

网络出版时间: 2020-9-24 13:29 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200923.1151.020.html>

miR-664b-5p对食管癌细胞 EC9706 和 TE-1生物学行为的影响

向辉 唐明 李阳 林怡秀 郑勇 陈卫刚

摘要 目的 探讨 miR-664b-5p 对食管癌细胞 EC9706 和 TE-1 生物学行为的影响。方法 在人食管癌细胞株 EC9706 和 TE-1 转染 miR-664b-5p mimic 或 inhibitor 后,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测细胞中 miR-664b-5p 的表达情况;通过 CCK-8 和平板克隆形成实验检测细胞增殖能力;通过 Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力;通过 Western Blot 检测细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达。结果 转染 miR-664b-5p mimic 后,食管癌细胞 EC9706 和 TE-1 中 miR-664b-5p 的表达增加($P < 0.05$),转染 miR-664b-5p inhibitor 后,miR-664b-5p 的表达降低($P < 0.05$);增殖实验结果表明,与 mimic NC 组比较,miR-664b-5p mimic 组食管癌细胞增殖能力下降,克隆形成数目减少($P < 0.05$),miR-664b-5p inhibitor 组较 inhibitor NC 组食管癌细胞增殖能力增强,克隆形成数目增多($P < 0.05$);Transwell 实验结果表明,miR-664b-5p mimic 组食管癌细胞迁移和侵袭数目少于 mimic NC 组($P < 0.05$);miR-664b-5p inhibitor 组食管癌细胞迁移和侵袭数目多于 inhibitor NC 组($P < 0.05$);Western blot 实验结果表明,miR-664b-5p mimic 组食管癌细胞 Bax 表达增加,Bcl-2 表达下降($P < 0.05$),而 miR-664b-5p inhibitor 组 Bax 表达下降,Bcl-2 表达增加($P < 0.05$)。结论 miR-664b-5p 可以抑制食管癌细胞 EC9706 和 TE-1 的增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡,为进一步研究 miR-664b-5p 在哈萨克族食管鳞癌中的分子机制提供了基础。

关键词 miR-664b-5p; 食管鳞癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡
中图分类号 R 735.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)11-1746-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.020

食管癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,90%的病例为食管鳞状细胞癌^[1]。食管癌的发病有着明显的地域分布特征,其中位于新疆北部的哈

萨克自治州新源县和托里县食管癌的发病率为 90/100 000 和 155.9/100 000,远高于全国平均水平(14.95/100 000)和新疆汉族人群(13/100 000)^[2]。食管癌早期症状不典型,侵袭和转移前多无症状,5 年生存率低于 20%^[3],目前食管癌的发病机制尚不明确。microRNAs(miRNAs)是一类大小约为 23 个核苷酸的非编码 RNA,有研究表明 miRNAs 的异常表达在食管鳞癌中发挥重要作用,如 miR-21^[4]、miR-375^[5]、miR-34a^[6]等。课题组前期^[7]运用 miRNA 基因芯片技术发现,与癌旁正常组织比较,miR-664b-5p 在哈萨克族食管鳞癌组织中高表达,qRT-PCR 验证结果与芯片一致。目前尚不清楚 miR-664b-5p 在食管鳞癌中发挥的功能。该研究在食管鳞癌细胞 EC9706 和 TE-1 中过表达和下调 miR-664b-5p,观察食管鳞癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭生物学行为的变化。

1 材料与方法

1.1 材料 人食管鳞癌细胞株 EC9706 和 TE-1 由石河子大学医学院新疆地方与民族高发重点实验室留存;胎牛血清购于以色列 BI 公司;DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司;miR-664b-5p 模拟物和抑制剂及相应的阴性对照均购于广州锐博公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购于美国 Invitrogen 公司;RNA 抽提试剂 Trizol 试剂购于美国赛默飞公司,miR-664b-5p 和内参 U6 引物、反转录试剂盒、miRNA qRT-PCR 试剂盒购于德国 QIAGEN 公司,细胞增殖检测 CCK-8 试剂盒购于日本东仁公司;兔抗人 Bcl-2、兔抗人 Bax 抗体购于英国 Abcam 公司;小鼠抗人 β -actin 抗体、山羊抗兔 IgG 二抗、山羊抗小鼠 IgG 二抗购于北京中杉金桥公司。

1.2 细胞培养与转染 用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的高糖 DMEM 培养基培养细胞,置于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。转染前 1 d,接种 $(3.0 \sim 5.0) \times 10^5$ 个细胞/孔至 6 孔板,加入含 10% 胎牛血清不含抗生素的 DMEM 新鲜培养基,当细胞密度融合至 50% ~ 70% 时,应用 Lipofectamine

2020-06-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81260362);石河子大学成果转化与技术推广计划(编号:CGZH201704)

作者单位:石河子大学医学院第一附属医院消化内科,石河子 832008

作者简介:向辉,男,硕士研究生;

陈卫刚,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: cwg_sh@126.com

2000 按照试剂说明书进行转染。将细胞分为 4 组: 转染 miR-664b-5p mimic 组(miR-664b-5p 模拟物)、miR-664b-5p mimic NC 组(miR-664b-5p 模拟物阴性对照)、miR-664b-5p inhibitor 组(miR-664b-5p 抑制剂)、miR-664b-5p inhibitor NC 组(miR-664b-5p 抑制剂阴性对照)。转染 12 h 后更换为含有 10% 胎牛血清完全培养基继续培养。

1.3 RNA 的提取及 qRT-PCR 按照上述分组转染后培养 48 h, Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 参照试剂盒说明书进行逆转录合成 cDNA 后 qRT-PCR 检测 miR-664b-5p 的表达, 以 U6 为内参。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 miR-664b-5p 的相对表达量。

1.4 CCK-8 实验 将细胞(3 000 个/孔)接种于 96 孔板, 每孔体积 100 μ l, 每组设置 5 个复孔。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的恒温培养箱中培养 0、24、48、72、96 h 时在每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 继续培养孵育 2 h 后用酶标仪测量各孔 450 nm 处的 OD 值。以时间点为横轴, OD 值为纵轴, 绘制各组细胞生长曲线。

1.5 平板克隆形成实验 用 0.25% 胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞, 按 600 个细胞/孔接种于 6 孔板, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的恒温培养箱中, 每 2 d 换液 1 次, 培养 14 d。当培养板中出现肉眼可见的克隆时, PBS 洗涤 2 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 结晶紫染色 30 min。计数超过 50 个细胞的克隆数。

1.6 Transwell 迁移和侵袭实验 用无血清培养基悬浮细胞并计数, 调整浓度为 2×10^5 /ml。在下室加入 800 μ l 含 20% 血清的培养基, 上室加入 150 μ l 细胞悬液, 继续在培养箱中培养 24 h。用镊子小心取出小室, 吸干上室液体, 4% 多聚甲醛固定后结晶紫染色, 用棉签小心擦去上室底部膜表面上的细胞, 用小刀切下小室底部膜, 移至载玻片上中性树胶封片, 显微镜下随机取 5 个视野记录穿过膜的细胞数。侵袭实验用无血清培养基按 1:7 稀释的基质胶, 取 70 μ l 铺在上层小室, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中, 孵育 4 h, 其余步骤同迁移实验。

1.7 Western blot 用含有苯甲磺酰氟(PMSF)的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度, 100 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 10% 分离胶进行蛋白电泳, 半干转法转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 加入一抗(1:1 000 稀释), 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜, TBST 洗膜后加入二抗(1:10 000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗膜后加入发光液后曝光。采用 Image J 软件分析测定蛋白条带的

灰度值, 同时检测 β -actin 蛋白条带作为内参, 计算 Bax 和 Bcl-2 的相对表达量。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 22.0 对数据进行分析, 并采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计作图, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较时采用独立样本 t 检验, 不符合正态分布时采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测转染后 miR-664b-5p 的表达

在食管癌细胞系 EC9706 和 TE-1 中分别转染 miR-664b-5p mimic、miR-664b-5p mimic NC 或 miR-664b-5p inhibitor、miR-664b-5p inhibitor NC, qRT-PCR 检测 EC9706 和 TE-1 细胞中各组 miR-664b-5p 的表达。结果显示, EC9706 和 TE-1 细胞中转染 miR-664b-5p mimic 组 miR-664b-5p 的表达水平高于 miR-664b-5p mimic NC 组($t = 9.782$, $P = 0.001$; $t = 9.925$, $P = 0.001$) (图 1A), 而与 miR-664b-5p inhibitor NC 组比较, 转染 miR-664b-5p inhibitor 组 miR-664b-5p 的表达减少($t = 9.212$, $P = 0.001$; $t = 9.212$, $P = 0.001$) (图 1B)。

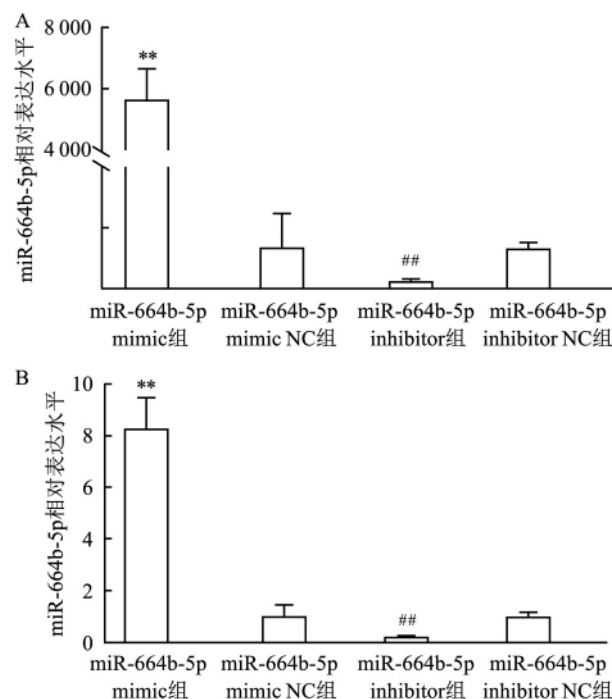


图1 qRT-PCR 检测转染后食管癌细胞中 miR-664b-5p 的表达

A: EC9706 细胞; B: TE-1 细胞; 与 miR-664b-5p mimic NC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 miR-664b-5p inhibitor NC 组比较: ## $P < 0.01$

2.2 miR-664b-5p 对食管癌细胞增殖的影响

CCK-8 结果分析显示, 各组 OD 值见表 1。EC9706

细胞转染 48 h 后 miR-664b-5p mimic 组 OD 值开始低于阴性对照 miR-664b-5p mimic NC 组, 差异有统计学意义 ($t = 4.626$, $P = 0.004$)。96 h 后 miR-664b-5p mimic 组增殖明显抑制 ($t = 14.086$, $P < 0.001$) (图 2A)。在 TE-1 细胞转染 24 h 后 miR-664b-5p mimic 组 OD 值低于阴性对照 miR-664b-5p mimic NC 组, 差异有统计学意义 ($t = 2.991$, $P = 0.024$) (图 2B)。相反, EC9706 细胞转染 miR-664b-5p inhibitor 组 24 h 后 OD 值高于阴性对照 miR-664b-5p inhibitor NC 组 ($t = 12.486$, $P < 0.001$) (图 2C)。

TE-1 细胞 miR-664b-5p inhibitor 组同样在 24 h 后 OD 值开始高于阴性对照 miR-664b-5p inhibitor NC 组 ($t = 8.239$, $P < 0.001$) (图 2D)。

平板克隆形成实验结果显示, 过表达 miR-664b-5p 后 EC9706 细胞 miR-664b-5p mimic 组克隆形成数 (136.330 ± 7.767) 个低于对照组 miR-664b-5p mimic NC 组 (293.330 ± 20.207) 个, 差异有统计学意义 ($t = 12.561$, $P < 0.001$)。TE-1 细胞 miR-664b-5p mimic 组克隆形成数 (253.670 ± 15.275) 个明显低于对照组 miR-664b-5p mimic NC 组 ($568.000 \pm$

表 1 miR-664b-5p 对食管癌细胞 EC9706 和 TE-1 增殖的影响 ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	OD ₄₅₀				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
EC9706 miR-664b-5p mimic	0.114 ± 0.003	0.272 ± 0.015	0.491 ± 0.045**	0.985 ± 0.064***	1.389 ± 0.087***
EC9706 miR-664b-5p mimic NC	0.118 ± 0.014	0.320 ± 0.062	0.696 ± 0.076	1.584 ± 0.079	2.276 ± 0.091
TE-1 miR-664b-5p mimic	0.159 ± 0.014	0.414 ± 0.031*	0.747 ± 0.069**	1.340 ± 0.078***	1.789 ± 0.125***
TE-1 miR-664b-5p mimic NC	0.167 ± 0.003	0.471 ± 0.022	1.036 ± 0.070	1.832 ± 0.079	2.452 ± 0.137
EC9706 miR-664b-5p inhibitor	0.196 ± 0.015	0.569 ± 0.041###	0.867 ± 0.072###	1.405 ± 0.113###	1.602 ± 0.130##
EC9706 miR-664b-5p inhibitor NC	0.186 ± 0.006	0.304 ± 0.126	0.504 ± 0.057	0.916 ± 0.071	1.070 ± 0.096
TE-1 miR-664b-5p inhibitor	0.297 ± 0.048	0.892 ± 0.082###	1.368 ± 0.104###	2.052 ± 0.136###	2.284 ± 0.175##
TE-1 miR-664b-5p inhibitor NC	0.266 ± 0.058	0.472 ± 0.061	0.749 ± 0.085	1.285 ± 0.115	1.542 ± 0.169

与对应 miR-664b-5p mimic NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与对应 miR-664b-5p inhibitor NC 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

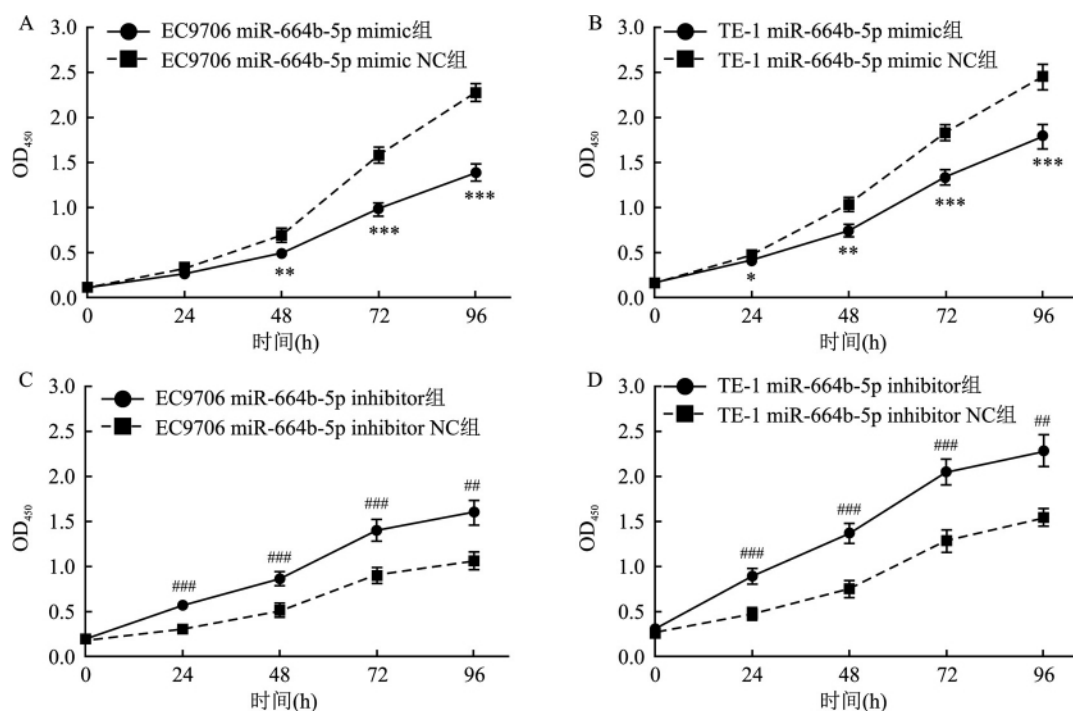


图 2 CCK-8 检测 miR-664b-5p 对食管癌细胞增殖的影响

A: EC9706 细胞转染后细胞生长曲线; B: TE-1 细胞转染后细胞生长曲线; 与对应 miR-664b-5p mimic NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; C: EC9706 细胞转染后细胞生长曲线; D: TE-1 细胞转染后细胞生长曲线; 与对应 miR-664b-5p inhibitor NC 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

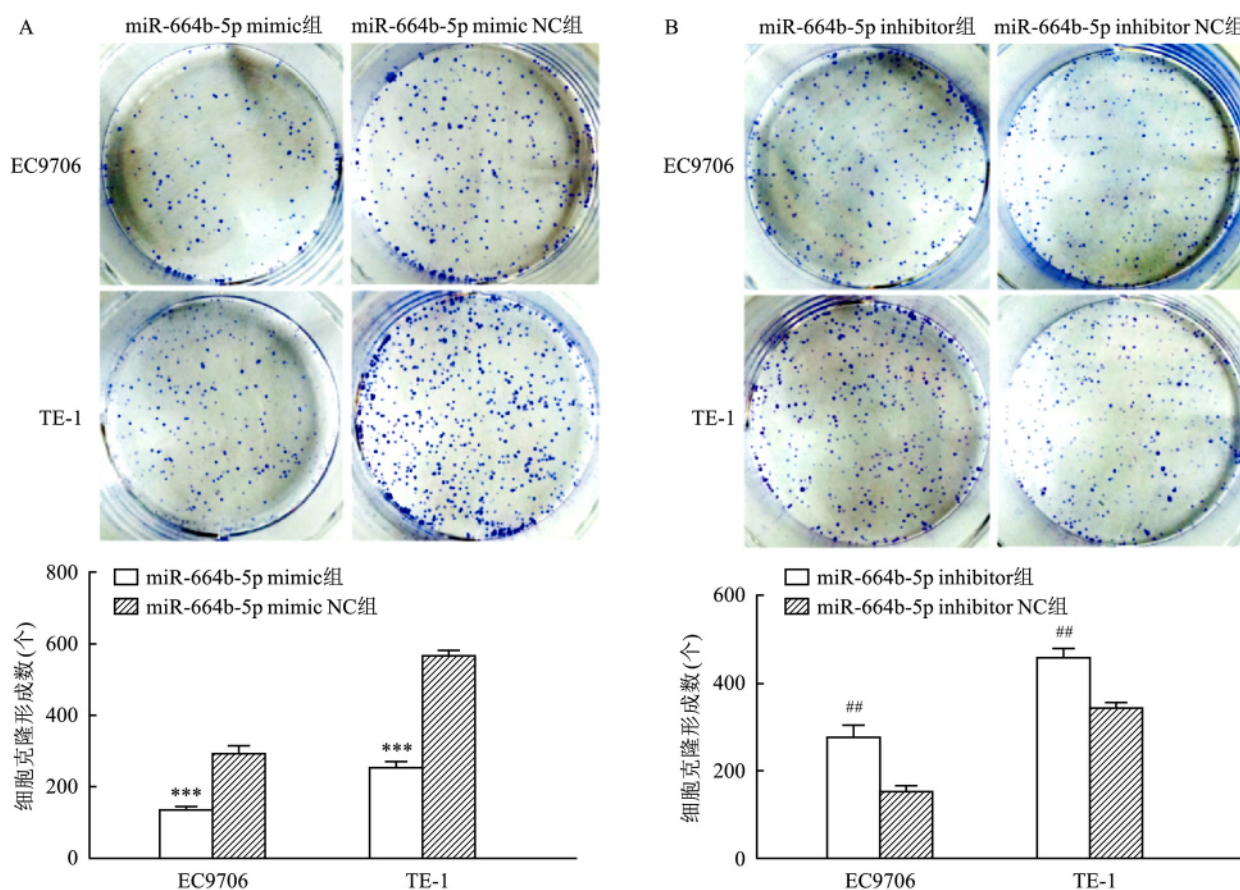


图3 平板克隆形成实验检测 miR-664b-5p 对食管癌细胞克隆形成的影响

A: 转染后细胞克隆形成; 与 miR-664b-5p mimic NC 组比较: *** $P < 0.001$; B: 转染后细胞克隆形成; 与 miR-664b-5p inhibitor NC 组比较: ## $P < 0.01$

13.115) 个 ($t = 27.042$, $P < 0.001$) (图 3A)。而抑制 miR-664b-5p 表达后 EC9706 细胞 miR-664b-5p inhibitor 组克隆形成数 (279.000 ± 25.942) 个高于对照组 miR-664b-5p inhibitor NC 组 (154.000 ± 11.533) 个 ($t = 7.626$, $P = 0.002$)。TE-1 细胞 miR-664b-5p inhibitor 组克隆形成数 (460.670 ± 18.339) 个高于对照组 miR-664b-5p inhibitor NC 组 (344.000 ± 11.533) 个 ($t = 9.328$, $P = 0.001$) (图 3B)。

2.3 miR-664b-5p 对食管癌细胞迁移和侵袭的影响 Transwell 迁移实验结果显示, EC9706 和 TE-1 细胞转染 miR-664b-5p mimic 组穿过小室底部膜的细胞数分别为 (81.000 ± 15.716) 和 (126.333 ± 18.339) 个, 少于相对应 miR-664b-5p mimic NC 组细胞数 (187.667 ± 37.873) 和 (298.333 ± 41.633) 个, 差异有统计学意义 ($t = 4.506$, $P = 0.011$; $t = 6.548$, $P = 0.003$) (图 4A)。Transwell 侵袭实验中 EC9706 和 TE-1 细胞转染 miR-664b-5p mimic 组穿过小室基底膜的细胞数分别为 (153.333 ± 48.232)

和 (229.000 ± 17.692) 个, 少于相对应 miR-664b-5p mimic NC 组细胞数 (297.000 ± 24.062) 和 (540.333 ± 69.644) 个, 差异有统计学意义 ($t = 4.617$, $P = 0.010$; $t = 7.504$, $P = 0.002$) (图 4B)。miR-664b-5p mimic NC 组显示出更高的迁移和侵袭能力。相反, 抑制 miR-664b-5p 的表达后 EC9706 和 TE-1 细胞 miR-664b-5p inhibitor 组穿过小室底部膜迁移细胞数分别为 (108.333 ± 5.132) 和 (1059.667 ± 56.190) 个, 多于 miR-664b-5p inhibitor NC 组细胞数 (64.000 ± 12.288) 和 (100.667 ± 8.082) 个, 差异有统计学意义 ($t = 5.766$, $P = 0.004$; $t = 29.260$, $P < 0.001$) (图 4C)。Transwell 侵袭实验中 EC9706 和 TE-1 细胞转染 miR-664b-5p inhibitor 组穿过小室基底膜的细胞数分别为 (220.000 ± 23.065) 和 (760.333 ± 40.278) 个, 多于相对应 miR-664b-5p inhibitor NC 组细胞数 (101.667 ± 18.930) 和 (448.000 ± 41.905) 个, 差异有统计学意义 ($t = 6.869$, $P = 0.002$; $t = 9.307$, $P < 0.001$) (图 4D)。miR-664b-5p

inhibitor 组显示出更高的迁移和侵袭能力。

2.4 miR-664b-5p 对凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响 Western blot 检测细胞转染 miR-664b-5p mimic 48 h 后促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,结果发现,与 miR-664b-5p mimic NC 组比

较,EC9706 和 TE-1 细胞中 miR-664b-5p mimic 组促凋亡蛋白 Bax 表达增加 ($t = 7.748$, $P = 0.016$; $t = 15.119$, $P = 0.004$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达减少 ($t = 27.520$, $P < 0.001$; $t = 21.066$, $P = 0.002$),差异有统计学意义(图 5A、B)。而 EC9706 和 TE-1 细胞

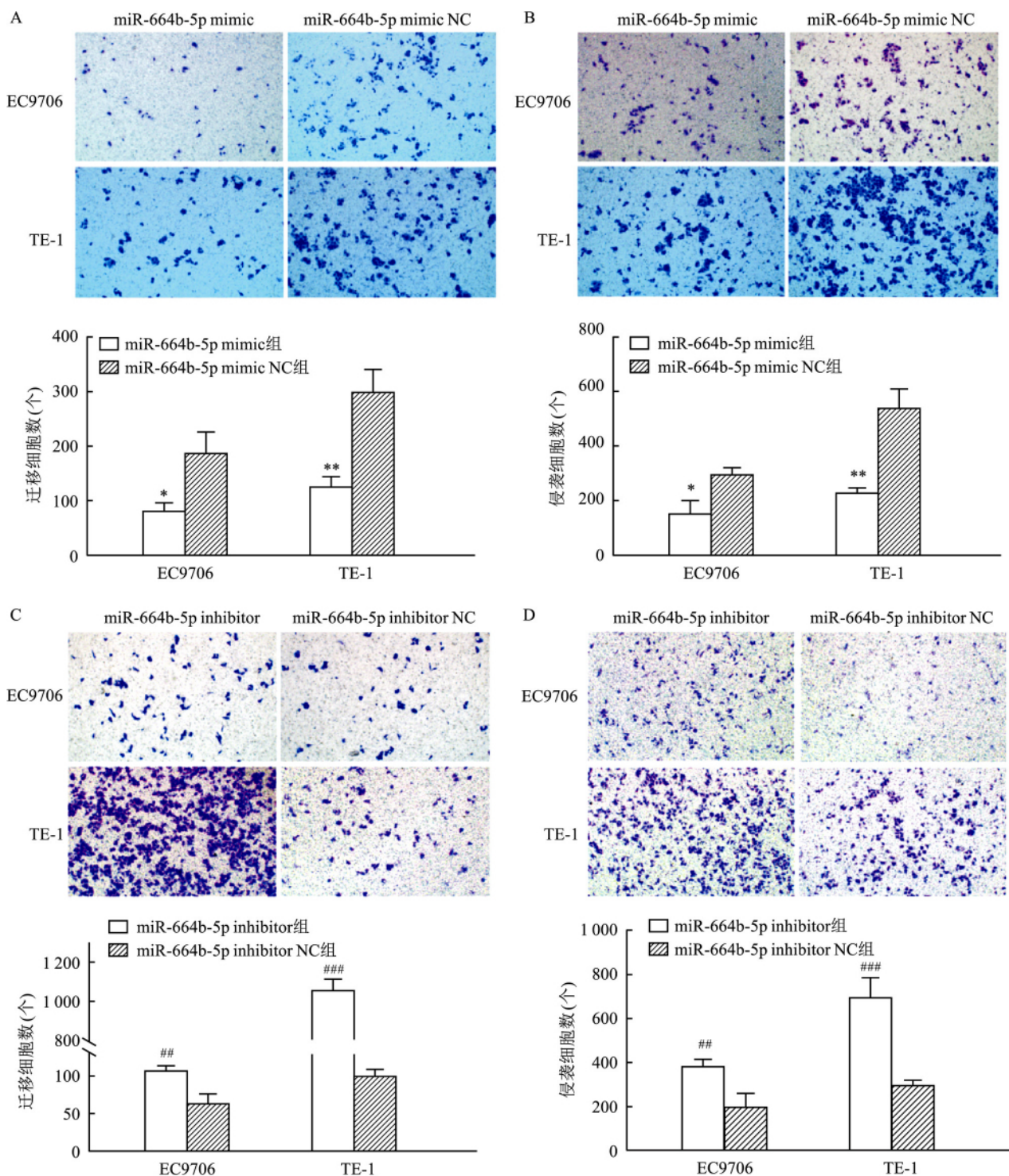


图4 Transwell 实验检测 miR-664b-5p 对食管癌细胞迁移和侵袭的影响 结晶紫染色 $\times 100$

A: 转染后迁移的细胞和统计数据; B: 转染后侵袭的细胞和统计数据; 与对应 miR-664b-5p mimic NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; C: 转染后迁移的细胞和统计数据; D: 转染后侵袭的细胞和统计数据; 与对应 miR-664b-5p inhibitor NC 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

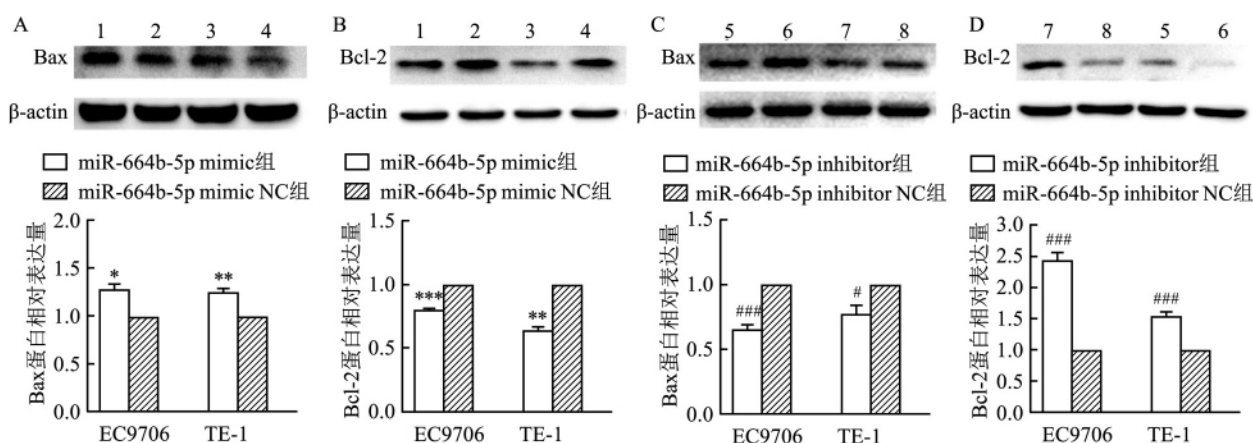


图5 Western Blot 检测 miR-664b-5p 对食管癌细胞中 Bax 和 Bcl-2 的表达的影响

A: 转染后细胞中 Bax 的表达及定量; B: 转染后细胞中 Bcl-2 的表达及定量; 与对应 miR-664b-5p mimic NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; C: 转染后细胞中 Bax 的表达及定量; D: 转染后细胞中 Bcl-2 的表达及定量; 与对应 miR-664b-5p inhibitor NC 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 1: EC9706 miR-664b-5p mimic 组; 2: EC9706 miR-664b-5p mimic NC 组; 3: TE-1 miR-664b-5p mimic 组; 4: TE-1 miR-664b-5p mimic NC 组; 5: EC9706 miR-664b-5p inhibitor 组; 6: EC9706 miR-664b-5p inhibitor NC 组; 7: TE-1 miR-664b-5p inhibitor 组; 8: TE-1 miR-664b-5p inhibitor NC 组

中转染 miR-664b-5p inhibitor 组与 miR-664b-5p inhibitor NC 组比较,促凋亡蛋白 Bax 表达减少 ($t = 17.097$, $P < 0.001$; $t = 5.108$, $P = 0.028$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达增加 ($t = 19.400$, $P < 0.001$; $t = 15.633$, $P < 0.001$) (图 5C、D)。

3 讨论

miRNAs 的异常表达与食管鳞癌的发生发展密切相关,参与调节食管鳞癌细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移等生物学行为^[8]。因此,全面地了解食管鳞癌相关的 miRNAs,对疾病的预防、诊断和治疗都十分重要。miR-664b-5p 位于 X 染色体,包含 24 个核苷酸,由 miRNA 前体 has-mir-664b 的 5' 端臂加工而成。李彦桦等^[9]同样运用 miRNA 芯片在 3 例汉族食管鳞癌患者中也发现,相比癌旁正常组织,miR-664b-5p 在食管癌组织中表达上调,差异倍数为 3.73,这与本课题组前期研究结果相一致,但哈萨克族患者中差异倍数更大,提示 miR-664b-5p 在食管鳞癌的发生发展中可能发挥重要作用。因此进一步在体外实验中研究 miR-664b-5p 对食管癌细胞的生物学行为的影响。

本研究同时在 EC9706 和 TE-1 两株食管癌细胞系中转染 miR-664b-5p 模拟物或抑制剂,运用 qRT-PCR 检测转染后 miR-664b-5p 的表达水平,确定最优转染条件满足后续功能研究。无限增殖、逃避凋亡以及侵袭和转移是肿瘤的重要特征,过表达

miR-664b-5p 后两株食管细胞的增殖、侵袭和迁移能力降低。相反,下调 miR-664b-5p 两株食管细胞的增殖、侵袭和迁移能力明显高于阴性对照组。Western Blot 结果发现,过表达 miR-664b-5p 后两株食管癌细胞内促凋亡蛋白 Bax 表达升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低,而抑制 miR-664b-5p 的表达后食管癌细胞中 Bax 表达降低, Bcl-2 表达升高,提示过表达 miR-664b-5p 后细胞对死亡信号敏感,促进细胞发生凋亡。综合以上结果表明 miR-664b-5p 能抑制食管癌细胞的增殖、侵袭和迁移,并且促进细胞凋亡,在食管癌中发挥类似抑癌基因的作用。Song et al^[10]研究发过表达 miR-664b-5p 后降低了乳腺癌 1 号基因 (BRCA1) 突变的三阴性乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力,诱导细胞凋亡,而抑制 miR-664b-5p 的表达则出现相反的结果,这与本研究结果相一致。进一步研究发现,细胞周期蛋白 E2 (CCNE2) 为 miR-664b-5p 的下游靶基因^[10]。

CCNE2 在肺癌^[11]、乳腺癌^[10]等多种肿瘤中表达增加。在 G₁ 期/S 期 CCNE2 与细胞周期蛋白依赖激酶 2 (CDK2) 形成复合物磷酸化 Rb,使转录因子 E2F 从磷酸化的 Rb 蛋白上分离,游离的 E2F 可促进 DNA 合成,推动细胞周期从 G₁ 期进入 S 期^[12]。miR-664b-5p 可与 CCNE2 mRNA 的 3' 端非翻译区结合降解 CCNE2 mRNA,抑制 CCNE2 蛋白的表达,阻止细胞周期进程由 G₁ 期转换到 S 期,从而发挥抑制肿瘤的作用^[10]。由此推测,食管鳞癌中

miR-664b-5p 可能通过抑制 CCNE2 的表达从而发挥抑癌作用。而 miR-664b-5p 也可能通过多个靶基因发挥抑癌作用,后期可进一步利用生物信息学分析 miR-664b-5p 的下游靶基因并通过荧光素酶报告实验验证结合位点,通过体内体外实验证明其介导 miR-664b-5p 的抑癌作用。

目前普遍认为癌中高表达的基因常常发挥促癌作用,本研究发现在哈萨克族食管鳞癌中高表达的 miR-664b-5p 发挥着抑癌基因的作用。可能的原因如下:当细胞增殖异常加速分裂时,细胞反馈性增加了抑癌基因的表达,阻滞细胞周期进程,诱导细胞凋亡,故而可能表现为抑癌基因表达的升高。哈萨克族食管鳞癌中 miR-664b-5p 高表达的机制仍需进一步研究。

综上所述,本研究在前期研究的基础上,通过体外实验研究表明 miR-664b-5p 抑制食管鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡,为阐明 miR-664b-5p 在哈萨克族食管鳞癌进展中的分子机制提供了研究基础。

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] Chen W, Yang C, Yang L, et al. Association of roasting meat intake with the risk of esophageal squamous cell carcinoma of Kazakh Chinese via affecting promoter methylation of p16 gene [J]. *Asia Pac J Clin Nutr* 2014, 23(3): 488–97.
- [3] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin* 2014, 64(1): 9–29.
- [4] Liao J, Liu R, Shi Y J, et al. Exosome-shuttling microRNA-21 promotes cell migration and invasion-targeting PDCD4 in esophageal cancer [J]. *Int J Oncol* 2016, 48(6): 2567–79.
- [5] Kong K L, Kwong D L, Chan T H, et al. MicroRNA-375 inhibits tumour growth and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma through repressing insulin-like growth factor 1 receptor [J]. *Gut* 2012, 61(1): 33–42.
- [6] Cui X B, Peng H, Li R R, et al. MicroRNA-34a functions as a tumor suppressor by directly targeting oncogenic PLCE1 in Kazakh esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget* 2017, 8(54): 92454–69.
- [7] Cheng L, Shi G, Fang C, et al. Identifying the differentially expressed microRNAs in esophagus squamous cell carcinoma of Kazakh patients in Xinjiang [J]. *Oncol Lett* 2019, 17(3): 2657–68.
- [8] Yin Y, Du L, Li X, et al. miR-133a-3p suppresses cell proliferation, migration, and invasion and promotes apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Cell Physiol* 2019, 234(8): 12757–70.
- [9] 李彦桦, 李雨珊, 张仁静, 等. 微小 RNA-481a-5p、320a 及其靶基因 TGF- β 1 在食管鳞癌中的表达 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(5): 395–401.
- [10] Song W, Tang L, Xu Y, et al. PARP inhibitor increases chemosensitivity by upregulating miR-664b-5p in BRCA1-mutated triple-negative breast cancer [J]. *Sci Rep* 2017, 7: 42319–30.
- [11] 陈毅德, 陈小旋, 沈丽娜, 等. 肺癌组织中 AKAP95 和 cyclinE2 蛋白表达的临床意义及与 Cx43 蛋白的关联性分析 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志* 2012, 30(10): 725–9.
- [12] Sonntag R, Giebler N, Nevzorova Y A, et al. Cyclin E1 and cyclin-dependent kinase 2 are critical for initiation, but not for progression of hepatocellular carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, 115(37): 9282–7.

Effect of miR-664b-5p on the biological behavior of esophageal cancer cell lines EC9706 and TE-1

Xiang Hui, Tang Ming, Li Yang, et al

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-664b-5p on the biological behavior of esophageal cancer cells EC9706 and TE-1. **Methods** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to determine the expression of miR-664b-5p after transfected with miR-664b-5p mimic or inhibitor in esophageal cancer cells EC9706 and TE-1; Cell proliferation was assessed by CCK-8 and colony formation; Migration and invasion of esophageal cancer cells were observed by the transwell chamber assay; The expression of apoptosis-related proteins Bax and Bcl-2 were detected by Western blot. **Results** After the transfection of miR-664b-5p mimic, the expression level of miR-

664b-5p increased in esophageal cancer cells EC9706 and TE-1 ($P < 0.05$), while the transfection of miR-664b-5p inhibitor was the opposite ($P < 0.05$); The results of cell proliferation assay showed that the ability of the cell proliferation and the number of colony formation decreased in the miR-664b-5p mimic group compared with the mimic NC group ($P < 0.05$), and the ability of the cell proliferation and the number of colony formation in the miR-664b-5p inhibitor group was higher than the inhibitor NC group ($P < 0.05$); The results of transwell assay showed that the number of migration cells and invasive cells of esophageal cancer in the miR-664b-5p mimic group was lower than that of the mimic NC group ($P < 0.05$), while the number of migration cells and invasive cells in the miR-664b-5p inhibitor group was higher than that of the inhibitor NC group ($P < 0.05$); The results of Western blot showed that the expression of Bax increased and Bcl-2 reduced in the miR-664b-5p mimic group ($P < 0.05$), but the expression of Bax reduced and Bcl-2 increased in the miR-664b-5p inhibitor group ($P < 0.05$). **Conclusion**

miR-664b-5p can inhibit cell proliferation, migration and invasion and promote the apoptosis of esophageal cancer cells EC9706 and TE-1, which provides the foundation to further study the molecular mechanism of miR-664b-5p in Kazakh patients with esophageal squamous cell carcinoma.

Key words miR-664b-5p; esophageal squamous cell carcinoma; proliferation; migration; invasion; apoptosis

(上接第 1745 页)

- [6] Tao H, Cao W, Yang J J, et al. Long noncoding RNA H19 controls DUSP5/ERK1/2 axis in cardiac fibroblast proliferation and fibrosis[J]. *Cardiovasc Pathol* 2016, 25(5): 381-9.
- [7] Frade A F, Laugier L, Ferreira L R, et al. Myocardial infarction-associated transcript, a long noncoding RNA, is overexpressed during dilated cardiomyopathy due to chronic chagas disease[J]. *Infect Dis* 2016, 214(1): 161-5.
- [8] Xuan L, Sun L, Zhang Y, et al. Circulating long non-coding RNAs NRON and MHRT as novel predictive biomarkers of heart failure[J]. *Cell Mol Med* 2017, 21(9): 1803-14.
- [9] Sharma S, Findlay G M, Bandukwala H S, et al. Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA-protein scaffold complex[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108(28): 11381-6.
- [10] Yao Z, Xiong Z, Li R. Long non-coding RNA NRON is downregulated in HCC and suppresses tumour cell proliferation and metastasis[J]. *Biomed Pharmacother* 2018, 104: 102-9.

LncRNA NRON alleviates atrial fibrosis via promoting NFATc3 phosphorylation

Wang Ze, Guo Zhixiang, Ge Shenglin

(Dept of Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the specific mechanism of LncRNA NRON affecting NFAT activity and progression of atrial fibrosis. **Methods** The expression level of NRON in atrial tissue was detected by qRT-PCR. Western blot was used to determine the protein levels of collagen I, collagen III, NFATc3 and pNFATc3. Immunohistochemistry was performed to observe the expression and distribution of collagen I in atrial tissue. Atrial fibroblasts were identified by vimentin/troponin immunofluorescence staining. Then the proliferation of fibroblasts was detected by CCK-8 analysis. HE staining was used to observe the morphological changes of cardiac tissue, and finally the myocardial fibrosis was detected by Masson staining. **Results** NRON inhibited fibroblast proliferation, and the expression of collagen I and collagen III, activated NFATc3 and nuclide entry. Overexpression of NRON inhibited the cardiac fibrosis induced by NFAT in mice. **Conclusion** The data from this study suggest that NRON alleviates atrial fibrosis by promoting NFATc3 phosphorylation.

Key words long non-coding RNA; NRON; atrial fibrillation; cardiac fibrosis; NFAT; phosphorylation