

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.06.002

· 基础研究 ·

miR-1269a 在食管癌组织中的表达及其对 KYSE30 细胞恶性生物学行为的影响

魏思思, 李晓亚, 董佩, 戴素丽, 张琰, 赵连梅, 单保恩(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 miR-1269a 在食管癌组织中的表达及其对 KYSE30 细胞恶性生物学行为的影响, 并研究其可能的作用机制。**方法:** 选取 90 例在河北医科大学第四医院通过手术切除的食管癌组织标本, 并收集正常食管永生上皮细胞和食管癌细胞系, 应用 qPCR 实验检测癌组织和细胞系 miR-1269a 的表达水平。将 miR-1269a 的 mimics 和 inhibitor 分别转染食管癌细胞 KYSE30 后, 用 MTS、Transwell 和克隆形成实验分别检测 miR-1269a 对 KYSE30 细胞增殖、侵袭、迁移和克隆形成能力的影响。通过生物信息学软件预测 miR-1269a 的靶基因, 并通过 WB 实验和双荧光素酶报告基因实验验证 miR-1269a 对靶基因的调控作用。转染 SOX6 质粒后, 采用 MTS、Transwell 和克隆形成实验分别检测 SOX6 对 KYSE30 细胞的增殖、侵袭、迁移和克隆形成能力的影响, 并利用回复实验进一步验证结果。**结果:** 食管癌组织中 miR-1269a 的表达水平显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$); 与正常食管上皮细胞相比, 食管癌细胞系中 miR-1269a 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。miR-1269a mimics 转染组 KYSE30 细胞的增殖、侵袭、迁移和克隆形成能力显著高于 mimics NC 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); inhibitor 转染组 KYSE30 细胞的增殖、侵袭、迁移和克隆形成能力显著低于 inhibitor NC 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。miR-1269a 可与 SOX6 的 3' UTR 区相结合, 且过表达 miR-1269a 后, KYSE30 细胞的 SOX6 表达水平和荧光素酶报告基因的活性均显著降低 ($P < 0.05$)。回复实验表明, 高表达 miR-1269a 可以促进食管癌细胞增殖、侵袭和迁移 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 同时高表达 SOX6 后, miR-1269a 的促进作用出现部分逆转。**结论:** miR-1269a 在食管癌组织和细胞系中表达上调, 能够促进 KYSE30 细胞的增殖、迁移、侵袭和克隆形成等恶性生物学行为, 其机制可能是通过抑制靶基因 SOX6 实现的。

[关键词] 食管癌; miR-1269a; KYSE30 细胞; SOX6 基因; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R392.12; R735.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)06-0623-09

Expression of miR-1269a in ESCC tissues and its effect on malignant biological behaviors of KYSE30 cells

WEI Sisi, LI Xiaoya, DONG Pei, DAI Suli, ZHANG Cong, ZHAO Lianmei, SHAN Baoen (Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] Objective: To investigate the expression of miR-1269a in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues and its effect on the malignant biological behaviors of ESCC KYSE30 cells, as well as to explore the underlying mechanism. **Methods:** Ninety specimens of ESCC tissues and adjacent para-cancerous tissues were obtained from patients underwent surgery in Fourth Hospital, Hebei Medical University. In addition, normal esophageal immortalized epithelial cells and esophageal cancer cell lines were also collected. The expression level of miR-1269a in above mentioned tissues and cell lines was examined by Real-time fluorescent quantitative PCR. After being transfected with miR-1269a mimics and inhibitors, the effects of miR-1269a on proliferation, migration, invasion and colony formation of KYSE30 cells were detected by MTS, Transwell and colony formation assay, respectively. The bioinformatics tool was used to predict the possible target genes of miR-1269a. Then the regulation effect of miR-1269a on target gene expression was validated by WB and Dual-luciferase reporter assay. After being transfected with SOX6 plasmid, the effects of SOX6 on the proliferation, migration, invasion and colony formation of KYSE30 cells were detected by MTS, Transwell and colony formation assay, respectively. At last, rescue assay was used to confirm the results. **Results:** The expression level of miR-1269a in ESCC tissues was significantly higher

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81772550);河北省科技计划基金资助项目(No.162777138)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81772550), and the Science and Technology Foundation of Hebei Province (No. 162777138)

[作者简介] 魏思思(1992-),女,硕士生,实习研究员,主要从事肿瘤分子生物学的基础研究,E-mail:weisisi19920202@163.com

[通信作者] 单保恩(SHAN Baoen, corresponding author),男,博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤免疫学、基因诊断、抗肿瘤中药研究和肿瘤生物治疗研究,E-mail: shanbaoen@163.com

than that in adjacent para-cancerous tissues ($P<0.05$), and the expression level of miR-1269a in ESCC cell lines was significantly elevated compared with the normal epithelial cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). The capacities of proliferation, invasion, migration and colony formation of KYSE30 cells in miR-1269a mimics transfection group were obviously higher than those in mimics NC group, while those abilities in miR-1269a inhibitor transfection group were significantly lower than those in inhibitor NC group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Bioinformatics analysis showed that miR-1269a could combine with 3' UTR region at SOX6 gene; and after miR-1269a over-expression, the expression level of SOX6 and luciferase activity in KYSE30 cells were significantly reduced ($P<0.05$). Rescue assay showed that miR-1269a over-expression could promote the proliferation, invasion and migration of KYSE 30 cells, while simultaneous transfection of SOX6 could partially reverse the promotion effect of miR-1269a mimics. **Conclusion:** The expression level of miR-1269a in ESCC tissues and cell lines is significantly increased, and it could enhance proliferation, migration, invasion and colony formation of KYSE30 cell line. And its mechanism may be related to the suppression of its target gene SOX6.

[Key words] esophageal cancer; miR-1269a; KYSE30 cell; SOX6 gene; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(6): 623-631. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.06.002]

食管癌是恶性程度最高的癌症之一,其病死率居世界癌症相关死亡的第6位^[1]。中国的食管癌患者数量居世界首位。食管癌根据病理分型可分为2类:食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)和食管腺癌(esophageal adenocarcinoma, EAC),中国食管癌患者绝大部分(>90%)为ESCC。食管癌恶性程度高,其发病隐匿、进展快、预后差,患者的5年生存率一般低于20%。因此,进一步探究食管癌的发病机制、筛选食管癌诊断的分子标志物、寻找有效的药物靶点具有重要的临床意义。miRNA是一类长度19~25 nt的小分子非编码RNA,其在细胞凋亡^[2]、增殖和分化^[3]、肿瘤形成和进展^[4-5]、病毒感染和炎症^[6-7]中均发挥重要作用。miRNA可以通过其种子序列与靶基因mRNA的3' UTR 碱基互补配对,导致mRNA降解或者翻译抑制,从而在转录后水平调控基因的表达^[8]。研究^[9]表明,miRNA可以通过多个靶基因发挥功能,如在肝细胞癌中,高表达的miR-1269a通过抑制FOXO1的表达,从而促进肝癌细胞的增殖^[4];在结直肠癌中,上调的miR-1269a通过直接靶向Smad7和HOXD10,从而促进TGF- β 信号通路转导,进而促进结直肠癌细胞的转移^[10];在肺癌中,miR-1269a通过靶向TP53和casepase-9促进细胞的生存和增殖^[11]。在肝癌中,miR-1269a通过与SOX6的3' UTR区结合,从而促进肝癌细胞的增殖和克隆形成能力^[12]。然而,在食管癌中,miR-1269a的具体功能及作用机制尚少见报道。本研究通过探讨miR-1269a在食管癌中的表达及其对食管癌细胞KYSE30恶性生物学行为的影响,进一步阐明miR-1269a对靶基因SOX6表达的调控作用,旨在为食管癌的靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人食管癌细胞系KYSE30、Eca109、NE2、NE3、TE1、TE13、KYSE30、KYSE150、KYSE180、KYSE170、

KYSE410、KYSE510和永生化食管癌细胞等来自于河北医科大学第四医院科研中心细胞库。RPMI 1640培养基、胰蛋白酶购自美国Gibco公司,胎牛血清购自Biological Industries(BI)公司,TRIzol购自美国Invitrogen公司,Platinum SYBR SuperMix试剂、MTS细胞增殖分析试剂盒均购自美国Promega公司。PCR引物和Lipofect AMINE 2000转染试剂均购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒和BCA蛋白定量检测试剂盒购自美国Thermo公司,RIPA细胞裂解液购自北京索莱宝生物科技有限公司,miR-1269a-mimics和inhibitor购自苏州吉玛基因公司,Transwell小室(孔径3.0 μm)购自美国Corning公司,Matrigel购自美国BD公司,结晶紫染液购自碧云天生物技术有限公司,兔抗人SOX6和GAPDH抗体购自美国Proteintech公司,DyLight™ 800标记的羊抗兔IgG荧光二抗购自美国Rockland公司。

1.2 组织标本的收集

收集2014年8月至2017年9月在河北医科大学第四医院胸外科首次进行手术切除的90例食管癌患者新鲜癌组织及其相应的癌旁组织(距癌组织边缘 ≥ 5 cm)。所有标本均经手术后病理检查确诊为ESCC。于病案室收集患者姓名、性别、年龄、手术记录、病理号码、病理报告等临床资料。58例患者有完整的病理信息,其中男性38例,女性20例;年龄41~74岁,中位年龄64岁;按照国际抗癌联盟推出的第八版食管癌TNM分期标准进行分期,I期6例,II期35例,III期17例;肿瘤直径<5 cm者17例,肿瘤直径 ≥ 5 cm者41例;有淋巴结转移者28例,无淋巴结转移者30例。所有患者均无其他重大基础疾病史,手术前均未进行放、化疗和免疫治疗。本研究获得医院伦理委员会的批准,所用的标本均得到患者的知情同意。

1.3 细胞培养及转染

KYSE30细胞用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的RPMI 1640培养基,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。取对数生长期的细胞进行实验。

转染前 1 d, 将 KYSE30 细胞接种到 6 孔板中, 待细胞汇合度达到 60%~70% 时按 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书操作。miR-1269a-mimics 和 miR-1269a-inhibitor 转染 6 h 后, 换为正常的完全培养基继续培养 24 或 48 h, 然后用于后续实验。

1.4 qPCR 实验检测食管癌组织和细胞系中 miR-1269a 的表达水平

用 TRIzol 裂解组织或细胞, 提取总 RNA。取 2 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA (逆转录条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min)。以此 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环。引物序列 miR-1269a F: 5'-GCTGGACTGAGCCGTGC-3', R: 5'-CAGTGC-GTGTCGTGGAGT-3'; 以 U6 为内参, U6 引物序列 F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', R: 5'-GGCTGAGAAGTGAATTCCA-3'。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值表示 miR-1269a 的相对表达水平, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值 > 1 表示 miR-1269a 的表达水平上调, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值 ≤ 1 表示 miR-1269a 的表达水平下调。

1.5 MTS 实验检测 miR-1269a 对 KYSE30 细胞增殖能力的影响

接种转染后的各组细胞于 96 孔板中 (2 $\times 10^3$ 个细胞/孔), 每组设 6 个复孔。KYSE30 细胞继续培养 24、48、72 和 96 h, 加入 MTS 试剂 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h, 用酶联免疫检测仪检测 492 nm 波长处各孔的光密度 (D) 值。以时间为横坐标, D 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.6 Transwell 小室法检测 miR-1269a 对 KYSE30 细胞迁移和侵袭能力的影响

细胞迁移实验: 收集转染后的各组细胞, 悬浮于无血清的 RPMI 1640 培养基中, 计数细胞。将 Transwell 小室置于无菌 24 孔板中, 将各组细胞等量加入 Transwell 小室的上室 (1.5 $\times 10^5$ 个/小室), 下室加入 600 μl 含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 继续培养细胞 24 h。取出 Transwell 小室, 用棉签小心擦净上室内侧面的细胞, 用 4% 多聚甲醛溶液于常温下固定 30 min, 风干后结晶紫染色 20 min, 自来水清洗后于倒置相差显微镜下 ($\times 200$) 观察并拍照, 随机观察 5 个视野, 计数穿膜细胞数。

细胞侵袭实验: 将置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 溶解过夜的 Matrigel 用无血清 RPMI 1640 培养基按 1:7 的体积比例进行稀释。Transwell 小室置于无菌 24 孔板中, 向小室中加入 20 μl Matrigel, 快速晃动 24 孔板, 使其均匀铺满小室底面。待 Matrigel 凝固后, 其他操作按细胞迁移实验进行。继续培养 24 h 后检测细胞的侵袭能力。

1.7 WB 实验检测 miR-1269a 对食管癌组织和

KYSE30 细胞 SOX6 蛋白表达水平的影响

收集转染后的各组细胞, 用 RIPA 裂解液提取各组细胞的总蛋白。BCA 法进行蛋白质定量。取 40 μg /孔进行 10% SDS-PAGE, 将电泳分离后的蛋白转移到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液在室温下封闭 1 h, 加入兔抗人 SOX6 (体积稀释比例为 1:1 000) 和兔抗人 GAPDH 抗体 (内参照, 体积稀释比例为 1:5 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜; 加入 DyLightTM 800 标记的羊抗兔 IgG 荧光二抗 (体积稀释比例为 1:100 000), 室温反应 1 h。用 Odyssey 红外荧光成像仪进行扫描, 以目的蛋白条带的灰度值/内参照蛋白条带的灰度值作为目的蛋白的相对表达水平。

1.8 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-1269a 对 SOX6 基因的靶向作用

由上海捷瑞生物工程有限公司合成 SOX6 基因的 3' UTR, 并插入 pGL3-Promoter 质粒载体中, 将该重组质粒命名为 pGL3-SOX6-3' UTR WT。此外, 利用定点突变将 SOX6 基因的 3' UTR 的 miR-1269a 的潜在结合部位 5'-CAGUCCA-3' 序列突变为 5'-UGC-GAUU-3', 并将该重组质粒命名为 pGL3-SOX6-3' UTR MUT。将 293T 细胞悬液计数后均匀接种 12 孔板中, 待细胞汇合度达 60%~70% 时分别将 miR-1269a-mimics 和 mimics-NC, pGL3-SOX6-3' UTR WT 或 pGL3-SOX6-3' UTR MUT 质粒共转染至每孔细胞中 (实验共分 4 组: pGL3-SOX6-3' UTR WT+mimics-NC, pGL3-SOX6-3' UTR WT+miR-1269a-mimics, pGL3-SOX6-3' UTR MUT+mimics-NC, pGL3-SOX6-3' UTR MUT+miR-1269a-mimics), 转染 6 h 后更换为新鲜的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 继续培养 36 h。之后按照 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) 试剂盒说明书进行操作, 检测各孔的荧光素酶活性。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。

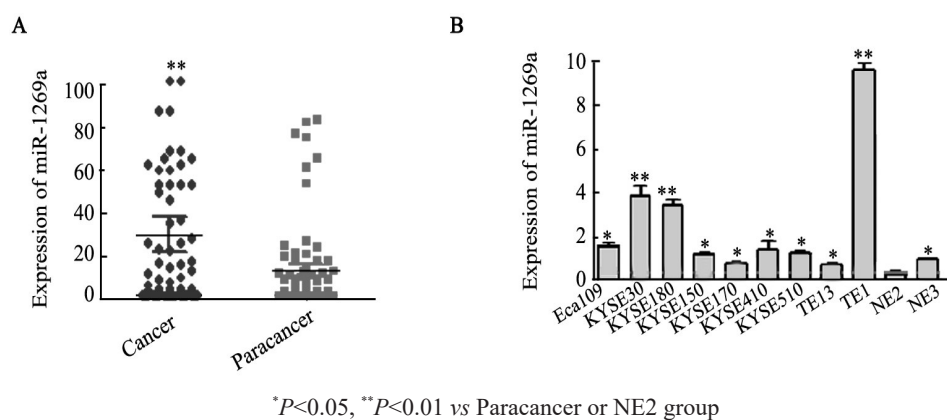
1.9 统计学处理

本研究中的各项实验均独立重复 3 次。应用 SPSS13.0 统计学软件对数据进行处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用配对 t 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 食管癌组织及细胞系中 miR-1269a 表达水平明显上调

qPCR 实验检测结果显示, 食管癌组织中 miR-1269a 的表达水平明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$, 图 1A); 与正常食管上皮细胞 NE2 相比, 食管癌细胞系中 miR-1269a 的表达水平显著升高 (图 1B)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Paracancer or NE2 group

图1 食管癌组织及细胞系中 miR-1269a 表达水平

Fig.1 Expression of miR-1269a in esophageal cancer tissues and cell lines

2.2 miR-1269a 表达升高促进 KYSE30 细胞的增殖和克隆形成能力

瞬时转染 miR-1269a-mimics 和 miR-1269a-inhibitor 后, qPCR 实验检测结果显示,与对照组相比,转染 miR-1269a-mimics 后 KYSE30 细胞中 miR-1269a 表达明显升高($P < 0.01$,图 2A);而转染 miR-1269a-inhibitor 后 KYSE30 细胞中 miR-1269a 表达显著降低($P < 0.01$,图 2B)。

MTS 实验检测结果(图 2C、D)显示,与对照组相比,转染 miR-1269a-mimics 组 KYSE30 细胞增殖能力明显升高,而转染 miR-1269a-inhibitor 组 KYSE30 细胞增殖能力明显降低(均 $P < 0.05$)。

克隆形成实验检测结果(图 2E、F)显示,与对照组相比,转染 miR-1269a-mimics 组 KYSE30 细胞克隆形成明显增多,而转染 miR-1269a-inhibitor 组 KYSE30 细胞克隆形成明显减少(均 $P < 0.01$)。

2.3 过表达 miR-1269a 提高 KYSE30 细胞的迁移和侵袭能力

Transwell 细胞迁移实验检测结果显示,与对照组相比,过表达 miR-1269a 后,穿过小室基底膜的 KYSE30 细胞数目明显增加($P < 0.01$,图 3A),表明 KYSE30 细胞的迁移能力增强;而敲低 miR-1269a 后,与对照组相比, KYSE30 细胞的迁移能力明显减弱($P < 0.01$,图 3B)。

Transwell 细胞侵袭实验表明,与对照组相比,过表达 miR-1269a 后,能够促进 KYSE30 细胞的侵袭能力($P < 0.01$,图 3A);敲低 miR-1269a 后,与对照组相比,能够抑制 KYSE30 细胞的侵袭能力($P < 0.01$,图 3B)。

2.4 SOX6 是食管癌组织 miR-1269a 的靶点基因

通过查找数据库 miRBase、TargetScan 和 miR-Walk 发现,SOX6 可能是 miR-1269a 的一个直接靶点基因。生物信息学分析结果(图 4A)显示,SOX6 基因

的 3'UTR 区存在 miR-1269a 的潜在结合位点。采用双荧光素报告基因实验检测结果(图 4B)显示,SOX6 野生型组中,miR-1269a 转染组荧光强度显著低于 miR-NC 组($P < 0.05$)。当 SOX6 的 3'UTR 区 miR-1269a 的结合位点突变后,miR-1269a 转染组荧光强度与 miR-NC 组无显著差异($P > 0.05$)。上述结果表明,SOX6 是 miR-1269a 的靶点基因。

在 KYSE30 细胞中转染 miR-1269a-mimics 和 miR-1269a-inhibitor 后, qPCR 和 Wb 实验检测结果(图 4C、D)显示,过表达 miR-1269a 后,SOX6 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低(均 $P < 0.05$);敲降 miR-1269a 后,SOX6 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高(均 $P < 0.05$)。

2.5 过表达 SOX6 抑制 KYSE30 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

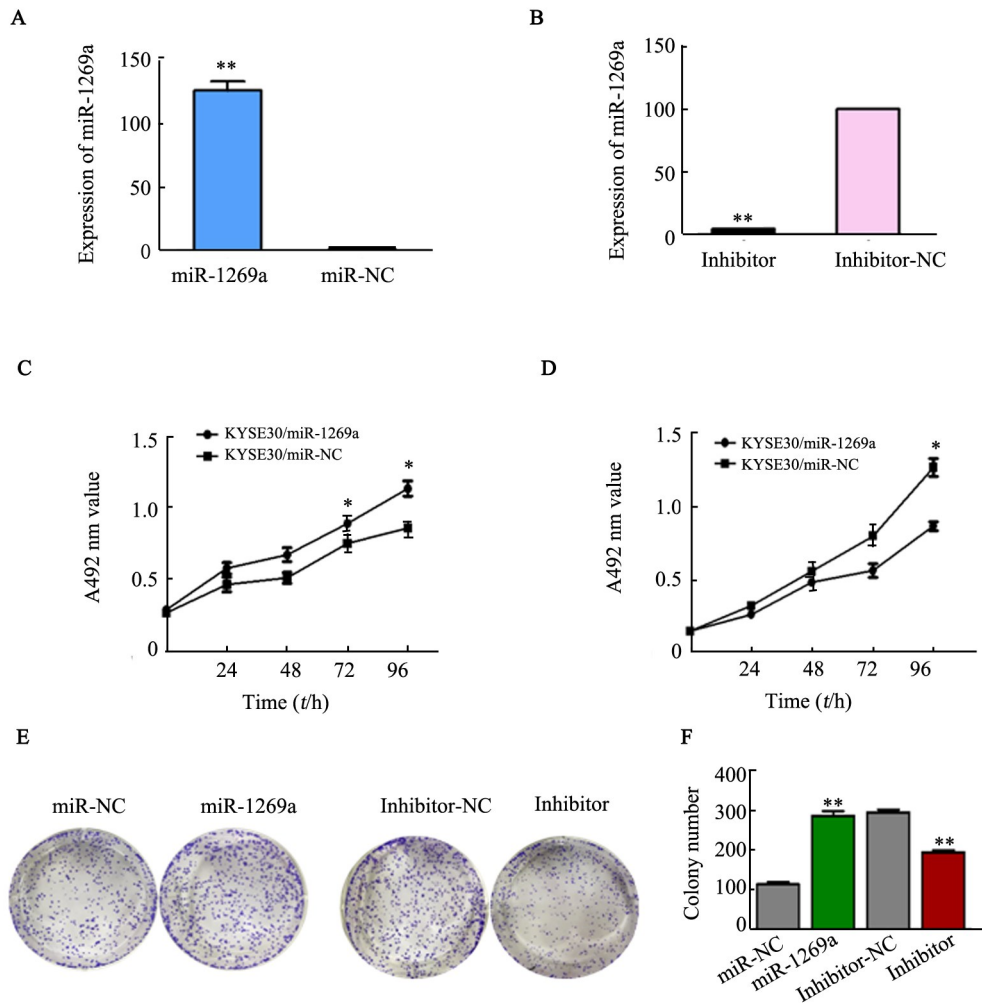
qPCR 实验检测结果(图 5A、B)显示,与癌旁组织和细胞系 NE2 相比,SOX6 在食管癌组织和细胞系中的表达水平显著下调(均 $P < 0.05$)。WB 实验(图 5C)证实,转染 SOX6 质粒后,胞内 SOX6 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。MTS 实验检测结果(图 5D)显示,与对照组相比,转染 SOX6 后, KYSE30 细胞的增殖能力明显减弱($P < 0.05$)。Transwell 细胞实验检测结果(图 5E)显示,过表达 SOX6 后,穿过小室膜的 KYSE30 细胞数目显著减少,细胞侵袭和迁移能力均降低(均 $P < 0.01$)。克隆形成实验检测结果(图 5F)显示,与对照组相比,转染 SOX6 后, KYSE30 细胞克隆形成能力明显减弱($P < 0.01$)。上述结果表明,SOX6 能够抑制食管癌的进展。

2.6 miR-1269a 通过调节 SOX6 的表达促进 KYSE30 细胞的增殖、迁移和侵袭

为了进一步证实 miR-1269a 是通过调节 SOX6 的表达而促进 KYSE30 细胞的增殖、迁移和侵袭,本研究进行了回复实验。qPCR 和 WB 实验检测结果

(图6A、B)显示,过表达SOX6的同时过表达miR-1269a,SOX6的表达水平受到明显抑制($P<0.01$)。MTS实验检测结果(图6C)显示,过表达miR-1269a后,KYSE30细胞的增殖能力升高($P<0.05$);同时过表达SOX6,KYSE30细胞的增殖能力有所减弱,部分

增殖能力得到回复。Transwell实验检测结果(图6D)显示,过表达miR-1269a后,KYSE30细胞的迁移和侵袭能力增强,同时过表达SOX6后,细胞的迁移和侵袭能力部分回复。上述结果表明,miR-1269a通过抑制SOX6的表达而发挥促癌作用。



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

A: The transfection efficiency of miR-1269a-mimics; B: The transfection efficiency of miR-1269a-inhibitor;
C: Effect of miR-1269a over-expression on proliferation; D: Effect of miR-1269a knockdown on proliferation;
E: Effect of miR-1269a over-expression or knockdown on clonogenesis; F: Statistical histograms of clonogenesis

图2 促进或抑制miR-1269a表达对KYSE30细胞增殖和克隆形成能力的影响

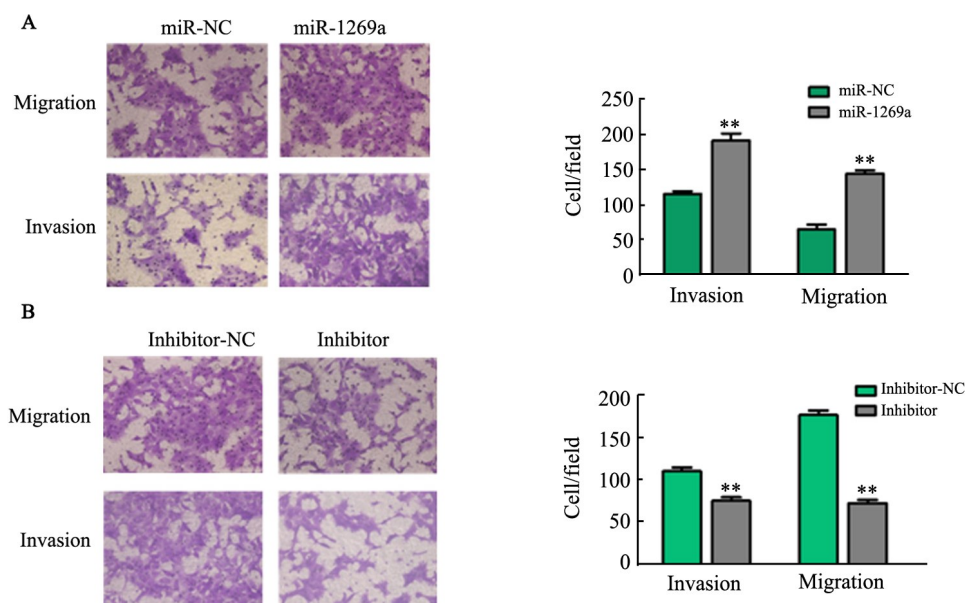
Fig.2 Effect of miR-1269a over-expression/knockdown on the proliferation and cloning ability of KYSE30 cells

3 讨论

食管癌是世界范围内常见的消化道恶性肿瘤之一,中国食管癌的发病率和病死率均居世界首位。食管癌恶性程度高,发病隐匿、进展快、预后较差,目前,食管癌临床诊断和治疗均缺乏特异性的分子靶点和有效的治疗药物。越来越多的研究^[13-14]表明,miRNA在细胞的增殖、分化、转移、凋亡及恶性转化等过程具有重要作用,是多种肿瘤诊断、预后和治疗

的有意义的作用靶点。

miR-1269a在其他多种肿瘤中的功能已有报道,如在肝癌中miR-1269a促进肿瘤的发生和进展^[10],在非小细胞肺癌中miR-1269a促进细胞的增殖和克隆形成^[15],但其在食管癌中的功能并不明确。miR-1269a在多种癌种中发挥促癌功能,可见miR-1269a对肿瘤的发生发展具有重要作用,因此本研究在食管癌中也探究其功能和作用机制。

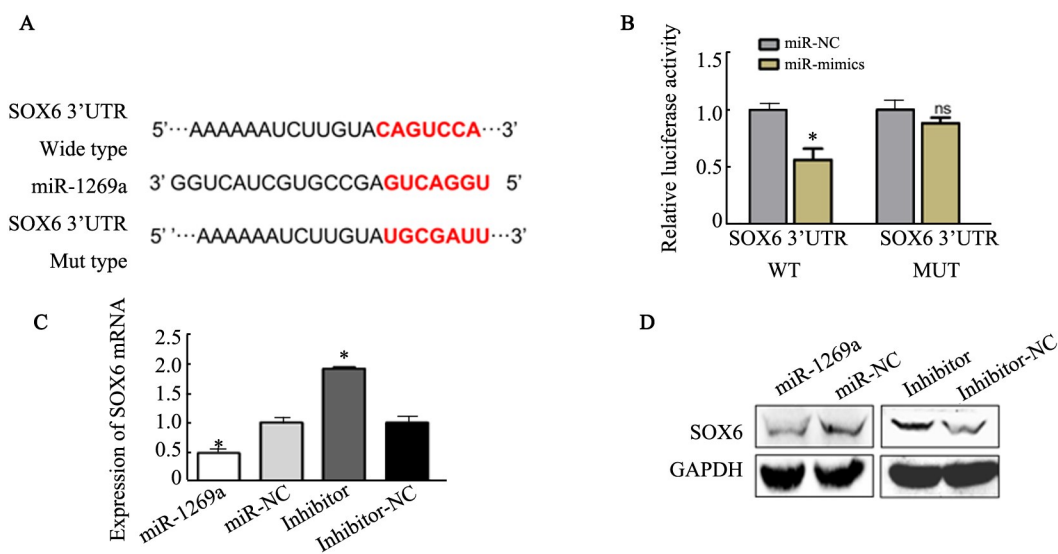


**P<0.01 vs miR-NC or Inhibitor-NC group

A: Effect of miR-1269a-mimics on migration and invasion; B: Effect of miR-1269a-inhibitor on migration and invasion

图3 过表达或敲降 miR-1269a 对 KYSE30 细胞迁移和侵袭能力的影响(×100)

Fig.3 Effects of microRNA-1269a over-expression or knockdown on migration and invasion of KYSE30 cells(×100)



*P<0.05 vs miR-NC or Inhibitor-NC group

A: The wild-type and mutant-type of miR-1269a binding sequence; B: Relative fluorescence activity by dual-luciferase reporter assay;

C: Expression level of SOX6 mRNA after transfection with miR-1269a mimics and inhibitor; D: Expression level of SOX6 protein after

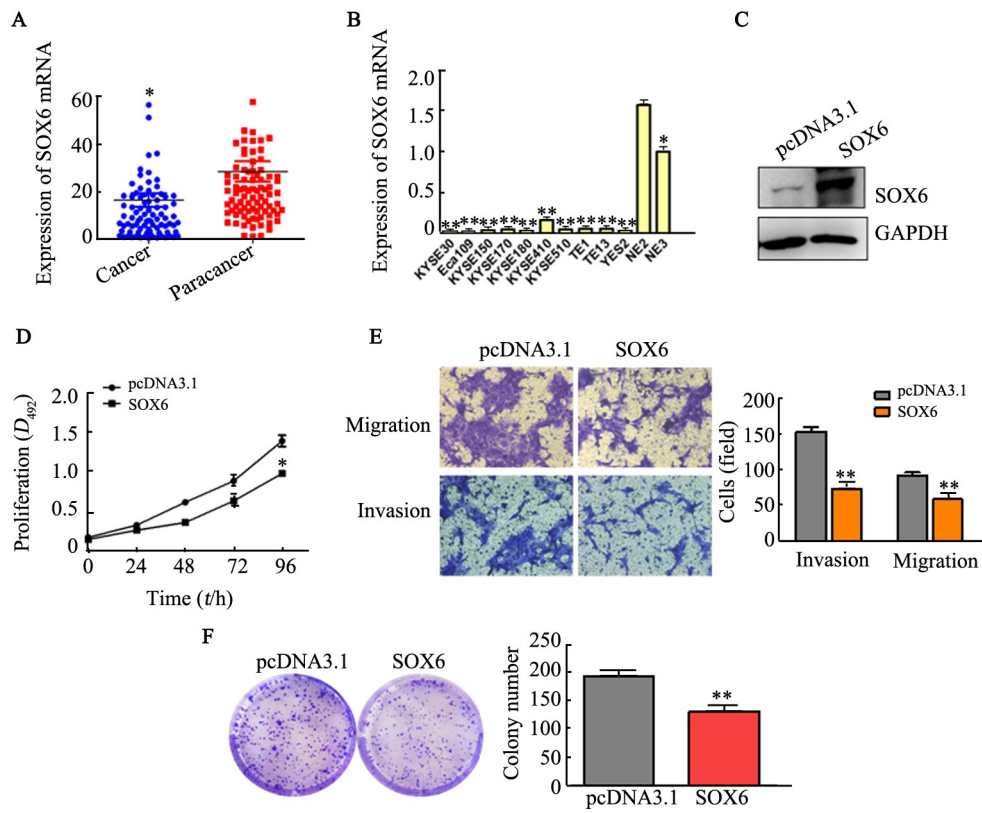
transfection with miR-1269a mimics and inhibitor

图4 预测并验证 SOX6 基因是 miR-1269a 的作用靶点

Fig.4 Prediction and validation of SOX6 as the target of miR-1269a

本研究通过 qPCR 检测 90 例食管癌及癌旁组织中 miR-1269a 的表达,结果显示,miR-1269a 在食管癌组织中的表达明显高于癌旁组织;MTS 增殖、Transwell 及克隆形成实验显示,miR-1269a 促进食管癌细胞的增殖、迁移、侵袭及克隆形成。上述结果表明,miR-1269a 在食管癌中发挥促癌功能。通过 3 种预测靶基因的软件预测 miR-1269a 的靶基因,并将 3 个预

测结果进行 overlap,通过进一步的生物信息学分析,最终选定 SOX6 为 miR-1269a 的潜在靶基因,并用荧光素酶报告基因实验进行验证。结果显示,SOX6 是 miR-1269a 的靶基因。高表达 miR-1269a 能明显抑制 SOX6 mRNA 和蛋白水平的表达,表明 miR-1269a 通过与 SOX6 mRNA 的 3'UTR 结合抑制 SOX6 mRNA 和蛋白水平的表达。

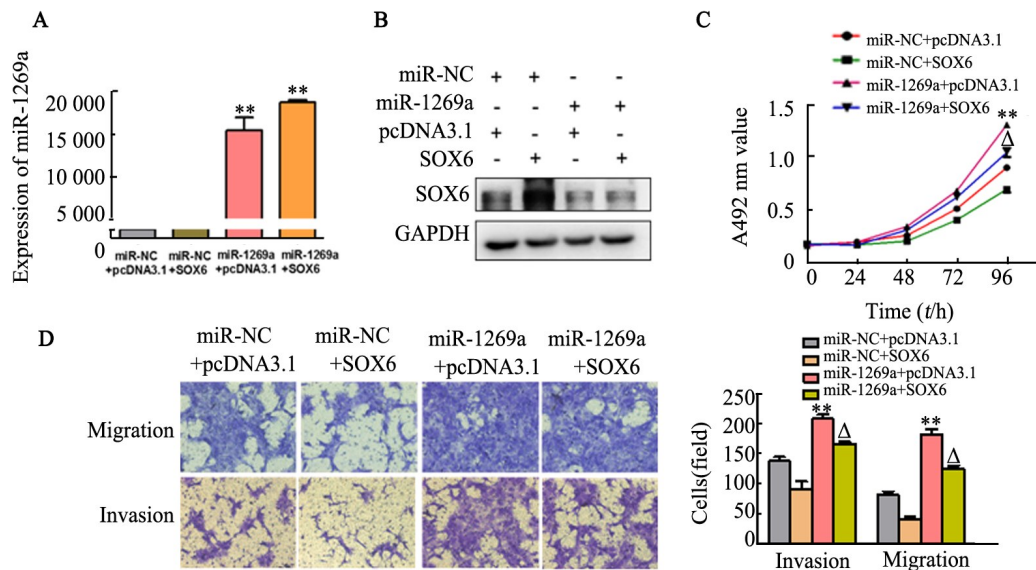


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Paracancer, NE2 or pcDNA3.1 group

A: Expression level of SOX6 mRNA in ESCC tissues; B: Expression level of SOX6 mRNA in ESCC cell lines; C: Expression level of SOX6 protein after transfection with SOX6 plasmid; D: Effect of SOX6 on KYSE30 cells proliferation; E: Effect of SOX6 on migration and invasion of KYSE30 cells; F: Effect of SOX6 on clonogenesis of KYSE30 cells

图5 过表达SOX6对KYSE30细胞增殖、迁移侵袭和克隆形成能力的影响

Fig.5 Effects of SOX6 over-expression on proliferation, migration, invasion and clonogenesis of KYSE30 cells



** $P < 0.01$ vs miR-NC+pcDNA3.1 or miR-NC+SOX6 group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs miR-1269a+pcDNA3.1 group

A: Expression of miR-1269a after co-transfection with miR-1269a-mimics and SOX6 plasmid; B: Expression of SOX6 protein after co-transfection with miR-1269a-mimics and SOX6 plasmid; C: Effect on proliferation after co-transfection with miR-1269a-mimics and SOX6 plasmid; D: Effect on migration and invasion after co-transfection with miR-1269a-mimics and SOX6 plasmid ($\times 100$)

图6 同时过表达miR-1269a和SOX6对KYSE30细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

Fig.6 Effects of simultaneous over-expression of miR-1269a and SOX6 on proliferation, migration and invasion of KYSE30 cells

SOX6是SOX转录因子家族的成员,SOX6在食管癌中低表达,通过上调P53和P21并且下调cyclin D1/CDK4、cyclin A和 β -catenin从而抑制食管癌的进展^[16]。其他多项研究^[17-19]也表明,SOX6作为肿瘤抑制因子通过影响细胞增殖和周期分布进而抑制肿瘤的发生发展。在恶性肿瘤如肝癌、食管癌、骨肉瘤和胰腺癌中,SOX6均发挥抑癌功能,因此SOX6表达降低可能是促进肿瘤发生发展的机制之一^[20-23]。本研究在食管癌细胞系及永生食管细胞中检测SOX6的表达,发现SOX6在食管癌细胞中的表达水平明显低于永生食管细胞中的表达;在临床组织样本中检测SOX6的表达,结果表明,SOX6在食管癌组织中的表达明显低于食管正常组织中的表达。过表达SOX6能够显著抑制食管癌细胞的增殖、克隆和迁移侵袭能力。

此外,已有研究^[24-26]显示,SOX6可被多种miRNA调控,在食管癌中,miR-208通过下调SOX6的表达而促进细胞生长;在结肠癌中,miR-766通过靶向SOX6而促进细胞增殖;在肝癌中,miR-96通过调节SOX6表达而促进细胞增殖和转移。本研究也证实,SOX6作为miR-1269a的靶基因而调节食管癌的进展。

综上所述,miR-1269a在食管癌组织中高表达,通过直接靶向SOX6,促进癌细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭,发挥促癌基因的作用。

[参考文献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] MA J, LI T F, HAN X W, et al. Knockdown of lncRNA ANRIL suppresses cell proliferation, metastasis, and invasion via regulating miR-122-5p expression in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(2): 205-214. DOI:10.1007/s00432-017-2543-y.
- [3] WANG J R, CHEN T Z, SHAN G Z. miR-148b regulates proliferation and differentiation of neural stem cells via wnt/ β -catenin signaling in rat ischemic stroke model[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 329. DOI:10.3389/fncel.2017.00329.
- [4] YU X F, MI L, DONG J, et al. Long intergenic non-protein-coding RNA 1567 (LINC01567) acts as a "sponge" against microRNA-93 in regulating the proliferation and tumorigenesis of human colon cancer stem cells[J/OL]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 716[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5674857/>. DOI:10.1186/s12885-017-3731-5.
- [5] XU G R, ZHU H X, ZHANG M H, et al. Histone deacetylase 3 is associated with gastric cancer cell growth via the miR-454-mediated targeting of CHD5[J/OL]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1): 155-163 [2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5746286/>. DOI:10.3892/ijmm.2017.3225.
- [6] ZHOU Y F, DO D C, ISHMAEL F T, et al. Mannose receptor modulates macrophage polarization and allergic inflammation through miR-511-3p[J/OL]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(1): 350-364. e8[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5944850/>. DOI:10.1016/j.jaci.2017.04.049.
- [7] MCCASKILL J L, RESSEL S, ALBER A, et al. Broad-spectrum inhibition of respiratory virus infection by microRNA mimics targeting p38 MAPK signaling[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 7: 256-266[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5415959/>. DOI:10.1016/j.omtn.2017.03.008.
- [8] HAO X, XIA L Z, QU R Y, et al. Association between miR-146a rs2910164 polymorphism and specific cancer susceptibility: an updated meta-analysis[J]. *Fam Cancer*, 2018, 17(3): 459-468. DOI: 10.1007/s10689-017-0056-0.
- [9] YANG X W, SHEN G Z, CAO L Q, et al. MicroRNA-1269 promotes proliferation in human hepatocellular carcinoma via down-regulation of FOXO1[J/OL]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 909[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4265494/>. DOI:10.1186/1471-2407-14-909.
- [10] BU P C, WANG L H, CHEN K Y, et al. MiR-1269 promotes metastasis and forms a positive feedback loop with TGF- β [J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6879[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4399006/>. DOI:10.1038/ncomms7879.
- [11] BAO M, SONG Y J, XIA J J, et al. MiR-1269 promotes cell survival and proliferation by targeting tp53 and caspase-9 in lung cancer[J/OL]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11: 1721-1732[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5875400/>. DOI:10.2147/OTT.S157715.
- [12] XIONG G Y, WANG Y, DING Q C, et al. Hsa-mir-1269 genetic variant contributes to hepatocellular carcinoma susceptibility through affecting SOX6[J/OL]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(10): 2091-2098[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656786/>.
- [13] BEERMANN J, PICCOLI M T, VIREECK J, et al. Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches[J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(4): 1297-1325. DOI:10.1152/physrev.00041.2015.
- [14] RUPAIMOOLE R, SLACK F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-222. DOI: 10.1038/nrd.2016.246.
- [15] JIN R H, YU D J, ZHONG M. MiR-1269a acts as an onco-miRNA in non-small cell lung cancer via down-regulating SOX6[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(15): 4888-4897. DOI:10.26355/eurrev_201808_15625.
- [16] QIN Y R, TANG H, XIE F J, et al. Characterization of tumor-suppressive function of SOX6 in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(1): 46-55. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-1155.
- [17] AKIYAMA H, CHABOISSIER M C, MARTIN J F, et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6[J/OL]. *Genes Dev*, 2002, 16(21): 2813-2828 [2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

- PMC187468/. DOI:10.1101/gad.1017802.
- [18] LIA P M, PAPATHANOU M, LAGUNA A, et al. Sox6 and Otx2 control the specification of substantia nigra and ventral tegmental area dopamine neurons[J]. *Cell Rep*, 2014, 8(4): 1018-1025. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.016.
- [19] UEDA R, KINOSHITA E, ITO R, et al. Induction of protective and therapeutic antitumor immunity by a DNA vaccine with a glioma antigen, SOX6[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(10): 2274-2279. DOI: 10.1002/ijc.23366.
- [20] JIANG W L, YUAN Q Y, JIANG Y Y, et al. Identification of Sox6 as a regulator of pancreatic cancer development[J/OL]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(3): 1864-1872[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5824410/>. DOI:10.1111/jcmm.13470.
- [21] QIN Y R, TANG H, XIE F J, et al. Characterization of tumor-suppressive function of SOX6 in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(1): 46-55. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-1155.
- [22] WANG J, DING S, DUAN Z, et al. Role of p14ARF-HDM2-p53 axis in SOX6-mediated tumor suppression[J/OL]. *Oncogene*, 2016, 35(13): 1692-1702[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4820682/>. DOI:10.1038/onc.2015.234.
- [23] WANG Z, LI J J, LI K, et al. SOX6 is downregulated in osteosarcoma and suppresses the migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition via TWIST1 regulation[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6803-6811. DOI:10.3892/mmr.2018.8681.
- [24] LI H P, ZHENG D Y, ZHANG B, et al. miR-208 promotes cell proliferation by repressing SOX6 expression in human esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *J Transl Med*, 2014, 12: 196[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4107867/>. DOI:10.1186/1479-5876-12-196.
- [25] LI Y C, LI C F, CHEN L B, et al. miRNA-766 targeting regulation of SOX6 expression promoted cell proliferation of human colorectal cancer[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 2981-2988[2019-02-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4622090/>. DOI:10.2147/OTT.S89459.
- [26] LI Z W, WANG Y. miR-96 targets SOX6 and promotes proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Cell Biol*, 2018, 96(3): 365-371. DOI:10.1139/bcb-2017-0183.

[收稿日期] 2019-01-25

[修回日期] 2019-03-25

[本文编辑] 王映红