

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.001

· 基础研究 ·

miRNA-26b-3p 通过靶向 STAT3 调控食管鳞状细胞癌细胞的增殖和迁移

谷丽娜^a, 桑梅香^{ab}, 刘思桦^a, 刘飞^a, 王芃堉^a, 单保恩^{ab} (河北医科大学第四医院 a. 科研中心; b. 肿瘤研究所免疫室, 石家庄 河北 050011)

[摘要] **目的:** 观察 miR-26b-3p 在食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中的表达水平及其对 ESCC 细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响,并探讨其分子调控机制。**方法:** 选取河北医科大学第四医院 2018 年 4 月 1 日至 2018 年 12 月 25 日手术切除的 ESCC 组织及相应癌旁组织各 60 例,利用 qPCR 法检测 ESCC 组织、癌旁组织和 ESCC 细胞中 miR-26b-3p 的表达。选取 miR-26b-3p 表达水平较低的 ESCC 细胞 TE1 和 KYSE150,转染 miR-26b-3p mimic,并设立阴性对照。利用细胞增殖实验、划痕愈合实验和 Transwell 实验检测过表达 miR-26b-3p 对 TE1 和 KYSE150 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。荧光素酶报告基因实验检测 miR-26b-3p 与 STAT3 的 3'UTR 靶点部位的结合情况。随后同时转染 miR-26b-3p mimic 和 pcDNA3.0-STAT3,利用细胞增殖实验、划痕愈合实验和 Transwell 实验检测 STAT3 是否可逆转过表达 miR-26b-3p 对细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。qPCR 和 WB 法检测甲基化酶抑制剂 5-Aza-DC 对 ESCC 细胞甲基化的影响和 miR-26b-3p 与 STAT3 表达的影响。**结果:** miR-26b-3p 在 ESCC 组织中的表达低于癌旁组织($P<0.01$),其在 ESCC 细胞 TE1、KYSE150 和 LYSE170 中表达水平显著低于人正常食管上皮细胞 HEEC(均 $P<0.01$)。与 miR-26b-3p NC 组相比,miR-26b-3p mimic 转染可明显上调 TE1 和 KYSE150 细胞中 miR-26b-3p 的表达(均 $P<0.01$),但可明显抑制两种细胞的增殖、迁移和侵袭能力($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。荧光素酶报告基因实验结果表明,在 TE1 和 KYSE150 细胞中,miR-26b-3p 明显抑制了野生型 STAT3 载体的荧光素酶活性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而突变型的荧光素酶活性不受影响。同时转染 miR-26b-3p mimic 和 pcDNA3.0-STAT3 可部分逆转 miR-26b-3p mimic 对 TE1 和 KYSE150 细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。5-Aza-DC 处理后,TE1 和 KYSE150 细胞中 miR-26b-3p 表达上调(均 $P<0.01$)、STAT3 mRNA 和蛋白水平降低($P<0.05$),miR-26b-3p 呈现去甲基化状态。**结论:** miR-26b-3p 的启动子高甲基化导致其在 ESCC 组织和细胞中的表达下调,其作为抑癌因子可通过靶向 STAT3 而抑制 ESCC 细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

[关键词] miRNA-26b-3p; 食管鳞状细胞癌; 转录激活因子 3; 甲基化; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.1; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)12-1151-09

miRNA-26b-3p regulates proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma cells by targeting STAT3

GU Lina^a, SANG Meixiang^{ab}, LIU Sihua^a, LIU Fei^a, WANG Pengyu^a, SHAN Baoen^{ab} (a. Research Center, b. Department of Immunology, Tumor Research Institute, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression level of miR-26b-3p in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues, and to explore its effect on the proliferation, invasion and migration of ESCC cells and its molecular mechanism. **Methods:** 60 pairs of ESCC tissues and corresponding adjacent tissues that surgically resected from April 1, 2018 to December 25, 2018 were collected from the Fourth Hospital of Hebei Medical University. qPCR was used to detect the expression of miR-26b-3p in ESCC tissues, corresponding adjacent tissues and ESCC cells. ESCC cell lines TE1 and KYSE150 with low miR-26b-3p expression were selected and transfected with miR-26b-3p mimics. At the same time, the negative control was set up. The effects of miR-26b-3p on proliferation, migration and invasion of TE1 and KYSE150 cells were detected by cell proliferation assay, Wound healing assay and Transwell assay. Luciferase reporter gene analysis was used to detect the binding between miR-26b-3p and STAT3 3'UTR. Then, miR-26b-3p mimics and pcDNA3.0-STAT3 were co-transfected into the cells to verify whether STAT3 could reverse the effect of miR-26b-3p on cell proliferation, migration and invasion using cell proliferation assay, Wound healing assay and Transwell test. The effects of methylase

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81972722);河北省卫健委青年科技课题基金资助项目(No. 20190720)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81972722), and the Youth Science and Technology Project from Health Commission of Hebei Province (No. 20190720)

[作者简介] 谷丽娜(1989—),女,硕士,助理研究员,主要从事肿瘤免疫的基础研究,E-mail: gln081225@163.com

[通信作者] 单保恩(SHAN Baoen, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤免疫、肿瘤分子诊断和中医药抗肿瘤方面的研究,E-mail: baoenshan@hotmail.com

inhibitor 5-Aza-DC on the methylation of ESCC cells as well as the expression of miR-26b-3p and STAT3 were detected by qPCR and WB. **Results:** The expression of miR-26b-3p in ESCC tissues was lower than that in the adjacent normal tissues ($P<0.05$), and the expression was also significantly lower in ESCC cell lines (TE1, KYSE150 and LYSE170) as compared with normal human esophageal epithelial HEEC cells (all $P<0.01$). Compared with miR-26b-3p NC group, transfection of miR-26b-3p mimics significantly up-regulated the expression of miR-26b-3p in TE1 and KYSE150 cells and obviously inhibited the proliferation, invasion and migration of the cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). The luciferase reporter gene assay showed that miR-26b-3p significantly inhibited the luciferase activity of wild-type STAT3 vector in TE1 and KYSE150 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the luciferase activity of mutant-type was not affected. Co-transfection with miR-26b-3p mimics and pcDNA3.0-STAT3 partially reversed the inhibitory effect of miR-26b-3p on proliferation, migration and invasion of TE1 and KYSE150 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). After 5-aza-DC treatment, the expression of miR-26b-3p was up-regulated ($P<0.01$), mRNA and protein levels of STAT3 were decreased ($P<0.05$), and miR-26b-3p was demethylated in TE1 and KYSE150 cells. **Conclusion:** miR-26b-3p is down-regulated in ESCC tissues and cells due to the hypermethylation of its promoter. As a tumor suppressor, miR-26b-3p inhibits the proliferation, invasion and migration of ESCC cells *via* targeting STAT3.

[Key words] miRNA-26b-3p; esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); STAT3; methylation; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(12): 1151-1159. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.001]

食管癌是中国常见的消化道恶性肿瘤,也是全球癌症相关死亡原因居第七位的恶性肿瘤^[1-2]。中国食管癌最常见的病理类型是食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)^[3],手术治疗后5年生存率低于25%^[4]。到目前为止,中国ESCC发病率仍很高,且呈老龄化趋势^[5]。研究ESCC的分子机制,寻找更有效的诊断和预后的生物标志物是十分必要的。人类肿瘤中miRNA的异常表达可以作为癌基因或抑癌基因在肿瘤发生发展中发挥重要作用^[6-7]。表观遗传调控(包括DNA甲基化、组蛋白甲基化、组蛋白乙酰化等)是抑制各种人类癌症中miRNA表达的机制之一^[8]。miR-26b-3p是一种位于人类染色体2q35的基因间miRNA。最近的研究表明miR-26b在多种恶性肿瘤中异常表达,如黑色素瘤^[9]、鼻咽癌^[10]、乳腺癌^[11]和胶质瘤^[12]等。乳腺癌组织中miR-26b表达水平与甲基化敏感基因呈负相关,而甲基化敏感基因的表达与甲基化状态存在相关性^[13-14]。CHEN等^[15]报道,miR-26b下调可以通过靶向TRAF5抑制ESCC细胞的增殖和迁移。然而,目前尚不清楚ESCC中miR-26b-3p的表达与启动子甲基化状态之间的关系,以及ESCC中是否存在其他miR-26b-3p靶点,故本研究利用多种分子生物学方法探讨ESCC中miR-26b-3p的功能及其影响ESCC进展的机制。

1 材料与方法

1.1 组织标本

选取河北医科大学第四医院2018年4月1日至2018年12月25日住院手术切除的ESCC组织及相应癌旁组织标本各60例,所选肿瘤患者均为首发,且术前未进行任何治疗。所有组织标本均经病理科医师诊断为ESCC。所有患者或其家属均签署知情同意

书,且该项目研究方案获得河北医科大学第四医院伦理委员会批准。

1.2 细胞和主要试剂

人ESCC细胞株KYSE170、TE1、KYSE150及人食管上皮细胞HEEC均保存于河北医科大学第四医院科研中心。DMEM培养基、胰蛋白酶和5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-DC)均购自美国Gibco公司,胎牛血清购自上海依科赛生物制品有限公司,TRIzol购自美国Invitrogen公司,Platinum SYBR SuperMix试剂、miR-26b-3p mimics及其阴性对照和pcDNA3.0-STAT3均购自中国广州瑞博生物有限公司。逆转录试剂盒、FuGENE HD转染试剂和双荧光素酶报告基因系统试剂盒均购自美国Promega公司,Bulge-loop™ miRNA qRT-PCR Kit和PCR引物均购自广州锐博生物科技有限公司,Transwell小室购自美国Corning公司,人工基质胶(matrigel)购自美国BD公司,DNA纯化试剂盒购自Qiagen公司,鼠抗人STAT3单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG(二抗)购自Proteintech公司,鼠抗人p-STAT3(Tyr-705)单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,兔抗人β-actin单克隆抗体购自英国Abcam公司,电化学发光检测试剂盒购自美国Thermo Scientific公司。

1.3 细胞转染和去甲基化药物处理

对于细胞转染,取对数生长期的TE1和KYSE150细胞,制成单细胞悬液后接种于6孔板中(1×10^6 个/孔),根据说明书所述的流程,将miR-26b-3p模拟物及其阴性对照和/或pcDNA3.0-STAT3及其空载体对照与转染试剂混合后,室温静置20 min,加入无血清的培养基培养的细胞中。转染6 h后更换为完全培养基,继续培养42 h,进一步以qPCR法检测转染细胞转染分子的表达水平,以鉴定细胞转染效率。

对于药物处理,在DNA甲基转移酶抑制

剂5-Aza-DC处理前1 d将细胞以低密度接种在6孔板中,所有细胞经5-Aza-DC(5 μmol/L)处理72 h,每24 h换液1次,对照组不作任何处理,72 h后换成完全培养基继续培养24 h后可以进行后续实验。

1.4 qPCR检测ESCC组织和细胞中miR-26b-3p和STAT3 mRNA的相对表达水平

用TRIzol提取细胞或组织的总RNA,按照试剂盒说明书提供的方法进行逆转录和qPCR。所用引物序列见表1。PCR反应条件为95℃5 min,95℃15 s、60℃1 min,共40个循环;72℃5 min。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算组织和细胞中miR-26b-3p和STAT3 mRNA的相对表达水平。实验重复3次。

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

PCR type	Gene	Primer	Product size(bp)
qPCR	STAT3	F:5'-GAAGGAGGCGTCACTTTTCAC-3'	95
		R:5'-TTGTTTCAGCTGCTGCTTTGT-3'	
	GAPDH	F:5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	66
		R:5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	
MSP	Methylation	F:5'-ATTTAGGTTAAGGGCGAGGTTAC-3'	179
		R:5'-ATCTACCGACAAAAACAAAACG-3'	
	Unmethylation	F:5'-ATTTAGGTTAAGGGTGAGGTTATGA-3'	179
		R:5'-ATCTACCAACAAAAACAAAACAAA-3'	

F: Forward primer; R: Reverse primer

1.5 CCK-8法检测转染后TE1和KYSE150细胞的增殖能力

将转染后的TE1和KYSE150细胞以 2×10^3 个/孔的密度接种于96孔板,常规培养,各个时间点设置3个复孔,分别于0、24、48、72、96 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,绘制细胞增殖曲线。实验重复3次。

1.6 细胞划痕实验检测转染后TE1和KYSE150细胞的迁移能力

将转染后的TE1和KYSE150细胞接种于6孔板,待细胞生长至汇合度约90%时,用高压灭菌过的200 μl枪头在6孔板划痕,无菌PBS洗涤6孔板3次,加入2 ml完全培养基继续培养。0、24 h时在倒置显微镜下($\times200$)观察细胞迁移情况,拍照并对划痕愈合情况进行分析。实验重复3次。

1.7 Transwell实验检测转染后TE1和KYSE150细胞的侵袭及迁移能力

将4℃下过夜溶解的人工基质胶用无血清的培养基按1:7的比例稀释,以25 μl人工基质胶均匀铺满上室底部,37℃无菌过夜后进行侵袭实验。将转染后的细胞制备成单细胞悬液,加入Transwell上室(1.5×10^5 个/室),下室中加入含10%胎牛血清的600 μl培养基,培养48 h后用棉签擦净上室细胞,用PBS清洗后结晶紫染色,于倒置相差显微镜($\times200$)下观察并拍照。随机观察5个视野,计数穿膜细胞数。迁移实验不预铺基质胶,其他操作同侵袭实验。实

验均重复3次。

1.8 荧光素酶报告基因实验检测miR-26b-3p与STAT3的3'UTR靶向位点的结合

利用Target Scan数据库(<http://www.targetu/>)预测miR-26b-3p的潜在靶点。数据库预测结果显示,miR-26b-3p可能与STAT3的3'UTR区靶向结合。构建野生型STAT3 3'UTR和突变型STAT3 3'UTR双荧光报告基因载体。取对数生长期TE1和KYSE150细胞接种于12孔板中(5×10^4 个/孔),将STAT3-WT、STAT3-MUT P1或STAT3-MUT P2与miR-26b-3p模拟物或阴性对照共转染至TE1和KYSE150细胞,每组设置3个复孔。常规培养48 h后,按照双荧光素酶报告基因系统试剂盒的说明书检测荧光素酶活性。

1.9 MSP法检测ESCC细胞中miR-26b-3p的甲基化状态

采用酚/氯仿抽提法提取去甲基化药物5-Aza-DC处理前后TE1和KYSE150细胞的RNA,用RNA纯化试剂盒对其进行纯化。根据Meth Primer预测miR-26b-3p启动子的CpG岛(-265~-42 bp),设计该位点甲基化特异引物,利用甲基化特异性引物和非甲基化特异性引物进行PCR扩增,引物序列见表1。反应条件为95℃5 min,95℃45 s、58℃30 s,共40个循环;72℃5 min。扩增产物经过2%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像和GeneSys系统进行拍照和分析。

1.10 WB法检测STAT3和p-STAT3蛋白的表达

用RIPA蛋白裂解液将转染后细胞裂解30 min,离心取上清液。将BCA法定量的40 μg蛋白质以

10%SDS-PAGE 分离,用 PVDF 膜转移电泳分离的蛋白条带;封闭液封闭 1 h,用抗 STAT3 抗体、p-STAT3 (Tyr-705)抗体和 β -actin 抗体(内参照)处理过夜;加二抗后在室温下放置 2 h, TBST 冲洗 10 min $\times$ 3 次。用电化学发光检测试剂盒曝光成像,化学发光系统拍照并分析结果。实验重复 3 次。

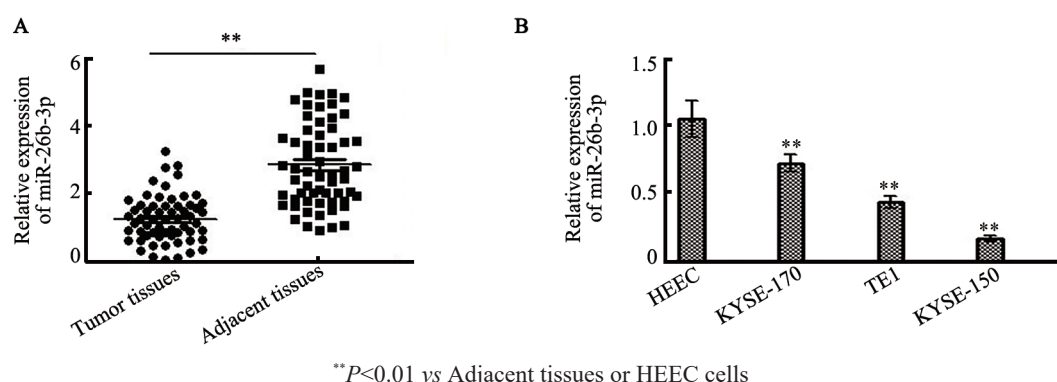
1.11 统计学处理

采用统计软件 SPSS20.0 对数据进行统计学分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 F 检验,以 $P<0.05$ 与 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-26b-3p 在 ESCC 组织和细胞中呈低表达

qPCR 法检测结果显示,与癌旁组织相比,miR-26b-3p 在 ESCC 组织中的相对表达量明显较低 (1.26 ± 0.70 vs 2.86 ± 1.25 , $P<0.01$, 图 1A)。与正常食管上皮细胞相比,miR-26b-3p 在不同 ESCC 细胞中的表达均较低。HEEC、KYSE170、TE1 和 KYSE150 细胞中 miR-26b-3p 的相对表达量为 1.05 ± 0.234 、 0.72 ± 0.11 、 0.43 ± 0.08 和 0.16 ± 0.03 (图 1B)。选择 TE1 和 KYSE150 细胞进行下一步实验。



A: The expression of miR-26b-3p in ESCC tissues was significantly lower than that in adjacent esophageal tissues;
B: The expression of miR-26b-3p in ESCC cells was significantly lower than that in normal esophageal epithelial cells

图1 qPCR法检测 miR-26b-3p 在 ESCC 组织(A)和细胞系(B)中的表达情况

Fig.1 Expression of miR-26b-3p in ESCC tissues (A) and cell lines(B) detected by qPCR

2.2 过表达 miR-26b-3p 对 ESCC 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

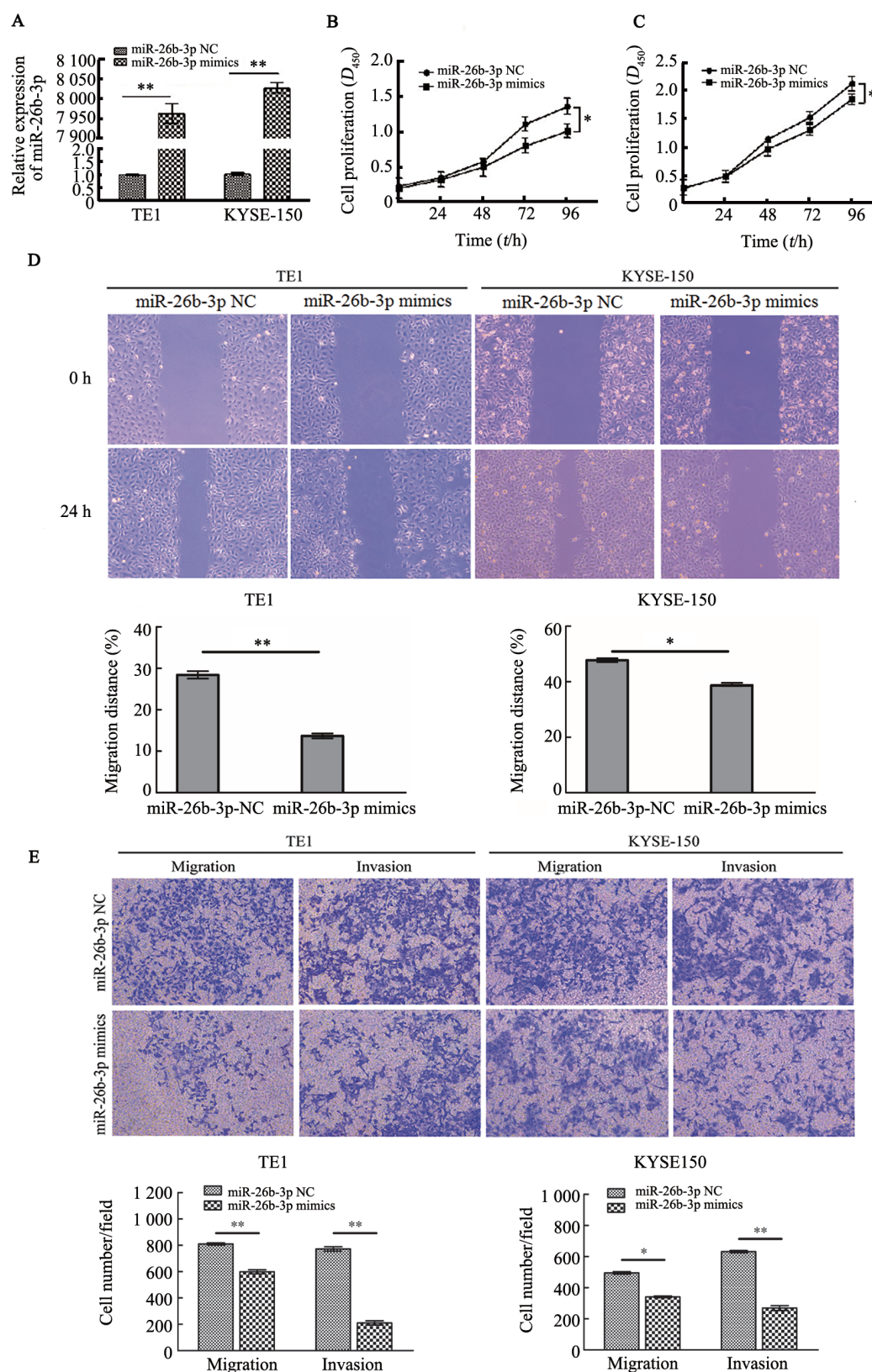
将 miR-26b-3p 模拟物及其阴性对照转染 TE1 和 KYSE150, 48 h 后, qPCR 检测 miR-26b-3p 的表达水平。与 miR-26b-3p NC 组相比, TE1 和 KYSE150 细胞中 miR-26b-3p 表达显著上调 ($P<0.01$, 图 2A)。为了研究过表达 miR-26b-3p 对 ESCC 细胞增殖能力的影响, 对 TE1 和 KYSE150 细胞进行了细胞增殖实验。增殖实验结果显示, miR-26b-3p 模拟物转染 72 和 96 h, TE1 ($P<0.05$, 图 2B) 和 KYSE150 ($P<0.05$, 图 2C) 细胞增殖能力有明显的降低。为了研究过表达 miR-26b-3p 对 ESCC 细胞侵袭和迁移能力的影响, 对 TE1 和 KYSE150 细胞进行了划痕愈合和 Transwell 实验。划痕愈合实验结果显示, 过表达 miR-26b-3p 后的 24 h, TE1 和 KYSE150 细胞迁移能力明显下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图 2D); Transwell 实验结果显示, 与 miR-26b-3p NC 组相比, miR-26b-3p 模拟物转染组的 TE1 和 KYSE150 细胞的侵袭和迁移能力均明显减弱 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图 2E)。

2.3 STAT3 的 3'UTR 存在 miR-26b-3p 的结合靶点

利用 Target Scan 数据库 (<http://www.targetu/>) 预测 miR-26b-3p 的潜在靶点, 数据库预测结果显示, STAT3 的 3'UTR 存在 miR-26b-3p 的潜在结合靶点 (图 3A)。采用荧光素酶报告基因实验检测 miR-26b-3p 与 STAT3 的 3'UTR 结合情况, 结果 (图 3B、C) 显示, 在 TE1 和 KYSE150 细胞中, miR-26b-3p 明显抑制了野生型 STAT3 载体的荧光素酶活性, 而突变型的荧光素酶活性不受影响, 提示两者存在结合。以上结果说明 STAT3 的 3'UTR 存在 miR-26b-3p 的结合靶点。

2.4 miR-26b-3p 通过靶向 STAT3 调控 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力

采用一系列挽救实验进一步探讨 miR-26b-3p 对 ESCC 细胞的作用。单独转染 miR-26b-3p 模拟物后, 发现 ESCC 细胞 TE1 和 KYSE150 中 STAT3 和 p-STAT3 (Tyr-705) 蛋白表达降低, 而在共转染 pcDNA3.0-STAT3 和 miR-26b-3p 模拟物后其表达量部分恢复升高 (图 4A)。细胞增殖曲线显示, 转染 miR-26b-3p 模拟物后细胞增殖率降低, 共转染 pcDNA3.0-STAT3 和 miR-26b-3p 模拟物可逆转降低的细胞增殖率, 使之重新升高 (图 4B)。同时,

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: Relative expression of miR-26b-3p in TE1 and KYSE150 cells transfected with NC or mimics; B, C: The proliferation of TE1(B) and KYSE150 (C) cells was decreased after miR-26b-3p over-expression; D: The migration ability of TE1 and KYSE150 cells in miR-26b-3p mimic group was decreased($\times 200$); E: The migration and invasion ability of TE1 and KYSE150 cells in miR-26b-3p mimic group were decreased ($\times 200$)

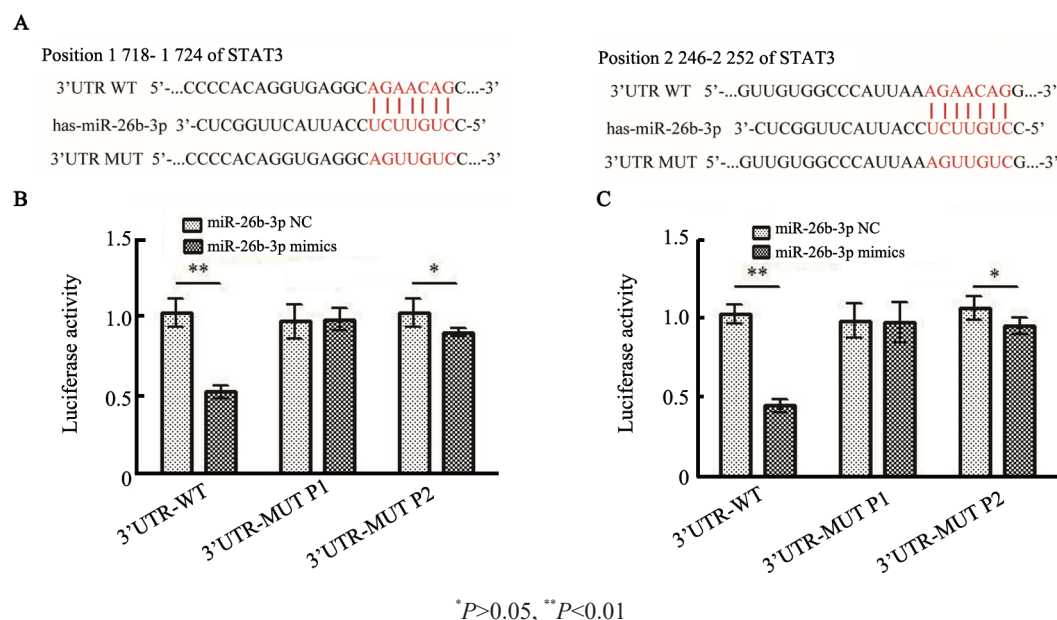
图2 过表达 miR-26b-3p 显著抑制 TE1 和 KYSE150 细胞的增殖、侵袭和迁移能力
Fig.2 miR-26b-3p over-expression significantly inhibited the ability of proliferation, migration and invasion of TE1 and KYSE150 cells

Transwell 实验表明,共转染 pcDNA3.0-STAT3 和 miR-26b-3p 模拟物可逆转 miR-26b-3p 模拟物单独转染对细胞迁移和侵袭能力的抑制作用(图 4C)。以上结果表明 STAT3 是 miR-26b-3p 的下游靶点基因,miR-26b-3p 通过靶向 STAT3 调控 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

2.5 ESCC 细胞中 miR-26b-3p 启动子甲基化对 miR-26b-3p 和 STAT3 表达的影响

经甲基化酶抑制剂 5-Aza-DC 处理后,MSP 检测结果显示,TE1 和 KYSE150 细胞呈现去甲基化状态

(图 5A);与 NC 组相比,TE1 细胞和 KYSE150 细胞的 miR-2b-3p 表达上调($P=0.003$, $P=0.004$,图 5B)。5-Aza-DC 处理后 TE1 和 KYSE150 细胞中 STAT3 mRNA 表达与 NC 组相比均降低(0.83 ± 0.050 vs 1.04 ± 0.10 , $P=0.020$; 0.82 ± 0.03 vs 1.04 ± 0.11 , $P=0.027$,图 5C);TE1 和 KYSE150 细胞中 STAT3 和 p-STAT3(Tyr-705)蛋白水平均显著降低(图 5D)。以上结果提示,ESCC 细胞中 miR-26b-3p 启动子 DNA 甲基化是 miR-26b-3p 的调控机制之一。



A: Binding sites between 3'-UTR of STAT3 and miR-26b-3p; B, C: Luciferase reporter assays showed that up-regulation of miR-26b-3p reduced the relative luciferase activity of STAT3 3'-UTR in TE1 (B) and KYSE150 (C) cells

图3 STAT3的3'-UTR存在miR-26b-3p的结合靶点

Fig.3 A binding site on the 3'-UTR of STAT3 with miR-26b-3p

3 讨论

越来越多的证据^[16]表明,miRNA参与了ESCC的发生发展。本研究观察到 miR-26b-3p 在 ESCC 组织和细胞中呈低表达,上调 miR-26b-3p 的表达可抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭。这提示 miR-26b-3p 可能在 ESCC 中起到抑癌基因的作用。

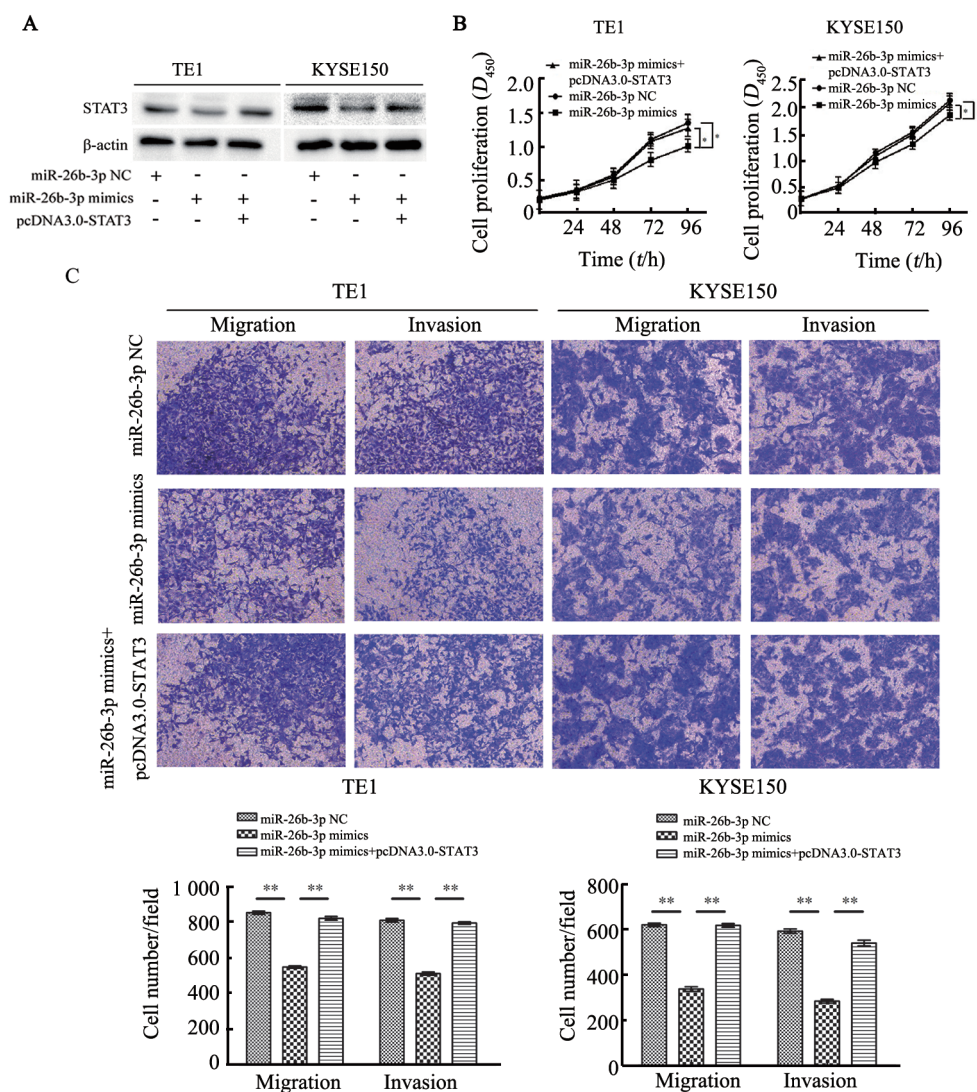
miRNA 可通过靶向下游基因进而发挥癌基因或抑癌基因的作用,其可通过结合靶基因的 3'-UTR 序列而抑制靶基因的翻译^[16]。由于匹配区域的非严格性,一个 miRNA 可与许多靶基因结合发挥调节作用,不同的 miRNA 也可以与同一基因靶点结合并导致翻译抑制^[17]。在本研究中,利用生物信息学预测发现 STAT3 是 miR-26b-3p 的下游靶基因,荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-26b-3p 可与 STAT3 转录物

的 3'-UTR 结合。STAT3 作为 JAK/STAT 信号通路的重要组成部分,参与了细胞质到细胞核的信号传递过程^[18],因此选择 STAT3 进行后续研究。结果显示,miR-26b-3p 的过表达降低了 STAT3 和 p-STAT3 蛋白的表达水平,这证实了 STAT3 可作为 miR-26b-3p 的下游靶基因发挥作用。细胞增殖和 Transwell 实验结果显示,过表达 STAT3 可部分逆转 miR-26b-3p 对 TE1 和 KYSE150 细胞增殖、迁移和侵袭能力的抑制作用。最近有研究^[19]表明,miR-26b-3p 作为抑癌因子在乳腺癌的发生发展中发挥重要作用,本研究结果与其一致。这些结果为探讨 miR-26b-3p 和 STAT3 在 ESCC 中的作用机制提供了实验依据。

CpG 岛(cytosine-phosphate-guanine island)的甲基化可调节 miRNAs 的转录^[20]。像其他生理修饰和生化修饰一样,DNA 甲基化同样可以逆转^[21]。DNA

高甲基化与抑癌基因沉默密切相关,DNA 甲基转移酶抑制剂可以显著逆转抑癌基因的沉默并抑制肿瘤生长^[21]。本研究利用去甲基化药物 5-Aza-DC 处理 TE1 和 KYSE150 细胞,结果发现 ESCC 细胞出现了去甲基化,同时 miR-26b-3p 的表达水平明显增高而

STAT3 mRNA 水平降低,并且 STAT3 和 p-STAT3 的蛋白水平也明显降低。这些结果表明,ESCC 细胞中 miR-26b-3p 表达下调的部分原因可能是其启动子 CpG 岛的高甲基化。对于 miR-26b-3p 的表达调控机制,目前尚未有相关报道。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

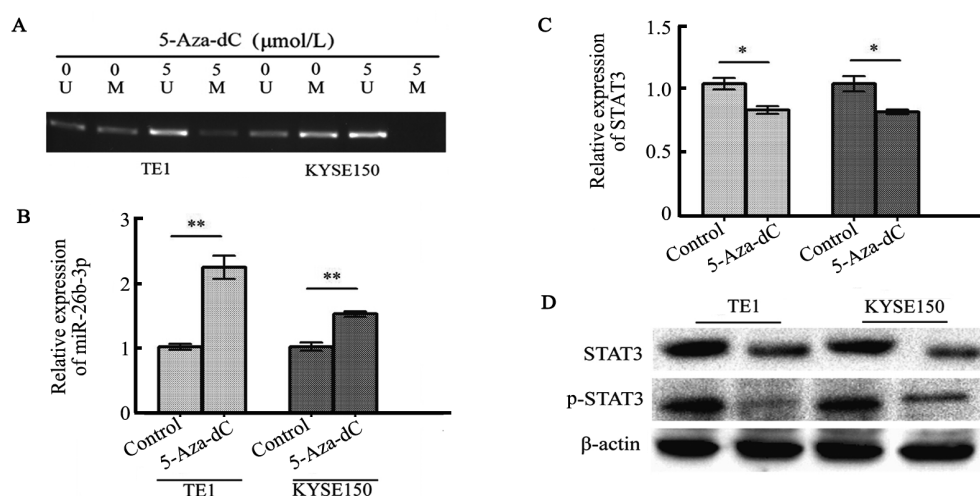
A: The relative expression of STAT3 and p-STAT3 proteins in TE1 and KYSE150 cells treated with miR-26b-3p NC, miR-26b-3p mimics and/or pcDNA3.0-STAT3; B: Co-transfection of pcDNA3.0-STAT3 and miR-26b-3p mimics could reverse the inhibitory effect of miR-26b-3p mimics on cell proliferation in TE1 and KYSE150 cells; C: Cell migration and invasion restrained by miR-26b-3p mimics were reversed by co-transfection of pcDNA3.0-STAT3 and miR-26b-3p mimics ($\times 100$)

图4 miR-26b-3p通过靶向STAT3调控TE1和KYSE150细胞的增殖、迁移和侵袭能力

Fig.4 miR-26b-3p regulated proliferation, migration and invasion of TE1 and KYSE150 cells by targeting STAT3

综上所述,miR-26b-3p可作为抑癌基因在ESCC中发挥作用,其启动子CpG位点的高甲基化是其表达下调的机制之一。另外,研究发现STAT3可能是miR-26b-3p的靶基因,STAT3可部分逆转miR-26b-3p对ESCC的抑癌作用。5-Aza-DC处理后,miR-26b-3p

的表达水平增加而STAT3表达降低。这些结果均表明miR-26b-3p可能是受到表观遗传修饰机制调控的抑癌基因,为ESCC的治疗提供了新的策略。然而,miR-26b-3p在ESCC发生发展过程中的确切机制尚需进一步研究。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: MSP analysis for methylation status after 5-Aza-DC treatment (0 or 5 μmol/L) in TE1 and KYSE150 cells; B and C: qPCR analysis for miR-26b-3p and STAT3 expression after 5-Aza-DC treatment (0 or 5 μmol/L) in TE1 cell and KYSE150 cell; D: WB analysis for STAT3 expression after 5-Aza-DC treatment (0 or 5 μmol/L) in TE1 and KYSE150 cells

图5 TE1和KYSE150细胞中miR-26b-3p启动子甲基化对miR-26b-3p和STAT3表达的影响

Fig.5 Effect of miR-26b-3p promoter methylation on the expression of miR-26b-3p and STAT3 in TE1 cell and KYSE150 cells

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30. DOI:10.3322/caac.21590.
- [2] CHEN W Q, SUN K X, ZHENG R S, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(1): 1-12. DOI:10.21147/j.issn.1000-9604.2018.01.01.
- [3] 吴浦嫒, 任伟, 刘宝瑞. 食管鳞状细胞癌免疫治疗的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(9):1043-1049.
- [4] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [5] 周家琛, 郑荣寿, 张思维, 等. 2000—2015年中国肿瘤登记地区食管癌发病及年龄变化趋势[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(18): 1437-1442. DOI:10.16073/j.cnki.cjcp.2020.18.01.
- [6] 杨谊琼, 李丹丹, 刘平, 等. miR-202-5p通过下调NFATc3的表达抑制口腔鳞状细胞癌细胞的生长、迁移和侵袭[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(11): 1206-1212. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.11.002.
- [7] 张成伟, 毕昕, 闫睿. miR-106a-5p靶向TGFBR2调控肺腺癌细胞增殖和迁移侵袭机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(16): 1284-1291, 1297. DOI:10.16073/j.cnki.cjcp.2020.16.02.
- [8] GLAICH O, PARIKH S, BELL R E, et al. DNA methylation directs microRNA biogenesis in mammalian cells[J/OL]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5657[2021-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6906426/>. DOI:10.1038/s41467-019-13527-1.
- [9] WEI C Y, WANG L, ZHU M X, et al. TRIM44 activates the AKT/mTOR signal pathway to induce melanoma progression by stabilizing TLR4[J/OL]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 137[2021-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6437891/>. DOI:10.1186/s13046-019-1138-7.
- [10] XIE T, PI G L, YANG B, et al. Long non-coding RNA 520 is a negative prognostic biomarker and exhibits pro-oncogenic function in nasopharyngeal carcinoma carcinogenesis through regulation of miR-26b-3p/USP39 axis[J]. Gene, 2019, 707: 44-52. DOI:10.1016/j.gene.2019.02.093.
- [11] DING Q Q, WANG Y, ZUO Z, et al. Decreased expression of microRNA-26b in locally advanced and inflammatory breast cancer[J]. Hum Pathol, 2018, 77: 121-129. DOI:10.1016/j.humpath.2018.04.002.
- [12] CHEN Z G, ZHENG C Y, CAI W Q, et al. miR-26b mimic inhibits glioma proliferation in vitro and in vivo suppressing COX-2 expression[J/OL]. Oncol Res, 2019, 27(2): 147-155[2021-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7848412/>. DOI: 10.3727/096504017X15021536183517.
- [13] SANDHU R, RIVENBARK A G, COLEMAN W B. Loss of post-transcriptional regulation of DNMT3b by microRNAs: a possible molecular mechanism for the hypermethylation defect observed in a subset of breast cancer cell lines[J]. Int J Oncol, 2012, 41(2): 721-732. DOI:10.3892/ijo.2012.1505.
- [14] SANDHU R, RIVENBARK A G, MACKLER R M, et al. Dysregulation of microRNA expression drives aberrant DNA hypermethylation in basal-like breast cancer[J/OL]. Int J Oncol, 2014, 44(2): 563-572[2021-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3898722/>. DOI:10.3892/ijo.2013.2197.
- [15] CHEN Z, ZHAO L, ZHAO F, et al. MicroRNA-26b regulates cancer proliferation migration and cell cycle transition by suppressing TRAF5 in esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. Am J Transl Res, 2016, 8(5): 1957-1970[2021-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4891411/>.
- [16] FENG Q Q, ZHANG H L, YAO D L, et al. Emerging role of non-coding RNAs in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): 258. DOI:10.3390/ijms21010258.
- [17] PINWEHA P, RATTANAPORN SOMPONG K, CHAROENSAN V, et al. MicroRNAs and oncogenic transcriptional regulatory networks

- controlling metabolic reprogramming in cancers[J/OL]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2016, 14: 223-233[2021-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4915959/>. DOI:10.1016/j.csbj.2016.05.005.
- [18] BOWMAN T, GARCIA R, TURKSON J, et al. STATs in oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2474-2488. DOI:10.1038/sj.onc.1203527.
- [19] MENG L J, LIU S H, LIU F, et al. ZEB1-mediated transcriptional upregulation of circWWC3 promotes breast cancer progression through activating ras signaling pathway[J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 124-137[2021-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7490471/>. DOI:10.1016/j.omtn.2020.08.015.
- [20] HUAN T X, MENDELSON M, JOEHANES R, et al. Epigenome-wide association study of DNA methylation and microRNA expression highlights novel pathways for human complex traits[J/OL]. *Epigenetics*, 2020, 15(1/2): 183-198[2021-08-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6961684/>. DOI: 10.1080/15592294.2019.1640547.
- [21] KÖHLER F, RODRÍGUEZ-PAREDES M. DNA methylation in epidermal differentiation, aging, and cancer[J]. *J Invest Dermatol*, 2020, 140(1): 38-47. DOI:10.1016/j.jid.2019.05.011.
- [收稿日期] 2021-08-27 [修回日期] 2021-12-26
[本文编辑] 王润蓓, 沈志超