

网络出版时间: 2019-12-18 17:12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20191217.1516.016.html>

MiR-25-3p 靶向 NOTCH1 对食管鳞癌细胞 ECA109 侵袭、迁移、增殖的影响

薛亚军^{1,2} 杜雅彦³ 周奕君¹ 董星星¹ 魏育涛^{1,4}

摘要 目的 探讨 miR-25-3p 靶向 NOTCH1 基因对食管鳞癌细胞侵袭、迁移和增殖的影响,阐明 miR-25-3p 和 NOTCH1 基因在食管鳞癌中的作用机制。方法 将 ECA109 细胞以 1×10^6 /ml 均匀接种于培养皿,每组设 3 个复孔,实验分为两组。第 1 组: miR-25-3p 上调组(转染 miR-25-3p 模拟物)、miR-25-3p 下调组(转染 miR-25-3p 抑制剂)和 NC 组;第 2 组: NOTCH1 上调组(转染 NOTCH1 模拟物)、NOTCH1 下调组(转染 NOTCH1 抑制剂)和 NC 组。实时荧光定量 PCR 法分别检测各组 miR-25-3p、NOTCH1 表达水平,Transwell 小室检测转染 miR-25-3p、NOTCH1 后 ESCC 细胞侵袭能力,CCK-8 检测细胞增殖能力,生物信息学分析和荧光素酶活性测定以确定 NOTCH1 是否为 miR-25-3p 的靶基因。结果 ① NOTCH1 是 miR-25-3p 的靶基因;②细胞实验结果显示,与 NC 组相比,miR-25-3p 上调组促进 ECA109 细胞的侵袭($P < 0.05$),CCK-8 增殖试验显示在 ECA109 细胞中 miR-25-3p 上调组促进细胞增殖($P < 0.05$);③下调 NOTCH1 促进细胞生长($P < 0.05$),下调 NOTCH1 可增强 ECA109 细胞的侵袭能力($P < 0.005$),上调 NOTCH1 可抑制 ECA109 细胞的侵袭能力($P < 0.005$)。结论 miR-25-3p 通过靶向调节 NOTCH1 促进人 ESCC 细胞的侵袭、迁移和增殖,miR-25-3p 有望成为 ESCC 治疗的新靶点。

关键词 miR-25-3p; ESCC; NOTCH1; 侵袭; 增殖; 生物信息学分析

中图分类号 R34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)01-0075-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.016

食管癌(esophageal cancer, EC)是全球第八大

常见癌症,也是癌症相关死亡的第六大常见原因^[1]。食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)占高危地区 EC 所有组织学类型的 90%,在中国中北部,ESCC 发病率和死亡率排名第一^[2]。NOTCH 的信号转导基因包括 NOTCH1、NOTCH2、NOTCH3 和 NOTCH4 等四种受体^[3],参与细胞增殖、分化、凋亡、转移和黏附。NOTCH1 的失调与癌症密切相关^[4-5]。

miR-25 是位于染色体 7q22.1 上的假定致癌基因,在各种癌症中高表达,并在许多恶性肿瘤相关过程中发挥功能,如癌症形成、增殖、凋亡和迁移^[4]。多种分子途径也是 miR-25 在各种癌症中的靶点^[6]。然而,miR-25 对 ESCC 中的作用和分子机制仍不清楚。该研究主要关注 ESCC 中 miR-25-3p 与 NOTCH1 的相关性,探讨其对 ESCC 细胞的可能作用机制,为 ESCC 的诊断和治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器与细胞系 人 ESCC 细胞株 ECA109 购自于中科院上海细胞库,引物及内参均由上海生工公司设计合成;miRNA 模拟物及抑制物由上海吉玛制药公司设计合成;NOTCH1 的过表达质粒和小干扰 RNA(siRNA)干扰片段由 GenePharma 公司构建。LipofectAMINETM 2000 转染试剂购自于美国 Invitrogen 公司;Transwell 小室及 Matrigel 基质胶购自于美国 Corning 公司;CCK-8 试剂盒购自于上海气海复泰有限公司;miRcute 系列细胞 miRNA 提取及检测试剂盒购自于北京天根生化科技有限公司。

1.2 资料来源参考数据库 ①本研究选取 PicTar (<http://pictar.org/>)、miRGen (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html>)、TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_50/)、miRWalk (<http://www.microrna.org/microrna/>) 和 miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) 5 个预测网站进行。为了减少软件预测的假阳性,取至少同时满足 2 个预测软件的基因才能作为靶基因。②应用 TargetScan 预测

2019-10-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81460059);兵团区域创新引导计划项目(编号: 2017BA043);石河子大学成果转化与技术推广项目(编号: CGZH201703)

作者单位: ¹ 石河子大学医学院,石河子 832000

² 石河子大学医学院附属第一医院心胸外科,石河子 832000

³ 荆州市中心医院急诊科,荆州 434000

⁴ 济宁市第一人民医院胸外科,济宁 272000

作者简介: 薛亚军 男 硕士研究生;

魏育涛 男 教授,硕士生导师,责任作者 E-mail: wytfbw@126.com

miR-25-3p 与 NOTCH1 3'-UTR 的互补结合位点。

1.3 细胞培养与转染 将细胞系在 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培养基混合物中培养,其中混合有 10% 胎牛血清(FBS),放置于含有 5% CO₂、温度为 37 °C 的细胞培养箱中培养。实验组分成两组:第 1 组:miR-25-3p 上调组(转染 miR-25-3p 模拟物,使 miR-25-3p 表达量提高)、miR-25-3p 下调组(转染 miR-25-3p 抑制剂,使 miR-25-3p 表达量降低)和 NC 组(脂质体包裹 NC 序列,不影响 miR-25-3p 的表达);第 2 组:NOTCH1 上调组(转染 NOTCH1 模拟物,使 NOTCH1 表达量提高)、NOTCH1 下调组(转染 NOTCH1 抑制剂,使 NOTCH1 表达量降低)和 NC 组(脂质体包裹 NC 序列,不影响 NOTCH1 的表达)。NOTCH1 的过表达质粒是 pcDNA3.1(+)-NOTCH1。其阴性对照质粒为 pcDNA3.1(+)-NC,不含 NOTCH1 基因的启动子区。分别用 miR-25-3p 模拟物、抑制剂,NOTCH1 模拟物、抑制剂和相对阴性对照转染 ECA109 细胞系。该公司合成的模拟物按照推荐量用无酶水稀释,脂质体 Lipofectmine 2000 与模拟物的比例根据细胞状态和 qRT-PCR 结果进行调整。miRNA-25-3p 模拟物、抑制剂和 NOTCH1 模拟物、抑制剂的靶序列如表 1 所示。转染 24 h 后更换为完全培养液继续培养 24 h,收集后用于后续试验。

1.4 实时荧光定量 PCR 法检测 miR-25-3p 的表达水平 使用 miRNeasy Mini Kit 从细胞中分离 RNA。以 260~280 nm 光密度(OD)比评估 RNA 质量。应用 miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit 和 PrimeScript RT Reagent Kit 将 RNA 逆转录为 cDNA。应用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒用于定量 mRNA。在 CFX96 实时热循环仪中进行检测。该研究中使用的寡核苷酸列于表 1 中。所有 miRNA 样品用 U6 标准化,而 mRNA 样品用 GAPDH 标准化。通过使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对表达水平。

表 1 实验相关引物序列列表

目的基因	引物序列 (5'-3')
U6	F: TGCGGGTGTCTCGCTTCGGCAGC R: GTGCAGGGTCCGAGCT
miR-25-3p	F: AGGCCGAGACTTGGGCAATTG R: GAATCGAGCACCAGTTACGC
NOTCH1	F: CGCCTTTGTGCTTCTGTCTCTC R: GGGCTCCCGCCGCTTCTCT
GAPDH	F: GTCACCAAGGCTGCTTTAACTC R: CAGCATCGCCCCACTTGATTTTG

1.5 Transwell 侵袭试验检测细胞侵袭能力 将细胞在未添加胎牛血清的 OPTI-MEM 培养基中饥饿处理 6 h。将细胞悬浮于 1 ml 无血清培养基中,并将 100 μ l (1×10^5) 细胞接种到 24 孔板的上室中,在下室中加入 600 μ l 含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基。置于细胞培养箱培养 48 h 后,用棉签旋转擦去上室面上未穿膜的细胞,多聚甲醛固定 20 min 后用 0.5% 结晶紫染色。在 100 \times 放大倍率下获得横跨下膜的 5 个视野的图像。使用 ImageJ 计数细胞。

1.6 CCK-8 法检测细胞增殖能力 将 ECA109 细胞以每孔 4 000 个细胞的密度接种到 96 孔微量培养板上,并在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养 12 h。将在 OPTI-MEM 培养基中培养的细胞设定为对照组。37 °C 培养 48 h 后,将每个孔与 10 μ l CCK-8 混合,并在 37 °C 下进一步培养 3 h。使用分光光度计在 450 nm 处检测 OD 值。以时间为横轴,OD 值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.7 双荧光素酶报告基因检测 在 NCBI 数据库中搜索 NOTCH1 启动子区基因序列。将荧光素酶质粒(2 001 bp)及其剪接变体荧光素酶报告基因质粒(1 501、1 001 和 501 bp) hsa-miR-25-3p 过表达质粒和 PRL-TK Renilla 荧光素酶质粒转染到 293T 细胞。用于检测的设备包括全波长扫描酶标仪和 Dual-Glo[®] 荧光素酶测定系统。样品加载试验采用以下步骤:①将 Dual-Glo[®] 荧光素酶试剂加入板中;②在 20~25 °C 温育 10 min;③测量萤火虫发光;④加入 100 μ l Stop & Glo[®] Reagent 试剂到板上;⑤在 20~25 °C 温育 10 min;⑥测量海肾发光;⑦计算每个孔的萤火虫/海肾发光的比例;⑧将样品孔中的比例标准化为对照孔(或一系列对照孔)中的比率。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析。每组的数据均进行 3 次重复。当数据处于正态分布时,使用两个独立样品的 Student-*T* 检验,三个或更多个独立样品的单向 ANOVA 评估组间差异。当数据不符合正态分布时,使用 Kruskal-Wallis H 检验评估组间差异,对具有三个或更多独立样本的数据进行统计分析,并使用 Wilcoxon 秩和检验对两个独立样本的数据进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-25-3p 及 NOTCH1 的转染效率 质体包裹经化学修饰的合成 miR-25-3p 和 NOCH1 转染 ES-CC 细胞系 ECA109,使 miR-25-3p 和 NOTCH1 在

ECA109 细胞中差异表达,以研究其调控机制。实验分组见 1.3 项,转染完成后,使用 qRT-PCR 检测三组细胞 miR-25-3p 和 NOTCH1 表达量,结果显示上调组较 NC 组表达量明显升高;下调组较 NC 组表达量明显降低(图 1),差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 miR-25-3p 和 NOTCH1 的模拟物和抑制剂成功转入细胞。

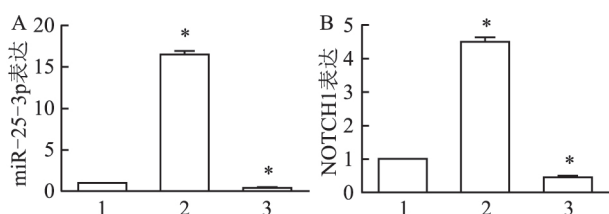


图 1 miR-25-3p 及 NOTCH1 的转染效率

A: miR-25-3p 的转染效率(1. NC 组; 2. miR-25-3p 上调组; miR-25-3p 下调组); B: NOTCH1 的转染效率(1. NC 组; 2. NOTCH1 上调组; NOTCH1 下调组); 与 NC 组相比, * $P < 0.05$

2.2 荧光素酶验证 NOTCH1 与 miR-25-3p 的靶向关系 通过搜索 TargetScan 数据库,在 NOTCH1 的 3'UTR 中发现了一个保守位点。本课题组进行了荧光素酶报告分析,以评估 miR-25-3p 是否靶向调控 293T 细胞中的 Notch1 mRNA。ECA109 细胞用于确定 miR-25-3p 的抑制和过表达是否会影响 NOTCH1 mRNA 的表达水平。首先,检查 NOTCH1 的 3'UTR

以确定整个区域是否是 miR-25-3p 的功能靶标。荧光素酶报告基因测定证实 NOTCH1 的 3'UTR 是 miR-25-3p 的实际靶标(图 2A)。NOTCH1 的 3'UTR 中的一个保守位点被确认为实际功能位点。在 miR-25-3p 转染 48 h 后荧光素酶活性被显著抑制(NOTCH1 的 3'UTR 中 miR-25-3p 靶位点的位置为第 1 602 ~ 1 608 个位点。该结果表明该特异性位点为 miR-25-3p 靶向位点(图 2B)。在用 miR-25-3p 模拟物转染的 ECA109 细胞系中,NOTCH1 mRNA 表达水平显著降低(图 2C)。进行蛋白质印迹分析以证实 miR-25-3p 表达与 ECA109 细胞系中的 NOTCH1 表达呈负相关。miR-25-3p 下调组 ECA109 细胞系中 NOTCH1 表达水平显著升高,miR-25-3p 上调组 ECA109 细胞系中 NOTCH1 表达水平显著降低(图 2D)。

2.3 miR-25-3p 促进细胞迁移和侵袭 将 miR-25-3p 模拟物和抑制剂转染到 ECA109 细胞中时,进行基质胶侵袭测定以检查 miR-25-3p 对 ECA109 细胞侵袭的影响。如图 3A 所示,上调组的下室中的细胞多于 NC 组的细胞,表明 miR-25-3p 可促进 ECA109 细胞的侵袭($P < 0.05$,图 3B)。CCK-8 增殖试验显示在 ECA109 细胞中上调 miR-25-3p 可促进细胞增殖($P < 0.05$,图 3C)。这些数据表明 miR-25-3p 可促进 ESCC 细胞侵袭和增殖。

2.4 NOTCH1 抑制 ESCC 细胞迁移和侵袭 将

A 人 NOTCH1 3'UTR 长度:1 627

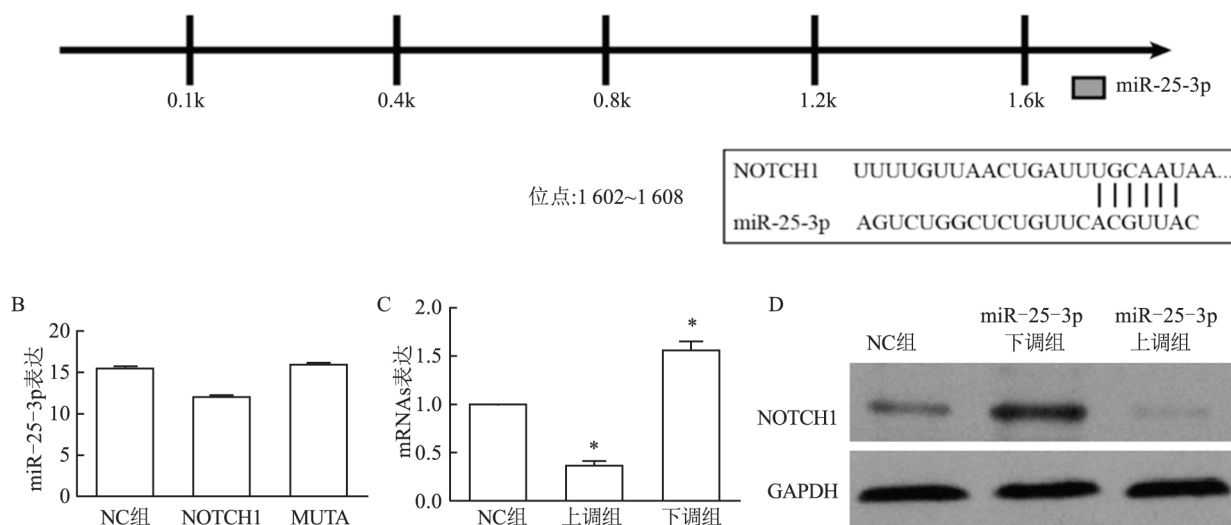


图 2 荧光素酶验证 NOTCH1 与 miR-25-3p 的靶向关系

A: miR-25-3p 与 NOTCH1 的保守结合位点的示意图; B: NOTCH1 的 3'端非编码区是 miR-25-3p 的靶标之一; C: 上调 miR-25-3p 后,NOTCH1 mRNA 水平下降;下调 miR-25-3p 后,NOTCH1 mRNA 水平升高,与 NC 组相比: * $P < 0.05$; D: 下调 miR-25-3p 后,NOTCH1 蛋白表达增多;上调 miR-25-3p 后,NOTCH1 蛋白表达减少

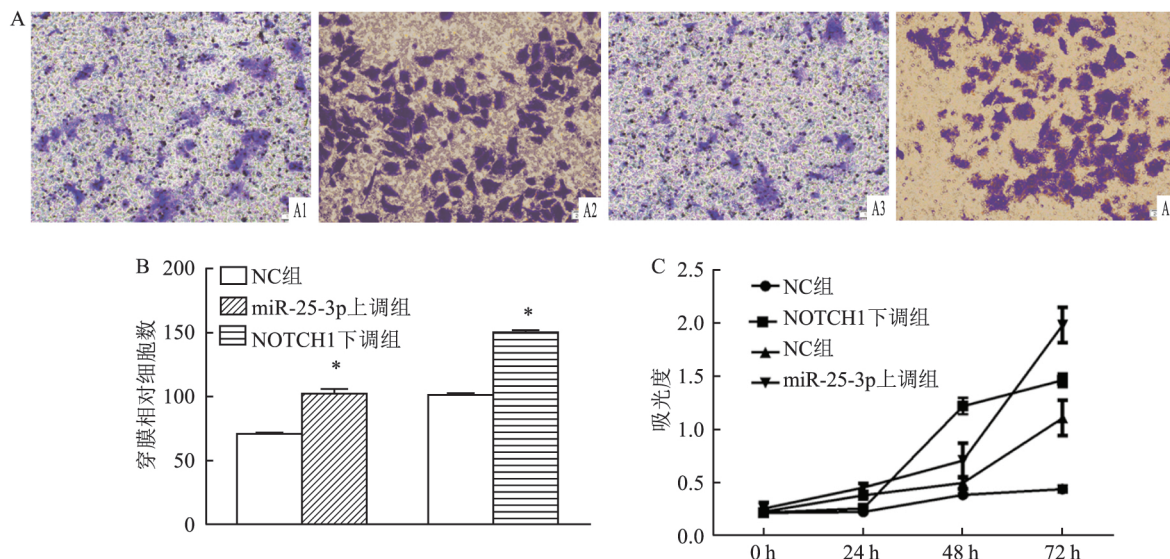


图3 Transwell和CCK-8实验检测miR-25-3p和NOTCH1上调和下调后对ECA109细胞增殖和迁移能力的影响

A: 显微镜100倍下观察穿过Transwell小室的相对细胞量; 1: miR-25-3p上调组; 2: NOTCH1下调组; 3: NC组(miR-25-3p实验组); 4: NC组(NOTCH1实验组); B: 穿过Transwell小室的相对细胞数; C: CCK-8法检测细胞增殖能力; 与NC组比较: * $P < 0.05$

NOTCH1模拟物和抑制剂质粒转染到ECA109细胞中,使用qRT-PCR检测NOTCH1的水平。NOTCH1下调组下室中的细胞数多于NC组(图3A), NOTCH1的缺乏也增强了ECA109细胞的侵袭能力($P < 0.005$,图3B),CCK-8增殖试验显示在ECA109细胞中下调NOTCH1可促进细胞增殖($P < 0.05$,图3C)。NOTCH1上调组的下室中细胞数比NC组中少($P < 0.005$,图4A),NOTCH1的上调抑制ECA109细胞的侵袭能力($P < 0.005$,图4B)。CCK-8增殖测定显示NOTCH1上调抑制细胞生长($P < 0.05$,图4C)。这些数据表明NOTCH1负调控

ESCC细胞侵袭和增殖。此外,miR-25-3p上调和NOTCH1下调对侵袭和增殖发挥相同的作用。

3 讨论

至2012年,全球共发生255 800例EC和400 200例死亡病例^[7]。ESCC是EC的主要病理分型之一,也是最常见的亚型。最近有研究表明细胞癌变是由异常信号转导引起的,癌细胞是由异常增殖信号诱导的。

miRNA和蛋白质是特殊的生物学标志物,有助于癌症的早期诊断。它们也是新的治疗目标,有助于癌症预后评估。最近发现越来越多的miRNA在各种癌症中差异表达,因此,它们是潜在的生物标志物,可以作为临床实践中补充的癌症生物标志物。研究^[8]表明,miRNA-21抑制剂可能通过下调Bcl-2的表达诱导人EC细胞ECA109的凋亡。miR-25、miR-106b、miR-21、miR-203和miR-145是ESCC中关键的差异表达miRNA^[9],其具体的作用机制尚未见有文献报道。其他研究确定了miR-106b-25与肿瘤发生的关联及其在肿瘤形成过程中上调^[10]。Kan et al^[11]的研究表明miR-106b-25具有潜在的抗细胞凋亡作用,并在体外实验中进行验证发现可以促进细胞周期。Kim et al^[12]证实了miR-25的高表达与胃癌淋巴结转移之间的正相关性。同样,miR-25在EC中高表达,其高表达与淋巴结转移显著相关。在本研究中,通过转染对miR-25进行过表达及抑制,然后进行ECA109细胞系迁移、侵袭和增殖的测定,

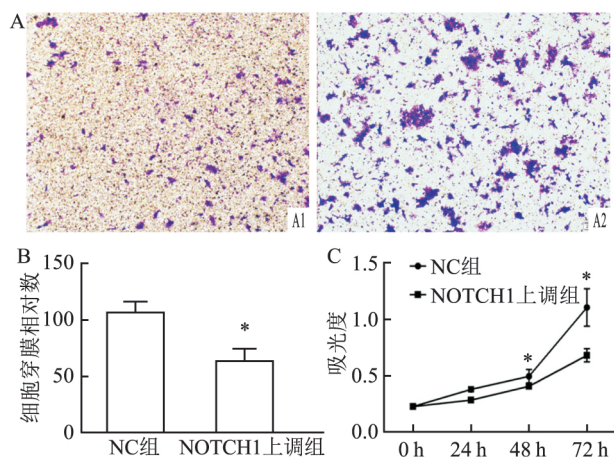


图4 Transwell和CCK-8实验检测NOTCH1上调后对ECA109细胞增殖和迁移能力的影响

A: 显微镜100倍下观察穿过Transwell小室的相对细胞量; 1: NOTCH1上调组; 2: NC组; B: miR-25-3p上调组穿膜细胞相对数; C: NOTCH1上调组CCK-8增殖测定; 与NC组比较: * $P < 0.05$

结果表明 miR-25 过表达促进 ESCC 细胞转移和侵袭。

NOTCH 蛋白是一种跨膜受体,从蠕虫到人类在结构和功能上都具有保守性。NOTCH 信号通路在 ESCC 中失调。该途径可能调控组织发育和体内平衡。此外,NOTCH 信号通路和癌症干细胞的自我更新、增殖、分化和凋亡有关。因此,NOTCH 信号传导是 ESCC 的潜在治疗靶标。研究^[13]表明,NOTCH1 信号通路是许多器官中的关键信号通路,可调节细胞分化和凋亡,影响许多生物过程的发育和功能。这一发现表明 NOTCH1 是一种有前景的 EC 生物标志物,具有重要的理论意义。

本课题组前期研究发现,miR-25-3p 在 ESCC 中高表达,提示 miR-25-3p 与 ECSS 的发生发展相关。本研究通过体外细胞实验及双荧光素酶实验发现,NOTCH1 抑制 ECA109 细胞增殖和迁移,miR-25-3p 促进 ECA109 细胞增殖和迁移,而 miR-25-3p 靶向调控 NOTCH1 的表达,从而得出结论;miR-25-3p 可能通过靶向负调控 NOTCH1 的表达来促进 ESCC 细胞的侵袭和增殖,从而促进 ESCC 的发生和发展。因此,miR-25-3p 可作为预测 ESCC 预后或治疗靶点的潜在生物标志物。但是,肿瘤的发生和发展受到很多因子和信号通路的协同作用,本研究的发现在 ESCC 中是否具有主要作用尚需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Desantis C E, Lin C C, Mariotto A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64 (4): 252–71.
- [2] Procter D S. Oesophageal carcinoma [J]. *S Afr Med J*, 1973, 47 (8): 348–51.
- [3] Lu Z, Liu H, Xue L, et al. An activated Notch1 signaling pathway inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC9706 [J]. *Int J Oncol*, 2008, 32(3): 643–51.
- [4] 袁勇, 胡杨, 赵雅凡, 等. Notch 信号通路相关蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2015, 18(9): 909–13.
- [5] Leonetti A, Facchinetti F, Minati R, et al. Notch pathway in small-cell lung cancer: from preclinical evidence to therapeutic challenges [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2019, 42(3): 261–73.
- [6] Smith A L, Iwanaga R, Drasin D J, et al. The miR-106b-25 cluster targets Smad7, activates TGF-beta signaling, and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of six1 in human breast cancer [J]. *Oncogene*, 2012, 31(50): 5162–71.
- [7] Park J S, Kim J, Elghiyat A, et al. Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(37): e12390.
- [8] 李红霞, 李玉芝, 高峻峰, 等. miRNA21 抑制剂对食管癌细胞凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(8): 1124–7.
- [9] Li X, Kleeman S, Coburn S B, et al. Selection and application of tissue microRNAs for nonendoscopic diagnosis of Barrett's esophagus [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(3): 771–83.
- [10] Tan W, Li Y, Lim S G, et al. miR-106b-25/miR-17-92 clusters: polycistrons with oncogenic roles in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(20): 5962–72.
- [11] Kan T, Meltzer S J. MicroRNAs in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(6): 727–32.
- [12] Kim B H, Hong S W, Kim A, et al. Prognostic implications for high expression of oncogenic microRNAs in advanced gastric carcinoma [J]. *J Surg Oncol*, 2013, 107(5): 505–10.
- [13] Izumchenko E, Sun K, Jones S, et al. Notch1 mutations are drivers of oral tumorigenesis [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2015, 8(4): 277–86.

Effect of MiR-25-3p targeting NOTCH1 on invasion, migration and proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cell line ECA109

Xue Yajun^{1,2}, Du Yayan³, Zhou Yijun¹, et al

(¹Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000; ²Second Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000; ³Dept of Critical Care Medicine, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434000)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-25-3p targeting NOTCH1 gene on invasion, migration and proliferation of esophageal squamous carcinoma cells, and to elucidate the mechanism of miR-25-3p targeting the regulation of NOTCH1 gene in esophageal squamous cell carcinoma. **Methods** ECA109 cells were uniformly inoc-

网络出版时间: 2019-12-18 17:12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20191217.1516.017.html>

人肝细胞癌中 HNF4 α 近端启动子区生物信息学分析

曹 辉¹, 许 钟², 陈燕平¹, 张玲玲², 鲁 亮¹

摘要 目的 应用生物信息学数据库挖掘数据, 预测分析肝细胞癌发生发展过程中抑癌基因肝核转录因子 4 α (HNF4 α) 表达下调的转录调控机制。方法 从美国国家生物技术信息中心在线核苷酸数据库获得 HNF4 α 基因的启动子序列; 应用 PromoterScan、Patch、P-Match、AliBaba2 等在线转录因子预测软件分析 HNF4 α 转录因子结合位点; 应用在线肝脏基因数据库 liveratlas 筛查肝癌组织中表达下调的基因, 与预测的转录因子进行对比。通过 TCGA 数据库提取相关转录因子与 HNF4 α 的肝癌组织芯片表达结果, 进行相关性分析。结果 人 HNF4 α 基因在肝癌中对应转录本的启动子约 1 471 bp。应用 PromoterScan、Patch、P-Match 和 AliBaba2 等在线软件分析, 预测转录因子结合位点结果汇总后去除重复, 共涵盖 225 个转录因子。应用在线基因数据库 liveratlas 检索, 提取肝细胞癌中表达下调的基因共 2 538 个, 与上述预测的 225 个转录因子进行对比, 取交集获得目标转录因子共 17 个。相关性分析提示 HLF ($r = 0.553\ 4$)、RREB1 ($r = 0.407\ 9$)、RXRA ($r = 0.424\ 7$) 等转录因子与 HNF4 α 的表达成正相关。结论 生物信息学分析提示 HLF、RREB1、RXRA 等转录因子参与 HNF4 α 在肝脏中表达的转录调控, 其中一个或多个蛋白的低表达与肝细胞癌发生发展中抑癌基因

HNF4 α 的表达下调有关。

关键词 HNF4 α ; 启动子; 转录因子; 生物信息学; 肝细胞癌
中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)01-0080-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.017

肝核转录因子 4 (hepatocyte nuclear factor 4, HNF4) 是细胞核激素受体家族中的核心成员之一, 在调控肝细胞分化和维持其生物学功能上具有重要作用, 其中 HNF4 α 与肝脏特异基因的表达密切相关^[1]。研究^[2-3]表明 HNF4 α 在肝细胞癌变中扮演着抑癌基因的角色, 在肝硬化、肝癌中其表达明显下调。作为肝细胞中的一个重要的转录因子, HNF4 α 与超过 40% 肝基因的启动子区相结合^[4], 其重要性可见一斑, 由此不难理解近年来肝脏疾病研究中 HNF4 α 受到国内外学者的重视^[5-7]。该研究拟应用生物信息学方法对 HNF4 α 基因启动子区进行序列分析, 预测该基因近端启动子区的转录因子结合位点, 进一步分析其在肝细胞癌中下调有关的转录因子, 为研究其转录调控机制、探索肝癌治疗新思路提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 基因启动子区序列的获得 从美国国家生物技术信息中心在线核苷酸数据库 (Gene Bank) 获得 HNF4 α 基因序列, 基于 HNF4 α 的基因序列 ID, 下载

2019-08-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81860439); 贵州省科学技术基金 (编号: 黔科合 J 字 (2012) 2241 号)

作者单位: 贵州省人民医院¹ 肿瘤科、² 消化内科, 贵阳 550002

作者简介: 曹 辉, 女, 博士, 副主任医师;

许 钟, 男, 博士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: xucong0567@163.com

ulated into culture dishes at 1×10^6 /ml, and each group was given 3 replicate wells. The experiment was divided into two groups. Group 1: miR-25-3p up-regulated (transfected with miR-25-3p mimics), miR-25-3p down-regulated (transfected with miR-25-3p inhibitor) and NC group; Group 2: NOTCH1 up-regulated (transfected NOTCH1 mimics), NOTCH1 down-regulated (transfected with NOTCH1 inhibitor), and NC group. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression levels of miR-25-3p and NOTCH1 in each group, transwell chamber was used to detect cell invasion ability, CCK-8 was used to detect cell proliferation, bioinformatics analysis and luciferase activity assay were used to determine whether NOTCH1 was Target gene of miR-25-3p. **Results** NOTCH1 is the target gene of miR-25-3p. Results revealed that cell invasion and proliferation increased with the overexpression of miR-25-3p by miRNA mimics and decreased with the suppression of NOTCH1. **Conclusion** miR-25-3p promotes the invasion and proliferation of human ESCC cells by targeting NOTCH1, and miR-25-3p is expected to become a new target for ESCC treatment.

Key words miR-25-3p; ESCC; NOTCH1; invasion; proliferation; bioinformatics analysis