRNA CASC9 高表达激活 PI3K/AKT 信号通路促进口腔鳞癌细胞增殖转移[J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44(7): 898-904.
- [10] Gramantieri L, Baglioni M, Fornari F, *et al.* LncRNAs as novel players in hepatocellular carcinoma recurrence[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(80): 35085-35099.
- [11] Chang J, Zhang Y, Ye X, *et al.* Long non-coding RNA (LncRNA) CASC9/microRNA (miR)-590-3p/sine oculis homeobox 1 (SIX1)/NF- κ B axis promotes proliferation and migration in breast cancer[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8709-8723.
- [12] Lawson CD, Fan C, Mitin N, *et al.* Rho GTPase transcriptome analysis reveals oncogenic roles for rho GTPase-activating proteins in basal-like breast cancers[J]. *Cancer Research*, 2016, 76(13): 3826-3837.
- [13] Alkasalias T, Alexeyenko A, Hennig K, *et al.* RhoA knockout fibroblasts lose tumor-inhibitory capacity in vitro and promote tumor growth in vivo[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(8): E1413-E1421.
- [14] Rodrigues P, Macaya I, Bazzocco S, *et al.* RHOA inactivation enhances Wnt signalling and promotes colorectal cancer[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5458.

(收稿日期: 2023-01-17

修回日期: 2023-03-09)