

LncRNA ESCCAL_1 对食管鳞状细胞癌免疫原性细胞死亡的影响

吕朋举, 韩鹏黎, 龚芬芬, 崔渊博, 曹巍

(郑州大学附属郑州中心医院转化医学中心, 河南 郑州 450007)

摘要: [目的] 探讨 LncRNA ESCCAL_1 对食管鳞状细胞癌免疫原性细胞死亡的影响。[方法] 分别将食管鳞状细胞癌细胞株 KYSE450、KYSE70 分为 shNC 组和 shESCCAL_1 组。采用慢病毒介导的 RNA 干扰技术, 敲减 KYSE450、KYSE70 细胞 LncRNA ESCCAL_1 后, 采用流式细胞术检测钙网蛋白和细胞凋亡; 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测细胞上清中高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 及 ATP 含量。敲减 ESCCAL_1 的 KYSE450、KYSE70 细胞与 DC 细胞共培养后, 流式细胞术检测 DC 细胞表面标记 CD86 和 CD1a 的表达。[结果] KYSE450、KYSE70 细胞敲减 ESCCAL_1 后, 与 shNC 相比, shESCCAL_1 组细胞钙网蛋白阳性表达均明显升高 ($t=21.96$ 、 31.11 , P 均 <0.001), KYSE450 和 KYSE70 细胞中 shESCCAL_1 组细胞凋亡增加 ($t=18.37$ 、 5.16 , P 均 <0.01)。在 KYSE450 和 KYSE70 细胞中, 与 shNC 组相比, 敲减 ESCCAL_1 组 ATP 释放明显增加 ($t=23.24$ 、 23.86 , P 均 <0.01), HMGB1 含量明显升高 ($t=48.69$ 、 49.97 , P 均 <0.001)。KYSE450 细胞 shESCCAL_1 组共培养的 DC 表面 CD86 和 CD1a 表达显著性增加 ($t=45.88$ 、 29.45 , P 均 <0.001), KYSE70 细胞 shESCCAL_1 组共培养的 DC 表面 CD86 和 CD1a 表达增加, 差异有统计学意义 ($t=32.45$ 、 37.41 , P 均 <0.001)。[结论] 敲减 LncRNA ESCCAL_1 可以促进食管鳞状细胞癌的免疫原性细胞死亡。

关键词: 食管鳞状细胞癌; LncRNA ESCCAL_1; 免疫原性细胞死亡

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2023)03-0216-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2023.03.B008

Effects of LncRNA ESCCAL_1 on Immunogenic Cell Death of Esophageal Squamous Cell Carcinoma

LYU Peng-ju, HAN Peng-li, GONG Fen-fen, CUI Yuan-bo, CAO Wei

(Translational Medical Center, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of LncRNA ESCCAL_1 on immunogenic cell death in esophageal squamous cell carcinoma. [Methods] Human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) KYSE450 and KYSE70 cells were transfected with shNC or shESCCAL_1. After knocking down of ESCCAL_1 expression, the expression of cellular calreticulin (CRT) and cell apoptosis were detected by flow cytometry, the contents of high mobility group box 1 (HMGB1) and ATP in cell culture supernatant were measured by ELISA method. After co-culture with transfected KYSE450 and KYSE70 cells, the expression of CD1a and CD86 in dendritic cells (DC) was detected by flow cytometry. [Results] After knocking down of LncRNA ESCCAL_1 in KYSE450 and KYSE70 cells, the cell surface expression of CRT in shESCCAL_1 group was significantly higher than in that in shNC group ($t=21.96$ and 31.11 , all $P<0.001$), cell apoptosis was significantly increased ($t=18.37$ and 5.16 , all $P<0.01$). Compared with shNC groups, the contents of ATP and HMGB-1 in shESCCAL_1 group were increased significantly ($t=23.24$ and 23.86 , all $P<0.01$; $t=48.69$ and 49.97 , all $P<0.001$, respectively). Compared with shNC groups, the expression of CD86 and CD1a in DC cells co-cultured with shESCCAL_1-transfected KYSE450 and KYSE70 cells was significantly increased ($t=45.88$ and 29.45 , all $P<0.001$; $t=32.45$ and 37.41 , all $P<0.001$, respectively). [Conclusion] Down-regulated expression of LncRNA ESCCAL_1 promotes immunogenic cell death in esophageal squamous cell carcinoma cells, which indicates that LncRNA ESCCAL_1 may affect tumor immunity.

Subject words: esophageal squamous cell carcinoma; long non-coding RNA ESCCAL_1; immunogenic cell death

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (16A310018); 河南省医学科技攻关计划 (SB201903032, 2018020764); 河南省自然科学基金 (182300410374); 河南省科技攻关计划项目 (192102310096)

通信作者: 曹巍, E-mail: caoweiyu@hotmail.com

收稿日期: 2022-11-23; **修回日期:** 2023-01-11

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 5 年生存率为 15%~20%^[1]。由于其早期发病的隐匿性,临床就诊时多数患者已为晚期而失去手术治疗的机会^[2]。免疫原性细胞死亡(immunogenic cell death, ICD) 是一种特殊的细胞死亡形式,它结合了细胞凋亡、内质网应激和自噬的特征。已有报道放化疗可诱导免疫原性细胞死亡,引发 T 细胞免疫,主要由高迁移率族蛋白 B1(high mobility group B1, HMGB1)和钙网蛋白(calreticulin, CRT)介导^[3]。研究发现,钙网蛋白在肿瘤细胞、凋亡细胞、一些药物处理细胞(如蒽环类药物)的表面表达量高于正常细胞,这些细胞表面的钙网蛋白能够与一些固有免疫细胞表面的受体 CD91/LRP1 结合,如巨噬细胞、树突状细胞等免疫细胞,增强免疫系统对这些细胞的免疫应答^[4]。细胞内非编码 RNA 的改变,在人类癌细胞中也观察到了导致免疫原性细胞死亡的许多表现,例如小干扰 RNA(siRNA)介导的钙网蛋白或 HMGB1 下调^[5]。前期的研究发现, LncRNA ESCCAL_1 异常表达与食管鳞癌的发生发展密切相关^[6-8]。然而,有关 LncRNA 与肿瘤细胞免疫原性细胞死亡关系的研究鲜有报道。本研究通过改变 LncRNA ESCCAL_1 在 ESCC 细胞中的表达,探讨敲减 ESCCAL_1 是否可以引起 ESCC 免疫原性细胞死亡,进而影响 ESCC 的肿瘤免疫和清除进程。

1 材料与方法

1.1 细胞系的选择及培养

食管鳞状细胞癌细胞系 KYSE450、KYSE70 由郑州大学生命科学学院惠赠。所有细胞加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养基(HyClone, USA),置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 细胞转染

ESCCAL_1 基因敲减慢病毒载体 shRNA (shESCCAL_1) 和对照 shRNA (shRNA-NC) 购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司(吉凯, 中国)。依照产品说明书,将 shESCCAL_1 或 shRNA-NC 的慢病毒载体分别转染 KYSE450 和 KYSE70 细胞。为了评价敲减 ESCCAL_1 后引发的 ESCC 细胞的免疫效应,将细胞分为两组:shNC 组(转染 shRNA-NC 慢病毒载体细胞株)、shESCCAL_1 组(转染 shESCCAL_1

慢病毒载体细胞株)。

1.3 DC 细胞与转染细胞株共培养及表面标记鉴定

通过 Ficoll 密度梯度离心法,分离来自健康人群外周血(10 mL)中的单核细胞,铺入六孔板培养 1 h,换新鲜培养基,贴壁的即为 DC 细胞,继续培养 72 h 后,分别将 shNC 组和 shESCCAL_1 组的 KYSE450 和 KYSE70 细胞铺于 Transwell 小室内,与下层 DC 细胞共培养 72 h 后,收集下层 DC 细胞,采用流式细胞术检测 CD86 和 CD1a 表达。

1.4 流式细胞术检测钙网蛋白及细胞凋亡

收集转染的 shNC 组和 sh-ESCCAL_1 组 KYSE450 和 KYSE70 细胞,用 PBS 将细胞浓度调整为 1×10^7 个/mL,混匀后在每个流式管中加入 100 μ L 细胞悬液,每管内加入钙网蛋白一抗(Abcam, USA),室温孵育 15 min,加入 PE 标记对应二抗(BioLegend, USA),室温孵育 10 min, PBS 缓冲液洗 2 次后,流式细胞仪检测钙网蛋白表达。另消化收集细胞(包括上清中的细胞)后, PBS 洗涤 2 遍,弃去上清,加入 10 μ L Annexin V 和 5 μ L PI 震荡混匀后室温避光孵育 20 min, PBS 洗 2 遍离心后加 400 μ L 鞘液重悬,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.5 ELISA 检测 HMGB1 及 ATP 含量

将 ESCC 细胞系 KYSE450 和 KYSE70 处理的 shNC 组、shESCCAL_1 组细胞分别铺在六孔板中,待细胞长满 90% 时,每孔加入 200 μ L 裂解液充分裂解细胞, 4℃, 12 000 r/min 离心 5 min。取上清,依照 ELISA 试剂盒说明分别检测 HMGB1 及 ATP 含量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析。计量资料符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 敲减 LncRNA ESCCAL_1 促进 KYSE450 和 KYSE70 细胞表面钙网蛋白的表达及细胞凋亡

KYSE450 和 KYSE70 细胞敲减 ESCCAL_1 表达后,与对照组 shNC 相比,shESCCAL_1 组细胞钙网蛋白阳性表达均明显升高($t=21.96, 31.11, P$ 均 < 0.001) (Figure 1)。同时,敲减 ESCCAL_1 后, KYSE450 和 KYSE70 细胞中 shESCCAL_1 组细胞凋亡增加,差异

具有统计学意义($t=18.37, 5.16, P$ 均 <0.01)(Figure 1)。

2.2 敲减 ESCCAL_1 后促进 KYSE450、KYSE70 细胞 HMGB1 和 ATP 的释放

为了探讨 LncRNA ESCCAL_1 对 KYSE450、KYSE70 细胞 ATP 和 HMGB1 释放的影响,我们对 ESCCAL_1 进行敲减。ELISA 结果显示,在 KYSE450 和 KYSE70 细胞中,与 shNC 组相比,敲减 ESCCAL_1 组 ATP 释放明显增加($t=23.24, 23.86, P$ 均 <0.01)(Figure 2);HMGB1 含量明显升高,与 shNC 组相比,差异有统计学意义($t=48.69, 49.97, P$ 均 <0.001)(Figure 2)。

2.3 敲减 ESCCAL_1 的 KYSE450、KYSE70 细胞促进未成熟 DC 的成熟

为了确定敲减 ESCCAL_1 能否直接改善肿瘤细胞的免疫原性,将分离的未成熟的人树突状细胞(im-DCs)与敲减 ESCCAL_1 后的 KYSE450、KYSE70 细胞共培养,共同孵育 72 h 后,流式细胞术检测 DC 细胞表面标志物 CD86 和 CD1a 的表达。KYSE450 细胞 shESCCAL_1 组共培养的 DC 细胞表面 CD86

和 CD1a 表达显著性增加($t=45.88, 29.45, P$ 均 <0.001)(Figure 3),KYSE70 细胞 shESCCAL_1 组共培养的 DC 表面 CD86 和 CD1a 表达增加,差异有统计学意义($t=32.45, 37.41, P$ 均 <0.001)(Figure 3)。

3 讨论

肿瘤细胞发生免疫原性细胞死亡时,一系列信号分子和细胞因子参与其中,包括细胞膜表面信号分子表达水平的改变,促进免疫效应因子的合成与释放,此类物质被称为损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs),这其中关键的损伤相关模式分子包括钙网蛋白、ATP、HMGB1 等^[9-10]。Cao 等^[11]报道,敲减人骨肉瘤细胞 U2OS 中 LncRNA-RB1 后使钙网蛋白表达降低,损害钙网蛋白的膜易位,从而抑制巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬。我们的实验结果表明,与对照组相比,敲减 ESCCAL_1 的食管鳞状细胞癌细胞系 KYSE450、KYSE70 显示钙网蛋白高表达, HMGB1 和 ATP 释放也显著性升高,表明

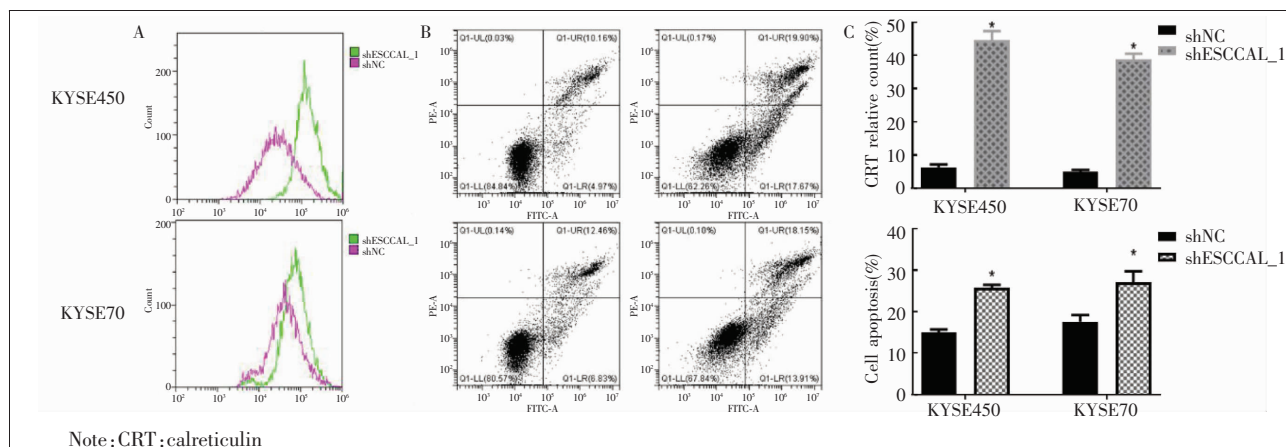


Figure 1 Knock down of ESCCAL_1 promotes calreticulin positive expression and cell apoptosis

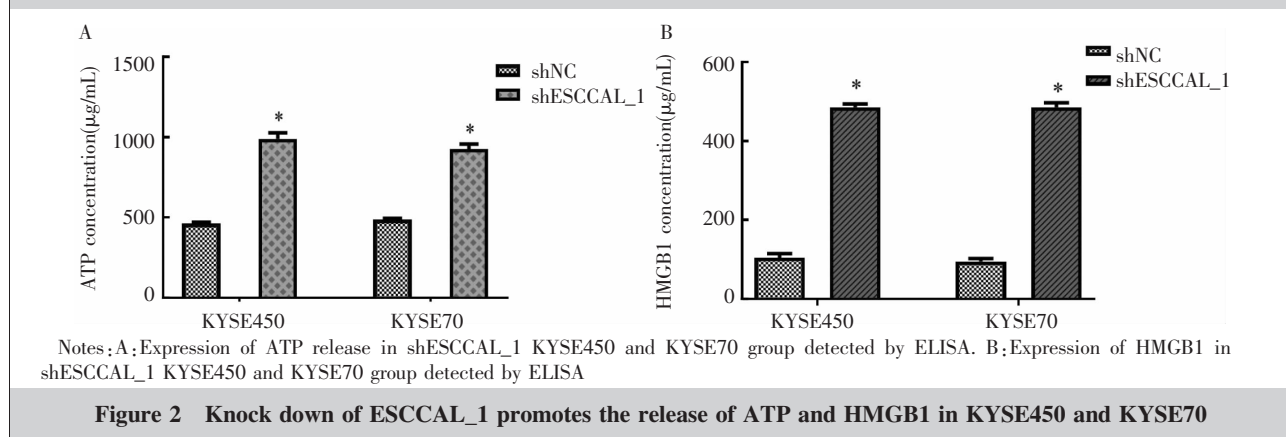
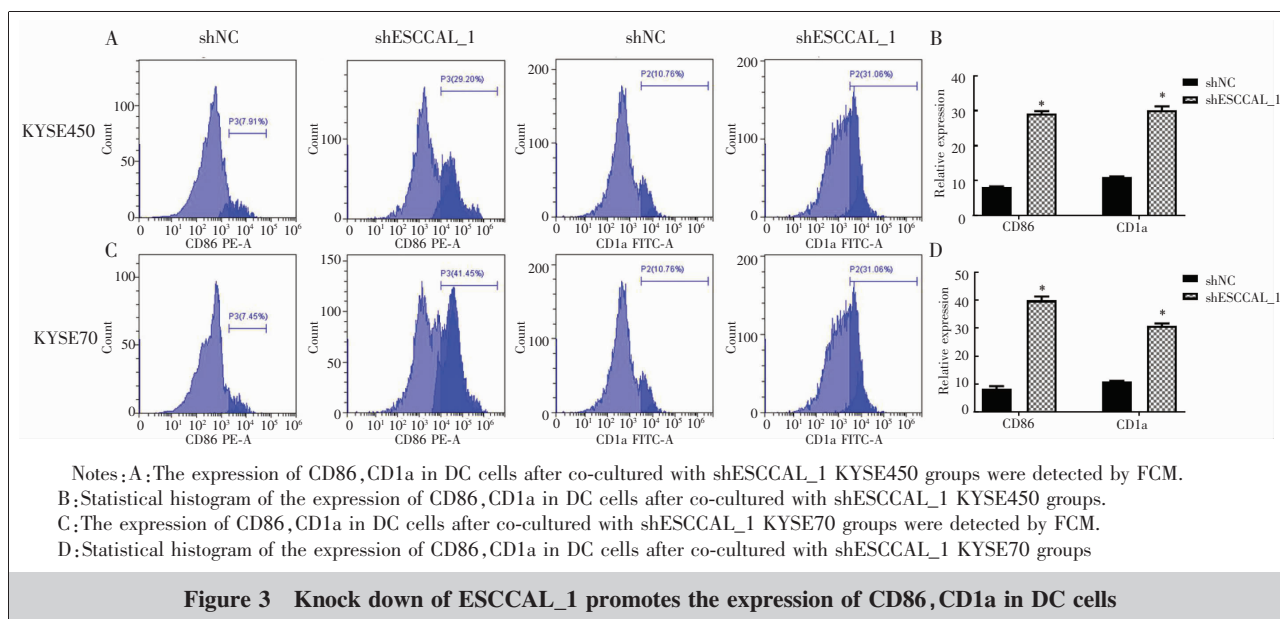


Figure 2 Knock down of ESCCAL_1 promotes the release of ATP and HMGB1 in KYSE450 and KYSE70



敲减 LncRNA ESCCAL_1 可能引起食管癌细胞的免疫原性细胞死亡;与 DC 共培养的结果显示,shESCCAL_1 细胞组可以促进 DC 细胞的成熟。我们的前期研究发现^[3,5,12],在切除的食管癌组织中,ESCCAL_1 表达升高,而正常组织中 ESCCAL_1 低表达,促进癌细胞的增殖,抑制细胞凋亡。ESCCAL_1 在食管癌细胞中敲减表达后引起细胞的免疫原性细胞死亡,这可能是由于这些损伤相关分子模式(DAMPs)(钙网蛋白的表达、HMGB1 和 ATP 释放)诱导 DC 成熟,提高 DC 的识别呈递能力,增加肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞的数量,反过来局部激活肿瘤免疫死亡、提高杀伤肿瘤的作用^[13]。

总之,敲减 LncRNA ESCCAL_1 可以促进食管癌细胞的免疫原性细胞死亡,诱导 DC 成熟。本研究不仅为 LncRNA 作为肿瘤免疫原性细胞死亡的调节因子提供了新的机制,还为抗肿瘤免疫新药物的开发以及新的免疫疗法打开了一个新视野。

参考文献:

- [1] Yang J, Liu X, Cao S, et al. Understanding esophageal cancer: the challenges and opportunities for the next decade[J]. Front Oncol, 2020, 10: 1727.
- [2] Watanabe M, Otake R, Kozuki R, et al. Recent progress in multidisciplinary treatment for patients with esophageal cancer[J]. Surg Today, 2020, 50(1): 12–20.
- [3] Aoto K, Mimura K, Okoyama H, et al. Immunogenic tumor cell death induced by chemotherapy in patients with breast cancer and esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2018, 39(1): 151–159.

- [4] Kroemer G, Galassi C, Zitvogel L, et al. Immunogenic cell stress and death[J]. Nat Immunol, 2022, 23(4): 487–500.
- [5] Galluzzi L, Vitale I, Warren S, et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death[J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(1): e000337.
- [6] Cao W, Wu W, Shi F, et al. Integrated analysis of long non-coding RNA and coding RNA expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Genomics, 2013, 2013: 480534.
- [7] Liu J, Mayekar MK, Wu W, et al. Long non-coding RNA ESCCAL_1 promotes esophageal squamous cell carcinoma by down regulating the negative regulator of APOBEC3G [J]. Cancer Lett, 2020, 493: 217–227.
- [8] Cui Y, Yan M, Wu W, et al. ESCCAL_1 promotes cell-cycle progression by interacting with and stabilizing galectin-1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. NPJ Precis Oncol, 2022, 6(1): 12.
- [9] Schaer DA, Geeganage S, Amaladas N, et al. The folate pathway inhibitor pemetrexed pleiotropically enhances effects of cancer immunotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(23): 7175–7188.
- [10] Musahl AS, Huang X, Rusakiewicz S, et al. A long non-coding RNA links calreticulin-mediated immunogenic cell removal to RB1 transcription[J]. Oncogene, 2015, 34(39): 5046–5054.
- [11] Cao W, Lee HY, Wu W, et al. Multi-faceted epigenetic dysregulation of gene expression promotes esophageal squamous cell carcinoma[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 3675.
- [12] Sethuraman SN, Singh MP, Patil G, et al. Novel calreticulin-nano-particle in combination with focused ultrasound induces immunogenic cell death in melanoma to enhance antitumor immunity[J]. Theranostics, 2020, 10(8): 3397–3412.
- [13] Rapoport BL, Anderson R, Rapoport BL, et al. Realizing the clinical potential of immunogenic cell death in cancer chemotherapy and radiotherapy[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4): 959.