

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002441

miR-30-5p 在食管癌中的表达及对食管癌细胞增殖和迁移的影响

诸葛雪朋¹, 王保收¹, 刘浩¹, 董冠中²

(1. 开封市中心医院心胸血管外科, 开封 475000;

2. 河南省人民医院胸外科/郑州大学人民医院医学院/河南大学临床医学院, 郑州 450003)

【摘要】目的:探讨 miR-30-5p 对食管癌细胞增殖和迁移的影响及分子机制。**方法:**选取开封市中心医院心胸血管外科和河南省人民医院胸外科 2014 年 6 月到 2019 年 6 月收集的食管癌和癌旁组织样本各 120 例, 采用荧光定量 PCR 测定 miR-30-5p mRNA 表达水平。采用慢病毒建立食管癌细胞系 EC109 中建立 miR-30-5p 过表达稳定细胞系(miR-30-5p 组)和对照细胞系(miR-control 组)。采用 EdU 染色分析 2 组细胞的增殖情况; 采用 Transwell 分析 2 组细胞的迁移情况; 采用生物信息学和双荧光素酶报告基因分析 miR-30-5p 的靶基因; 在 miR-30-5p 组和 miR-control 组过表达靶基因对细胞增殖和迁移的影响。**结果:**与癌旁组织比较, 食管癌组织中 miR-30-5p mRNA 表达水平明显上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 miR-control 组比较, miR-30-5p 组细胞增殖能力和细胞迁移能力明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。生物信息学和双荧光素酶报告基因显示 BCL-9 是 miR-30-5p 的靶基因。在 miR-control 组细胞中过表达 BCL-9, 可显著提高细胞的增殖和迁移, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 miR-30-5p 组细胞过表达 BCL-9, 细胞增殖和迁移差异无统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**miR-30-5p 在食管癌中呈低表达, 可导致靶基因 BCL-9 表达上调, 进而促进食管癌细胞的增殖和迁移。

【关键词】食管癌; miR-30-5p; 增殖; 迁移; BCL-9**【中图分类号】**R735**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-09-01

Expression of miR-30-5p in esophageal cancer and its effect on proliferation and migration of esophageal cancer cells

Zhuge Xuepeng¹, Wang Baoshou¹, Liu Hao¹, Dong Guanzhong²

(1. Department of Cardiothoracic Vascular Surgery, Kaifeng Central Hospital;

2. Department of Thoracic Surgery, Henan Provincial People's Hospital/

People's Hospital of Zhengzhou University/Clinical Medicine College of Henan University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of miR-30-5p on the proliferation and migration of esophageal cancer cells and its molecular mechanism. **Methods:** A total of 120 samples of esophageal cancer and 120 samples of adjacent tissues were collected in department of cardiothoracic vascular surgery of Kaifeng Central Hospital and thoracic surgery of Henan People's Hospital from June 2014 to June 2019, and fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of miR-30-5p. Lentivirus was used to establish miR-30-5p overexpression cell lines (the miR-30-5p group) and control cell lines (the miR-control group) in esophageal cancer cell line EC109. The EdU staining was used to analyze the proliferation in two groups. Transwell was used to analyze migration in two groups. Bioinformatics and double luciferase reporter gene were used to analyze target genes of miR-30-5p. Influence of overexpression gene on cell proliferation and migration in the miR-30-5p group and the miR-control group was analyzed. **Results:** Compared with adjacent tissues, the expression of miR-30-5p of esophageal cancer tissues was significantly increased, with statistically significant difference ($P < 0.05$). Compared with the miR-control group, the proliferation and migration ability in the miR-30-5p group significantly decreased, with statistically significant difference ($P < 0.05$). Bioinformatics and double luciferase reporter gene showed that BCL-9 was the target gene of miR-30-5p. Overexpression of BCL-9 in the miR-control group was able to significantly increase cell proliferation and migration, with statistically significant difference ($P < 0.05$). Over-expression of BCL-9 in

作者介绍: 诸葛雪朋, Email: 409477257@qq.com,

研究方向: 食管癌及肺癌的基础及临床研究。

基金项目: 2015 年度河南省医学科技攻关计划资助项目 (编号: 201503180)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200413.1311.020.html>
(2020-04-14)cantly decreased, with statistically significant difference ($P < 0.05$). Bioinformatics and double luciferase reporter gene showed that BCL-9 was the target gene of miR-30-5p. Overexpression of BCL-9 in the miR-control group was able to significantly increase cell proliferation and migration, with statistically significant difference ($P < 0.05$). Over-expression of BCL-9 in

the miR-30-5p group had no statistical significance on cell proliferation and migration ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of miR-30-5p is low in esophageal cancer, which can up-regulate the expression of its target gene BCL-9 and promote proliferation and migration of esophageal cancer cells.

[Key words] esophageal cancer; miR-30-5p; proliferation; migration; BCL-9

食管癌是临床常见的头颈部恶性肿瘤类型之一,发病率和致死率位居世界前列,成为严重威胁人类健康的疾病类型之一^[1-2]。食管癌病因多种多样,可能与患者生活习惯、遗传史和基因表达失调有关。从基因表达情况分析食管癌发生发展是目前临床研究的热点^[3]。非编码 RNA 是一类无法编码蛋白质的 RNA,在调控基因表达、胚胎发育和表观遗传等方面发挥重要作用^[4-5]。miRNA 作为一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,在肿瘤发生过程中发挥重要作用^[6]。miR-30-5p 作为 miRNA 家族成员之一,在多发性骨髓瘤、结直肠癌和肾癌中呈低表达,扮演肿瘤抑癌基因的作用^[7-9]。但是其在食管癌中如何表达,并对食管癌生长和发展如何影响,目前尚未见相关报道。本研究采用细胞生物学分析 miR-30-5p 在食管癌组织中的表达及作用机制,为食管癌治疗和诊断提供一定的价值。

1 材料和方法

1.1 临床标本

选取开封市中心医院心胸血管外科和河南省人民医院胸外科 2014 年 6 月到 2019 年 6 月收集的食管癌和癌旁组织各 120 例作为研究对象。其中男性 75 例,女性 45 例,年龄 43~77 岁,平均年龄 (53.12 ± 15.98) 岁。肿瘤分化程度:食管高分化鳞癌 44 例,食管中分化鳞癌 40 例,食管低分化鳞癌 37 例。有淋巴结转移 51 例,无淋巴结转移 79 例。TNM 分期 I~II 期 68 例,III~IV 期 52 例。所有患者均签署知情同意书。

1.2 实验试剂和材料

食管癌细胞系 EC109 购自美国 ATCC 公司;DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶及青链霉素均购自美国 Hyclone 生物有限公司;plenti-miR-30-5p 和空载 plenti 慢病毒载体和慢病毒由上海捷瑞生物有限公司构建并包装;BCL-9 和 Tubulin 单克隆抗体购自美国 CST 公司;HRP 标记的羊抗兔二抗购自杭州华安生物科技有限公司;EdU 试剂盒购自上海碧云天科技有限公司;双荧光素酶报告基因试剂盒购自美国 Promega

公司;Transwell 购自美国 Corning 公司;逆转录试剂盒和 qPCR SYBR Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 分组及处理

miR-30-5p 过表达稳定细胞系构建 EC109 细胞培养至指数生长期,采用胰酶消化后将细胞密度调整为 1×10^6 个/mL,接种于 6 孔板,每孔 300 μ L。等细胞贴壁后,分别向细胞中加入 miR-30-5p 和对照慢病毒,感染 24 h 后更换含有嘌呤霉素 (1μ g/mL) 的新鲜培养基,处理 24 h 后,未被杀死的细胞则为稳定细胞系。将过表达 miR-30-5p 的细胞系命名为 miR-30-5p 组,对照细胞系命名为 miR-control 组。

1.4 荧光定量 PCR 体系

收集 miR-control 组和 miR-30-5p 组细胞,采用 miRNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒提取 miRNA,并逆转录为 cDNA。根据 miR-30-5p 序列设计引物。miRNA-30-5p-F:5'-CC-CGGGCTTGTCTTTTGT-3';miRNA-30-5p-R:5'-GACTG-GGTGGCTCACTCTTCTG-3';U6-F:5'-CTGGGCTACACTG-AGCACC-3';U6-R:5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'。然后按照以下体积制备反应体系:2 $\times$ Sybgreen 预混合物 10 μ L,模板 8.8 μ L,上游引物 0.6 μ L,下游引物 0.6 μ L,总体积 20 μ L。根据所需样本数量配置相应体积混合液,然后加至 96 孔 PCR 板。按照下述反应条件进行 PCR:第 1 阶段,预变性,95 $^{\circ}$ C 30 s;第 2 阶段,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,循环数 40 个;第 3 阶段建立溶解曲线,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,95 $^{\circ}$ C 15 s。PCR 结束后直接在仪器上读取目的基因的相对表达水平。

1.5 EdU 染色

取对数生长期细胞,以每孔 1×10^5 个细胞接种于 96 孔板,待细胞完全贴壁。用细胞培养基按照 1 000:1 的比例稀释 EdU 溶液,每孔加入 100 μ L 含 EdU 的培养基,孵育 2 h,弃培养基,PBS 清洗细胞 2 次,每次 5 min。每孔加入 100 μ L 含 4%多聚甲醛的固定液,室温固定 30 min 后,PBS 洗涤 2 次,显微镜下观察 EdU 阳性细胞比例。

1.6 细胞迁移

收集 miR-control 组和 miR-30-5p 组细胞,1 000 r/min 离心 3 min,沉淀采用无血清培养基进行重悬,吹打均匀后,将细胞密度调整为 1×10^5 个/mL,将 Transwell 小室放入 24 孔板,将细胞悬液 100 μ L 置于 Transwell 上室,下室加入 500 μ L 含 10%血清的培养基,然后将接种好的细胞放入培养箱,在培养箱常规培养 24 h。上室弃培养基,4%多聚甲醛固定

30 min, 1%结晶紫染色 10 min, 然后在显微镜下观察细胞迁移情况。

1.7 双荧光素酶报告基因

根据生物信息学预测 miR-30-5p 的靶基因是 BCL-9。根据 miR-30-5p 与 BCL-9-3'-UTR 相互作用片段的序列, 设计野生型 BCL-9-3'-UTR (BCL-9-WT) 及缺失 miR-30-5p 结合区域的突变体 BCL-9-3'-UTR (BCL-9-Mut) 序列, 并构建荧光素酶报告载体。分别将 BCL-9-WT 和 BCL-9-Mut 荧光素酶报告载体转染 miR-control 组和 miR-30-5p 组细胞, 转染 48 h 后采用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光素酶活性。

1.8 Western blot 分析

收集 miR-control 组和 miR-30-5p 组细胞, 密度为 1×10^6 个细胞/mL, 离心收集沉淀后, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液, 裂解 30 min 后离心取上清, 加入上样缓冲液, 进行 SDS-PAGE 垂直电泳和水平电泳, 将蛋白转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭 30 min, 然后用 5% 脱脂奶粉按照 1:1 000 稀释 BCL-9 兔多克隆抗体, 4 °C 孵育过夜, 次日用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 然后用封闭液 1:2 500 稀释 HRP 标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 2 h 后用 PBST 洗涤 3 次, 采用超敏化学发光液进行显色, 同时以 Tubulin 作为内标。

1.9 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计量数据比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 食管癌组织 miR-30-5p 表达水平分析

荧光定量 PCR 结果显示, 与癌旁组织 (1.21 ± 0.12) 比较, 食管癌组织中 miR-30-5p 的表达水平 (0.29 ± 0.08) 明显下调, 差异有统计学意义 ($t=3.114, P=0.011$)。

2.2 miR-30-5p 稳定细胞系构建

实验采用慢病毒构建 miR-30-5p 过表达的稳定细胞系, 经嘌呤霉素筛选后, 成功构建稳定细胞系, 并分别命名为 miR-control 组和 miR-30-5p 组。采用荧光定量 PCR 分析显示, 与 miR-control 组细胞 miR-30-5p 表达水平 (1.10 ± 0.19) 比较, miR-30-5p 组细胞 miR-30-5p 表达水平 (3.91 ± 0.43) 明显增加, 差异有统计学意义 ($t=4.018, P=0.005$)。

2.3 miR-30-5p 对食管癌细胞增殖和迁移的影响

与 miR-control 组细胞 EdU 阳性率 [$(76.43 \pm 10.72)\%$] 比较, miR-30-5p 组细胞的 EdU 阳性率 [$(30.13 \pm 10.72)\%$] 明显下降, 差异有统计学意义 ($t=2.671, P=0.019$)。与 miR-control 组细胞 (101.33 ± 8.12) 比较, miR-30-5p 组细胞的迁移能力 (59.32 ± 4.91) 明显下降, 差异有统计学意义 ($t=3.002, P=0.003$) (图 1)。

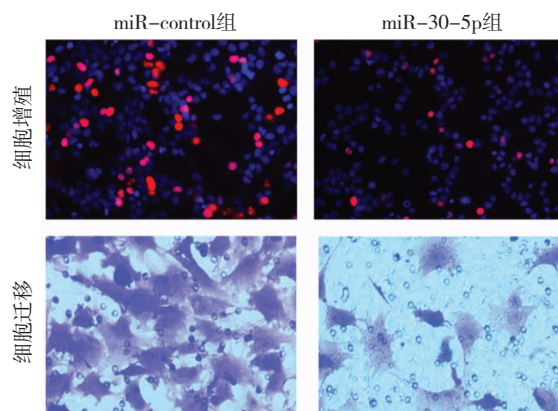
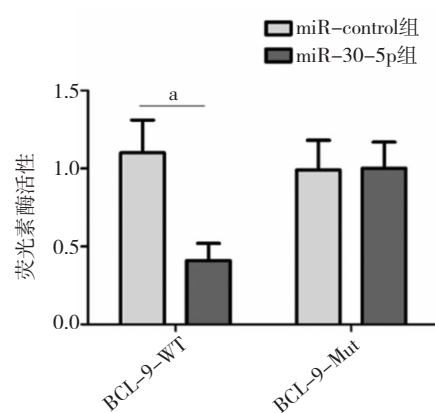


图 1 miR-30-5p 对食管癌细胞增殖和迁移的影响

2.4 miR-30-5p 靶基因分析

生物信息学研究显示, miR-30-5p 与 BCL-9-3'-UTR 区域存在 7 个碱基互补。双荧光素酶报告基因研究如图 2 所示: miR-30-5p 组细胞转染 BCL-9-WT 后, 细胞荧光素酶活性较 miR-control 组细胞明显下调, 差异有统计学意义 ($t=2.817, P=0.015$); 无论是 miR-control 组还是 miR-30-5p 组, 转染 BCL-9-Mut 后细胞荧光素酶活性差异没有统计学意义 ($t=0.391, P=0.201$)。



注: a, $P<0.05$

图 2 双荧光素酶报告基因结果比较

2.5 miR-30-5p 与靶基因关系

实验进一步采用功能实验验证 miR-30-5p 与 BCL-9 的关系, 与 miR-control 组细胞增殖和迁移比较, 在 miR-control 组细胞中过表达 BCL-9 明显增加了细胞增殖和迁移能力, 差异有统计学意义 ($t=3.440, P=0.003$)。与 miR-30-5p 组细胞增殖和迁移比较, 在 miR-30-5p 组细胞中过表达 BCL-9 则对细胞增殖和迁移无统计学差异 ($t=0.710, P=0.103$)。

3 讨论

非编码 RNA 是指不编码蛋白质的 RNA, 包括

rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 和 microRNA 等多种已知功能的 RNA,还包括未知功能的 RNA。miRNA 是非编码 RNA 成员之一,是一类内生的、长度为20~24 个核苷酸的小 RNA,在细胞内具有多种重要的调节作用。每个 miRNA 可以有多个靶基因,在基因表达调控、细胞分化、细胞炎症和凋亡等过程中发挥重要功能。目前发现许多 miRNA 在肿瘤发生、发展和转移过程中扮演重要角色。miR-30-5p 是一种功能多样的 miRNA。研究显示,miR-30-5p 可通过靶向 MBNL 调节 Trim55 和 INSR 抑制肌细胞分化^[10]。miR-30-5p 也与肿瘤化疗耐药和肿瘤干细胞特性有关。此外,研究显示 miR-30-5p 作为肿瘤抑制因子参与头颈部肿瘤和肾癌的发生发展^[11]。但是,miR-30-5p 在食管癌中扮演怎样的角色目前尚不清楚,本研究分析了 miR-30-5p 对食管癌的影响。

采用荧光定量 PCR 发现,与癌旁组织比较,食管癌组织中 miR-30-5p 的表达水平明显下调,差异有统计学意义。这一结果提示 miR-30-5p 可能具有抑制肿瘤生长的作用。采用 EdU 染色和细胞迁移实验证实,在过表达 miR-30-5p 的肿瘤细胞中,细胞的增殖和迁移能力明显下调,这一结果进一步证实 miR-30-5p 具有肿瘤抑制的特性。

miRNA 对细胞生物学特性的影响主要通过其作用的靶蛋白实现。本研究进一步采用生物信息学分析了 miR-30-5p 的靶基因,结果发现 miR-30-5p 与 BCL-9-3'-UTR 区域存在互补。BCL-9 是 Wnt 信号通路中新发现的一个癌基因,其异常表达促使 Wnt 信号通路异常激活,进而导致肿瘤发生^[12-13]。Wnt 信号通路主要参与细胞增殖、分化、凋亡与抗凋亡等生命过程,其异常激活与细胞单克隆性无限制恶性生长及癌变密切相关。BCL-9 在多种肿瘤组织中均存在异常表达^[13-14]。本研究发现 miR-30-5p 过表达会导致 BCL-9 表达水平明显下调,进而抑制肿瘤发生。而在 miR-30-5p 细胞中过表达 BCL-9 则会导致肿瘤细胞增殖和迁移明显增加,这一结果进一步说明 miR-30-5p 通过靶向 BCL-9 调节肿瘤增殖和迁移能力。

本研究结果表明,miR-30-5p 通过靶向 BCL-9 影响食管癌细胞的增殖和迁移,为食管癌治疗提供

了一定的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Huang FL, Yu SJ. Esophageal cancer: risk factors, genetic association, and treatment[J]. *Asian J Surg*, 2018, 41(3): 210-215.
- [2] Hoebe A, Polak J, Van De Voorde L, et al. Cervical esophageal cancer: a gap in cancer knowledge[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(9): 1664-1674.
- [3] Domper Arnal MJ, Ferrández Arenas Á, Lanas Arbeloa Á. Esophageal cancer: risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(26): 7933-7943.
- [4] Patil VS, Zhou R, Rana TM. Gene regulation by non-coding RNAs[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014, 49(1): 16-32.
- [5] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7): 522-531.
- [6] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(8): 509-524.
- [7] Chen Z, Zhang J, Zhang Z, et al. The putative tumor suppressor microRNA-30a-5p modulates clear cell renal cell carcinoma aggressiveness through repression of ZEB2[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6): e2859.
- [8] Jiang S, Miao D, Wang M, et al. MiR-30-5p suppresses cell chemoresistance and stemness in colorectal cancer through USP22/Wnt/ β -catenin signaling axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(1): 630-640.
- [9] Zhao JJ, Lin J, Zhu D, et al. miR-30-5p functions as a tumor suppressor and novel therapeutic tool by targeting the oncogenic Wnt/ β -catenin/BCL9 pathway[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(6): 1801-1813.
- [10] Zhang BW, Cai HF, Wei XF, et al. miR-30-5p regulates muscle differentiation and alternative splicing of muscle-related genes by targeting MBNL1[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): E182.
- [11] Saleh AD, Cheng H, Martin SE, et al. Integrated genomic and functional microRNA analysis identifies miR-30-5p as a tumor suppressor and potential therapeutic nanomedicine in head and neck cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(9): 2860-2873.
- [12] Mani M, Carrasco DE, Zhang Y, et al. BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7577-7786.
- [13] Le Baccon P, Leroux D, Dascalescu C, et al. Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001, 32(3): 250-264.
- [14] Sarris A, Ford R. Recent advances in the molecular pathogenesis of lymphomas[J]. *Curr Opin Oncol*, 1999, 11(5): 351-363.

(责任编辑: 冉明会)