

# miR-133b 通过靶向调控 EGFR 影响食管鳞癌的侵袭、转移

曾 薇<sup>1</sup>, 朱金峰<sup>2</sup>, 孔德华<sup>1</sup>, 单 莉<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 miR-133b 在食管鳞癌侵袭、转移过程中的作用及机制。方法 使用生物信息学工具预测 miR-133b 的靶基因; 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-133b 对靶基因表皮生长因子受体(EGFR)的直接靶向调控作用; 细胞增殖实验、划痕实验和 Transwell 实验检测 miR-133b 的不同表达对食管鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响; qRT-PCR 验证 miR-133b 与 EGFR 在食管鳞癌组织中的表达, 并分析 miR-133b 与食管鳞癌临床病理特征之间的关系。结果 生物信息学工具预测 EGFR 为 miR-133b 的靶基因, 双荧光素酶报告基因实验证实 miR-133b 可与 EGFR 3' UTR 片段结合; 体外实验通过上调食管鳞癌细胞中 miR-133b 的表达使细胞的增殖受阻(ECA109:  $P < 0.05$ , KYSE150:  $P < 0.01$ ); 细胞的迁移(ECA109:  $P < 0.01$ , KYSE150:  $P < 0.01$ )和侵袭能力(ECA109:  $P < 0.01$ , KYSE150:  $P < 0.01$ )显著减弱。在食管鳞癌组织中 miR-133b 与 EGFR 的表达呈负相关性( $P < 0.01$ ), 且 miR-133b 的表达与食管鳞癌的 TNM 分期、淋巴结转移显著相关( $P$  均  $< 0.05$ )。结论 miR-133b 可能通过下调 EGFR 的表达, 抑制食管鳞癌的增殖、侵袭和转移, 在食管鳞癌的演进中起负调控作用。

**关键词** 食管鳞癌; miR-133b; EGFR; 侵袭; 转移

**中图分类号** R 735.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)07-1010-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.005

食管鳞癌的侵袭、转移是多因素的综合作用, 是多基因变化积累、叠加的结果。随着 miRNA 的生成及功能异常在多种肿瘤发生、发展中的作用被逐渐认识<sup>[1]</sup>, miRNA 在食管鳞癌侵袭、转移中的机制研究越来越受到人们的关注<sup>[2]</sup>。miRNA 长约 20~24 nt, 主要通过转录后或翻译水平调控基因表达<sup>[3]</sup>。目前研究<sup>[4]</sup>显示, 在食管鳞癌组织中低表达的 miR-133b 可能作为抑癌基因, 参与食管鳞癌的演进, 并预测 miR-133b 可能作为食管鳞癌治疗的潜在靶

点。该研究将对 miR-133b 参与食管鳞癌侵袭、转移的具体作用及机制做进一步的研究讨论。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系** 人食管鳞癌细胞系 ECA109、KYSE150 购自 ATCC 细胞库。所有细胞为 90% RPMI 1640 培养基加 10% 胎牛血清, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。DMEM 培养基用于 Transwell 实验。

**1.1.2 组织标本** 收集 2008 年 1 月~2010 年 12 月新疆医科大学附属肿瘤医院胸外科手术切除的食管鳞癌组织标本, 包括肿瘤及与其配对的正常食管黏膜组织。所有患者术前未接受化疗、放疗或其他任何相关的抗肿瘤治疗。根据 UICC TNM (第七版) 分期。所有临床标本经过新疆医科大学附属肿瘤医院病理科专家诊断证实。临床标本的切取均通过新疆医科大学附属肿瘤医院伦理委员会批准, 并征得患者的同意签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 运用生物信息学方法预测 miR-133b 的靶基因** 运用 MiRbase、Targetscans 及 PicTar 数据库预测 miR-133b 的候选靶基因。

**1.2.2 细胞转染** 转染前 1 d, 细胞生长密度达 70%~80%。转染当天, 使用 250  $\mu$ l 无血清 Opti-MEM I 培养基稀释 miR-133b mimic/negative control 4.0  $\mu$ g, 轻轻混匀, 室温下静置 5 min。同时将 Lipofectamine™ 2000 10  $\mu$ l 稀释于 250  $\mu$ l 无血清 Opti-MEM I 培养基中, 轻轻混匀, 室温下静置 5 min。分别混合 Lipofectamine™ 2000 和 miR-133b mimic/miR-133b negative control 的稀释液, 室温下静置 20 min。6 孔板的每个孔中加入混合液 500  $\mu$ l。4 h 后更换细胞培养液, 于 37 °C、CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 48 h, 用于后续检测。

**1.2.3 荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)** 查找基因序列, 设计引物, 见表 1。引物由上海生工合成。使

2018-03-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(编号: 81660397)

作者单位: 新疆医科大学附属医院<sup>1</sup> 肺内科一病区、<sup>2</sup> 胃肠外科, 乌鲁木齐 830011

作者简介: 曾 薇, 女, 博士研究生, 主治医师;

单 莉, 女, 副教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shanlinew319@126.com

用 ABI7500 型定量 PCR 仪。TRIzol 法提取组织 RNA。逆转录反应体系 10  $\mu$ l 为: 5  $\times$  PrimerScript RT Master Mix 2  $\mu$ l、总 RNA 500 ng、加无 RNase 酶的水至 10  $\mu$ l。反应条件为: 37  $^{\circ}$ C、15 min; 85  $^{\circ}$ C、5 s; 4  $^{\circ}$ C、5 min。qRT-PCR 反应体系 10  $\mu$ l 为: SYBR Premix Ex TaqII(2  $\times$ ) 5  $\mu$ l, 上/下游引物各 0.5  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l, RNase Free dH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ l。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C、30 s; 95  $^{\circ}$ C、5 s; 60  $^{\circ}$ C、30 s。每个基因的相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。

表 1 qRT-PCR 实验引物序列

| 基因             | 引物序列(5'-3')                                      |
|----------------|--------------------------------------------------|
| EGFR           | F: GCACGCCAATAGAAGG<br>R: GTAAACGGCATGGCATC      |
| $\beta$ -actin | F: CCTCACCTGAAGTACCCCA<br>R: TCGTCCAGTTGGTGACGAT |
| miR-133b       | F: CTTTGGTCCCTTCAACCA<br>R: GTGCAGGGTCCGAGGT     |
| U6             | F: CTCGCTTCGGCAGCACA<br>R: AACGCTTCACGAAYYGCCT   |

**1.2.4 Western blot** 收集细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度,SDS-PAGE 胶电泳,将蛋白电转移到 PVDF 膜上,5% BSA 封闭,一抗(1:500)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(1:1000)室温孵育 1 h,ECL 化学发光显像。

**1.2.5 荧光素酶报告基因实验** 转染前将细胞按 70% 的密度接种至 96 孔板。按比例配制报告基因质粒和转染试剂即 Firefly: Renilla: 转染试剂 = 0.1  $\mu$ g: 0.01  $\mu$ g: 0.25  $\mu$ l,并常温下孵育 5 min。配制 miR-133b mimic/negative control 和转染试剂的稀释液:加入转染试剂 0.25  $\mu$ l 使 miR-133b mimic/negative control 的终浓度为 100 nmol/L,常温孵育 5 min。将稀释好的报告基因质粒、miR-133b mimic/negative control 混匀,常温孵育 20 min,然后分别添加到每孔细胞样品中。转染 6 h 后,更换细胞培养基。48 h 后弃去培养基,用 100  $\mu$ l 1  $\times$  PBS 洗 1 遍。每孔加 50  $\mu$ l 稀释好的 1  $\times$  PLB,置于摇床上,常温下 15 min 进行裂解。在白色不透光的 96 孔酶标板中每孔加入裂解液的上清液 10  $\mu$ l,再加入 100  $\mu$ l 预先混好的 LAR II 2 s 后测数据,得到萤火虫荧光素酶反应强度。每孔再添加 100  $\mu$ l 预先混好的 Stop&Glo Reagent 静止 2 s 后测数据,得到内参海肾荧光素酶反应强度。

**1.2.6 细胞增殖实验** 接种  $2 \times 10^5$  个细胞至 96

孔板,48 h 后加入新鲜配置的 MTT 溶液,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续孵育 4 h 后终止培养,每孔加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砜,酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的光密度(optical density, OD) 值。

**1.2.7 细胞划痕实验** 接种  $2 \times 10^6$  个细胞至 6 孔板,待细胞完全融合后垂直划出等宽的细胞划痕,继续培养 48 h,并于相应时间段在显微镜下观察划痕宽度,同时拍照记录。

**1.2.8 Transwell 实验** ECA109、KYSE150 细胞转染 24 h 后(具体转染步骤详见方法 1.2.2),胰酶消化并制备单细胞悬液,以  $5 \times 10^4$  个细胞密度接种于 Transwell 小室,24 孔板下层加入 750  $\mu$ l 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,70 h 后计算细胞过膜率。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量资料正态分布用  $\bar{x} \pm s$  表示,进行独立样本  $t$  检验,miR-133b 与其靶基因的表达采用 Pearson 相关分析,miR-133b 表达与临床病理参数之间的关系分析采用 Fisher 精确概率法, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 生物信息学分析预测 miR-133b 的靶基因** 本研究主要探索 miR-133b 调控其靶基因参与食管鳞癌侵袭、转移的机制。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 所参与的信号通路,与肿瘤的侵袭、转移密切相关。故本研究锁定在 3 个 miRNA 数据库中 miR-133b 靶基因预测结果的交集-EGFR,作为 miR-133b 的预测靶基因进行下一步的研究。见表 2。

表 2 miR-133b 与靶基因 EGFR 的结合序列

| 基因                  | 预测配对区域                          |
|---------------------|---------------------------------|
| EGFR 3'UTR 50-56 位点 | 5'...CUCUUUCGAUACCCAGGACCAAG... |
| Has-miR-133b        | 3'AUCGACCAACUCCCCUGGUUU         |

**2.2 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-133b 的靶基因** 为证实 miR-133b 对其靶基因 EGFR 的调控作用,课题组构建了 EGFR 野生型及突变型质粒进行双荧光素酶报告基因实验。具体实验分组如下: MT 组即插入了 EGFR 突变型质粒 3'UTR 片段的荧光素酶报告基因载体,WT 组即插入了 EGFR 野生型质粒 3'UTR 片段的荧光素酶报告基因载体,NC 组即荧光素酶报告基因载体。在食管鳞癌细胞 ECA109、KYSE150 中,通过转染 miR-133b mimics,检测各组的

荧光素酶活性,判断 miR-133b 对 EGFR 的调控作用。结果显示:转染 miR-133b mimics 对 MT 组和 NC 组的荧光素酶活性影响不显著,但能使 WT 组的荧光素酶活性明显下降(ECA109:  $t = 20.24$  vs NC 组,  $P < 0.01$ ; KYSE150:  $t = 14.07$  vs NC 组,  $P < 0.01$ ),提示 miR-133b 可直接靶向调控 EGFR 见图 1。

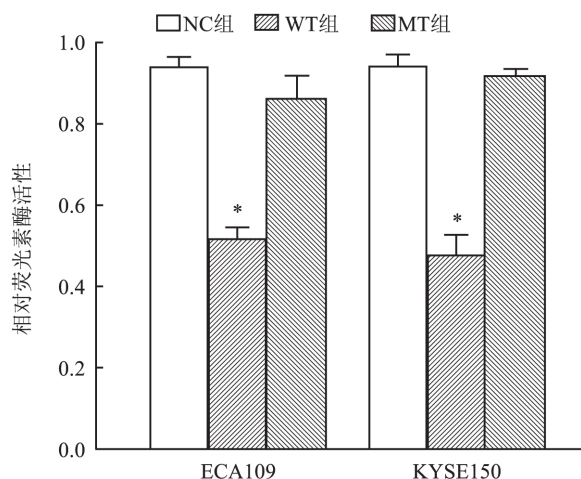


图1 双荧光素酶报告基因实验检测转染 miR-133b mimics 对各实验组荧光素酶活性的影响  
与 NC 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.3 miR-133b 对食管鳞癌细胞中 EGFR 表达的影响** 采用 qRT-PCR、Western blot 实验检测 miR-133b 对 EGFR 表达的影响。实验分组如下: miR-133b mimics 组即在食管鳞癌细胞中转染 miR-133b mimics; negative control 组即在食管鳞癌细胞中转染 negative control。qRT-PCR 结果显示,在食管鳞癌细胞 ECA109、KYSE150 中,与 negative control 组相比, miR-133b mimics 组中 miR-133b 在转录水平的表达显著上调,提示转染有效(ECA109:  $t = 9.28$  vs negative control 组,  $P < 0.01$ ; KYSE150:  $t = 35.53$  vs negative control 组,  $P < 0.01$ )。但与 negative control 组相比, miR-133b mimic 组中 EGFR 在转录水平的表达无显著变化,见图 2A ~ D。Western blot 结果显示,在食管鳞癌细胞 ECA109、KYSE150 中,与 negative control 组相比, miR-133b mimics 组中 EGFR 在蛋白水平的表达发生显著下调,见图 2E。

**2.4 miR-133b 抑制食管鳞癌细胞增殖** 采用 MTT 实验检测 miR-133b 对食管鳞癌细胞增殖的影响。实验分组同 2.3 中描述。结果显示,在食管鳞癌细胞 ECA109、KYSE150 中,与 negative control 组相比, 72 h 时 miR-133b mimics 组细胞的增殖能力显著下

降(ECA109:  $t = 4.18$  vs negative control 组,  $P < 0.05$ ; KYSE150:  $t = 11.18$  vs negative control 组,  $P < 0.01$ ),提示 miR-133b 能够抑制食管鳞癌细胞的增殖,对肿瘤的生长起抑制作用,见图 3。

**2.5 miR-133b 抑制食管鳞癌细胞迁移** 采用细胞划痕实验检测 miR-133b 对食管鳞癌细胞迁移能力的影响。实验分组同 2.3 中描述。结果显示,在食管鳞癌细胞 ECA109 中, negative control 组、miR-133b mimics 组细胞划痕闭合率分别为(42.00% ± 4.36%)、(14.00% ± 4.58%),差异有统计学意义( $t = 7.67$  vs negative control 组,  $P < 0.01$ );食管鳞癌细胞 KYSE150 中, negative control 组、miR-133b mimics 组细胞划痕闭合率分别为(52.33% ± 5.86%)、(22.00% ± 4.36%),差异有统计学意义( $t = 7.19$  vs negative control 组,  $P < 0.01$ );上述实验提示,上调 miR-133b 表达可以抑制两种食管鳞癌细胞的迁移,见图 4。

**2.6 miR-133b 抑制食管鳞癌细胞侵袭** 采用 Transwell 实验检测 miR-133b 对食管鳞癌细胞侵袭能力的影响。实验分组同 2.3 中描述。结果显示,在食管鳞癌细胞 ECA109 中, negative control 组、miR-133b mimics 组细胞过膜数分别为(78.67 ± 7.02)、(19.67 ± 3.06),差异有统计学意义( $t = 14.02$  vs negative control 组,  $P < 0.01$ );在食管鳞癌细胞 KYSE150 中, negative control 组、miR-133b mimics 组细胞过膜数分别为(87.33 ± 5.77)、(24.67 ± 7.37),差异有统计学意义( $t = 11.59$  vs negative control 组,  $P < 0.01$ );上述实验提示,上调 miR-133b 表达对两种食管鳞癌细胞的侵袭能力具有抑制作用,见图 5。

**2.7 miR-133b 及 EGFR 在食管鳞癌组织中的表达** 采用 qRT-PCR 实验检测 miR-133b 与 EGFR 在 33 例食管鳞癌组织中的表达,并进行相关性分析。结果显示,miR-133b 在食管鳞癌组织中的表达下调,EGFR 在食管鳞癌组织中的表达上调,二者表达呈负相关性( $P < 0.01$ ),见图 6。将 miR-133b 的表达与食管鳞癌患者的临床病理特征进行相关性分析显示:miR-133b 的表达与肿瘤的 TNM 分期、淋巴结转移相关,即 miR-133b 在 I / II 期食管鳞癌中的阳性表达率显著高于 III 期( $P < 0.05$ )、miR-133b 在淋巴结阴性食管鳞癌中的阳性表达率显著高于淋巴结阳性食管鳞癌( $P < 0.05$ ),见表 3。

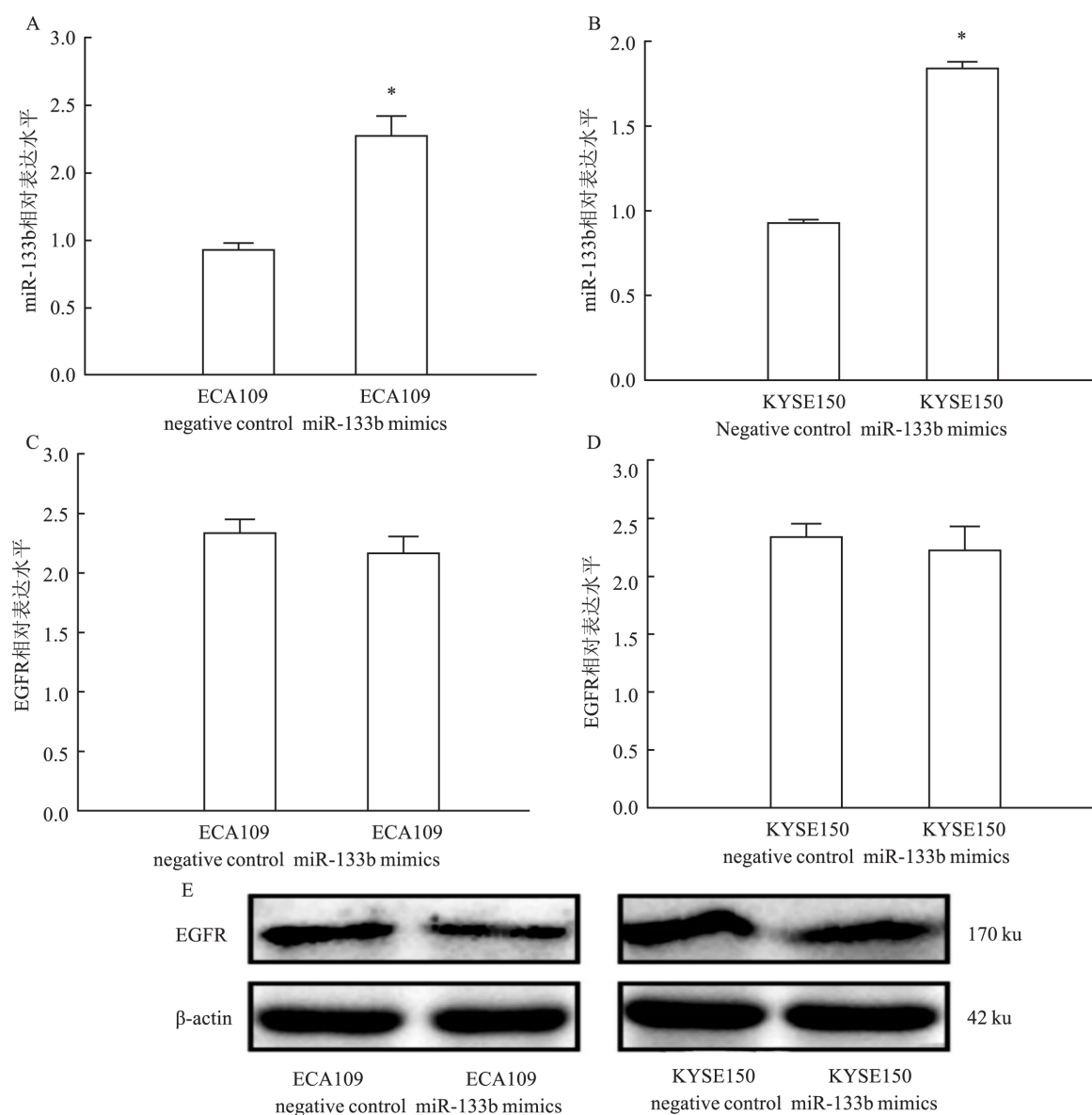


图2 miR-133b对EGFR在转录和蛋白水平表达的影响

A: ECA109 细胞转染 miR-133b mimics 检测 miR-133b 转录水平的表达; B: KYSE150 细胞转染 miR-133b mimics 检测 miR-133b 转录水平的表达; C: ECA109 细胞转染 miR-133b mimics 检测 EGFR 转录水平的表达; D: KYSE150 细胞转染 miR-133b mimics 检测 EGFR 转录水平的表达; E: ECA109、KYSE150 细胞转染 miR-133b mimics 检测 EGFR 蛋白水平的表达; 与 negative control 组比较: \*  $P < 0.05$

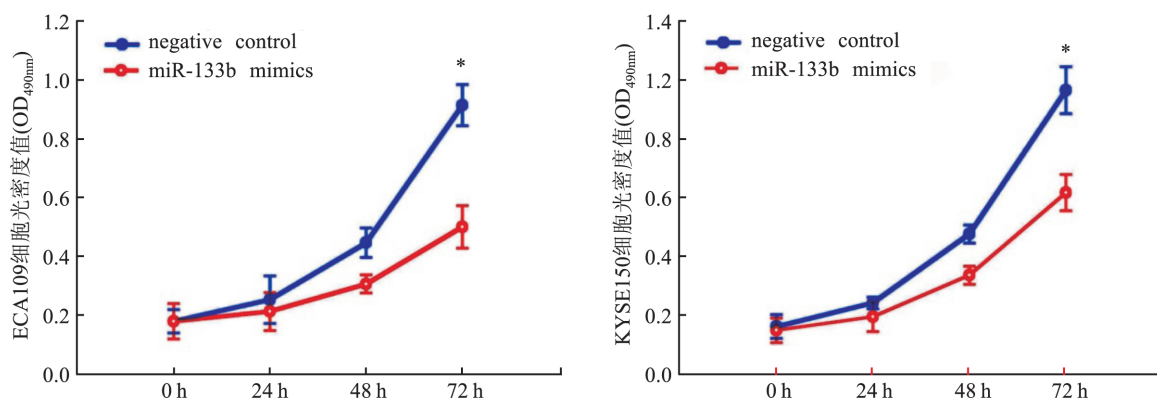


图3 miR-133b对两种食管鳞癌细胞增殖的影响

与 negative control 组比较: \*  $P < 0.05$

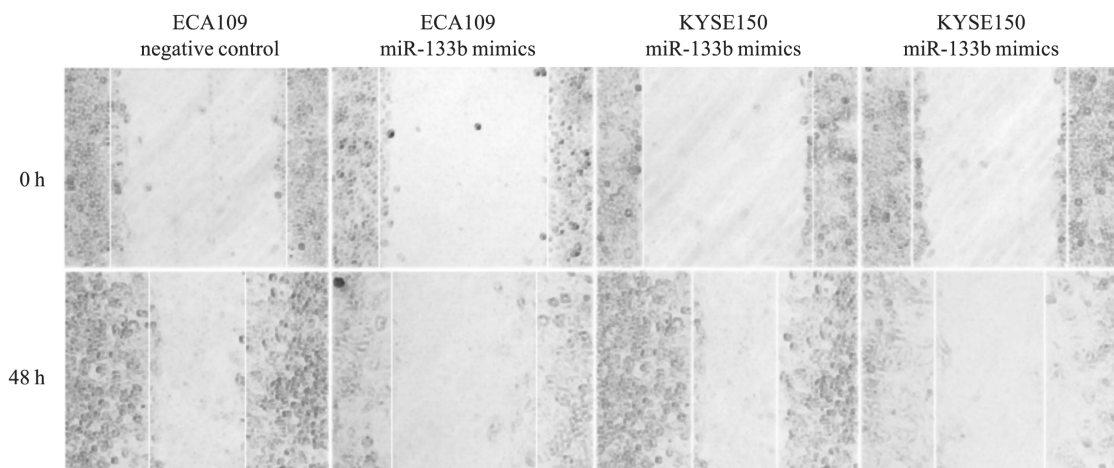


图4 miR-133b对两种食管鳞癌细胞迁移能力的影响 ×200

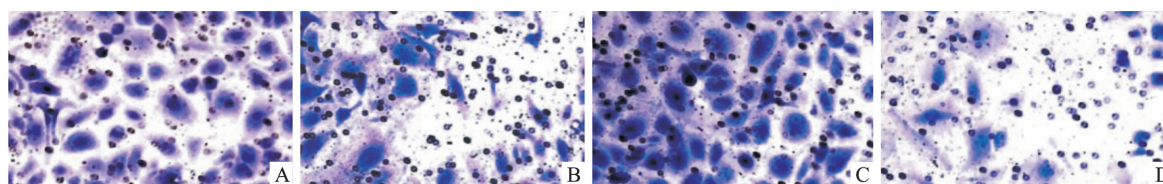


图5 miR-133b对两种食管鳞癌细胞侵袭能力的影响 ×200

A: ECA109 negative control 组; B: ECA109 miR-133b mimics 组; C: KYSE150 negative control 组; D: KYSE150 miR-133b mimics 组; 与 negative control 组比较: \*  $P < 0.05$

表3 miR-133b 表达与食管鳞癌临床病理特征的关系

| 临床病理参数 | 例数 | miR-133b 表达 |    | P 值   |
|--------|----|-------------|----|-------|
|        |    | 高           | 低  |       |
| 年龄(岁)  |    |             |    |       |
| ≥65    | 22 | 10          | 12 | 0.270 |
| <65    | 11 | 7           | 4  |       |
| 性别     |    |             |    |       |
| 男      | 24 | 11          | 13 | 0.438 |
| 女      | 9  | 6           | 3  |       |
| 分化程度   |    |             |    |       |
| 低/中    | 27 | 15          | 12 | 0.398 |
| 高      | 6  | 2           | 4  |       |
| 位置     |    |             |    |       |
| 上段+中段  | 24 | 14          | 10 | 0.259 |
| 下段     | 9  | 3           | 6  |       |
| 淋巴结转移  |    |             |    |       |
| 阴性     | 13 | 11          | 2  | 0.040 |
| 阳性     | 20 | 6           | 14 |       |
| TNM 分期 |    |             |    |       |
| I / II | 15 | 11          | 4  | 0.015 |
| III    | 18 | 5           | 13 |       |

### 3 讨论

食管癌位居全球恶性肿瘤发病率的前列<sup>[5]</sup>。中国是食管癌的高发区。Chen et al<sup>[6]</sup>2016 年的统计分析指出,中国食管癌的发病率为477 900例,接

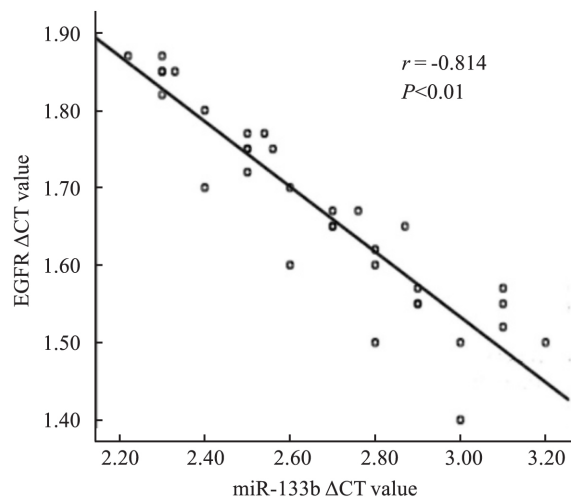


图6 食管鳞癌组织中 miR-133b 与 EGFR 的表达及相关性分析

近全球食管癌发病的 50%。其中食管鳞癌占食管癌发病的 90% 以上,其恶性程度高,预后差,多数食管鳞癌在确诊时即分期较晚,丧失手术机会,并且一些食管鳞癌在早期既有较强的侵袭和转移趋势<sup>[7]</sup>。在过去的几十年中,随着外科技术的提高以及新辅助化疗放疗技术的运用,食管鳞癌患者的预后有了一定程度的改善,但患者的 5 年生存率仍然较低<sup>[8]</sup>。

如果能寻找到与食管鳞癌侵袭、转移相关的分

子生物学标志物,在食管鳞癌患者中发现侵袭、转移的高危人群并进行有针对性的治疗,将有望改善食管鳞癌患者的预后<sup>[9]</sup>。

目前越来越多的证据显示,miRNA 的异常表达在肿瘤的侵袭、转移中发挥着重要的调控作用<sup>[10]</sup>。Fu et al<sup>[4]</sup> 研究发现 miR-433b 在食管鳞癌中呈低表达,且 miR-433b 的差异表达与食管鳞癌的侵袭、转移相关。Kano et al<sup>[11]</sup> 发现在食管鳞癌细胞中上调 miR-433b,可以抑制细胞增殖、阻止肿瘤细胞侵袭,提示 miR-433b 可能作为抑癌基因参与食管鳞癌的发生、发展。Qin et al<sup>[12]</sup> 研究发现,miR-433b 在食管鳞癌组织和细胞中均呈低表达,上调食管鳞癌细胞中 miR-433b 的表达,可对食管鳞癌的上皮间充质转化起负调控作用,提示 miR-433b 在食管鳞癌的转移中发挥着重要的作用。

EGFR 属于 ErbB 受体家族。研究<sup>[13]</sup> 显示,在多种实体瘤中,EGFR 的过表达与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移、凋亡以及血管生成有关,而 EGFR 基因的突变则有助于上皮细胞发生恶性转化。Jia et al<sup>[14]</sup> 研究发现,在食管鳞癌组织中高表达的 EGFR 与肿瘤的淋巴结转移、浸润深度及 TNM 分期呈正相关。COX 回归分析显示,EGFR 可作为食管鳞癌患者的独立预后因素。Wang et al<sup>[15]</sup> 采用免疫组化法对癌前病变、早期食管鳞癌、进展期食管鳞癌组织中 EGFR 的表达进行检测。结果显示,EGFR 的阳性表达率随肿瘤的进展而增高。提示 EGFR 可能参与了食管鳞癌的发生、发展过程。Lin et al<sup>[16]</sup> 研究发现,高表达的 EGFR 与肿瘤较差的分化程度相关,而 EGFR 的扩增则与肿瘤的分期、淋巴结的转移相关,并提示 EGFR 的拷贝数增加可作为食管鳞癌预后判定的指标。

关于 miR-433b 和 EGFR 在肿瘤中的表达调控关系,目前已有一些研究报道。Liu et al<sup>[17]</sup> 研究发现,miR-433b 可通过调控 EGFR 表达,影响其下游通路的活化,从而抑制非小细胞肺癌细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡,提高 EGFR-TKI 药物治疗的敏感性。Tao et al<sup>[18]</sup> 研究发现,在激素治疗不敏感的 PC3 和 DU145 前列腺癌细胞中,miR-433b 可通过调控 EGFR 表达,影响细胞的增殖、侵袭、迁移。但目前对于食管鳞癌中 miR-433b 与 EGFR 之间的靶向调控关系,尚无研究报道。而本研究则对这一调控机制进行了初步的探索和验证。在本研究中,课题组通过生物信息学预测 EGFR 为 miR-433b 的下游靶基因,并采用双荧光素酶报告系统证实 miR-

433b 可直接靶向作用于 EGFR。在食管鳞癌细胞中证实通过转染 miR-433b mimic,上调 miR-433b 的表达,可以下调 EGFR 在蛋白水平的表达,并抑制食管鳞癌细胞的增殖、侵袭、迁移。在食管鳞癌组织中采用 qRT-PCR 实验证实 miR-433b 呈低表达,EGFR 呈高表达,且二者表达呈负相关性。将 miR-433b 的表达与食管鳞癌的临床病理特征进行相关性分析显示,miR-433b 的表达与肿瘤 TNM 分期、淋巴结转移密切相关。基于上述研究结果,课题组推测在正常食管黏膜组织中 miR-433b 可能通过与其靶基因 EGFR 的 3'-UTR 端结合,通过维持 EGFR 在蛋白水平的正常表达,从而使正常食管黏膜组织细胞的增殖与凋亡处于动态平衡。而在食管鳞癌组织中,由于某种或多种原因导致的 miR-433b 的生成及功能异常,致使 miR-433b 的表达下调,miR-433b 对 EGFR 表达的调控作用减弱,使 EGFR 在蛋白水平的表达上调,导致细胞增殖过度,细胞的侵袭及迁移能力增强,从而促进了肿瘤的进展。

但是,目前对于 miR-433b 的上游调控机制,miR-433b 靶向调控 EGFR 参与食管鳞癌的侵袭、转移过程的具体信号通路、以及下调食管鳞癌中 EGFR 的表达对 miR-433b 表达及食管鳞癌侵袭、转移的影响,目前尚不完全清楚,在今后的实验中课题组将针对上述问题进行进一步的探讨。

## 参考文献

- [1] D'Angelo B, Benedetti E, Cimini A, et al. MicroRNAs: a puzzling tool in cancer diagnostics and therapy [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(11): 5571-5.
- [2] Nariman-Saleh-Fam Z, Bastami M, Somi M H, et al. In Silico dissection of miRNA targetome polymorphisms and their role in regulating miRNA-mediated gene expression in esophageal cancer [J]. *Cell Biochem Biophys* 2016 74 (4): 483-97.
- [3] Lakshminpathy U, Hart R P. Concise review: MicroRNA expression in multipotent mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 356-63.
- [4] Fu H L, Wu D P, Wang X F, et al. Altered miRNA expression is associated with differentiation, invasion, and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in patients from Huaian, China [J]. *Cell Biochem Biophys* 2013 67(2): 657-68.
- [5] Di Pardo B J, Bronson N W, Diggs B S, et al. The global burden of esophageal cancer: A disability-adjusted life-year approach [J]. *World J Surg* 2016 40(2): 395-401.
- [6] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin* 2016 66(2): 115-32.
- [7] Hongo M, Nagasaki Y, Shoji T. Epidemiology of esophageal cancer: orient to occident. Effects of chronology, geography and eth-

- nicity[J]. *J Gastroenterol Hepatol* 2009 24(5): 729–35.
- [8] Shapiro J, Biernann K, van Klaveren D, et al. Prognostic value of pretreatment pathological tumor extent in patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery for esophageal or junctional cancer[J]. *Ann Surg* 2017 265(2): 356–62.
- [9] Qi Y J, Chao W X, Chiu J F. An overview of esophageal squamous cell carcinoma proteomics[J]. *J Proteomics* 2012 75(11): 3129–37.
- [10] Zang W, Wang Y, Du Y, et al. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biol* 2014 35(4): 3295–304.
- [11] Kano M, Seki N, Kikkawa N, et al. miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Cancer* 2010 127(12): 2804–14.
- [12] Qin Y, Zhang Y, Tang Q, et al. SQLE induces epithelial-to-mesenchymal transition by regulating of miR-133b in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2017 49(2): 138–48.
- [13] Sakurai H. Non-canonical activation of receptor tyrosine kinases in cancer progression[J]. *Yakugaku Zasshi*, 2017 137(2): 141–4.
- [14] Jia W, Wang W, Ji C S, et al. Coexpression of periostin and EGFR in patients with esophageal squamous cell carcinoma and their prognostic significance[J]. *Onco Targets Ther* 2016 9: 5133–42.
- [15] Wang H, Jiang D, Song Q, et al. Prognostic impact and potential interaction of EGFR and c-Met in the progression of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biol* 2016 37(7): 9771–9.
- [16] Lin G, Sun X J, Han Q B, et al. Epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene amplification are associated with aggressive biological behaviors of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2015 10(2): 901–6.
- [17] Liu L, Shao X, Gao W, et al. MicroRNA-133b inhibits the growth of non-small-cell lung cancer by targeting the epidermal growth factor receptor[J]. *FEBS J* 2012 279(20): 3800–12.
- [18] Tao J, Wu D, Xu B, et al. microRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor receptor[J]. *Oncol Rep* 2012 27(6): 1967–75.

## miR-133b regulates esophageal squamous cell carcinoma invasion and metastasis by targeting EGFR

Zeng Wei<sup>1</sup>, Zhu Jinfeng<sup>2</sup>, Kong Dehua<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>First Dept of Lung Cancer Chemotherapy, <sup>2</sup>Dept of Gastrointestinal Surgery, The Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

**Abstract Objective** To investigate the role and mechanism of miR-133b in cell invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** Bioinformatics tools were used to predict the potential target gene of miR-133b; dual luciferase reporter gene assay was conducted to verify the prediction. Cell proliferation, wound healing and transwell assay were performed to investigate the effects of miR-133b on cell proliferation, migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. qRT-PCR was conducted in a cohort of 33 pairs of ESCC tissues and correspondingly adjacent tissues, then the relationship between the miR-133b and clinical pathological features were analysed. **Results** Bioinformatics tools predicted that EGFR was the potential target gene of miR-133b, dual luciferase reporter gene assay verified that miR-133b could bind to a specific sequence of the 3'-UTR of the mRNA of EGFR. Overexpression of miR-133b in ESCC cell could inhibit proliferation (ECA109:  $P < 0.05$ , KYSE150:  $P < 0.01$ ), migration (ECA109:  $P < 0.01$ , KYSE150:  $P < 0.01$ ) and invasion (ECA109:  $P < 0.01$ , KYSE150:  $P < 0.01$ ) *in vitro*. The results demonstrated that EGFR, the target of miR-133b in ESCC, which up-regulated in ESCC tissues was negatively related to miR-133b ( $P < 0.01$ ), and miR-133b was frequently downregulated in esophageal squamous cell carcinoma tissues and its decrement correlated with TNM stage of ESCC and lymphatic metastasis ( $P$  both  $< 0.05$ ). **Conclusion** MiR-133b may inhibit esophageal carcinoma proliferation, invasion and metastasis by targeting EGFR, it plays a negative role in the progression of ESCC.

**Key words** esophageal squamous cell carcinoma; miR-133b; EGFR; invasion; metastasis