

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.02.012

◇临床医学◇

## 微RNA-346对食管癌细胞生物学行为影响的分子机制研究

赵明理, 刘雷, 曹建西, 崔琳

作者单位: 河南中医药大学第一附属医院心胸外科, 河南 郑州 450000

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题(2019ZY1203); 河南省高等学校重点科目项目(20B360006)

**摘要:**目的 观察微RNA-346(miR-346)对食管癌细胞生物学行为的影响,并探讨其分子机制。方法 通过实时荧光定量PCR(qPCR)检测食管癌组织和细胞株miR-346的表达量。以表达量最低的细胞为感染对象,分别感染miR-346慢病毒(实验组)和空载慢病毒(对照组)。MTT法和集落形成实验分别检测细胞活力和增殖能力,流式细胞术检测凋亡率。qPCR和蛋白质印迹法检测细胞中Yes相关蛋白1(YAP1)及细胞周期蛋白E(Cyclin E)、细胞凋亡抑制蛋白1(cIAP1)表达水平。结果 食管癌组织和细胞株中miR-346表达量均明显下降( $P < 0.01$ ),TE-1细胞下降最明显。实验组感染miR-346的细胞活力(实验组 $0.93 \pm 0.06$ ,对照组 $1.37 \pm 0.06$ )和增殖能力(对照组 $232.3 \pm 37.40$ ,实验组 $82.55 \pm 9.66$ )降低( $P < 0.01$ ),细胞凋亡率升高(实验组 $8.26\% \pm 0.80\%$ ,对照组 $0.94\% \pm 0.28$ , $P < 0.01$ ),YAP1、Cyclin E和cIAP1蛋白表达显著下调。结论 miR-346在食管癌组织和细胞中低表达,可明显抑制TE-1细胞的增殖和诱导凋亡,其作用机制可能是靶向干扰YAP1基因的表达。

**关键词:**微RNAs; 食管肿瘤; Yes相关蛋白1; 增殖; 凋亡

## Molecular mechanism of miR-346 on the biological behavior of esophageal cancer cells

ZHAO Mingli, LIU Lei, CAO Jianxi, CUI Lin

Author Affiliation: Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450000, China

**Abstract: Objective** To observe the effect of microRNA-346 (miR-346) on the biological behavior of esophageal cancer cells and discuss its molecular mechanism. **Methods** The expression of miR-346 in esophageal cancer tissues and cell lines was detected by real-time quantitative PCR (qPCR). The cells with the lowest expression of miR-346 were infected with miR-346 lentivirus (experimental group) and empty lentivirus (control group). MTT assay and colony formation assay were used to detect the viability and proliferation of cells. Flow cytometry was used to detect the apoptotic rate. The expressions of Yes related protein 1 (YAP1), cyclin E and apoptosis protein 1 (cIAP1) were detected by qPCR and Western blot. **Results** The expression of miR-346 in esophageal carcinoma and cell lines was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), TE-1 cells decreased most significantly ( $P < 0.01$ ). The cell viability [ $(0.93 \pm 0.06)$  vs.  $(1.37 \pm 0.06)$ ] and proliferation ability [ $(232.3 \pm 34.40) \pm (82.55 \pm 9.66)$ ] of cells infected with miR-346 were decreased [ $(8.26\% \pm 0.80\%)$  vs.  $(0.94\% \pm 0.28\%)$ ,  $P < 0.01$ ], the apoptosis rate was increased ( $P < 0.01$ ). The expression of YAP1, Cyclin E and cIAP1 protein was also significantly decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** miR-346 is low-expressed in esophageal cancer tissues and cells, which can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of TE-1 cells. The mechanism may be that the expression of YAP1 gene is interfered by miR-346.

**Key words:** MicroRNAs; Esophageal neoplasms; Yes related protein 1; Proliferation; Apoptosis

食管癌是全球第八大最常见的肿瘤,也是肿瘤相关死亡的第六大常见原因<sup>[1-2]</sup>。食管癌的发病因素主要包括吸烟、饮酒、环境因素及对食管造成损伤的各种慢性刺激等<sup>[3]</sup>。近年来,尽管食管癌的治疗方式与方案得到极大的发展,然而食管癌治疗的远期效果仍难令人满意<sup>[4]</sup>。微RNA(miRNA)是一类内源性非编码RNA,在细胞增殖、衰老、凋亡、转移等多种细胞生物学行为中发挥重要作用,与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[5]</sup>。miR-346是一种新发现在多

种肿瘤中具有促癌或抑癌作用的miRNA<sup>[6-8]</sup>,然而其在食管癌中的机制研究尚未明了。本研究拟通过观察miR-346对食管癌细胞生物学行为的影响,探讨其可能的分子作用机制,为miR-346靶向治疗食管癌提供理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 临床标本** 收集2016年10月至2017年4月河南中医药大学第一附属医院心胸外科存档的食管癌标本和癌旁标本6对,所有病例均经病理证实。

所有病人均为首次确诊病例。病人术前均未行任何辅助治疗,标本取出后立即至于液氮罐内保存。本研究获本院伦理委员会批准,病人对研究方案签署知情同意书。

**1.2 材料** 人正常食管黏膜上皮细胞株 HET-1A 和 4 种食管癌细胞株 (TE-1、Eca109、Eca9706、KYSE150) 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。DMEM 培养基、RPMI 1640 培养基和 FBS 购自美国 Gibco 公司。Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。qPCR 相关试剂盒购自美国 Promega 公司。PCR 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。miR-346 慢病毒及空载慢病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司。噻唑蓝 (MTT) 试剂盒购自美国 Sigma 公司。细胞凋亡试剂盒购自碧云天生物技术研究所。一抗  $\beta$ -actin、Yes 相关蛋白 1 (YAP1) 及细胞周期蛋白 E (Cyclin E)、细胞凋亡抑制蛋白 1 (cIAP1) 购自美国 CST 公司。

**1.3 细胞培养、感染及分组** HET-1A 和 TE-1 培养于含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基中, Eca109、Eca9706 和 KYSE150 培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,在 37 °C、5% 二氧化碳、饱和湿度培养箱中培养。以 TE-1 为感染对象,感染 miR-346 慢病毒的 TE-1 细胞组为实验组,转染空载慢病毒的细胞组为阴性对照组。具体方法:以对数生长期的 TE-1 细胞为感染对象,待细胞融合度达到 50%,将 miRNA346 慢病毒或空载慢病毒感染 TE-1 细胞。24 h 后更换培养液,供后续实验。

**1.4 qPCR 检测 miR-346 和 YAP1 基因表达水平** 根据 Trizol 试剂盒说明书提取组织或细胞总 RNA,反转录为 cDNA,按照 qPCR 试剂盒说明书,以 U6 或 GAPDH 分别进行 qPCR 扩增检测 miR-346 和 YAP1 基因表达水平,扩增数据采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行定量统计分析。GAPDH 引物序列 (5'~3') : Forward GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT, Reverse Primer GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG。YAP1 引物序列 (5'~3') : Forward TAGCCCTGCGTAGCCAGTTA, Reverse TCATGCTTACTTCACTGTCTGT。

**1.5 MTT 法检测** 感染后的两组 TE-1 细胞,胰酶消化后接种于 96 孔板,于接种后 1、2、3、4 d 分别进行 MTT 检测。具体检测:在每个时间点,每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液,培养箱内孵育 4 h,每孔加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷,振荡 10 min。酶标仪检测每孔在 490 nm 波长处的吸光度 (optical density, OD),绘制细胞生长曲线。

**1.6 集落形成实验** 取生长状态良好的两组细胞,

胰酶消化、制备单细胞悬液,以 1 000 个/孔接种于 6 孔板,培养箱内连续培养 10 d,隔天更换新鲜培养基。10 d 后弃上清,甲醇固定 10 min,0.1% 结晶紫溶液染色 20 min,洗去多余染液,观察统计集落数量。

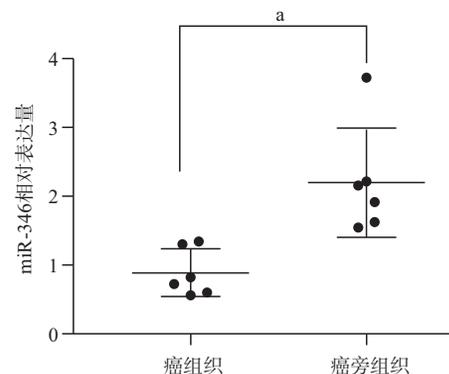
**1.7 流式细胞术检测细胞凋亡** 收集感染后的细胞,用预冷的 PBS 缓冲液洗 2 遍,加入 200  $\mu$ L 凋亡结合液重悬细胞,加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 溶液和 10  $\mu$ L PI 溶液,避光孵育 30 min,流式细胞仪检测 10 000 个细胞,统计凋亡比例。

**1.8 蛋白质印迹法检测** 收集感染后的两组细胞,细胞裂解液裂解提取总蛋白,定量后分别取两组蛋白样本 50  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭液封闭 2 h,4 °C 一抗孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h,ECL 显影剂发光显影反应,以  $\beta$ -actin 作为内参进行标准对照,每组实验重复 3 次。

**1.9 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-346 在临床食管癌组织中的表达水平** qPCR 检测结果显示,与癌旁组织相比,miR-346 在食管癌组织中的表达量明显下降 ( $2.20 \pm 0.32$  比  $0.89 \pm 0.14$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1。



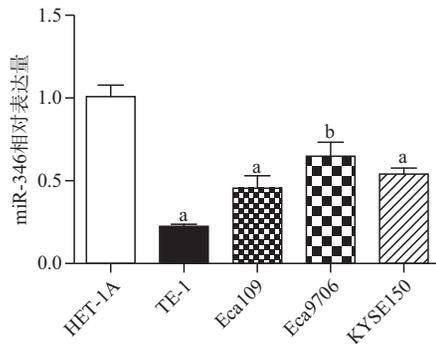
注:与癌组织相比,\* $P < 0.01$

图1 miR-346在食管癌组织和癌旁组织中的表达水平

**2.2 miR-346 在正常食管黏膜上皮细胞和食管癌细胞中的表达水平** qPCR 检测结果显示,miR-346 在 4 种食管癌细胞 (TE-1、Eca109、Eca9706 和 KYSE150) 中的表达量 ( $0.22 \pm 0.02$ 、 $0.45 \pm 0.08$ 、 $0.65 \pm 0.08$ 、 $0.53 \pm 0.04$ ) 均显著低于正常人食管黏膜上皮细胞 HET-1A ( $1.06 \pm 0.36$ ),差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),其中 TE-1 细胞中 miR-346 下降的最为明显。见图 2。

**2.3 miR-346 在两组细胞中的相对表达量** 慢病毒感染 TE-1 细胞后,实验组的 miR-346 显著高于对

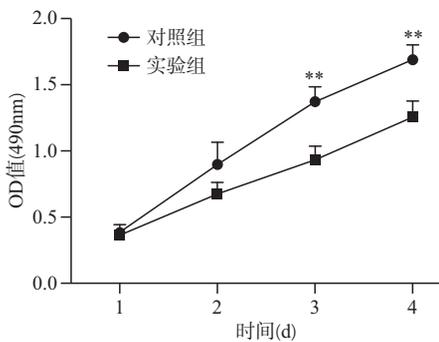
对照组(265.75±78.78比1.06±0.36,  $P < 0.01$ )。



注:与HET-1A相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图2 miR-346在正常食管黏膜上皮细胞和食管癌细胞中的表达水平

**2.4 miR-346对细胞活力的影响** 自第3天开始,与对照组相比,miR-346慢病毒感染的TE-1细胞的活力显著降低(1.37±0.06比0.93±0.06),差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图3。



注:与对照组相比,\*\* $P < 0.01$

图3 miR-346对TE-1细胞活力的影响

**2.5 miR-346对细胞增殖能力的影响** 通过统计实验组TE-1细胞的集落数目和大小,实验组集落的数目及大小明显低于对照组(232.3±37.40比82.55±9.66,  $P < 0.01$ )。结果表明,miR-346过表达能有效抑制TE-1细胞的增殖能力。

**2.6 miR-346对细胞凋亡的影响** 实验组TE-1细胞的凋亡率显著多于对照组(8.26%±0.80%比0.94%±0.28%,  $P < 0.01$ ),提示过表达miR-346具有诱导TE-1细胞凋亡的作用。

**2.7 miR-346靶基因预测结果** microRNA.org-Targets and Expression 在线预测软件(<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)显示,miR-346与YAP1 mRNA 3' UTR区域存在结合位点。见图4。

**2.8 qPCR检测YAP1 mRNA表达** 实验组TE-1细胞中YAP1 mRNA较对照组表达量明显下降

(0.44±0.11比1.00±0.04,  $P < 0.01$ )。

**2.9 蛋白质印迹法结果** 与对照组相比,实验组TE-1细胞中YAP1、Cyclin E和cIAP1蛋白表达量显著下降。见图5。

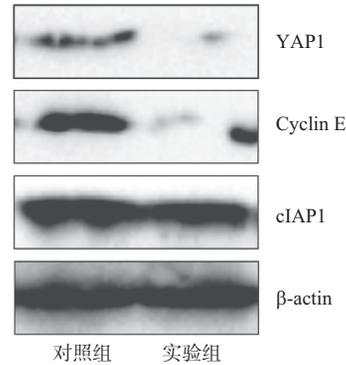


图5 两组细胞中Yes相关蛋白1(YAP1)及细胞周期蛋白E(Cyclin E)、细胞凋亡抑制蛋白1(cIAP1)蛋白的表达情况

### 3 讨论

miRNA是由20-24个核苷酸构成的单链非编码RNA,属于基因表达的转录后调控因子,miRNA在机体内广泛存在,通过与靶基因mRNA的3'非翻译区域的互补序列相结合,起到抑制靶基因表达的作用<sup>[9]</sup>。若miRNA与靶基因完全互补配对,导致靶基因mRNA的降解;若miRNA与靶基因不能完全互补配对,则导致靶基因mRNA翻译的抑制<sup>[10]</sup>。miRNA、靶基因及表型之间存在复杂相互作用,miRNA已经成为各种疾病诊断、治疗效果、预后评估的生物标志物。近年来研究表明,miR-145-5p、miR-130a、miR-99a等<sup>[11-13]</sup>众多miRNA参与食管癌的发生发展。miR-346参与多种疾病的病理过程。在糖尿病肾病小鼠模型中,miR-346作为SMAD3/4的负调节因子,通过减少肾组织中SMAD3/4表达,改善了糖尿病肾病小鼠的肾功能,延缓糖尿病肾病的进展,miR-346可能作为糖尿病肾病治疗的靶标分子。miR-346通过靶向Bcl-6基因的表达,调节CD4(+)CXCR5(+)T细胞数量,并且可能在Graves病的发病过程起重要作用<sup>[14]</sup>。miR-346在多种肿瘤中发挥明显的促癌或抑癌作用。miR-346在皮肤鳞状细胞癌中的表达升高,通过干扰SRCIN1基因的表达促进皮肤鳞状细胞癌的增殖和迁移<sup>[15]</sup>。miR-346通过靶向抑制SRCIN1基因的表达,促进乳腺癌细胞增殖、集落形成、迁移和侵袭,并减少细胞凋亡,同时降低降低乳腺癌细胞对多西紫杉醇的化学敏感

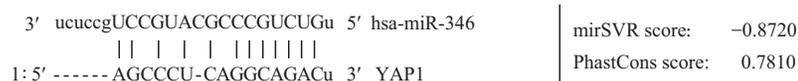


图4 miR-346与YAP1 mRNA 3' UTR互补配对区域

性<sup>[16]</sup>。Argonaute 2 蛋白对于 miRNA 的活性至关重要, miR-346 可增强 Argonaute 2 蛋白的表达, 导致其他 miRNA 的活性增加, 并促进宫颈癌细胞的迁移和侵袭<sup>[17]</sup>。miR-346 通过靶向抑制 BRMS1 基因的表达, 促进鼻咽癌细胞的迁移和侵袭<sup>[6]</sup>。miR-346 在非小细胞肺癌中属于致癌性 miRNA, 通过调控 XPC 基因的表达, 促进非小细胞肺癌细胞生长和转移<sup>[7]</sup>。肝细胞癌组织中 miR-346 表达显著下调, 且与肿瘤大小和 TNM 分级有关, miR-346 通过干扰 SMYD3 基因的表达抑制肝细胞癌细胞增殖, 同时 Cox 比例风险分析表明 miR-346 的低表达是 HCC 的独立预后因素<sup>[8]</sup>。miR-346 在食管癌中的研究尚未见报道。

我们发现, 过表达 miR-346 后食管癌细胞的活力和增殖能力显著下降, 细胞凋亡显著上升, miR-346 具有抑制食管癌细胞生长的作用。通过 microRNA.org-Targets and Expression 在线预测软件发现, YAP1 可能是 miR-346 的靶基因。YAP1 是一种癌基因, 在多种肿瘤中表现为高表达, 参与肿瘤的发生发展<sup>[18]</sup>。YAP1 是 Hippo-YAP 通路负向调控的下游效应分子, Hippo-YAP 信号通路通过调节细胞增殖与凋亡, 在肿瘤发生发展中发挥重要的抑癌作用。当 Hippo-YAP 信号通路失活时, YAP1 表达上调<sup>[19]</sup>。YAP1 mRNA 和蛋白在食管癌组织中明显上调, 且 YAP1 与食管癌的转移和肿瘤分期密切相关<sup>[20]</sup>。我们发现, 过表达 miR-346 后的食管癌细胞中 YAP1 基因表达下降。高表达的 YAP1 可诱导细胞周期蛋白 E (Cyclin E) 和细胞凋亡抑制蛋白 1 (cIAP1) 等基因的表达, 促进细胞的增殖和抑制细胞凋亡, 促进肿瘤的发生发展<sup>[21-22]</sup>。Cyclin E 和 cIAP1 蛋白表达变化与文献一致。

总之, 本组实验结果提示, miR-346 在食管癌组织以及食管癌细胞株中均呈低表达, 能明显抑制食管癌细胞的增殖, 诱导细胞的凋亡, 其可能机制是干扰 YAP1 基因的表达。miR-346 或许可成为治疗食管癌的新靶点。

### 参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] 王迪, 柴小青, 疏树华, 等. 氟比洛芬酯对食管癌患者围术期外周血树突状细胞亚群数量的影响 [J]. 安徽医药, 2015, 19(12): 2384-2388.
- [3] PEERLINGS J, VAN DE VOORDE L, MITEA C, et al. Hypoxia and hypoxia response-associated molecular markers in esophageal cancer: A systematic review [J]. Methods, 2017, 130: 51-62.
- [4] MILLER K D, SIEGEL R L, LIN C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289.
- [5] 兰艳丽, 刘韵. 光动力学处理对宫颈癌细胞的 miRNA 的影响 [J]. 安徽医药, 2015, 19(12): 2321-2325.
- [6] YAN H L, LI L, LI S J, et al. miR-346 promotes migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells via targeting BRMS1 [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2016, 30(12): 602-607.
- [7] SUN C C, LI S J, YUAN Z P, et al. MicroRNA-346 facilitates cell growth and metastasis, and suppresses cell apoptosis in human non-small cell lung cancer by regulation of XPC/ERK/Snai1/E-cadherin pathway [J]. Aging (Albany NY), 2016, 8(10): 2509-2524.
- [8] ZHU W, QIAN J, MA L, et al. MiR-346 suppresses cell proliferation through SMYD3 dependent approach in hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(39): 65218-65229.
- [9] ZHANG R, LIU R, LIU C, et al. A novel role for MiR-520a-3p in regulating egfr expression in colorectal cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(4): 1559-1574.
- [10] LI Z, PENG Z, GU S, et al. Global analysis of miRNA-mRNA interaction network in breast cancer with brain metastasis [J]. Anticancer Res, 2017, 37(8): 4455-4468.
- [11] MEI L L, WANG W J, QIU Y T, et al. miR-145-5p Suppresses tumor cell migration, invasion and epithelial to mesenchymal transition by regulating the Sp1/NF-kappaB signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9): 237-239.
- [12] SHOJI H, ISOMOTO H, YOSHIDA A, et al. MicroRNA-130a is highly expressed in the esophageal mucosa of achalasia patients [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(2): 898-904.
- [13] MEI L L, QIU Y T, HUANG M B, et al. MiR-99a suppresses proliferation, migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells through inhibiting the IGF1R signaling pathway [J]. Cancer Biomark, 2017, 22(2): 145-148.
- [14] CHEN J, TIAN J, TANG X, et al. MiR-346 regulates CD4(+)CXCR5(+) T cells in the pathogenesis of Graves' disease [J]. Endocrine, 2015, 49(3): 752-760.
- [15] CHEN B, PAN W, LIN X, et al. MicroRNA-346 functions as an oncogene in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Tumour Biol, 2016, 37(2): 2765-2771.
- [16] YANG F, LUO L J, ZHANG L, et al. MiR-346 promotes the biological function of breast cancer cells by targeting SRCIN1 and reduces chemosensitivity to docetaxel [J]. Gene, 2017, 600: 21-28.
- [17] GUO J, LV J, LIU M, et al. miR-346 Up-regulates argonaute 2 (AGO2) protein expression to augment the activity of other microRNAs (miRNAs) and contributes to cervical cancer cell malignancy [J]. J Biol Chem, 2015, 290(51): 30342-30350.
- [18] YEY Y W, CHENG C C, YANG S T, et al. Targeting the VEGF-C/VEGFR3 axis suppresses Slug-mediated cancer metastasis and stemness via inhibition of KRAS/YAP1 signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8(3): 5603-5618.
- [19] MA Y, YANG Y, WANG F, et al. Hippo-YAP signaling pathway: a new paradigm for cancer therapy [J]. Int J Cancer, 2015, 137(10): 2275-2286.
- [20] ZHAO J, LI X, YANG Y, et al. Effect of YAP1 silencing on esophageal cancer [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 3137-3146.
- [21] KODAKA M, HATA Y. The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(2): 285-306.
- [22] MOROISHI T, HANSEN C G, GUAN K L. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(2): 73-79.

(收稿日期: 2017-07-27, 修回日期: 2017-09-15)