

MiR-124 对食管癌细胞增殖和侵袭的作用及机制研究

林冰, 刘沙, 周平, 张爽, 潘涛, 林先桃, 杨屏

(海南医学院第一附属医院, 海南 海口 570100)

摘要: [目的] 检测 miR-124 及其靶基因 *CREB1* 在食管癌组织中的表达情况, 探讨 miR-124/*CREB1* 在人食管鳞癌细胞 KYSE-150 体外增殖和侵袭中的作用及机制。[方法] 通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 32 例食管鳞状细胞癌(ESCC)组织及周围正常组织的 miR-124 和 *CREB1* 表达。Targetscan 分析 miR-124 与 *CREB1* 的结合位点, 荧光素酶基因报告实验验证 miR-124 与 *CREB1* 是否结合; 过表达或抑制 miR-124 后, 采用 Western blot 检测 KYSE-150 细胞中 *CREB1* 的表达; 在 KYSE-150 细胞中转染 miR-124 mimic 为 miR-124 mimic 或转染 miR-124 抑制剂为 anti-miR-124, 转染后 24h、48h、72h 收集细胞计数, 检测细胞增殖情况; 转染 24h 后通过体外侵袭实验检测过表达或抑制 miR-124 对 KYSE-150 细胞侵袭的影响。在 KYSE-150 细胞中转染 *CREB1* siRNA 后 24h、48h、72h 收集细胞计数, 检测细胞增殖情况; 转染 *CREB1* siRNA 24h 后检测 KYSE-150 细胞侵袭能力的变化; 在 KYSE-150 细胞中共同转染 anti-miR-124 和 si*CREB1*, 检测细胞增殖和侵袭能力变化情况。[结果] MiR-124 在食管癌组织表达降低($P<0.001$), 而 *CREB1* 在食管癌组织中表达升高($P<0.001$); *CREB1* 是 miR-124 下游分子, 过表达 miR-124 抑制 KYSE-150 细胞中 *CREB1* 的表达($P=0.016$), 抑制 miR-124 促进 KYSE-150 细胞中 *CREB1* 的表达($P<0.001$)。在食管癌细胞中, 过表达 miR-124 抑制 KYSE-150 细胞的增殖和侵袭(P 均 <0.05), 抑制 miR-124 促进 KYSE-150 细胞的增殖和侵袭(P 均 <0.05); 敲低 *CREB1* 抑制 KYSE-150 细胞的增殖和侵袭(P 均 <0.05)。敲低 *CREB1* 可抑制 anti-miR-124 对 KYSE-150 细胞增殖和侵袭的促进作用(P 均 <0.05)。[结论] 过表达 miR-124 通过靶向 *CREB1* 抑制食管癌细胞的增殖和侵袭。

关键词: 食管肿瘤; 食管鳞状细胞癌; miR-124; *CREB1*

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)12-1047-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.12.B007

The Effect of MiR-124 on Proliferation and Invasion of Esophageal Cancer Cells and Its Mechanism

LIN Bing, LIU Sha, ZHOU Ping, ZHANG Shuang, PAN Tao, LIN Xian-tao, YANG Ping

(The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100, China)

Abstract: [Objective] To detect the expression of miR-124 and its target gene *CREB1* in esophageal cancer tissues and evaluate the effect of miR-124 on proliferation and invasion of esophageal cancer cells and its mechanism. [Methods] The expression of miR-124 and *CREB1* in esophageal cancer tissues and surrounding normal tissues in 32 cases of esophageal squamous cell (ESCC) was detected by real-time RT-PCR (qRT-PCR). The binding of miR-124 to *CREB1* was analyzed by Targetscan and confirmed by luciferase gene reporter assay. The miR-124 mimic or anti-miR-124 was transfected to human ESCC KYSE-150 cells, the expression of *CREB1* in KYSE-150 cells was detected by Western blot after overexpression or inhibition of miR-124. The proliferation was detected at different time points (24, 48, 72h) after transfection, the effect of miR-124 on invasion ability of KYSE-150 cell was detected by in vitro invasion assay 24 h after transfection. Cell counts were performed in KYSE-150 cells at 24h, 48h and 72h after transfection with *CREB1* siRNA; the invasive ability of KYSE-150 cells was detected after transfection with *CREB1* siRNA for 24h. KYSE-150 cells were co-transfected with anti-miR-124 and si*CREB1* to exam the role of miR-124/*CREB1* axis in cell proliferation and invasion. [Results] The expression of miR-124 was decreased and the expression of *CREB1* was increased in esophagus cancer tissues ($P<0.001$). Overexpression of miR-124 inhibited the expression of *CREB1* in KYSE-150 cells ($P=0.016$), while inhibition of miR-124 promoted the expression of *CREB1* ($P<0.001$). Overexpression of miR-124 inhibited the proliferation and invasion of KYSE-150 cells (all $P<0.05$), while knockdown of miR-124 inhibited the proliferation and invasion of KYSE-150 cells (all $P<0.05$). Knockdown of *CREB1* inhibited the promoting effect of anti-miR-124 on the proliferation ($P<0.05$) and invasion ($P<0.001$) of esophageal cancer cells. [Conclusion] Overexpression of miR-124 inhibits proliferation and invasion of esophageal cancer cells by targeting *CREB1*.

Subject words: esophageal cancer; esophageal squamous cell carcinoma; miR-124; *CREB1*

通信作者: 林冰, 主治医师, 本科; 海南医学院第一附属医院放疗科, 海南省海口市龙华路 31 号 (570100); E-mail: 307609901@qq.com

收稿日期: 2019-12-03; **修回日期:** 2020-04-07

食管癌(esophageal cancer, EC)是常见上消化道癌症之一,预后差、死亡率高。根据组织病理学分类,食管癌可分为鳞状细胞癌、腺癌和腺鳞癌,其中食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)占食管癌 90%以上^[1-3]。尽管目前在食管癌的诊断和治疗方面取得了很大进展,但食管癌患者的预后仍然很差^[4-5]。因此,了解食管癌的分子机制将有助于建立新的治疗方案。

MiRNA 是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,部分结合 mRNA 的特定靶位点来调节蛋白质编码基因表达。研究表明,miRNA 在癌症进展中起重要作用^[6-8]。研究发现 miR-124 在肺癌^[8]、直肠癌^[9]和宫颈癌^[10]中发挥重要作用,但 miR-124 在食管癌中的作用机制尚不清楚。本研究检测 32 例食管癌患者癌组织与癌旁正常组织中 miR-124 及 CREB1 的表达情况,并在体外实验探究 miR-124 和 CREB1 对人食管鳞癌细胞系 KYSE-150 细胞增殖及侵袭的影响,探究 miR-124 在食管癌中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料

选取 2018—2019 年于海南医学院第一附属医院经病理检查确诊并进行食管癌手术的 32 例患者,收集新鲜食管癌组织和癌旁正常组织。所有患者均未进行化疗和放疗,32 例患者中男性 19 例、女性 13 例,年龄 43~67 岁,平均年龄(54.2±7.8)岁。

1.1.2 材料

人食管鳞癌细胞系 KYSE-150 (ATCC), RPMI1640 (美国 Sigma 公司), FBS (杭州四季青), miR-124 及 U6 特异性引物 (广州锐博生物科技有限公司), miR-124 mimic 和 miR-124 inhibitor (anti-miR-124) (广州锐博生物科技有限公司), CREB1 抗体(美国 Proteintech 公司), siCREB1 和 Lipofectamine 2000 转染试剂均购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

KYSE-150 细胞在含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中生长,补充青霉素(100U/ml)和链霉素(100U/ml)在 37℃细胞恒温箱中孵育。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

TRIzol 法提取总 RNA, 使用 HiScript Q Select RT SuperMix qPCR 试剂盒(R133-01, Vazyme Biotech)和 miR-124 逆转录引物进行反转录,使用 qRT-PCR 检测成熟 miR-124 的表达, U6 为内参。

1.2.3 荧光素酶基因报告实验

根据 Targetscan 软件预测 miR-124 与 CREB1 mRNA 3'-UTR 区结合序列。将含该结合位点的片段插入到荧光素酶报告基因质粒,构建两组质粒:包含该结合位点的野生型质粒(CREB1 3'UTR WT)及突变该结合位点的突变质粒(CREB1 3'UTR Mut)。转染 KYSE-150 细胞 miR-124 mimic 和两组质粒, miR-con 用作对照组。根据说明书(Promega, E2920)进行荧光素酶活性测定。

1.2.4 质粒转染

根据锐博生物科技有限公司提供的说明书,将 KYSE-150 细胞系铺板,使用 lipofectamine 2000 进行转染,对照组转染 miR-con。

1.2.5 SiRNA 转染

使用靶向 CREB1 的 siRNA 敲低 CREB1 表达,使用 Lipofectamine 2000 转染试剂进行细胞转染。

1.2.6 细胞增殖检测

对转染 miR-124 mimic 或 anti-miR-124 的 KYSE-150 细胞进行细胞增殖检测,检测起点记为 0h,分别在 0h、24h、48h、72h 收集细胞,使用血球计数板进行细胞计数。

1.2.7 细胞侵袭能力检测

使用 Transwell 进行体外细胞侵袭实验, Transwell 小室 PVDF 膜上用基质胶与处理,细胞恒温箱中平衡 2h,在 transwell 内室加入细胞悬液(1×10^5 细胞/孔),恒温箱中孵育 24h,轻轻擦去靠近内侧的细胞,甲醛室温固定 30min,结晶紫染色 20min, PBS 洗 3 遍,镜下计数,每组设 3 个复孔。

1.2.8 Western blot 分析

RIPA 裂解液裂解细胞,在冰上提取总蛋白。4℃ 12 000g 离心 20min。BCA 蛋白定量,12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,湿转法将 PVDF 膜上,用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次,每次 15min,5%脱脂牛奶室温封闭 2h,加入一抗(CREB1, 1:1000),4℃ 过夜,用 TBST 洗 3 次,每次 15min,室温孵育二抗 (1:

2000)2h,用 TBST 洗 3 次,每次 15min,化学发光显色法显影拍照。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件包进行数据分析,计量资料采用 *t* 检验或方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌组织中 miR-124 和 CREB1 的表达情况

与癌旁正常组织相比,miR-124 在食管癌组织中表达降低 ($P<0.001$),CREB1 表达增加 ($P<0.001$) (Figure 1)。

2.2 MiR-124 与 CREB1 mRNA 结合

荧光素酶实验证实 miR-124 可与 CREB1 结合 (Figure 2)。

2.3 MiR-124 调节 CREB1 表达

与 miR-control mimic 组比,在人食管鳞癌细胞系 KYSE-150 细胞中转染 miR-124 的 miR-124 mimic

组 CREB1 的表达降低($P=0.016$),与 anti-miR-control 组相比,转染 miR-124 抑制剂 anti-miR-124 的 anti-miR-124 组的 CREB1 表达升高($P<0.001$)(Figure 3)。

2.4 MiR-124 对食管癌细胞增殖的影响

MiR-control mimic 组在 24h、48h、72h 细胞数目分别为 $(3.4\pm0.5)\times10^5$ 、 $(6.2\pm0.6)\times10^5$ 、 $(9.8\pm0.7)\times10^5$, miR-124 mimic 组在 24h、48h、72h 细胞数目分别为 $(1.4\pm0.5)\times10^5$ 、 $(2.7\pm0.7)\times10^5$ 、 $(4.3\pm0.8)\times10^5$,与 miR-control mimic 组比,miR-124 mimic 组的细胞数目显著降低 (P 均 <0.05);anti-miR-control 组在 24h、48h、72h 的细胞数目分别为 $(2.9\pm0.3)\times10^5$ 、 $(6.2\pm0.5)\times10^5$ 、 $(9.5\pm0.7)\times10^5$,anti-miR-124 组在 24h、48h、72h 细胞数目分别为 $(4.2\pm0.6)\times10^5$ 、 $(9.4\pm0.7)\times10^5$ 、 $(4.8\pm0.6)\times10^5$ (P 均 <0.05),与 anti-miR-control 组比,anti-miR-124 组的细胞数目显著增高 (P 均 <0.05)(Figure 4)。

2.5 MiR-124 对食管癌细胞侵袭的影响

与 miR-control mimic 组 (689 ± 21) 相比,miR-124 mimic 组穿过 Transwell 的细胞数目(456 ± 36)显著降低 ($t=9.755$, $P<0.001$);与 anti-miR-control 组 (687 ± 20) 相比,anti-miR-124 组穿过 Transwell 的细胞数目(854 ± 33)显著增高 ($t=7.185$, $P=0.002$)。

2.6 CREB1 对食管癌细胞增殖和侵袭的影响

与 siRNA control 组比,人食管鳞癌细胞系 KYSE150 细胞中转染 CREB1 siRNA 的 siCREB1 组在 24h、48h、72h 的细胞数目显著降低 (P 均 <0.05) (Table 1)。与 siRNA control 组比,siCREB1 组穿过 Transwell 的细胞数目显著降低 746 ± 32 vs 376 ± 28 ($t=14.94$, $P<0.001$)。

2.7 MiR-124/CREB1 对食管癌细胞增殖和侵袭的影响

同时转染 anti-miR-

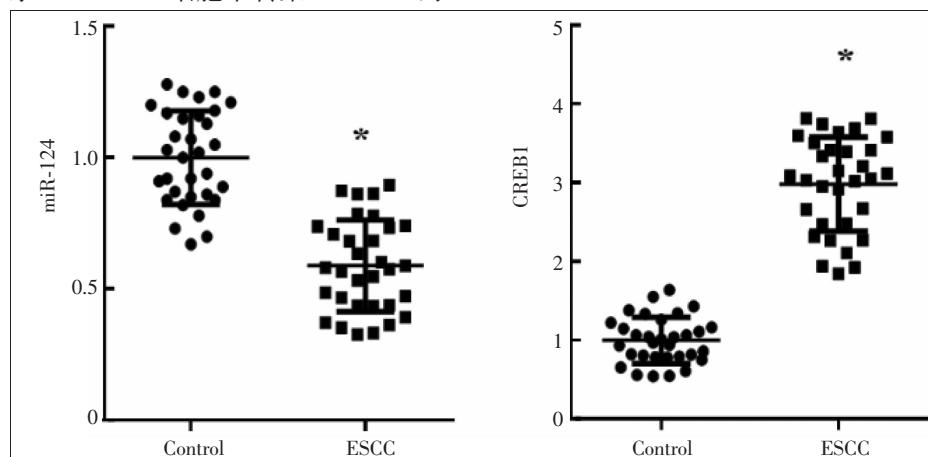


Figure 1 The expression of miRNA-124 and CREB1 in ESCC and control group (* $P<0.001$)

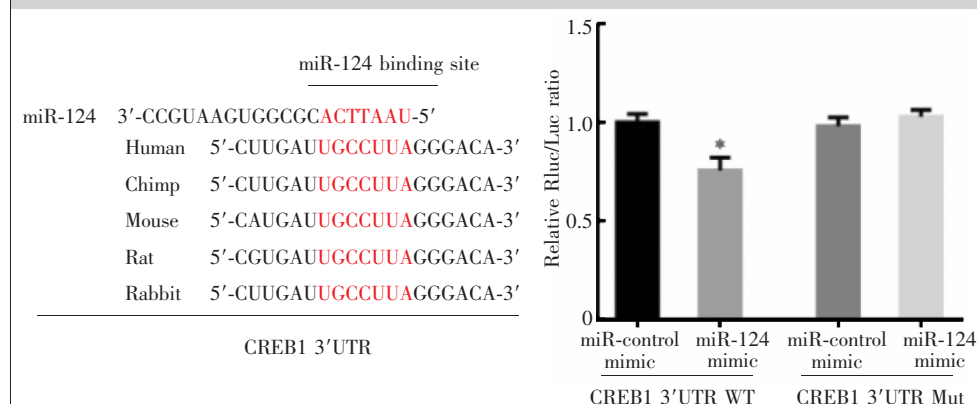


Figure 2 MiR-124 binding to CERB1(* $P=0.0004$)

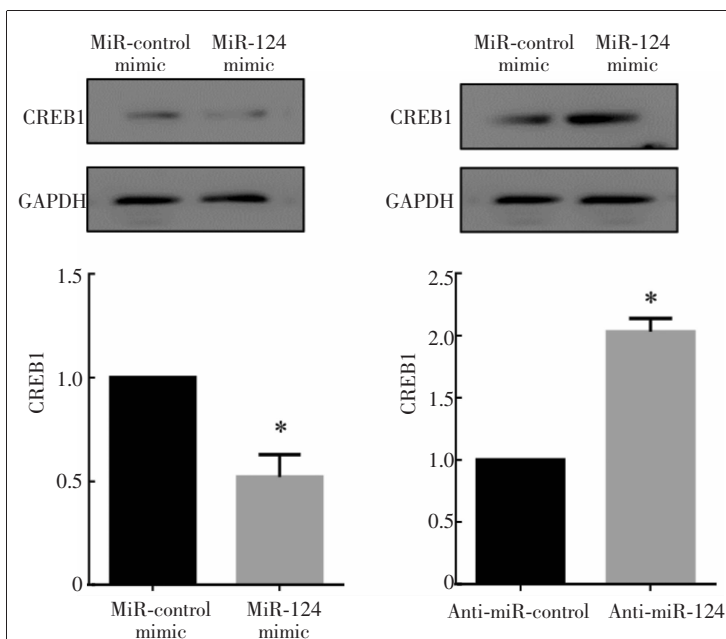


Figure 3 The expression of CREB1 is regulated by miR-124 (* $P<0.01$)

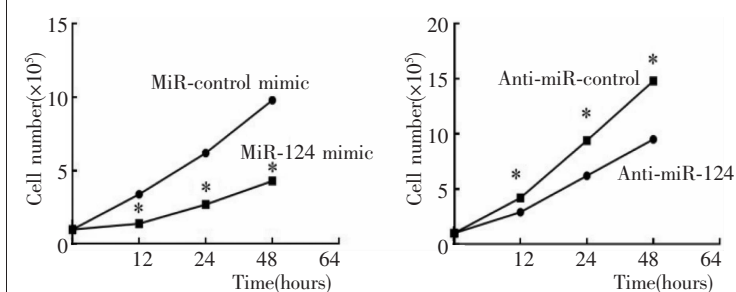


Figure 4 The role of miR-124 in the proliferation of esophageal cancer cells (* $P<0.05$)

Table 1 The role of CREB1 in the proliferation of esophageal cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Group	Cell number($\times 10^5$)			
	0h	24h	48h	72h
siRNA control group	1.00	2.93 ± 0.09	6.29 ± 0.18	9.73 ± 0.14
siCREB1 group	1.00	1.37 ± 0.11	4.67 ± 0.14	6.97 ± 0.17
<i>t</i>	—	19.42	12.29	22.10
<i>P</i>	—	< 0.001	< 0.001	< 0.001

control 和 siRNA control, KYSE-150 细胞数为 $(3.8 \pm 0.3) \times 10^5$, 同时转染 anti-miR-control 和 siCREB1, KYSE-150 细胞数为 $(2.7 \pm 0.3) \times 10^5$, 同时转染 anti-miR124 和 siRNA control 组, KYSE-150 细胞数为 $(5.18 \pm 0.4) \times 10^5$, 同时转染 anti-miR-124 和 siCREB1 组, KYSE-150 细胞数为 $(3.7 \pm 0.3) \times 10^5$ 。在 Transwell 侵袭实验中, 同时转染 anti-miR-control 和 siRNA control 组细胞数为 679 ± 26 , 同时转染 anti-miR-con-

trol 和 siCREB1 组细胞数为 492 ± 34 , 同时转染 anti-miR124 和 siRNA control 组细胞数为 825 ± 66 , 同时转染 anti-miR-124 和 siCREB1 组细胞数为 697 ± 7 。KYSE-150 细胞转染 anti-miR-124 可促进 KYSE-150 细胞增殖和侵袭, KYSE-150 细胞同时转染 anti-miR-124 及 siCREB1 可抑制 anti-miR-124 对 KYSE-150 细胞增殖和侵袭的促进作用。

3 讨论

食管鳞状细胞癌是世界范围内消化系统的常见癌症, 每年约有 48 万例新发患者, 是世界上第 8 大常见癌症, 居癌症相关死因第 6 位^[11-12]。尽管有多种治疗选择, 但其预后不良, 患者 5 年生存率不到 40%^[13]。因此, 寻找特异性的生物标志物和潜在治疗靶点有助于食管癌早期诊断, 降低患者的死亡率, 改善生存质量。MiRNA 是内源性调节分子, 转录后调节基因表达。研究表明 miRNA 在某些生物过程中起着重要作用, 如炎症、细胞周期调节、应激反应、分化、凋亡和迁移^[14-15]。近年来 miRNA 在肿瘤中发挥的生物学功能受到研究人员的关注, miRNA 表达谱在癌组织和相应的邻近组织中发生改变, miRNA 的失调在癌症的发展和进展中起重要作用^[16-17]。

研究发现 miR-124 在食管癌中发挥抑癌作用^[18], 然而关于在食管癌亚型 ESCC 中 miR-124 的表达及机制尚不清楚。本研究显示 miR-124 在 ESCC 组织中表达显著下调, 表明 miR-124 可能与 ESCC 的发生和发展密切相关, 进一步的研究显示过表达 miR-124 可在体外抑制人 ESCC 细胞系 KYSE-150 的增殖和侵袭, 而敲低 miR-124 可促进 KYSE-150 细胞的增殖和侵袭, 表明体外过表达 miR-124 可以抑制食管癌细胞的增殖和侵袭。

MiR-124 可以靶向多种相关的癌基因, 如 *PIK3CA*^[19]、*ROCK1* 等^[20]。通过 Targetscan 软件预测分析并经荧光素酶实验验证, CREB1 可能是 miR-124 的下游分子, Western blot 分析也佐证了 miR-124 可调节 CREB1 的表达, 因此我们的研究可基本

确定 *CREB1* 是 miR-124 的直接靶基因,在调节食管癌进展中起重要作用,拓宽了 miR-124/*CREB1* 在食管癌中的功能。

CREB1 基因定位于人类染色体 2q32.3~q34,该区域已知是包括癌症在内的各种疾病中易位或缺失的热点^[21]。有研究发现 *CREB1* 在胃癌中高表达,与肿瘤分期、淋巴结转移和远处转移相关,并且 *CREB1* 可以作为胃癌的潜在预后因子^[22],最近研究也得到了类似的结果,miR-124 的同族成员 miR-122 通过靶向 *CREB1* 抑制胃癌的增殖和侵袭^[23]。本研究结果显示,*CREB1* 在食管癌组织中高表达,体外研究显示 *CREB1* 敲低对食管癌细胞的影响与 miR-124 过表达具有相似的作用,可以抑制食管癌细胞的增殖和侵袭。表明 miR-124 可能是通过抑制 *CREB1* 表达来发挥抑制食管癌的作用,而敲低 *CREB1* 的表达可以翻转 anti-miR-124 对 KYSE-150 细胞增殖和侵袭的促进作用,该结果进一步佐证 *CREB1* 是 miR-124 的靶基因。

综上所述,miR-124 在 ESCC 组织中表达降低,*CREB1* 表达升高,过表达的 miR-124 可抑制食管癌细胞的增殖和侵袭,敲低 *CREB1* 可抑制食管癌细胞的增殖和侵袭,*CREB1* 可能是 miR-124 的靶标。

参考文献:

- [1] Couch G,Redman JE,Wernisch L,et al. The discovery and validation of biomarkers for the diagnosis of esophageal squamous dysplasia and squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*,2016,9(7):558-566.
- [2] Anvari K,Sima HR,Seilianian Toussi M,et al. EGFR Expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma and its association with pathologic response to pre-operative chemoradiotherapy:a study in Northeastern Iran [J]. *Arch Iran Med*,2017,20(4):240-245.
- [3] 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.
- [4] Rustgi AK,HB El-Serag.Esophageal carcinoma[J]. *N Engl J Med*,2014,371(26):2499-509.
- [5] Chen Z,Hu X,Wu Y,et al. Long non-coding RNA XIST promotes the development of esophageal cancer by sponging miR-494 to regulate CDK6 expression[J]. *Biomed Pharmacother*,2019,109(1):2228-2236.
- [6] Rupaimoole R,Calin GA,Lopez-Berestein G,et al. miRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment[J]. *Cancer Discov*,2016,6(3):235-246.
- [7] Hydbring P,Wang Y,Fassl A,et al. Cell-cycle-targeting microRNAs as therapeutic tools against refractory cancers [J]. *Cancer Cell*,2017,31(4):576-590,e8.
- [8] Ryan BM.MicroRNAs in cancer susceptibility [J]. *Adv Cancer Res*,2017,135(8):151-171.
- [9] Qiu Z,Guo W,Wang Q,et al. MicroRNA-124 reduces the pentose phosphate pathway and proliferation by targeting PRPS1 and RPIA mRNAs in human colorectal cancer cells[J]. *Gastroenterology*,2015,149(6):1587-1598,e11.
- [10] Zummeren MV,Kremer WW,Leeman A,et al. HPV E4 expression and DNA hypermethylation of CADM1,MAL, and miR124-2 genes in cervical cancer and precursor lesions[J]. *Mod Pathol*,2018,31(12):1842-1850.
- [11] Ferlay J,Soerjomataram I,Dikshit R,et al. Cancer incidence and mortality worldwide:sources,methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*,2015,136(5):E359-E386.
- [12] Torre LA,Bray F,Siegel RL,et al. Global cancer statistics,2012[J]. *CA Cancer J Clin*,2015,65(2):87-108.
- [13] So B,Marcu L,Olver I,et al. Oesophageal cancer:Which treatment is the easiest to swallow? A review of combined modality treatments for resectable carcinomas[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*,2017,113:135-150.
- [14] Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets:recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship [J]. *Nat Rev Genet*,2012,13(4):271-282.
- [15] Dong H,Lei J,Ding L,et al. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis[J]. *Chem Rev*,2013,113(8):6207-33.
- [16] Lu J,Getz G,Miska EA,et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*,2005,435(7043):834-838.
- [17] Di Leva G,Garofalo M,Croce CM,et al. MicroRNAs in cancer[J]. *Annu Rev Pathol*,2014,9(9):287-314.
- [18] Cheng Y,Li Y,Nian Y,et al. STAT3 is involved in miR-124-mediated suppressive effects on esophageal cancer cells[J]. *BMC Cancer*,2015,15:306.
- [19] Lang Q,Ling C. MiR-124 suppresses cell proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting PIK3CA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2012,426(2):247-252.
- [20] Hu CB,Li QL,Hu JF,et al. miR-124 inhibits growth and invasion of gastric cancer by targeting ROCK1 [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2014,15(16):6543-6546.
- [21] Bartsch D,Casadio A,Karl K A,et al. CREB1 encodes a nuclear activator,a repressor,and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation [J]. *Cell*,1998,95(2):211-223.
- [22] Wang YW,Chen X,Gao JW,et al. High expression of cAMP-responsive element-binding protein 1 (CREB1) is associated with metastasis,tumor stage and poor outcome in gastric cancer[J]. *Oncotarget*,2015,6(12):10646-10657.
- [23] Rao M,Zhu Y,Zhou Y,et al. MicroRNA-122 inhibits proliferation and invasion in gastric cancer by targeting CREB1[J]. *Am J Cancer Res*,2017,7(2):323-333.