学 校 代 码 10459
学号或申请号 201612442013483
密 级 公 开

郑州大学

硕士学位论文

食管鳞状细胞癌中 LncRNA FEZF1-AS1 的表达及生物学意义研究

作 者 姓 名：杨丽君
导 师 姓 名：贺付成 教授
学 科 门 类：医 学
专 业 名 称：临床检验诊断学
培 养 院 系：郑州大学第一附属医院
完 成 时 间：2019 年 5 月

中国知网 https://www.cnki.net

A thesis(dissertation) submitted to

Zhengzhou University

for the degree of Master(doctor)

The Study on Expression and Biological Significance of LncRNA FEZF1-AS1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

By Lijun Yang

Supervisor: Prof. Fucheng He

Department of Clinical Laboratory

The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University

May 2019

中国知网 https://www.cnki.net

中国知网 https://www.cnki.net

食管鳞状细胞癌中 LncRNA FEZF1-AS1

的表达及生物学意义研究

研究生：杨丽君
导　师：贺付成
郑州大学第一附属医院检验科
河南 郑州 450052

摘要

背景与目的:

中国为食管癌（Esophageal cancer，EC）的高发国家，食管癌患者的发病率约占全世界食管癌患者的46.6%，其中90%以上为食管鳞癌（esophageal squamous cell carcinoma，ESCC），该病严重威胁我国人民的健康与生命安全。食管癌发病隐匿，患者多在中晚期确诊，常出现淋巴结转移，缺少可靠的治疗靶标，预后较差，总体5年生存率较低。因此，深入研究食管癌疾病进程中的内在分子机制对于其靶向治疗及预后改善具有重要意义。

长链非编码RNA（long non-coding RNA，lncRNA）是非编码RNA（non-coding RNA，ncRNA）家族的重要成员，转录本大于个200核苷酸，没有完整的开放阅读框，不编码蛋白质，但在染色质修饰、基因转录、剪接修饰、蛋白翻译等多种生物过程中发挥重要作用。目前已证实 lncRNA 在乳腺癌、胃癌、肝癌及食管癌等多种肿瘤中表达异常，在肿瘤细胞的增殖、凋亡、浸润及上皮间质转化等过程中发挥重要作用，可作为肿瘤治疗靶标及预后判断的潜在标志物。

FEZ 家族锌指 1 反义 RNA 1（FEZ family zinc finger 1 antisense RNA 1，FEZF1-AS1）是一种长度为2564 bp的长链非编码RNA，位于7号染色体上。有研究证实FEZF1-AS1在胃癌肿瘤组织中过表达，FEZF1-AS1敲除可以显著抑

中国知网 https://www.cnki.net

制胃癌细胞在体外和体内的增殖，并通过引起 G1/S 阻滞抑制细胞周期进程。此外，FEZF1-AS1 在非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）中也被发现显著上调，其表达水平升高与患者淋巴结转移、肿瘤分化程度、TNM 分期有关，下调 FEZF1-AS1 的表达显著抑制 NSCLC 细胞的增殖和侵袭能力。这些研究表明 FEZF1-AS1 可以在肿瘤中发挥癌基因的重要作用，然而 FEZF1-AS1 在食管癌中的作用与机制尚不清楚，有待进一步的研究阐明。

在本研究中，我们检测了 45 例食管鳞癌组织及相应癌旁组织中 FEZF1-AS1 的表达水平，分析了 FEZF1-AS1 表达水平与食管鳞癌患者临床病理因素之间的关系。通过在食管鳞癌细胞系中敲减及过表达 FEZF1-AS1，检测了 FEZF1-AS1 对食管鳞癌细胞增殖、周期、迁移和侵袭等生物学行为的影响。此外，初步探讨了 FEZF1-AS1 在食管鳞癌中发挥作用的分子机制，以期为 FEZF1-AS1 成为潜在的 ESCC 临床治疗靶点提供实验基础与依据。

方法：

1 采用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）实验检测 ESCC 患者组织及细胞系中 FEZF1-AS1 的表达水平，分析 FEZF1-AS1 与 ESCC 患者临床病理因素的相关性。

2 利用 siRNA 敲减 ESCC 细胞系中 FEZF1-AS1 的表达，利用过表达质粒 GV219-FEZF1-AS1 上调 ESCC 细胞系中 FEZF1-AS1 的表达；通过 WST-1 增殖实验，细胞周期实验和 Transwell 迁移、侵袭实验探讨 FEZF1-AS1 的表达变化对食管鳞癌细胞生物学功能的影响。

3 分析 FEZF1-AS1 发挥作用可能的下游靶基因，RT-qPCR 检测其在 ESCC 组织、转染前和转染后 ESCC 细胞系中的 mRNA 表达水平，探讨 FEZF1-AS1 在食管鳞癌中发挥作用的分子机制。

结果：

1 FEZF1-AS1 在 ESCC 患者癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织（$P<$ 0.05），且其高表达与 ESCC 患者的淋巴结转移相关（$P<0.05$）。

2 FEZF1-AS1 在食管癌细胞系 EC1 和 EC9706 中的表达水平显著高于正常食管上皮细胞系 Het-1A（$P<0.05$）；在 ESCC 细胞中敲减 FEZF1-AS1 可以显著抑制其迁移及侵袭（$P<0.05$），过表达 FEZF1-AS1 则可显著促进其迁移及侵袭（$P<0.05$）；FEZF1-AS1 在 ESCC 细胞中的表达量对其增殖及细胞周期无显著

中国知网 https://www.cnki.net

影响（$P>0.05$）。

3 β-连环蛋白（β-catenin）在 ESCC 组织中表达上调（$P<0.05$），且与组织 FEZF1-AS1 表达水平呈正相关（r=0.656）；在食管癌细胞系 EC1、EC9706 中敲减或过表达 FEZF1-AS1 后，β-catenin 的表达随之发生下降或上调（$P<0.05$）。

结论：

本课题的研究结果表明，lncRNA FEZF1-AS1 在 ESCC 患者癌组织中高表达，其表达水平与组织中β-catenin 的表达水平呈正相关，与 ESCC 患者淋巴结转移相关；敲减或过表达 FEZF1-AS1 可显著抑制或促进 ESCC 细胞的迁移侵袭，这一过程可能是通过 Wnt/β-catenin 通路实现的。

关键词：长链非编码 RNA　FEZF1-AS1　食管鳞癌　迁移 侵袭

中国知网　https://www.cnki.net

The Study on Expression and Biological Significance of LncRNA FEZF1-AS1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

By Lijun Yang

Supervisor: Prof. Fucheng He

Department of Clinical Laboratory

The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University

Zhengzhou 450052

Abstract

Background and objective: China is one of the countries with a high incidence of esophageal cancer (EC) and the incidence of esophageal cancer patients in China accounts for 46.6% of the world's. In China, esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) accounts for more than 90% of EC, which seriously threatens the health and life safety of Chinese people. There are no obvious clinical signs and symptoms in the early stage of ESCC, many patients are diagnosed in the middle or late stage with lymph node metastasis. Due to the lack of reliable therapeutic targets for this disease, the prognosis is poor and the overall 5-year survival rate is low. Therefore, in-depth study of the underlying molecular mechanisms in the progression of esophageal cancer is of great significance for its targeted treatment and prognosis improvement.

Long non-coding RNA (lncRNA) is an important new member of the non-coding RNA (ncRNA) family, transcripts >200 nucleotides in length and with no protein coding potential. LncRNA plays an important role in chromatin modification, transcription, translation, splicing, epigenetic regulation and other biological processes. Currently, it has been confirmed that lncRNA is abnormally expressed in breast cancer, gastric cancer, liver cancer, esophageal cancer and other tumors, and it

中国知网 https://www.cnki.net

plays an important role in the proliferation, apoptosis, infiltration and epithelial interstitial transformation of tumor cells, and can be used as a potential marker for tumor therapy and prognosis.

FEZ family zinc finger 1 antisense RNA 1 (FEZF1-AS1), an lncRNA with a length of 2564 bp, which located in chromosome 7. Studies have confirmed that FEZF1-AS1 is overexpressed in gastric cancer, and knockout of FEZF1-AS1 can significantly inhibit the proliferation of gastric cancer cells in vitro and in vivo, and inhibit cell cycle progression by causing G1/S arrest. In addition, FEZF1-AS1 is also significantly up-regulated in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues, and the increased expression level of it is related to the lymph node metastasis, differentiation degree and TNM stage of NSCLC patients, and down-regulated FEZF1-AS1 expression could inhibits the proliferation and invasion ability of NSCLC cells. These studies indicate that FEZF1-AS1 plays an important role of oncogenes in some tumors. However, the role and mechanism of FEZF1-AS1 in ESCC remain unclear, which needs to be further clarified.

In this study, we detected the expression level of FEZF1-AS1 in 45 cases of ESCC tissues and adjacent non-tumorous tissues and analyzed the relationship between FEZF1-AS1 expression and the clinical characteristics of patients with ESCC. By knockdown or over-express the level of FEZF1-AS1 in ESCC cells, we tested the influence of FEZF1-AS1 on the biological behaviors of esophageal squamous cell carcinoma cells, such as cell proliferation, cell cycle, cell migration and invasion. In addition, we preliminarily discussed the molecular mechanism of FEZF1-AS1 in ESCC, so as to provide a new experimental basis for FEZF1-AS1 to become a potential clinical therapeutic target of ESCC.

Methods: 1 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression level of FEZF1-AS1 in ESCC tissues and cell lines. Statistical software was used to analyze the correlation between FEZF1-AS1 expression and clinicopathological factors of ESCC patients.

2 The siRNAs was used to knockdown the expression of FEZF1-AS1 in EC9706 and EC1 cell lines, and GV219-FEZF1-AS1 plasmid was used to up-regulate the

中国知网 https://www.cnki.net

expression of FEZF1-AS1 in the contrary. WST-1 assays, cell cycle assays and transwell assays were used to investigate the influence of FEZF1-AS1 knockdown and overexpression on the biological function of ESCC cells.

3 The possible downstream target genes of FEZF1-AS1 were analyzed, and the mRNA expression levels of it in ESCC tissues, pre-transfection and post-transfection ESCC cell lines were detected by RT-qPCR, so as to explore the molecular mechanism of FEZF1-AS1 in esophageal squamous cell carcinoma.

Results: 1 The expression level of FEZF1-AS1 was significantly higher in ESCC tissues than that in adjacent non-tumorous tissues, and its high expression was correlated with lymph node metastasis status of patients (P<0.05).

2 The level of FEZF1-AS1 in EC9706 and EC1 cell lines was significantly higher than that in normal esophageal epithelial cell line Het-1A (P<0.05). Knockdown of FEZF1-AS1 in ESCC cells could significantly inhibited its migration and invasion (P<0.05). Overexpression of FEZF1-AS1 could significantly promoted the migration and invasion of ESCC cells (P<0.05).

3 β-catenin was up-regulated in ESCC tissues (P<0.05) and positively correlated with the expression level of FEZF1-AS1 in tissues (r=0.656). After knockdown or overexpression of FEZF1-AS1 in esophageal cancer cell lines EC1 and EC9706, the expression of β-catenin was subsequently decreased or up-regulated (P<0.05).

Conclusion: The results of this study showed that FEZF1-AS1 was obviously up-regulated in ESCC tissues. The expression of FEZF1-AS1 in tissues displayed a significant positive correlated with the expression of β-catenin and its high expression was correlated with patient's lymph node metastasis. Knockdown or overexpress FEZF1-AS1 could significantly inhibited or promoted the migration and invasion of ESCC cells. This process might be achieved through the Wnt/β-catenin pathway.

Key words: Long non-coding RNA; FEZF1-AS1; esophageal squamous cell carcinoma; migration; invasion

中国知网 https://www.cnki.net

目　录

正文部分

中英文缩略表..... Ⅰ
食管鳞状细胞癌中 LncRNA FEZF1-AS1 的表达及生物学意义研究..... 1
引　言..... 1
（一）材料与方法..... 3
1 实验材料..... 3
2 实验方法..... 6
（二）实验结果..... 18
（三）实验讨论..... 28
（四）实验结论..... 31
参考文献..... 32

综述部分

食管癌与长链非编码 RNA 相关研究进展..... 35
参考文献..... 45

附录部分

个人简历..... 51
致　谢..... 52

中国知网　https://www.cnki.net

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
EC	esophageal carcinoma	食管癌
ESCC	esophageal squamous cell carcinoma	食管鳞癌
EAC	esophageal adenocarcinoma	食管腺癌
CRC	colorectal carcinoma	结直肠癌
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小细胞肺癌
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction	实时定量聚合酶链式反应
RT-qPCR	Reverse transcription-qPCR	反转录实时定量聚合酶链式反应
FEZF1-AS1	FEZ family zinc finger 1 antisense RNA 1	FEZ 家族锌指 1 反义 RNA 1
UICC	Union for International Cancer Control	国际抗癌联盟
GAPDH	Glyceraladehyde-3-phosphate dehydrogenase	磷酸甘油醛脱氢酶
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
lncRNA	long non-coding RNA	长链非编码 RNA
miRNA	microRNA	微小非编码 RNA
mRNA	messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
siRNA	small interfering RNA	小干扰 RNA
DEPC	diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
EDTA	ethylene diamine triacetic acid	乙二胺四乙酸

中国知网 https://www.cnki.net

OD	optical density	光密度
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
FBS	fatal bovine serum	胎牛血清
DMSO	dimethylsulfoxide	二甲基亚砜
EB	ethidium bromide	溴化乙锭
PI	propidium Iodide	碘化丙啶
rpm	rolls per minute	每分钟转速
EMT	epithelial-mesenchymal transition	上皮间质转化
WST-1	water soluble tetrazolium slat 1	水溶性四唑盐试剂 1
SNPs	single nucleotide polymorphisms	单核苷酸多态性
GERD	gastro-esophageal reflux disease	胃食管反流病
EGD	esophago-gastro-duodenoscopy	食管胃十二指肠镜
TNE	trans-nasal endoscopy	经鼻内窥镜检查
VLE	volumetric laser endomicroscopy	体积激光显微内镜
RIP	RNA binding protein immunoprecipitation	RNA 免疫沉淀
ChIP	RNA-binding protein immunoprecipitation	染色质免疫沉淀
OS	overall survival	总生存期
PFS	progression-free survival	无进展生存期
min	minute	分钟
g	gravitational acceleration	重力加速度
s	second	秒

中国知网 https://www.cnki.net

食管鳞状细胞癌中 LncRNA FEZF1-AS1 的表达及生物学意义研究

研究生：杨丽君

导师：贺付成

郑州大学第一附属医院检验科

郑州 450052

引言

食管癌（Esophageal cancer，EC）是世界范围内发病率高、病死率高、5 年生存率低、预后较差的恶性肿瘤之一[1]，组织病理学上食管癌可以分为两个亚型：食管鳞癌(Esophageal squamous cell carcinoma，ESCC)和食管腺癌(Esophageal adenocarcinoma，EAC)[2]。从地域来看，食管癌在东亚、东非、南非较为高发，西非发病率最低[3]。中国的食管癌发病率居世界之最，其发病率在我国男性恶性肿瘤发病率中位居第四，女性恶性肿瘤发病率中位居第六[4]，90%的病理类型是食管鳞癌。尽管食管癌的各种治疗手段在不断进步，目前仍有大多数患者在治疗性切除及辅助治疗后死于肿瘤的继发性远处转移，其高发性及难治性严重危害了我国人民的生命健康[5]。因此，深入探讨食管癌的发生发展机制，从分子水平研究其生物学行为，对治疗靶点的发现和患者预后的改善具有重要意义。

整合基因组学研究表明只有2%的人类基因组外显子转录本具有蛋白质编码功能，98%的人类基因组转录本为非编码 RNA (Non-coding RNA，ncRNA)，具有有限或没有蛋白质编码能力[6]。长链非编码 RNA (Long non-coding RNA，lncRNA)是 ncRNA 的一种，转录本长度超过 200 个核苷酸，目前哺乳动物基因组中已鉴定出数千种长链非编码 RNA (lncRNA)，它们被发现在调节细胞增殖、分化、迁移、侵袭和自噬等生物学功能方面发挥重要作用[7,8]。越来越多关于 lncRNA 表达失调的报道证实，lncRNA 可以在转录、转录后和表观遗传学等水平上调控关键癌症通路，参与癌症进展[9]。例如：在肝癌细胞中抑制 LncRNA

中国知网 https://www.cnki.net

ANRIL 的表达可以上调 miR-122-5p 的含量进而抑制肝癌细胞的体内外增殖和体外集落形成、转移、侵袭能力[10]；lncRNA BLACAT2 可以通过调控 VEGF-C、SNAI2 和 MMP9 的表达，诱导肿瘤相关的淋巴管生成，促进膀胱癌患者的淋巴结转移[11]；LncRNA EZR-AS1 可以通过与 SMYD3 和 RNA 聚合酶 II 相互作用，上调 EZR 转录，进而促进 ESCC 细胞的迁移和侵袭[12]；LncRNA MALAT1 可以通过靶向 miR-206 激活 Akt/mTOR 信号通路，促进非小细胞肺癌的上皮间充质转化、细胞迁移和侵袭，且 MALAT1 组织高表达与肿瘤大小、淋巴转移呈正相关[13]等。目前，食管癌发生发展的具体分子机制尚不十分清楚，深入研究食管癌中 lncRNA 的作用机制，将为进一步理解食管癌的疾病进程提供线索，有助于筛选食管癌发生发展过程中的重要分子标志物，为食管癌患者的诊断、治疗以及预后提供更进一步的科学理论依据。

FEZ 家族锌指 1 反义 RNA 1（FEZ family zinc finger 1 antisense RNA 1，FEZF1-AS1）是一种新近发现的 lncRNA，定位于人类染色体 7q31.32，转录本全长为 2564 个核苷酸。据报道，它的异常表达涉及胃癌[14,15]、非小细胞肺癌[16]和肝癌[17]等多种类型人类恶性肿瘤的疾病进展。例如：Liu 等人发现 LncRNA FEZF1-AS1 在胃癌组织中过表达，与肿瘤大小和患者不良预后相关，并可以通过 LSD1 介导的 H3K4me2 去甲基化抑制 p21 的表达，从而作为癌基因促进胃癌细胞的增殖[15]；Wang 等人发现 FEZF1-AS1 在肝癌中显著上调，与肝癌患者侵袭性表型及不良预后相关，下调 FEZF1-AS1 可以阻滞细胞周期显著抑制肝癌细胞的体内外增殖，还可抑制 JAK2/STAT3 信号介导的 EMT 过程来抑制肝癌细胞的转移[17]。以上研究表明 FEZF1-AS1 在部分恶性肿瘤的生长及侵袭中发挥着癌基因的重要作用。但是 FEZF1-AS1 在食管癌发生发展中扮演什么样的角色？其表达水平是否影响食管癌的疾病进程？能否成为食管癌诊断与治疗的新靶标？这些问题还不是很清楚。

本文针对以上问题开展实验，旨在探讨 FEZF1-AS1 在 ESCC 组织及细胞系中的表达，FEZF1-AS1 的表达水平与 ESCC 增殖，周期，迁移，侵袭等生物学功能的关系，以及 FEZF1-AS1 在人食管鳞癌疾病进程中发挥作用的分子机制。

中国知网 https://www.cnki.net

（一）材料与方法

1 实验材料

1.1 组织样本

收集 2016 年 11 月至 2017 年 5 月郑州大学第一附属医院病理科确认的食管鳞癌患者癌组织及相应癌旁组织（距离癌组织>5cm）共计 45 对。本实验纳入研究的所有患者在术前未行放化疗。患者的年龄、性别、肿瘤大小、分化情况、TNM 分期以及淋巴结转移等相关临床资料经电子病历系统获得，癌症 TNM 分期遵照第八版国际抗癌联盟（Union for International Cancer Control，UICC）进行。该研究获得郑大一附院医学伦理委员会批准，基于赫尔辛基宣言执行，相关患者签署知情同意书。

1.2 细胞系

本实验选取的人食管鳞癌细胞系为 EC1、EC9706，正常食管粘膜上皮细胞系为 Het-1A，以上三种细胞系来源于郑州大学第一附属医院医学科学研究所。

1.3 引物及 siRNA 干扰序列

用于组织及细胞样本 qPCR 实验的引物购自上海生工生物有限公司，ESCC 细胞系 siRNA 干扰序列由广州市锐博生物科技有限公司设计及合成，汇总如下：

名称	碱基序列
FEZF1-AS1	F: 5’-AGAGGCTATGACTCAGGGTT-3’
	R: 5’-TGTTGCTCCACAGTAAAGGT-3’
β-catenin	F: 5’
	R: 5’-TGTAGGGTCCCAGCGGTACAA-3’
GAPDH	F: 5’-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3’
	R: 5’-GGCTGTTGTCATACTTC-TCATGG-3’

中国知网 https://www.cnki.net

si-FEZF1-AS1#1	5’-GCCAATCGTTAACTTCCAA-3’
si-FEZF1-AS1#2	5’-GTCACTTACAAGGGTGTTA-3’

1.4 实验试剂

名称	厂家	国别
焦碳酸二乙酯（DEPC 水）	北京鼎国	中国
异丙醇	杭州四季青	中国
氯仿	杭州四季青	中国
无水乙醇	国药集团	中国
反转录试剂盒	Takara	日本
SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒	Takara	日本
Trizol	Takara	日本
琼脂糖	Genview	美国
6×Loading Buffer	北京索莱宝	中国
RPMI 1640	Hyclone	美国
PBS 缓冲液	北京鼎国	中国
二甲基亚砜（DMSO）	北京鼎国	中国
青链霉素双抗	Hyclone	美国
胎牛血清	Gibco	美国
0.25%胰蛋白酶	Gibco	美国
RFect 小核酸转染试剂	常州百代	中国
Lipo8000™转染试剂	上海碧云天	中国
siRNA	广州锐博	中国
质粒甘油菌	上海吉凯	中国
细菌 LB 液体培养基	北京鼎国	中国
Amp	北京京百卓显	中国

中国知网 https://www.cnki.net

高纯度质粒小提中量试剂盒	北京天根	中国
WST-1 细胞增殖试剂盒	Roche 公司	瑞士
碘化丙啶（PI）染液	北京鼎国	中国
溴化乙锭（EB）	上海生工	中国
Matrigel 胶	北京鼎国	中国
4%多聚甲醛	北京鼎国	中国
结晶紫溶液	北京索莱宝	中国

1.5 主要仪器与耗材

仪器或耗材名称	厂家	国别
高速冷冻离心机	杭州奥盛	中国
台式离心机	Eppendorf	德国
微量移液器	Eppendorf	德国
制冰机	Sanyo	日本
梯度 PCR 扩增仪	Thermo Force	美国
qPCR 仪（QuantStudio5）	Thermo Force	美国
掌上离心机	Scilogex	美国
水浴锅	杰瑞尔	中国
生物安全柜	Thermo Force	美国
细胞间电动吸引器	上海斯曼峰	中国
CO2 细胞培养箱	Thermo Force	美国
高压蒸汽灭菌锅	Tomy	日本
Countstar 细胞计数仪	上海睿钰	中国
倒置相差显微镜	Olympus	日本
相机	佳能	日本
倒置荧光显微镜	Olympus	日本

中国知网 https://www.cnki.net

超净工作台	苏州净化	中国
全波长多功能酶标仪	Molecular Devices	美国
恒温气浴摇床	智诚	中国
组织研磨机	上海净信	中国
超微量分光光度计	Thermo Force	美国
FACSCalibur™流式细胞分析仪	BD	美国
电泳仪	上海天能	中国
全自动数码凝胶图像分析系统	上海天能	中国
迷你漩涡仪	杭州奥盛	中国
电子天平	上海梅特勒-托利多	中国
液氮罐	Thermo Force	美国
Transwell 小室	Hyclone	美国
培养瓶（板）	Hyclone	美国

2 实验方法

2.1 样本收集

查询郑州大学第一附属医院符合收集条件的食管癌患者的手术安排，于手术日当天收取患者食管鳞癌组织及相应癌旁组织（距离癌组织>5cm），将其放入加有组织保存液的冻存管内，置入液氮罐中冻存。

2.2 细胞培养

2.2.1 培养基制备

本实验涉及的所有细胞均使用含有 10%胎牛血清（fatal bovine serum，FBS）的 RPMI 1640 培养基培养。使用 50mL 无菌离心管向内加入 45mL RPMI 1640 及 5mL FBS 混匀后置于 4℃保存，短时期内使用完毕。可根据细胞状态，酌情加入 1%青、链霉素双抗。所配培养基使用前在室温复温。

中国知网 https://www.cnki.net

2.2.2 细胞复苏

（1）75%酒精棉球擦拭生物安全柜台面，将加样枪，枪头及培养瓶等提前置于台面，打开紫外灯定时照射 30min。

（2）将水浴锅温度设置为 37℃并接通电源，同时培养基和 PBS 缓冲液从 4℃取出复温。

（3）按操作规范小心打开液氮罐，取出目的细胞，仔细核对冻存日期及细胞名称后，迅速将冻存管置于 37℃水浴锅，轻轻晃动使其充分融化。

（4）酒精棉球擦拭冻存管表面，打开生物安全柜，使用 1mL 加样枪将冻存液混悬细胞吸出，转移至 15mL 离心管，1000rpm 离心 5min。

（5）离心后将离心管转移至超净工作台，弃去上清液，加入 PBS 2mL，吹打混匀，同样条件下再次离心以洗涤细胞，在此期间可向培养瓶内加入 4mL 完全培养基。

（6）弃上清液，向离心管内加入 1mL 完全培养基，吹打混匀后转移至第（4）步的细胞培养瓶，十字交叉、八字摇匀铺平细胞。

（7）培养瓶上备注复苏时间、细胞系名称、操作者姓名，转移至 37℃，5%CO_2 细胞培养箱培养。复苏全程佩戴手套，遵照无菌原则，进出细胞间应更换衣物及鞋套。

2.2.3 贴壁细胞换液

（1）每次细胞换液前，参照 2.2.2（1）做好前期准备，并将培养基、胰酶和 PBS 缓冲液从 4℃取出复温。

（2）取出培养瓶，置于倒置显微镜观察细胞生长情况，然后转移至生物安全柜，负压抽吸弃去瓶内培养液。

（3）向瓶内加入 2mL PBS 缓冲液，轻轻晃动培养瓶使其与培养细胞充分接触洗涤，后负压抽吸弃去瓶内 PBS 缓冲液。

（4）使用加样枪向瓶内加入 5mL 完全培养基，标记操作内容与时间，再次观察细胞状态，将培养瓶放回培养箱。

（5）依据细胞生长状态，适时换液。

2.2.4 贴壁细胞传代

中国知网 https://www.cnki.net

（1）观察细胞融合度，细胞融合度达 90%左右的对数生长期时表明适宜传代。

（2）传代前，75%酒精棉球擦拭生物安全柜台面，将加样枪，枪头等提前置于台面，紫外灯定时照射 30min。

（3）负压抽吸弃去细胞培养基，2mLPBS 溶液洗 1 遍，加入 1mL 胰酶，缓慢摇晃使之完全覆盖瓶底细胞，重新置于培养箱消化 2-3min。

（4）显微镜观察细胞形态变化，若细胞边缘回缩，摇晃后呈悬浮状态则提示消化完全，此时向培养瓶内加入 1mL 完全培养基充分混匀终止消化，加样枪反复吹打瓶底至贴壁细胞完全脱落悬浮。

（5)转移瓶内液体至 15mL 离心管，管身标记细胞系名称，1000rpm 离心 5min，此时可向培养瓶内加入 5ml 完全培养基备用。

（6）弃上清液，加样枪加入 2mL PBS 溶液并充分吹打洗涤，再次离心，若在第（1）步观察细胞时发现细胞代谢废物较多，可重复此步骤 1-2 次。

（7）弃上清，加入 1mL 完全培养基至离心管，充分混匀细胞后根据实验需求转移适量悬液至第（5）步培养瓶内，十字交叉、八字摇匀平铺细胞。

（8）瓶身标记本次操作时间及内容，观察细胞状态和混匀情况后继续培养。

2.2.5 冻存

（1）观察细胞融合度及生长状况，融合度较高的对数生长期细胞可用于冻存。

（2）冻存前，75%酒精棉球擦拭生物安全柜台面，将加样枪，枪头及冻存管等提前置于台面，紫外灯定时照射 30min。

（3）冻存液：根据冻存数目将 1640 培养基、FBS 以及 DMSO 以 7：2：1 的比例混合均匀备用（冻存正常食管上皮细胞 Het-1A 时保持 DMSO 比例不变，适当增加血清比例）。

（4）消化洗涤细胞，同 2.2.4（3）-（6）。

（5）弃去上清液，根据冻存需求向离心管内加入冻存液（1.5mL/冻存管），吹打混匀后分装至事先写好冻存时间及细胞系名称的冻存管内。

（6)封口膜密封冻存管管口，之后依次将冻存管置于 4℃冷藏 1h，转移至-20℃冷冻 1h，放于-80℃冰箱过夜，最后转移至液氮中长久保存。

中国知网 https://www.cnki.net

2.3 RNA 提取

2.3.1 患者组织总 RNA 提取

（1）准备工作：打开通风橱，将实验用无菌无酶枪头，加样枪，无菌无酶 EP 管，EP 管架，手套，口罩，护目镜等准备完全；相关试剂 DEPC 水、Trizol、氯仿、无水乙醇 4℃预冷、异丙醇-20℃预冷。

（2）组织研磨：遵照操作规程从液氮罐小心取出组织冻存管，放入事先准备的冰盒中，转移适量组织块儿至做好相应标识的 2mLEP 管。按照 30mg/mL 的比例添加 Trizol 试剂，并向管内放入 75%乙醇浸泡 24h 的研磨珠（3 枚）。置于高通量组织研磨仪中将组织研磨完全，转移 EP 管内溶液至新的相应标识 EP 管，冰上静置 5min。

（3）转移第（2）步 EP 管至通风橱，向管内加入 200μL 氯仿，扣紧管盖，剧烈震荡 15s 使其充分混匀，放于管架室温静置 5min，此时可见管内液体分层。

（4）转移 EP 管至高速冷冻离心机，4℃，12000rpm，离心 15min。小心转移 EP 管至管架，平稳移至通风橱操作台，此时可见样品分为 3 层，从上至下为无色水相、中间蛋白质层、红色有机相，RNA 存在于最上层的无色水相。

（5）缓慢多次吸取水相 500μL 至新的 EP 管，切勿触碰到中间层，宁可少吸取，加入 500μL 预冷的异丙醇，颠倒混匀数次，室温下放置 10min（此时可使用 DEPC 水、无水乙醇配制 75%的乙醇溶液，根据所提取标本数目配制 n+1mL 备用）。

（6）4℃，12000rpm，离心 5min，弃上清，此时管底可见白色的沉淀物，即为 RNA。

（7）洗涤沉淀：向各个 EP 管内分别加入 75%的乙醇溶液 1mL，使用漩涡仪震荡 5s 至白色沉淀脱离管壁，后轻柔上下颠倒洗涤沉淀。

（8）4℃，7500rpm，离心 5min，弃上清，管内剩余难以倾倒的残液可用加样枪吸取（注意不要损失白色 RNA 沉淀），将 EP 管置于台面干燥 10-15min。

（9）待管内液体蒸发，沉淀通透，即可加入适量 DEPC 水溶解 RNA(若 RNA 干燥过度可在 55~60℃水浴锅中助溶 5-10min)。

（10）RNA 溶解完全后将 EP 管放于冰盒中冷浴，等待检测。或根据实验安排先移至-80℃保存。

2.3.2 ESCC 细胞系总 RNA 提取

（1）75%酒精棉球擦拭生物安全柜台面，将加样枪，枪头及培养瓶等提前置

中国知网 https://www.cnki.net

于柜内，打开紫外灯定时照射 30min。其余准备工作同 2.3.1（1）。

（2）倒置显微镜观察培养细胞的融合程度，待细胞融合度至 90%左右时即可用于 RNA 提取。

（3）此时向瓶内加入 PBS 缓冲液 2mL 充分清洗贴壁细胞，负压吸引弃去清洗液，重复 1~2 次。

（4）准备冰盒，将培养瓶放在冰面上拿至通风橱内，向瓶内加入 1mL 预冷的 Trizol 试剂，左右摇晃使 Trizol 试剂平铺于培养瓶底面，冰上裂解 2min。

（5）使用加样枪反复吹打瓶底，待贴壁细胞完全裂解后转移瓶内溶液至无菌无酶 1.5mL EP 管。

剩余步骤与患者组织总 RNA 提取（3）-（9）步相同。

2.4 所提取 RNA 浓度及质量的检测

2.4.1 超微量分光光度计测定：

（1）将装有所提取 RNA 的 EP 管置于冰上，移至超微量分光光度计旁。

（2）选择 RNA 测定选项，使用 DEPC 水将仪器调零 3 次，每次用量 2μL，之后依次滴加 RNA 样本检测其纯度及浓度。

（3）在 EP 管上注明所测样本浓度及纯度。

（4）待所有样本检测完毕，使用 DEPC 水再次洗涤超微量分光光度计 3 次。

（5）合格的 RNA 标本纯度 OD260/ODA280 应在 1.8~2.1 之间，可以进行后续实验，若标本不合格，需再次提取直至合格。

2.4.2 RNA 琼脂糖凝胶电泳：

（1）琼脂糖凝胶的配制：将 1.2g 琼脂糖粉剂加入 80mL 1×TAE 溶液，微波炉 100%火力加热 2min，之后 40%-60%火力加热 2min，取出冷却，待冷却至 60℃左右时加入 EB 染料（终浓度为 0.5μg/mL），配置成 1.5%的琼脂糖凝胶。

（2）将所配液体轻轻摇匀（注意不要产生气泡），倒入到插好加样梳的胶模中，放于室温凝固，此时可向电泳槽内加入足量 1×TAE 电泳缓冲液。

（3）待琼脂糖溶液凝固后，取出梳子，将胶块置于电泳槽内，取 5μL RNA 溶液向孔内点样，120V 恒压电泳 15min。

（4）电泳结束后，取出胶块置于全自动数码凝胶图像分析仪，紫外光下观察

中国知网 https://www.cnki.net

拍照，若 28S 和 18S 条带清晰，且 28S 条带亮度约是 18S 亮度的两倍，说明所提取 RNA 完整性好，可进行后续试验。

2.5 ESCC 组织及细胞系总 RNA RT-qPCR 反应

2.5.1 逆转录 RNA 为 cDNA

逆转录实验遵照日本 Takara 公司反转录试剂盒（DRR047A，Tokyo，Japan）说明书操作，所有步骤均在冰上进行。

（1）去除基因组 DNA：使用 200μLEP 管，加入反应体系如下：

试剂	体积（μL）
5×gDNA Eraser Buffer	2
gDNA Eraser	1
Rnase Free dH2O	7-v
Total RNA	v

（v=RNA 总质量/RNA 浓度，10μL 体系反转录 RNA 量不应超过 1000ng）

最后将加好的反应体系置梯度 PCR 仪，设置 42℃，2min。

注意事项：每个 EP 管均应标注操作日期、样本名称、编号；5×gDNA Eraser Buffer 使用前上下颠倒混匀，gDNA Eraser 使用前应当瞬离。

（2）逆转录反应：使用 200μLEP 管，加入反应体系如下：

试剂	体积（μL）
5×Primescript Buffer 2	4
Primescript RT Enzyme Mix1	1
RT Primer	1
Rnase Free dH2O	4
第（1）步 EP 管内液体	10

（可将以上四种溶液配制混合液充分混匀后加入第（1）步 EP 管中）

最后将加好的反应体系置于梯度 PCR 仪，设置 85℃，5s 及 37℃，15min，反应后备用。

注意事项：5×Primescript Buffer 2 试剂使用前上下颠倒混匀，Primescript RT

中国知网 https://www.cnki.net

Enzyme Mix1 试剂使用前应当瞬离。

2.5.2 cDNA 扩增

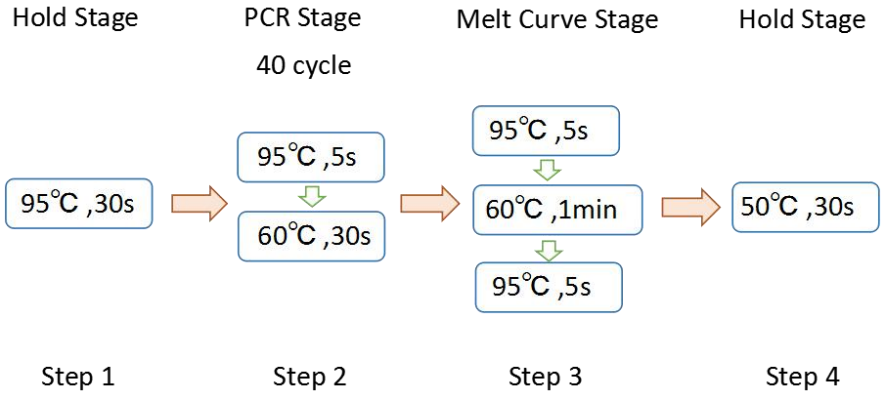
（1）分装引物：使用台式离心机瞬离装有引物的 EP 管，以防止开盖时引物损失。根据引物说明书向各个 EP 管内加入相应体积的 DEPC 水，使用加样枪反复吹打使其充分溶解，此时得到的液体为 100μM 浓度的引物浓缩液（储存液）。根据使用需求将浓缩液分装至提前标记好引物名称的 200μL EP 管内，放于-20℃冰箱保存。浓缩液在使用前稀释 10 倍，即成为 10μM 浓度的工作液。

（2）扩增 cDNA：本实验遵照日本 Takara 公司 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应试剂盒（DRR820A, Tokyo, Japan）说明书进行，每个样本相应的目的基因设置三个复孔。使用八连排管在冰上避光加样，每孔加入反应体系如下：

试剂	体积（μL）
SYBR Premix Ex TaqII	10
DEPC 水	6.4
PCR Forwad Primer	0.8
PCR Reverse Primer	0.8
cDNA	2

（本步骤所用的 cDNA 是 2.5.1（2）中得到的 cDNA 稀释 3 倍所得）

将上述体系加好后，将八连排管放置于掌上离心机瞬离，之后放入 QuantStudio5 PCR 仪，设置反应程序如下：



注意事项：实验所有步骤注意避光；SYBR Premix Ex TaqII 试剂使用前需轻柔混匀；注意观察实验结果相同引物孔的溶解曲线，若杂乱则代表引物特异性

中国知网 https://www.cnki.net

低，需重新设计引物进行实验；实验结果中三个复孔的循环数差异不可大于 0.5。

2.6 ESCC 细胞系转染

2.6.1 siRNA 转染

（1）转染用 siRNA 套装由广州锐博生物技术有限公司设计与合成，三个序列分别命名为 si-FEZF1-AS1#1、si-FEZF1-AS1#2 以及 si-NC，所有 siRNA 提前溶解、稀释至浓度 20μM 备用。转染试剂为常州百代 RFect 小核酸转染试剂。

（2）75%酒精棉球擦拭生物安全柜台面，打开紫外灯定时照射 30min，加样枪、枪头、EP 管等提前置于台面，培养基及 PBS 复温。

（3）观察细胞生长状态，若目的细胞处于对数生长期，则可消化，洗涤，悬浮细胞用于铺板。

（4）使用细胞计数仪计数，完全培养基（不含抗生素）稀释 EC1 细胞浓度为 4×10^5 个/mL，稀释 EC9706 细胞浓度为 3×10^5 个/mL。分别取 1mL 细胞悬液接种于 6 孔板（每种细胞设置两个实验孔，一个对照孔），完全培养基补足容积为 2mL 后放回培养箱继续培养 24h。

（5）取出培养板，此时细胞密度应在 30%-50%之间，负压吸引弃去孔内培养液，向各培养孔加入 1mL PBS 洗涤贴壁细胞一次，后更换为 2mL 完全培养基放回培养箱。

（6）配置转染液：视转染孔数取高温高压灭菌的 1.5mL EP 管若干，分别向 EP 管内加入 100μL 完全培养基、5μL 转染试剂，室温孵育 5min，之后根据实验分组加入 5μL 相应组别的 siRNA 稀释液，室温孵育 10-20min。

（7）将转染液加入第（5）步做过换液处理的培养板，轻轻晃动混匀，置于培养箱继续培养 24-72h（于培养 6-8h 观察细胞状态，如有需要可以更换培养基为完全培养基，24h-48h 观察转染荧光）。

（8）提取细胞 RNA，RT-qPCR 检测目的基因表达量。

2.6.2 质粒转染

转染用 GV219-FEZF1-AS1 及阴性对照质粒由上海吉凯基因生物技术有限公司设计与合成，转染试剂为上海碧云天 Lipo8000™。

中国知网 https://www.cnki.net

2.6.2.1 质粒扩增

（1）将配置好的 100mL 液态 LB 细菌培养基以及两个 100mL 锥形瓶高温高压灭菌，冷却后向锥形瓶内倒入 50mL 培养基，取过表达质粒和对照组质粒甘油菌各 100μL 分别加入两个锥形瓶中，做好标识，使用锡纸封口。

（2）封口后的锥形瓶放入恒温气浴摇床，设置温度为 37℃，转速为 3000rpm/min，摇菌 12-16h。

（3）将所得菌液倒入 50ml 细胞离心管，4000rpm/min，离心 5min，可见管底有黄褐色细菌团块，此时可取 6 个 EP 管做好标识（实验组及对照组分别 3 个）。

（4）小心倾倒 2 个离心管内液体，直至余量 3ml 左右，使用加样枪吹打混匀菌液，平均分至相对应的 3 个 1.5mL 无菌 EP 管中。

（5）12000rpm 离心 1min，尽量吸取上清，余下步骤遵照 TIANGEN 高纯度质粒小提中量试剂盒说明书进行，最后将质粒洗脱收集至 EP 管内。

（6）使用分光光度计检测所得质粒的浓度及纯度，质粒 OD260/ODA280 控制在 1.8-2.0 范围内为宜，偏低可能有蛋白污染，偏高则可能有 RNA 污染。检测后将质粒分装保存至-20℃备用，管身注明相关标识。

2.6.2.2 转染

（1）使用 75%酒精棉球擦拭生物安全柜台面，紫外灯定时照射 30min，加样枪、枪头、EP 管等提前置于台面，取出培养基及 PBS 复温。

（2）在转染前一天（18-24h），观察细胞生长情况，若目的细胞处于对数生长期，则可消化，洗涤，悬浮用于铺板。

（3）完全培养基重悬 EC1，EC9706 细胞，细胞计数仪计数，按照 EC1 细胞 7×10^5 个、EC9706 细胞 6×10^5 个的数目将其接种到六孔板内进行培养（每种细胞设置 1 个实验孔及 1 个对照孔）。

（4）第二天细胞密度达到约 70-80%，此时弃去培养液，向各孔加入 1mL PBS 洗涤贴壁细胞一次，后换用 2ml 含血清和抗生素的完全培养基（对于 Lipo8000™ 转染试剂，抗生素的存在不会影响转染效率，也不会在细胞转染后导致细胞毒性）。

（5）取与转染孔数相对应的 EP 管做好标识，加入 125μL 不含抗生素和血清的 RPMI 1640 培养基，2.5μg 对应的质粒 DNA 以及 4μL Lipo8000™转染试剂，使用加样枪轻轻吹打混匀（配制完成后，室温存放 6 小时内稳定）。

中国知网 https://www.cnki.net

（6）按照六孔板每孔 125μL Lipo8000™转染试剂-DNA 混合物的用量，将 EP 管内液体均匀滴加到相应培养孔内，轻轻混匀使其与细胞充分接触。

（7）继续培养 24-48h 后，提取细胞 RNA，RT-qPCR 检测转染效果。

2.7 WST-1 法细胞增殖实验

（1）观察细胞生长状态，若目的细胞处于对数生长期，则可胰酶消化，PBS 洗涤，完全培养基悬浮，细胞计数仪计数用于铺板。

（2）调整各实验组及对照组细胞的浓度至 2×10^4 个/mL，按每孔 100μL 的体积接种于 96 孔板，实验组及对照组各个时间节点均设置 3 个复孔（总孔数为时间节点数×3），其余各孔加入等体积 PBS 以防培养基蒸发影响结果。

（3）标记好操作时间、操作内容、各组实验细胞的名称、分组情况等，细胞培养箱继续培养 24h。

（4）取出 96 孔板，向各组 24h 时间点的 3 个复孔中加入 10uL 按实验说明书配置好的 WST-1 溶液，后放回培养箱中继续培养 2 小时。

（5）取出培养板摇床轻摇 1min 充分混合待检测体系，加样枪吸出本次实验孔中液体至新的 96 孔板做好标记用于检测，余下各孔细胞继续培养。

（6）将装有待测体系的培养板放于全波长多功能酶标仪上，波长设置为 450nm，方法选定为终点法，测定待测液吸光度（OD 值）并记录实验结果。

（7）按照本实验（4）-（6）步相同的操作步骤测定 48h，72h，96h 的吸光度，记录实验结果。

（8）使用 GraphPad Prism 5 软件绘制细胞的增殖曲线，比较各组细胞增殖速度。实验重复三次以减少误差。

2.8 细胞周期实验

（1）观察细胞生长状态，将处于对数生长期的转染细胞消化重悬，收集 1×10^6 个细胞于 15mL 离心管，1000rpm 离心 5min 后弃去培养液。

（2）使用 1mLPBS 缓冲液重悬细胞并将其转移至 1.5mL EP 管，台式离心机 1000rpm 离心 5min。此时可以按超纯水：无水乙醇=3：7 的比例配置 70%的乙醇固定液。

（3）弃上清，向管内加入 1mL 70%乙醇固定液，轻轻混匀，4℃固定过夜。

中国知网 https://www.cnki.net

（4）1mLPBS 连续洗涤细胞三次，前两次离心条件为 1000rpm，5min，最后一次洗涤离心条件为 3000rpm，5min，去 PBS 后收集细胞沉淀。

（5）加入 1mL 碘化丙啶（Propidium Iodide，PI）染液，37℃孵育 30min 或 4℃避光孵育大于等于 30min。

（6）3000rpm，离心 30s，去除部分上清，剩余细胞沉淀混匀后在 FACSCalibur™仪器上检测细胞周期。

（7）拷贝数据，使用 ModFit LT4.1 软件分析实验结果。实验重复三次。

2.9 Transwell 实验

2.9.1 Transwell 细胞迁移实验

（1）准备：酒精擦拭台面，将 24 孔板及 Transwell 小室、枪头等耗材放至安全柜，紫外照射 30min。取出培养基（含及不含胎牛血清）、PBS 复温。

（2）使用胰酶消化，收集对数生长的转染细胞 EC9706 及 EC1，经 PBS 洗涤一次，用无 FBS 无双抗的 RPMI 1640 培养基悬浮细胞。

（3）使用细胞计数仪，取 200μL 共 5×10^5 个转染细胞加至 Transwell 小室上室，下室中则加入 650μL 含 15% FBS 的完全培养基，每组细胞设置 3 个复孔，在 24 孔板上做好相应的组别、操作时间、操作者等标记。

（4）将以上 24 孔板放入恒温培养箱培养 24h。取全新 24 孔板，倒入 650μL 4%多聚甲醛细胞固定液和 650μL 0.1%结晶紫溶液备用，做好对应标记。

（5）取出培养板，使用小镊子小心倾倒 Transwell 上室内培养基，使用棉签（头部轻微湿润并压平）轻柔擦去小室上表面的贴壁细胞，并吸去残液，不要碰到小室下表面。

（6）将 Transwell 上室其放入上述含有 650μL 4%多聚甲醛细胞固定液的孔内，固定下表面贴壁细胞 15min。

（7）转移小室至上述含有 650μL 0.1%结晶紫溶液孔内，染色 30min。

（8）使用镊子小心取出 Transwell 上室，在装有 PBS 缓冲液的烧杯内轻柔摇晃洗去染液，棉签吸去残余液体，注意不要碰到小室下表面。

（9）小室置于 24 孔板内自然风干 30min，移至显微镜下观察实验结果。使用显微镜配套相机每个小室随机选取 5 个视野进行拍摄，标注好相应的文件名。计数图片中的细胞数目，统计学比较分析不同组的实验结果。实验重复三次。

中国知网 https://www.cnki.net

2.9.2 Transwell 细胞侵袭实验

（1）实验开始前一天，将 Matrigel 胶置于冰上 4℃过夜溶解，实验开始前 2h 将灭菌处理的枪头放于-20℃预冷，实验开始后将 Matrigel 胶与不含 FBS 的 1640 培养基在冰上按 1：6 的比例稀释。

（2）将稀释后的 Matrigel 胶加至 Transwell 小室上室，室温包被其上表面 1h，吸出多余液体，将包被好的 Transwell 小室放于 4℃备用。

（3）Transwell 小室使用前在孔内加入 100μL 无血清 RPMI 1640 培养基水化基质胶 30min。

（4）收集对数生长期的 EC9706 及 EC1 转染细胞，PBS 洗一次，使用无 FBS 无双抗的 RPMI 1640 培养基重悬细胞。

（5）将 Transwell 小室中起水化作用的 RPMI 1640 培养基吸出，取 200μL 共 5×10^5 个转染细胞加于其上室，下室加入含 15%胎牛血清的完全培养基 650μL，每组细胞设置 3 个复孔，做好相应的组别，操作时间，操作者等标记。

（6）将以上 24 孔板放入恒温培养箱培养 48h。取全新 24 孔板倒入相应数量 650μL 4%多聚甲醛细胞固定液以及 650μL 0.1%结晶紫溶液备用，做好对应标记。

（7）余下固定、染色、拍照、计数、分析同迁移实验。实验重复三次。

注意事项：Transwell 迁移及侵袭实验操作全程应避免上下室之间产生气泡，以防影响细胞穿膜以及固定、染色效果。

2.10 统计学处理

使用 GraphPad Prism 5 软件、IBM SPSS statistics 21 软件、Adobe Photoshop CS5 分析实验结果及处理相关图片。四种统计学分析方法：t 检验，确切概率法,$\chi2$ 检验以及 Pearson 相关分析被用来视情况统计各变量之间的差异（$P< 0.05$ 为差异有统计学意义）。

中国知网 https://www.cnki.net

（二）实验结果

1 所抽提 RNA 及质粒的合格性检测

所有组织及细胞 RNA 样本均在超微量分光光度计上机检测，结果表明所得 RNA 浓度较高，且吸光度 OD260 与 OD280 比值为 1.8~2.1 之间，无有机溶剂或蛋白质污染所致标本不合格情况。之后的琼脂糖凝胶电泳实验显示，28S 条带亮度约是 18S 亮度的两倍，提示所提取的 RNA 完整性较好（图 2.1）。综上，本实验所提组织及细胞总 RNA 合格，可以进行后续实验。

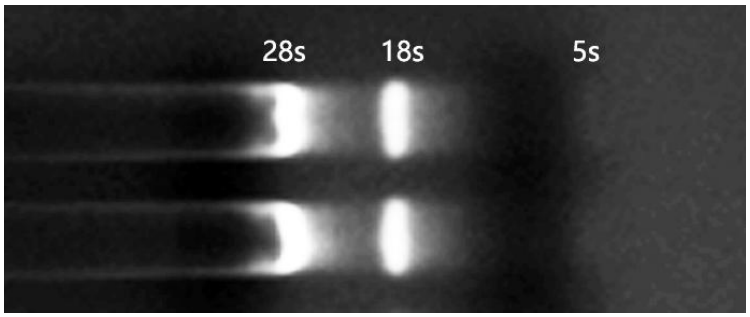


图 2.1　RNA 琼脂糖凝胶电泳

将所抽提质粒在超微量分光光度计上机检测，浓度均大于 1000ng/μL，吸光度 OD260 与 OD280 比值在 1.8~2.0 之间，纯度较高。琼脂糖凝胶电泳实验显示质粒条带清晰完整，DNA 完整性较好（图 2.2）。以上结果表明所提质粒可以用于细胞转染。

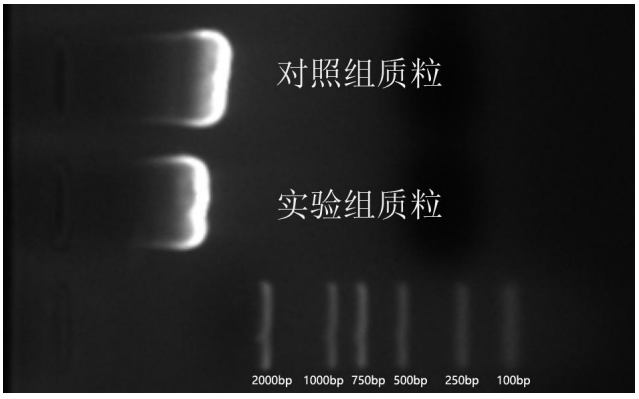


图 2.2　DNA 琼脂糖凝胶电泳

中国知网 https://www.cnki.net

2 ESCC 患者癌组织及癌旁组织中 FEZF1-AS1 的差异表达

提取食管癌患者癌组织及相应癌旁组织 RNA，RT-qPCR 实验检测其 FEZF1-AS1 表达水平（以 GAPDH 作为内参基因）。结果显示与相应癌旁组织相比，FEZF1-AS1 在 ESCC 患者癌组织中表达水平显著升高（图 2.3 a）。这一结果与 GEPIA 数据库中食管癌患者组织 FEZF1-AS1 的表达分析具有一致性（图 2.3 b）。

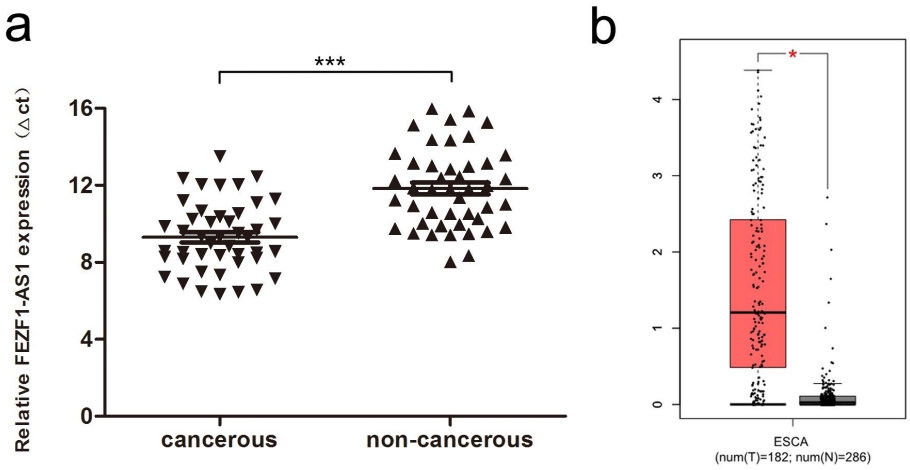


图 2.3　ESCC 患者组织中 FEZF1-AS1 的差异表达（*P<　0.05，***P<　0.001）

3 FEZF1-AS1 表达水平与患者临床病理特征的相关性

根据 FEZF1-AS1 表达水平，取中位数为界限值将患者分为 FEZF1-AS1 高表达组和低表达组，分析 FEZF1-AS1 表达水平与患者临床病理特征的关系。结果显示，FEZF1-AS1 高表达与 ESCC 患者的淋巴结转移明显相关，与患者年龄、性别、肿瘤大小、分化程度以及 TNM 分期无关（表 2.1）。

表 2.1 FEZF1-AS1 组织表达水平与 ESCC 患者临床特征的相关性（**P<　0.01）

变量		N（个）	FEZF1-AS1 表达量		$\chi2$ 值	P 值
			低表达 (23)	高表达 (22)		
性别	男	23	12	11	0.021	0.884
	女	22	11	11		

中国知网　https://www.cnki.net

续表 2.1 FEZF1-AS1 组织表达水平与 ESCC 患者临床特征的相关性（**$P<$ 0.01）

变量		N（个）	FEZF1-AS1 表达量		χ2 值	*P* 值
			低表达 (23)	高表达 (22)		
年龄（岁）	＜65	19	9	10	0.184	0.668
	≥65	26	14	12		
肿瘤大小	≤3cm	19	10	9	0.030	0.862
	＞3cm	26	13	13		
分化程度	低分化	12	7	5	0.342	0.559
	高/中分化	33	16	17		
TNM 分期	I+II	13	6	7	0.180	0.672
	III+IV	32	17	15		
淋巴结转移	阴性	23	17	6	9.789	0.002**
	阳性	22	6	16		

4 ESCC 及正常食管上皮细胞中 FEZF1-AS1 的差异表达

RT-qPCR 实验检测食管鳞癌细胞系 EC1、EC9706 及正常食管粘膜上皮 Het-1A 细胞系中 FEZF1-AS1 的表达水平。如图 2.4 所示，与正常食管粘膜上皮细胞系 Het-1A 相比，FEZF1-AS1 在 ESCC 细胞系中表达水平显著升高（图 2.4）。

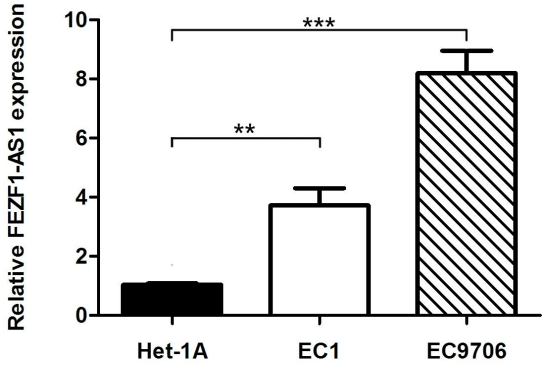


图 2.4 FEZF1-AS1 在 ESCC 及正常食管上皮细胞系中的表达差异
（**$P<$ 0.01，***$P<$ 0.001）

中国知网 https://www.cnki.net

5 ESCC 细胞系转染后 FEZF1-AS1 的表达

分别使用 RFect 小核酸转染试剂及 Lipo8000™转染试剂将针对 FEZF1-AS1 的 si-FEZF1-AS1 及对照组 siRNA，过表达质粒 GV219-FEZF1-AS1 及对照组质粒转染入 EC9706 和 EC1 细胞。荧光显微镜下观察 si-FEZF1-AS1 实验组及对照组荧光，结果显示转染效率大于 90%（图 2.5 a）。RT-qPCR 实验检测转染细胞 FEZF1-AS1 的表达水平，发现转染 si-FEZF1-AS1#1 和 si-FEZF1-AS1#2 的细胞 FEZF1-AS1 表达水平显著低于对照组（图 2.5 b）；转染 GV219-FEZF1-AS1 质粒的细胞 FEZF1-AS1 表达水平显著高于对照组（图 2.5 c），差异有统计学意义。

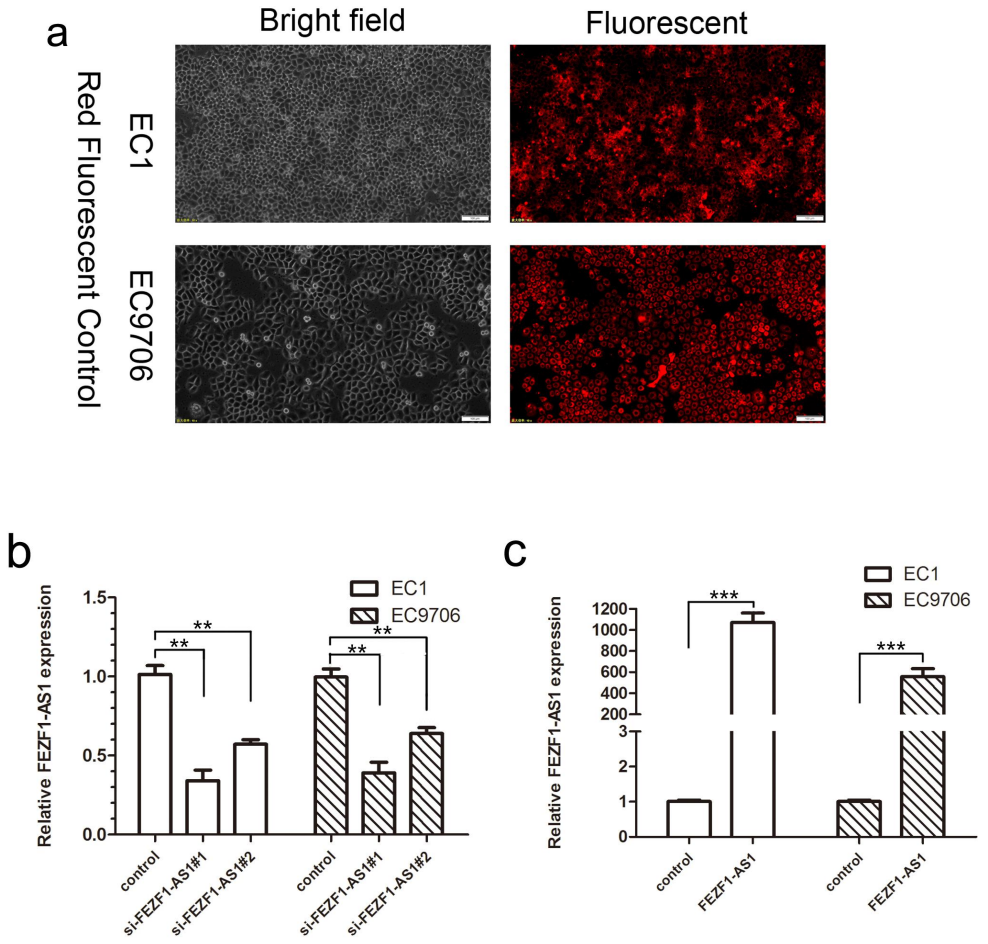


图 2.5 siRNA 转染效率及转染 siRNA、质粒后细胞系 FEZF1-AS1 的表达变化（**$P<$ 0.01，***$P<$ 0.001）

中国知网 https://www.cnki.net

6　调节 FEZF1-AS1 表达对 ESCC 细胞增殖能力的影响

为明确在 FEZF1-AS1 在 ESCC 疾病进程中发挥的作用，本研究在 ESCC 细胞系中敲减及过表达 FEZF1-AS1 后，使用 WST-1 实验评估了 ESCC 细胞增殖能力的变化。实验结果表明，与对照组细胞相比，FEZF1-AS1 的敲减（图 2.6 a，b）或过表达（图 2.7 a，b）对 ESCC 细胞系 EC1、EC9706 的增殖能力无显著影响，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

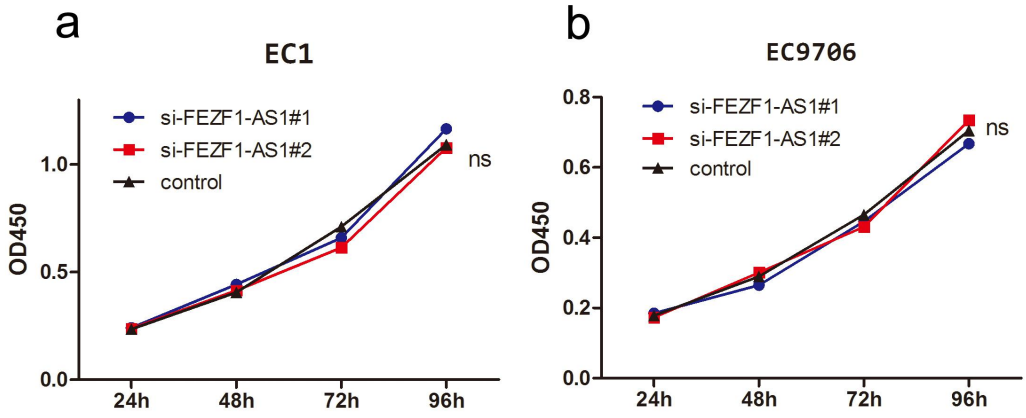


图 2.6　敲减 FEZF1-AS1 对 ESCC 细胞增殖能力的影响
（ns=无统计学意义）

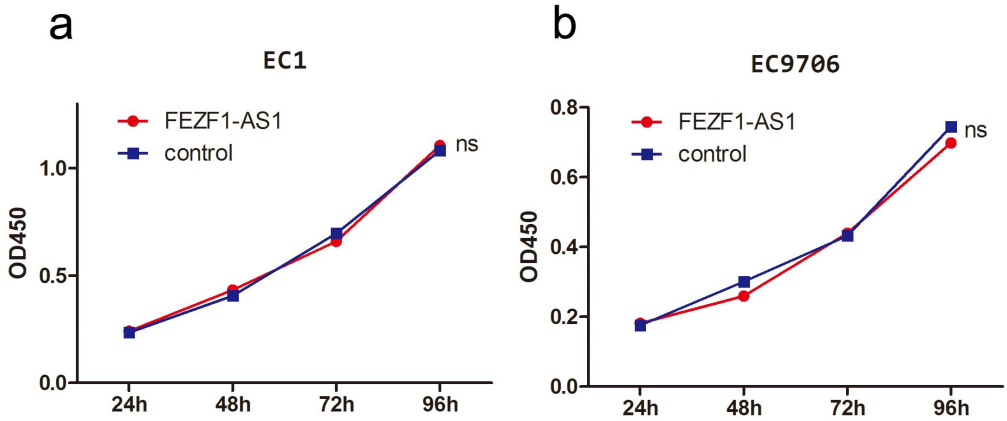


图 2.7　过表达 FEZF1-AS1 对 ESCC 细胞增殖能力的影响
（ns=无统计学意义）

中国知网　https://www.cnki.net

7　调节 FEZF1-AS1 表达对 ESCC 细胞周期的影响

在随后进行的细胞周期实验中，我们评估了 FEZF1-AS1 敲减及过表达对 ESCC 细胞体外细胞周期的影响。结果表明，与对照组相比，FEZF1-AS1 表达量的敲减（图 2.8 a，b）或者过表达（图 2.9 a，b），对 ESCC 细胞系 EC1 及 EC9706 的细胞周期变化无明显影响（$P>0.05$）。

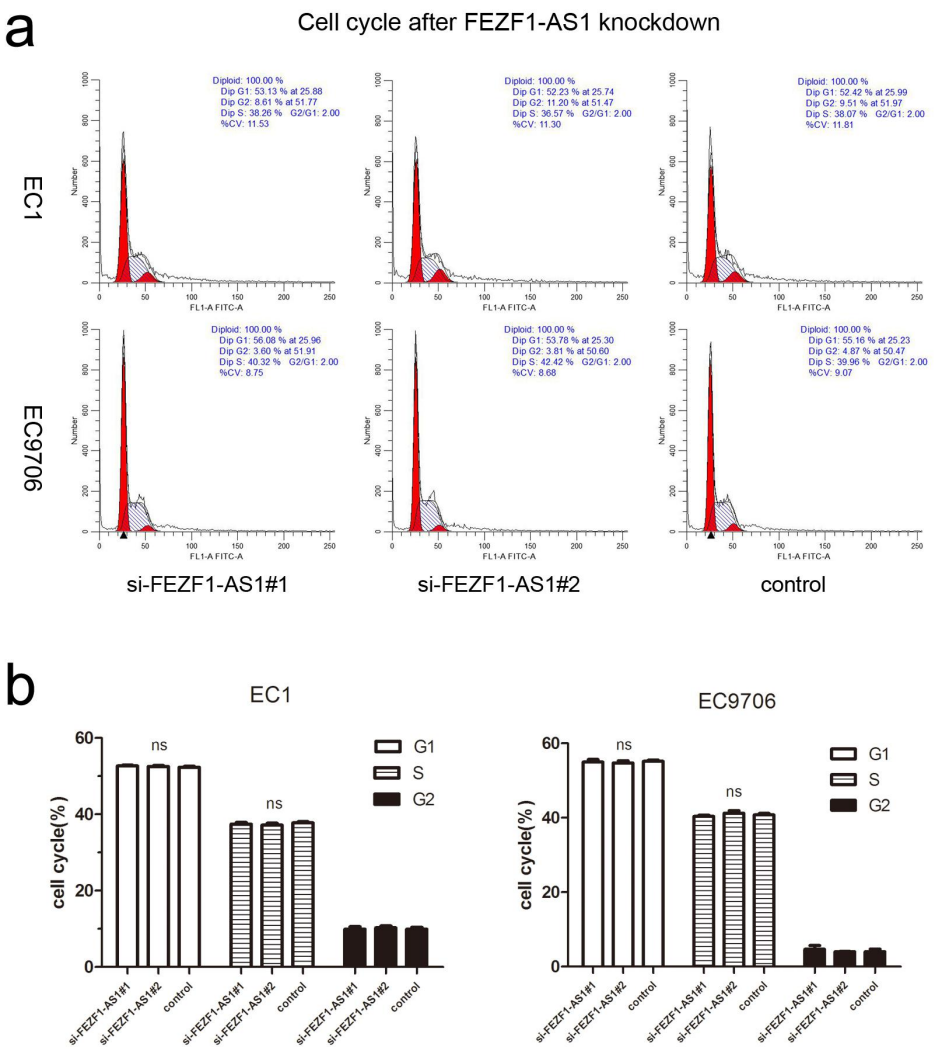


图 2.8　FEZF1-AS1 表达水平降低对 ESCC 细胞系细胞周期的影响（ns=无统计学意义）

中国知网　https://www.cnki.net

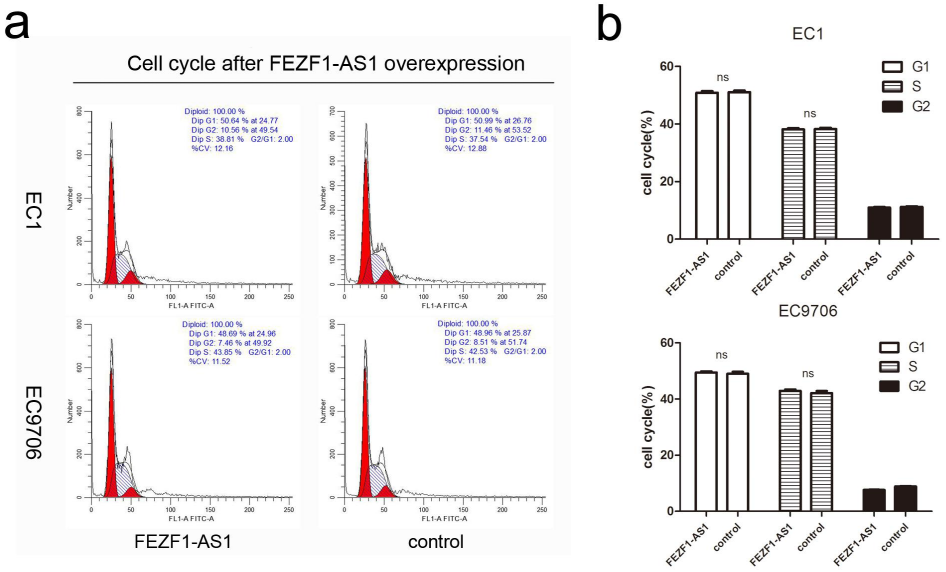


图 2.9　FEZF1-AS1 表达水平升高对 ESCC 细胞系细胞周期的影响
（ns=无统计学意义）

8　敲减 FEZF1-AS1 表达对 ESCC 细胞迁移能力的影响

使用 si-FEZF1-AS1 敲减食管癌细胞系 EC1 和 EC9706 中 FEZF1-AS1 的表达水平，Transwell 实验检测其敲减对 ESCC 细胞迁移能力的影响，实验结果表明敲减食管癌细胞系 EC1 和 EC9706 中 FEZF1-AS1 的表达可以显著抑制其迁移能力（图 2.10 a,b）。

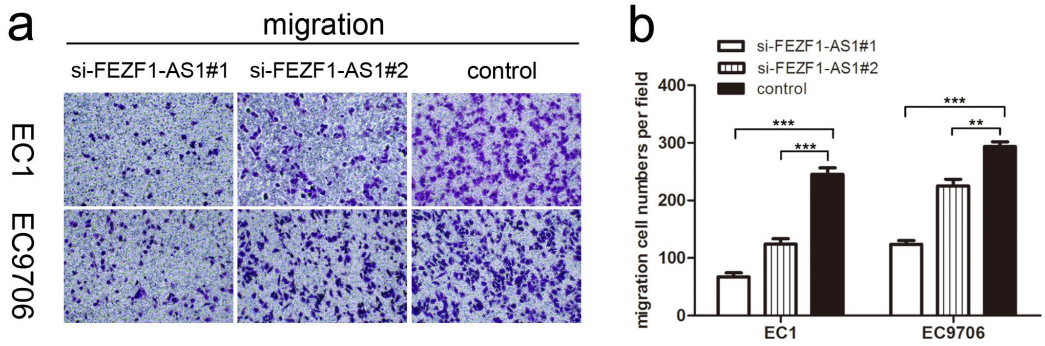


图 2.10　FEZF1-AS1 表达水平降低对 ESCC 体外细胞迁移的影响
（**P< 0.01，***P< 0.001）

中国知网 https://www.cnki.net

9 敲减 FEZF1-AS1 表达对 ESCC 细胞侵袭能力的影响

为验证 FEZF1-AS1 对 EC1 和 EC9706 食管癌细胞系侵袭能力的影响，我们随后进行了添加 Matrigel 胶的 Transwell 实验，结果表明食管癌细胞系中 FEZF1-AS1 表达水平的降低可显著抑制其体外侵袭能力（图 2.11 a,b）。

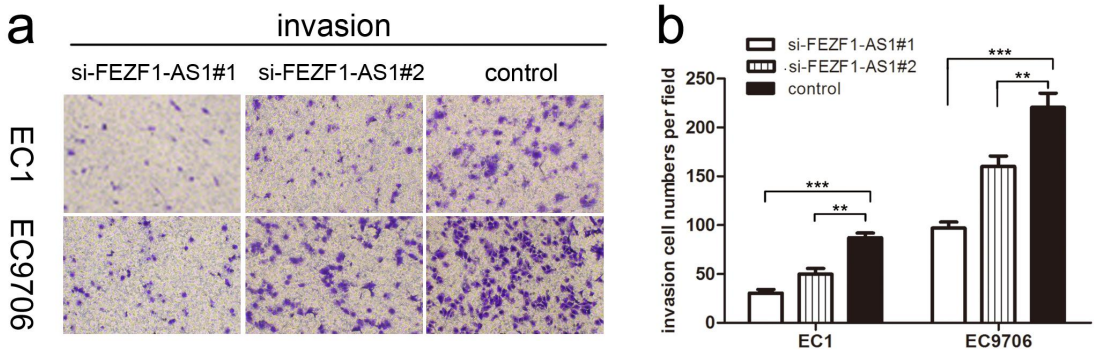


图 2.11　FEZF1-AS1 表达水平降低对 ESCC 体外细胞侵袭的影响

（**P<　0.01，***P<　0.001）

10 过表达 FEZF1-AS1 对 ESCC 细胞迁移能力的影响

使用质粒 GV129-FEZF1-AS1 在 EC1 和 EC9706 食管癌细胞系中过表达 FEZF1-AS1，利用 Transwell 实验检测 FEZF1-AS1 过表达对食管癌细胞系迁移能力的影响，实验结果如下图所示，在食管癌细胞系 EC1 和 EC9706 中过表达 FEZF1-AS1，可以显著增强其迁移能力（图 2.12 a,b）。

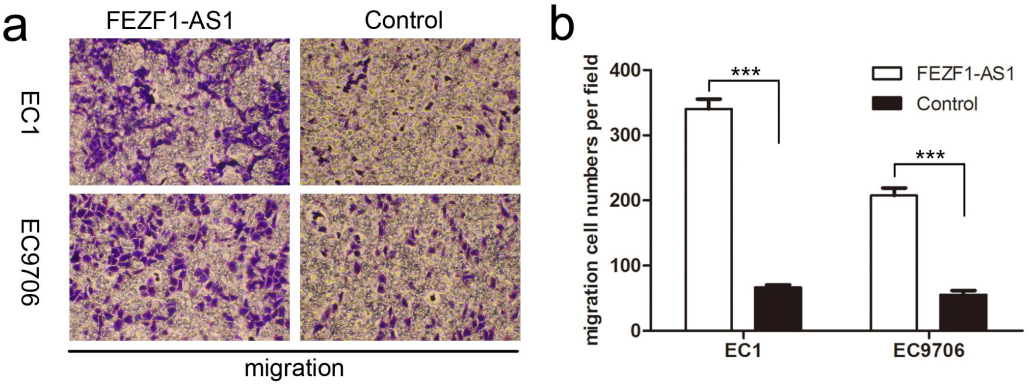


图 2.12　FEZF1-AS1 表达水平增高对 ESCC 体外细胞迁移的影响

（***P<　0.001）

中国知网　https://www.cnki.net

11　过表达 FEZF1-AS1 对 ESCC 细胞侵袭能力的影响

同样的，我们使用加 Matrigel 胶的 Transwell 实验检测了 FEZF1-AS1 过表达对 ESCC 细胞系侵袭能力的影响，实验结果表明 FEZF1-AS1 过表达显著增强了细胞系 EC1 和 EC9706 的侵袭能力（图 2.13 a,b）。

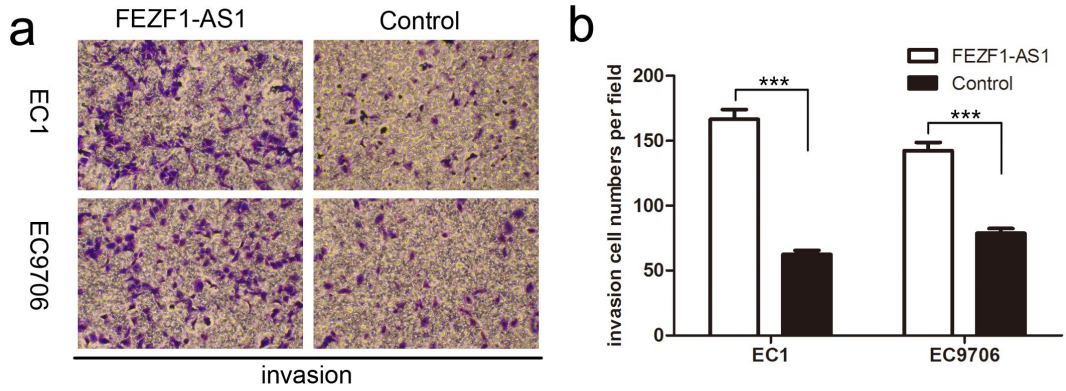


图 2.13　FEZF1-AS1 表达水平增高对 ESCC 体外细胞侵袭的影响

（***$P<$　0.001）

12　敲减及过表达 FEZF1-AS1 后 ESCC 细胞系中β-catenin 的表达水平变化

为探讨 FEZF1-AS1 促进 ESCC 细胞迁移侵袭能力的作用机制，本研究在 ESCC 细胞系中敲减及过表达 FEZF1-AS1 后，使用 RT-qPCR 实验检测了与肿瘤侵袭转移上皮间质转化（Epithelial-mesenchymal transition，EMT）过程密切相关的 TGF-β、Slug、Snail、wnt、β-catenin 等分子的 mRNA 表达水平。发现在 ESCC 细胞系中敲减 FEZF1-AS1 后细胞内β-catenin 表达量显著降低（图 2.14 a），过表达 FEZF1-AS1 后细胞内β-catenin 表达量显著增高（图 2.14 b）。

中国知网　https://www.cnki.net

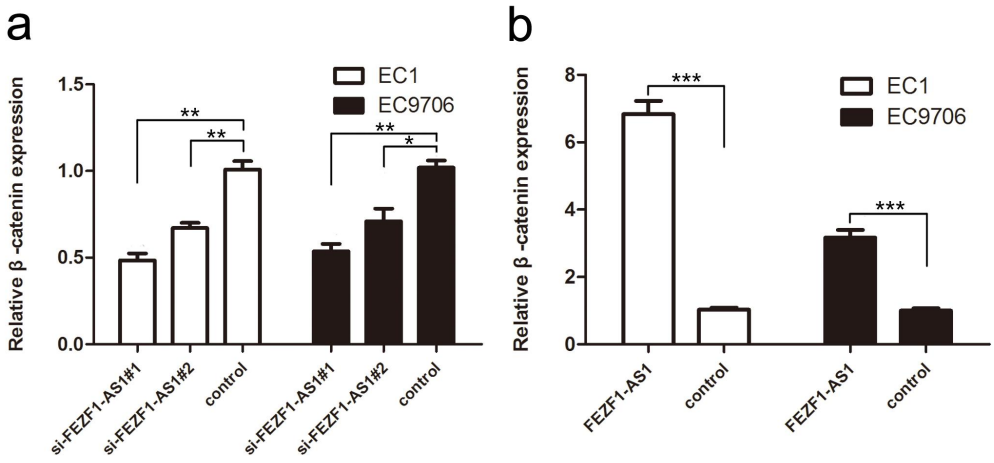


图 2.14　敲减及过表达 FEZF1-AS1 后 ESCC 细胞系的β-catenin 表达变化
（*P<0.05，**P<　0.01，***P<0.001）

13 ESCC 组织中 FEZF1-AS1 表达与β-catenin 表达的相关性

为明确 ESCC 中 FEZF1-AS1 和β-catenin 表达水平的关系，本研究进一步检测了 ESCC 患者组织β-catenin 的 mRNA 水平，分析了其表达与 FEZF1-AS1 表达的相关性。实验结果显示：与相应癌旁组织相比，β-catenin 在食管癌组织中高表达（图 2.15 a），该结果与 GEPIA 数据库中的分析结果相一致（图 2.15 b）；相关性分析显示 ESCC 患者组织中β-catenin 的表达水平和 FEZF1-AS1 的表达水平呈现显著正相关（图 2.15 c）。

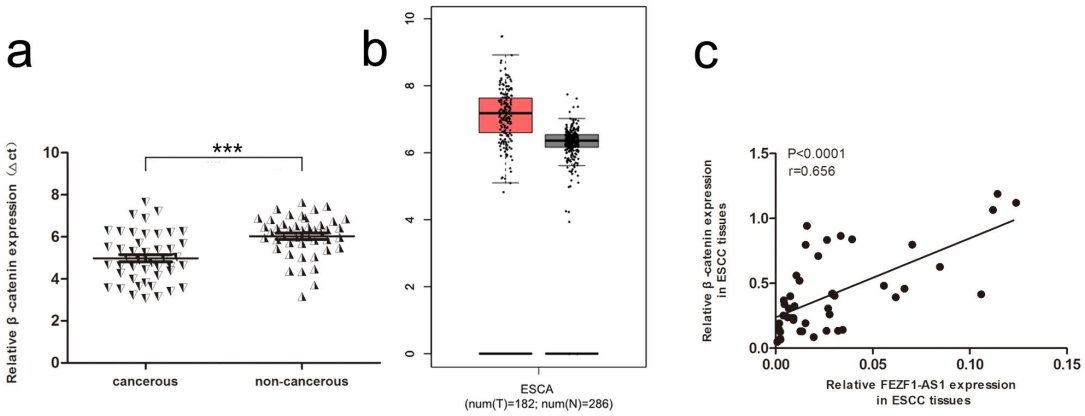


图 2.15　β-catenin 在 ESCC 组织中的表达及其与 FEZF1-AS1 表达的相关性
（***P<　0.001）

中国知网　https://www.cnki.net

（三）实验讨论

食管癌是我国发病率第三，死亡率第四的恶性肿瘤，其中绝大多数患者的病理类型为 ESCC[4]。ESCC 患者前期体征不明显，加之目前诊断的金标准技术是内镜和活检，患者检查体验较差，导致了食管癌患者多于晚期就诊，伴有淋巴结转移，死亡率高的临床现状[18]。ESCC 的转移是一个多因素参与、多步骤累积的复杂过程，涉及到多种基因的遗传学及表观遗传学改变，目前具体的分子机制尚不十分清楚[19]。因此，探索 ESCC 发生发展的内在分子机制，深化对 ESCC 疾病进程的了解，研究对食管癌治疗及预后改善有效的分子靶标显得尤为迫切。

癌症是一种基因网络失调的疾病。癌症全基因组关联研究显示，超过 80%的癌症相关单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms，SNPs）发生在基因组的非编码区域[20]。lncRNA 是一种长度大于 200 个核苷酸无蛋白质编码能力的 ncRNA[21]，近年来引起了人们的广泛关注，越来越多的证据表明 lncRNA 在调控人体各种细胞的生物学行为中发挥着重要作用[22,23]，且可以与 DNA、RNA、蛋白质分子等关键信号介质相互作用，赋予癌细胞生长和转移的能力[24-26]。例如 Chen 等人发现 LNMAT1 在淋巴结转移阳性的膀胱癌组织中上调，并与淋巴结转移和预后相关。在机制上，LNMAT1 可以通过增加 H3K4 甲基化将 hnRNPL 招募到 CCL2 启动子区进而激活其转录与表达，使巨噬细胞进入肿瘤，通过 VEGF-C 排泄促进淋巴转移[27]；Xiao 等人发现 FILNC1 在肾细胞癌中表达下调，其低表达与肾细胞癌临床预后差有关。此外，肾癌细胞中 FILNC1 的缺乏可以上调 c-Myc 表达从而减轻能量应激诱导的肾癌细胞凋亡，促进肾肿瘤的发展[28]；lncRNA CASC2 在乳腺癌组织和细胞系中显著下调，CASC2 可以抑制乳腺癌细胞增殖迁移并诱导其周期阻滞和早期凋亡，该功能部分通过失活 TGF-β信号通路实现[29]；LINC01296 在 NSCLC 组织及细胞系表达升高，在 NSCLC 细胞系敲减 LINC01296 的表达可以在体内外抑制其增殖，加速细胞体外凋亡。机制研究表明，INC01296/miR-598/Twist1 构成了促进 NSCLC 肿瘤进展的正反馈回路，为 NSCLC 的治疗提供了一种新的见解和有价值的治疗策略[30]。以上研究表明，lncRNA 相关研究对于肿瘤发生发展内在分子机制的阐明具有重要作用，探索 lncRNA 在食管癌中发挥的作用及其作用机制对于进一步明确食管癌的疾病机理具有重要意义。

FEZ 家族锌指 1 反义 RNA 1 （FEZF1- AS1）是位于 7 号染色体 FEZF1 基因反链上的 lncRNA，研究发现 FEZF1-AS1 在一些癌症如乳腺癌、结直肠癌中过表达并扮演致癌基因的角色，可以促进其肿瘤细胞的增殖和迁移侵袭。例如：

中国知网 https://www.cnki.net

lncRNA FEZF1-AS1 在人原发性结直肠癌（colorectal carcinoma，CRC）中显著上调，提示 CRC 转移和预后不良。在 CRC 细胞中下调 FEZF1-AS1 表达可显著抑制其体内外生长和转移，上调 FEZF1-AS1 表达则结果相反[31]；FEZF1-AS1 在乳腺癌组织及细胞系中高表达，可以显著促进乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力，并促进肿瘤的体内生长。机制实验证实，FEZF1-AS1 可以作为 ceRNA 作用于 miR-30a 进而调控 Nanog 的表达，通过 FEZF1-AS1/miR-30a/Nanog 轴促进乳腺癌进展[32]。然而，目前 lncRNA FEZF1-AS1 在 ESCC 中的生物学作用尚不清楚。

在本研究中，我们首先收取了 45 对 ESCC 患者的癌组织和相应癌旁组织作为临床样本，RT-qPCR 检测了组织样本中 FEZF1-AS1 的表达水平，发现 FEZF1-AS1 在 ESCC 组织中的表达水平显著增加。紧接着 GEPIA 数据库的分析结果也印证了这一结论。随后根据测得的食管癌组织中 FEZF1-AS1 的表达水平将患者分为 FEZF1-AS1 高表达组和 FEZF1-AS1 低表达组，与收集到的患者临床病历资料经χ^2检验结合分析，发现 FEZF1-AS1 高表达与患者的淋巴结转移明显相关，这一结果提示 FEZF1-AS1 在 ESCC 中可能作为促癌基因发挥作用。

为明确 FEZF1-AS1 在 ESCC 细胞生物学功能中发挥的作用，我们进一步使用 siRNA 及过表达质粒在食管癌细胞系 EC1 和 EC9706 中进行了 FEZF1-AS1 的敲减及过表达实验。利用 WST-1 增殖实验、周期实验、Transwell 迁移和侵袭实验探索了 FEZF1-AS1 对 ESCC 细胞生物学行为变化的影响。我们的实验结果表明，FEZF1-AS1 在 ESCC 细胞系中表达水平的高低对其增殖以及细胞周期无明显影响；在 ESCC 细胞系中敲减 FEZF1-AS1 表达对其迁移和侵袭能力有显著抑制作用，而上调 FEZF1-AS1 表达对其迁移侵袭能力有显著促进作用。即长链非编码 RNA FEZF1-AS1 在 ESCC 中发挥促进肿瘤细胞迁移侵袭的重要作用。

上皮细胞间质化（Epithelial-mesenchymal transition，EMT）程序的激活被普遍认为是肿瘤转移进展的重要组成部分[33,34]。EMT 是一个复杂的过程，其发生过程中的分子重编程是由多种因素触发的，许多信号通路可以诱导 EMT，而 Wnt/β-catenin 通路是其中最重要的诱导途径之一[35]。研究表明，β-连环蛋白（β-catenin）的核内累积可以启动 Snail1、Twist 、Slug 等基因的转录，降低 E-钙黏蛋白（E-cadherin）的表达，进而促进细胞转移[36]。β-catenin 是一种胞内脚手架蛋白与粘附分子[37]，有研究报道其异常表达与 lncRNA 的调控作用有关。例如：Wang 等人发现 LncRNA LINC00968 可以通过激活β-catenin 表达进而促进 NSCLC 细胞的生长、迁移和侵袭，该实验表明 lncRNA 可以正向调控β-catenin 在 NSCLC 中的表达，从而促进癌症进展[38]；相反的，Xiang 等人发现，lncRNA DGCR5 过表达可以抑制 Wnt/β-catenin 信号通路中β-catenin 的表达进而抑制肝癌进展，表明长链非编码 RNA 可以负向调控β-catenin 在肝癌中的表达，起到抑癌

中国知网 https://www.cnki.net

作用[39]。

在本研究中，我们发现敲低 ESCC 细胞系中 FEZF1-AS1 的表达水平可以显著降低细胞内β-catenin 的表达；而过表达 ESCC 细胞系中 FEZF1-AS1 水平可以显著增加细胞内β-catenin 的表达。此外，患者组织的 RT-qPCR 实验结果表明β-catenin 在 ESCC 中高表达，其表达水平与组织 FEZF1-AS1 的表达水平呈现显著正相关。因此，我们推测 FEZF1-AS1 对 ESCC 转移的促进作用可能是通过正向调控β-catenin 表达，激活 Wnt/β-catenin 信号通路介导的 EMT 过程实现的。

本研究首次检测了 FEZF1-AS1 在 ESCC 组织及细胞中的表达水平，通过敲减和过表达实验验证了 FEZF1-AS1 在食管癌细胞中的生物学功能，并对其机制进行了初步探讨。为深入研究 ESCC 的转移机制提供了新的视角及后续实验依据。然而，由于动物实验尚未实施，深入机制尚未明确，还需课题组成员后续实验的进一步研究。

中国知网 https://www.cnki.net

（四）实验结论

1　FEZF1-AS1 在食管鳞癌组织中高表达，且与患者临床淋巴结转移和组织中β-catenin mRNA 的表达水平呈正相关。

2　FEZF1-AS1 在 ESCC 细胞系中高表达，在 ESCC 细胞系敲减或过表达 FEZF1-AS1 可以显著抑制或促进其迁移及侵袭能力，而对其增殖能力和细胞周期无显著影响。FEZF1-AS1 促进 ESCC 细胞迁移侵袭可能是通过 Wnt/β-catenin 这一通路实现的。

中国知网　https://www.cnki.net

参考文献

[1] Smyth E C, Lagergren J, Fitzgerald R C, et al. Oesophageal cancer[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2017, 3: 17048.

[2] Lijun Y, Kaiyan S, Jie C, et al. Long non-coding RNA FTH1P3 regulated metastasis and invasion of esophageal squamous cell carcinoma through SP1/NF-kB pathway[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 106: 1570-1577.

[3] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. Ca A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2): 87-108.

[4] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. Ca A cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132.

[5] Sun K, Zhao X, Wan J, et al. The diagnostic value of long non-coding RNA MIR31HG and its role in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Life Sciences, 2018, 202: 124-130.

[6] Boon RA, Jae N, Holdt L, et al. Long Noncoding RNAs: From Clinical Genetics to Therapeutic Targets?[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2016, 67(10): 1214-1226.

[7] Wang P, Xu J, Wang Y, et al. An interferon-independent lncRNA promotes viral replication by modulating cellular metabolism[J]. Science, 2017, 358(6366): 1051-1055.

[8] Mao Z, Li H, Du B, et al. LncRNA DANCR promotes migration and invasion through suppression of lncRNA-LET in gastric cancer cells[J]. Bioscience Reports, 2017, 37(6): BSR20171070.

[9] Huarte M, Rinn JL. Large non-coding RNAs: missing links in cancer?[J]. Human Molecular Genetics, 2010, 19(R2): R152-161.

[10] Ma J, Li T, Han X, et al. Knockdown of LncRNA ANRIL suppresses cell proliferation, metastasis, and invasion via regulating miR-122-5p expression in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2018, 144(2): 205-214.

[11] He W, Zhong G, Jiang N, et al. Long noncoding RNA BLACAT2 promotes bladder cancer-associated lymphangiogenesis and lymphatic metastasis[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2018, 128(2): 861-875.

[12] Zhang XD, Huang GW, Xie YH, et al. The interaction of lncRNA EZR-AS1 with SMYD3 maintains overexpression of EZR in ESCC cells[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(4): 1793-1809.

[13] Tang Y, Xiao G, Chen Y, et al. LncRNA MALAT1 promotes migration and invasion of non-small-cell lung cancer by targeting miR-206 and activating Akt/mTOR signaling[J]. Anti-cancer Drugs, 2018, 29(8): 725-735.

[14] Wu X, Zhang P, Zhu H, et al. Long noncoding RNA FEZF1-AS1 indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumorigenesis via activation of Wnt signaling pathway[J].

中国知网 https://www.cnki.net

Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 96: 1103-1108.

[15] Liu YW, Xia R, Lu K, et al. LincRNAFEZF1-AS1 represses p21 expression to promote gastric cancer proliferation through LSD1-Mediated H3K4me2 demethylation[J]. Molecular Cancer, 2017, 16(1): 39.

[16] He R, Zhang FH, Shen N. LncRNA FEZF1-AS1 enhances epithelial-mesenchymal transition (EMT) through suppressing E-cadherin and regulating WNT pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 95: 331-338.

[17] Wang YD, Sun XJ, Yin JJ, et al. Long non-coding RNA FEZF1-AS1 promotes cell invasion and epithelial-mesenchymal transition through JAK2/STAT3 signaling pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 106: 134-141.

[18] Yazbeck R, Jaenisch SE, Watson DI. From blood to breath: New horizons for esophageal cancer biomarkers[J]. World Journal of Gastroenterology, 2016, 22(46): 15-21.

[19] Sun W, Zu Y, Fu X, et al. Knockdown of lncRNA-XIST enhances the chemosensitivity of NSCLC cells via suppression of autophagy[J]. Oncology Reports, 2017, 38(6): 3347-3354.

[20] Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS, et al. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer[J]. British Journal of Cancer, 2013, 108(12): 2419-2425.

[21] Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways[J]. Cancer cell, 2016, 29(4): 452-463.

[22] Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas[J]. Molecular Cancer, 2011, 10: 38.

[23] Hosseini ES, Meryet-Figuiere M, Sabzalipoor H, et al. Dysregulated expression of long noncoding RNAs in gynecologic cancers[J]. Molecular Cancer, 2017, 16(1): 107.

[24] Ferre F, Colantoni A, Helmer-Citterich M. Revealing protein-lncRNA interaction[J]. Briefings in Bioinformatics, 2016, 17(1): 106-116.

[25] Lin C, Yang L. Long Noncoding RNA in Cancer: Wiring Signaling Circuitry[J]. Trends in Cell Biology, 2018, 28(4): 287-301.

[26] Ballantyne MD, McDonald RA, Baker AH. lncRNA/MicroRNA interactions in the vasculature[J]. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2016, 99(5): 494-501.

[27] Chen C, He W, Huang J, et al. LNMAT1 promotes lymphatic metastasis of bladder cancer via CCL2 dependent macrophage recruitment[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3826.

[28] Xiao ZD, Han L, Lee H, et al. Energy stress-induced lncRNA FILNC1 represses c-Myc-mediated energy metabolism and inhibits renal tumor development[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 783.

[29] Zhang Y, Zhu M, Sun Y, et al. Upregulation of lncRNA CASC2 Suppresses Cell Proliferation and Metastasis of Breast Cancer via Inactivation of the TGF-beta Signaling Pathway[J]. Oncology Research, 2019, 27(3): 379-387.

[30] Xu L, Wei B, Hui H, et al. Positive feedback loop of lncRNA LINC01296/miR-598/Twist1

中国知网 https://www.cnki.net

promotes non-small cell lung cancer tumorigenesis[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(4): 4563-4571.

[31] Chen N, Guo D, Xu Q, et al. Long non-coding RNA FEZF1-AS1 facilitates cell proliferation and migration in colorectal carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(10): 11271-11283.

[32] Zhang Z, Sun L, Zhang Y, et al. Long non-coding RNA FEZF1-AS1 promotes breast cancer stemness and tumorigenesis via targeting miR-30a/Nanog axis[J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 233(11): 8630-8638.

[33] Goossens S, Vandamme N, Van Vlierberghe P, et al. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET[J]. Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on cancer, 2017, 1868(2): 584-591.

[34] Singh M, Yelle N, Venugopal C, et al. EMT: mechanisms and therapeutic implications[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2017, 182: 80-94.

[35] Garg M. Epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factors-multifunctional regulators in cancer[J]. World Journal of Stem Cells, 2013, 5(4): 188-195.

[36] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. Developmental Cell, 2009, 17(1): 9-26.

[37] Katoh M. Multilayered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/betacatenin signaling activation (Review)[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 42(2): 713-725.

[38] Wang Y, Zhou J, Xu YJ, et al. Long non-coding RNA LINC00968 acts as oncogene in NSCLC by activating the Wnt signaling pathway[J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 233(4): 3397-3406.

[39] Wang XL, Shi M, Xiang T, et al. Long noncoding RNA DGCR5 represses hepatocellular carcinoma progression by inactivating Wnt signaling pathway[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(1): 275-282.

中国知网 https://www.cnki.net

综述

食管癌与长链非编码 RNA 相关研究进展

杨丽君 综述

贺付成 审校

食管癌(Esophageal cancer，EC)是世界范围内发病率、死亡率高的消化道恶性肿瘤之一，患者起病隐匿，中晚期诊断时常伴淋巴结转移，经外科及辅助治疗后五年生存率低，相关发病机制未明。lncRNA 是长度大于 200 个核苷酸的非蛋白编码 RNA，已经被证实在细胞的生物学功能中发挥重要的调节作用。同时，越来越多的研究表明 lncRNA 在食管癌的疾病进程中扮演着癌基因或抑癌基因的重要角色，可以促进或者抑制食管癌细胞的增殖、周期、凋亡、迁移侵袭等生物学功能，其差异表达与患者的临床病理因素以及疾病预后密切相关。本文就食管癌与长链非编码 RNA 相关研究进展做以下综述。

1 食管癌

1.1 食管癌的病理学及流行病学特征

食管癌是一种极具侵袭性的消化系统肿瘤，在癌症死亡率中排名第六，是世界上最致命的癌症之一[1,2]。从病理学上讲 EC 通常以两种形式发生：一种是鳞状上皮细胞来源的食管鳞癌(Esophageal squamous carcinoma，ESCC)，另一种是柱状腺细胞来源的食管腺癌 (Esophageal adenocarcinoma，EAC)[3]。这两者虽在组织病理学上而言是两种不同类型的实体瘤，但在流行病学分布、危险因素、发病机制以及临床和预后相关性方面又有些许重叠[4]。

ESCC 是全球最常见的食管癌病理类型[5]，在亚洲国家的发病率最高[6]，患者多数年龄较大，男性患者发病率大于女性。其发病的主要危险因素是烟草和酒精的摄入，但也有其他因素在这一癌症的发展中起促进作用，如摄入过热的食物和饮品、营养缺乏以及水果和蔬菜摄入不足等[7]。

EAC 的区域流行病学特征在过去几十年发生了变化：直到 20 世纪 70 年代，

中国知网 https://www.cnki.net

ESCC 还一直是美国和西欧国家最常见的食管癌病理类型，而在过去的几十年里，西方国家 ESCC 的发病率有所下降，EAC 的发病率则有所上升[8]，其增加的主要危险因素与胃食管反流病(Gastro-esophageal reflux disease，GERD)和肥胖患者的增加有关[5,9]。

1.2 食管癌在中国

食管癌是中国第三大最常被诊断的癌症，也是我国第四大癌症死亡原因，患者的发病率约占全世界食管癌患者的 46.6%，病理类型以食管鳞癌为主（占比 90%以上）[6,10]。根据全球癌症状况最新数据估计，2012 年全球食管癌死亡为 40.02 万人，其中中国食管癌死亡为 19.75 万人，占全球总人数的 49.35% [11]，形势严峻。我国男性 ESCC 患者的发病率高于女性，城市男性患者死亡约为女性的 3.08 倍，农村男性患者死亡约为女性的 2.15 倍[12]。农村地区食管癌发病率普遍高于城市地区，以中国中部的河南、河北、山西的某些农村地区更为明显，例如河北省磁县的发病率是北京上海等城市的十多倍[13]。在我国，不良的生活习惯是引起食管癌发病的主要原因之一，抽烟、饮酒、热食、亚硝酸盐摄入过量、幽门螺杆菌感染是患病的高风险因素[14-17]。目前对于食管癌的主要预防策略是降低发病的风险因素，敦促高危人群改善不良生活习惯，如戒烟和避免过度饮酒等。

1.3 食管癌的诊断与治疗

食管癌发病早期无明显临床体征及症状，目前世界范围内尚缺少对于食管癌诊断的可靠标志物，故患者的诊断多在疾病中晚期，常出现淋巴结转移[18,19]。患者的早期发现和治疗意味着生存率的提高，准确的食管癌诊断、肿瘤分期和辅助治疗是评价食管癌手术可操作性和确定最佳治疗方案的关键[20]。

目前国际上对于食管癌及其癌前病变的金标准检查是食管胃十二指肠镜（Esophago-gastro-duodenoscopy，EGD），除此之外经鼻内窥镜检查（Trans-nasal endoscopy，TNE）、胶囊内窥镜成像、体积激光显微内镜（Volumetric laser endomicroscopy，VLE）、食管细胞拉网收集装置等方法也可用于检查食管癌[21,22]。

从治疗策略上来讲食管恶性肿瘤的治疗可以分为两个轴:局部治疗和系统治疗[22]。需要根据癌症的类型、局部或区域累及程度以及患者自身的功能状况对

中国知网 https://www.cnki.net

每个患者进行单独评估，以确定合适的治疗方案。近半个世纪以来，食管癌的主流治疗方法一直是手术，外科手术如胸腔镜手术和开腹食管切除术在食管癌患者的局部控制中发挥重要作用。如在不超过粘膜层(T1a)的病变中，通常选用内镜下切除来根治；伴有淋巴结转移、体积较大的肿瘤则可通过开胸切除术治疗[23,24]。然而，尽管外科技术在不断进步，截止目前为止仍有大多数患者在癌组织治疗性切除后死于肿瘤的继发性远处转移，患者五年生存率低[25]。在放化疗方面，食管癌对化疗和放疗的敏感性高于其他胃肠道癌症，放疗联合卡铂加紫杉醇化疗是食管鳞癌和腺癌的首选新辅助治疗方案[26]。此外，最近新开发的多种单克隆抗体和酪氨酸激酶抑制剂，单独或联合传统治疗也可改善晚期食管癌患者的预后[27]。综上，多模式治疗，结合外科治疗和非手术治疗的优点，有针对性的进行个体化治疗可在一定程度上改善食管癌患者的预后。

2 长链非编码 RNA

2.1 长链非编码 RNA 的起源与分类

测序技术的最新进展表明，人类基因组普遍可以被转录，但只有不到 2%的蛋白质编码转录本，剩余转录本均为非编码 RNA (non-coding RNA)[28]。最初发现这些非编码 RNA 时，人们认为它们是基因组转录过程中的“噪音”，因此在很长的一段时间没有重视其存在[29]。长链非编码 RNA（long non-coding RNA, lncRNA）是这些 ncRNA 的一种，它一般被定义为长度超过 200 个核苷酸，几乎不具编码蛋白质潜能的 RNA 转录本[30,31]。与能进行蛋白质编码的 mRNA 相比，lncRNA 具有平均丰度较低，常驻留在细胞核内，更强的组织特异性，种间序列保护较差等特点[32]。

目前 lncRNA 的分类还很不完善，根据 lncRNA 相对于蛋白编码基因的位置，可以将其定义为两大类：（1）基因间 lncRNA：包括伪基因、长基因间非编码 RNA（lincRNAs）、超长基因间非编码 RNA（vlincRNAs / macroRNAs）等；（2）编码基因重叠 lncRNA：以内含子 RNA、天然反义转录本（NATs）、启动子 RNA 等一系列不断扩展的子类为代表[31,33]；根据 lncRNA 对基因表达的作用，可以将其分为三类：（1）顺式作用 lncRNA；（2）反式作用 lncRNA；（3）同时具有顺式和反式调控而难以归为一类的 lncRNA[34]；根据 lncRNA 的作用机制，如转

中国知网 https://www.cnki.net

译抑制、mRNA 降解、RNA 诱骗、促进染色质修饰物的招募、调节蛋白活性、通过海绵作用调节 miRNA 的可用性等机制又可将其分为：（1）参与调节基因转录的 lncRNA；（2）参与转录后调节的 lncRNA；（3）参与表观遗传学修饰的 lncRNA 三类[35,36]。

2.2 长链非编码 RNA 的作用与功能

随着 lncRNA 相关研究的逐渐深入，人们渐渐地摒弃了在 lncRNA 发现伊始认为它是转录过程中的“垃圾 RNA”的错误认识。科学家们发现 lncRNA 可以通过其 RNA 二级结构结合核酸或蛋白质，参与转录前、转录中和转录后水平的调控。如参与组蛋白修饰[37]，参与剂量补偿效应[38]， 参与 DNA 甲基化[39]，参与染色质重塑[40]，参与基因转录的正负向调节[41-43]，参与转录后修饰[42]，参与 mRNA 降解[44]，参与 mRNA 保护[45]等。通过以上的调控方式，lncRNA 被发现可以作用于细胞内多种关键分子通路，进而参与多种生物学活动。如 lncRNA 可以指导和维护女性 X 染色体剂量补偿[46]，参与维持干细胞的干性和定向分化[47]，控制体细胞的组织分化[46]；调控微血管功能[48]，调控造血细胞的发育和衰老，参与炎症诱导[49]，参与免疫细胞的活化[50]，参与细胞生长[51]等等。

2.3 长链非编码 RNA 与疾病

研究表明，长链非编码 RNA 在多种性疾病的发生发展中存在异常表达，并对疾病的进程以及患者预后起重要作用。如在糖尿病 GK mMVE 细胞中抑制 lncRNA IGF2AS 的表达可以显著增强其增殖和迁移能力，在分子和蛋白水平上调 IGF2 和 VEGF，进而刺激 2 型糖尿病患者的血管生成[52]；lncRNA MALAT1 在肝脏再生过程中上调，可以通过抑制 Axin1 和 APC 的表达来上调 cyclin D1 激活 Wnt /β-catenin 通路，进而促进肝细胞的增殖及抑制其体外凋亡，对 MALAT1 的药理学干预可能对肝功能衰竭或肝移植有益[53]；Zhang 等人的研究表明，在类风湿性关节炎中 lncRNA HOTAIR 可以通过调节 miR-138 的表达以及 NF-κB 信号通路的活性来增加软骨细胞增殖率、抑制炎症对机体起保护作用，调控 HOTAIR 的表达可能是一种有前途的类风湿性关节炎治疗策略[54]；lncRNA PFR 被发现在肺成纤维细胞和小鼠肺纤维化组织中均有明显升高，过表达 PFRL 可以诱导成纤维细胞的活化和胶原沉积，机制上，PFRL 可以通过调节 miR-26a 和

中国知网 https://www.cnki.net

Smad2 之间的相互抑制作用促进肺纤维化的进展，这一 lncRNA 可能是特发性肺纤维化的治疗靶点[55]；lncRNA H19 在 TGF-β2 诱导的 HK-2 体外细胞纤维化、单侧输尿管梗阻诱导的体内肾纤维化体中显著上调，抑制 H19 表达可以通过 H19/miR-17/纤连蛋白调节网络减弱肾纤维化，这对于肾脏纤维化疾病而言可能是一种新的治疗方法[56]；Li 等人发现，lncRNA Mirt1 主要在心脏成纤维细胞中表达，下调其表达可以使炎症因子表达下降，减轻炎性细胞浸润，抑制缺氧条件下的巨噬细胞迁移，减少心肌细胞凋亡，改善心脏功能[57]等等。

2.4 长链非编码 RNA 与肿瘤

越来越多的研究证据显示 lncRNA 与肿瘤发生发展密切相关，在患者癌组织及非癌组织中差异表达，参与肿瘤细胞的增殖、周期、凋亡、迁移、侵袭等各种生物学过程。根据其表达及功能又可将其分为促癌 lncRNA 和抑癌 lncRNA。

如 Wei 等人发现 lncRNA MEG3 在胃癌组织中表达量较低，发挥抑癌作用，过表达 lncRNA MEG3 可以增加胃癌细胞中 p53 的表达，降低其增殖和转移能力[58]；lncRNA PCGEM1 和 PRNCR1 在前列腺癌中高表达，可以调节前列腺癌细胞的雄激素依赖和并在体内外促进其细胞增殖，有望作为前列腺癌的治疗靶点[59]；lncRNA NUTF2P3-001 在胰腺癌中显著过表达，提示肿瘤预后较差。在胰腺癌细胞系下调 lncRNA NUTF2P3-001 表达后，胰腺癌细胞的体内外增殖和侵袭能力均可受到明显抑制[60]; lncRNA ROR 在肾细胞癌组织和细胞系中表达水平显著增高，高表达 ROR 的肾细胞癌患者生存率较低。在肾细胞癌细胞系降低 ROR 的表达可导致 p53 表达增加，cMyc 表达减少，体外肾癌细胞增殖减少，凋亡增加[61]；lncRNA ATB 在结肠癌以及其转移癌组织中表达上调，在细胞系下调其表达可使上皮标志物 E-cad、ZO-1 表达增加，间充质标志物 ZEB1 和 N-cad 表达减少，显著抑制结肠癌的进展[62]；Sun 等人发现 lncRNA XIST 在非小细胞肺癌中过表达，下调其表达可以抑制 ATG7 表达水平进而降低细胞自噬能力，并增强非小细胞肺癌细胞的化学敏感性[63]；lncRNA TUG1 在宫颈癌组织和细胞系中显著上调，TUG1 表达升高与肿瘤体积较大、分期分化差、淋巴结转移有关。机制上，在宫颈癌细胞系敲减 TUG1 表达可以下调 Bcl-2 和 caspase-3 的表达进而抑制细胞增殖和促进细胞凋亡，同时抑制上皮-间充质转化（Epithelial-mesenchymal transition，EMT）抑制细胞迁移和侵袭[64]等等。以上研究表明 lncRNA 显著影响

中国知网 https://www.cnki.net

多种肿瘤的发生发展过程，lncRNA 相关研究将为癌症的靶向治疗以及预后评估提供新的方向和思路。

3. 食管癌与长链非编码 RNA

3.1 食管癌增殖相关长链非编码 RNA

食管癌发生后肿瘤细胞生长迅速，疾病后期癌组织容易堵塞食道导致进食困难，给病人带来极大的痛苦，直接导致患者生活质量严重下降。食管癌发生与生长过程中涉及多种因素，最近有许多研究表明食管癌细胞的生长与 lncRNA 密切相关。如：Xu 等人的研究显示，lncRNA SNHG7 在食管癌组织和细胞系中表达明显上调，使用 si-SNHG7 在 ESCC 细胞系干扰其表达后 p15 和 p16 的表达显著升高，食管癌细胞增殖受到抑制，凋亡率增加，细胞周期在 G1-G0 期受阻，该研究证明 SNHG7 在食管癌细胞增殖过程中起着促进作用[65]；同样的，与食管正常上皮细胞及癌旁组织相比，ESCC 细胞系及癌组织中 lncRNA LUCAT1 表达明显上调。下调 LUCAT1 的表达可以显著降低 ESCC 细胞增殖，诱导细胞凋亡[66]；Li 的团队发现，与对照组织相比，ESCC 肿瘤标本中 lncRNA PVT1 表达明显上调，在细胞系敲除 PVT1 可以在体内外抑制肿瘤细胞的生长。机制上，PVT1 可以通过与 miR-203 竞争性结合，进而增加 LASP1 的表达量，发挥促瘤作用，该研究首次提供了 ESCC 中 PVT1/miR-203/LASP1 轴失调的证据[67]；LINC01296 在 ESCC 组织中的表达明显高于正常食管黏膜组织，细胞功能学实验结果显示 LINC01296 的敲除显著抑制了 ESCC 细胞的增殖、克隆形成、迁移侵袭能力。RNA 免疫沉淀（RNA Binding Protein Immunoprecipitation，RIP）和染色质免疫沉淀（RNA-Binding Protein Immunoprecipitation，ChIP）实验表明，LINC01296 可以通过与 ESCC 细胞中的 EZH2 相互作用，在表观遗传学水平抑制 KLF2 的表达，促进肿瘤进展[68]；Chen 的研究团队发现与邻近非癌组织相比，ESCC 中 lncRNA SBF2-AS1 的表达显著升高（8.82 倍），其表达量与肿瘤大小和分期呈正相关，使用 siRNA 敲减 SBF2-AS1 后，ESCC 细胞周期在 G2 期受阻，增殖及侵袭能力受到明显抑制（P<0.05），证实了 SBF2-AS1 可能是一种新的生物标志物和 ESCC 潜在的治疗靶点[69]。以上研究表明 lncRNA 在 ESCC 细胞增殖过程中通过不同的分子机制起着相应的调控作用，可以为食管癌的靶向治疗提供新的

中国知网 https://www.cnki.net

方向和思路。

3.2 食管癌迁移侵袭相关长链非编码 RNA

食管癌作为消化道恶性肿瘤的一种，在疾病进展过程中容易发生早期和肿瘤切除后的晚期转移，给患者的治疗带来困难，给患者的预后带来不可预料的麻烦与痛苦。因此，探讨食管癌转移过程中的相关分子机制具有重要意义。

近期，许多研究表明 lncRNA 与食管癌细胞的迁移侵袭有着密不可分的联系。如 LINC00675 被发现在 ESCC 组织和细胞系中显著下调，其表达水平下降与患者淋巴结转移及临床分期进展有关。体外实验表明，LINC00675 过表达可以抑制 Wnt /β-catenin 通路进而抑制 ESCC 细胞的迁移、侵袭和 EMT 过程[70]；另有研究表明，与配对的相邻非癌组织相比，ESCC 中 lncRNA DLX6-AS1 表达上调，与组织分化差、肿瘤淋巴结转移、分期显著相关。DLX6-AS1 下调显著抑制 ESCC 细胞的增殖、侵袭和迁移能力，提高细胞凋亡率。机制探讨发现，沉默 DLX6-AS1 可以影响 ESCC 细胞的 EMT 过程[71]；同样的，TTN-AS1 作为一种致癌 lncRNA，也被发现在 ESCC 组织和细胞系中高度表达，在功能上可以促进 ESCC 细胞的增殖和转移。在机制上，TTN-AS1 可以竞争性结合 miR-133，进而促进转录因子 Snail1 的表达，促进上皮间质转化。同时 TTN-AS1 还可以通过海绵作用于 miR-133b 并上调 mRNA 稳定蛋白 HuR 的表达，诱导 FSCN1 升高，进一步增强 ESCC 细胞的侵袭能力[72]；Yao 等人发现 ESCC 组织和细胞系中 lncRNA RP11-766N7.4 表达下调，提示患者淋巴结转移、肿瘤分期差、生存率低。下调 RP11-766N7.4 可以诱导 EMT 进程进而促进 ESCC 细胞迁移和侵袭，过表达 RP11-766N7.4 则结果相反，而 RP11-766N7.4 对 ESCC 细胞的增殖、细胞周期和凋亡无显著影响[73]；研究表明，lncRNA CASC9 在 ESCC 患者癌组织中高表达，细胞实验结果显示 CASC9 可以在整合素通路上游诱导物 LAMC2 的启动子中增强 CBP 和 H3K27 的乙酰化，上调 LAMC2 的表达，进而促进 ESCC 转移，裸鼠体内实验也证明了下调 CASC9 的表达可以显著抑制 ESCC 的转移能力[74]。

这些最新的研究成果表明，lncRNA 在食管癌中差异表达，抑癌相关 lncRNA 的减少或促癌相关 lncRNA 的增加均能导致食管癌细胞运动性的增加，影响食管癌的转移能力。

中国知网 https://www.cnki.net

3.3 食管癌耐药相关长链非编码 RNA

目前晚期 ESCC 患者对传统的术后化疗策略容易产生耐药，降低化疗疗效，更好地了解 ESCC 耐药的分子机制可以有针对性的制定个性化治疗策略，对改善 ESCC 患者的预后具有重要意义。

近年来，研究证实多种 lncRNA 可参与调节 ESCC 对化疗药物的耐药。如 Lin 等人检测了 lncRNA LINC00261 在 75 例 5-氟尿嘧啶（5-FU）耐药的 ESCC 患者癌组织中的表达水平，发现其表达水平显著降低。机制实验表明 LINC00261 可以招募 DNA 甲基转移酶（DNMT）来增加细胞内二氢嘧啶脱氢酶（DPYD，可降解 5-氟尿嘧啶）基因启动子的甲基化，从而降低具有 5- FU 抗性的 TE-1 和 -5 细胞中 DPYD 的活性，进而抑制其增殖和凋亡抵抗，该研究结果显示高表达 LINC00261 可能对改善食管癌患者的化疗反应和提高生存率[75]; lncRNA PCAT-1 在食管癌组织中的表达量高于正常粘膜组织，抑制细胞内 PCAT-1 表达可以抑制食管癌细胞的增殖，并提高其对顺铂的化学敏感性。该研究表明沉默 PCAT-1 可能是抑制食管癌患者顺铂耐药的一种治疗策略[76]；ESCC 组织和细胞系中 lncRNA TUSC7 表达下调，体内外实验结果证实在 ESCC 中过表达 TUSC7 可以抑制 miR-224 的同时增加 DESC1 的表达，进而抑制 ESCC 细胞增殖和化疗耐药，促进细胞凋亡，证实了 TUSC7 可以通过 EGFR/AKT 通路抑制 ESCC 细胞的化疗耐药[77]。以上研究结果表明，部分 lncRNA 的差异表达与食管癌的化疗耐药情况显著相关，调节 lncRNA 的表达含量可以增加化疗药物的敏感性，这可能是在食管鳞癌治疗过程中减轻化疗耐药的一种新思路。

3.4 食管癌治疗相关长链非编码 RNA

许多食管癌患者经过传统手段治疗后，死于肿瘤的复发或远处转移，预后较差。因此，探索食管癌治疗的新方法、新策略对于我国食管癌患者的生命安全显得至关重要。lncRNA 与食管癌的相关研究表明，lncRNA 有潜力作为食管癌患者治疗的新靶点。如 Huang 等人发现， lncRNA GAS5 在 ESCC 组织中过表达，在 ESCC 细胞系过表达 GAS5 可以抑制其增殖、迁移和侵袭。机制实验表明，GAS5 作为干扰素（IFN）刺激基因，是 IFN 应答的阳性调节因子，而 IFN 又可以通过 JAK-STAT 通路正向调控 GAS5 的表达，GAS5 与 IFN 信号通路构成的反馈环在 ESCC 中起着重要的抗肿瘤作用，可以作为食管癌潜在的治疗靶点

中国知网 https://www.cnki.net

[78]；MALAT1 在 ESCC 组织中高表达，使用 si-MALAT1 沉默 MALAT1 的表达可以显著抑制食管癌细胞的增殖、迁移和肿瘤球形成，同时增加食管癌细胞的凋亡。在动物实验中下调 MALAT1 的表达，可以显著抑制肿瘤的形成，提高裸鼠存活率，提示 MALAT1 可能是 ESCC 治疗的潜在靶点[79]；Liu 及其研究团队发现 lncRNA AK001796 在 ESCC 肿瘤组织中的表达明显高于邻近非肿瘤组织。使用 siRNAs 下调 AK001796 的表达可以正向调节 MDM2/p53 信号通路，抑制异种移植小鼠模型中 ESCC 细胞的生长、细胞周期和肿瘤形成，表明干预 AK001796 的表达可能是 ESCC 治疗的新方法[80]。从以上相关研究我们得出结论，敲减或过表达食管癌转移相关 lncRNA 有望成为食管癌治疗的新方向，为未来食管癌治疗提供靶点。

3.5 食管癌预后相关长链非编码 RNA

在癌症治疗中对于患者预后的判断是治疗过程的重要环节，同时也是患者及其家人的关心重点。最近的研究表明 lncRNA 的异常表达可以在一定程度上辅助医生对 ESCC 患者的预后判断。例如：ESCC 癌组织及细胞系中 LINC01296 的表达显著上调，下调 LINC01296 显著抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭。LINC01296 高表达的 ESCC 患者总生存期（Overall survival，OS）和无进展生存期（Progression-free survival，PFS）较短（P=0.0009，P=0.0005），单变量和多变量分析显示 LINC01296 是 ESCC 患者 OS 和 DFS 的独立预测因子[81]；Pan 等人的研究检测了 82 个 ESCC 组织及邻近非癌组织中 lncRNA FOXCUT 和 FOXC1 基因的表达，发现癌组织中 lncRNA FOXCUT 和 FOXC1 的表达水平呈正相关，且明显高于癌旁非癌组织，与患者分化不良、分级进展及淋巴结转移相关性强。Kaplan-Meier 生存分析和 log-rank 检验发现 lncRNA FOXCUT 和 FOXC1 上调的 ESCC 患者预后较差（P<0.001, P=0.014）。lncRNA FOXCUT-FOXC1 基因对可能是 ESCC 的预后生物标志物和治疗靶点[82]；CASC9 在 ESCC 细胞系和组织中显著上调，表达水平与患者的肿瘤分期、淋巴结转移有关，Kaplan-Meier 分析显示高水平的 CASC9 表达对 ESCC 患者的总生存率（P=0.014）和无病生存率（P=0.0025）有显著影响，多变量分析发现 CASC9 的表达是总生存率和无病生存率的独立预后标志物[83]；Han 等人发现与正常组织和食管上皮细胞相比，ESCC 组织和细胞系中 lncRNA SNHG16 的表达水平明显上调，SNHG16 表达升高与患

中国知网 https://www.cnki.net

者肿瘤分期、淋巴结转移密切相关。Kaplan-Meier 分析显示，SNHG16 高表达的食管癌患者生存时间明显短于 SNHG16 低表达患者（*P*=0.0017），SNHG16 的高表达是 ESCC 患者生存不良的独立预测因子[84]。以上研究表明，lncRNA 在食管癌中的差异表达可以单独或与其他基因联合预测食管癌患者的预后情况。

4 总结与展望

测序技术的发展使得越来越多的 lncRNA 被相继发现，lncRNA 的群体也越发壮大。随着 lncRNA 相关研究的增加，研究者们逐渐发现 lncRNA 几乎在生命的所有成长发育过程，特别是各种疾病的发生与进展中发挥着重要作用。但是其庞大的数量和复杂的调控机制，使得目前研究较为清楚的 lncRNA 只是凤毛麟角，许多 lncRNA 的功能和作用机制尚待挖掘。

鉴别癌症的内在分子变化是开展疾病有效治疗的关键步骤，食管癌作为一种对人类健康威胁极大的消化系恶性肿瘤，人们对其分子机制的了解还有许多不足。近年来随着 lncRNA 相关研究的深入，越来越多的研究者将目光聚集在了 lncRNA 与肿瘤这一热点领域，并获得了许多研究成果。具体至 lncRNA 与食管鳞癌这一方向，也有许多新的发现与认识：不同的 lncRNA 在食管鳞癌细胞的增殖、周期、凋亡、迁移、侵袭中发挥着抑癌或者促癌的作用，可以通过其二级结构与 miRNA 或者 mRNA 结合、蛋白质招募等各种调控方式调节细胞活动的关键信号通路，进而影响食管癌细胞体内外的生物学行为；食管癌患者组织中个别 LncRNA 的表达可以在一定程度上提示患者的预后；细胞实验或动物实验层面敲减或过表达相应的 lncRNA，可以显著抑制或者促进食管癌的恶性进展，提示 lncRNA 对于食管癌治疗具有广泛的应用前景。

然而，目前食管癌与 lncRNA 的相关研究还处于实验探索阶段，虽然取得了一定的研究成果，但是距离走入临床试验，找到在临床实际治疗中发挥作用、对治疗具有指导意义的 lncRNA 还有很长的路要走。我们期待在实验技术不断改善，理论基础更加扎实的未来，能够有更多 lncRNA 相关的开拓性研究成果出现，给全球食管癌患者带来福音。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer[J]. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(34): 5598-5606.

[2] Wang J, Sun D, Wu K, et al. Genome-wide analysis of long non-coding RNAs in esophageal squamous cell carcinoma reveals their potential role in invasion and metastasis[J]. Thoracic Cancer, 2019, 10(1): 78-89.

[3] Testa U, Castelli G, Pelosi E. Esophageal Cancer: Genomic and Molecular Characterization, Stem Cell Compartment and Clonal Evolution[J]. Medicines, 2017, 4(3): E67.

[4] Thrift AP, Whiteman DC. The incidence of esophageal adenocarcinoma continues to rise: analysis of period and birth cohort effects on recent trends[J]. Annals of Oncology, 2012, 23(12): 3155-3162.

[5] Smyth EC, Lagergren J, Fitzgerald RC, et al. Oesophageal Cancer[J]. Nature reviews. Disease primers, 2017, 3: 17048.

[6] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132.

[7] Lagergren J, Smyth E, Cunningham D, et al. Oesophageal Cancer[J]. Lancet (London, England), 2017, 390(10110): 2383-2396.

[8] Jain S, Dhingra S. Pathology of esophageal cancer and Barrett's esophagus[J]. Annals of Cardiothoracic Surgery, 2017, 6(2): 99-109.

[9] Thrift AP. The epidemic of oesophageal carcinoma: Where are we now?[J]. Cancer Epidemiology, 2016, 41: 88-95.

[10] Lin Y, Totsuka Y, He Y, et al. Epidemiology of esophageal cancer in Japan and China[J]. Journal of Epidemiology, 2013, 23(4): 233-242.

[11] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. International Journal of Cancer, 2015, 136(5): E359-386.

[12] Zuo TT, Zheng RS, Zeng HM, et al. [Incidence and trend analysis of esophageal cancer in China][J]. Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese Journal of Oncology], 2016, 38(9): 703-708.

[13] Lin Y, Totsuka Y, Shan B, et al. Esophageal cancer in high-risk areas of China: research progress and challenges[J]. Annals of Epidemiology, 2017, 27(3): 215-221.

[14] Wu M, Zhao JK, Zhang ZF, et al. Smoking and alcohol drinking increased the risk of esophageal cancer among Chinese men but not women in a high-risk population[J]. Cancer Causes & Control : CCC, 2011, 22(4): 649-657.

[15] Peng Q, Chen H, Huo JR. Alcohol consumption and corresponding factors: A novel perspective on the risk factors of esophageal cancer[J]. Oncology Letters, 2016, 11(5): 3231-3239.

中国知网 https://www.cnki.net

[16] Zhang T, Pan D, Su M, et al. Determination of dietary nitrite in patients with esophageal pre-cancerous lesion and normal people: a duplicate diet study[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2018: 1-11.

[17] Zhuo X, Zhang Y, Wang Y, et al. Helicobacter pylori infection and oesophageal cancer risk: association studies via evidence-based meta-analyses[J]. Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain)), 2008, 20(10): 757-762.

[18] Dubecz A, Gall I, Solymosi N, et al. Temporal trends in long-term survival and cure rates in esophageal cancer: a SEER database analysis[J]. Journal of Thoracic Oncology, 2012, 7(2): 443-447.

[19] Domper Arnal MJ, Ferrandez Arenas A, Lanas Arbeloa A. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(26): 7933-7943.

[20] Griffin Y. Esophageal Cancer: Role of Imaging in Primary Staging and Response Assessment Post Neoadjuvant Therapy[J]. Seminars in Ultrasound, CT, and MR, 2016, 37(4): 339-351.

[21] Mannath J, Ragunath K. Role of endoscopy in early oesophageal cancer[J]. Nature Reviews. Gastroenterology & hepatology, 2016, 13(12): 720-730.

[22] Pietro MD, Canto MI, Fitzgerald RC. Endoscopic Management of Early Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: Screening, Diagnosis, and Therapy[J]. Gastroenterology, 2018, 154(2): 421-436.

[23] Sohda M, Kuwano H. Current Status and Future Prospects for Esophageal Cancer Treatment[J]. Annals of thoracic and cardiovascular surgery : official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia, 2017, 23(1): 1-11.

[24] Goense L, van Rossum PS, Kandioler D, et al. Stage-directed individualized therapy in esophageal cancer[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2016, 1381(1): 50-65.

[25] Klevebro F, Ekman S, Nilsson M. Current trends in multimodality treatment of esophageal and gastroesophageal junction cancer - Review article[J]. Surgical Oncology, 2017, 26(3): 290-295.

[26] Tomasello G, Ghidini M, Barni S, et al. Overview of different available chemotherapy regimens combined with radiotherapy for the neoadjuvant and definitive treatment of esophageal cancer[J]. Expert Review of Clinical Pharmacology, 2017, 10(6): 649-660.

[27] Zhang L, Ma J, Han Y, et al. Targeted therapy in esophageal cancer[J]. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology, 2016, 10(5): 595-604.

[28] Dhamija S, Diederichs S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis[J]. International Journal of Cancer, 2016, 139(2): 269-280.

[29] Churchman LS. Not Just Noise: Genomics and Genetics Bring Long Noncoding RNAs into Focus[J]. Molecular Cell, 2017, 65(1): 1-2.

[30] Wang C, Zhang Q, Hu Y, et al. Emerging role of long non-coding RNA MALAT1 in predicting clinical outcomes of patients with digestive system malignancies: A

中国知网 https://www.cnki.net

meta-analysis[J]. Oncology Letters, 2019, 17(2): 2159-2170.

[31] Wu T, Du Y. LncRNAs: From Basic Research to Medical Application[J]. International Journal of Biological Sciences, 2017, 13(3): 295-307.

[32] Nakagawa S, Kageyama Y. Nuclear lncRNAs as epigenetic regulators-beyond skepticism[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2014, 1839(3): 215-222.

[33] St Laurent G, Wahlestedt C, Kapranov P. The Landscape of long noncoding RNA classification[J]. Trends in Genetics : TIG, 2015, 31(5): 239-251.

[34] Khorkova O, Hsiao J, Wahlestedt C. Basic biology and therapeutic implications of lncRNA[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015, 87: 15-24.

[35] Geisler S, Coller J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts[J]. Nature reviews. Molecular Cell Biology, 2013, 14(11): 699-712.

[36] Mercer TR, Mattick JS. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2013, 20(3): 300-307.

[37] Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs[J]. Cell, 2007, 129(7): 1311-1323.

[38] Migeon BR, Pappas K, Stetten G, et al. X inactivation in triploidy and trisomy: the search for autosomal transfactors that choose the active X[J]. European Journal of Human Genetics : EJHG, 2008, 16(2): 153-162.

[39] O'Leary VB, Ovsepian SV, Carrascosa LG, et al. PARTICLE, a Triplex-Forming Long ncRNA, Regulates Locus-Specific Methylation in Response to Low-Dose Irradiation[J]. Cell Reports, 2015, 11(3): 474-485.

[40] Han P, Li W, Lin CH, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy[J]. Nature, 2014, 514(7520): 102-106.

[41] Johnsson P, Lipovich L, Grander D, et al. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2014, 1840(3): 1063-1071.

[42] Ramos AD, Andersen RE, Liu SJ, et al. The long noncoding RNA Pnky regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2015, 16(4): 439-447.

[43] Jiang W, Liu Y, Liu R, et al. The lncRNA DEANR1 facilitates human endoderm differentiation by activating FOXA2 expression[J]. Cell Reports, 2015, 11(1): 137-148.

[44] Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements[J]. Nature, 2011, 470(7333): 284-288.

[45] Wang K, Jin W, Song Y, et al. LncRNA RP11-436H11.5, functioning as a competitive endogenous RNA, upregulates BCL-W expression by sponging miR-335-5p and promotes proliferation and invasion in renal cell carcinoma[J]. Molecular Cancer, 2017, 16(1): 166.

[46] Simon MD, Pinter SF, Fang R, et al. High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation[J]. Nature, 2013, 504(7480): 465-469.

[47] Pal D, Rao MRS. Long Noncoding RNAs in Pluripotency of Stem Cells and Cell Fate

中国知网 https://www.cnki.net

Specification[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2017, 1008: 223-252.

[48] Yan B, Yao J, Liu JY, et al. lncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA[J]. Circulation Research, 2015, 116(7): 1143-1156.

[49] Carpenter S. Determining the Function of Long Noncoding RNA in Innate Immunity[J]. Methods in Molecular Biology, 2016, 1390: 183-195.

[50] Xu F, Jin L, Jin Y, et al. Long noncoding RNAs in autoimmune diseases[J]. Journal of Biomedical Materials Research: Part A, 2019, 107(2): 468-475.

[51] Wang Z, Tan M, Chen G, et al. LncRNA SOX2-OT is a novel prognostic biomarker for osteosarcoma patients and regulates osteosarcoma cells proliferation and motility through modulating SOX2[J]. IUBMB Life, 2017, 69(11): 867-876.

[52] Zhao Z, Liu B, Li B, et al. Inhibition of long noncoding RNA IGF2AS promotes angiogenesis in type 2 diabetes[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 92: 445-450.

[53] Li C, Chang L, Chen Z, et al. The role of lncRNA MALAT1 in the regulation of hepatocyte proliferation during liver regeneration[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2017, 39(2): 347-356.

[54] Zhang HJ, Wei QF, Wang SJ, et al. LncRNA HOTAIR alleviates rheumatoid arthritis by targeting miR-138 and inactivating NF-kappaB pathway[J]. International Immunopharmacology, 2017, 50: 283-290.

[55] Jiang H, Chen Y, Yu T, et al. Inhibition of lncRNA PFRL prevents pulmonary fibrosis by disrupting the miR-26a/smad2 loop[J]. American Journal of Physiology. Lung cellular and molecular physiology, 2018, 315(4): L563-l575.

[56] Xie H, Xue JD, Chao F, et al. Long non-coding RNA-H19 antagonism protects against renal fibrosis[J]. Oncotarget, 2016, 7(32): 51473-51481.

[57] Li X, Zhou J, Huang K. Inhibition of the lncRNA Mirt1 Attenuates Acute Myocardial Infarction by Suppressing NF-kappaB Activation[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 42(3): 1153-1164.

[58] Wei GH, Wang X. lncRNA MEG3 inhibit proliferation and metastasis of gastric cancer via p53 signaling pathway[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2017, 21(17): 3850-3856.

[59] Yang L, Lin C, Jin C, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs[J]. Nature, 2013, 500(7464): 598-602.

[60] Li X, Deng SJ, Zhu S, et al. Hypoxia-induced lncRNA-NUTF2P3-001 contributes to tumorigenesis of pancreatic cancer by derepressing the miR-3923/KRAS pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(5): 6000-6014.

[61] Shi J, Zhang W, Tian H, et al. lncRNA ROR promotes the proliferation of renal cancer and is negatively associated with favorable prognosis[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(6): 9561-9566.

[62] Yue B, Qiu S, Zhao S, et al. LncRNA-ATB mediated E-cadherin repression promotes the

中国知网 https://www.cnki.net

progression of colon cancer and predicts poor prognosis[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2016, 31(3): 595-603.

[63] Sun W, Zu Y, Fu X, et al. Knockdown of lncRNA-XIST enhances the chemosensitivity of NSCLC cells via suppression of autophagy[J]. Oncology Reports, 2017, 38(6): 3347-3354.

[64] Hu Y, Sun X, Mao C, et al. Upregulation of long noncoding RNA TUG1 promotes cervical cancer cell proliferation and migration[J]. Cancer Medicine, 2017, 6(2): 471-482.

[65] Xu LJ, Yu XJ, Wei B, et al. LncRNA SNHG7 promotes the proliferation of esophageal cancer cells and inhibits its apoptosis[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(9): 2653-2661.

[66] Yoon JH, You BH, Park CH, et al. The long noncoding RNA LUCAT1 promotes tumorigenesis by controlling ubiquitination and stability of DNA methyltransferase 1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Letters, 2018, 417: 47-57.

[67] Li PD, Hu JL, Ma C, et al. Upregulation of the long non-coding RNA PVT1 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression by acting as a molecular sponge of miR-203 and LASP1[J]. Oncotarget, 2017, 8(21): 34164-34176.

[68] Wang L, Meng D, Wang Y, et al. Long non-coding RNA LINC01296 promotes esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation and invasion by epigenetic suppression of KLF2[J]. American Journal of Cancer Research, 2018, 8(10): 2020-2029.

[69] Chen R, Xia W, Wang X, et al. Upregulated long non-coding RNA SBF2-AS1 promotes proliferation in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncology Letters, 2018, 15(4): 5071-5080.

[70] Zhong YB, Shan AJ, Lv W, et al. Long non-coding RNA LINC00675 inhibits tumorigenesis and EMT via repressing Wnt/beta-catenin signaling in esophageal squamous cell carcinoma[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(23): 8288-8297.

[71] Wang M, Li Y, Yang Y, et al. Long noncoding RNA DLX6AS1 is associated with malignant progression and promotes proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Molecular Medicine Reports, 2019, 19(3):1942-1950.

[72] Lin C, Zhang S, Wang Y, et al. Functional Role of a Novel Long Noncoding RNA TTN-AS1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression and Metastasis[J]. Clinical Cancer Research, 2018, 24(2): 486-498.

[73] Yao GL, Pan CF, Xu H, et al. Long noncoding RNA RP11-766N7.4 functions as a tumor suppressor by regulating epithelial-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 88: 778-785.

[74] 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 and Differentiation, 2018, 25(11): 1980-1995.

[75] Lin K, Jiang H, Zhuang SS, et al. Long noncoding RNA LINC00261 induces chemosensitization to 5-fluorouracil by mediating methylation-dependent repression of

中国知网 https://www.cnki.net

DPYD in human esophageal cancer[J]. The FASEB Journal, 2018: fj201800759R.

[76] Zhen Q, Gao LN, Wang RF, et al. LncRNA PCAT-1 promotes tumour growth and chemoresistance of oesophageal cancer to cisplatin[J]. Cell Biochemistry and Function, 2018, 36(1): 27-33.

[77] Chang ZW, Jia YX, Zhang WJ, et al. LncRNA-TUSC7/miR-224 affected chemotherapy resistance of esophageal squamous cell carcinoma by competitively regulating DESC1[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR, 2018, 37(1): 56.

[78] Huang J, Li Y, Lu Z, et al. Long non-coding RNA GAS5 is induced by interferons and plays an antitumor role in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Medicine, 2018.

[79] Wang W, Zhu Y, Li S, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes malignant development of esophageal squamous cell carcinoma by targeting beta-catenin via Ezh2[J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 25668-25682.

[80] Liu B, Pan CF, Yao GL, et al. The long non-coding RNA AK001796 contributes to tumor growth via regulating expression of p53 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Cell International, 2018, 18: 38.

[81] Wang B, Liang T, Li J. Long noncoding RNA LINC01296 is associated with poor prognosis in ESCC and promotes ESCC cell proliferation, migration and invasion[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(14): 4524-4531.

[82] Pan F, Yao J, Chen Y, et al. A novel long non-coding RNA FOXCUT and mRNA FOXC1 pair promote progression and predict poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014, 7(6): 2838-2849.

[83] Gao GD, Liu XY, Lin Y, et al. LncRNA CASC9 promotes tumorigenesis by affecting EMT and predicts poor prognosis in esophageal squamous cell cancer[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(2): 422-429.

[84] Han GH, Lu KJ, Wang P, et al. LncRNA SNHG16 predicts poor prognosis in ESCC and promotes cell proliferation and invasion by regulating Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(12): 3795-3803.

中国知网 https://www.cnki.net

中国知网 https://www.cnki.net

致谢

时光转瞬即逝，转眼间硕士研究生即将毕业。忆往昔，如今仿佛还能看到研究生刚入学时那个青涩的我。回首这三年的读研经历，收获满满，感慨良多。

就读研究生这三年期间，在老师和同学们的关心与帮助下，我不仅学习到了专业知识，还学到了许多做人、做事、做学问的道理。不仅在专业上达到了一定的水平，还学会了科学合理地安排自己的时间，妥当大方地待人接物，主动自觉地自我提升，真正由青涩蜕变为成熟，为今后的学习以及踏入社会后的工作与生活做了良好的铺垫。

我谨在此向所有曾经关心、帮助、鼓励我的人表示感谢。

首先要感谢我的导师，也是我的论文指导老师：郑州大学第一附属医院临床检验诊断学专业贺付成教授。贺付成教授给我论文的研究方向提出了指导性的意见及推荐，同时也在课题相关实验进行和论文撰写过程中悉心指点我的错误和困惑之处，提出了许多醍醐灌顶的意见，言传身教的教给我许多做人做事的道理，使我获益匪浅，能成为您的研究生是我此生的荣幸。

感谢万军虎博士对我科研、学习、生活上的莫大帮助，研究生期间能够遇到您是我的幸运。您丰富的学识，乐于助人的品格，热爱生活的态度深深的感染了我，是我进步的榜样和之后的奋斗目标。

感谢师母尹惠卿教授，对我生活上无微不至的关怀，使我在忙碌的实验之余感受到家一样的温暖；感谢我的师姐孙开颜、董翠翠、曲蕴慧、吕品以及师兄董树龄、师妹楚洁在实验操作、方法及思路上的帮助和在生活上的开导。

感谢郑州大学医学科学院的科研平台以及实验室的老师及同学们，感谢平台管理者张忠献、赵慧君、王晓东、陈莹莹老师对我的帮助与照顾，有你们的鼓励以及耐心讲解，实验中遇到的困难和挫折也显得没有那么可怕了。

感谢我的室友张小云、高晓娟、贺沁三年来对我生活上的关心帮助，感谢临床检验诊断学专业的同窗们给予我美好的研究生回忆。

感谢我的父母，这么多年无论我做出什么样的决定你们都在背后默默的支持我，无条件的相信我，鼓励我进步，陪伴我成长。你们对我的付出我将铭记终生，你们对我的教诲我将谨遵不忘，无以为报，只有奋进。

中国知网 https://www.cnki.net