

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.02.002

· 研究快报 ·

## miR-92b 通过调控 *EZH2* 基因的表达抑制食管癌细胞 Eca109 的增殖和侵袭

刘飞, 孟令娇, 刘世娜, 谷丽娜, 李娟, 张建东, 吴云艳, 桑梅香 (河北医科大学第四医院 科研中心, 河北石家庄 050011)

**[摘要]** **目的:** 探讨食管癌(esophageal carcinoma, EC)细胞中 miR-92b 对组蛋白甲基转移酶 zeste 同源物增强子 2 (enhancer of zeste homolog 2, *EZH2*) 基因表达的调控作用, 以及对 EC 细胞增殖和侵袭能力的影响。**方法:** 选取河北医科大学第四医院科研中心保存的 2016 年 1 月至 2017 年 1 月 15 例 EC 患者手术瘤组织标本, 通过生物信息学软件预测分析对 *EZH2* 可能调控的 miRNAs, 将预测的 miRNAs mimic 分别转染人 EC 细胞 Eca109 后, 采用实时荧光定量 PCR、Western blotting 和双荧光素酶报告基因实验验证 miRNAs 对 *EZH2* 基因的靶向调控作用。同时将 *EZH2* 过表达质粒共转染至 Eca109, 然后采用 CCK-8 法、流式细胞术和 Transwell 细胞侵袭及迁移实验分别检测 miRNAs 和 *EZH2* 表达变化对 EC 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响。**结果:** 转染 miR-92b 的 Eca109 细胞中 *EZH2* mRNA 与 mimic-NC 相比明显降低 ( $P < 0.01$ ), 转染 miR-92b 的 Eca109 细胞中 *EZH2* 蛋白表达水平明显低于转染 mimic-NC 组 ( $0.525 \pm 0.052$  vs  $0.689 \pm 0.026$ ,  $P < 0.01$ )。生物信息学软件分析显示, miR-92b、let-7a 及 miR-25 可与 *EZH2* 基因 3' 端非翻译区的结合位点相结合, 但仅有 miR-92b 可以调控 *EZH2* 基因的表达, 且 miR-92b 表达与 *EZH2* mRNA 表达成负相关 ( $P < 0.01$ )。miR-92b mimic 转染后 *EZH2* mRNA、蛋白及荧光素酶报告基因活性均明显下调 (均  $P < 0.01$ ), 对 Eca109 细胞凋亡无明显影响 ( $P > 0.05$ ); miR-92b mimic 转染能抑制 Eca109 细胞的增殖和侵袭及迁移能力 ( $P < 0.01$ )。而 EC 细胞转染 *EZH2* 过表达质粒后, miR-92b mimic 对 Eca109 细胞增殖和侵袭及迁移能力的抑制作用明显减弱 ( $P < 0.01$ )。**结论:** miR-92b 可抑制 Eca109 细胞的增殖和侵袭及迁移能力, 其作用机制可能与靶向调控抑癌基因 *EZH2* 的表达有关。

**[关键词]** 食管癌; miR-92b; zeste 同源物增强子 2 基因; 增殖; 侵袭; 迁移

**[中图分类号]** R735.1; R730.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)02-0118-07

## miR-92b suppresses growth and invasion of esophageal cancer Eca109 cells by regulating *EZH2* gene expression

LIU Fei, MENG Lingjiao, LIU Shina, GU Lina, LI Juan, ZHANG Jiandong, WU Yunyan, SANG Meixiang (Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the regulating effects of miR-92b on the expression of *EZH2* (enhancer of zeste homolog 2) gene and the proliferation and invasion abilities of esophageal cancer (EC) cells. **Methods:** Fifteen cases of esophageal cancer tissues that preserved in the research center of the Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University from January 2016 to January 2017 were selected for this study. The bioinformatics tool was used to predict the possible miRNAs that might target *EZH2*. The mimics of predicted miRNAs were transfected into human esophageal carcinoma cell lines Eca109, respectively. Then the regulation effect of miRNAs on *EZH2* gene expression was validated by real-time PCR, Western blotting and dual luciferase reporter experiment. In the meanwhile, *EZH2* over-expression plasmids were co-transfected into esophageal carcinoma Eca109 cells, and the effects of miRNAs and *EZH2* expression changes on the proliferation, apoptosis, invasion and migration of esophageal carcinoma cells were detected by CCK-8 method, Flow Cytometry, Transwell Invasion and migration assay, respectively. **Results:** Bioinformatics analysis showed that miR-92b, let-7a and miR-25 could combine with potential binding sites at 3'-terminal non-translation region of *EZH2* gene. Real-time PCR results showed that only miR-92b was able to regulate the expression of *EZH2*, and miR-92b was negatively correlated to *EZH2* in esophageal cancer ( $P < 0.01$ ). Compared with mimic-NC, the expression of *EZH2* mRNA, protein and luciferase activity in Eca109 cells after miR-

**[基金项目]** 河北省杰出青年基金资助项目 (No.2016206410)。Project supported by the Science Fund for Outstanding Youth of Hebei Province (No.2016206410)

**[作者简介]** 刘飞 (1986-), 男, 硕士, 实习研究员, 主要从事肿瘤免疫的基础研究, E-mail: kyzzlf@hotmail.com

**[通信作者]** 桑梅香 (SANG Meixiang, corresponding author), 博士, 研究员, 硕士生导师, 主要从事肿瘤方面的基础研究, E-mail: mxsang@hotmail.com

92b mimic transfection was significantly down-regulated (both  $P<0.01$ ). However, miR-92b mimic transfection had no effect on the apoptosis of Eca109 cells. Moreover, the proliferation, invasion and migration of Eca109 cells were significantly inhibited after transfection with miR-92b-mimic ( $P<0.01$ ). In addition, after co-transfection with *EZH2* over-expression plasmids, the effects of miR-92b-mimic on the proliferation, invasion and migration of Eca109 cells were significantly weakened ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** miR-92b can inhibit the proliferation, invasion and migration of esophageal carcinoma cells, and its mechanism may be related to its target regulation of *EZH2*.

**[Key words]** esophageal carcinoma(EC); miR-92b ;enhancer of zeste homolog 2(*EZH2*) gene; proliferation; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(2): 118-124. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.02.002]

在世界范围内,食管癌(esophageal carcinoma, EC)已经成为严重威胁人类生命杀手之一。EC是导致美国中年男性癌症死亡的重要类型之一,其5年生存率低于20%<sup>[1]</sup>。在我国每年新发EC患者数量高达25万,其发病率及病死率均居第4位<sup>[2]</sup>。组蛋白甲基转移酶 zeste 同源物增强子 2(enhancer of zeste homolog 2, *EZH2*) 基因位于7号染色体长臂7q35,含有20个外显子,编码746个氨基酸,属于多梳家族。它可以通过催化组蛋白H3赖氨酸27发生三甲基化进而沉默靶基因的表达<sup>[3]</sup>。笔者先前的研究<sup>[4-6]</sup>表明,*EZH2*基因在EC组织中高表达,与患者不良预后明显相关,且过表达*EZH2*能够增加EC细胞增殖和侵袭能力。但是在EC组织中*EZH2*过表达的机制目前尚不清楚。miRNAs是进化上保守的、长度约为21~23个核苷酸的非蛋白质编码RNA,它能够通过结合靶基因3'非翻译区抑制靶基因的表达<sup>[7]</sup>。miRNAs大约能够调控1/3人类mRNA表达,miR-92b在肺癌<sup>[8]</sup>、成胶质细胞瘤<sup>[9]</sup>、垂体腺瘤<sup>[10]</sup>、膀胱癌<sup>[11]</sup>、肝癌<sup>[12]</sup>、骨肉瘤<sup>[13]</sup>、EC<sup>[14]</sup>等恶性肿瘤中表达水平异常,与肿瘤的发生、发展、增殖及迁移密切相关。然而,在EC中miR-92b与*EZH2*间是否存在调控关系,尚未见报道。本研究探讨EC细胞中miR-92b对组蛋白甲基转移酶*EZH2*基因表达的调控作用及对EC细胞增殖和侵袭能力的影响,以期为EC治疗提供新靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取河北医科大学第四医院科研中心保存的2016年1月至2017年1月15例EC患者手术癌组织标本,经病理学检测确诊。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。采集的每例标本存于-80℃冰箱中,用于RNA的提取。

### 1.2 细胞和主要试剂

人EC细胞株Eca109来自于河北医科大学第四医院科研中心。RPMI DMEM培养基、胰蛋白酶购自美国Gibco公司,胎牛血清购自上海依科赛生物制品有限公司,RIPA细胞裂解液购自上海贝博生物公司,TRIzol购自美国Invitrogen公司,Platinum SYBR Su-

perMix试剂、FuGENE HD、pGL3-Promoter质粒和pRL-TK质粒以及双荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自美国Promega公司,Hiperfect transfection reagent转染试剂购自德国QIAGEN公司,凋亡检测试剂盒购于上海贝博生物试剂公司,miR-25、miR-92b及let7a的模拟物(mimics)及无关miRNAs(NC mimics)购自苏州吉玛基因公司,pCMV6 Entry-EZH2-Myc-DDK质粒均购自ORIGENE公司,PCR引物购自锐博公司和英潍捷基贸易有限公司,定点突变试剂盒购自美国NEB公司,miDETECTA Track™ miRNA qRT-PCR starter kit购自广州锐博生物科技有限公司,兔抗人EZH2多克隆抗体和鼠抗人的β-actin单克隆抗体购自美国Invitrogen公司,羊抗兔二抗购自Abcam公司,Transwell小室(孔径3.0 μm)购自美国Corning公司,Matrigel购自美国BD公司,姬姆萨染液购自珠海贝索生物技术有限公司,CCK-8试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自上海威奥生物科技有限公司。

### 1.3 生物信息学方法预测调控*EZH2*的miRNAs并合成miR-25、miR-92b及let-7a模拟物

检索生物信息学工具网站<http://www.TargetScan.org>,预测对*EZH2*调控的miRNAs。选取与*EZH2*基因存在结合位点的miR-25、miR-92b及let-7a用于本研究。人miR-25、miR-92b及let-7a模拟物(mimic)和其阴性对照(negative control, NC)均由上海吉玛制药技术有限公司合成。miR-25-mimic的正义链序列为5'-CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA-3',反义链序列为5'-AGACCGAGACAAGUGCAAUGUU-3'; miR-92b-mimic的正义链序列为5'-UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC-3',反义链序列为5'-AGGCCGGGACGAGUGCAAUAUU-3'; Let-7a-mimic的正义链序列为5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3',反义链序列为5'-CUAUACAACCUACUACCUCAUU-3'; mimic-NC的正义链序列为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反义链序列为5'-ACGUGACACGUUCGAGAATT-3'。

### 1.4 细胞培养及转染

Eca109细胞用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的DMEM培养基培养,置于

37 °C、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。miRNA 转染前1 d, 将Eca109细胞分别接种到6孔板中, 待细胞汇合度为60%~70%时, 按Hiperfect transfection reagent转染试剂说明书操作。细胞转染首先分4组, Eca109细胞中转染miR-92b-mimic、miR-25-mimic、let-7a-mimic及mimic-NC; 然后再增设EZH2过表达质粒转染组和空载体(vector)转染组, 分为mimic-NC+vector转染组、miR-92b-mimic+vector转染组、mimic-NC+EZH2转染组、miR-92b-mimic+EZH2转染组。转染时, 各组片段的终浓度均为100 nmol/L。转染6 h后, 换为正常的完全培养液继续培养48或72 h, 然后用于后续实验。

### 1.5 实时荧光定量PCR法检测miR-92b、miR-25、let-7a及EZH2 mRNA的表达水平

收集转染48 h后4组的Eca109细胞, 用TRIzol试剂提取各组Eca109细胞及15例EC患者的总RNA, 按反转录试剂盒和实时荧光定量PCR试剂盒说明书提供的方法进行反转录, 并利用荧光定量PCR方法检测EZH2(以GAPDH为内参照)、miR-92b、miR-25和let-7a(以U6为内参照)表达量。检测miR-92b、miR-25和let-7a表达水平的PCR反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 5 s、60 °C 20 s、72 °C 15 s, 共35个循环; 65 °C 5 min。检测EZH2表达水平的PCR反应条件: 95 °C 预变性5 min, 95 °C 15 s、60 °C 1 min, 共40个循环; 72 °C 5 min。以2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算各组细胞miR-92b、miR-25、let-7a和EZH2 mRNA的相对表达水平。实验重复3次。

### 1.6 Western blotting检测EZH2蛋白的表达水平

收集mimic-NC、miR-92b-mimic、mimic-NC+vector、mimic-NC+EZH2、miR-92b-mimic+vector及miR-92b-mimic+EZH2组细胞。用RIPA蛋白裂解液裂解细胞, 冰浴条件下用超声细胞粉碎机持续超声裂解蛋白约5 min, 冰上静置30 min, 离心后取上清液。BCA法进行蛋白定量, 取蛋白质30 μg/孔进行10% SDS-PAGE, 将电泳分离后的蛋白质电转移至硝化纤维素膜上, 用脱脂奶粉封闭1~3 h; 加入兔抗人EZH2多克隆抗体(体积稀释比例为1:1 000)和兔抗人β-actin单克隆抗体(体积稀释比例为1:1 000, 作为内参照), 4 °C反应过夜, TBST漂洗3次(每次10 min); 然后加入山羊抗兔IgG(体积稀释比例为1:5 000), 室温反应2 h, TBST漂洗3次(每次10 min)。ECL化学发光, 用Image J灰度分析软件进行分析。实验重复3次。

### 1.7 双荧光素酶报告基因实验检测miR-92b对EZH2基因的靶向作用

由英潍捷基贸易有限公司合成EZH2基因的3' UTR, 上下游引物序列分别为5'-AATCTCGAG-

CATCTGCTACCTCC-3'和5'-CCGCTCGAGTTG-CAAAAATTCAC-3'(含Xho I酶切位点)。以Eca109细胞cDNA为模板, PCR获得EZH2基因3'UTR中含miR-92b结合位点的长度为262 bp, 经Xho I酶切并插入pGL3-Promoter质粒载体中。测序鉴定插入序列准确无误后, 将该重组质粒命名为pGL3-EZH2-3'UTR WT。此外, 利用定点突变将EZH2基因3'UTR的miR-92b潜在结合部位5'-GUACCAGUGAAU-UUUUGCAAUA-3'序列中划线碱基删除, 并将该重组质粒命名为pGL3-EZH2-3'UTR-MUT。

将Eca109单细胞悬液计数后均匀接种于96孔板中(每孔2×10<sup>4</sup>个细胞, 200 μl)。24 h后分别向Eca109细胞中转染miR-92b-mimic及mimic-NC。48 h后将0.2 μg pGL3-EZH2-3'UTR-WT或pGL3-EZH2-3'UTR-MUT与0.02 μg pRL-TK质粒共转染至每孔细胞中, 置于37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的培养箱中培养12 h后, 弃去旧培养液, 添加新鲜的含10%胎牛血清的DMEM培养液, 继续培养36 h。细胞经PBS洗涤3次后, 弃尽洗液, 每孔中加入200 μl细胞裂解液, 振荡裂解细胞15 min, 于4 °C条件下1 000×g离心5 min, 吸出上清液并加到空白不透明的96孔板中。按双荧光素酶活性检测试剂盒说明书提供的方法, 在多功能酶标仪上检测, 计算相对荧光素酶活性。相对荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。实验重复3次。

### 1.8 CCK-8法检测Eca109细胞增殖能力

分别收集转染了mimic-NC+vector、miR-92b-mimic+vector、mimic-NC+EZH2及miR-92b-mimic+EZH2的4组Eca109细胞, 以2×10<sup>3</sup>个/孔的密度接种细胞于96孔板, 常规培养。分别于0、24、48和72 h在各孔中加入CCK-8试剂10 μl, 继续培养细胞1 h。然后用酶标仪测定波长为450 nm处各孔的光密度(D)值。各个时间点设置3个复孔, 计算平均值。实验重复3次。

### 1.9 流式细胞术检测转染miR-92b后Eca109细胞的凋亡情况

用无EDTA的胰蛋白酶消化转染后的Eca109细胞, 并收集至EP管中。用200 μl Annexin V结合缓冲液重悬细胞。每管加5 μl Annexin-V/FITC溶液, 4 °C避光孵育15 min。再加入5 μl 20 μg/ml PI溶液, 轻轻混匀, 4 °C避光孵育5 min。将细胞转入流式管中, 上机进行检测。Annexin V单染代表细胞发生早期凋亡, Annexin V/PI双染代表细胞处于晚期凋亡。实验重复3次。

### 1.10 Transwell实验检测Eca109细胞侵袭及迁移能力

将4 °C过夜溶解的Matrigel胶用无血清的培养

基按 1:7 的比例稀释,操作在冰上进行,避免 Matrigel 胶在常温下出现不可逆性凝固。将带有 8 μm 微孔聚碳酸酯膜的 Transwell 小室置于无菌 24 孔板中,由此形成上下两个小室,向上室中加入 25 μl Matrigel 胶,快速晃动 24 孔板,使其均匀铺满小室底面,避免产生气泡,37 °C 无菌保持过夜,确保 Matrigel 胶充分聚合。Transwell 迁移实验为上室中不铺 Matrigel 胶。收集 mimic-NC+vector、miR-92b-mimic+vector、mimic-NC+*EZH2* 及 miR-92b-mimic+*EZH2* 的 4 组 Eca109 细胞,培养 24 h 后用胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液并计数。将各组细胞分别加入 Transwell 小室的上室(1.5×10<sup>5</sup>个/小室),下室中加入 600 μl 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,常规培养 48 h,用棉签擦净上室细胞,PBS 清洗后姬姆萨染色,于倒置相差显微镜下(×200)观察并拍照,随机观察 5 个视野,计数穿膜细胞数。实验重复 3 次。

1.11 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计学软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间的均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK-*q* 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 转染 miR-92b 降低 Eca109 细胞中 *EZH2* mRNA 和蛋白的表达水平

使用生物信息学软件 TargetScan 预测靶向调控 *EZH2* 的 miRNAs,最终选择了 3 个 miRNAs (let-7a、miR-92b 和 miR-25),并在 Eca109 细胞中进行转染上述 miRNA mimic,结果(图 1)显示,转染 miR-92b 的 Eca109 细胞中 *EZH2* mRNA 与 mimic-NC 相比明显降低(*P*<0.01)。转染 miR-92b 的 Eca109 细胞中 *EZH2* 蛋白表达水平明显低于转染 mimic-NC 组[(0.525 ±

0.052) vs(0.689 ± 0.026),*t*=4.856,*P*=0.008]。

2.2 miR-92b 靶向作用于 *EZH2* 基因

生物信息学软件分析结果(图 2A)显示,*EZH2* 基因 3' UTR 上存在潜在的 miR-92b 结合位点。双荧光素酶报告基因分析结果(图 2B)显示,miR-92b 转染组 *EZH2* 相对荧光强度明显低于对照组(*t*=17.69,*P*=0.001),当 *EZH2* 3' UTR 中的 miR-92b 结合位点发生突变后,miR-92b 过表达对报告基因的抑制作用消失,即 miR-92b-mimic 转染组与 mimic-NC 组的表达无明显差异(*t*=1.747,*P*=0.155)。对 15 例 EC 组织中 *EZH2* 与 miR-92b 表达的相关性分析结果(图 2C)显示,*EZH2* 与 miR-92b 两者之间表达存在负相关(*r*=-0.6847,*P*<0.01)。

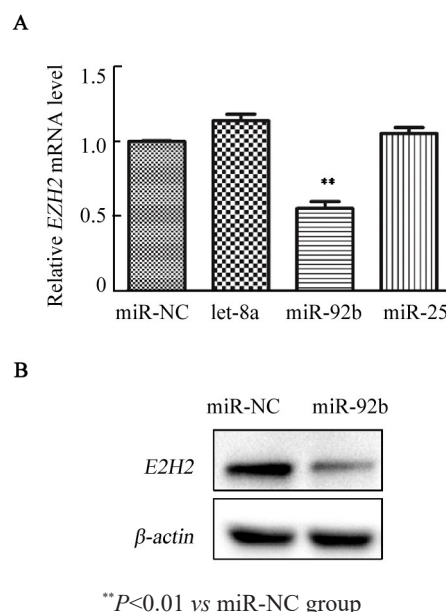
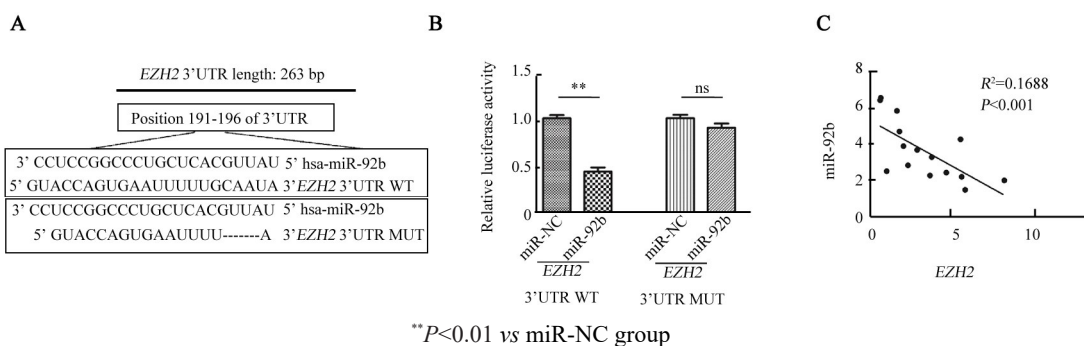


图 1 转染 miR-92b 后 Eca109 细胞中 *EZH2* mRNA(A) 和蛋白(B)的表达水平

Fig.1 Expression level of *EZH2* mRNA (A) and protein (B) in Eca109 cells after transfection with miR-92b mimics



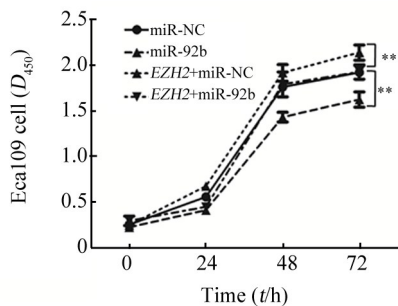
A: The wild-type and mutant type of miR-92b binding sequence; B: Relative fluorescence value by dual-luciferase reporter assay; C: Correlation between miR-92b and *EZH2* mRNA in EC tissues

图 2 预测并验证 *EZH2* 基因是 miR-92b 直接作用靶点

Fig.2 Prediction and validation of *EZH2* gene as the target of miR-92b

2.3 转染 miR-92b mimic 明显抑制 Eca109 细胞的增殖

CCK-8 法检测结果(图 3)显示,转染 miR-92b-mimic 组的 Eca109 细胞增殖能力较转染 mimic-NC 组明显减弱( $q=6.446, P<0.01$ );而联合转染 *EZH2* 过表达质粒后,miR-NC+*EZH2* 组增殖能力较 mimic-NC 组相比明显增强( $q=4.659, P<0.01$ ); miR-92b-mimic+*EZH2* 对 Eca109 细胞增殖的抑制作用与转染 mimic-NC 组相比无明显差异( $q=0.079, P>0.05$ )。



\*\* $P<0.01$  vs miR-NC group

图 3 转染 miR-92b 及过表达 *EZH2* 对 Eca109 细胞增殖的影响  
Fig.3 Effect of miR-92b transfection and *EZH2* over-expression on proliferation of Eca109 cells

2.4 转染 miR-92b mimic 显著抑制 Eca109 细胞的 *EZH2* 蛋白的表达量

Western blotting 检测结果(图 4)显示,与 mimic-NC+control 相比,miR-92b-mimic+control 组 *EZH2* 蛋白的表达量显著减少( $q=23.32, P<0.01$ )。与 mimic-NC+control 相比,miR-NC+*EZH2* 组 *EZH2* 蛋白的表达量显著增加( $q=12.04, P<0.01$ )。与 mimic-NC+control 组相比,miR-92b-mimic+*EZH2* 组 *EZH2* 蛋白表达量无明显差异( $q=0.3945, P>0.05$ )。

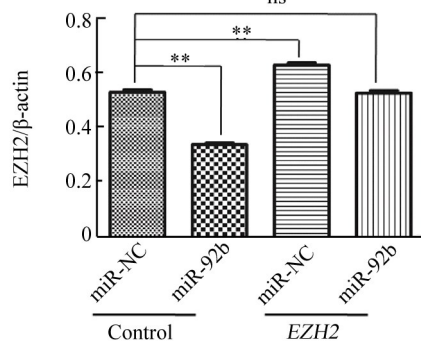
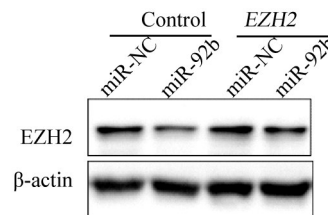
2.5 转染 miR-92b mimic 对 Eca109 细胞凋亡无明显影响

流式细胞技术检测结果(图 5)显示,转染 miR-92b-mimic 组 Eca109 细胞的凋亡率与转染 miR-NC 组相比无明显差异( $t=1.225, P>0.05$ ),表明 miR-92b 对 Eca109 细胞凋亡无显著影响。

2.6 转染 miR-92b mimic 降低 Eca109 细胞的侵袭及迁移能力

Transwell 侵袭实验结果(图 6A)显示,转染 miR-92b-mimic 组的 Eca109 细胞穿膜数比转染 mimic-NC 组明显减少( $q=12.88, P<0.01$ ),而联合转染 *EZH2* 过表达质粒后,与 mimic-NC+control 组相比,miR-92b+*EZH2* 组细胞的侵袭能力未见明显变化( $q=0.1277, P>0.05$ )。Transwell 细胞迁移实验结果(图 6B)显示,转染 miR-92b-mimic 组穿膜细胞数比转染 mimic-NC 组减少( $q=31.78, P<0.01$ ),而联合转染 *EZH2* 过表达质

粒后,与 mimic-NC+control 组相比,miR-92b+*EZH2* 组细胞的侵袭能力未见明显变化( $q=2.971, P>0.05$ )。



\*\* $P<0.01$  vs miR-NC+ vector group

图 4 转染 miR-92b 联合过表达 *EZH2* 对 *EZH2* 蛋白表达水平的影响

Fig.4 Effect of co-transfection of miR-92b mimics and *EZH2* over-expression vectors on the protein expression of *EZH2*

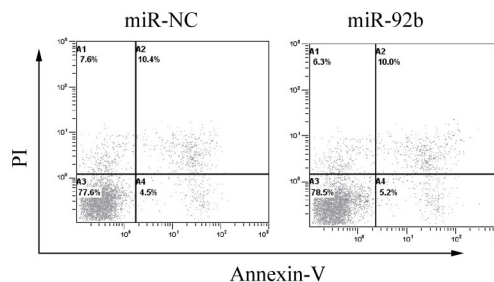


图 5 转染 miR-92b mimic 对 Eca109 细胞凋亡的影响

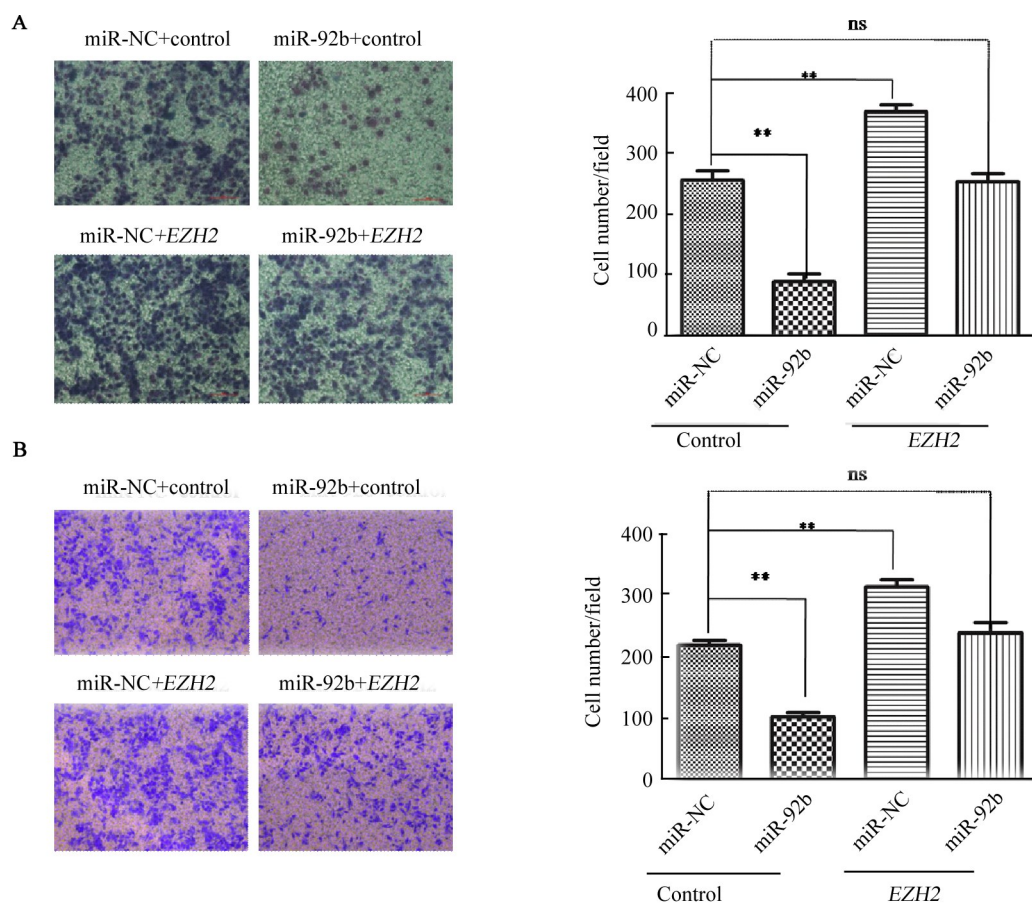
Fig.5 Effect of miR-92b mimic transfection on apoptosis of Eca109 cells

3 讨论

*EZH2* 是 PRC2 复合体的催化亚基,它的羧基末端 SET 区具有 H3K27 甲基转移酶功能,能够催化组蛋白 H3 赖氨酸 27 发生三甲基化,三甲基化后的 *H3K27*(*H3K27me3*)能将 PRC2 复合物招募到特定的靶基因位点,从而沉默靶基因的表达<sup>[3]</sup>。*EZH2* 表达与多种恶性肿瘤的生长及转移相关,Shin 等<sup>[15]</sup>研究表明,*EZH2* 能够使 *TIMP3* 启动子发生组蛋白 H3 赖氨酸 27 三甲基化抑制其表达,从而破坏了 MMPs/*TIMPs* 平衡,导致细胞外基质降解增加,前列腺癌细胞侵袭能力增强。Hou 等<sup>[16]</sup>研究显示,miR-101-3p 能

够通过作用于 *EZH2* 基因 3' UTR 从而抑制其表达, 进而抑制肺鳞状细胞癌细胞的增殖、侵袭及迁移能力。Zhang 等<sup>[17]</sup> 研究表明, miR-137 在宫颈癌中低表达, miR-137 上调可以通过抑制 *EZH2* 的表达进而抑制宫颈癌细胞增殖和迁移能力。本课题组前期的研究<sup>[4-6]</sup> 表明, *EZH2* 与 *H3K27me3* 与食管鳞状细胞癌患者预

后明显相关, *EZH2* 与 *H3K27me3* 与 EC 细胞的增殖、侵袭及迁移能力有关。以上这些研究结果表明, *EZH2* 是促进肿瘤细胞增殖及侵袭的重要促癌因子, 因此寻找特异性的靶向 *EZH2* 表达的小分子药物对治疗肿瘤生长和转移有重要的临床意义。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs miR-NC group

图6 miR-92b 过表达联合 *EZH2* 基因过表达对 Eca109 细胞侵袭(A)及迁移(B)能力的影响(姬姆萨染色,  $\times 200$ )

Fig. 6 Effect of co-transfection of miR-92b mimics and *EZH2* over-expression vectors on the invasion (A) and migration (B) of Eca109 cells(Giemsa staining,  $\times 200$ )

尽管有许多研究<sup>[18-19]</sup>报道了 miRNA 参与了 EC 细胞发生、发展以及侵袭和迁移, 但其具体分子作用机制还不是十分清楚。研究<sup>[20]</sup>显示, miRNA 对靶基因表达主要起负性调控作用, 主要通过自身‘种子序列’与靶基因 3' UTR 结合, 然后经由 RNA 介导的沉默复合物(RNA-inducingsilence complex, RISC)来实现。miR-92b 与多种肿瘤的发生发展密切相关, 例如在骨肉瘤中过表达 miR-92b 通过抑制 RECK 促进骨肉瘤细胞增殖、迁移及侵袭能力<sup>[13]</sup>。Zhuang 等<sup>[12]</sup>在体内外实验研究表明, miR-92b 通过靶向作用于 smad7 促进肝癌细胞发生增殖及转移。Wang 等<sup>[21]</sup>研究表明 miR-92b 抑制剂通过调节 beta-catenin/TCF-4 信号通路, 对神经胶质瘤的生长及侵袭起抑制作用。而 Ma

等<sup>[13]</sup>研究 miR-92b 在食管癌组织中的表达时发现, miR-92b 在伴有远处淋巴结转移的食管癌组织中的表达明显低于不伴有远处转移的食管癌组织, 并且发现 miR-92b 高表达的患者预后较好。其另一项研究<sup>[22]</sup>认为, miR-92b 抑制食管癌细胞发生侵袭和转移与靶向抑制 Integrin  $\alpha 6$  表达有关。以上这些结果显示, miR-92b 在不同肿瘤及靶基因中可能发挥癌基因及抑癌基因的不同作用。

本研究通过采用生物信息学软件分析的方法预测了对 *EZH2* 可能调控的 miRNAs, 实时荧光定量 PCR 及蛋白质印迹检测结果显示, 转染 miR-92b mimic 的食管癌 Eca109 细胞 *EZH2* mRNA 及蛋白表达水平明显降低。通过双荧光素酶报告基因实验证明 miR-

92b 直接与 *EZH2* 基因的 3'UTR 结合而抑制其表达; 并且在 EC 组织的研究发现 *EZH2* 与 miR-92b 表达呈负相关。进一步通过 CCK-8 和 Transwell 侵袭及迁移实验证明, miR-92b 与 *EZH2* 在 EC 细胞增殖、侵袭及迁移能力方面具有相反功能。

总之, 本研究结果表明, miR-92b 具有抑制 EC 细胞增殖、侵袭及迁移能力, 这种作用是通过靶向作用于组蛋白甲基转移酶 *EZH2* 来实现的, 提示 miR-92b 通过靶向抑制 *EZH2* 的表达能够抑制 EC 细胞的增殖、侵袭及迁移。本研究结果为进一步探索 miR-92b 在 EC 进展过程中的作用机制提供了实验基础。

### [参考文献]

- [1] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29. DOI:10.3322/caac.21208.
- [2] LIN Y, TOTSUKA Y, HE Y, et al. Epidemiology of esophageal cancer in Japan and China [J]. J Epidemiol, 2013, 23(4): 233-242.
- [3] MARGUERON R, LI G, SARMA K, et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms [J]. Mol Cell, 2008, 32(4): 503-518. DOI:10.1016/j.molcel.2008.11.004.
- [4] LIU F, GU L, CAO Y, et al. Aberrant overexpression of EZH2 and H3K27me3 serves as poor prognostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma patients [J]. Biomarkers, 2016, 21(1): 80-90. DOI:10.3109/1354750X.2015.1118537.
- [5] 刘飞, 尹丹静, 黄卫娜, 等. EZH2 和 H3K27me3 的表达对食管癌细胞迁移和侵袭能力的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(5): 490-496. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.006.
- [6] 黄卫娜, 古丽娜, 刘飞, 等. EZH2 基因对人食管癌细胞增殖的影响 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(9): 960-965. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.006.
- [7] HATA A, LIEBERMAN J. Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer[J]. Sci Signal, 2015, 8(368): re3. DOI: 10.1126/scisignal.2005825.
- [8] LIU X, TIAN X D, LIU Y, et al. Regulation of Twist in the metastasis of non-small cell lung cancer by miR-92b[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(19): 4003-4010.
- [9] XU T, WANG H, JIANG M, et al. The E3 ubiquitin ligase CHIP/miR-92b/PTEN regulatory network contributes to tumorigenesis of glioblastoma[J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(2): 289-300.
- [10] LIU B, PANG B, WANG Q, et al. EZH2 upregulation correlates with tumor invasiveness, proliferation, and angiogenesis in human pituitary adenomas[J]. Hum Pathol, 2017, 3(28): 1433-1439. DOI: 10.1016/j.humphath.2017.03.028.
- [11] HUANG J, WANG B, HUI K, et al. miR-92b targets DAB2IP to promote EMT in bladder cancer migration and invasion[J]. Oncol Rep, 2016, 36(22): 1693-1701. DOI:10.3892/or.2016.4940.
- [12] ZHUANG L K, YANG Y T, MA X, et al. MicroRNA-92b promotes hepatocellular carcinoma progression by targeting Smad7 and is mediated by long non-coding RNA XIST[J/OL]. Cell Death Dis, 2016, 7: e2203[2017-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4855645/. DOI:10.1038/cddis.2016.100.
- [13] ZHOU Z, WANG Z, WEI H, et al. Promotion of tumour proliferation, migration and invasion by miR-92b in targeting RECK in osteosarcoma[J]. Clin Sci (Lond), 2016, 130(9): 921-930. DOI: 10.1042/CS20150509.
- [14] MA G, JING C, LI L, et al. MicroRNA-92b represses invasion-metastasis cascade of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 20209-20222. DOI:10.18632/oncotarget.7747.
- [15] SHIN Y J, KIM J H. The role of EZH2 in the regulation of the activity of matrix metalloproteinases in prostate cancer cells[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(1): e30393[2017-10-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/22272343/. DOI: 10.1371/journal.pone.0030393.
- [16] HOU Y, LI L, JU Y, et al. MiR-101-3p regulates the viability of lung squamous carcinoma cells via targeting EZH2[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(10): 3142-3149. DOI: 10.1002/jcb.25836.
- [17] ZHANG H, YAN T, LIU Z, et al. MicroRNA-137 is negatively associated with clinical outcome and regulates tumor development through EZH2 in cervical cancer[J]. J Cell Biochem, 2017, 335(2): 92-97. DOI:10.1002/jcb.26259.
- [18] 周智锋, 王玲, 林万松, 等. 携带非 A5.1 型 MHC I 类相关分子 A 穿膜区等位基因中晚期食管癌患者对 NK 细胞免疫治疗的敏感性高[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(6): 640-644. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.011.
- [19] 连晶瑶, 李红, 黄岚, 等. 体外扩增人脐带血来源的 NK 细胞对食管癌细胞的促凋亡作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(2): 117-121. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.003
- [20] MAO Q, QUAN T, LUO B, et al. MiR-375 targets KLF4 and impacts the proliferation of colorectal carcinoma[J]. Tumour Biol, 2016, 37(15): 463-471. DOI:10.1007/s13277-015-3809-0.
- [21] WANG K, WANG X, ZOU J, et al. miR-92b controls glioma proliferation and invasion through regulating Wnt/beta-catenin signaling via Nemo-like kinase[J]. Neuro Oncol, 2013, 15(10): 578-588. DOI: 10.1093/neuonc/not004.
- [22] MA G, JING C, HUANG F, et al. Integrin alpha6 promotes esophageal cancer metastasis and is targeted by miR-92b[J]. Oncotarget, 2017, 8(123): 6681-6690. DOI:10.18632/oncotarget.14259.

[收稿日期] 2017-10-12

[修回日期] 2017-12-29

[本文编辑] 王映红

欢迎访问《中国肿瘤生物治疗杂志》网站 [www.biother.org](http://www.biother.org)