

LINC00261 通过靶向 miR-23a-3p/ZNF292 轴抑制食管鳞状细胞癌的增殖、侵袭与转移

米源¹, 李旭哲², 王占鹏³, 刘延杰⁴, 宋春涛¹, 王澜涛¹, 王雷⁴

¹河北医科大学第四医院急诊科, 河北石家庄 050000; ²河北医科大学基础医学院临床医学系, 河北石家庄 050000; ³故城县医院急诊科, 河北衡水 053000; ⁴河北医科大学第四医院胸二科, 河北石家庄 050000

摘要:目的 探讨长链非编码RNA LINC00261 对食管鳞状细胞的增殖、侵袭及转移等生物学行为的影响。方法 通过GEO数据库中GSE149612数据集分析食管鳞状细胞癌中的差异分子。收集临床食管鳞状细胞癌及正常食管组织样本及多种食管鳞状细胞癌细胞系细胞和正常食管上皮细胞HEEC细胞, 通过PCR技术检测LINC00261的表达变化。过表达LINC00261再分为pcDNA组和pcDNA-LINC00261组, CCK-8、克隆形成实验检测细胞增殖能力, Transwell和流式细胞术分析其对细胞侵袭转移和凋亡的影响。ENCORI等相关生物信息学网站对LINC00261的靶点进行预测, 双荧光素酶实验及Western blotting实验进行验证, 裸鼠皮下移植瘤实验验证了LINC00261对食管鳞状细胞癌的影响。结果 LINC00261在食管鳞状细胞癌中显著低表达, 并且在临床食管鳞状细胞癌样本及细胞系中同样表达量明显降低($P < 0.05$); 通过过表达LINC00261, 发现其明显抑制了食管鳞状细胞癌的增殖、侵袭和转移并促进了肿瘤细胞的凋亡($P < 0.05$)。通过生物信息学网站的预测和双荧光素酶报告基因测定, 验证了LINC00261靶向miR-23a-3p/ZNF292的关系。裸鼠皮下移植瘤实验发现通过过表达LINC00261可以明显抑制食管鳞状细胞癌的增殖和转移($P < 0.0001$)。结论 LINC00261可以通过靶向miR-23a-3p/ZNF292抑制人食管鳞状细胞癌的增殖、侵袭和转移, 为食管鳞状细胞癌的治疗提供新的依据。

关键词: 食管鳞状细胞癌; LINC00261; miR-23a-3p; ZNF292

LINC00261 suppresses esophageal squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by targeting the miR-23a-3p/ZNF292 axis

MI Yuan¹, LI Xuzhe², WANG Zhanpeng³, LIU Yanjie⁴, SONG Chuntao¹, WANG Lantao¹, WANG Lei⁴

¹Department of Emergency Medicine, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; ²Department of Clinical Medicine, School of Basic Medical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; ³Department of Emergency Medicine, Gucheng County Hospital, Hengshui 053000, China; ⁴Department of Thoracic Surgery, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To evaluate the regulatory effects of lncRNA LINC00261 on proliferation, invasion, and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells. **Methods** The differentially expressed RNAs in ESCC were identified using the GSE149612 dataset from the GEO database. PCR was used to detect LINC00261 expression levels in clinical ESCC and normal esophageal tissue samples and in multiple ESCC cell lines and normal esophageal epithelial cells (HEEC). In ESCC cells, the effects of overexpression of LINC00261 on cell proliferation, invasion, metastasis and apoptosis were analyzed using CCK-8 assay, clone formation assay, Transwell assay and flow cytometry. The potential targets of LINC00261 were predicted using bioinformatics tools including ENCORI and verified using dual-luciferase reporter assay and Western blotting. The effects of LINC00261 overexpression on ESCC were confirmed in a nude mouse model bearing ESCC xenograft. **Results** Analysis of the GSE149612 dataset revealed significantly lower LINC00261 expression in ESCC tissues and cell lines. In cultured ESCC cells, LINC00261 overexpression markedly suppressed cell proliferation, invasion, and metastasis and promoted cell apoptosis. Dual-luciferase reporter assays confirmed that LINC00261 targets the miR-23a-3p/ZNF292 axis. In the tumor-bearing mouse model, LINC00261 overexpression significantly inhibited ESCC xenograft proliferation and metastasis. **Conclusion** LINC00261 suppresses ESCC progression by targeting the miR-23a-3p/ZNF292 axis, suggesting a potential therapeutic strategy for ESCC treatment.

Keywords: esophageal squamous cell carcinoma; LINC00261; miR-23a-3p; ZNF292

收稿日期: 2025-05-12

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划资助(20240625); 河北省省级科技计划项目(22377769D); 河北省省级科技计划基础研究专项(自然科学基金)联合基金项目(H202206391); 河北医科大学第四医院科研创新团队项目(2023B02); 中国青年医学创新研究科研课题项目(P250125108786); 中国抗癌协会肿瘤领域区域性科研培育基金项目(CESTDQLCORP300-07)

作者简介: 米源, 博士, 主治医师, E-mail: miyuan_medicine@163.com

通信作者: 王雷, 博士, 主任医师, 教授, E-mail: wangleidocor@hebm.edu.cn

食管癌是一种高度侵袭性的恶性消化道肿瘤, 是全球第7大常见癌症, 也是全球癌症相关死亡的第6大常见原因^[1,2]。中国食管癌的年发病率和死亡率占全球总病例数的一半以上^[3]。在中国, 食管癌是第6大最常见的恶性肿瘤, 也是癌症相关死亡的第4大原因^[4]。食管癌主要分为食管鳞状细胞癌和食管腺癌两种组织学亚型, 在高收入国家, 大多数食管癌患者患有食管腺癌。食管鳞状细胞癌主要分布于东亚地区, 在中国, 超过90%的食管癌病例是食管鳞状细胞癌^[5,6]。尽管近年来

食管癌的治疗取得了长足的进步,但食管鳞状细胞癌的预后仍然很差,5年生存率不到30%,在过去的30年里,FDA只批准了3种针对食管腺癌的靶向疗法,而对食管鳞状细胞癌的靶向药物未见进展^[7,8]。食管鳞状细胞癌的查出时间较晚;淋巴结转移较早;手术治疗难以根除;治疗后容易复发转移是导致食管鳞状细胞癌预后不良的主要原因^[9]。因此,进一步了解食管鳞状细胞癌增殖、侵袭和转移的分子机制对于改进治疗方法和策略以及改善临床预后具有深远的科学意义和价值。

长链非编码RNA(lncRNA)是一种转录长度超过200个核苷酸且不具有蛋白质编码能力的调节RNA^[10]。LncRNA已被证明与肿瘤的发生和发展密切相关。LncRNA通过多样化的机制在转录调控、转录后调控、表观遗传学等多个方面调控编码基因的表达,从而在驱动恶性表型和调节细胞信号转导等方面发挥着重要作用^[11]。目前,lncRNA在肿瘤中的作用是一个研究热点,包括乳腺癌^[12]、胃癌^[13]和膀胱癌^[14]。此外,lncRNAs在食管鳞状细胞癌中的作用也已有少量报道。例如,lncRNA KLF3-AS1通过调节miR-185-5p/KLF3轴影响食管鳞状细胞癌的侵袭转移^[15]。研究发现LINC00261是一种肿瘤抑制因子,并发现它在甲状腺癌等癌症中发挥着重要作用,但其在食管鳞状细胞癌中的表达情况及其在食管鳞状细胞癌中的作用机制仍不清楚^[16]。本研究从临床样本及生物测序结果出发,从细胞、分子生物学及动物体水平探讨了LINC00261对食管鳞状细胞癌的增殖、侵袭转移等生物学过程的影响及可能调控通路的研究,为食管鳞状细胞癌的靶向治疗和改善患者预后奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人食管鳞状细胞癌细胞系Eca150、Eca9706、TE-1和Eca109以及正常食管上皮细胞HEEC细胞由河北医科大学第四医院提供,20对临床食管鳞状细胞癌及正常食管组织标本由河北医科大学第四医院胸外科提供,并收集了食管鳞状细胞癌患者的生存时间信息。pcDNA和pcDNA-LINC00261(吉玛生物科技有限公司),LINC00261和GAPDH引物(生工生物工程股份有限公司),RNA提取试剂盒(ThermoFisher),反转录试剂盒(诺唯赞生物科技有限公司),荧光定量PCR试剂盒(广州易锦生物技术有限公司),ZNF292兔抗人单克隆抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司),GAPDH鼠抗人单克隆抗体、Ki67兔抗人单克隆抗体、Vimentin兔抗人单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),Transwell膜嵌套(本生(天津)健康科技有限公司),CCK-8试剂盒(大连美仑生物技术有限公司),凋亡试剂盒(武汉赛维

尔生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 从GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)网站下载GSE149612数据集信息,通过服务器linux进行指控、比对、定量、压缩,并通过DESeq2进行差异分析,再通过R语言进行绘图。通过ENCORI(<https://rnasyu.com/encori/>)数据库下载食管癌组织及正常组织中LINC00261的表达信息。通过ENCORI网站下载食管癌中LINC00261、miR-23a-3p与ZNF292的相关性分析结果。DIANA(<https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/diana/web/index.php?r=tarbasev8>)和miRDB(<https://mirdb.org/>)以及ENCORI网站对miR-23a-3p的下游靶点进行分析。

1.2.2 细胞培养和转染 将Eca150、TE-1和Eca109和Eca9706食管鳞状细胞癌细胞系细胞均在含有10%胎牛血清的RPMI 1640中培养,并在5% CO₂、37 °C的培养箱中进行培养。pcDNA-LINC00261过表达载体、pcDNA对照组载体按照Lipofectamine 3000说明书将这些质粒转染到细胞中。

1.2.3 qRT-PCR法检测基因的表达 将各组细胞按提取试剂盒说明书提取总RNA,然后按照反转录试剂盒说明书配体系上机进行反转录。按照荧光定量PCR试剂盒的说明书配体系进行qRT-PCR定量分析。该值使用2^{-ΔΔCt}方法进行计算,以GAPDH作为内参。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列(表1)。

表1 PCR中引物的序列

Tab.1 Sequences of primers for qRT-PCR

Gene	Sequences of primers
LINC00261	Forward 5'-AAGACCAGCTCAACCATCGC-3'
	Reverse 5'-TGCCATTCCTGTGAATTGATGA-3'
GAPDH	Forward 5'-TGACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	Reverse 5'-CGCCTGCTTCACCACCTTCTT-3'

1.2.4 CCK-8 将每组细胞以1×10³/孔的浓度加入96孔板中,每组3个重复孔。将每组细胞在37 °C、5% CO₂细胞培养箱中培养0、24、48、72、96 h。在每个时间点加入10 μL CCK-8溶液,并在37 °C的温度下孵育2 h。然后测量吸光度值A_{450nm}。

1.2.5 菌落形成实验 将每组对数生长细胞以1×10³细胞/孔的浓度接种到6孔板中,并在5% CO₂、37 °C培养箱中孵育7 d。然后,用PBS清洗6孔板,用4%多聚甲醛在室温下固定20 min,在用PBS清洗6孔板,再用结晶紫溶液染色20 min。最后,晾干计算相对菌落形成。

1.2.6 Transwell侵袭转移实验 将各组转染好的细胞按5×10⁴浓度溶解到不含胎牛血清的基础培养基中,然后

接种在 Transwell 的上室中总体积不超过 300 μL 。下室中加入含胎牛血清的完全培养基 600 μL 。然后将细胞放到培养箱中孵育 24 h。然后洗去 Transwell 上室中的溶液,用 4% 多聚甲醛进行固定 15 min,用 PBS 清洗后用结晶紫染色 15 min,用 PBS 清洗晾干后在显微镜下进行计数拍照。侵袭实验需要在前 1 d 将 Matrigel 胶溶解涂到 Transwell 上室中并放到培养箱中使其凝固。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组食管鳞状细胞癌细胞并悬浮在 100 μL 缓冲溶液中。每管细胞加用 FITC 和 PI 染料 5 μL ,避光染色 20 min。之后向每管中加入 400 μL 结合缓冲液,并在 1 h 内通过流式细胞仪评估细胞凋亡。

1.2.8 细胞核 RNA 和细胞质 RNA 的分离 按照试剂盒的说明书,使用细胞质和核 RNA 纯化试剂盒分离细胞核和细胞质 RNA。纯化和 DNaseI 处理后,如上所述,将分离的细胞核或细胞质 RNA 逆转录并用于 PCR。

1.2.9 双荧光素酶测定 通过查阅文献结合 targetscan 网站 (https://www.targetsca.com/vert_80) 的结合位点信息构建了相应的突变质粒,使用 Lipofectamine 3000 将 LINC00261-WT 或 LINC00261-MUT 与 miR-23a-3p 模拟物或 NC 共转染到 Eca150 细胞中。使用 Lipofectamine 3000 也将 ZNF292-WT 或 ZNF292-Mut 与 miR-23a-3p 模拟物或 NC 共转染到 Eca150 细胞中。48 h 后,根据方案通过双 Glo 荧光素酶测定系统检测相对荧光素酶活性。海肾信号用于使荧光素酶活性标准化。

1.2.10 Western blotting 使用含有 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解每组细胞获取每组的蛋白质。然后使用 10% SDS-PAGE 凝胶分离它们并通过冰水浴转移到 PVDF 膜上。将膜在室温下用快速封闭液密封半 h。然后加入一抗并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。第 2 天用 TBST 洗膜后加入对应二抗孵育 2 h,最后用 ECL 试剂显色。使用抗体分别为 GAPDH(1:50 000)、ZNF292(1:1000)。

1.2.11 裸鼠皮下移植瘤 动物实验均符合《实验动物护理和使用指南》(伦理批号:20240318),裸鼠购自思研(北京)生物技术有限公司,取 10 只 6 周龄、体质量 18~22 g 的雄性 BALB/c 裸鼠。这些小鼠在 SPF 级标准的无菌环境中饲养。将各组构建好的稳定转染的 Eca150 细胞按 5×10^6 的浓度注射到小鼠的腋下,5 只/组。接种后观察小鼠的肿瘤重量变化。注射后 3 周左右,对小鼠实施安乐死,并提取肿瘤组织进行称重及免疫组化实验。

1.2.12 免疫组织化学 从肿瘤组织中去除蜡并恢复其水分后,使用 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)进行抗原修复。添加抗 Ki-67(1:400)、抗 Vimentin(1:400)和抗 ZNF292(1:200),在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下持续 1 晚。在此之后,使用 HRP 二抗和 DAB 显影剂进行免疫测定。

1.3 统计学分析

本文将实验数据表示为均数 \pm 标准差。GraphPad Prism 8 用于分析和绘制所有数据。采用 *t* 检验比较两组之间的差异,以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LINC00261 在食管鳞状细胞癌中明显低表达

GSE149612 数据集的分析结果显示 LINC00261 在食管鳞状细胞癌组织中明显低表达(图 1A、B);通过 ENCORI 网站信息同样发现 LINC00261 在食管癌组织明显低表达(图 1C);qRT-PCR 结果显示 LINC00261 在食管鳞状细胞癌组织中表达降低($P < 0.0001$,图 1D),相比于正常组。LINC00261 表达量明显降低($P < 0.05$),相比于正常食管上皮 HEEC 细胞(图 1E~H)。将 LINC00261 的表达量按中位数进行排序分为高表达组和低表达组,结果显示高表达组患者生存时间明显延长($P = 0.0332$,图 1I)。

2.2 过表达 LINC00261 可以明显抑制食管鳞状细胞癌的增殖、侵袭转移

qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,pcDNA-LINC00261 组中 LINC00261 表达明显增加(Eca150: $P < 0.0001$,Eca9706: $P = 0.0071$,图 2A)。CCK-8(Eca150: $P < 0.0001$,Eca9706: $P = 0.0057$,图 2B)和克隆形成实验(Eca150: $P = 0.0058$,Eca9706: $P = 0.0010$,图 2C)显示,LINC00261 的过表达组明显抑制了细胞活力并减少了细胞中的集落数量。Transwell 侵袭转移实验结果显示相比对照组,LINC00261 的过表达组细胞的侵袭(Eca150: $P < 0.0001$,Eca9706: $P < 0.0001$,图 2D)和转移能力(Eca150: $P < 0.0001$,Eca9706: $P < 0.0001$,图 2D)明显降低。此外,流式细胞术检测凋亡的结果显示,与对照组相比,pcDNA-LINC00261 组的凋亡细胞显著增加(Eca150: $P = 0.0024$,Eca9706: $P < 0.0001$,图 2E)。

2.3 LINC00261 通过结合 miR-23a-3p 靶向作用 ZNF292

LINC00261 主要位于细胞质中(图 3A),生物信息学预测显示,LINC00261 和 miR-23a-3p 在食管癌中是负相关关系($r = -0.512$, $P = 3.28 \times 10^{-12}$,图 3B),通过 ENCORI、DIANA 和 miRDB 三个网站对靶基因进行预测并取交集发现 530 个可能的靶基因(图 3C);通过查阅文献及相关性分析我们确定 ZNF292 作为 miR-23a-3p 的靶点,ENCORI 网站分析中 miR-23a-3p 与 ZNF292 成负相关($r = -0.468$, $P = 3.33 \times 10^{-10}$,图 3D),LINC00261 与 ZNF292 成正相关($r = 0.323$, $P = 2.69 \times 10^{-5}$,图 3E),LINC00261 序列和 miR-23a-3p 序列之间存在特异性结合位点,同时 miR-23a-3p 序列和 ZNF292 序列之间存在特异性结合位点(图 3F)。相比于对照组,miR-23a-3p 组 LINC00261-WT ($P < 0.0001$)、ZNF292-WT ($P < 0.0001$)

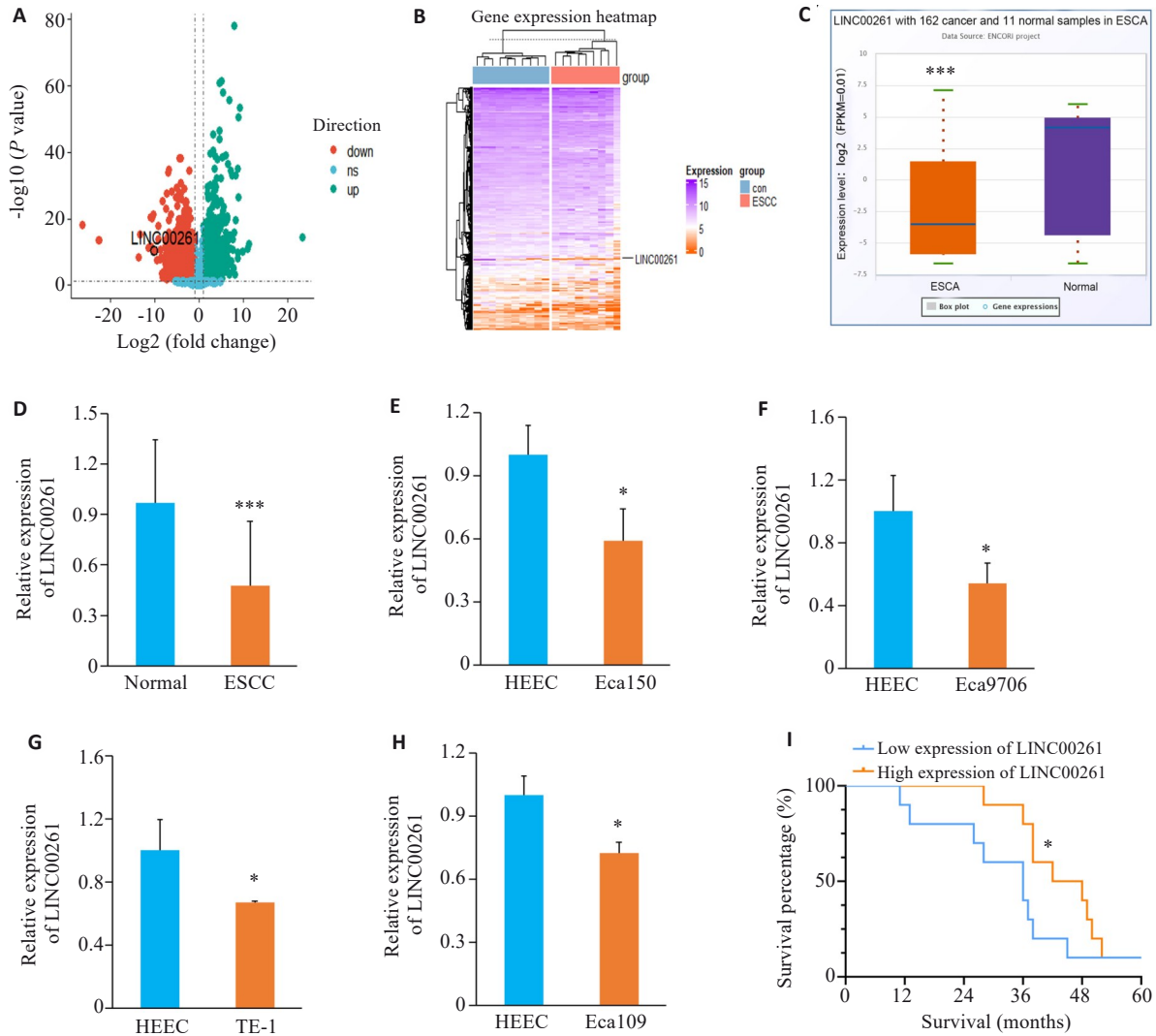


图1 LINC00261在食管鳞状细胞癌组织及细胞中低表达

Fig.1 LINC00261 is lowly expressed in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues and cells. A: Changes of each gene in the GSE149612 dataset. B: Expression of each gene in each tissue in the GSE149612 dataset. C: Expression of LINC00261 in ENCORI. D: Expression changes of LINC00261 in clinical ESCC and normal esophageal tissues. E-H: Expression of LINC00261 in ESCC cells and normal esophageal cells. I: Survival analysis of ESCC patients with high-level or low-level LINC00261 expression. * $P < 0.05$ vs HEEC, *** $P < 0.001$ vs Normal.

的荧光素酶活性明显降低,但 LINC00261-MUT、ZNF292-MUT 荧光素酶活性没有变化(图 3G)。Western blotting 检测显示 pcDNA-LINC00261 组 ZNF292 的表达相比于 pcDNA 组明显升高($P=0.0027$)。

2.4 体内实验验证 LINC00261 在食管鳞状细胞癌中的作用

与 pcDNA 组相比,pcDNA-LINC00261 组肿瘤质量明显降低($P=0.0009$,图 4A)。免疫组化结果显示增殖指标 Ki67 明显降低,转移指标 Vimentin 表达明显降低(图 4B)。

3 讨论

本研究首先通过分析食管鳞状细胞癌及正常食管的测序结果创新性地发现了 LINC00261 在食管鳞状细胞癌组织中明显低表达,并通过生物信息学网站、

临床组织样本及细胞实验进行了验证,证实了测序结果的准确性。LINC00261 的转录位点位于第 20 号染色体上^[17]。研究发现 LINC00261 在多种癌症中发挥着抑制肿瘤的作用,涉及多种细胞过程。例如,一项研究发现 LINC00261 是子宫内膜癌预后的潜在生物标志物^[18]。同样有研究报道 LINC00261 表达还可以减少乳腺癌细胞的增殖和迁移^[19]。

为了进一步明确 LINC00261 在食管鳞状细胞癌中的作用,我们通过食管鳞状细胞癌细胞系 Eca150 和 Eca9706 中过表达 LINC00261,结果发现通过过表达 LINC00261 可以明显抑制肿瘤的增殖、侵袭和转移。Yi Li 等在乳腺癌中同样发现 LINC00261 表达明显降低,并研究发现 LINC00261 可以吸附 miR-550a-3p 来调节 SDPR,从而抑制乳腺癌细胞的活力和微球形成,并降低乳腺癌干细胞生物学特性,而起到抗肿瘤的作

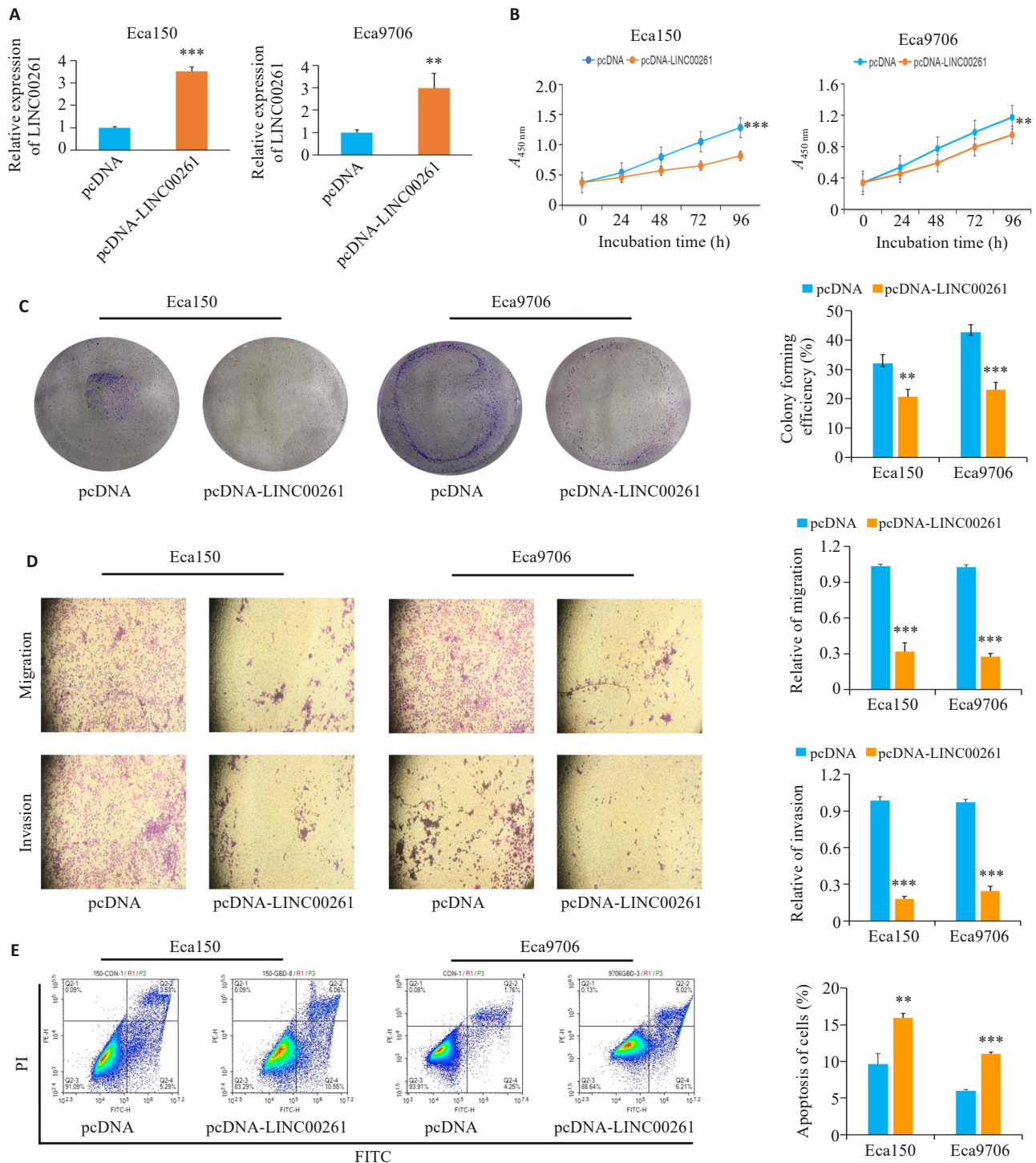


图2 过表达LINC00261可以抑制食管鳞状细胞癌的增殖、侵袭和转移并促进细胞凋亡

Fig.2 Overexpression of LINC00261 inhibits proliferation, invasion and metastasis of ESCC cells and promotes cell apoptosis. A: qRT-PCR for detecting expression changes of LINC00261 after overexpression. B: CCK-8 assay for assessing changes in cell proliferation ability. C: Clone formation assay for assessing cell proliferation ability. D: Transwell assay for assessing changes in cell invasion and metastasis abilities (×100). E: Detection of changes in cell apoptosis by flow cytometry. ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs pcDNA.

用^[19]。Zou等^[20]同样研究发现LINC00261在胰腺癌组织和细胞中低表达。LINC00261在胰腺癌细胞中通过靶向FOXP3对SCP2的负调节发挥抑制血管生成和阻滞细胞周期进程的作用。Liao等^[21]同样发现LINC00261在非小细胞肺癌组织和细胞系中的表达显著低于邻近正常组织或对照细胞系,通过过表达LINC00261其可

以通过下调Snail表达来影响上皮间质转化过程来抑制细胞增殖和转移。这些结果均表明LINC00261在多种肿瘤中发挥着肿瘤抑制因子的作用,现有研究并未明确报道LINC00261在食管鳞状细胞癌中的作用,本研究创新性的发现了LINC00261在食管鳞状细胞癌的抗肿瘤作用。

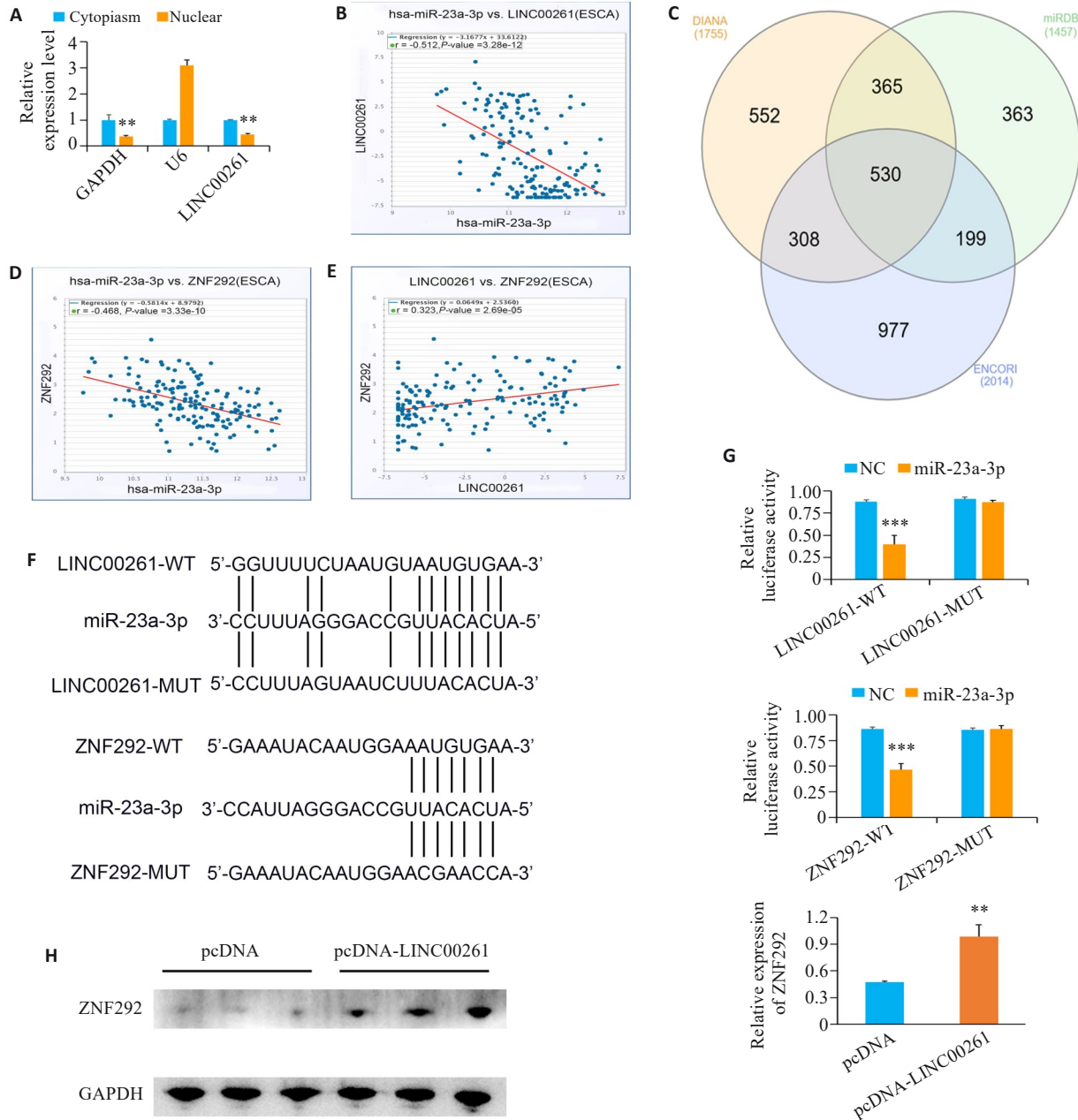


图3 食管鳞状细胞癌中LINC00261靶向miR-23a-3p/ZNF292发挥作用

Fig. 3 LINC00261 targets miR-23a-3p/ZNF292 in ESCC. A: Location of LINC00261 in ESCC cells. B: Correlation analysis of LINC00261 and miR-23a-3p in the ENCORI database. C: Prediction of the targeted genes of miR-23a-3p by ENCORI, DIANA and miRDB databases. D: Correlation analysis of miR-23a-3p and ZNF292 in the ENCORI database. E: Correlation analysis of LINC00261 and ZNF292 in the ENCORI database. F: Bioinformatics websites predict the potential binding sequences of LINC00261 with miR-23a-3p and miR-23a-3p with ZNF292. G: Binding of LINC00261 with miR-23a-3p, and miR-23a-3p and ZNF292 verified by luciferase reporter gene assay. H: Changes in the expression of ZNF292 after overexpression of LINC00261. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs pcDNA.

LncRNA可通过与细胞核或细胞质中的染色质、蛋白质或RNA相互作用,通过基因组表达调节、表观遗传修饰和顺式或反式转录后调控参与各种生理和病理的细胞活动^[22]。越来越多的报告表明,LncRNAs通过与特异性miRNA结合的ceRNA机制而对肿瘤的发生发展产生影响^[23]。并且在骨肉瘤^[24]、结肠癌^[25]等多种肿瘤中发现LINC00261均通过ceRNA机制发挥着抗肿瘤作用。因此,为了进一步挖掘并找到靶向的miRNA,我们

进行了一系列的后续研究。本研究通过亚细胞分离实验,发现LINC00261主要定位于食管鳞状细胞癌细胞的细胞质中,表明LINC00261可能通过作用miRNA调节其下游基因表达。我们通过生物信息学网站预测了LINC00261的靶标miRNA并确定了miR-23a-3p,据报道它在多种癌症中发挥促进肿瘤进展的作用,例如结肠癌^[26]、肝癌^[27]和口腔鳞状细胞癌^[28]等。此后,我们进一步探讨了miR-23a-3p对食管鳞状细胞癌进展的机

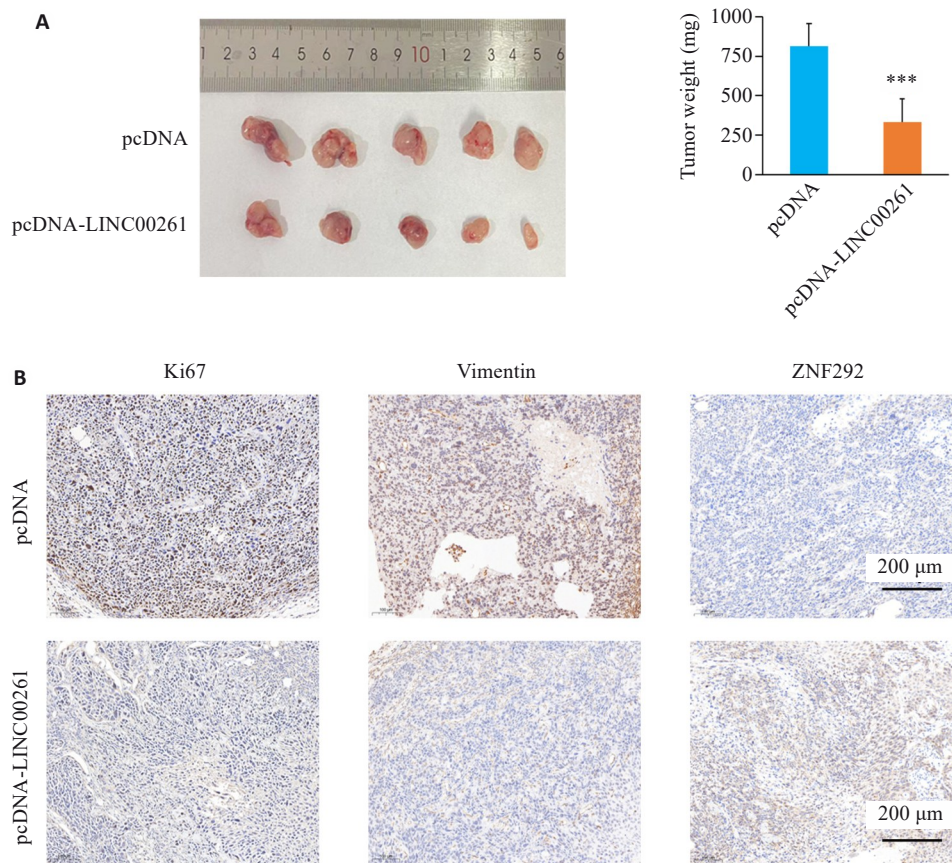


图4 LINC00261在体内裸鼠实验中可以影响食管鳞状细胞癌的增殖与转移

Fig.4 LINC00261 affects proliferation and metastasis of ESCC xenografts in nude mice. **A:** Weight changes of subcutaneous transplanted tumors in each group. **B:** Immunohistochemistry for Ki67, Vimentin and ZNF292 in the tumor tissues in each group. *** $P < 0.001$ vs pcDNA.

制。我们进一步通过生物信息学网站预测了 miR-23a-3p 的靶基因, 鉴定出 ZNF292 作为其靶点。ZNF292 是一种生长激素依赖性锌指转录因子, 属于 kruepel C2H2 型锌指蛋白家族。ZNF292 被认为是候选的肿瘤抑制基因。已在肝癌、结肠癌和骨髓瘤中发现其突变^[29]。Gong 等^[30] 研究发现 ZNF292 的低表达与食管鳞状细胞癌的不良预后相关, ZNF292 通过 SKP2/P27 信号抑制食管鳞状细胞癌的增殖。本研究又通过信息网站发现 LINC00261 与 miR-23a-3p 之间和 miR-23a-3p 与 ZNF292 之间存在负相关关系, 同时 LINC00261 与 ZNF292 之间存在正相关关系, 间接验证了 LINC00261 与 miR-23a-3p/ZNF292 的靶向作用, 最后本研究又通过裸鼠体内实验进一步说明了过表达 LINC00261 可以抑制食管鳞状细胞癌的增殖转移。Wang 等^[31] 仅在胰腺癌中发现 LINC00261 过表达通过降低胰腺癌细胞中 miR-23a-3p 的表达来抑制细胞活力和侵袭, 并增强了细胞凋亡, 但 miR-23a-3p 具体通过作用何种分子并未明确报道。并且在食管鳞状细胞癌的研究中仅研究了 LINC00261 对食管鳞状细胞癌顺铂、5-氟尿嘧啶等化疗耐药方面的机制研究^[4, 32], 并且其调控耐药的机制与本研究研究的 miR-23a-3p/ZNF292 通路是不同的, 而本

研究创新性的明确了 LINC00261 在食管鳞状细胞癌中的抗肿瘤作用及其可能通过 miR-23a-3p/ZNF292 通路发挥抗肿瘤的作用。

本研究发现, 在食管鳞状细胞癌组织和细胞中 LINC00261 水平均显著降低。过表达 LINC00261 可通过调节 miR-23a-3p/ZNF292 通路在体内和体外抑制肿瘤的增殖侵袭转移。因此, 本研究表明, LINC00261 可能作为食管鳞状细胞癌治疗的潜在靶点。本研究尚缺乏临床多中心数据的验证, 以及 ZNF292 作用的具体通路均有待接下来的研究中进一步地探索。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

[1] Zhao DY, Guo YP, Wei HF, et al. Multi-omics characterization of esophageal squamous cell carcinoma identifies molecular subtypes and therapeutic targets[J]. JCI Insight, 2024, 9(10): e171916.

[2] 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 Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.

[3] Guo HY, Shu JH, Hu GB, et al. Downregulation of RCN1 inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression and M2

- macrophage polarization[J]. *PLoS One*, 2024, 19(5): e0302780.
- [4] Wang LJ, Wang XJ, Yan PW, et al. LINC00261 suppresses cisplatin resistance of esophageal squamous cell carcinoma through miR-545-3p/MT1M axis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 687788.
- [5] Liu XJ, Zhao SM, Wang KK, et al. Spatial transcriptomics analysis of esophageal squamous precancerous lesions and their progression to esophageal cancer[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4779.
- [6] Yang ZL, Tian H, Chen XW, et al. Single-cell sequencing reveals immune features of treatment response to neoadjuvant immunochemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 9097.
- [7] Xia T, Meng L, Xu GX, et al. TRIM33 promotes glycolysis through regulating P53 K48-linked ubiquitination to promote esophageal squamous cell carcinoma growth[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(10): 740.
- [8] Zhou LT, Yao N, Yang L, et al. DUSP4 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression by dephosphorylating HSP90 β [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(5): 112445.
- [9] Chen DY, Chen TY, Guo YX, et al. Platycodin D (PD) regulates LncRNA-XIST/miR-335 axis to slow down bladder cancer progression in vitro and in vivo[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 396(1): 112281.
- [10] Yan QH, Wong W, Gong L, et al. Roles of long non-coding RNAs in esophageal cell squamous carcinoma (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2024, 54(2): 72.
- [11] Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long noncoding RNA and cancer: a new paradigm[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(15): 3965-81.
- [12] Smolarz B, Zadrozna-Nowak A, Romanowicz H. The role of lncRNA in the development of tumors, including breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8427.
- [13] Dai ZT, Wu YL, Xu T, et al. The role of lncRNA SNHG14 in gastric cancer: enhancing tumor cell proliferation and migration, and mechanisms of CDH2 expression[J]. *Cell Cycle*, 2023, 22(23/24): 2522-37.
- [14] Mehmandar-Oskuie A, Jahankhani K, Rostamlou A, et al. Molecular landscape of LncRNAs in bladder cancer: from drug resistance to novel LncRNA-based therapeutic strategies[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115242.
- [15] Liu JQ, Deng M, Xue NN, et al. lncRNA KLF3-AS1 suppresses cell migration and invasion in ESCC by impairing miR-185-5p-targeted KLF3 inhibition[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20: 231-41.
- [16] Tao QY, Li XJ, Xia YY, et al. LINC00261 triggers DNA damage via the miR-23a-3p/CELF2 axis to mitigate the malignant characteristics of 131I-resistant papillary thyroid carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2024, 40: 101858.
- [17] Li XY, Li JY, Lu P, et al. LINC00261 relieves the progression of sepsis-induced acute kidney injury by inhibiting NF- κ B activation through targeting the miR-654-5p/SOCS3 axis[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2021, 53(2): 129-37.
- [18] Fang QJ, Sang L, Du SH. Long noncoding RNA LINC00261 regulates endometrial carcinoma progression by modulating miRNA/FOXO1 expression[J]. *Cell Biochem Funct*, 2018, 36(6): 323-30.
- [19] Li Y, Wu CH. LINC00261/microRNA-550a-3p/SDPR axis affects the biological characteristics of breast cancer stem cells[J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(1): 188-201.
- [20] Zou J, Pei XZ, Xing D, et al. LINC00261 elevation inhibits angiogenesis and cell cycle progression of pancreatic cancer cells by upregulating SCP2 via targeting FOXP3[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(20): 9826-36.
- [21] Liao J, Dong LP. Linc00261 suppresses growth and metastasis of non-small cell lung cancer via repressing epithelial-mesenchymal transition[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(9): 3829-37.
- [22] Lin WY, Zhou QY, Wang CQ, et al. LncRNAs regulate metabolism in cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(7): 1194-206.
- [23] Xue ST, Zheng B, Cao SQ, et al. Long non-coding RNA LINC00680 functions as a CeRNA to promote esophageal squamous cell carcinoma progression through the miR-423-5p/PAK6 axis[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 69.
- [24] Han G, Guo QY, Ma N, et al. Apatinib inhibits cell proliferation and migration of osteosarcoma via activating LINC00261/miR-620/PTEN axis[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(18): 1785-98.
- [25] Yan DS, Liu WD, Liu YL, et al. LINC00261 suppresses human colon cancer progression via sponging miR-324-3p and inactivating the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 22648-56.
- [26] Zuo H, Liu S, Li X, et al. miR-23a-3p promotes the development of colon cancer by inhibiting the expression of NDRG4[J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(4): 933-40.
- [27] Lu YJ, Chan YT, Tan HY, et al. Epigenetic regulation of ferroptosis via ETS1/miR-23a-3p/ACSL4 axis mediates sorafenib resistance in human hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 3.
- [28] Ma Y, Gao JB, Guo HN. miR-23a-3p regulates Runx2 to inhibit the proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 8719542.
- [29] Lee JH, Song SY, Kim MS, et al. Frameshift mutations of a tumor suppressor gene ZNF292 in gastric and colorectal cancers with high microsatellite instability[J]. *APMIS*, 2016, 124(7): 556-60.
- [30] Gong W, Xu J, Wang G, et al. ZNF292 suppresses proliferation of ESCC cells through ZNF292/SKP2/P27 signaling axis[J]. *Chin J Cancer Res*, 2021, 33(6): 637-48.
- [31] Wang X, Gao XZ, Tian JX, et al. LINC00261 inhibits progression of pancreatic cancer by down-regulating miR-23a-3p[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 689: 108469.
- [32] Lin K, Jiang H, Zhuang SS, et al. Long noncoding RNA LINC00261 induces chemosensitization to 5-fluorouracil by mediating methylation-dependent repression of DPYD in human esophageal cancer[J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 1972-88.

(编辑:吴锦雅)