原创精选
Selected article

长链非编码 RNA-*GK3P* 在食管癌中的表达及其对癌细胞生物学功能的影响

周静静[1]，顾云[2]，张龙[2]，张颖[1]，赵超[1]，陆强[1]，张虎[1]，浦跃朴[1]，尹立红[1]

1. 东南大学公共卫生学院环境医学工程教育部重点实验室，江苏 南京 210009
2. 涟水县人民医院胸外科，江苏 涟水 223400

摘要：

[背景] 甘油激酶3假基因（*GK3P*）是位于人类染色体4q32.3区域的长链非编码RNA（lncRNA），其亲本基因甘油激酶基因与肿瘤发展有关。然而，lncRNA-*GK3P*在食管癌中的表达与作用机制尚不清楚。

[目的] 分析lncRNA-*GK3P*在食管癌组织、癌细胞中的表达情况，并探讨其对食管癌EC109细胞增殖、周期、凋亡的影响及机制。

[方法] 应用实时定量逆转录聚合酶链反应（qRT-PCR）技术检测lncRNA-*GK3P*在食管癌细胞（EC109）与永生化正常食管上皮细胞（Het-1A）以及41例食管癌组织与癌旁组织中的表达情况；采用siRNA敲低技术、质粒转染技术分别构建lncRNA-*GK3P*敲低和过表达的EC109细胞株，并将其分为4组：si-GK3P组（siRNA *GK3P*转染）、si-NC组（siRNA *GK3P*的空载体对照）、plasmid-GK3P组（*GK3P*过表达质粒转染）、plasmid-NC组（*GK3P*空载质粒对照）；CCK-8法检测细胞活性、EdU法检测细胞的增殖；流式细胞术检测细胞凋亡、细胞周期，Western blotting测定细胞周期和凋亡相关蛋白Cyclin E1、Cyclin B1、Bcl2和Bax的表达变化。

[结果] 与癌旁组织相比，lncRNA-*GK3P* 在食管癌组织中表达水平为前者的（2.91±0.61）倍（t=19.38，P<0.05）；且相对于食管上皮细胞Het-1A，lncRNA-*GK3P*在食管癌EC109细胞中表达水平为前者的（3.15±0.27）倍（t=13.06，P<0.05）。lncRNA-*GK3P*敲低后，细胞增殖受到抑制［si-GK3P组vs si-NC组，（27.21±1.11）% vs（37.95±0.93）%，P<0.05］；细胞G0/G1期比例增加（P<0.05），S期比例增加（P<0.05），G2/M期比例减少（P<0.05）；细胞凋亡增加［si-GK3P组vs si-NC组，（10.19±0.91）% vs（7.46±0.18）%，P<0.05］；Cyclin E1、Cyclin B1、Bcl2表达下调，Bax表达上调。lncRNA-*GK3P*过表达后，细胞增殖增加［plasmid-GK3P组vs plasmid-NC组，（37.00±1.71）% vs（29.63±1.45）%，P<0.05］；细胞G0/G1期比例减少（P<0.05），S期比例增加（P<0.05），G2/M期比例减少（P<0.05）；细胞凋亡下降［plasmid-GK3P组vs plasmid-NC组，（5.27±0.07）% vs（9.71±0.19）%，P<0.05］；Cyclin E1、Cyclin B1、Bcl2表达上调，Bax表达下调。

[结论] lncRNA-*GK3P*在食管癌中高表达，通过调控Cyclin E1、Cyclin B1、Bcl2及Bax的表达，在食管癌EC109细胞中发挥促进细胞增殖、抑制凋亡的作用。

关键词：食管癌；长链非编码RNA；甘油激酶3假基因；增殖；凋亡；细胞周期

Expression of long non-coding RNA-*GK3P* in esophageal cancer and its effect on biological function of cancer cells

ZHOU Jingjing[1], GU Yun[2], ZHANG Long[2], ZHANG Ying[1], ZHAO Chao[1], LU Qiang[1], ZHANG Hu[1], PU Yuepu[1], YIN Lihong[1] (1.Key Laboratory of Environmental Medical Engineering of Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China; 2.Departments of Thoracic Surgery, People's Hospital of Lianshui, Lianshui, Jiangsu 223400, China)

Abstract:

[Background] Glycerol kinase 3 pseudogene (*GK3P*) is a long non-coding RNA (lncRNA) located in the 4q32.3 region of human chromosome. Its parent gene glycerol kinase is related to tumor development. However, the expression and mechanism of lncRNA-*GK3P* in esophageal cancer are still unclear.

[Objective] This experiment aims to investigate the expression of lncRNA-*GK3P* in esophageal cancer tissues and cancer cells, and its effects on the proliferation, cycle, and apoptosis of esophageal cancer EC109 cells.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20500

基金项目
国家自然科学基金项目（81872588）；江苏省淮安市科技项目（HAB201951）

作者简介
周静静（1995—），女，硕士生；
E-mail：2589556915@qq.com

通信作者
尹立红，E-mail：lhyin@seu.edu.cn

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2020-11-05
录用日期 2021-04-13

文章编号 2095-9982(2021)07-0701-08
中图分类号 R73-3
文献标志码 A

▸引用
周静静，顾云，张龙，等. 长链非编码RNA-*GK3P*在食管癌中的表达及其对癌细胞生物学功能的影响［J］. 环境与职业医学，2021，38（7）：701-708.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20500

Funding
This study was funded.

Correspondence to
YIN Lihong, E-mail: lhyin@seu.edu.cn

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2020-11-05
Accepted 2021-04-13

▸To cite
ZHOU Jingjing, GU Yun, ZHANG Long, et al. Expression of long non-coding RNA-*GK3P* in esophageal cancer and its effect on biological function of cancer cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(7): 701-708.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20500

[Methods] Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) technology was used to detect expression of lncRNA-*GK3P* in esophageal cancer cells (EC109), immortalized esophageal epithelial cells (Het-1A), and 41 esophageal cancer tissues and paired adjacent tissues. siRNA technology and plasmid transfection were used to construct lncRNA-*GK3P* knockdown and lncRNA-*GK3P* overexpressed EC109 cell lines, respectively. They were divided into four groups: si-GK3P group (siRNA *GK3P* transfection), si-NC group (siRNA *GK3P* empty vector control), plasmid-GK3P group (*GK3P* overexpression plasmid transfection), and plasmid-NC group (*GK3P* empty plasmid control). CCK8 method was used to detect cell viability, EdU method for the proliferation of EC109 cells, flow cytometry for apoptosis and cycle of EC109 cells, and Western blotting for expression of proteins related to cell cycle and apoptosis (Cyclin E1, Cyclin B1, Bcl2, and Bax).

[Results] Compared with adjacent tissues, the expression of lncRNA-*GK3P* in esophageal cancer tissues was 2.91±0.61 times higher (t=19.38, P<0.05); and compared with esophageal epithelial Het-1A cells, the expression of lncRNA-*GK3P* in EC109 cells was 3.15±0.27 times higher (t=13.06, P<0.05). After the knockdown of lncRNA-*GK3P*, the cell proliferation was inhibited [si-GK3P group vs si-NC group, (27.21±1.11)% vs (37.95±0.93)%, P<0.05]; the proportion of cells in G0/G1 phase increased (P<0.05), the proportion of cells in S phase increased (P<0.05), and the proportion of cells in G2/M phase decreased (P<0.05); the overall apoptosis rate increased [si-GK3P group vs si-NC group, (10.19±0.91)% vs (7.46±0.18)%, P<0.05]; moreover, the expressions of Cyclin E1, Cyclin B1, and Bcl2 were down-regulated, while the expression of Bax was up-regulated. After the overexpression of lncRNA-*GK3P*, the cell proliferation was promoted [plasmid-GK3P group vs plasmid-NC group, (37.00±1.71)% vs (29.63±1.45)%, P<0.05]; the proportion of G0/G1 phase cells decreased (P<0.05), the proportion of S phase cells increased (P<0.05), and the proportion of G2/M phse cells decreased (P<0.05); the overall apoptosis rate reduced [plasmid-GK3P group vs plasmid-NC group, (5.27±0.07)% vs (9.71±0.19)%, P<0.05]; furthermore, the expressions of Cyclin E1, Cyclin B1, and Bcl2 were up-regulated, and the expression of Bax was down-regulated.

[Conclusion] LncRNA-*GK3P* is highly expressed in esophageal cancer, and it promotes proliferation and inhibits apoptosis in EC109 cells by regulating the expressions of Cyclin E1, Cyclin B1, Bcl2, and Bax.

Keywords: esophageal cancer; long non-coding RNA; glycerol kinase 3 pseudogene; proliferation; apoptosis; cell cycle

食管癌是一种常见的消化道肿瘤，位居全球癌症死因顺位第六位[1]。近年来，食管癌的发病率仍在迅速攀升，发病机制尚不清楚，尽管多学科治疗取得了一定的进展，但全球范围内，食管癌患者5年生存率仍<20%[2]，因此迫切需要探索食管癌新的诊断和治疗靶点。非编码RNA是指不编码蛋白质的RNA，根据长度分为长链非编码RNA（long non-coding RNA，lncRNA）和短链非编码RNA（如microRNA）[3]。其中，lncRNA长度>200个核苷酸，可直接与DNA、RNA和蛋白质相互作用[4-5]，影响细胞增殖、凋亡、周期进展、迁移和侵袭，参与包括恶性肿瘤在内的多种疾病的发生发展[6-7]。随着高通量测序技术和生物信息学的发展，越来越多的研究表明lncRNA在食管癌中异常表达，作为促癌因子或抑癌因子参与食管癌的发生发展，被认为是食管癌诊断、治疗及预后相关的潜在生物标志[8-9]。因此，识别与食管癌发生发展有关的lncRNA并阐明其调控机制对食管癌的防控具有重要意义。

在人类基因组中有大量假基因的存在，它们被认为是没有功能作用的。然而，最近的研究表明，假基因来源的lncRNA通过DNA、RNA或蛋白质水平上的调节在包括癌症在内的多种人类疾病中发挥重要作用[10]。甘油激酶3假基因（glycerol kinase 3 pseudogene，*GK3P*）是位于人类染色体4q32.3区域的lncRNA，其亲本基因是甘油激酶基因。研究表明，假基因在基因序列与功能上与亲本基因具有相似性[11]。Zhou等[12]发现，敲低甘油激酶5基因可通过固醇调节元件结合蛋白1/硬脂酰辅酶A去饱和酶1信号通路诱导肺腺癌细胞周期停滞和凋亡；Yu等[13]报道，甘油激酶基因在高级胶质母细胞瘤组织中低表达，并且可以促进胶质母细胞瘤细胞的增殖。这些均提示甘油激酶基因与癌症进展关系密切。课题组前期基于RNA-Seq、TCGA数据库及生物信息学分析发现lncRNA-*GK3P*与食管癌患者的总生存率有相关性，但lncRNA-*GK3P*在食管癌进程中的功能特征尚不明确[14]。因此，本研究在分析食管癌组织及癌旁组织、食管癌细胞以及永生化正常食管上皮细胞中lncRNA-*GK3P*表达水平的基础上，进一步采用质粒转染技术和siRNA敲低技术分别构建lncRNA-*GK3P*过表达和敲低的食管癌EC109细胞株，以探讨lncRNA-*GK3P*对食管癌细胞生物学功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 人体组织样本 在江苏省淮安市涟水县人民医院募集41例食管癌确诊患者，收集其癌组织及配对癌旁组织样本；本研究经东南大学附属中大医院伦理委员会批准（审批号：2018ZDKYSB023），并获得受试者的知情同意。

1.1.2 细胞 人食管鳞癌细胞株（EC109）和永生化食管上皮细胞株（Het-1A）均来自东南大学公共卫生学院环境医学工程教育部重点实验室。

1.1.3 主要仪器与试剂 超净工作台（上海净化仪器厂，中国），二氧化碳培养箱（Heraeus，德国），生物图像导航仪（Olympus，日本），细胞组织研磨仪（上海净信，中国），高速离心机（Eppendorf，德国），Tanon凝胶成像及分析系统（上海天能，中国），酶标仪（BioTek，美国）等。

RPMI1640细胞培养基（Gibco，美国），DMEM细胞培养基（Gibco，美国），OptiMEM培养基（Gibco，美国），胎牛血清（Gibco，美国），Lipofectamine™2000转染试剂（Thermo，美国），CCK-8检测试剂盒（上海碧云天，中国），EdU多重荧光染色试剂盒（广州锐博，中国），qRT-PCR试剂盒（Takara，日本），lncRNA-*GK3P*过表达质粒及空载对照、lncRNA-*GK3P*敲低siRNA及空载对照、细胞周期检测试剂盒、细胞凋亡试剂盒（南京凯基，中国），一抗Bax、Bcl2、Cyclin B1、Cyclin E1、β-actin（CST，美国），羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗（武汉爱博泰克，中国）等。

1.2 实验分组设计

将EC109分为4组：si-GK3P组（siRNA *GK3P*转染），si-NC组（siRNA *GK3P*的空载体对照），plasmid-GK3P组（*GK3P*过表达质粒转染），plasmid-NC组（*GK3P*空载质粒对照）。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及转染 EC109采用含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的RPMI1640培养基，Het-1A采用含10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基，置于37℃、5%CO_2培养箱中培养。EC109细胞以3×10^5个·孔$^{-1}$接种于6孔板中，继续常规培养24 h，用siRNA转染构建lncRNA-*GK3P*敲低EC109细胞株，用质粒转染构建lncRNA-*GK3P*过表达EC109细胞株，分别设置空载对照组，转染6 h后换液，继续培养至48 h，qRT-PCR验证转染效率。

1.3.2 RNA提取 细胞RNA提取：收集细胞后，加入1 mL Trizol，吹打混匀，60 Hz研磨30 s，室温静置5 min；再加入200 μL三氯甲烷，颠倒混匀，于4℃、12 000×*g*离心10 min；取上层水相与异丙醇体积比为1∶1至新EP管中，颠倒混匀，4℃、12 000×*g*离心10 min，弃上清；加入体积分数为75%乙醇洗涤，4℃、8 000×*g*离心5 min，弃上清；重复洗涤一次；置室温干燥10 min后用无酶水溶解使RNA含量在500 ng·μL^{-1}左右。组织RNA提取：组织剪碎体积约为0.5 cm^3左右，加1 mL Trizol，60 Hz研磨5 min；后续操作同细胞RNA提取。

1.3.3 RNA逆转录及qRT-PCR分析 以*β-actin*为内参，lncRNA-*GK3P*基因及内参基因引物序列设计见表1。PCR小管中依次加入5×逆转录酶混合物4 μL，总RNA 1μL，补无酶水至总体积10μL。反应条件：37℃、15 min，85℃、5 s，4℃保存。

qRT-PCR反应体系：SYBR Premix Ex Taq II 5 μL，前、后引物各0.4 μL，Rox Reference Dye 0.2 μL，cDNA 1 μL，补无酶水至总体积10 μL。反应条件：预变性阶段（95℃、30 s），PCR反应阶段（95℃、5 s，60℃、30 s），40个循环，每个样本重复3次。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算癌组织相对于癌旁组织中lncRNA-*GK3P*的相对表达量。

表1 qRT-PCR分析的引物序列

Table 1 The primer sequence for qRT-PCR analysis

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature/℃
lncRNA-*GK3P*	F：GCCTGTTCGAGCGTCATTTC	60
	R：ACGAGACCGCCGATTCATTT	
β-actin	F：CCACTGGCATCGTGATGGA	60
	R：CGCTCGGTGAGGATCTTCAT	

1.3.4 细胞活性测定 96孔板每孔接种8×10^3个细胞，每组6个平行，实验组（si-GK3P组或plasmid-GK3P组），空载对照组（si-NC组或plasmid-NC组），同时设置空白对照组，转染48 h后，每孔加入100 μL细胞培养液和10 μL CCK-8溶液，孵育约2 h，酶标仪测定450 nm波长处的光密度值（*D*）。细胞活性计算：细胞活性=（$D_{实验组}-D_{空白组}$）/（$D_{对照组}-D_{空白组}$）×100%。

1.3.5 细胞增殖检测 细胞以密度8×10^3个·孔$^{-1}$接种于96孔板，每组各设3个平行孔，转染48 h后，按照EdU多重荧光染色试剂盒说明书进行EdU标记、细胞固定、染色，然后用生物图像导航仪拍照分析。红色标记增殖期细胞，蓝色标记活细胞。细胞增殖率计算：细胞增殖率=增殖期细胞数/细胞总数×100%。

1.3.6 细胞周期检测 收集转染后的细胞，PBS洗涤1次，400×*g*离心5 min，调整细胞密度为1×10^6个·mL^{-1}，取1 mL单细胞悬液，离心后弃上清，加入预冷体积分数为70%乙醇500 μL固定过夜。染色前，用PBS洗去固定液，加入染色工作液（PI∶RnaseA=9∶1），室温避光30~60 min，流式细胞仪检测。

1.3.7 细胞凋亡检测 细胞转染后，采用无EDTA的胰

酶消化细胞，PBS洗涤2次，400×*g*离心5 min，收集5×10^5个细胞。加入500 μL细胞结合缓冲液（binding buffer）悬浮细胞，加入5 μL Annexin V-APC和5 μL PI（或5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI）进行标记，避光室温5~15 min，流式细胞仪分析细胞凋亡。凋亡率=（早期凋亡细胞数+晚期凋亡细胞数）/总细胞数×100%。

1.3.8 蛋白表达测定 采用Western blotting法检测细胞周期蛋白E1（cyclin E1 protein，Cyclin E1）、细胞周期蛋白B1（cyclin B1 protein，Cyclin B1）、B淋巴细胞瘤-2蛋白（B cell lymphoma 2 protein，Bcl2蛋白）和Bcl2家族蛋白（Bcl2 associated X protein，Bax蛋白）的表达。用细胞刮板刮取各组细胞，PBS洗涤两次，于4℃，400×*g*离心5 min，每1×10^7个细胞加入含1 mmol·L^{-1}蛋白酶抑制剂（PMSF）的RIPA裂解液300 μL，60 Hz研磨2 min，冰上放置30 min。离心后取上清液，BCA法测定总蛋白浓度，用5×SDS上样缓冲液和无酶水将蛋白浓度稀释至2 μg·mL^{-1}，于100℃，煮沸5 min使蛋白变性。Western blotting条件为：浓缩胶电压为70 V，30 min；分离胶电压为90 V，60 min；在200 mA条件下转膜2 h；转移至PVDF膜后，TBST洗涤两次，质量分数为5%脱脂奶粉室温封闭2 h，TBST稀释一抗至适当浓度，4℃孵育过夜；TBST洗6次后加入稀释好的二抗，室温孵育2 h；TBST洗涤6次，最后进行化学发光检测。Image J v1.8.0软件对蛋白条带进行灰度值分析。

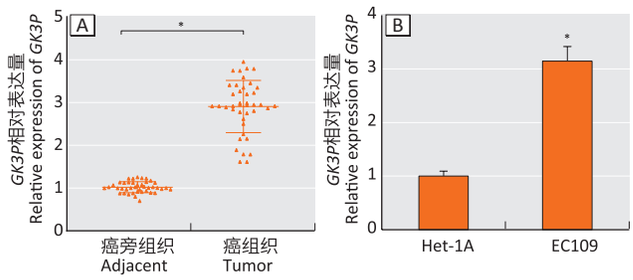
1.4 统计学分析

数据分析使用SPSS 22.0，计量资料采用Shapiro-Wilk（S-W）方法进行正态性检验，符合正态分布的资料以均数±标准差表示；经方差齐性检验数据具有方差齐性。两组间均数比较采用*t*检验；采用χ^2检验分析lncRNA-*GK3P*相对表达水平与临床特征的相关性；检验水准α=0.05。采用GraphPad Prism 8.0、Adobe Photoshop CS6软件进行绘图。

2 结果

2.1 lncRNA-*GK3P*在食管癌组织与食管癌细胞中的表达水平

qRT-PCR结果显示，lncRNA-*GK3P*在食管癌组织中表达水平为癌旁组织的（2.91±0.61）倍，差异具有统计学意义（图1A，t=19.38，P<0.05）。且相对于食管上皮细胞Het-1A，lncRNA-*GK3P*在食管癌EC109细胞中的表达水平明显升高，表达水平为前者的（3.15±0.27）倍（图1B，t=13.06，P<0.05）。根据lncRNA-*GK3P*在食管癌患者组织中相对表达水平的均数（2.91），将表达水平高于2.91的患者归为高表达组，共23例；将表达水平低于2.91的患者归为低表达组，共18例。对lncRNA-*GK3P*相对表达水平与临床特征之间的关系进行分析，结果显示lncRNA-*GK3P*表达水平与性别、年龄、有无淋巴结转移、吸烟以及饮酒均无相关性（表2）。



[注（Note）]*：P<0.05。

图1 lncRNA-*GK3P*在组织（A）和细胞（B）中的相对表达水平

Figure 1 Relative expression levels of lncRNA-*GK3P* in selected tissues (A) and cells (B)

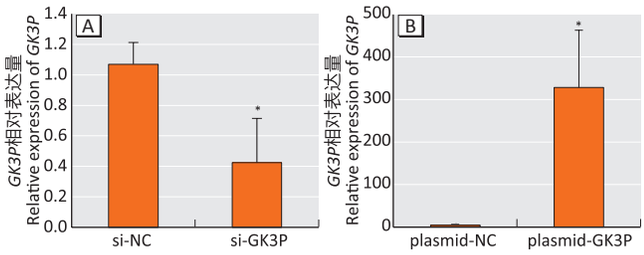
表2 lncRNA-*GK3P*表达水平与临床特征的关系分析

Table 2 Relationship between the expression level of lncRNA-*GK3P* and clinical characteristics

临床特征 Characteristics	病例数 Number of cases	低表达 Weak-expression（n=18）	高表达 Over-expression（n=23）	χ^2	P
年龄/岁（Age/years）				0.08	0.76
<60	17	7	10		
≥60	24	11	13		
性别（Sex）				0.0002	0.98
男（Male）	25	11	14		
女（Female）	16	7	9		
吸烟（Smoking）				0.03	0.95
是（Yes）	23	10	13		
否（No）	18	8	10		
饮酒（Drinking）				0.48	0.47
是（Yes）	18	9	9		
否（No）	23	9	14		
淋巴结转移 Lymphnode metastasis				0.19	0.65
是（Yes）	10	5	5		
否（No）	31	13	18		

2.2 转染效率

qRT-PCR检测lncRNA-*GK3P*敲低和过表达后mRNA的表达水平，结果显示，si-GK3P组细胞中lncRNA-*GK3P*的mRNA相对表达量是si-NC组的42%（图2A，t=3.46，P<0.05）；plasmid-GK3P组细胞中lncRNA-*GK3P*的mRNA相对表达量是plasmid-NC组的328倍（图2B，t=4.20，P<0.05）。



[注] A：敲低后 lncRNA-*GK3P* 表达水平；B：过表达后 lncRNA-*GK3P* 表达水平。*：$P<0.05$。

[Note] A: The expression level of lncRNA-*GK3P* after knockdown; B: The expression level of lncRNA-*GK3P* after overexpression. *: $P<0.05$.

图2 qRT-PCR 检测转染效率

Figure 2 Transfection efficiency by qRT-PCR

2.3 lncRNA-*GK3P* 对食管癌细胞活性和增殖能力的影响

CCK-8 实验显示（图3A、3B），与 si-NC 组相比，si-GK3P 组细胞活性降低（t=17.00，$P<0.05$），与 plasmid-NC 相比，plasmid-GK3P 组细胞活性增强（t=11.61，$P<0.05$）。EdU 结果显示（图3C、3D），si-GK3P 组和 si-NC 组增殖率分别为（27.21±1.11）%、（37.95±0.93）%，敲低 lncRNA-*GK3P* 抑制食管癌细胞增殖（t=15.91，$P<0.05$）；plasmid-GK3P 组和 plasmid-NC 组增殖率为（37.00±1.71）%、（29.63±1.45）%，过表达 lncRNA-*GK3P* 促进食管癌细胞增殖（t=7.37，$P<0.05$）。

2.4 lncRNA-*GK3P* 对食管癌细胞周期的影响

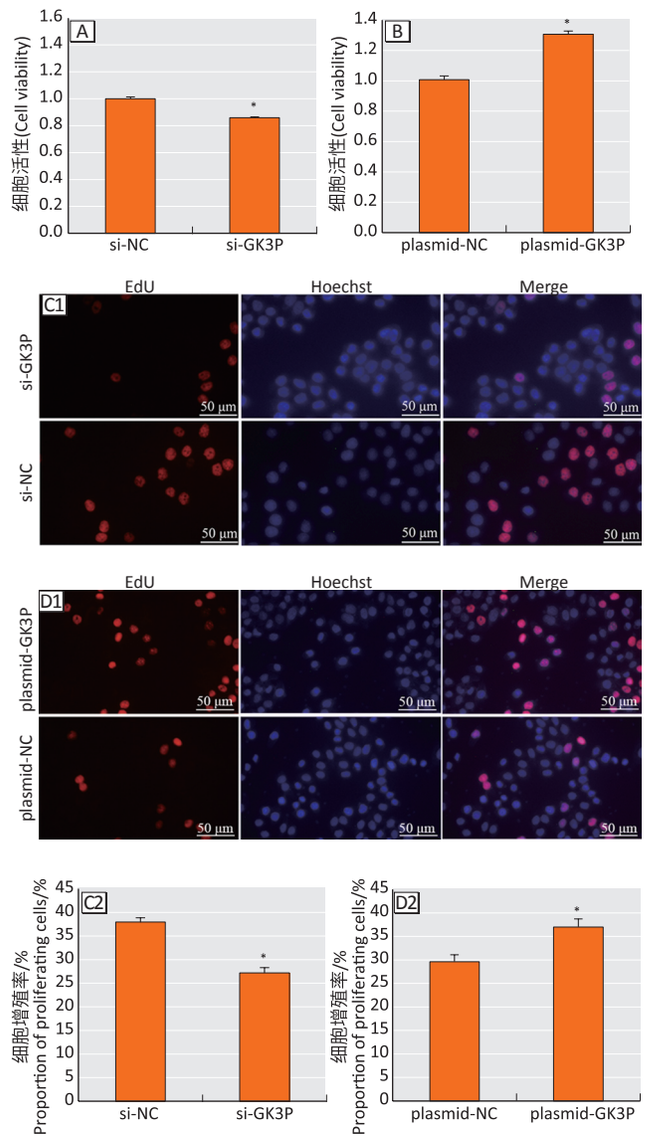
流式细胞术检测结果显示（图4），si-GK3P 组与 si-NC 组 G0/G1 期比例分别为（60.29±0.71）%、（57.91±0.77）%（t=3.91，$P<0.05$）；S 期比例分别为（26.27±0.75）%、（24.51±0.45）%（t=3.49，$P<0.05$）；G2/M 期比例分别为（13.45±0.03）%、（17.57±0.41）%（t=15.53，$P<0.05$）。plasmid-GK3P 组与 plasmid-NC 组 G0/G1 期比例分别为（53.65±0.23）%、（65.65±0.05）%（t=87.71，$P<0.05$）；S 期比例分别为（39.39±0.65）%、（25.47±0.23）%（t=34.72，$P<0.05$）；G2/M 期比例分别为（7.23±0.70）%、（8.91±0.18）%（t=4.03，$P<0.05$）。

2.5 lncRNA-*GK3P* 对食管癌细胞凋亡影响

流式细胞术检测结果显示（图5），si-GK3P 组与 si-NC 组凋亡率分别为（10.19±0.91）%、（7.46±0.18）%（t=5.12，$P<0.05$），提示 lncRNA-*GK3P* 敲低促进食管癌细胞凋亡。plasmid-GK3P 组与 plasmid-NC 组凋亡率分别为（5.27±0.07）%、（9.71±0.19）%（t=27.71，$P<0.05$），提示 lncRNA-*GK3P* 过表达抑制食管癌细胞凋亡。

2.6 lncRNA-*GK3P* 敲低及过表达后 Cyclin E1/Cyclin B1/Bcl2/Bax 蛋白的表达情况

Western blotting 结果显示（见图6），与 si-NC 组相比，si-GK3P 组细胞中 Bax 表达上调（t=8.07，$P<0.05$），Bcl2 表达下调（t=10.09，$P<0.05$），Cyclin E1 表达下调（t=21.92，$P<0.05$），Cyclin B1 表达下调（t=6.16，$P<0.05$）。与 plasmid-NC 组相比，plasmid-GK3P 组细胞中 Bax 表达下调（t=7.99，$P<0.05$），Bcl2 表达上调（t=4.74，$P<0.05$），Cyclin E1 表达上调（t=8.03，$P<0.05$），Cyclin B1 表达上调（t=6.03，$P<0.05$）。

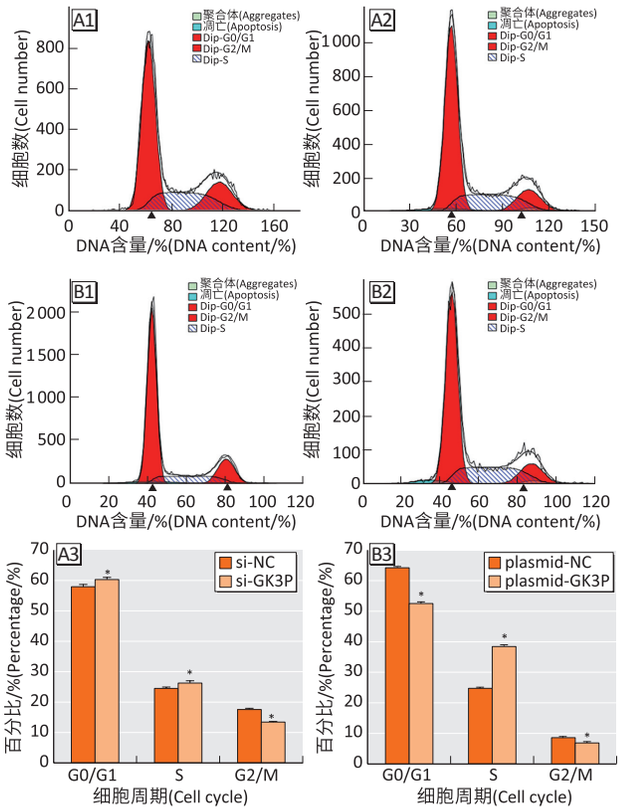


[注] A、B：CCK-8 检测细胞活性；C1、D1：EdU 染色法检测细胞增殖，生物图像导航仪（×200），EdU 红色标记增殖期细胞，Hoechst 蓝色标记活细胞，Merge 代表 EdU 和 Hoechst 的合成图像；C2、D2：各组细胞的增殖率。*：$P<0.05$。

[Note] A, B: CCK8 results of cell viability; C1, D1: EdU staining results of cell proliferation, biological image navigator, ×200, EdU red marks proliferative cells, Hoechst blue marks living cells, Merge represents the composite image of EdU and Hoechst; C2, D2: Cell proliferation rate of each group. *: $P<0.05$.

图3 lncRNA-*GK3P* 对 EC109 细胞活性和增殖能力的影响

Figure 3 The effect of lncRNA-*GK3P* on cell viability and proliferation ability of EC109 cells

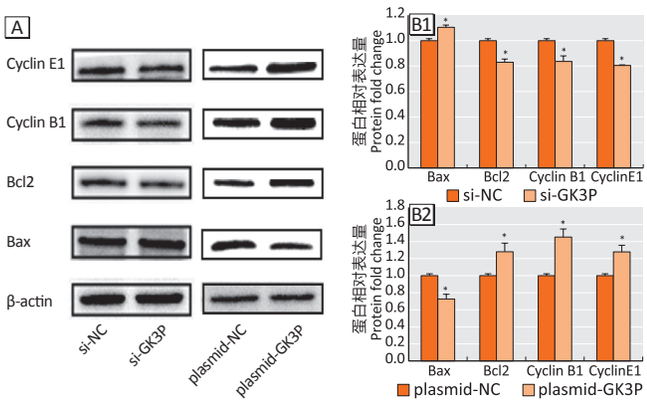


[注] A1、A2：si-NC组与si-GK3P组细胞周期检测流式图；A3：si-GK3P组与si-NC组细胞周期分布百分比；B1、B2：plasmid-NC组与plasmid-GK3P组细胞周期检测流式图；B3：plasmid-GK3P组与plasmid-NC组细胞周期分布百分比；*：$P<0.05$。

[Note] A1, A2: Flow cytometry results of cell cycle of the si-NC group and the si-GK3P group; A3: Quantification of cell cycle distribution of the si-NC group and the si-GK3P group;B1, B2: Flow cytometry results of cell cycle of the plasmid-NC group and theplasmid-GK3P group; B3:Quantification of cell cycle distribution of the plasmid-NC group and the plasmid-GK3P group; *: $P<0.05$.

图4 流式细胞术检测lncRNA-*GK3P*对EC109细胞周期分布的影响

Figure 4 Effect of lncRNA-*GK3P* on cell cycle distribution of EC109 cells by flow cytometry

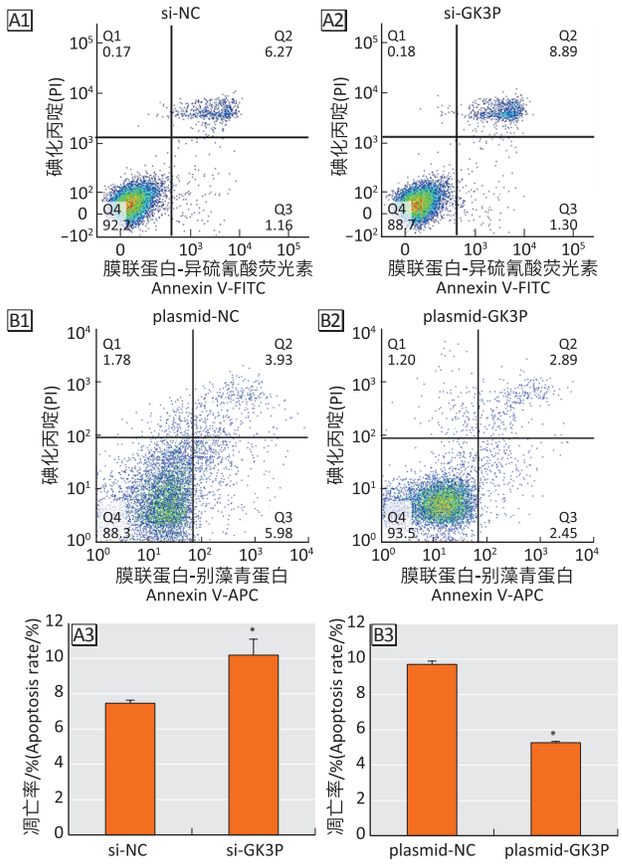


[注] A：Western blotting电泳图；B1、B2：各组蛋白相对表达量；*：$P<0.05$。

[Note] A: Western blotting electrophoresis diagram; B1, B2: Relative expression of each group; *: $P<0.05$.

图6 lncRNA-*GK3P*敲低及过表达后Cyclin E1/Cyclin B1/Bcl2/Bax的相对表达量

Figure 6 Relative expressions of Cyclin E1, Cyclin B1, Bcl2, and Bax after lncRNA-*GK3P* knockdown and overexpression



[注] A1、A2：si-NC组与si-GK3P组细胞凋亡检测流式图；A3：si-GK3P组与si-NC组细胞凋亡率；B1、B2：plasmid-NC组与plasmid-GK3P组细胞凋亡检测流式图；B3：plasmid-GK3P组与plasmid-NC组细胞凋亡率；*：$P<0.05$。

[Note] A1, A2: Flow cytometry results of apoptosis rate of the si-NC group and the si-GK3P group; A3: Quantification of apoptosis rate of the si-NC group and the si-GK3P group; B1, B2: Flow cytometry results of apoptosis rate of the plasmid-NC group and the plasmid-GK3P group; B3: Quantification of apoptosis rate of the lasmid-NC group and theplasmid-GK3P group; *: $P<0.05$.

图5 lncRNA-*GK3P*敲低及过表达后细胞凋亡统计分析

Figure 5 Apoptosis after lncRNA-*GK3P* knockdown and overexpression

3 讨论

本研究通过对41例食管癌患者的癌组织及癌旁组织中lncRNA-*GK3P*的表达水平进行检测发现，与癌旁组织相比，癌组织中lncRNA-*GK3P*表达水平显著上调；这一结果同课题组前期生物信息分析结果一致[14]，表明高表达的lncRNA-*GK3P*可能通过某种调控机制影响食管癌进程，值得深入分析和研究。根据lncRNA-*GK3P*的检测结果将41例食管癌患者分为高表达组与低表达组，并分析其与食管癌患者临床特征之间的关系，结果显示lncRNA-*GK3P*表达的上调与性别、年龄、是否吸烟、饮酒及有无淋巴结转移等因素无关。功能实验结果显示，lncRNA-*GK3P*敲低抑制细胞活性，抑制细胞周期从G0/G1期进入S期和G2/M期，诱导细胞周期阻滞在G0/G1期，下调食管癌细胞

Cyclin B1、Cyclin E1蛋白表达，分裂活动受阻，细胞增殖能力降低，Bax表达上调、Bcl2表达下调，细胞凋亡率增加；lncRNA-*GK3P*过表达后，细胞活性增强，细胞周期G0/G1期比例减少、S期比例增多，上调食管癌细胞Cyclin B1、Cyclin E1蛋白表达，分裂活动增强，细胞增殖能力增强，Bax表达下调、Bcl2表达上调，细胞凋亡率降低。

一些与肿瘤进展关系密切的lncRNA，其表达水平往往会与肿瘤大小、淋巴结转移、TNM分期和浸润深度等临床特征相关[15]。而本研究结果显示lncRNA-*GK3P*表达的上调与性别、年龄、是否吸烟、饮酒及有无淋巴结转移等因素无关。说明lncRNA-*GK3P*的表达可能不受这些因素的影响。另外，有限的样本量也有可能致使分析结果产生一定的偏差。

增殖、凋亡等生物学功能可以反映肿瘤细胞恶性程度，本研究针对lncRNA-*GK3P*对食管癌细胞生物学功能的影响进行了初步探索。结果显示，lncRNA-*GK3P*促进食管癌细胞增殖，抑制凋亡。细胞周期紊乱是肿瘤细胞异常增殖的重要前提，细胞周期蛋白（Cyclin）是一类通过周期蛋白依赖性激酶调控细胞周期，控制细胞增殖的蛋白家族[16]，其中，Cyclin E1是参与调控细胞G1/S期限制性检测点的主要蛋白[17]。Cyclin B1是调控细胞周期由G2期进入M期的关键因子，只有Cyclin B1蛋白表达量足够时才能结合并激活周期蛋白依赖性激酶1进而发挥调控作用[18]。肿瘤的发展过程中常常出现细胞周期蛋白的异常表达，lncRNA亦可通过影响细胞周期蛋白表达在肿瘤进程中发挥作用，如lncRNA-*00312*可下调Cyclin B1的表达，诱导肝癌细胞中G2/M细胞周期停滞，抑制肝癌细胞增殖[19]；敲低lncRNA-*00857*可下调CyclinE1的表达，导致细胞周期阻滞，进而抑制胃癌细胞增殖[20]。本研究发现，lncRNA-*GK3P*敲低抑制细胞周期从G0/G1期进入S期和G2/M期，诱导细胞周期阻滞在G0/G1期，下调食管癌细胞Cyclin B1、Cyclin E1蛋白表达，分裂活动受阻，细胞增殖能力降低。lncRNA-*GK3P*过表达后，细胞周期G0/G1期比例减少，S期比例增多，上调食管癌细胞Cyclin B1、Cyclin E1蛋白表达，分裂活动增强，细胞增殖能力增强。这一结果说明lncRNA-*GK3P*可能通过影响Cyclin B1、E1蛋白表达调控细胞周期，进而促进食管癌细胞增殖。除了细胞增殖失衡外，细胞凋亡异常也是肿瘤发生发展的重要机制。*Bcl2*基因家族在细胞凋亡过程中发挥着重要的调控作用，其中Bcl2蛋白能抑制细胞色素C释放，降低细胞内钙浓度，抑制细胞凋亡[21]；Bax也是Bcl2家族成员，通过破坏线粒体渗透性、激活Caspase-3促进细胞凋亡。此外，Bcl2与Bax蛋白能够形成聚合体，在细胞凋亡过程中发挥调控作用[22]。有研究表明lncRNA-*SNHG5*影响Bax、Bcl2表达促进黑色素瘤细胞凋亡[23]，lncRNA-*CCHE1*通过上调Bcl2、下调Bax表达抑制胃癌细胞凋亡[24]。本研究发现lncRNA-*GK3P*能上调Bcl2、下调Bax表达，说明lncRNA-*GK3P*调控Bax、Bcl2的表达可能是其抑制食管癌细胞凋亡的重要机制之一。

综上所述，本研究初步证实lncRNA-*GK3P*在食管癌中高表达。通过敲低和过表达lncRNA-*GK3P*证实，lncRNA-*GK3P*通过调控细胞周期相关蛋白的表达促进EC109细胞增殖，通过调控Bax、Bcl2蛋白抑制EC109细胞凋亡，为lncRNA-*GK3P*在食管癌中作用机制的研究奠定了基础。当然，本研究也存在一定的局限性。首先，本研究中纳入的食管癌病例数有限，得到的结论仍需在更大的样本量中进行验证；其次，本研究只采用了EC109一株食管癌细胞进行实验，关于lncRNA-*GK3P*对食管癌细胞功能影响的机制研究还不够深入，需要进一步探索。

参考文献

[1] BRAY F，FERLAY J，SOERJOMATARAM I，et al. Global cancer statistics 2018：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries［J］. CA Cancer J Clin，2018，68（6）：394-424.

[2] TALUKDAR F R，DI PIETRO M，SECRIER M，et al. Molecular landscape of esophageal cancer：implications for early detection and personalized therapy［J］. Ann N Y Acad Sci，2018，1434（1）：342-359.

[3] The ENCODE Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project［J］. Nature，2007，447（7146）：799-816.

[4] ROBINSON E K，COVARRUBIAS S，CARPENTER S. The how and why of lncRNA function：an innate immune perspective［J］. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech，2020，1863（4）：194419.

[5] FENG Q，ZHANG H，YAO D，et al. Emerging role of non-coding RNAs in esophageal squamous cell carcinoma［J］. Int J Mol Sci，2019，21（1）：258.

[6] ZHAO Z，SUN W，GUO Z，et al. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis [J]. Life Sci，2020，254：116900.

[7] SCHMITZ S U，GROTE P，HERRMANN B G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease [J]. Cell Mol Life Sci，2016，73（13）：2491-2509.

[8] HOU X，WEN J，REN Z，et al. Non-coding RNAs：new biomarkers and therapeutic targets for esophageal cancer [J]. Oncotarget，2017，8（26）：43571-43578.

[9] HUANG X，ZHOU X，HU Q，et al. Advances in esophageal cancer：a new perspective on pathogenesis associated with long non-coding RNAs [J]. Cancer Lett，2018，413：94-101.

[10] LOU W，DING B，FU P. Pseudogene-derived lncRNAs and their miRNA sponging mechanism in human cancer [J]. Front Cell Dev Biol，2020，8：85.

[11] MILLSON A，LEWIS T，PESARAN T，et al. Processed pseudogene confounding deletion/duplication assays for *SMAD4* [J]. J Mol Diagn，2015，17（5）：576-582.

[12] ZHOU J，QU G，ZHANG G，et al. Glycerol kinase 5 confers gefitinib resistance through SREBP1/SCD1 signaling pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res，2019，38（1）：96.

[13] YU Y，ZHANG J H，ZHANG B Z. MicroRNA-135b exerts oncogenic activity in glioblastoma via the inhibition of glycerol kinase 5 expression [J]. Mol Med Rep，2015，12（2）：2721-2726.

[14] MIAO Y，SUI J，ZHANG Y，et al. Development of a novel signature of long noncoding RNAs as a prognostic biomarker for esophageal cancer [J/OL]. BioRxiv，(2018-10-13) [2021-02-18]. https://doi.org/10.1101/441568.

[15] WANG A H，TAN P，ZHUANG Y，et al. Down-regulation of long non-coding RNA HOTAIR inhibits invasion and migration of oesophageal cancer cells via up-regulation of microRNA-204 [J]. J Cell Mol Med，2019，23（10）：6595-6610.

[16] ZHANG H P，LI S Y，WANG J P，et al. Clinical significance and biological roles of cyclins in gastric cancer [J]. Onco Targets Ther，2018，11：6673-6685.

[17] PETRACHKOVA T，WORTINGER L A，BARD A J，et al. Lack of cyclin B1 in zebrafish causes lengthening of G2 and M phases [J]. Dev Biol，2019，451（2）：167-179.

[18] SIU K T，ROSNER M R，MINELLA A C. An integrated view of cyclin E function and regulation [J]. Cell Cycle，2012，11（1）：57-64.

[19] WU J，ZHOU X，FAN Y，et al. Long non-coding RNA 00312 downregulates cyclin B1 and inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. Biochem Biophys Res Commun，2018，497（1）：173-180.

[20] PANG K，RAN M J，ZOU F W，et al. Long non-coding RNA *LINC00857* promotes gastric cancer cell proliferation and predicts poor patient survival [J]. Oncol Lett，2018，16（2）：2119-2124.

[21] WARREN C F，WONG-BROWN M W，BOWDEN N A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer [J]. Cell Death Dis，2019，10（3）：177.

[22] PISTRITTO G，TRISCIUOGLIO D，CECI C，et al. Apoptosis as anticancer mechanism：function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. Aging (Albany NY)，2016，8（4）：603-619.

[23] 李静，刘琴，柯锦. LncRNA SNHG5 调控 miR-23a-3p 影响恶性黑色素瘤细胞增殖和凋亡的作用机制 [J]. 河北医药，2020，42（18）：2751-2755.
LI J，LIU Q，KE J. Experimental study on the effects of lncRNA SNHG5 on cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma cells and potential action mechanism in regulating miR-23a-3p [J]. Hebei Med J，2020，42（18）：2751-2755.

[24] XU G，ZHANG Y，LI N，et al. LncRNA CCHE1 in the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2018，22（9）：2631-2637.

（英文编辑：汪源；责任编辑：丁瑾瑜）