

LncRNA MIF-AS1调节miR-423-5p/*KDM2A*轴 对食管鳞状细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

熊玉梅* 郭剑锋 许芬芬 刘劼 谢玉芳
(攀钢集团总医院消化科, 攀枝花 617000)

摘要 该文探讨了长链非编码RNA(LncRNA) MIF-AS1调节微小RNA-423-5p(miR-423-5p)/组蛋白去甲基化酶2A(*KDM2A*)轴对食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞增殖、迁移和侵袭的影响。qRT-PCR法检测39例2023年1月至2024年1月期间在攀钢集团总医院进行手术的ESCC患者术中切除的ESCC组织及癌旁组织中LncRNA MIF-AS1、miR-423-5p、*KDM2A* mRNA的表达。将KYSE30细胞随机分为Control组、sh-NC组、sh-MIF-AS1组、sh-MIF-AS1+anti-NC组、sh-MIF-AS1+anti-miR-423-5p组,检测KYSE30细胞中LncRNA MIF-AS1、miR-423-5p、*KDM2A* mRNA表达情况;平板克隆法、划痕实验、Transwell实验分别检测KYSE30细胞增殖、迁移、侵袭情况;Western blot检测KYSE30细胞中PCNA、*KDM2A*、MMP-9蛋白的表达水平。结果显示,ESCC组织LncRNA MIF-AS1、*KDM2A* mRNA表达水平高于癌旁组织,miR-423-5p表达水平低于癌旁组织($P<0.05$)。沉默LncRNA MIF-AS1导致细胞克隆数、划痕愈合率、侵袭数、LncRNA MIF-AS1、PCNA蛋白、*KDM2A* mRNA和*KDM2A*蛋白、MMP-9蛋白表达水平降低($P<0.05$);抑制miR-423-5p逆转了沉默LncRNA MIF-AS1对上述指标的影响($P<0.05$)。LncRNA MIF-AS1可以靶向负调控miR-423-5p,miR-423-5p可以靶向负调控*KDM2A*。以上结果表明,沉默LncRNA MIF-AS1可以抑制ESCC细胞的增殖、迁移、侵袭,其机制可能是通过调控miR-423-5p/*KDM2A*信号通路实现的。

关键词 长链非编码RNA MIF-AS1; 微小RNA-423-5p; 组蛋白去甲基化酶2A; 食管鳞状细胞癌; 增殖; 迁移和侵袭

Effects of LncRNA MIF-AS1 on the Proliferation, Migration, and Invasion of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells by Regulating the miR-423-5p/*KDM2A* Axis

XIONG Yumei*, GUO Jianfeng, XU Fenfen, LIU Jie, XIE Yufang
(Gastroenterology Department, Pangang Group General Hospital, Panzhihua 617000, China)

Abstract This study aims to investigate the effects of LncRNA (long non-coding RNA) MIF-AS1 on the proliferation, migration, and invasion of ESCC (esophageal squamous cell carcinoma) cells by regulating the miR-423-5p (microRNA-423-5p)/*KDM2A* (histone demethylase 2A) axis. qRT-PCR was applied to detect the expression of LncRNA MIF-AS1, miR-423-5p, and *KDM2A* mRNA in ESCC tissues and adjacent tissues of 39 ESCC patients who underwent surgery in Pangang Group General Hospital from January 2023 to January 2024. KYSE30 cells were separated into Control group, sh-NC group, sh-MIF-AS1 group, sh-MIF-AS1+anti-NC group, and sh-MIF-

收稿日期: 2024-09-24

接受日期: 2024-10-30

攀枝花市2022年度市级指导性科技计划(批准号: 2022ZD-S-48)资助的课题

*通信作者。Tel: 15881260930, E-mail: uens63@163.com

Received: September 24, 2024

Accepted: October 30, 2024

This work was supported by the Panzhihua City's 2022 Municipal Guiding Science and Technology Plan (Grant No.2022ZD-S-48)

*Corresponding author. Tel: +86-15881260930, E-mail: uens63@163.com

AS1+anti miR-423-5p group randomly. The mRNA expression of LncRNA MIF-AS1, miR-423-5p, and *KDM2A* was detected in KYSE30 cells. Plate cloning, scratch assay, and Transwell assay were applied to detect the proliferation, migration, and invasion of KYSE30 cells, respectively. Western blot was applied to detect the expression of PCNA, *KDM2A*, and MMP-9 proteins in KYSE30 cells. The results showed that the expression of LncRNA MIF-AS1 and *KDM2A* mRNA in ESCC tissues was higher than that in adjacent tissues, while the expression of miR-423-5p was lower than that in adjacent tissues ($P<0.05$). Silencing LncRNA MIF-AS1 resulted in decreased cell clone number, scratch healing rate, invasion number, LncRNA MIF-AS1, PCNA protein, *KDM2A* mRNA and *KDM2A* protein, and MMP-9 protein expression. Inhibition of miR-423-5p reversed the effect of silencing LncRNA MIF-AS1 on the above indexes ($P<0.05$). LncRNA MIF-AS1 could target negative regulation of miR-423-5p, and miR-423-5p could target negative regulation of *KDM2A*. These results suggest that silencing LncRNA MIF-AS1 can inhibit the proliferation, migration, and invasion of ESCC cells, and its mechanism may be achieved by regulating the miR-423-5p/*KDM2A* signaling pathway.

Keywords long non-coding RNA MIF-AS1; microRNA-423-5p; histone demethylase 2A; esophageal squamous cell carcinoma; proliferation; migration and invasion

食管癌(esophagus cancer, EC)是全球癌症相关死亡的第六大原因,其发病率具有显著的区域差异,我国EC发病率居世界前列,食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是最常见的原发性EC之一,是我国最常见的EC类型^[1]。ESCC是一种生长迅速、淋巴结转移率高的侵袭性肿瘤,常累及食管上三分之二,吞咽困难和颈部淋巴结肿大直到癌症晚期时才表现出来,5年生存率低^[2]。由于医疗技术的不断进步和发展,许多新的治疗方案被用于治疗ESCC,如早期筛查或手术联合化疗和放疗,但ESCC患者的总生存期仍然很差^[3]。因此,确定ESCC进展的机制基础并为ESCC患者开发新的治疗靶点迫在眉睫。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)具有调控顺式反式转录、核结构域组织、蛋白质、RNA分子等多种功能,在EC的发生和转移过程中发挥重要作用^[4]。LncRNA MIF-AS1是染色体22q11.23转录的LncRNA,在头颈部鳞状细胞癌、胃癌的肿瘤组织中被发现表达上调^[5]。微小RNA(microRNA, miRNA)通过诱导mRNA降解或翻译沉默异常表达,与ESCC的生物学过程密切相关^[6]。相关研究显示,miR-423-5p在ESCC中表达下调^[7]。组蛋白去甲基化酶2A(histone demethylase 2A, *KDM2A*)是JmJc结构域组蛋白去甲基化酶的重要成员,可以催化组蛋白的去甲基化,从而调节染色质重塑和细胞发育等重要生物过程,还可以修饰非组蛋白,调节其稳定性和转录活性,*KDM2A*在ESCC中高表达,可作为ESCC

早期诊断和预测癌前病变的潜在生物标志物^[8]。本研究前期通过Starbase网站发现LncRNA MIF-AS1与miR-423-5p、miR-423-5p与*KDM2A*之间存在结合位点。据此推测,LncRNA MIF-AS1可以调节miR-423-5p/*KDM2A*调控ESCC细胞的增殖、迁移和侵袭,以提高ESCC的诊治效能。

1 材料与方法

1.1 标本收集

取39例2023年1月至2024年1月期间在我院进行手术的ESCC患者(均经患者知情同意)术中切除的ESCC组织及癌旁组织。本研究获得本院伦理委员会的批准(批号:2023005)。

1.2 主要试剂与仪器

KYSE30细胞(货号: PriCells-h098)购自武汉原生物医药科技有限公司;第一链cDNA合成试剂盒(货号: BW-RT0212-03)购自杭州倍沃医学科技有限公司; qRT-PCR试剂盒(货号: T427)购自广州英赞生物科技有限公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号: BN27109)购自北京拜尔迪生物技术有限公司; ECL检测试剂盒(货号: HZ10015)购自上海沪震实业有限公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(货号: SLDL-100)购自北京美科美生物技术开发有限公司; PCNA、*KDM2A*、MMP-9、GAPDH、HRP(货号: ab265609、ab191387、ab8245、ab8245、ab6789)购自英国Abcam公司; qRT-PCR仪(型号: qTOWER 3G)购自上海耶拿分析仪器有限公司; 倒置显微镜(型号:

Revolve)购自广州德瑞科仪科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR法检测 LncRNA MIF-AS1、miR-423-5p、KDM2A mRNA表达 ESCC组织和癌旁组织总RNA采用Trizol试剂提取,反转录合成cDNA并以此为模板,LncRNA MIF-AS1、KDM2A以GAPDH作为内参,miR-423-5p以U6作为内参,进行qRT-PCR。热循环参数为:95 °C预变性10 s;然后是95 °C变性5 s,60 °C退火10 s,72 °C延伸10 s,共45次循环;最后一次延伸是72 °C、5 min。据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算ESCC组织和癌旁组织中LncRNA MIF-AS1、miR-423-5p、KDM2A mRNA相对表达量。引物序列见表1。

1.3.2 细胞分组 将KYSE30细胞随机分为Control组(正常培养)、sh-NC组(转染sh-NC)、sh-MIF-AS1组(转染sh-MIF-AS1)、sh-MIF-AS1+anti-NC组(sh-MIF-AS1和anti-NC共转染)、sh-MIF-AS1+anti-miR-423-5p组(sh-MIF-AS1和anti-miR-423-5p共转染)。每组实验重复3次,每次2个平行。采用1.3.1方法测定各组KYSE30细胞中LncRNA MIF-AS1、miR-423-5p、KDM2A mRNA相对表达量。

1.3.3 平板克隆法检测KYSE30细胞增殖 转染的KYSE30细胞培养48 h时,收获细胞,采用0.25%胰蛋白酶在37 °C下消化1~2 min,重悬于含有10% FBS的新鲜培养基中,按照每2 mL 0.5×10^3 个细胞的密度,将2 mL细胞悬液涂于6孔细胞培养板中,在37 °C、5% CO₂的最佳条件下孵育2周,用4%多聚甲醛室温固定细胞,用0.5%结晶紫室温染色5 min,在显微镜下拍照并观察。

1.3.4 划痕实验检测KYSE30细胞迁移 将转染的ESCC细胞重新接种在6孔培养板中,培养至90%汇合度,用200 μ L无菌移液管针尖在细胞单层中形成线性划痕,PBS冲洗孔3次,去除脱落细胞,使用倒置显微镜捕捉图像,计算划伤后0和24 h的伤口面积。创面面积百分比为各组在24 h时与0 h时记录的伤口宽度比值

乘以100%。

1.3.5 Transwell实验检测KYSE30细胞侵袭 将50 ng/mL Matrigel基质胶预涂于Transwell上室,将KYSE30细胞重悬于300 μ L无血清培养基中,以每室 5×10^4 个细胞的密度装于上室内,同时在下室加入500 μ L含10% FBS的培养基,37 °C孵育24 h后,用棉签拭去表面残留的细胞,同时,将膜另一侧的侵袭细胞用甲醇室温固定20 min,再用0.1%结晶紫室温染色20 min,在倒置显微镜下观察,计侵袭细胞数。

1.3.6 Western blot检测KYSE30细胞中PCNA、KDM2A、MMP-9蛋白的表达情况 在RIPA提取试剂加入PMSF蛋白酶抑制剂裂解细胞,超声功率400 W,超声3 s,间隔10 s,超声10次,12 000 r/min、4 °C离心20 min,使用BCA试剂盒定量蛋白浓度,同样数量的蛋白质用10% SDS-PAGE分离,并转移到PVDF膜上,使用脱脂牛奶在室温下阻断膜1 h,并与PCNA、KDM2A、MMP-9、GAPDH一抗(稀释比均为1:1 000),在4 °C下孵育过夜,将制备好的膜与二抗(1:2 000)室温孵育2 h,用ECL化学发光试剂对条带进行可视化,使用ImageJ对结果进行量化。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验 通过PCR扩增制备LncRNA MIF-AS1和KDM2A完整序列和突变序列片段(MIF-AS1-WT4、KDM2A-WT、MIF-AS1-MUT、KDM2A-MUT),并将其克隆到pmirGLO载体上,在将其分别与miR-423-5p mimic和mimic-NC,转染到在24孔板中生长的KYSE30细胞(密度为 1×10^5 个/孔)中,转染48 h后,收集细胞。使用双荧光素酶报告分析系统和酶标仪进行分析。

1.4 统计与分析

数据用SPSS 25.0分析,符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,ESCC组织和癌旁中LncRNA MIF-AS1、miR-423-5p、KDM2A mRNA表达采用独立样本t检验进行;不同组别间miR-423-5p、KDM2A mRNA

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因 Gene	上游引物(5'→3') Upstream primers (5'→3')	下游引物(5'→3') Downstream primers (5'→3')
LncRNA MIF-AS1	ACA TCG GCA TGA TGG CAG AA	TCA CAA AAG GCG GGA CCA C
miR-423-5p	CGA AGT TCC CTT TGT CAT CCT	GTG CAG GGT CCG AGG TAT TC
KDM2A	GCC AAG GCA CTT GAA AGA AA	AGC AGC CTC GAA CAC TCA TT
U6	CAC AGC ACA CCA GAA TCA	GCA GTC CTT GAA TCC TTG T
GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA	AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG

表达、克隆数、划痕愈合率等比较采用单因素方差分析, 两两比较行SNK-*q*检验; Pearson相关法分析LncRNA MIF-AS1与miR-423-5p以及miR-423-5p与*KDM2A*的相关性。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ESCC组织中LncRNA MIF-AS1、miR-423-5p、*KDM2A* mRNA表达

ESCC组织LncRNA MIF-AS1、*KDM2A* mRNA表达水平高于癌旁组织, miR-423-5p表达水平低于癌旁组织($P<0.05$)。见图1。

2.2 沉默LncRNA MIF-AS1对KYSE30细胞中LncRNA MIF-AS1、miR-423-5p、*KDM2A* mRNA表达的影响

sh-MIF-AS1组LncRNA MIF-AS1、*KDM2A*

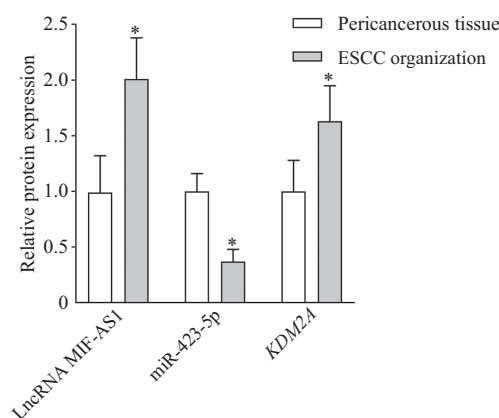
mRNA表达水平低于sh-NC组、Control组, miR-423-5p表达水平高于sh-NC组、Control组($P<0.05$); 与sh-MIF-AS1组、sh-MIF-AS1+anti-NC组相比, sh-MIF-AS1+anti-miR-423-5p组miR-423-5p表达水平降低, *KDM2A* mRNA表达水平升高($P<0.05$)。见图2。

2.3 沉默LncRNA MIF-AS1对KYSE30细胞增殖的影响

sh-MIF-AS1组克隆数低于sh-NC组、Control组($P<0.05$); 与sh-MIF-AS1组、sh-MIF-AS1+anti-NC组相比, sh-MIF-AS1+anti-miR-423-5p组克隆数升高($P<0.05$)。见图3、表2。

2.4 沉默LncRNA MIF-AS1对KYSE30细胞迁移的影响

sh-MIF-AS1组划痕愈合率低于sh-NC组、Control组($P<0.05$); 与sh-MIF-AS1组、sh-MIF-AS1+anti-

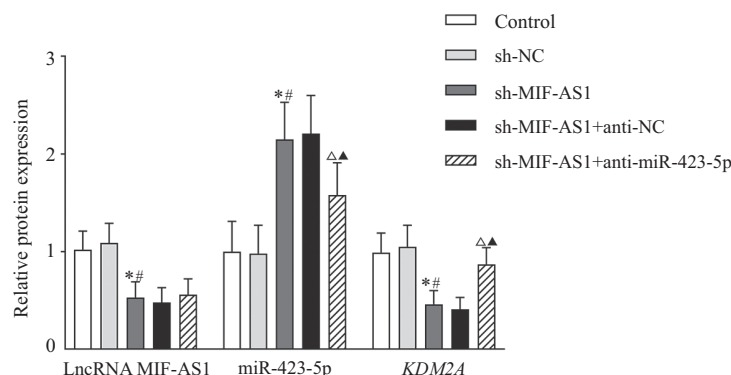


* $P<0.05$, 与癌旁组织比较。 $\bar{x}\pm s$, $n=39$ 。

* $P<0.05$ compared with adjacent tissues. $\bar{x}\pm s$, $n=39$ 。

图1 LncRNA MIF-AS1、miR-423-5p、*KDM2A* mRNA在ESCC组织中的表达情况比较

Fig.1 Comparison of LncRNA MIF-AS1, miR-423-5p, *KDM2A* mRNA expression in ESCC tissues



* $P<0.05$, 与Control组相比; # $P<0.05$, 与sh-NC组相比; Δ $P<0.05$, 与sh-MIF-AS1组相比; $\blacktriangle$ $P<0.05$, 与sh-MIF-AS1+anti-NC组相比。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with Control group; # $P<0.05$ compared with sh-NC group; Δ $P<0.05$ compared with sh-MIF-AS1 group; $\blacktriangle$ $P<0.05$ compared with sh-MIF-AS1+anti-NC group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

图2 各组KYSE30细胞中LncRNA MIF-AS1、miR-423-5p、*KDM2A* mRNA表达水平比较

Fig.2 Comparison of LncRNA MIF-AS1, miR-423-5p and *KDM2A* mRNA expression in KYSE30 cells of different groups

NC组相比, sh-MIF-AS1+anti-miR-423-5p组划痕愈合率升高($P<0.05$)。见图4和表3。

2.5 沉默LncRNA MIF-AS1对KYSE30细胞侵袭能力的影响

sh-MIF-AS1组侵袭数低于 sh-NC组、Control组($P<0.05$); 与 sh-MIF-AS1组、sh-MIF-AS1+anti-NC组相比, sh-MIF-AS1+anti-miR-423-5p组侵袭数升高($P<0.05$)。见图5和表4。

2.6 沉默LncRNA MIF-AS1对PCNA、KDM2A、MMP-9蛋白表达情况的影响

sh-MIF-AS1组PCNA、KDM2A、MMP-9蛋白表达水平低于 sh-NC组、Control组($P<0.05$); 与 sh-

MIF-AS1组、sh-MIF-AS1+anti-NC组相比, sh-MIF-AS1+anti-miR-423-5p组PCNA、KDM2A、MMP-9蛋白表达水平升高($P<0.05$)。见图6和图7。

2.7 双荧光素酶报告实验检测LncRNA MIF-AS1和miR-423-5p、miR-423-5p和KDM2A的靶向关系

Starbase网站显示LncRNA MIF-AS1与miR-423-5p、miR-423-5p和KDM2A的之间存在结合位点, 见图8和图9。相关性分析显示, LncRNA MIF-AS1与miR-423-5p呈负相关($R=-0.528$, $P<0.05$), miR-423-5p与KDM2A呈负相关($R=-0.671$, $P<0.05$)。在转染MIF-AS1-WT的KYSE30细胞中, miR-423-5p mimic组的荧光素酶活性降低($P<0.05$); 在转染KDM2A-

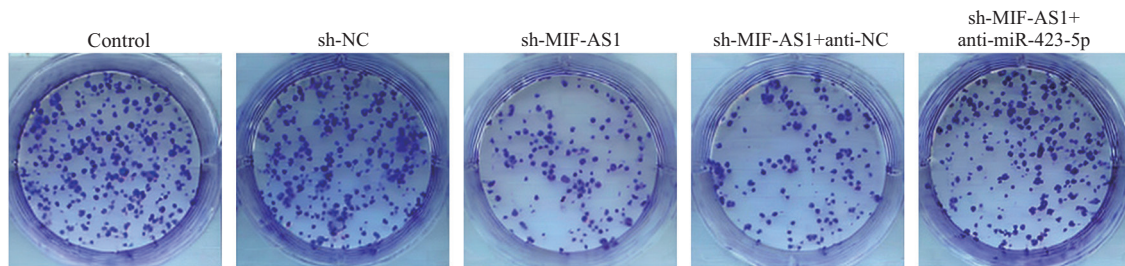


图3 平板克隆法检测KYSE30细胞增殖

Fig.3 Detection of KYSE30 cell proliferation by plate cloning method

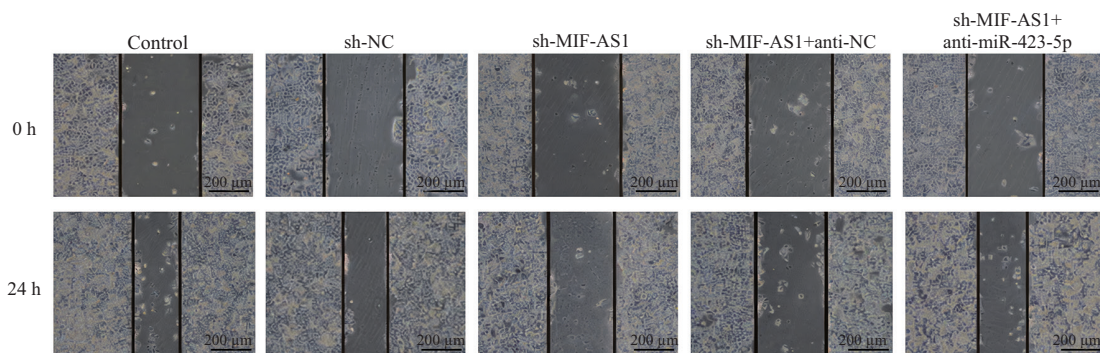
表2 各组KYSE30细胞克隆数比较

Table 2 Comparison of clone count of KYSE30 cells in each group

组别 Group	克隆数/个 Number of clones /pieces
Control	117.52±12.07
sh-NC	114.38±11.93
sh-MIF-AS1	62.54±9.85 ^{*#}
sh-MIF-AS1+anti-NC	64.86±9.43
sh-MIF-AS1+anti-miR-423-5p	97.79±10.46 ^{△▲}

* $P<0.05$, 与Control组相比; [#] $P<0.05$, 与sh-NC组相比; [△] $P<0.05$, 与sh-MIF-AS1组相比; [▲] $P<0.05$, 与sh-MIF-AS1+anti-NC组相比。 $\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with Control group; [#] $P<0.05$ compared with sh-NC group; [△] $P<0.05$ compared with sh-MIF-AS1 group; [▲] $P<0.05$ compared with sh-MIF-AS1+anti-NC group. $\bar{x}\pm s$, $n=6$.



$\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。

图4 划痕实验检测A549细胞迁移

Fig.4 Scratch assay for detecting A549 cell migration

表3 各组KYSE30细胞划痕愈合率比较

Table 3 Comparison of scratch healing rates of KYSE30 cells in various groups

组别 Group	划痕愈合率/个 Scratch healing rate /piece
Control	44.85±4.97
sh-NC	45.96±5.03
sh-MIF-AS1	21.34±2.76 ^{*#}
sh-MIF-AS1+anti-NC	20.78±2.68
sh-MIF-AS1+anti-miR-423-5p	38.63±3.89 ^{△▲}

^{*}*P*<0.05, 与Control组相比; [#]*P*<0.05, 与sh-NC组相比; [△]*P*<0.05, 与sh-MIF-AS1组相比; [▲]*P*<0.05, 与sh-MIF-AS1+anti-NC组相比。 $\bar{x}\pm s$, *n*=6。
^{*}*P*<0.05 compared with Control group; [#]*P*<0.05 compared with sh-NC group; [△]*P*<0.05 compared with sh-MIF-AS1 group; [▲]*P*<0.05 compared with sh-MIF-AS1+anti-NC group. $\bar{x}\pm s$, *n*=6.

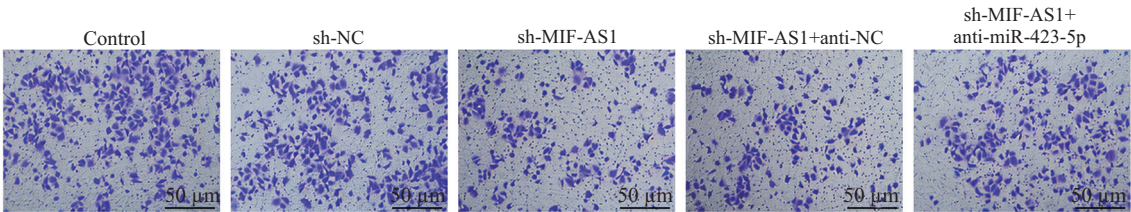


图5 Transwell实验检测KYSE30细胞侵袭

Fig.5 Transwell experiment detection of KYSE30 cell invasion

表4 各组KYSE30细胞侵袭数比较

Table 4 Comparison of invasion numbers of KYSE30 cells in each group

组别 Group	侵袭数/个 Number of invasions /pieces
Control	99.84±10.26
sh-NC	98.53±9.97
sh-MIF-AS1	52.76±8.41 ^{*#}
sh-MIF-AS1+anti-NC	51.63±8.23
sh-MIF-AS1+anti-miR-423-5p	82.41±8.54 ^{△▲}

^{*}*P*<0.05, 与Control组相比; [#]*P*<0.05, 与sh-NC组相比; [△]*P*<0.05, 与sh-MIF-AS1组相比; [▲]*P*<0.05, 与sh-MIF-AS1+anti-NC组相比。 $\bar{x}\pm s$, *n*=6。
^{*}*P*<0.05 compared with Control group; [#]*P*<0.05 compared with sh-NC group; [△]*P*<0.05 compared with sh-MIF-AS1 group; [▲]*P*<0.05 compared with sh-MIF-AS1+anti-NC group. $\bar{x}\pm s$, *n*=6.

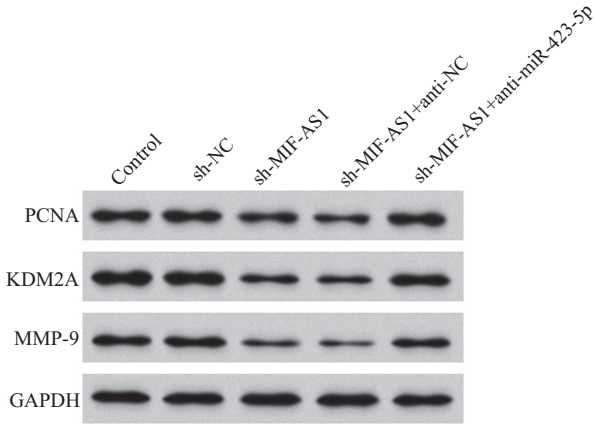
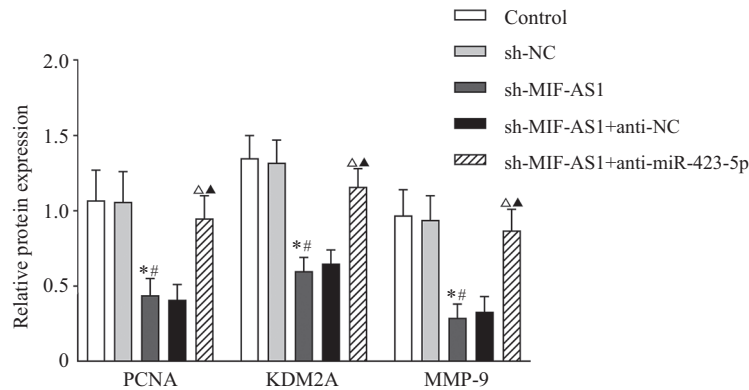


图6 Western blot检测KYSE30细胞中蛋白表达情况

Fig.6 Western blot detection of protein expression in KYSE30 cells



* $P < 0.05$, 与Control组相比; # $P < 0.05$, 与sh-NC组相比; $\Delta P < 0.05$, 与sh-MIF-AS1组相比; $\blacktriangle P < 0.05$, 与sh-MIF-AS1+anti-NC组相比。 $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with sh-NC group; $\Delta P < 0.05$ compared with sh-MIF-AS1 group; $\blacktriangle P < 0.05$ compared with sh-MIF-AS1+anti-NC group. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。

图7 各组KYSE30细胞中蛋白表达情况比较

Fig.7 Comparison of protein expression in KYSE30 cells among different groups

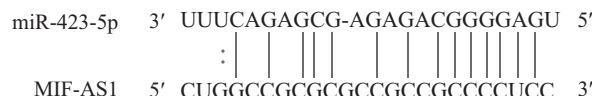


图8 LncRNA MIF-AS1与miR-423-5p的结合位点

Fig.8 Binding sites of LncRNA MIF-AS1 and miR-423-5p

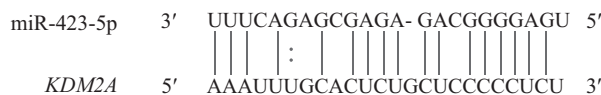


图9 miR-423-5p与KDM2A的结合位点

Fig.9 Binding sites of miR-423-5p and KDM2A

表5 双荧光素酶活性比较

Table 5 Comparison of dual luciferase activity

组别 Group	MIF-AS1-WT	MIF-AS1-MUT	KDM2A-WT	KDM2A-MUT
mimic-NC	0.99±0.18	1.00±0.27	1.00±0.15	1.03±0.34
miR-423-5p mimic	0.53±0.14*	1.08±0.32	0.33±0.11*	0.97±0.31

* $P < 0.05$, 与mimic-NC组相比。 $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。

* $P < 0.05$ compared with the mimic-NC group. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。

WT的KYSE30细胞中, miR-423-5p mimic组的荧光素酶活性降低($P < 0.05$)。见表5。

3 讨论

ESCC约占全球EC病例的90%, 其中超过50%发生在中国, 导致ESCC的潜在因素可能是吸烟、酗酒、喝热水、吃太烫的食物等不良习惯^[9]。目前, 内镜与钳活检是ESCC的标准诊断方式, 然而, 存在侵入性高、成本高、采样误差大, 以及可能遗漏小病变等缺点。尽管非侵入性血液肿瘤标志物, 如癌胚抗原

和SCC抗原, 已被用于临床ESCC的检测和预后, 但在早期诊断和评估肿瘤进展方面仍存在不足^[10]。尽管针对ESCC的治疗方法最近取得了进展, 但ESCC具有直接侵袭和早期转移的能力, 患者的5年生存率仍在9%至27.1%之间, 迫切需要寻找新的治疗靶点^[11]。因此, 探讨ESCC的分子机制, 可以确定新的更高效诊断方法和开发新的治疗方式以改善ESCC患者的预后。

LncRNA不能编码蛋白质, 但可以间接参与基因调控, LncRNA可以作为ceRNA发挥作用, 并通过

miRNA 结合调节 mRNA 的表达, LncRNA 可能作为致癌驱动因子或肿瘤抑制因子来调节 ESCC 发生和进展^[12]。相关研究显示, LncRNA MIF-AS1 是一种致癌基因。DING 等^[13]发现, LncRNA MIF-AS1 在乳腺癌组织和细胞中表达上调, 沉默 LncRNA MIF-AS1 通过调节 miR-1249-3p/HOXB8 信号通路, 抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移、上皮-间质转化。FAN 等^[14]发现, LncRNA MIF-AS1 在卵巢癌组织和细胞系中显著上调, LncRNA MIF-AS1 通过海绵化 miRNA-31-5p, 调节 PLCB1 的表达, 促进卵巢癌细胞的增殖、迁移、侵袭。LI 等^[15]发现, 与非癌性胃组织和细胞相比, LncRNA MIF-AS1 在胃癌组织和细胞系中表达上调, LncRNA MIF-AS1/miR-212-5p/NDUFA4 信号通路通过激活氧化磷酸化途径, 促进胃癌细胞的增殖并减少胃癌细胞的凋亡。相关研究显示, PCNA 和 MMP-9 与细胞增殖、迁移和侵袭相关^[16]。本研究发现, LncRNA MIF-AS1 在 ESCC 组织中高表达, 沉默 LncRNA MIF-AS1 可以抑制 PCNA 和 MMP-9 的表达进而抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移、侵袭, 提示 LncRNA MIF-AS1 通过促进 ESCC 细胞的恶性生物学行为促进 ESCC 的生长、转移, 靶向 LncRNA MIF-AS1 可作为 ESCC 治疗的潜在生物靶点。

miRNA 主要通过阻止靶 mRNA 的翻译来调节多种细胞过程, 进而参与 ESCC 的进展^[17]。研究表明, miR-423-5p 在多种癌症中低表达。XUE 等^[18]发现, miR-423-5p 通过直接靶向 FOXP4 作为肿瘤抑制因子, 抑制髓母细胞瘤肿瘤发生, 可作为治疗髓母细胞瘤儿童的潜在治疗方法。WANG 等^[19]发现, 胃癌细胞和组织中 miR-423-5p 表达水平下调, miR-423-5p 被鉴定为 LncRNA TERC 的靶标, 并可以直接与 LncRNA TERC 结合, 此外, miR-423-5p 可以直接靶向 SOX12, 抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭, LncRNA TERC/miR-423-5p/SOX12 可作为胃癌治疗的新靶点。LIN 等^[20]发现, miR-423-5p 在甲状腺癌中表达下调, LncRNA PVT1 通过介导 miR-423-5p-PAK3 轴促进甲状腺癌的进展。XUE 等^[21]发现, miR-423-5p 在 ESCC 中低表达, miR-423-5p 受上游 LINC00680 的调控, 并靶向负调控下游 PAK6, 调节 ESCC 细胞的增殖、集落形成、迁移和侵袭, 并参与调控体内 ESCC 肿瘤的生长, 可作为 ESCC 的有前途的诊断和预后生物标志物及治疗靶点。本研究发现, miR-423-5p 在 ESCC 组织中低表达, LncRNA MIF-AS1 与

miR-423-5p 之间存在结合位点, 沉默 LncRNA MIF-AS1 导致 miR-423-5p 表达水平显著升高, 抑制 miR-423-5p 逆转了沉默 LncRNA MIF-AS1 对 ESCC 细胞恶性生物学行为的抑制作用, 提示 LncRNA MIF-AS1 可以海绵化 miR-423-5p 促进 ESCC 细胞的恶性进展。

KDM2A 具有表观遗传功能, 通过其不同的结构域与不同的蛋白相互作用, 参与多种生物学过程^[8]。CHEN 等^[22]发现, KDM2A 在乳腺癌中高表达, 且其表达量增加与乳腺癌患者的晚期肿瘤分期和不良临床结果相关, 上调 KDM2A 通过转录激活成纤维细胞中 PD-L1 的表达, 诱导成纤维细胞 p53 依赖性衰老, 并增强细胞因子的释放能力, 从而促进癌细胞增殖, 敲低 KDM2A, 降低肿瘤组织间质中 PD-L1 的表达水平, 抑制体内癌症相关成纤维细胞对乳腺肿瘤生长的促瘤活性。XI 等^[23]发现, 在结直肠癌组织和细胞系中, KDM2A 表达上调, LINC01278 通过与 miR-143 相互作用, 上调 KDM2A, 促进结直肠癌的进展。WANG 等^[24]发现, KDM2A 在 ESCC 细胞中高表达, 沉默 KDM2A 导致 ESCC 细胞系恶性表型得到抑制, 而过表达 KDM2A 则显示出相反的效果。本研究发现, KDM2A mRNA 在 ESCC 癌组织中高表达, miR-423-5p 可以靶向负调控 KDM2A, 沉默 LncRNA MIF-AS1 导致 KDM2A 表达水平降低, 抑制 miR-423-5p 导致 KDM2A 表达水平升高, 提示 LncRNA MIF-AS1 可以靶向 miR-423-5p 促进 KDM2A 的表达, 促进 ESCC 细胞的增殖、迁移、侵袭, LncRNA MIF-AS1 可作为 ESCC 的潜在治疗靶点。

综上所述, 沉默 LncRNA MIF-AS1 可以抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移、侵袭, 其机制可能是调控 miR-423-5p/KDM2A 信号通路实现的。

参考文献 (References)

- [1] YANG C, CHEN C, XIAO Q, et al. Relationship between PTEN and angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma and the underlying mechanism [J]. *Front Oncol*, 2021, 11(1): 739297-12.
- [2] AN L, LI M, JIA Q. Mechanisms of radiotherapy resistance and radiosensitization strategies for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2021, 22(1): 140-60.
- [3] WANG Y, TAN J, LI J, et al. ING5 inhibits migration and invasion of esophageal cancer cells by downregulating the IL-6/CXCL12 signaling pathway [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2021, 20(1): 1-8.
- [4] WANG P, YANG S, DAI S, et al. Expression and clinical value of LncRNA GAPLINC in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14(1): 4039-45.

- [5] GUO Y, YANG P T, WANG Z W, et al. Identification of three autophagy-related long non-coding RNAs as a novel head and neck squamous cell carcinoma prognostic signature [J]. *Front Oncol*, 2021, 10(1): 603864-76.
- [6] CHEN M, JIN D, WANG B, et al. Identification of miRNAs as prognostic factors for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Math Biosci Eng*, 2020, 17(3): 2302-9.
- [7] LIN C, WEI Y, DUAN X, et al. Circ_0001821 affects proliferation and the cell cycle in esophageal squamous cell carcinoma by elevating BTRC-mediated ikba ubiquitination [J]. *Mol Cancer Res*, 2022, 20(11): 1686-96.
- [8] ZHENG Y Q, HUANG H H, CHEN S X, et al. Discovery and validation of combined biomarkers for the diagnosis of esophageal intraepithelial neoplasia and esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Proteomics*, 2024, 304(1): 105233.
- [9] GUO X, ZHU R, LUO A, et al. EIF3H promotes aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma by modulating Snail stability [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 175-89.
- [10] KIM S, KIM G H, PARK S J, et al. Exosomal microRNA analyses in esophageal squamous cell carcinoma cell lines [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(15): 4426.
- [11] WANG Y, LYU Z, QIN Y, et al. FOXO1 promotes tumor progression by increased M2 macrophage infiltration in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Theranostics*, 2020, 10(25): 11535-48.
- [12] ZHENG X, LIU W, ZHU Y, et al. Development and validation of the oxidative stress related lncRNAs for prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancers*, 2023, 15(17): 4399-18.
- [13] DING J, WU W, YANG J, et al. Long non-coding RNA MIF-AS1 promotes breast cancer cell proliferation, migration and EMT process through regulating miR-1249-3p/HOXB8 axis [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(7): 152376.
- [14] FAN Y, WANG L, HAN X C, et al. LncRNA MIF-AS1 aggravates the progression of ovarian cancer by sponging miRNA-31-5p [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(5): 2248-55.
- [15] LI L, LI Y, HUANG Y, et al. Long non-coding RNA MIF-AS1 promotes gastric cancer cell proliferation and reduces apoptosis to upregulate NDUFA4 [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(12): 3714-25.
- [16] BAI Y, ZHU P, ZHOU K, et al. Effect of the acid suppressor omeprazole on the proliferation, migration, invasion and cell cycle of esophageal squamous cell carcinoma cells via the aryl hydrocarbon receptor pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(4): 1187.
- [17] MAHAWONGKAJIT P, TOMTITCHONG P. Expression of miRNA in 5-FU resistant esophageal cancer [J]. *Mol Clin Oncol*, 2020, 13(2): 221-7.
- [18] XUE P, HUANG S, HAN X, et al. Exosomal miR-101-3p and miR-423-5p inhibit medulloblastoma tumorigenesis through targeting FOXP4 and EZH2 [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(1): 82-95.
- [19] WANG J, WU M, CHANG L, et al. The lncRNA TERC promotes gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion by sponging miR-423-5p to regulate SOX12 expression [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(18): 963-78.
- [20] LIN Q Y, QI Q L, HOU S, et al. LncRNA PVT1 acts as a tumor promoter in thyroid cancer and promotes tumor progression by mediating miR-423-5p-PAK3 [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12(1): 13403-13.
- [21] XUE S T, ZHENG B, CAO S Q, et al. Long non-coding RNA LINC00680 functions as a ceRNA to promote esophageal squamous cell carcinoma progression through the miR-423-5p/PAK6 axis [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 69-86.
- [22] CHEN J Y, LI C F, LAI Y S, et al. Lysine demethylase 2A expression in cancer-associated fibroblasts promotes breast tumour growth [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(2): 484-93.
- [23] XI C, YE N Y, WANG Y B. LncRNA LINC01278 accelerates colorectal cancer progression via miR-134-5p/KDM2A axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(20): 10526-34.
- [24] WANG J, ZHANG Z Y, JIANG J, et al. KDM2A plays a dual role in regulating the expression of malignancy-related genes in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 624(1): 53-8.