

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.09.008

· 临床研究 ·

miR-6803 和 *PPP6R1* 在食管鳞状细胞癌组织和细胞中的表达及其甲基化状态与患者临床病例特征的关系

沈素朋, 徐凤楼, 刘江惠, 卢帆, 梁佳, 郭炜, 董稚明(河北医科大学第四医院 河北省肿瘤研究所, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨微小 RNA-6803(miR-6803)及其宿主基因蛋白磷酸酶 6 调节亚单位 1(protein phosphatase 6 regulation subunit 1, *PPP6R1*) 在食管鳞状细胞癌(ESCC)中的表达和 *PPP6R1* 基因启动子区甲基化状态及其在 ESCC 发生及发展中的作用。**方法:** 采用 2013 年至 2014 年间河北医科大学第四医院生物标本库的 72 例 ESCC 手术患者癌组织及对应的癌旁组织标本, 用实时荧光定量 PCR 法检测 miR-6803 和 *PPP6R1* 在 ESCC 组织及其癌旁组织和 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC)处理前后的 ESCC 细胞株 TE1、TE13、Eca109、T.TN、Kyse170 中的表达水平。用甲基化特异性 PCR(MSP)法检测 ESCC 细胞系和组织及其癌旁组织中 *PPP6R1* 的甲基化状态, 分析其与患者临床病理特征的关系。**结果:** ESCC 组织中 miR-6803 和 *PPP6R1* 的表达水平显著低于癌旁组织($0.318 \pm 0.156, 0.408 \pm 0.177$ vs 1.000 ± 0.001 , 均 $P < 0.05$), miR-6803 表达水平与淋巴结转移、组织分化程度及 TNM 分期密切相关(均 $P < 0.05$); *PPP6R1* 表达水平与 TNM 分期和组织学分化程度密切相关(均 $P < 0.05$)。ESCC 组织中 miR-6803 和 *PPP6R1* 基因的表达具有显著相关性($P < 0.05$)。ESCC 组织中 *PPP6R1* 的启动子区甲基化率显著高于癌旁组织(56.94% vs 36.11% , $P < 0.05$), 并与 TNM 分期和组织学分化程度密切相关(均 $P < 0.05$), miR-6803 和 *PPP6R1* 基因的低表达与 *PPP6R1* 启动子区甲基化明显相关($P < 0.05$)。经 5-Aza-dC 处理后, 5 种 ESCC 细胞中 miR-6803 和 *PPP6R1* 的表达均升高, 并且 TE1、TE13、Kyse170 细胞中 *PPP6R1* 基因甲基化程度降低, 非甲基化程度增加, 其余 2 种细胞中 *PPP6R1* 基因均表现为非甲基化状态。**结论:** miR-6803 及其宿主基因 *PPP6R1* 的低表达可能与 ESCC 的发生发展密切相关, 其启动子区甲基化可能是 miR-6803 和 *PPP6R1* 表达沉默的机制之一。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; 微小 RNA-6803; 蛋白磷酸酶 6 调节亚单位 1(*PPP6R1*) 基因; 甲基化

[中图分类号] R730.54; R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)09-0972-007

Expression and methylation status of miRNA-6803 and *PPP6R1* in esophageal squamous cell carcinoma and their relationship with clinical characteristics of ESCC patients

SHEN Supeng, XU Fenglou, LIU Jianghui, LU Fan, LIANG Jia, GUO Wei, DONG Zhiming (Cancer Institute of Hebei Province, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of microRNA-6803(miR-6803) and its host gene *PPP6R1* in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and the role of promoter methylation status of *PPP6R1* in the tumorigenesis and progression of ESCC. **Methods:** ESCC tissues and corresponding para-cancerous tissues from 72 cases of ESCC patients stored in the bio-specimen base of the Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University during 2013 and 2014 were collected for this study. Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of miR-6803/*PPP6R1* in collected tissues and in ESCC cell lines (TE1, TE13, Eca109, T.TN, Kyse170) treated or untreated with DNA methyl-transferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC). Methyla-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81572441);河北省医学科学研究重点课题(No.20170700, No.20170701)。Projects supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81572441), and the Key Project of Medical Science Research of Hebei Province(No.20170700, No.20170701)

[作者简介] 沈素朋(1984-),女,硕士,助理研究员,主要从事肿瘤发病机制的研究, E-mail: shensupeng273@sina.com

[通信作者] 董稚明(DONG Zhiming, corresponding author), 博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤发病机制及临床的研究, E-mail: dongzhiming2000@163.com

[优先发表]

tion specific PCR (MSP) method was used to detect the methylation status of *PPP6R1* in esophageal cancer cell lines and collected tissues, respectively. **Results:** The relative expressions of miR-6803 and *PPP6R1* in ESCC tissues were significantly reduced compared to corresponding tissues (0.318 ± 0.156 , 0.408 ± 0.177 vs 1.000 ± 0.001 , all $P < 0.05$), and expression of miR-6803 was associated with lymph node metastasis, TNM stage and pathological differentiation (all $P < 0.05$); The expression of *PPP6R1* was associated with TNM stage and pathological differentiation (all $P < 0.05$). There was a significant correlation between the relative expression of miR-6803 and *PPP6R1* in ESCC tissues ($P < 0.05$). The promoter methylation frequency of *PPP6R1* in ESCC tissues was significantly higher than that in corresponding normal tissues (56.94% vs 36.11% , $P < 0.05$), and was also associated with TNM stage and pathological differentiation (all $P < 0.05$). The low expression of miR-6803/*PPP6R1* was significantly correlated with promoter methylation of *PPP6R1* in ESCC tissues ($P < 0.05$). The relative expression level of miR-6803 and *PPP6R1* in 5 ESCC cell lines was enhanced after the treatment with 5-Aza-dC. After treatment with 5-Aza-dC, the methylation level of *PPP6R1* was decreased in TE1, TE13, Kyse170 cells, while complete unmethylation of *PPP6R1* was detected in other two cell lines. **Conclusion:** Aberrant low expression of miR-6803 and its host gene *PPP6R1* are closely related to the occurrence and development of ESCC, and promoter methylation may be one of the mechanisms for inactivation of miR-6803/*PPP6R1* in ESCC.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma; microRNA-6803(miR-6803); protein phosphatase 6 regulates subunit 1(*PPP6R1*) gene; methylation

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(9): 972-978. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.008]

微小RNA (microRNA, miRNA) 是一类长约 22 个核苷酸的内源性非编码 RNA。miRNA 具有广泛的基因调节功能, 位于编码基因内含子区的 miRNA 称为内含子 miRNA 或基因内 miRNA^[1-2]。这些 miRNA 通常与其宿主基因共享启动子区, 并与宿主基因一起发生转录。有研究^[3-5]表明, 内含子 miRNA 与其宿主基因在细胞功能上可能有协同作用。本研究在 miRNA 芯片数据基础上结合生物信息学分析筛选与食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell cancer, ESCC) 发生发展相关的 miR-6803 及其宿主基因蛋白磷酸酶 6 调节亚单位 1 (protein phosphatase 6 regulation subunit 1, *PPP6R1*), 探索两者在 ESCC 组织和细胞中表达及其甲基化水平, 分析其与患者临床病理特征的关系, 为确认 miR-6803 和 *PPP6R1* 在 ESCC 发生发展中的作用提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取河北医科大学第四医院生物标本库保存的 2013 年至 2014 年间的 72 例 ESCC 手术患者癌组织及对应的癌旁组织标本, 经病理学切片确诊。其中男性 47 例, 女性 25 例, 年龄 39~78 岁, 中位年龄 60 岁。全部患者术前均未经化疗和放疗, 所有研究对象均签署知情同意书, 研究方案经医院伦理委员会批准同意。采集的每例标本一部分置于 RNAlater 液中存于 -80°C 冰箱中, 用于 DNA 和 RNA 的提取。肿瘤组织及癌旁组织均进行常规的病理诊断证实, 按照国

际抗癌联盟 (UICC; 2009 年版) TNM 分期: I 期 2 例 (2.78%), II 期 25 例 (34.72%), III 期 27 例 (37.50%), IV 期 18 例 (25.00%)。按照 WHO 肿瘤病理学分级标准 (2000 年版) 分级: 高分化 17 例 (23.61%), 中低分化 55 例 (76.39%)。

1.2 细胞系及主要试剂

实验用 ESCC 细胞 TE13、T.TN、Yes-2、Eca109、Kyse170 由河北医科大学第四医院生物标本库保留并传代。RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清、5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC) 购自美国 Sigma 公司, 蛋白酶 K 购自美国 Merck 公司, 甲基化转化试剂盒购自德国 Qiagen 公司, 总 RNA 提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司, 逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, miRNA cDNA 第一链合成试剂盒、miRNA 荧光定量检测试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。qPCR 引物均在上海生工合成。

1.3 ESCC 细胞系的培养

将 ESCC 细胞 TE13、T.TN、Yes-2、Eca109、Kyse170 用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养液, 置于 37°C 、饱和湿度和 5% CO_2 的培养箱中传代培养。取对数生长期细胞, 用 5-Aza-dC (终浓度 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理细胞株作为实验组, 每 24 h 更换液体, 培养 2 d, 第 3 天换全血清培养基培养 24 h 后收集细胞并提取 DNA 及 RNA。以未经 5-Aza-dC 处理的 ESCC 细胞系作为对照组。

1.4 miRNA 芯片高通量筛选作为研究对象的 miR-

NA 及其宿主基因

结合生物信息学分析的基础上筛选 ESCC 发生发展相关的候选 miRNA, 选取 miR-6803 为研究对象, 并在 UCSC (University of California Santa Cruz) 基因序列数据库中进行检索, 发现 miR-6803 为内含子 miRNA, 其宿主基因为 *PPP6R1*。经在线基因数据库分析 miR-6803/*PPP6R1* 转录起始点周围发现 CpG 岛。

1.5 qPCR 检测 ESCC 组织及细胞中 miR-6803 及 *PPP6R1* 的表达

按 TRIzol 试剂说明书提取 5-Aza-dC 处理前后的细胞系和 72 例 ESCC 及癌旁组织中的总 RNA, 按

逆转录试剂盒说明书提供的步骤将 RNA 逆转录合成 miRNA 对应的 cDNA 第一链, 并按照配套荧光定量检测试剂盒说明书设计 miR-6803 的上游引物, 引物序列见表 1。反向引物及内参 *U6* 的引物由试剂盒提供。qPCR 反应条件: 94℃ 预变性 2 min; PCR 循环中模板变性: 94℃ 变性 20 s、60℃ 退火 34 s, 退火、延伸, 共 40 个循环。按照逆转录试剂盒说明书建议的比例加样, 将 RNA 逆转录成 cDNA。qPCR 反应条件: 94℃ 预变性 10 min; 94℃ 变性 15 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环; 72℃, 7min。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 miR-6803 和 *PPP6R1* mRNA 的相对表达量, $\Delta Ct = Ct_{miRNA/miRNA} - Ct_{GAPDH/U6}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{病例组} - \Delta Ct_{对照组}$ 。

表 1 miR-6803 及 *PPP6R1* 基因 qPCR 和 MSP 引物序列
Tab. 1 Primer sequences of miR-6803 and *PPP6R1* gene

Types	Primer sequence	Product size (bp)
qPCR		
miR-6803	F: 5'-CGCACCTGCCTCTCACCCACAG-3'	
<i>U6</i>	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	
<i>PPP6R1</i>	F: 5'-ACAGCCAACATCACCTTC-3'	
	R: 5'-CGTCCTCCTCTTCTCAT-3'	118
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	104
	R: 5'-AGGGGTCATTGATGGCAACA-3'	
MSP		
<i>PPP6R1</i>	MF: 5'-GGTTTATTTCTGGGGTAGATC-3'	163
	MR: 5'-GGTTTATTTCTGGGGTAGATC-3'	
	UR: 5'-TGGGTTTATTTTGGGGTAGATT-3'	163
	UF: 5'-CCTCCCACAACACTATATTAATAC-3'	

1.6 甲基化特异性 PCR(MSP)法检测 ESCC 组织及细胞系中 *PPP6R1* 甲基化状态

采用常规酚/氯仿抽提法, 提取 5-Aza-dC 处理前后 ESCC 细胞系和 72 例 ESCC 及癌旁组织中 DNA, 用紫外分光光度法定量, 每个样本中均取 2 μg DNA, 按照 EpiTect Fast DNA 纯化试剂盒说明书对样本进行转化及纯化, 经 UCSC 基因序列数据库进行序列检索, 并结合 Methprimer CpG 岛预测软件分析, 发现 *PPP6R1* 在横跨部分启动子及第一外显子区有一长达 1 080 bp 的 CpG 岛, CG 二核苷酸序列密度大于 50%。本实验在此 CpG 岛范围内设计 MSP 检测用引物, 引物位置位于启动子区(-541~-378 bp)。用甲基化引物和非甲基化引物进行 PCR 扩增, 引物序列见表 1。qPCR 反应条件为: 95℃ 预变性 10 min 后, 95℃ 变性 45 s, 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环后, 72℃ 延伸 7 min。MSP 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用 UV 凝胶电泳成像及图像分析系统进行图像分析。甲基化结果的判定方法如下: (1) 完全甲基

化, 甲基化特异引物扩增出目的条带, 而非甲基化特异引物未扩增出目的条带; (2) 非甲基化, 非甲基化特异引物扩增出目的条带, 而甲基化引物未扩增出目的条带; (3) 不完全甲基化, 甲基化特异引物和非甲基化特异引物均扩增出目的条带, 统计时将不完全甲基化归入甲基化。MSP 阳性对照采用基因组 DNA 经甲基化酶 *Sss I* 处理以后进行 PCR, 阴性对照用灭菌双蒸水取代 DNA 模板进行 PCR。为进行 MSP 检测的质量控制, 随机选取 10% 的标本进行重复实验。

1.7 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料采用 χ^2 检验, 相关性分析采用 *Pearson* 分析, 均为双侧检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ESCC 组织中 miR-6803 的表达及其与临床病理

特征的关系

经在线基因数据库分析,miR-6803 位于宿主基因 *PPP6R1* 的第4位内含子上,且在 *PPP6R1* 基因上游 5' 端区域存在密集 CpG 岛(图1)。qPCR 法检测结果(表2,图2A)显示,ESCC 组织中 miR-6803 的表达水平显著低于相应癌旁组织($t=-37.025, P<0.05$)。ESCC 患者 miR-6803 表达水平与其病理分级($t=2.563, P<0.05$)、TNM 分期($t=20.65, P<0.05$)有关,而与患者淋巴结转移情况、性别及年龄无关($t=-1.416, 0.566, 0.747$; 均 $P>0.05$)。

2.2 ESCC 组织中 *PPP6R1* 的表达及其与临床特征的关系

qPCR 检测结果(表2,图2B)显示,ESCC 组织中 *PPP6R1* 的表达水平显著低于癌旁组织($t=-28.325,$

$P<0.05$)。ESCC 患者 *PPP6R1* 基因的表达水平与病理分级($t=-2.496, P<0.01$)、TNM 分期($t=2.356, P<0.01$)有关,而与患者的淋巴结转移、性别及年龄无关(分别 $t=-1.890, -0.740, 1.181$; 均 $P>0.05$)。ESCC 组织中 miR-6803 表达与其宿主基因 *PPP6R1* 表达有显著相关性($r=0.878, P<0.05$; 图2C)。

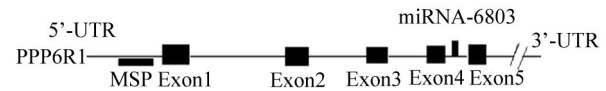
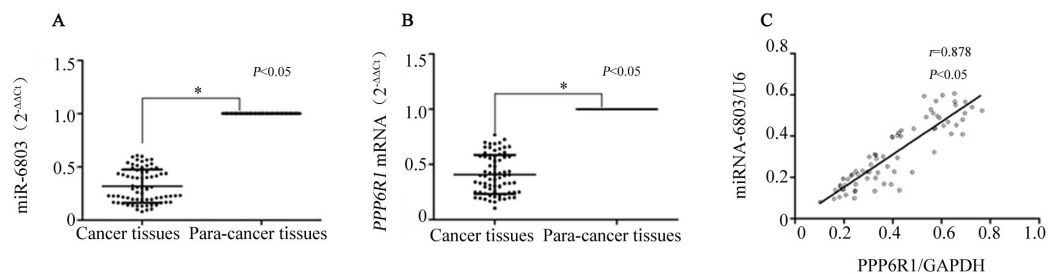


图1 miR-6803 和 *PPP6R1* 基因结构示意图

Fig. 1 Schematic map of genomic structure of miR-6803 and *PPP6R1* gene



* $P<0.05$ vs para-cancerous tissues

A: Relative expression of miR-6803 in ESCC tissues; B: Relative expression of *PPP6R1* mRNA in ESCC tissues; C: Pearson correlation between miR-6803 and *PPP6R1* mRNA

图2 ESCC 组织中 miR-6803 和 *PPP6R1* mRNA 的相对表达

Fig. 2 Relative expression of miR-6803 and *PPP6R1* mRNA in ESCC tissues

表2 miR-6803 和 *PPP6R1* 的表达及甲基化状态与患者临床病理资料的关系

Tab. 2 Correlations of the expression and methylation status of miR-6803 and *PPP6R1* in ESCC tissues with the clinicopathologic features

Group	N	Expression of miR-6803			Expression of <i>PPP6R1</i>			Methylation of <i>PPP6R1</i> promoter		
		$\bar{x} \pm s$	t	P	$\bar{x} \pm s$	t	P	n(%)	χ^2	P
Total	72	0.318±0.156	-37.025	0.000	0.408±0.177		0.000	41(56.94)	7.185	0.007
Gender										
Male	47	0.325±0.173	0.566	0.573	0.426±0.186	-0.740	0.462	26(55.32)	0.146	0.703
Female	25	0.305±0.124			0.395±0.172			15(60.00)		
Age										
≥60	37	0.331±0.167	0.747	0.457	0.432±0.169	1.181	0.242	22(56.76)	0.001	0.974
<60	35	0.304±0.145			0.383±0.184			25(60.61)		
Lymph node										
+	46	0.299±0.166	-1.416	0.162	0.330±0.183	-1.890	0.062	36(63.16)	5.553	0.018
-	26	0.350±0.134			0.405±0.182			11(36.67)		
Differe-ntiation										
Well	17	0.382±0.154	2.563	0.013	0.423±0.172	2.087	0.040	6(35.29)	4.626	0.039
Poorly	55	0.286±0.148			0.342±0.189			30(66.67)		
TNM stage										
I+II	27	0.365±0.156	20.65	0.043	0.407±0.181	2.536	0.020	11(40.74)	6.675	0.031
III+IV	45	0.288±0.150			0.328±0.180			30(66.67)		

2.3 ESCC 组织中 *PPP6R1* 基因甲基化状态及其与临床病理特征的关系

MSP 分析结果(表2)显示, *PPP6R1* 在 ESCC 组织中甲基化率显著高于癌旁组织($\chi^2=7.185, P<0.05$)。ESCC 患者 *PPP6R1* 基因甲基化状态与其病理分级($\chi^2=4.255, P<0.05$)、TNM 分期($\chi^2=4.626, P<0.05$)有关, 而与患者的及淋巴结转移、性别、年龄无关($\chi^2=5.553, 0.146, 0.001$, 均 $P>0.05$)。

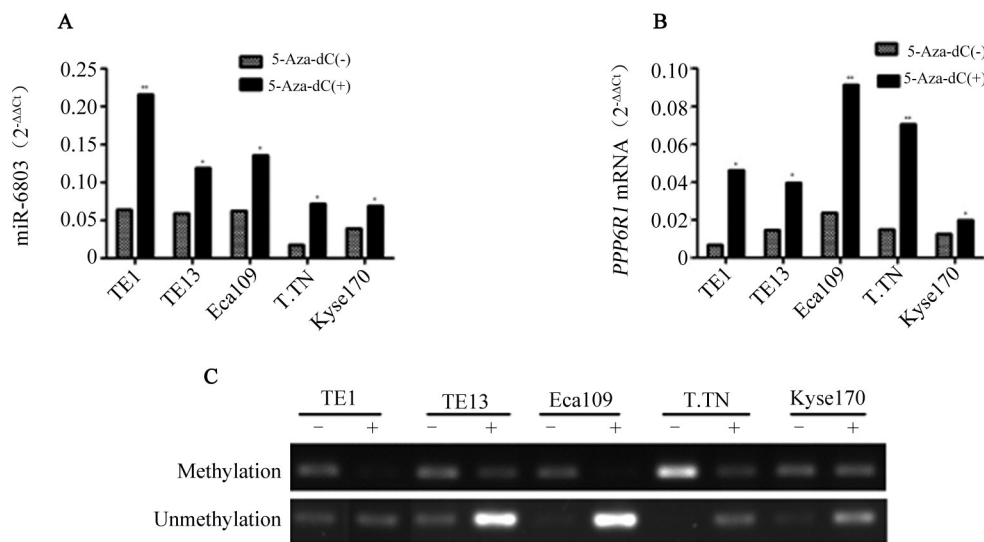
2.4 ESCC 组织中 miR-6803 和 *PPP6R1* 表达与 *PPP6R1* 启动子区甲基化的关系

在 72 例 ESCC 组织中, 发生 *PPP6R1* 甲基化的组织中 miR-6803 表达水平显著低于未发生甲基化的组

织(0.283 ± 0.138 vs $364 \pm 0.167, t=-2.195, P<0.05$) ; *PPP6R1* mRNA 在甲基化组的相对表达水平显著低于未发生甲基化组(0.361 ± 0.160 vs $0.469 \pm 0.183, t=-2.653, P<0.05$)。

2.5 ESCC 细胞系中 miR-6803 和 *PPP6R1* 表达及其甲基化状态

经 5-Aza-dC 处理后, 5 种 ESCC 细胞 TE1、TE13、Eca109、T.TN、Kyse170 中 miR-6803 和 *PPP6R1* 的表达均升高(图 3A, 3B), 并且 TE1、TE13、Kyse170 细胞系中 *PPP6R1* 基因甲基化程度降低、非甲基化程度增加, 其余 2 种细胞系中 *PPP6R1* 基因均表现为非甲基化状态(图 3C)。



* $P<0.05$, ** $P<0.05$ vs 5Aza-dC(-) group

A: Expression of miR-6803; B: Expression of *PPP6R1*; C: Methylation of *PPP6R1*;

+: 5-Aza-dC-treated; -: 5-Aza-dC-untreated

图3 ESCC 细胞系中 miR-6803 和 *PPP6R1* 的表达及甲基化状态

Fig. 3 Expression and methylation status of miR-6803 and *PPP6R1* gene in ESCC cell lines

3 讨论

近年来, 关于内含子 miRNA 及其宿主基因表达及功能通路的研究越来越受到人们的关注。有研究^[6]表明, 内含子 miRNA 及其宿主基因的相对表达水平具有一致性, 其表达水平的高低可能受到宿主基因启动子的调控。宿主基因启动子区 DNA 甲基化可能是导致内含子 miRNA 及其宿主基因表达沉默的重要机制。Dohi 等^[7]应用甲基化芯片筛选在肝细胞癌中具有启动子区甲基化的 miRNA, 发现 miRNA-335 与其宿主基因中胚层特异性转录本 (mesoderm-specific transcript, *MEST*) 在肝细胞癌中表达水平具有一致性, 且其表达下调可能是由于宿主基因启动子区 CpG 岛甲基化导致的。Grady 等^[8]在对结直肠癌

的研究发现, 内含子 miR-342 及其宿主基因 *EVL* (Enah/Vasp-like) 表达沉默, 其沉默机制可能是 *EVL* 基因上游的 CpG 岛甲基化。Yeung 等^[9]的实验结果也表明, HPV-16 感染相关的子宫颈癌抑制基因 miR-23b 的低表达可能与其宿主基因 *C9orf3* 启动子区甲基化有关, miR-23b 低表达后 HPV-16 型 *E6* 基因表达升高, 从而导致肿瘤发生。

miR-6803 是在 miRNA 芯片数据基础上并结合生物信息学分析筛选出的, 是 ESCC 组织中显著低表达的 miRNA 之一。在 UCSC 基因序列数据库中检索发现, miR-6803 为内含子 miRNA, 其宿主基因为 *PPP6R1*。miR-6803 位于 *PPP6R1* 的第 4 位内含子上。 *PPP6R1* 基因属于丝/苏氨酸磷酸酶的蛋白磷酸酶 (protein phosphatase, PPP) 家族成员, 该家族成员

在体内参与多种生理过程,包细胞周期、细胞增殖及分化等过程^[10-12]。有研究^[13]认为,siRNA 敲除 *PPP6R1* 可能导致 IκB 激酶 ε (kinases ε, IκBε) 对 TNF-α 的反应性降低,从而增加其致癌活性。

首先,本研究经 GEO 数据库检索芯片数据结果显示,*PPP6R1* 基因在 5-Aza-dC 处理后的肝癌细胞系、前列腺癌细胞系、乳腺癌细胞系等多种肿瘤细胞中表达升高,提示 *PPP6R1* 在这些肿瘤中低表达可能与其 DNA 甲基化有关。进一步结合 Methprimer CpG 岛预测软件在线分析 miR-6803/*PPP6R1* 转录起始点周围发现 CpG 岛。基于以上数据分析结果,本课题进一步探索 miR-6803/*PPP6R1* 在 ESCC 中的表达情况及其与甲基化的关系。

本研究中在 72 例 ESCC 及相应癌旁组织中检测 miR-6803 和 *PPP6R1* 的相对表达水平,结果显示 miR-6803 和 *PPP6R1* 在 ESCC 组织中表达水平均显著低于癌旁组织 ($P < 0.05$)。结果提示 miR-6803/*PPP6R1* 表达沉默可能与 ESCC 的发生有关,而且在 ESCC 组织中 miR-6803 与 *PPP6R1* 的表达水平呈正相关 ($P < 0.05$),支持内含子 miR-6803 与其宿主基因 *PPP6R1* 表达相一致的推论。

为了进一步验证 miR-6803/*PPP6R1* 在 ESCC 中是否存在甲基化,本研究首先检测 miR-6803/*PPP6R1* 在 5 种 ESCC 细胞 TE1、TE13、Eca109、T.TN、Kyse170 中的表达均呈阴性或弱阳性,经甲基化抑制剂 5-Aza-dC 处理后,上述 5 种细胞中 miR-6803/*PPP6R1* 的表达水平均增高,提示基因组 DNA 甲基化可能是导致 miR-6803/*PPP6R1* 在 ESCC 中表达下调的机制之一。本研究还应用 MSP 法检测 5 种 ESCC 细胞系中 *PPP6R1* 的甲基化状态,结果显示未经 5-Aza-dC 处理的 5 种细胞中 *PPP6R1* 均扩增出甲基化条带,应用 5-Aza-dC 处理后,TE1、TE13、Kyse170 细胞系中 *PPP6R1* 基因甲基化程度降低,非甲基化程度增加,其余 2 种细胞系中 *PPP6R1* 基因均表现为非甲基化状态,进一步提示 miR-6803/*PPP6R1* 在 ESCC 中表达缺失或降低可能与宿主基因 *PPP6R1* 启动子区 DNA 甲基化有关。本研究结果与上述文献报道相一致。

此外,本研究还发现 *PPP6R1* 在 ESCC 组织中的甲基化率显著高于癌旁组织,且 miR-6803/*PPP6R1* 在 ESCC 组织中低表达与 *PPP6R1* 启动子区甲基化有关,进一步提示 miR-6803/*PPP6R1* 表达下调可能与其启动子区 CpG 岛异常高甲基化密切相关。并且 *PPP6R1* 基因的高甲基化与 ESCC 组织的病理分级及患者 TNM 分期相关,提示该基因甲基化导致的基因沉默可能与 ESCC 的恶性表型相关,对预后评估可能有一定的参考意义。但本研究也发现 *PPP6R1* 表达

阳性且该检测区域也发生甲基化的组织,其甲基化检测结果显示不完全甲基化状态,提示可能在部分肿瘤组织中可能 *PPP6R1* 启动子区甲基化不足以抑制其转录而呈阳性表达。

总之,本研究结果提示,内含子 miR-6803 与其宿主基因 *PPP6R1* 在 ESCC 中的表达具有一致性,miRN-6804 在 ESCC 组织中低表达可能受到 *PPP6R1* 启动子区的调控,*PPP6R1* 基因启动子区甲基化可能是导致 miR-6803/*PPP6R1* 低表达的重要机制之一。Yatin 等^[14]分析 *PPP6R1* 可能对 Notch1 胞内域 (intracellular domain of Notch1, ICN1) 有蛋白修饰作用,*PPP6R1* 是否参与 Notch1 的信号调节还有待于进一步验证。而由此认为,对 miR-6803/*PPP6R1* 作用机制的进一步研究可能为 ESCC 的诊断及预后评估提供新的分子依据。

[参 考 文 献]

- [1] SCHMITT D C, MADEIRA da SILVA L, ZHANG W, et al. ErbB2-intronic microRNA-4728: a novel tumor suppressor and antagonist of oncogenic MAPK signaling[J/OL]. Cell Death Dis, 2015, 6 (5):e1742 [2017-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4669696/>. DOI:10.1038/cddis.2015.116.
- [2] KOS A, OLDELOOHUIS N F, WIECZOREK M L, et al. A potential regulatory role for intronic microRNA-338-3p for its host gene encoding apoptosis-associated tyrosine kinase[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(2): e31022 [2017-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3281898/>. DOI:10.1371/journal.pone.0031022.
- [3] HAN J, DENLI A M, GAGE F H. The enemy within: intronic miR-26b represses its host gene, ctdsp2, to regulate neurogenesis[J/OL]. Genes Dev, 2012, 26(1): 6-10[2017-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3258967/>. DOI:10.1101/gad.184416.111.
- [4] DILL H, LINDER B, FEHR A, et al. Intronic miR-26b controls neuronal differentiation by repressing its host transcript, ctdsp2[J/OL]. Genes Dev, 2012, 26(1): 25-30[2017-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3258962/>. DOI:10.1101/gad.177774.111.
- [5] NEWIE I, SØKILDE R, PERSSON H, et al. *HER2*-encoded mir-4728 forms a receptor-independent circuit with miR-21-5p through the non-canonical poly(A) polymerase PAPD5[J/OL]. Sci Rep, 2016, 6: 35664[2017-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5067774/>. DOI:10.1038/srep35664.
- [6] BASKERVILLE S, BARTEL D P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes[J/OL]. RNA, 2015, 11(3): 241-247[2017-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1370713/>. DOI: 10.1261/rna.7240905.
- [7] DOHI O, YASUI K, GEN Y, et al. Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma[J/OL]. Int J Oncol, 2013, 42(2): 411-418.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3583616/>. DOI:10.3892/ijo.2012.1724.
- [8] GRADY W M, PARKIN R K, MITCHELL P S, et al. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(27): 3880-3888.

- DOI:10.1038/onc.2008.10.
- [9] YEUNG C L, TSANG T Y, YAU P L, et al. Human papillomavirus type 16 E6 suppresses microRNA-23b expression in human cervical cancer cells through DNA methylation of the host gene C9orf3 [J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(7): 12158-12173[2017-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5355333/>. DOI:10.18632/oncotarget.14555.
- [10] DOUGLAS P, YE R, TRINKLE-MULCAHY L, et al. Polo-like kinase 1 (PLK1) and protein phosphatase 6 (PP6) regulate DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) phosphorylation in mitosis[J/OL]. *Biosci Rep*, 2014, 34(3): e00113[2017-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4069685/>. DOI:10.1042/BSR20140051.
- [11] YORK A, HUTCHINSON E C, FODOR E. Interactome analysis of the influenza A virus transcription/replication machinery identifies-protein phosphatase 6 as a cellular factor required for efficient virus replication[J]. *J Virol*, 2014, 88(22): 13284-13299. DOI:10.1128/JVI.01813-14.
- [12] ZIEMBIK M A, BENDER T P, LARNER J M, et al. Functions of protein phosphatase-6 in NF- κ B signaling and in lymphocytes[J/OL]. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45(3): 693-701[2017-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5473023/>. DOI:10.1042/BST20160169
- [13] STEFANSSON B, BRAUTIGAN D L. Protein phosphatase 6 subunit with conserved Sit4- associated protein domain targets Ikappa-Bepsilon[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 22624-22634. DOI:10.1074/jbc.M601772200.
- [14] YATIMA A, BENNE C, SOBHIAN B, et al. NOTCH1 nuclear interactome reveals key regulators of its transcriptional activity and oncogenic function[J/OL]. *Mol Cell*, 2012, 48(3): 445-458 [2017-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3595990/>. DOI:10.1016/j.molcel.2012.08.022.
- [收稿日期] 2017-05-18 [修回日期] 2017-07-24
[本文编辑] 党瑞山

· 读者·作者·编者·

《中国肿瘤生物治疗杂志》征稿和征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的高级学术刊物,为中国精品科技期刊、RCCSE 中国权威学术期刊、中国中文核心期刊、中国科学引文数据库核心源期刊、中国科技核心期刊、中国人民解放军优秀医学期刊,为同行专家评审期刊和开放获取(OA)期刊;获 2015-2017 年度中国科协精品科技期刊工程项目资助。本刊主要报道肿瘤生物治疗领域基础研究和临床应用的新成果、新理论、新技术和新经验,常设有述评、院士论坛、专家论坛、研究快报、青年学者论坛、基础研究、临床研究、转化医学、技术方法、短篇论著、学术争鸣、文献综述、个案报告等栏目,以从事肿瘤防治的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及相关学科科技人员为读者对象。月刊,每月 25 日出版,国内外公开发行。

本刊主编为中国医学科学院院长、中国免疫学会理事长曹雪涛院士,编委会由包括 15 名院士和 9 名外籍专家的众多名家大师组成。本刊已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、荷兰《医学文摘》(EMbase)等 10 个国际著名检索系统收录。本刊在国内肿瘤学领域的学术地位和影响力名列前茅,在国际学术界的显示度日益广泛和增强。

本刊使用网络远程投稿、审稿系统和编校管理系统进行编辑出版工作,工作效率高,编校质量好,论文发表周期短。另设“快速发表通道”,将有较高创新性的论文以 2~3 个月的速度快速发表。

热忱欢迎广大肿瘤防治工作者通过本刊网站投稿系统、电子信箱踊跃投稿。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每册定价 15.00 元,全年定价 180.00 元。邮发代号: 4-576。

联系地址:上海市翔殷路 800 号;第二军医大学免疫楼《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部(邮编 200433)

联系人: 韩丹 黄静怡 联系电话: 021-55620605×22, 021-81871002×22

传真: 021-81871007 网址: www.biother.org

电子邮箱: cjcb@biother.org