

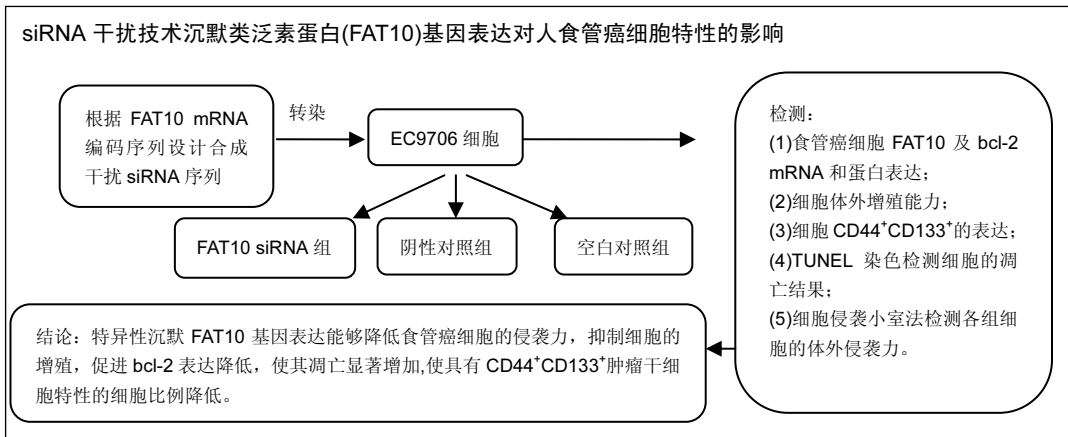
FAT10基因沉默对人食管癌细胞凋亡及肿瘤干细胞特性的影响

王志强¹, 张建军²(¹解放军150医院心胸外科, 河南省洛阳市 471031; ²天津市第四中心医院, 神经内科, 天津市 300143)

引用本文: 王志强, 张建军. FAT10 基因沉默对人食管癌细胞凋亡及肿瘤干细胞特性的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(50):7453-7459.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.50.001 ORCID: 0000-0003-4828-8544(王志强)

文章快速阅读:



王志强, 男, 1977 年生, 河南省洛阳市人, 汉族, 2001 年新乡医学院毕业, 主治医师, 主要从事胸外科研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)50-07453-07

稿件接受: 2016-09-26

文题释义:

基因沉寂: 也可以被称为“基因沉默”。基因沉寂是真核生物细胞基因表达调节的一种重要手段。在染色体水平, 基因沉寂实际上是形成异染色质(Heterochromatin)的过程, 被沉寂的基因区段呈高浓缩状态。

肿瘤干细胞: 目前有两种理论解释, 一是随机化理论, 它认为肿瘤细胞具有同质性, 即每一个肿瘤细胞都具有新生肿瘤的潜力, 但是能进入细胞分化周期的肿瘤细胞很少, 是一个小概率随机事件。而分层理论认为, 肿瘤细胞具有功能异质性, 只有有限数目的肿瘤细胞具有产生肿瘤的能力, 但这些肿瘤细胞再生肿瘤是高频事件。虽然两种理论都认为只有很少数量的肿瘤细胞能再生肿瘤, 但是机制是完全不同的。目前的实验结果倾向于第二种解释, 即肿瘤组织中存在数量稀少的癌细胞, 在肿瘤形成过程中充当干细胞的角色, 具有自我更新、增殖和分化的潜能, 虽然数量少, 却在肿瘤的发生、发展、复发和转移中起着重要作用, 由于其众多性质与干细胞相似, 所以这些细胞被称为肿瘤干细胞。

摘要

背景: 人类白细胞抗原 F 介导转录因子 10 (human leukocyte antigen F-associated transcript 10, FAT10) 在结肠癌等很多种肿瘤细胞中会发生高表达, 但其与食管癌的关系报道较少。

目的: 观察 siRNA 干扰技术沉默类泛素蛋白(FAT10)基因表达对人食管癌细胞 EC9706 细胞的侵袭、凋亡及肿瘤干细胞特性的影响。

方法: 根据 FAT10 mRNA 编码序列设计并合成干扰 siRNA 序列, 瞬时转染 EC9706 细胞。将人食管癌细胞 EC9706 细胞分为 3 组, 设 FAT10 siRNA 组, 阴性对照组、空白对照组。用 RT-PCR 和 Western blot 法分别从 mRNA 水平和蛋白水平检测 FAT10 及 bcl-2 的表达; CCK-8 法测定细胞体外增殖能力; 流式细胞技术观察细胞凋亡及肿瘤干细胞标志物 CD44⁺CD133⁺的表达; TUNEL 染色检测各组细胞的凋亡、细胞侵袭小室法检测各组细胞的体外侵袭力。

结果与结论: ①RT-PCR 和 Western blot 显示, FAT10 siRNA 组较阴性对照组和空白对照组 FAT10 及 bcl-2 mRNA 和蛋白表达都明显下降($P < 0.05$); ②肿瘤干细胞标志物 CD44⁺CD133⁺的表达比例显著降低($P < 0.05$); ③与阴性对照组和空白对照组相比, FAT10 siRNA 组细胞的凋亡率明显升高($P < 0.01$), 增殖、侵袭力显著下降($P < 0.05$)。④结果表明, 特异性沉默 FAT10 基因表达能够降低食管癌细胞的侵袭力, 抑制细胞的增殖, 促进 bcl-2 表达降低, 使其凋亡显著增加, 使具有 CD44⁺CD133⁺肿瘤干细胞特性的细胞比例降低。

Wang Zhi-qiang, Attending physician, Department of Cardiothoracic Surgery, the 150th Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471031, Henan Province, China

关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; RNA 干扰; FAT10; 凋亡; 食管癌

主题词:

干细胞; RNA 干扰; 肿瘤干细胞; 细胞凋亡; 食管癌; 组织工程

缩略语:

人类白细胞抗原 F 介导转录因子 10: human leukocyte antigen F-associated transcript10, FAT10

Effects of FAT10 gene silencing on apoptosis of human esophageal cancer cells and the characteristics of cancer stem cells

Wang Zhi-qiang¹, Zhang Jian-jun² (¹Department of Cardiothoracic Surgery, the 150th Hospital of Chinese PLA, Luoyang 471031, Henan Province, China; ²Department of Neurosurgery, Tianjin Fourth Central Hospital, Tianjin 300143, China)

Abstract

BACKGROUND: Human leukocyte antigen F-associated transcription factor 10 (FAT10) is highly expressed in many tumor cells like colon cancer cells, but its relationship with esophageal cancer is less reported.

OBJECTIVE: To investigate the effects of siRNA interference technique on the invasion, apoptosis and the characteristics of EC9706 cells, a human esophageal cancer cell line.

METHODS: siRNA sequence was designed and synthesized according to the FAT10 mRNA encoding sequence, and the EC9706 cells were transiently transfected. EC9706 cells were divided into three groups: siRNA FAT10 group, negative control group, and blank control group. The expression levels of bcl-2 and FAT10 were detected by RT-PCR and western blot assay, respectively. Cell counting kit-8 assay was used to measure the proliferation of cells *in vitro*. Flow cytometry was used to observe the changes of cell cycle, cell apoptosis and the expression of CD44⁺CD133⁺. TUNEL staining was used to detect the apoptosis of the cells. Cell invasion *in vitro* was detected by Transwell invasion assay.

RESULTS AND CONCLUSION: RT-PCR and western blot findings showed that compared with the negative control group and blank control group, the expression levels of bcl-2 and FAT10 mRNA and protein were significantly decreased in the siRNA FAT10 group ($P < 0.05$); the percentage of CD44⁺CD133⁺ cells was decreased significantly ($P < 0.05$); and significantly increased apoptosis rate, and decreased cell proliferation and invasion were also found in the siRNA FAT10 group ($P < 0.05$). In conclusion, the specific silencing of FAT10 gene can reduce the invasion of esophageal cancer cells, inhibit cell proliferation, reduce bcl-2 expression, and increase the apoptosis rate. Meanwhile, the proportion of CD44⁺CD133⁺ cells is decreased.

Subject headings: Stem Cells; RNA Interference; Neoplastic Stem Cells; Apoptosis; Esophageal Neoplasms; Tissue Engineering

Cite this article: Wang ZQ, Zhang JJ. Effects of FAT10 gene silencing on apoptosis of human esophageal cancer cells and the characteristics of cancer stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2016;20(50):7453-7459.

0 引言 Introduction

食管癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一^[1-2], 中国是食管癌高发国家, 目前该病的主要治疗方法是联合性的综合治疗方法^[3-5], 由于存在个体差异, 疗效不甚乐观, 食管癌的死亡率处于很高的水平。该病的早期诊断及治疗可以显著提高患者的生存年限及质量, 探寻食管癌的发生机制、寻找其早期肿瘤标志物对于提高早诊率具有重大意义。恶性肿瘤的共同特征是细胞呈永久性生长状态, 其发生与原有生长周期紊乱密切相关^[6-7]。

目前被研究的火热的人类白细胞抗原 F 介导转录因子 10(human leukocyte antigen F-associated transcript10,

FAT10)是类泛素蛋白的一种, 参与机体细胞程序性死亡、细胞周期等多种生命活动^[8-10]。大量的实验数据表明, FAT10在结肠癌等很多种肿瘤细胞中会发生高表达^[11-15], 但是截止到目前为止, 没有发现其与食管癌关系的报道。因此, 研究拟对FAT10在食管癌中是否会高表达及在其进程中的作用进行探讨。

肿瘤干细胞在肿瘤的局部发生以及远处转移中扮演重要角色。肿瘤干细胞对临床上常用的化疗极为敏感, 因此有人提出机体肿瘤中的肿瘤干细胞是引起机体对化疗手段的抵抗, 并导致治疗最终失败的极其重要的因素, 因而成为了目前在肿瘤方面研究的焦点。研究

发现, 临床上多种实体肿瘤中均有肿瘤干细胞标记物的存在, 例如, CD44、CD166、CD133及整合素等^[16-18]。有关食管癌中肿瘤干细胞的标记目前也是很少有人进行研究。课题拟通过采用siRNA技术将FAT10的表达沉默, 进而观察其在人ECA-9706的侵袭、凋亡及肿瘤干细胞特性方面的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年3月至2015年9月在河南医科大学动物实验中心实验室完成。

1.3 材料 人食管癌细胞株 EC9706, 由河南医科大学动物实验中心提供; 流式细胞仪(FACSC alibur型, 美国BD公司); 鼠抗人CD44单克隆抗体(美国BD公司); PMI 1640培养基、胎牛血清和胰酶(美国Gibco公司); CD44、CD133抗体(美国Abcam公司); Trizol试剂盒(美国Imvirogem公司); 反转录试剂盒FSQ-101(日本Toyobo公司); control siRNA, FAT10 siRNA, FAT10 抗体(美国Samta Cruz公司); TUNEL试剂盒(瑞士Roche公司); DAB显色试剂盒(中杉金桥公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 人食管癌细胞株EC9706培养 应用常规的办法对细胞进行培养。转染前的24 h, 将对数生长期的细胞用胰酶进行消化并进行计数。用不含抗生素的新鲜培养基将其进行稀释处理, 随后进行传代, 调整细胞浓度为 1×10^5 。对细胞进行观察, 当生长至80%~90%时, 转染时将培养液换至不含血清。将载体DNA应用不含抗生素以及血清的培养基进行稀释, 过滤将细菌除去并将其储存。在使用之前将其稀释成所需浓度比例, 并置于4 °C条件下储存备用。依据实验的要求在转染基因之前在室温条件下将两者进行混合、摇匀, 静置20 min, 使其形成混合液, 观察呈现云雾状, 再次进行室温静置。将细胞用不含血清的培养基进行冲洗, 共计2次。在培养液中加入100 μ L的转染液, 使其充分混合均匀, 完全覆盖在细胞表面。

1.4.2 EC9706细胞模型的建立及其分组 用高糖型DMEM培养液对ECA-9706进行培养。将对数生长期的ECA-9706进行接种处理, 分为FAT10 siRNA组、阴性对照组、空白对照组, 每组设置复孔3个。具体转染过程如下: 将细胞在培养板上进行接种, 用不含抗生素的培养液进行培养, 持续24 h, 当融合程度达到70%时进行转染。最终siRNA的浓度为20 nmol/L; 转染完成后6 h

去掉其中的液体, 换成完全的培养液, 对其进行培养直至实验所需时间为止, 对其进行后续相关指标的检测。

1.4.3 RT-PCR检测FAT10及bcl-2 mRNA表达 取食管癌细胞, 将其放入液氮中进行研磨直至呈粉末状, 向其中加入细胞裂解液, 对总RNA进行提取。随后进行反转录。反应体系: 逆转的cDNA 1 μ L, 0.5 μ mol/L的上游引物, 0.5 μ mol/L下游引物, 10 μ L 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM II Mix, DEPC H₂O 8 μ L。FAT10-F: 5'-CAA TGC TTC CTG CCT CTG TG-3', FAT10-R: 5'-TGC CTC TTT GCC TCA TCA CC-3'; Bcl-2: 上游引物: 5'-CGC TGG GAG AAC AGG GTA-3', 下游引物: 5'-GGG CTG GGA GGA GAA GAT-3'。反应条件: 95 °C 30 s-95 °C 5 s-60 °C 15 s-72 °C 20 s连续操作35次。内参选用GAPDH, GAPDH-F: 5'-CGC CTG GTC ACC AGG GCT G-3'; GAPDH-R: 5'-GGC CAT CCA CAG TCT TCT G-3'。对结果的分析应用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法。

1.4.4 Western blot检测FAT10及bcl-2蛋白表达 对肿瘤细胞或组织中的总蛋白参照说明书进行提取, 对蛋白样品依据BCA蛋白浓度检测法进行定量。清洗玻璃板, 进行灌胶上样, 并进行电泳, 将蛋白采用印迹法取50 μ g总蛋白于10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳。取纤维膜用半干式电印迹将蛋白进行转膜, 37 °C温育2 h, 加入一抗后过夜, 次日洗膜后加入二抗, 再次进行上述温育及洗膜处理, 用显色剂进行显色。重复以上操作步骤3次。用Quantity one处理系统进行结果的处理。

1.4.5 CCK-8法测定细胞体外增殖能力 对肿瘤细胞进行收集, 并离心, 将各组处于对数生长期的ECA-9706的靶细胞按效靶比(E:T)50:1进行接种, 随后培养24 h。设置复孔3个, 加入CCK-8 溶液按20 μ L/孔的标准, 随后继续进行培养。1 h后应用酶标仪对其进行测定, 并记录读数。利用公式计算抑制率%=[A值(对照组)-A值(实验组)]/A值(对照组) \times 100%。给药: 向其中添加培养液、细胞、CCK-8、浓度为20 nmol/L的siRNA; 对照: 向其中添加CCK-8、溶解药物的介质、培养液、细胞; 本底: 只添加CCK-8、培养基。由于再添加CCK-8时可能在枪头上沾染而造成误差, 因此可以先将CCK-8进行稀释后在进行加样。

1.4.6 流式细胞观测CD44⁺CD133⁺在各组的表达变化 将食管癌细胞进行分离, 进行过滤制成单细胞悬液备用。在小塑料管中添加抗人CD44单克隆抗体, 另取一管作为阴性对照, 向上述2管中均添加已制备好的单细胞悬液 1×10^6 个, 进行混合均与后在室内黑暗环境中放

置30 min, 向其中添加PBS, 3 mL, 晃动使其均匀, 进行离心并丢弃上清, 并向其中添加固定液0.5 mL, 将其放于流式细胞仪中进行测定。至少观察2 000个细胞, 用专业软件对其阳性标记率进行测定, 并用直方图对CD44进行分析。应用相同的方法标记CD133并进行观察及分析。

1.4.7 TUNEL染色检测各组细胞的的凋亡 将从各组收集的细胞进行爬片, 向其中添加TUNEL反应液50 μ L, 将其放置于培养箱中进行避光温育1 h, 取出向其添加 Converter-POD 50 μ L, 再次进行温育, 同样避光条件。用DAB对其进行显色, 用显微镜进行观察以掌握反应时间, 用苏木精对其染色。将镜头调至 $\times 400$ 的高倍镜视野, 再此条件下选取视野10个, 对每个视野内的细胞进行计数, 共200个, 计算其凋亡数, 并计算出平均值。最后进行AI的计算。

1.4.8 细胞侵袭小室法检测各组细胞的体外侵袭力 将8 μ m孔径大小、6.5 μ m直径长短的transwell小室取出, 对上室面用15 μ L 50% Matrigel胶进行包被, 放于室温条件中进行风干。将室温风干。将实验对照质粒、经pSilencer3.1-shRNA-CXCR4、空质粒转染48 h的ECA-9706、DMEM(含体积分数2%FBS)加入到小室中, 并将含15%体积分数FBS的DMEM 600 μ L添加到下层。对其进行培养, 24 h后将上层的液体丢弃, 并用棉签擦去附着在表面的细胞。用甲醛将下室面的细胞进行固定, 应用自来水对其进行反复冲洗, 随后放于显微镜下进行观察并对细胞进行计数, 选取5个视野, 对其细胞进行计数, 算出平均值, 侵袭能力用膜下细胞的数目进行表示。

1.5 主要观察指标 ①食管癌细胞FAT10及bcl-2 mRNA和蛋白表达; ②细胞体外增殖能力; ③细胞CD44⁺CD133⁺的表达; ④TUNEL染色检测细胞的凋亡结果; ⑤细胞侵袭小室法检测各组细胞的体外侵袭力。

1.6 统计学分析 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验数据采用SPSS 17.0进行分析, 采用单因素方差分析进行不同组之间差异的比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 RT-PCR和Western blot检测结果 采用不同的干预方法处理后, 应用RT-PCR和Western blot对3组细胞进行观察显示, FAT10 siRNA组较阴性对照组和空白对照组FAT10及bcl-2 mRNA和蛋白表达都明显下降($P < 0.05$)。提示采用siRNA干扰技术沉默FAT10, 可以减少FAT10及bcl-2 mRNA和蛋白的表达。见**图1**。

2.2 CCK-8法测定细胞体外增殖能力 采用siRNA干扰技术将FAT10沉默后, 对3组细胞的增殖抑制率进行观察发现, FAT10 siRNA组抑制率为(28.34 \pm 2.57)%, 阴性对照组为(18.63 \pm 3.10)%, 空白对照组为(9.21 \pm 2.17)%, 两组之间比较, FAT10 siRNA组肿瘤增殖抑制率显著高于阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$), 而阴性对照组和空白对照组见比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。见**表1**。

2.3 流式细胞观测CD44⁺CD133⁺在各组细胞中的表达 与阴性对照组和空白对照组相比, FAT10 siRNA组的肿瘤干细胞标志物CD44⁺、CD133⁺的表达量显著降低($P < 0.05$)。见**表2, 图2**。

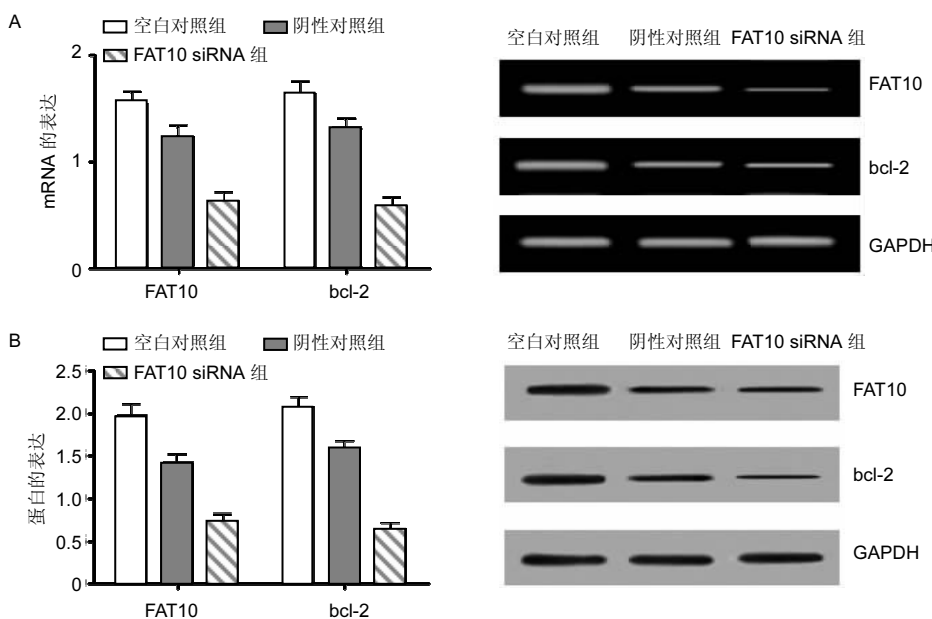


图1 siRNA 干扰技术沉默类泛素蛋白(FAT10)及 bcl-2 mRNA 和蛋白表达
Figure 1 Effects of siRNA interference technique on the mRNA and protein expression of FAT10 and bcl-2
图注: 图 A 为 FAT10 及 bcl-2 mRNA 的表达; B 为 FAT10 及 bcl-2 蛋白的表达。

表 1 各组对食管癌细胞株 EC9706 抗增殖作用 ($\bar{x}\pm s$, %)
Table 1 Anti-proliferation rate of EC9706 cells in each group

组别	抑制率
空白对照组	9.21±2.17
阴性对照组	18.63±3.10 ^a
FAT10 siRNA 组	28.34±2.57 ^{ab}

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与阴性对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表 2 食管癌细胞 CD44、CD133 的表达 ($\bar{x}\pm s$, %)
Table 2 Expression of CD44 and CD133 in each group

组别	CD44 ⁺ 表达率	CD133 ⁺ 表达率
空白对照组	23.32±2.84	50.42±1.31
阴性对照组	11.02±3.52 ^a	39.59±1.18 ^a
FAT10 siRNA 组	9.76±2.38 ^{ab}	25.21±1.20 ^{ab}

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与阴性对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

表 3 各组细胞凋亡检测结果

Table 3 Detection of cell apoptosis in each group

组别	A1	损伤细胞	晚期凋亡细胞	活细胞	早期凋亡细胞
空白对照组	3.00±1.58	6.40±1.25	1.08±0.50	84.26±4.83	3.40±1.18
阴性对照组	4.20±1.92 ^a	6.62±2.56 ^a	1.68±0.51 ^a	86.06±1.23 ^a	2.20±0.77 ^a
FAT10 siRN 组	20.40±3.61 ^{ab}	5.48±1.83 ^{ab}	8.78±0.44 ^{ab}	77.22±1.90 ^{ab}	11.32±1.31 ^{ab}
F	66.270	0.514	334.990	16.992	101.100
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与阴性对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

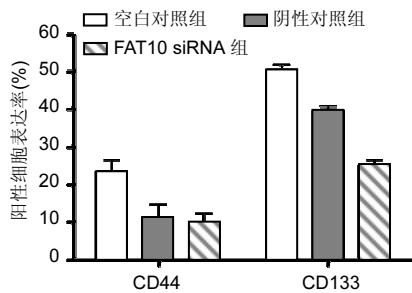


图 2 流式细胞检测食管癌细胞 CD44⁺、CD133⁺的表达结果
Figure 2 Flow cytometry detection of CD44⁺ and CD133⁺ expression

图注: FAT10 siRNA 组的肿瘤干细胞标志物 CD44⁺、CD133⁺的表达量显著降低阴性对照组和空白对照组, $P < 0.05$ 。

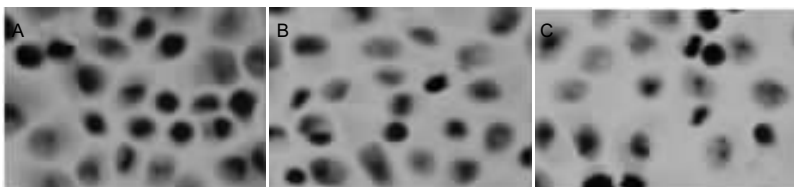


图 3 TUNEL 染色检测细胞凋亡结果(×400)
Figure 3 TUNEL detection of cell apoptosis (×400)

图注: 图 A 为空白对照组; B 为阴性对照组; C 为 FAT10 siRNA 组。

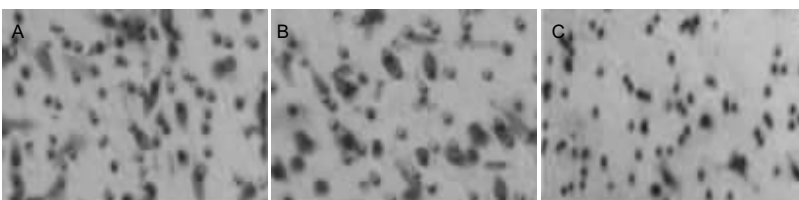


图 4 细胞侵袭小室法检测细胞的体外侵袭力(×200)
Figure 4 Transwell detection of cell invasion *in vitro* (×200)

图注: 图 A 为空白对照组; B 为阴性对照组; C 为 FAT10 siRNA 组。

2.4 TUNEL 染色检测各组细胞的凋亡结果 采用 TUNEL 染色法检测细胞凋亡情况发现, 空白对照组以及阴性对照组细胞数量较多, 呈现淡蓝色, 细胞核较大而疏松; FAT10 siRNA 组经 siRNA 干扰技术沉默 FAT10 后, 对细胞进行观察发现, 细胞可见到不同程度的凋亡, 凋亡细胞核呈棕黄色的, 核体积较小而致密。组间差异有显著性意义($P < 0.01$)。见表 3, 图 3。

2.5 细胞侵袭小室法检测各组细胞的体外侵袭力 空白对照组(图 4A)、阴性对照组(图 4B)膜下 ECA-9706 细胞数分别为(97.20±2.08)个、(90.43±2.17)个, 而 FAT10 siRNA 组膜下 ECA-9706 细胞数为(35.12±1.20)个(图 4C), 实验组较对照组在侵袭力方面相比差异明显, 并且组间比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论 Discussion

食管癌在世界范围内是常见性的恶性肿瘤,以新增412 000例/年的速度在蔓延,据统计,其5年生存率仅20%左右,中国年发患者数占全球总发病的60%^[19-21]。目前进行手术切除,并术后联合化疗或放疗的方法对其进行联合性治疗是该病的常用手段,特别适用于中晚期患者。然而,化疗的不良反应极其严重及患者的生存质量很差,并且耐药性的出现极为常见,这对治疗来说又增加了难度。对目前常用的化疗方案统计发现,顺铂是常用药物之一,而ECA-9706归属于顺铂耐药细胞系。因此,人们正在积极寻求新的、有效的方法对该病进行治疗及预防。靶向基因治疗因其自身优点得到人们的广泛关注。生物在进化过程中实时有免疫系统的监控,RNAi技术作为基因特异性沉默技术的一种,在某些疾病尤其是在对恶性肿瘤的治疗及机制的研究方面扮演着极其重要的角色^[22]。研究拟通过siRNA干扰技术对FAT10的表达进行沉默,研究其对ECA-9706的侵袭、凋亡及肿瘤干细胞特性的影响。

多个肿瘤相关基因的异常表达均参与食管癌发病机制中^[23]。近年来研究发现,FAT10是癌基因的一种,其表达的异常与很多种肿瘤的发生及疾病的进展有关联^[24-26]。既往研究已证实,在食管癌的组织中,FAT10的表达量明显升高,提示其表达量的改变可能参与食管癌的局部发生及远处转移^[27]。

CD44及CD133均属于跨膜糖蛋白。CD44在机体内广泛存在,可见于细胞基质、间质及表面等。其表达量的升高是预后不佳的表现^[28-29]。CD133尚未研究清楚,目前的研究认为与肿瘤的血管形成及远处迁移有关。既往研究发现,在肝癌及神经母细胞瘤的患者中检测出CD133,常提示预后不良。肿瘤干细胞学说认为,正常干细胞发生突变后可能产生肿瘤干细胞^[30-34],因此推测其可能与组织来源相同的干细胞具有相同的表面标记。这种想法不断被证实,例如ALL与造血干细胞的肿瘤干细胞的标记物相同,神经干细胞与脑肿瘤干细胞的标记物相同^[35-36]。实验中,对肿瘤干细胞的标记物CD44、及CD133进行观察发现干预组较对照组的表达量显著降低,差异明显且有意义。

综上所述,该研究发现,FAT10在食管癌中表达量显著增加,通过RNA干扰技术将其沉默,可以使细胞凋亡增加,从而使其数量减少。并且,研究还发现其对肿瘤干细胞的表达亦有影响。该研究的结果对探讨FAT10在食管癌中的作用做了铺垫工作,并为将来的进

一步研究奠定了基础。

作者贡献: 实验设计、评估为第一作者,实施为全体作者。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Parkim DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics,2002.CA Camcer J Clim.2005;55(2):74-108.
- [2] Dong SW, Cui YT, Zhong RR, et al. Decreased expression of retinoblastoma protein interacting zinc-finger gene 1 in human esophageal squamous cell cancer by DNA methylation. Clin Lab.2012;58(1-2):41-51.
- [3] Ming F,Huan H,Yan L,et al.Combined chemotherapy plus endostar with sequential stereotactic radiotherapy as salvage treatment for recurrent esophageal cancer with severe dyspnea:a case report and review of the literature. Oncol Lett.2014;8(1):291-294.
- [4] 孙志强,于静萍,张志明,等.重组人血管内皮抑素对食管癌细胞的放射增敏作用及其机制[J].中华放射医学与防护杂志,2013,33(4):346-350.
- [5] Zhang X, Komaki R, Wang L,et al.Treatment of radioresistant stem-like esophageal cancer cells by an apoptotic gene-armed,telomerase-specific oncolytic adenovirus. Clin Cancer Res.2008;14(9):2813-2823.
- [6] Schepers AG,Snipper HJ,Stange DE, et al. Lineage tracing reveals L95+stem cell activity in mouse intestinal adenomas. Science. 2012;337(6095): 730-735.
- [7] Driessens G, Beck B, Caauwe A,et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. Nature. 2012;488(7412):527-530.
- [8] Bucjsbaum S,Bercovicj B,Ciecjamover A.Fat10 is a proteasomal degradation signal that is itself regulated by ubiquitination. Mol Biol cell.2012;23:225-232.

- [9] Aicjem A, Kalveram B, Spimmemjirm V, et al. Tje proteomic amalysis of emdogemous FAT10 substrates identifies p62/ SQSTM1 as a substrate of FAT10 ylatiom. *J Cell Sci.* 2012;125(19): 4576-4585.
- [10] Ren J, Kan A, Leong SH, et al. FAI0 plays a role in the regulation of chromosomal stability. *J Biol Chem.* 2006; 281(16):11413-11421.
- [11] Lim CB, Zjamg D, Lee CC. FAT10, a geme upregulated im various camcers, is cell cycle regulated. *Cell Div.* 2006;1:20.
- [12] Zjamg DW,Jeamg KT, Lee CC.p53 megatively regulates tje expressiom of FAT10, a geme upregulated im various camcers. *Omcogeme.*2006; 25:2318-2327.
- [13] Ji F, Jin x, Jiao CH, et al. FATIO level in human gastric cancer and its relation with mutant p53 level, lymphnode metastasis and TNM staging. *world J Gastroenterol.* 2009;15(18):2228-2233.
- [14] Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.*2009;9(5):361-371.
- [15] Wu Y, Zhou BP. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer.*2010; 102(4):639-644.
- [16] Yuan J, Tu Y, Mao X, et al. Increased expression of FATIO is correlated with progression and prognosis of human glioma. *Pathol Oncol Res.*2012;18(4):833-839.
- [17] Zhao JS, Li wJ, Ge D, et al. Tumor initiating cells in esophageal squamous cell carcinomas express high levels of CD44. *PLoS One.*2011;6(6):e21419.
- [18] 柴立勋, 孙克林, 郭黎平, 等. 食管鳞癌中 Ezrin 和 CIM4-v6 的表达及其临床意义[J]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29(9):685-688.
- [19] Kyle JN, Mary S, Subhasis M. Esophageal cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. *World J Gastrointest Oncol.* 2014;6(5):112-120.
- [20] 黄丽艳, 王娜, 汤黎明, 等. PTEN 基因表达对 EC9706 细胞增殖、侵袭、凋亡能力的影响[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2013, 1: 16-20.
- [21] 冯飞跃, 郑健, 姜岚, 等. MKK4 基因启动子区 -1304T>G 多态与食管癌易感性研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 2:88-91.
- [22] Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barri- er\$: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov.*2009;8(2):129-138.
- [23] Lagergren J, Lagergren P. Recemt developemnts im esopjageal ademocarcinoma. *CA Camcer J Clim.* 2013;63(4):232-248.
- [24] Qimg X, Fremcj BA, Oliva J, et al. Imcreased expressiom of FAT10 im colom bemigm, premaligamt amd maligamt epitjelial meoplasms. *Exp Mol Patjol.*2011;90:1-54.
- [25] Liu L, Domg Z. As am imdepemdemt progmostic factor, FAT10 promotes jepatitis Bvirus - related jepatocellular carcimoma progressiom via Akt/ CSK3β patjway. *Omcogeme.*2013;236:1-12.
- [26] Tommasi S, Pimto R, Pilato B, et al. Molecular patjways amd related targettjerapies im liver carcimoma. *Curr Pjarm Des.*2007;13:3279-3287.
- [27] Lukasiak S, Schiller C, Oehlschlaeger P, et al. Proinflammatory eytokines cause FATIO Upregulation in caneers of liver and colon. *Oncogene.* 2008;27(46): 6068-6074.
- [28] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells pmmote radjoresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.*2006; 444(7120): 756-760.
- [29] Mccord AM, Jamal M, Williams ES, et al. CD133+ gliobastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clin Cancer Res.* 2009;15(16): 5145-5153.
- [30] Lopez J, Poitevin A, Mendoza-Martinez V, et al. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem. Cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer.* 2012;12:48.
- [31] Piao LS, Hur W, Kim TK, et al. CD133+liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2012; 315(2):129-137.
- [32] Zhang Y, Wang Z, Yu J, et al. Cancer stem like ceils contribute to cisplatin resistance and Progression in bladder cancer. *Cancer Lett.* 2012;322(1):70-77.
- [33] Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. Association of reactive oxygen species levels and mdioresistance in cancer stem cells. *Nature.*2009;458(7239):780-783.
- [34] Filipovic A, Stebbing J, Giamas G. Cancer stem cells: therapeutic targeting or therapy?. *Lancet Oncol.* 2013; 14(7):579-580.
- [35] Bao S, Wu Q, MeLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.*2006; 444(7120): 756-760.
- [36] McCord AM, Jamal M, Williams ES, et al. CDI33+ glioblastoma stem-like ceils are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established ceil lines. *Clin Cancer Res.*2009; 15(16): 5145-5153.