

论著·基础研究

miR-760 靶向 *c-Myc* 对人食管鳞状细胞癌 TE-10 细胞生物学特性的影响

杨雪涛, 王小文, 吴庆琛

重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016

[摘要] **目的**·观察 miR-760 对人食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) TE-10 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响并初步探究其机制。**方法**·应用反转录-定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 和 Western blotting 检测 miR-760 和 *c-Myc* 在 5 个 ESCC 细胞株 (正常食管鳞状上皮细胞作为对照) 和 14 例 ESCC 组织 (癌旁组织作为对照) 标本中的 mRNA 与蛋白表达水平。使用 miR-760 的模拟物、抑制剂 (miR-mimics 组、miR-inhibitor 组) 及模拟物阴性对照、抑制剂阴性对照 (mimics-NC 组、inhibitor-NC 组) 转染 TE-10 细胞, 通过 RT-qPCR 验证 miR-760 的过表达和抑制效率以及 *c-Myc* 在 mRNA 水平的表达变化。CCK-8 和集落形成实验检测 miR-760 对 TE-10 细胞增殖能力的影响; 流式细胞术检测细胞周期分布及凋亡比例的变化; Western blotting 分析 *c-Myc* 蛋白及细胞周期、凋亡、迁移和侵袭等相关蛋白表达水平的变化。通过双荧光素酶实验验证 miR-760 与 *c-Myc* 的靶向结合作用。**结果**·5 个 ESCC 细胞株的 miR-760 表达水平均低于正常食管鳞状上皮细胞, 而 *c-Myc* mRNA 和蛋白的表达水平高于正常食管鳞状上皮细胞; 在癌组织中 miR-760 的表达水平较癌旁组织降低, 而 *c-Myc* mRNA 和蛋白的表达水平较癌旁组织升高。与 mimics-NC 组相比, miR-mimics 组的细胞增殖能力降低, 细胞形成的集落数目减少, 阻滞在 G1 期的细胞和凋亡细胞的比例均明显增加, 迁移和侵袭细胞的数量减少; miR-mimics 组周期蛋白 D1、B 细胞淋巴瘤 2 蛋白、基质金属蛋白酶 2 和波形蛋白的表达水平降低, 而裂解型半胱氨酸蛋白酶 3、上皮钙黏素和 β -连环蛋白的表达水平升高; miR-inhibitor 组则呈现与 miR-mimics 组相反的结果。双荧光素酶实验证实了 miR-760 与 *c-Myc* 3' 非翻译区具有靶向结合作用。**结论**·miR-760 可能通过靶向 *c-Myc* 抑制 TE-10 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并诱导其凋亡。

[关键词] miR-760; 食管鳞状细胞癌; *c-Myc*; 靶基因

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.11.009 **[中图分类号]** R655.4; R735.1; Q279 **[文献标志码]** A

Effects of miR-760 targeting *c-Myc* on biological characteristics of human esophageal squamous cell carcinoma TE-10 cells

YANG Xue-tao, WANG Xiao-wen, WU Qing-chen

Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective**·To detect the effects of miR-760 on proliferation, apoptosis, migration and invasion of human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) TE-10 cells and to analyse the underlying mechanism. **Methods**·The mRNA and protein expression levels of miR-760 and *c-Myc* in five ESCC cell lines (normal esophageal epithelial cells as control) and 14 pieces of ESCC tissue specimens (paracancerous tissues as control) were detected by using reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting. TE-10 cells were transfected with miR-760 mimics, miR-760 inhibitor (miR-mimics/miR-inhibitor group) and corresponding negative controls (mimics-NC/inhibitor-NC group), in which the overexpression and inhibition efficiency of miR-760 and the expression of *c-Myc* were verified by RT-qPCR. The effect of miR-760 on the proliferation of TE-10 cells was assessed by CCK-8 and colony formation assay. Changes of cell cycle distribution and proportion of apoptotic cells were measured by flow cytometry. Expression levels of cell cycle-, apoptosis-, migration-, and invasion-associated proteins as well as *c-Myc* were analyzed by Western blotting. The targeting relationship between miR-760 and *c-Myc* was verified by using the dual luciferase reporter assay. **Results**·The expressions of miR-760 were down-regulated and the expressions of *c-Myc* mRNA and protein were up-regulated in five ESCC cell lines compared with those in the normal esophageal epithelial cells. In 14 cases of ESCC tissue specimens, the expressions of miR-760 were down-regulated but the expressions of *c-Myc* were up-regulated compared with those in the cancer-adjacent tissues. The proliferation ability of TE-10 cells in the miR-mimics group was markedly attenuated, and colony numbers were also decreased. Flow cytometry assay showed that the proportion of cells in G1 phase was notably augmented, and the proportion of apoptotic cells was also increased. The miR-mimics group cells had weaker migration and invasion potential compared with mimics-NC group. Western blotting analysis conformed that expression levels of cyclin D1, B cell lymphoma 2, matrix metalloproteinase 2 and vimentin were decreased, but expression levels of cleaved-caspase3, E-cadherin and β -catenin were elevated. The miR-inhibitor group showed opposite results compared with the miR-mimics group. The dual luciferase reporter assay validated the direct targeted binding of miR-760 to the 3'UTR of *c-Myc*. **Conclusion**·miR-760 can suppress proliferation, migration and invasion, and induce apoptosis of TE-10 cells by directly targeting *c-Myc*.

[Key words] miR-760; esophageal squamous cell carcinoma; *c-Myc*; target gene

[基金项目] 重庆市卫生局重点项目 (20121015) (Key Project of Chongqing Health Bureau, 20121015)。

[作者简介] 杨雪涛 (1992—), 男, 硕士; 电子信箱: yangxuetao92@163.com。

[通信作者] 吴庆琛, 电子信箱: qcwucq@163.com。

食管癌, 包括食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 和食管腺癌 (esophageal adenocarcinoma, EAC), 是世界上第八大常见的人类恶性肿瘤, 也是癌症致死的第六大原因, 在非洲和东南亚国家尤其是中国的发生率较高^[1]。食管癌的主要治疗方法包括手术治疗以及手术联合放射治疗 (放疗) 和化学治疗 (化疗), 但存在预后不良和 5 年生存率较低的情况^[2]。

miRNA 是一类内源性表达的短链非编码小 RNA, 可通过与靶基因 3' 非翻译区 (3'UTR) 序列中的互补位点相互作用来调控其转录后沉默, 从而调节增殖、分化、凋亡、代谢、免疫和肿瘤起始等多种生物学进程^[3-4]。尽管已确认的人类 miRNA 的数量不断增加, 但仅有少数 miRNA 在病理生理方面的功能和机制得到了描述。已发现在多种人类恶性肿瘤中 miR-760 的表达水平下调, 包括结直肠癌、非小细胞肺癌、胃癌和乳腺癌等^[5-8]。然而, miR-760 在 ESCC 中的作用机制仍未见报道。

c-Myc 基因是 *MYC* (MYC proto-oncogene, BHLH transcription factor) 家族的成员之一, 主要通过扩增和染色体易位重排的方式激活, 可以通过驱动细胞分裂、无限增殖和细胞永生化来促进肿瘤的发生、发展^[9-10]。据调查, 20% 的人类恶性肿瘤, 包括乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、骨肉瘤和小细胞肺癌等, 均与 *c-Myc* 的异常表达有关^[9-12]。本研究拟分析 miR-760 在 ESCC TE-10 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭中的作用及潜在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床组织标本和细胞株 收集 2017—2018 年于重庆医科大学附属第一医院接受食管癌根治术的 14 例 ESCC 患者的癌组织及癌旁组织 (正常食管组织或距离癌组织 ≥ 5 cm)。患者术前均未接受化疗或放疗。标本收集后立即液氮快速冷冻, 并储存在 -80°C 冰箱。所有患者或监护人均签署知情同意书。研究获得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会的批准。人 ESCC 细胞株 TE-10、Eca109、KYSE510、KYSE150 和 EC9706 以及正常人食管鳞状上皮细胞 Het-1A 由重庆市分子肿瘤学和表观遗传学重点实验室提供。

1.1.2 试剂和仪器 RPMI-1640 培养基购于 Hyclone 公司 (美国), 胎牛血清购于 PAN Biotech 公司 (德国), 青霉素、链霉素、胰酶和嘌呤霉素购于 Gibco 公司 (美国), SanPrep 柱式 microRNA 提取试剂盒购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司, All-in-OneTM 第一链 cDNA 合

成试剂盒和 All-in-OneTM miRNA qRT-PCR 检测试剂盒购于 GeneCopoeia 公司 (美国), TRIzol 试剂、PrimeScriptTM RT 试剂盒和 SYBR Premix Ex TaqTM II (TliRNaseH Plus) 试剂盒购于 TaKaRa 公司 (日本), Lipofectamine 2000 转染试剂购于 Invitrogen 公司 (美国), miR-760 的模拟物 (miR-mimics)、抑制剂 (miR-inhibitor)、模拟物阴性对照 (mimics-NC)、抑制剂阴性对照 (inhibitor-NC) 及 GP-miRGLO 质粒载体 [c-Myc-WT (c-Myc 野生型质粒)、c-Myc-MUT (c-Myc 突变型质粒) 和空质粒] 均购于上海吉玛制药技术有限公司, 蛋白裂解液 (RIPA)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、BCA 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司, CCK-8 试剂盒购于 Bimake 公司 (美国), 细胞周期测定试剂盒购于 Sigma 公司 (美国), 细胞凋亡试剂盒购于 BD 公司 (美国), BD Matrigel 基质胶购于 Corning 公司 (美国), Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 试剂盒购于 Promega 公司 (美国), 兔抗人 c-Myc 多克隆抗体、兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 多克隆抗体购于北京博奥森生物技术有限公司, 兔抗人上皮钙黏素 (E-cadherin) 多克隆抗体购于 CST 公司 (美国), 鼠抗人 B 细胞淋巴瘤 2 (B cell lymphoma 2, Bcl2)、周期蛋白 D1 (cyclin D1)、半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase3)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 和波形蛋白 (vimentin) 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司 (美国), 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和抗小鼠 IgG (二抗) 购于北京神州义翘科技有限公司, PVDF 膜、ECL 化学发光试剂购于 Millipore 公司 (美国)。倒置显微镜 (CKX41, Leica, 德国), Tecan Infinite[®] 200 Pro 多功能酶标仪 (M200, Tecan, 瑞士), 流式细胞仪 (FACSCanto II, Corning, 美国), 迷你双垂直电泳槽 (DYCZ-24DN, 北京六一生物科技有限公司), 定量 PCR 仪 (Applied Biosystems ABI 7500 型, Thermo, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA 提取、反转录和实时定量 PCR 使用 SanPrep 柱式 microRNA 提取试剂盒和 RNAiso Plus (TRIzol) 从 6 个细胞株和 14 对癌及癌旁组织中提取 miRNA 和总 RNA。随后使用 All-in-OneTM 第一链 cDNA 合成试剂盒将从细胞和组织获得的 miRNA 反转录成 cDNA, 根据标准程序使用 All-in-OneTM miRNA qRT-PCR 检测试剂盒进行反转录-定量聚合酶链反应 (RT-qPCR)。对于总 RNA, 使用 PrimeScriptTM RT 试剂盒生成 cDNA 并使用 SYBR Premix Ex TaqTM II (TliRNaseH Plus) 对 mRNA 表达进行 RT-qPCR 检测。最后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法衡量 miRNA 和 mRNA

相对表达水平。

1.2.2 蛋白提取及 Western blotting 向待检测的细胞和组织中加入适量 RIPA 与 PMSF 的混合液 (100:1) 裂解, 将裂解混合物置于 4 ℃ 摇床 30 min 后, 用超声进一步裂解; 4 ℃ 离心 15 min, 收集上清液获得总蛋白。之后用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。按 4:1 的比例于裂解混合物中加入蛋白上样缓冲液后在 100 ℃ 的条件下变性 10 min。20 μg/孔等量上样后在 10% 的分离胶中进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 100 V 分离 1.5 h, 然后按 250 mA 恒电流转至 PVDF 膜。室温下在 QuickBlock™ 封闭缓冲液中封闭 15 min, 加入一抗, 4 ℃ 孵育过夜。随后 TBST 洗涤 3 次, 在室温下二抗 (1:5 000) 孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次后, 电化学发光 (ECL) 试剂显影。

1.2.3 转染 取对数生长期 TE-10 细胞, 胰酶消化后制备成 8×10^4 个/mL 的细胞悬液, 按照 2.5 mL/孔加入 6 孔板, 培养 24 h 生长至 40% ~ 70% 融合度。更换完全培养基 (含 10% 胎牛血清) 为无血清培养基后, 每孔分别加入 75 pmol miR-mimics、mimic-NC、miR-inhibitor 和 inhibitor-NC, 再分别加入 5 μL Lipofectamine 2000, 混合。6 h 后换液, 继续培养。将转染的 TE-10 细胞分为处理组 (miR-mimics 组、miR-inhibitor 组) 和对照组 (mimics-NC 组、inhibitor-NC 组), 进行后续细胞实验。

1.2.4 细胞增殖和集落形成实验 按照 2×10^3 个/孔将转染 48 h 的 TE-10 细胞接种到 96 孔板中, 每组 5 个复孔。细胞贴壁后, 将 100 μL 无血清 RPMI-1640 培养基和 10 μL CCK-8 试剂混匀并加入 96 孔板中, 37 ℃ 孵育 2 h 后使用酶标仪测量 450 nm 处的 $D(450 \text{ nm})$ 值并设定为 0 h 时间点, 之后分别在 24、48 和 72 h 时间点测定 $D(450 \text{ nm})$ 值。对于集落形成试验, 按照 500 个/孔将转染 48 h 的 TE-10 细胞接种于 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔。培养约 2 周后出现肉眼可见成团细胞集落即终止培养, 在 4% 多聚甲醛固定和 0.1% 结晶紫染色后于显微镜下扫描计数。

1.2.5 细胞周期检测 离心收集转染 48 h 的 TE-10 细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 在 -20 ℃ 预冷的 70% 乙醇中轻柔吹散并固定至少 24 h。用 PBS 洗涤细胞, 之后重悬于 400 μL PBS 中, 加入 2.5 μL RNase 在 37 ℃ 孵育 30 min。再加入 5 μL 碘化丙啶 (PI) 于 37 ℃ 避光孵育 30 min, 通过流式细胞术检测细胞周期。

1.2.6 细胞凋亡检测 离心收集转染 48 h 的 TE-10 细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 以 1×10^6 个/mL 的细胞浓度重悬于 $1 \times$ 结合缓冲液中。将 100 μL 含有 1×10^5 个细胞的悬液转

移到 1.5 mL EP 管中, 加入 5 μL FITC Annexin V 和 5 μL PI 复合物, 在室温下避光孵育 15 min。加入 400 μL $1 \times$ 结合缓冲液, 并在 1 h 内通过流式细胞术检测细胞凋亡。

1.2.7 细胞迁移和侵袭试验 对于细胞迁移试验, 将悬浮于 200 μL 无血清 RPMI-1640 培养基中的 5×10^4 个细胞 (转染 48 h) 加至 Transwell 小室上室中, 并在下室里加入 700 μL 完全培养基。对于细胞侵袭试验, 将含有 5×10^4 个细胞 (转染 48 h) 的无血清 RPMI-1640 悬液 (200 μL) 接种于铺有基质胶的小室上室, 并在下室加入 700 μL 完全培养基。设置处理组和对照组, 每组 3 个复孔。在含 5% CO₂ 的 37 ℃ 孵箱中培养 24 h (迁移) 或 36 h (侵袭) 后, 用 4% 多聚甲醛固定和 0.1% 结晶紫染色, 并在聚碳酸酯膜内侧用棉签轻轻拭去残留的细胞, 随机选取 5 个显微镜视野 ($\times 200$) 拍照计数。

1.2.8 双荧光素酶试验 按照 5×10^4 个/孔将 TE-10 细胞接种至 96 孔板, 培养 24 h。将 0.2 μL/孔的 GP-miRGLO 质粒载体 (c-Myc-WT、c-Myc-MUT 和空质粒载体) 分别与 5 pmol/孔的 miR-mimics 和 mimics-NC 混匀, 室温放置 5 min, 再与 0.2 μL/孔 Lipofectamine 2000 混合, 室温放置 20 min 后共转染细胞, 每组设置 3 个复孔。转染 48 h 后, 使用酶标仪并按照 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 操作说明书测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性比值。

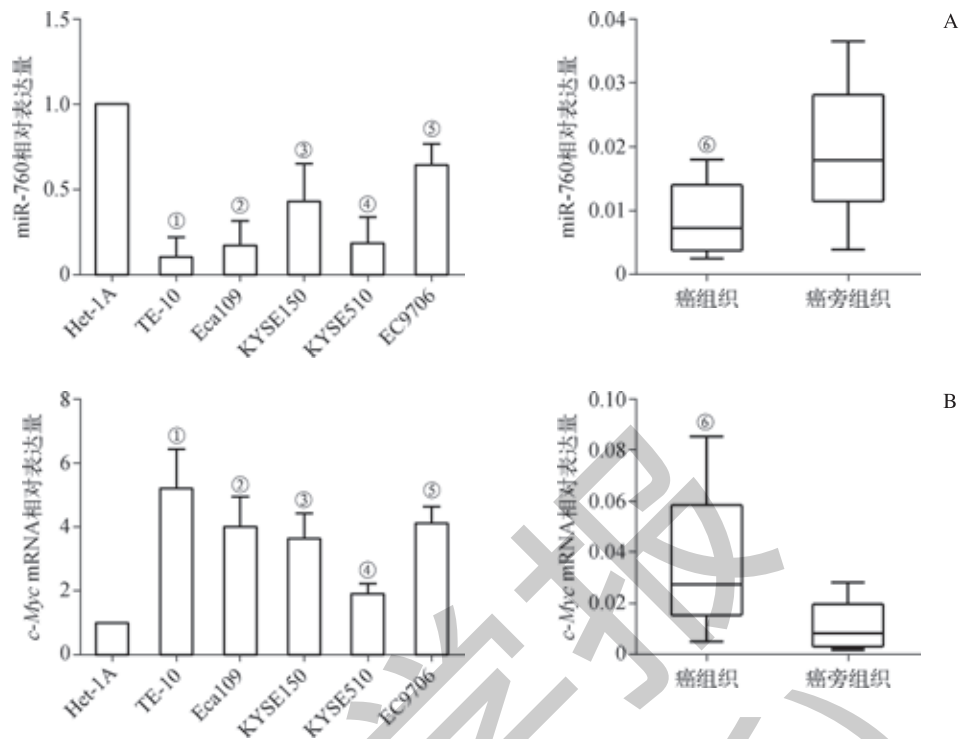
1.3 统计学方法

应用 SPSS20.0、GraphPad Prism 7.0 以及 Adobe Illustrator CS6 软件进行统计学分析和作图。定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 t 检验 (student t test) 或秩和检验 (Mann-Whitney U test)。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-760 和 c-Myc 在 ESCC 细胞株和组织中的表达水平

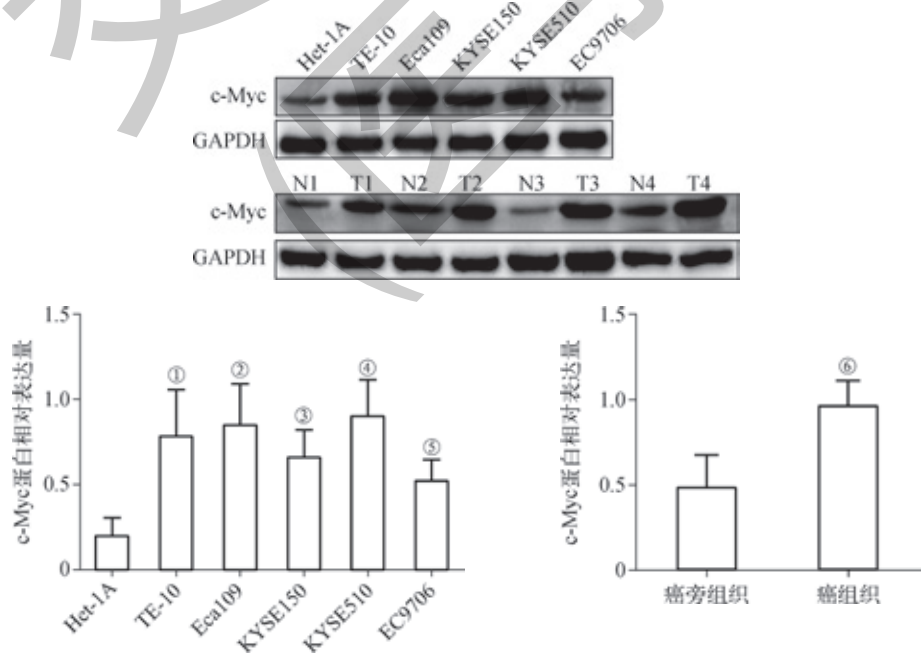
通过 RT-qPCR 检测, miR-760 在 5 个 ESCC 细胞株 TE-10、Eca109、KYSE150、KYSE510 和 EC9706 中的表达水平均低于食管鳞状上皮细胞 Het-1A, 在 14 例癌组织中的表达水平均低于癌旁组织 (均 $P < 0.05$) (图 1A)。而 *c-Myc* 的 mRNA 表达水平在 ESCC 细胞株和癌组织中均升高 (均 $P < 0.05$) (图 1B)。综合上述结果, 在 5 个 ESCC 细胞株中 TE-10 细胞的 miR-760 表达水平最低, 而 *c-Myc* 表达水平最高, 因此选择 TE-10 细胞进行进一步的细胞功能实验。



注: A. miR-760 在 6 个细胞株和 14 对癌及癌旁组织的表达 (^① $P=0.000$, ^② $P=0.001$, ^③ $P=0.011$, ^④ $P=0.001$, ^⑤ $P=0.008$, 与 Het-1A 细胞比较; ^⑥ $P=0.023$, 与癌旁组织比较); B. *c-Myc* 在 6 个细胞株和 14 对癌及癌旁组织的 mRNA 表达水平 (^① $P=0.004$, ^② $P=0.007$, ^③ $P=0.005$, ^④ $P=0.012$, ^⑤ $P=0.001$, 与 Het-1A 细胞比较; ^⑥ $P=0.002$, 与癌旁组织比较)

图 1 RT-qPCR 检测 miR-760 和 *c-Myc* 在 ESCC 细胞株和组织中的表达
Fig 1 RT-qPCR analysis of miR-760 and *c-Myc* expression in ESCC cell lines and tissues

对 6 个细胞株与随机选取的 4 对 ESCC 组织样本进行 Western blotting 检测。与 Het-1A 细胞相比, 5 个 ESCC 细胞株中 *c-Myc* 的蛋白表达水平均明显增高 ($P<0.05$); 4 对 ESCC 癌组织的 *c-Myc* 蛋白表达水平亦均高于癌旁组织 ($P=0.009$) (图 2)。



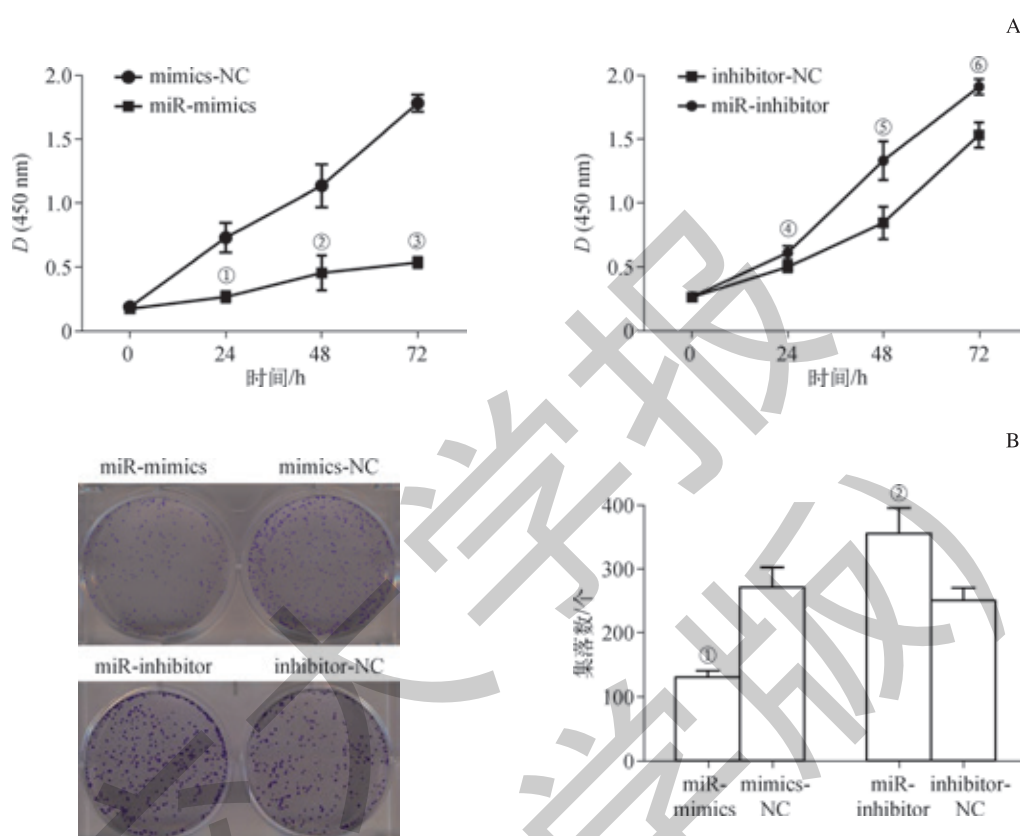
注: N1 ~ N4 为癌旁组织, T1 ~ T4 为癌组织。 ^① $P=0.026$, ^② $P=0.014$, ^③ $P=0.016$, ^④ $P=0.007$, ^⑤ $P=0.028$, 与 Het-1A 细胞比较; ^⑥ $P=0.009$, 与癌旁组织比较

图 2 Western blotting 检测 *c-Myc* 在 ESCC 细胞株和组织中的蛋白表达
Fig 2 Western blotting analysis of *c-Myc* protein expression in ESCC cell lines and tissues

2.2 过表达 miR-760 抑制 TE-10 细胞增殖

CCK-8 检测结果显示, miR-mimics 组 TE-10 细胞在 24、48、72 h 3 个时间点的 $D(450\text{ nm})$ 值均低于 mimics-NC 组 ($P<0.05$); 而 miR-inhibitor 组在 3 个时间点的 $D(450\text{ nm})$ 值均高于 inhibitor-NC 组 ($P<0.05$) (图 3A)。集落形

成实验结果显示 miR-mimics 组细胞形成的集落数低于 mimics-NC 组 [(130 ± 6) 个 vs (271 ± 18) 个, $P=0.002$], 而 miR-inhibitor 组细胞形成的集落数高于 inhibitor-NC 组 [(335 ± 23) 个 vs (251 ± 11) 个, $P=0.006$] (图 3B)。



注: A. CCK-8 实验检测 miR-mimics/inhibitor 组的细胞增殖能力 (^① $P=0.002$, ^② $P=0.004$, ^③ $P=0.001$, 与 mimics-NC 组比较; ^④ $P=0.047$, ^⑤ $P=0.013$, ^⑥ $P=0.005$, 与 inhibitor-NC 组比较); B. 集落形成实验检测 miR-mimics/inhibitor 组的细胞集落形成能力 (^① $P=0.009$, 与 mimics-NC 组比较; ^② $P=0.006$, 与 inhibitor-NC 组比较)

图 3 不同处理组的 TE-10 细胞增殖能力检测

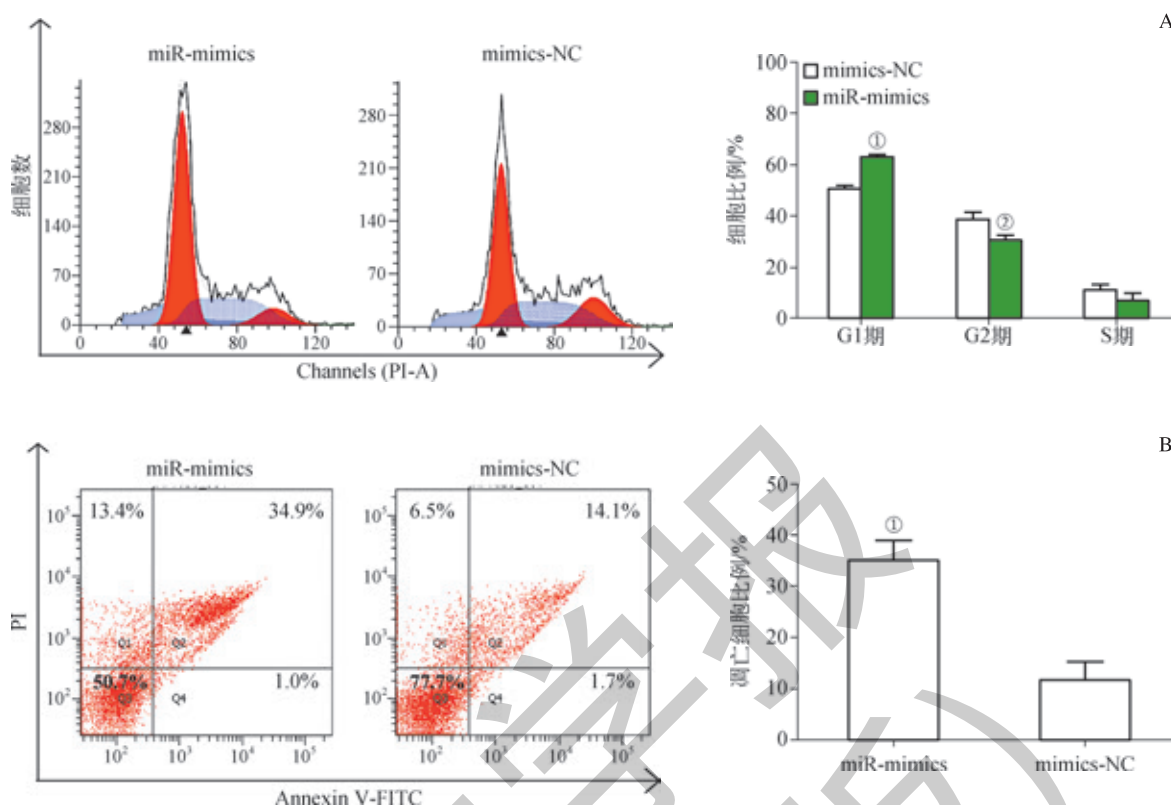
Fig 3 Analysis of proliferative ability of TE-10 cells in different treatment groups

2.3 过表达 miR-760 导致 ESCC 细胞周期阻滞在 G1 期并诱导其凋亡

由于 miR-760 过表达可以抑制 TE-10 细胞增殖, 因此通过流式细胞术来检测 TE-10 细胞周期是否受 miR-760 过表达影响。图 4A 显示 miR-mimics 组 G1 期细胞比例增加 [$(50.36\pm0.83)\%$ vs $(62.80\pm0.32)\%$, $P=0.000$], S 期无明显变化 [$(11.12\pm1.15)\%$ vs $(7.02\pm1.54)\%$, $P=0.099$], G2 期细胞比例减少 [$(38.49\pm1.67)\%$ vs $(30.17\pm1.23)\%$, $P=0.016$]。进一步通过流式细胞术分析 miR-760 在 TE-10 细

胞中的促凋亡作用。结果表明, TE-10 细胞中 miR-mimics 组的细胞凋亡率 [早期凋亡率 (Q2) + 晚期凋亡率 (Q4)] 明显高于 mimics-NC 组 [$(36.97\pm0.83)\%$ vs $(11.57\pm2.15)\%$, $P=0.002$] (图 4B)。

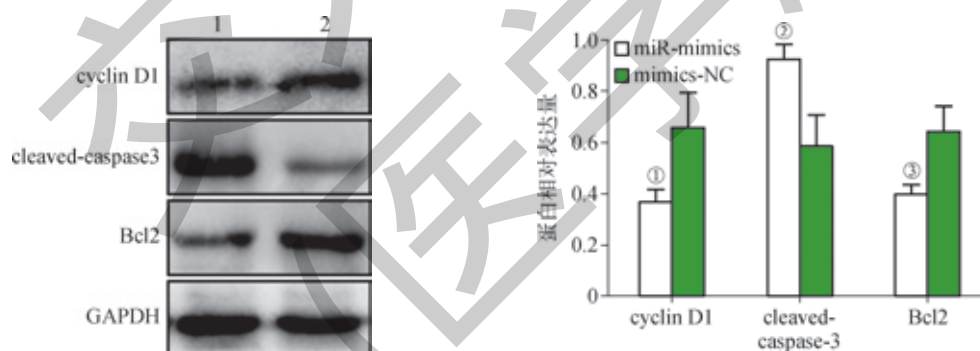
此外, miR-mimics 组 cyclin D1 的蛋白表达水平降低 ($P=0.026$), 进一步支持 miR-760 过表达导致 TE-10 细胞周期阻滞在 G1 期; 促凋亡蛋白 cleaved-caspase3 的表达水平升高 ($P=0.012$), 抗凋亡蛋白 Bcl2 表达水平降低 ($P=0.017$), 提示 miR-760 过表达促进 TE-10 细胞凋亡 (图 5)。



注: A. 细胞周期流式检测 (^① $P=0.000$, ^② $P=0.016$, 与 mimics-NC 组比较); B. 细胞凋亡流式检测 (^① $P=0.002$, 与 mimics-NC 组比较)

图4 流式细胞术检测 miR-mimics 对 TE-10 细胞周期及凋亡的影响

Fig 4 Effects of miR-mimics on cell cycle and apoptosis in TE-10 cells by flow cytometry analysis



注: 1. miR-mimics 组; 2. mimics-NC 组; ^① $P=0.026$, ^② $P=0.012$, ^③ $P=0.017$, 与 mimics-NC 组比较

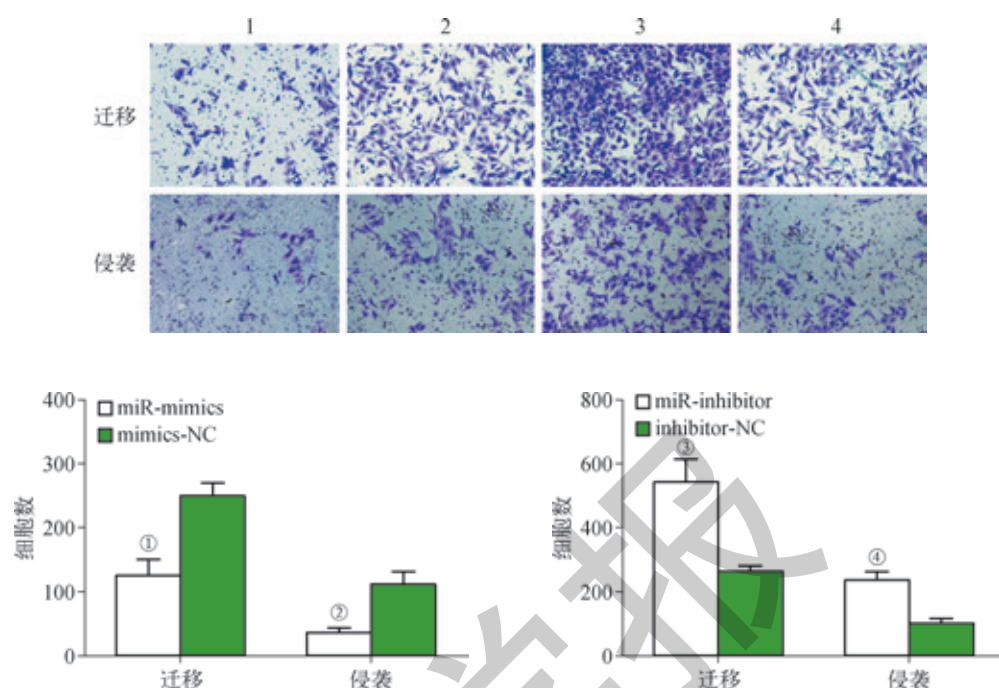
图5 转染 miR-mimics 后 TE-10 细胞周期蛋白和凋亡相关蛋白的表达

Fig 5 Expression levels of cell cycle- and apoptosis-related proteins in TE-10 cells transfected with miR-mimics

2.4 miR-760 抑制 ESCC 细胞的迁移和侵袭

Transwell 迁移实验结果显示, miR-mimics 组穿出细胞数较 mimics-NC 组减少 [(125±15) 个 vs (251±11) 个, $P=0.003$], 而 miR-inhibitor 组穿出细胞数较 inhibitor-NC 组增多 [(265±9) 个 vs (541±43) 个, $P=0.003$]; 并且侵袭

实验结果表明, miR-mimics 组穿出细胞数较 mimics-NC 组减少 [(35±4) 个 vs (113±9) 个, $P=0.001$], 而 miR-inhibitor 组穿出细胞数较 inhibitor-NC 组增多 [(237±12) 个 vs (101±12) 个, $P=0.001$] (图 6)。

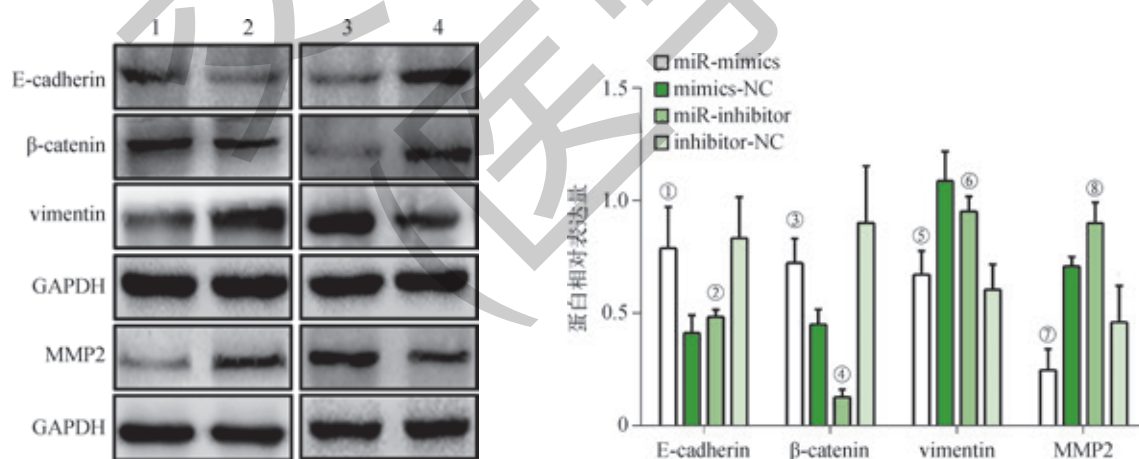


注: 1 为 miR-mimics 组, 2 为 mimics-NC 组, 3 为 miR-inhibitor 组, 4 为 inhibitor-NC 组; ^① $P=0.003$, ^② $P=0.001$, 与 mimics-NC 组比较; ^③ $P=0.003$, ^④ $P=0.001$, 与 inhibitor-NC 组比较

图 6 不同处理组 TE-10 细胞的迁移和侵袭能力

Fig 6 Migratory and invasive ability of TE-10 cells in different treatment groups

此外, Western blotting 结果显示: miR-mimics 组 E-cadherin 和 β -catenin 的表达水平升高, MMP2 和 vimentin 的表达水平降低 (均 $P<0.05$); miR-inhibitor 组 E-cadherin 和 β -catenin 的表达水平降低, MMP2 和 vimentin 的表达水平升高 (均 $P<0.05$) (图 7)。



注: 1 为 miR-mimics 组, 2 为 mimics-NC 组, 3 为 miR-inhibitor 组, 4 为 inhibitor-NC 组; ^① $P=0.031$, ^② $P=0.021$, ^③ $P=0.013$, ^④ $P=0.002$, 与 mimics-NC 组比较; ^⑤ $P=0.031$, ^⑥ $P=0.006$, ^⑦ $P=0.010$, ^⑧ $P=0.015$, 与 inhibitor-NC 组比较

图 7 Western blotting 检测不同处理组 TE-10 细胞迁移和侵袭相关蛋白的表达

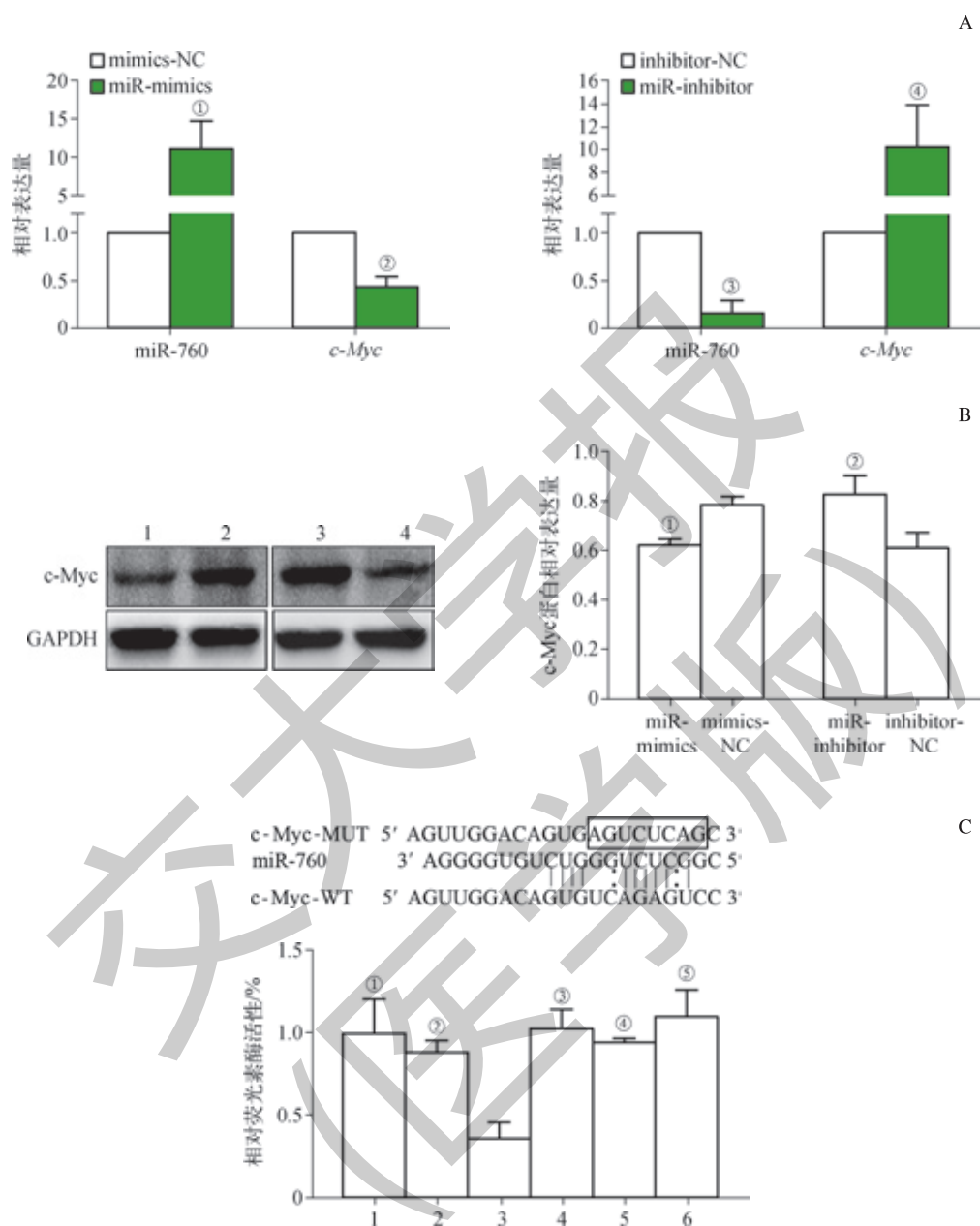
Fig 7 Expression levels of migration- and invasion-associated proteins in TE-10 cells of different treatment groups by Western blotting

2.5 *c-Myc* 是 miR-760 的靶基因

在 TE-10 细胞转染 miR-mimics 后, miR-760 表达水平升高 ($P=0.010$), *c-Myc* 表达水平降低 ($P=0.001$);

而转染 miR-inhibitor 后 miR-760 表达水平明显下调 ($P=0.000$), *c-Myc* 表达水平明显升高 ($P=0.013$) (图 8A、B)。miR-760 与 *c-Myc* 的 3' UTR 存在结合位点 (图

8C), 因此, 预测 *c-Myc* 为 miR-760 的靶基因。双荧光素酶实验结果显示 *c-Myc*-WT+miR-mimics 组的荧光素酶活性降低 ($P<0.05$), 而其他处理组和对照组的荧光素酶活性无明显变化 ($P>0.05$)。



注: A. 转染 miR-mimics/inhibitor 后 miR-760 和 *c-Myc* mRNA 表达 (^① $P=0.010$, ^② $P=0.001$, 与 mimics-NC 组比较; ^③ $P=0.000$, ^④ $P=0.013$, 与 inhibitor-NC 组比较); B. 不同处理组 TE-10 细胞 *c-Myc* 的蛋白表达 (1 为 miR-mimics 组, 2 为 mimics-NC 组, 3 为 miR-inhibitor 组, 4 为 inhibitor-NC 组; ^① $P=0.002$, 与 mimics-NC 组比较; ^② $P=0.020$, 与 inhibitor-NC 组比较); C. miR-760 与 *c-Myc* 的结合位点及双荧光素酶试验 (1 为空质粒 + miR-mimics, 2 为 *c-Myc*-MUT + miR-mimics, 3 为 *c-Myc*-WT + miR-mimics, 4 为空质粒 + mimics-NC, 5 为 *c-Myc*-MUT + mimics-NC, 6 为 *c-Myc*-WT + mimics-NC; ^① $P=0.012$, ^② $P=0.002$, ^③ $P=0.006$, ^④ $P=0.001$, ^⑤ $P=0.009$, 与 *c-Myc*-WT + miR-mimics 组比较)

图 8 在 TE-10 细胞中 miR-760 靶向结合 *c-Myc*

Fig 8 miR-760 targeting *c-Myc* in TE-10 cells

3 讨论

miRNA 可以广泛激活多条信号通路从而调控 ESCC 进展, 这使得 miRNA 可以作为 ESCC 早期诊断、靶向治疗和

预测预后的新型标志物^[13]。之前的报道^[5-8, 14]指出 miR-760 可以通过靶向多种基因 (*c-Myc* 未见报道) 调控包括非小细胞肺癌、胃癌、结直肠癌和乳腺癌在内的多种人类肿瘤进展从而发挥其抑癌基因的功能。然而, 在 ESCC 中关于 miR-

760 功能和分子机制的研究仍未见报道。基于此, 我们通过 RT-qPCR 检测 miR-760 和 *c-Myc* 在 ESCC 细胞系和癌组织中的表达, 结果发现 miR-760 的表达水平明显降低而 *c-Myc* 的表达水平明显升高, 提示 miR-760 可能在 ESCC 中发挥抑癌作用, 也表明对 miR-760、*c-Myc* 在 ESCC 中的关系进行进一步研究具有较高的可行性。由于在 5 株 ESCC 细胞系中 TE-10 细胞的 miR-760 表达水平最低, *c-Myc* 表达水平最高, 因此我们选择 TE-10 细胞行进一步的细胞功能实验。

为了明确 miR-760 在 ESCC 细胞中的抗肿瘤效应, 使用 miR-mimics/inhibitor 转染 TE-10 细胞; CCK-8 和集落形成实验结果表明, miR-mimics 组的细胞增殖能力降低, 而 miR-inhibitor 组的细胞增殖能力增强; 流式细胞术检测结果显示, miR-mimics 组中 TE-10 细胞阻滞在 G1 期, 细胞凋亡率显著提高; 此外, 在 miR-mimics 组中促使细胞由 G1 期向 S 期转换的 cyclin D1 的蛋白表达水平明显降低, 促凋亡蛋白 cleaved-caspase3 表达水平上调而抗凋亡蛋白 Bcl2 表达水平下调。以上结果均表明 miR-760 过表达可以抑制 TE-10 细胞增殖并诱导其凋亡。

上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是指上皮细胞失去细胞极性, 失去与基底膜的连接等上皮表型, 获得较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型的过程。我们的研究发现

miR-mimics 组的细胞迁移、侵袭能力也明显受到抑制, 而 miR-inhibitor 组中细胞的迁移、侵袭能力明显增强。同时 Western blotting 结果显示上皮标志蛋白 E-cadherin 和 β -catenin 的表达水平在 miR-mimics 组细胞中明显提高, 而在 miR-inhibitor 组细胞中降低; 而参与 EMT 过程的间质标志蛋白 MMP2 和 vimentin 的表达水平在 miR-mimics 组细胞中降低, 但在 miR-inhibitor 组细胞中升高。因此, miR-760 具有抑制 TE-10 细胞的迁移与侵袭的功能。

大量研究已证实食管癌中 *c-Myc* 基因可以抑制细胞凋亡并且促进 ESCC 细胞的增殖和侵袭; 同时还有报道^[15-20]指出 *c-Myc* 参与肿瘤脂肪代谢以及诱导相关干性基因表达从而促进肿瘤细胞干性化过程。我们的研究发现过表达 (或抑制) miR-760 后 *c-Myc* mRNA 和蛋白的表达水平明显降低 (或升高)。双荧光素酶报告试验结果证实了 miR-760 与 *c-Myc* 具有靶向关系。

综上所述, 本研究发现 miR-760 在 ESCC 中表达下调, miR-760 可以影响 TE-10 细胞的周期、增殖、凋亡、迁移和侵袭等多种生物学进程, 并且进一步发现 miR-760 可能通过抑制靶基因 *c-Myc* 发挥抗肿瘤作用。总之, 我们初步阐明了 miR-760 在 TE-10 细胞中可能作为肿瘤抑制基因的分子机制, 其可能成为 ESCC 治疗过程中新的诊断标志物和治疗靶点。

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.
- [2] Rustgi AK, El-Serag HB. Esophageal carcinoma[J]. N Engl J Med, 2014, 371(26): 2499-2509.
- [3] Hammond SM. An overview of microRNAs[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 87: 3-14.
- [4] Bushati N, Cohen SM. microRNA functions[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23(1): 175-205.
- [5] Wang Q, Huang Z, Ni S, et al. Plasma miR-601 and miR-760 are novel biomarkers for the early detection of colorectal cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44398.
- [6] Yan C, Zhang W, Shi X, et al. MiR-760 suppresses non-small cell lung cancer proliferation and metastasis by targeting ROS1[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(19): 18385-18391.
- [7] Iwaya T, Fukagawa T, Suzuki Y, et al. Contrasting expression patterns of histone mRNA and microRNA 760 in patients with gastric cancer[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(23): 6438-6449.
- [8] Hu SH, Wang CH, Huang ZJ, et al. miR-760 mediates chemoresistance through inhibition of epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(23): 5002.
- [9] Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, et al. Isolation and characterization of *c-myc*, a cellular homolog of the oncogene (*v-myc*) of avian myelocytomatosis virus strain 29[J]. J Virol, 1982, 42(3): 773-779.
- [10] Dang CV. MYC on the path to cancer[J]. Cell, 2012, 149(1): 22-35.
- [11] Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, et al. The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice[J]. Nature, 1985, 318(6046): 533-538.
- [12] Nie Z, Hu G, Wei G, et al. *c-Myc* is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells[J]. Cell, 2012, 151(1): 68-79.
- [13] Kestens C, Siersema PD, van Baal JW. Current understanding of the functional roles of aberrantly expressed microRNAs in esophageal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(1): 1-7.
- [14] Kim SY, Lee YH, Bae YS. MiR-186, miR-216b, miR-337-3p, and miR-760 cooperatively induce cellular senescence by targeting α subunit of protein kinase CKII in human colorectal cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 429(3/4): 173-179.
- [15] Kim J, Woo AJ, Chu J, et al. A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs[J]. Cell, 2010, 143(2): 313-324.
- [16] Li J, Liang Y, Lv H, et al. miR-26a and miR-26b inhibit esophageal squamous cancer cell proliferation through suppression of c-MYC pathway[J]. Gene, 2017, 625: 1-9.
- [17] Wang J, Liu Z, Wang Z, et al. Targeting c-Myc: JQ1 as a promising option for c-Myc-amplified esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2018, 419: 64-74.
- [18] Zhong C, Fan L, Yao F, et al. HMGR is necessary for the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma and is regulated by Myc[J]. Tumor Biol, 2014, 35(5): 4123-4129.
- [19] Le Y, Wu WK, Jie LZ, et al. Prostaglandin E₂ promotes cell proliferation via protein kinase C/extracellular signal regulated kinase pathway-dependent induction of c-Myc expression in human esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2010, 125(11): 2540-2546.
- [20] Lee KB, Shuai Y, Man HP, et al. p63-mediated activation of the β -catenin/c-Myc signaling pathway stimulates esophageal squamous carcinoma cell invasion and metastasis[J]. Cancer Lett, 2014, 353(1): 124-132.

[收稿日期] 2019-04-19

[本文编辑] 崔黎明

