

miR-524-5p调控HEG1表达对食管癌细胞上皮间质转化的影响

王娅菲¹, 耿天祥¹, 陈林林¹, 李治国¹, 李世朋²

Effect of miR-524-5p on Epithelial-mesenchymal Transition in Esophageal Cancer Cells by Regulating HEG1 Expression

WANG Yafei¹, GENG Tianxiang¹, CHEN Linlin¹, LI Zhiguo¹, LI Shipeng²

1. Department of Gastroenterology, Jiaozuo People's Hospital, Jiaozuo 454000, China;

2. Liver Transplant Center, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism and the effect of miR-524-5p regulating HEG1 expression on the proliferation and epithelial-mesenchymal transition of esophageal cancer cells. **Methods** The expression levels of miR-524-5p and HEG1 mRNA in esophageal cancer cells and normal esophageal epithelial cells were detected by qRT-PCR. KYSE30 cells were divided into miR-524-5p mimic group, miR-524-5p NC group, miR-524-5p mimic+pcDNA3.1 group, and miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1 group. Non-transfected cells were set as the normal control group (group Control). CCK-8 method was applied to detect the proliferation ability of KYSE30 cells. Western blot analysis was conducted to detect the expression of proteins related to EMT, invasion, and migration and the HEG1 protein. Scratch and Transwell assays were applied to detect the migration and invasion abilities of KYSE30 cells. A dual-luciferase reporter gene was used to examine the targeting relationship between miR-524-5p and HEG1. **Results** miR-524-5p was lowly expressed in four esophageal cancer cell lines, namely, TE-1, KYSE30, KYSE150, and NEC ($P<0.05$). KYSE30 cells with the lowest expression level were selected for subsequent experiments. HEG1 mRNA was highly expressed in four esophageal cancer cell lines ($P<0.05$). The GEPIA database showed that HEG1 was highly expressed in esophageal cancer tumor tissues ($P<0.05$). KYSE30 cells in the miR-524-5p mimic group had lower proliferation ability, colony formation number, mesenchymal marker protein expression, and migration and invasion abilities and upregulated epithelial marker protein E-cadherin level than cells in the miR-524-5p NC group ($P<0.05$). The miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1 group significantly reversed the inhibitory effect of overexpression of miR-524-5p on the proliferation, epithelial-mesenchymal transformation, invasion, and metastasis of KYSE30 cells ($P<0.05$). The luciferase activity of cells in the miR-524-5p mimic and WT-HEG1 co-transfection groups was lower than that in the miR-524-5p NC and WT-HEG1 co-transfection groups ($P<0.05$). **Conclusion** miR-524-5p is lowly expressed in EC cells and tissues. The overexpression of miR-524-5p can negatively regulate the expression of HEG1 in esophageal cancer cell line (KYSE30 cells) and reduce the proliferation, EMT process, and invasion and migration abilities of KYSE30 cells.

Key words: miR-524-5p; HEG1 protein; Esophageal cancer; Epithelial-mesenchymal transition; Invasion

Funding: Medical Science and Technology Program Scientific Research Project of Henan Province (No. LHGJ20190371)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 探讨miR-524-5p调控HEG1表达对食管癌细胞增殖、上皮间质转化(EMT)的作用机制。**方法** qRT-PCR检测食管癌细胞和正常食管上皮细胞中miR-524-5p和HEG1 mRNA表

达水平。将KYSE30细胞分为miR-524-5p mimic组、miR-524-5p NC组、miR-524-5p mimic+pcDNA3.1组和miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1组,另设置不转染的细胞为正常对照组(Control组)。CCK-8法检测KYSE30细胞增殖能力;Western blot检测EMT相关蛋

收稿日期: 2023-04-23; 修回日期: 2023-08-29

基金项目: 河南省医学科技项目科研课题(LHGJ20190371)

作者单位: 1. 454000 焦作, 焦作市人民医院消化内科; 2. 100050 北京, 北京友谊医院肝移植中心

作者简介: 王娅菲(1986-), 女, 博士在读, 主治医师, 主要从事消化道早期癌症的诊治工作, ORCID: 0009-0001-7900-4922

白、侵袭迁移相关蛋白和HEG1蛋白表达,划痕实验和Transwell实验检测KYSE30细胞迁移和侵袭能力,双荧光素酶报告基因检测miR-524-5p和HEG1靶向关系。结果 miR-524-5p在四种食管癌细胞系TE-1、KYSE30、KYSE150、NEC中均低表达($P<0.05$),选择表达水平最低的KYSE30细胞作为后续实验细胞。HEG1 mRNA在四种食管癌细胞中均高表达($P<0.05$),并且GEPIA数据库显示HEG1在食管癌组织中高表达($P<0.05$)。与miR-524-5p NC组相比,miR-524-5p mimic组KYSE30细胞增殖能力、克隆形成数、间质标志蛋白水平、迁移和侵袭能力显著降低,上皮标志蛋白E-cadherin水平显著上调($P<0.05$);miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1组可以明显逆转过表达miR-524-5p对于KYSE30细胞增殖和上皮间质转化、侵袭转移的抑制作用($P<0.05$)。miR-524-5p mimic组与WT-HEG1共转染组细胞荧光素酶活性显著低于miR-524-5p NC组与WT-HEG1共转染组($P<0.05$)。结论 miR-524-5p在食管癌细胞和组织中低表达,过表达miR-524-5p可以负向调节HEG1在食管癌细胞系KYSE30细胞中的表达,抑制KYSE30细胞的增殖、EMT进程和侵袭迁移能力。

关键词: miR-524-5p; HEG1; 食管癌; 上皮间质转化; 侵袭

中图分类号: R735.1

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

食管癌(esophageal cancer, EC)是临床上常见的迁移、侵袭能力很强的癌症之一^[1],致病因素包括吸烟、饮酒、社会地位低下、生存环境不佳、微量元素缺乏等^[2]。食管癌术后预后较差,化疗是治疗食管癌的主要手段,但长期使用化疗药物会产生耐药性,导致治疗效果不佳。目前,靶向疗法在食管癌的临床治疗中已发挥了重要作用^[3]。研究发现miRNA及其靶基因在食管癌中与免疫浸润、肿瘤微环境、癌症干性特性和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)呈现不同程度的相关性^[4]。研究表明多种miRNA通过调控其靶基因影响食管癌细胞的迁移、侵袭能力,如miR-493过表达靶向Wnt5a/PD-L1^[5]、miR-2053过表达靶向KIF3C^[6]等均可抑制食管癌细胞增殖、迁移和侵袭,起抑癌作用。Starbase数据库预测显示miR-524-5p与具有EGF样结构域的心脏发育蛋白1(heart development protein with EGF-like domains 1, HEG1)有结合位点。已知HEG1在肝癌细胞中表达上调,并且可以促进肝癌细胞侵袭转移和EMT进程^[7-8]。本研究拟探讨miR-524-5p是否通过调节HEG1影响食管癌细胞的增殖、EMT和侵袭转移并对此进行研究。

1 材料与方法

1.1 细胞

人食管癌细胞TE-1购自上海泽叶生物科技有限公司;人食管癌细胞KYSE30、KYSE150购自上海烜雅生物科技有限公司;人食管癌细胞NEC由上海生化细胞所提供;人正常食管上皮细胞HEEC购自上海研域生物科技有限公司。

1.2 试剂与仪器

RPMI 1640培养基购自上海麦克林生化科技有限公司;miR-524-5p过表达(miR-524-5p mimic)或阴性对照(miR-524-5p NC)序列购自上海吉玛制药公司;胎牛血清(FBS)、Lipofectamine™2000转染试剂购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;CCK-8试剂盒购自上海宏叶生物科技有限公司;双荧光素酶试剂盒购自上海通蔚实业有限公司;一抗MMP2、MMP9、E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、Snail和二抗均购自艾博抗(上海)贸易有限公司;HEG1抗体购自美国Invitrogen公司。仪器:CO₂恒温培养箱购自德国艾本德公司;荧光倒置显微镜购自徕卡显微系统上海贸易有限公司;PCR仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将1.1中四种人食管癌细胞和人正常食管上皮细胞用RPMI1640培养基(含有10%FBS,青霉素100 u/ml,链霉素100 μg/ml),在5%CO₂、37℃培养箱中培养,每2天更换一次培养基,传代培养至对数期用于后续实验。调整培养的5种细胞浓度至每升 1×10^7 个,于6孔板每孔接入1 ml上述浓度细胞,培养24 h。

1.3.2 RT-qPCR检测miR-524-5p及HEG1 mRNA表达 收集1.3.1中培养的细胞,加入TRIzol溶液提取总RNA,按照反转录试剂盒进行PCR扩增,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,扩增条件为:95℃ 60 s, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s,共40个循环。miR-524-5p以U6为内参,HEG1以GAPDH为内参。引物设计见表1。

1.3.3 HEG1在食管癌肿瘤组织和正常食管组织中的表达 利用GEPIA数据库查询HEG1在食管癌肿瘤组织和正常食管组织中的表达水平。

1.3.4 细胞转染与分组 KYSE30细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种6孔板中,37℃恒温CO₂培养箱培养过夜后,采用Lipofectamine™2000试剂转染核酸序列,实验分为四组:转染miR-524-5p mimic(miR-524-5p mimic组)、miR-524-5p NC(miR-524-5p NC组)、共转染miR-524-5p NC和pcDNA3.1

表1 PCR引物序列
Table 1 PCR primer sequences

Genes	Primer sequence
miR-524-5p	Forward: 5'-CTACAAAGGGAAGCACTT-3' Reverse: 5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'
U6	Forward: 5'-CTCGCT TCGGCAGCACA-3' Reverse: 5'-AACGCTTCA CGAATTTGCGT-3'
HEG1	Forward: 5'-AAGGAACCGAGTGATTGTGG-3' Reverse: 5'-ACGTGAAGCTGGGCTGTACT-3'
GAPDH	Forward: 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3' Reverse: 5'-AGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'

(miR-524-5p mimic+pcDNA3.1组)和共转染miR-524-5p NC和pcDNA3.1-HEG1(miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1组),另设置未经转染的细胞为正常对照组(Control组)。转染后细胞培养6 h,弃掉培养基,更换为1.3.1中使用的培养基继续培养72 h,收集细胞用于后续实验。

1.3.5 细胞增殖能力检测 使用CCK-8试剂盒检测KYSE30细胞增殖能力,细胞按照1.3.4中的方法转染后,继续培养72 h,分别于24、48和72 h三个时间段加入CCK-8溶液,培养2 h后,用酶标仪在450 nm下读取吸光度值。

1.3.6 KYSE30细胞克隆形成实验 按照1.3.4的方法转染细胞后,培养24 h后收集KYSE30细胞,重新在培养皿中按照 1×10^3 个/皿接种KYSE30细胞,继续培养2周后,弃培养液,PBS冲洗,加入固定液固定15 min,弃去固定液,结晶紫染色,显微镜观察并计数克隆细胞数目。

1.3.7 Western blot检测蛋白表达 将细胞按照1.3.4的方式培养24 h后,收集细胞,裂解后提取总蛋白,测定蛋白浓度。随后进行电泳、转膜及5%脱脂牛奶室温封闭等操作,封闭2 h后加入一抗MMP2、MMP9、E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、Snail、HEG1(1:1 000)培养过夜,PBS清洗后加入二抗(1:2 000)培养2 h,GAPDH(1:1 000)为内参,加入ECL显影,Image J软件分析条带灰度值,计算蛋白表达量。

1.3.8 KYSE30细胞迁移能力检测 细胞划痕实验:将细胞按照1.3.4的方法培养至对数期后,用无菌10 μ l移液枪枪头尖在6孔板底部垂直划线,PBS冲洗后加入无血清的RPMI1640培养基,培养24 h,分别在培养的0和24 h时用显微镜观察并拍照,计算划痕愈合率。

1.3.9 KYSE30细胞侵袭能力检测 Transwell实验:将基质胶用不含血清的RPMI 1640培养基稀释8倍后,每个小室加入50 μ l,置于CO₂恒温培养箱(37℃)培养30 min,将按照1.3.4的方法转染细

胞,消化重悬后,在小室的上室中接入200 μ l浓度为 1×10^5 /ml的细胞悬液,下室为600 μ l含血清的RPMI1640培养基,培养24 h后,加入固定液固定,结晶紫染色,擦去上室细胞,倒置显微镜拍照并计数。

1.3.10 双荧光素酶报告基因检测 利用Starbase数据库(<https://starbase.sysu.edu.cn/>)预测miR-524-5p与HEG1的结合位点,构建野生型(WT)和突变型(MUT)HEG1质粒,利用LipofectamineTM2000试剂将miR-524-5p mimic或NC和HEG1野生或突变质粒共转染KYSE30细胞,并且转染海肾质粒为内参,转染48 h后用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光素酶活性。

1.4 统计学方法

采用SPSS26.0和GraphPad Prism 9软件进行数据分析。所有数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$),多组比较采用单因素方差分析,两两组间比较采用SNK-q检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-524-5p和HEG1在人食管癌细胞和正常食管上皮细胞中的表达

miR-524-5p在食管癌细胞TE-1、KYSE30、KYSE150、NEC中的表达均显著降低,HEG1 mRNA相对表达量在各细胞系中均显著上调(均 $P=0.000$),见表2。说明在食管癌细胞中miR-524-5p为低表达,HEG1高表达。本实验选择miR-524-5p表达量最低的KYSE30细胞作为后续实验细胞。

表2 miR-524-5p和HEG1在几种食管细胞系中的相对表达量
Table 2 Relative expression of miR-524-5p and HEG1 in several esophageal cell lines

Cell line	Relative expression of miR-524-5p	Relative expression of HEG1 mRNA
HEEC	1.00 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.04
TE-1	0.55 $\pm$ 0.03*	1.85 $\pm$ 0.12*
KYSE30	0.43 $\pm$ 0.05*	1.92 $\pm$ 0.09*
KYSE150	0.68 $\pm$ 0.06*	2.01 $\pm$ 0.15*
NEC	0.62 $\pm$ 0.04*	1.88 $\pm$ 0.16*

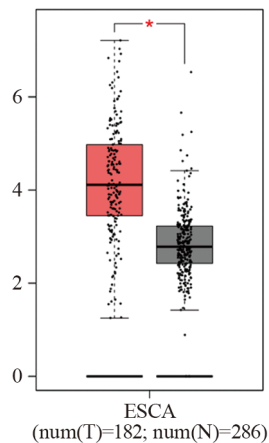
Note: *: $P<0.001$, compared with HEEC cell line.

2.2 HEG1在食管癌组织和正常食管组织中的表达

在GEPIA数据库中,HEG1在食管癌组织中表达显著高于正常食管组织($P<0.05$),见图1。

2.3 KYSE30细胞增殖能力

在24、48、72h时,miR-524-5p NC组和Control组的KYSE30细胞增殖能力比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),在24 h时,与miR-524-5p NC组比较,miR-524-5p mimic组KYSE30



ESCA: esophageal carcinoma.
图1 HEG1在食管癌组织和正常食管组织中的表达
Figure 1 Expression of HEG1 in esophageal cancer tissues and normal esophageal tissues

细胞增殖能力差异无统计学意义 ($P>0.05$)，与mimic+pcDNA3.1组比较，miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1组KYSE30细胞增殖能力明显增强 ($P=0.000$)；在48 h和72 h时，与miR-524-5p NC组比较，miR-524-5p mimic组KYSE30细胞增殖能力明显降低 (均 $P=0.000$)，与miR-524-5p mimic+pcDNA3.1组比较，miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1组KYSE30细胞增殖能力明显增强 (均 $P=0.000$)，见表3。

2.4 KYSE30细胞克隆形成率

miR-524-5p NC组 (385.13 ± 17.12) 和Control组细胞克隆形成数 (387.88 ± 16.04) 比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与miR-524-5p NC组比较，miR-524-5p mimic组的KYSE30细胞克隆形成数 (143.22 ± 10.85) 明显降低 ($P=0.000$)，与miR-524-5p mimic+pcDNA3.1组 (152.25 ± 11.34) 比较，miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1组KYSE30细胞克隆形成数 (293.10 ± 13.74) 明显上升 ($P=0.000$)，见图2。

2.5 KYSE30细胞中EMT、HEG1和miR-524-5p的表达

表3 miR-524-5p对KYSE30细胞增殖能力的影响
Table 3 Effect of miR-524-5p on the proliferative capacity of KYSE30 cells

Groups	OD ₄₅₀		
	24 h	48 h	72 h
Control group	0.45±0.04	0.89±0.05	1.25±0.08
miR-524-5p NC group	0.44±0.05	0.83±0.04	1.21±0.06
miR-524-5p mimic group	0.42±0.06	0.52±0.03*	0.72±0.03*
miR-524-5p mimic+pcDNA3.1 group	0.40±0.05	0.51±0.04	0.73±0.05
miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1 group	0.56±0.07#	0.69±0.06#	0.98±0.08#

Notes: *: $P<0.001$, compared with miR-524-5p NC group; #: $P<0.001$, compared with miR-524-5p mimic+pcDNA3.1 group.

miR-524-5p NC组和Control组上皮标志蛋白E-cadherin、间质标志蛋白Vimentin、N-cadherin、Snail以及HEG1蛋白、miR-524-5p表达量比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与miR-524-5p NC组比较，miR-524-5p mimic组上皮标志蛋白E-cadherin、miR-524-5p表达明显上调，间质标志蛋白Vimentin、N-cadherin、Snail及HEG1蛋白表达明显下调 (均 $P=0.000$)，与miR-524-5p mimic+pcDNA3.1组比较，miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1组上皮标志蛋白E-cadherin、miR-524-5p表达明显下调，间质标志蛋白Vimentin、N-cadherin、Snail及HEG1蛋白表达明显上调 (均 $P=0.000$)，见图3、表4。

2.6 KYSE30细胞迁移能力

miR-524-5p NC组细胞划痕愈合率 (42.59 ± 2.33 %) 和Control组 (43.28 ± 3.51 %) 比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与miR-524-5p NC组比较，miR-524-5p mimic组KYSE30细胞划痕愈合率 (21.68 ± 1.65 %) 明显降低 ($P=0.000$)；与miR-524-5p mimic+pcDNA3.1组 (22.15 ± 1.44 %) 比较，miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1组KYSE30细胞划痕愈合率 (34.25 ± 1.65 %) 明显升高 ($P=0.000$)，见图4。

2.7 KYSE30细胞侵袭能力

miR-524-5p NC组 (212.48 ± 9.12) 和Control

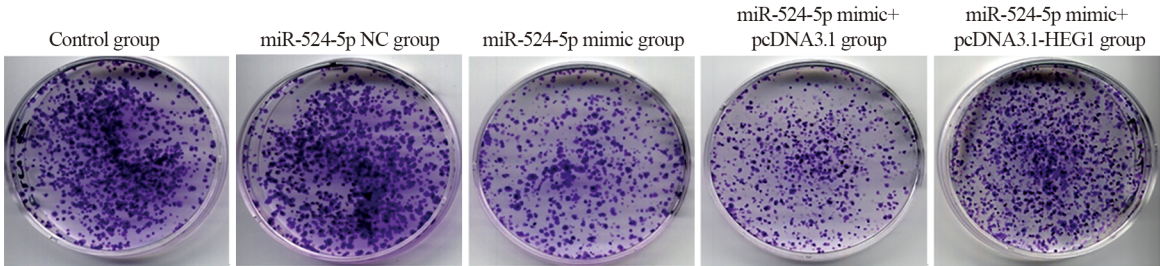
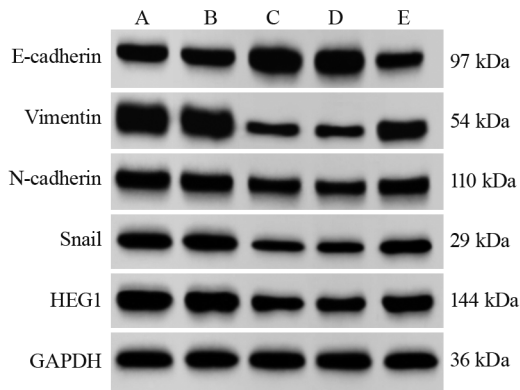


图2 各转染组KYSE30细胞平板克隆形成情况
Figure 2 Plate clone formation of KYSE30 cells in each transfection group



A: Control group; B: miR-524-5p NC group; C: miR-524-5p mimic group; D: miR-524-5p mimic+pcDNA3.1 group; E: miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1 group.

图3 不同转染组中EMT相关蛋白和HEG1蛋白表达量
Figure 3 EMT-related protein and HEG1 protein expression in different transfection groups

组细胞侵袭数目 (208.26 ± 7.48) 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与miR-524-5p NC组比较, miR-524-5p mimic组KYSE30细胞侵袭数目 (89.35 ± 6.95) 明显降低 ($P = 0.000$), 与miR-524-5p mimic+pcDNA3.1组 (91.02 ± 7.05) 比较, miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1组KYSE30细胞侵袭数目 (149.75 ± 8.47) 明显升高 ($P = 0.000$), 见图5。

2.8 侵袭迁移相关蛋白MMP2、MMP9表达

miR-524-5p NC组和Control组细胞MMP2、MMP9蛋白表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与miR-524-5p NC组比较, miR-

524-5p mimic组KYSE30细胞侵袭迁移相关蛋白MMP2、MMP9表达明显降低 (均 $P = 0.000$), 与miR-524-5p mimic+pcDNA3.1组比较, miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1组KYSE30细胞侵袭迁移相关蛋白MMP2、MMP9表达明显升高 (均 $P = 0.000$), 见图6、表5。

2.9 双荧光素酶报告基因检测结果

miR-524-5p可以靶向结合HEG1的3'UTR区域, 见图7。双荧光素酶报告基因实验结果, miR-524-5p mimic组与WT-HEG1共转染组细胞荧光素酶活性显著低于miR-524-5p NC组与WT-HEG1共转染组 ($P = 0.000$), miR-524-5p mimic组与MUT-HEG1共转染组的细胞荧光素酶活性与miR-524-5p NC组与MUT-HEG1共转染组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Control组、miR-524-5p NC组之间与WT-HEG1共转染和与MUT-HEG1共转染差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表6。说明miR-524-5p可与HEG1的3'UTR区结合。

3 讨论

食管癌是致命性的恶性肿瘤之一, 已发现多种miRNA可以通过靶向不同靶标来调节食管癌进展, 如miR-33a-5p靶向DKK1抑制食管癌进展^[9]; miR-375通过阻断ERBB₂/VEGFA通路抑制食管癌发展^[10]等。miR-524-5p已被发现对多种肿瘤细胞的耐药性、迁移侵袭、EMT进展有抑制作用^[11-13]。但

表4 不同转染组中EMT相关蛋白和HEG1蛋白表达量

Table 4 EMT-related protein and HEG1 protein expression in different transfection groups

Groups	E-cadherin	Vimentin	N-cadherin	Snail	HEG1	miR-524-5p
Control group	1.54±0.09	2.78±0.15	1.24±0.11	1.05±0.10	1.52±0.12	1.00±0.02
miR-524-5p NC group	1.61±0.11	2.45±0.16	1.28±0.12	1.01±0.11	1.60±0.13	0.98±0.05
miR-524-5p mimic group	2.98±0.13*	0.59±0.08*	0.81±0.09*	0.58±0.03*	0.78±0.09*	1.89±0.09*
miR-524-5p mimic+pcDNA3.1 group	2.86±0.14	0.60±0.07	0.83±0.08	0.55±0.04	0.80±0.10	1.84±0.11
miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1 group	1.45±0.13 [#]	1.72±0.14 [#]	1.16±0.12 [#]	0.89±0.08 [#]	1.35±0.12 [#]	1.22±0.10 [#]

Notes: *: $P < 0.001$, compared with miR-524-5p NC group; #: $P < 0.001$, compared with miR-524-5p mimic+pcDNA3.1 group.

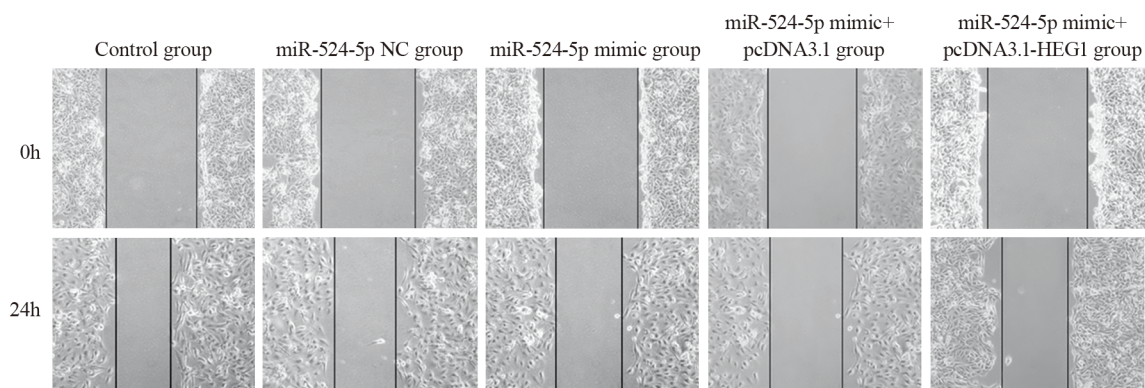


图4 划痕实验检测各组KYSE30细胞迁移能力

Figure 4 Scratch assay of the migration ability of KYSE30 cells in each group

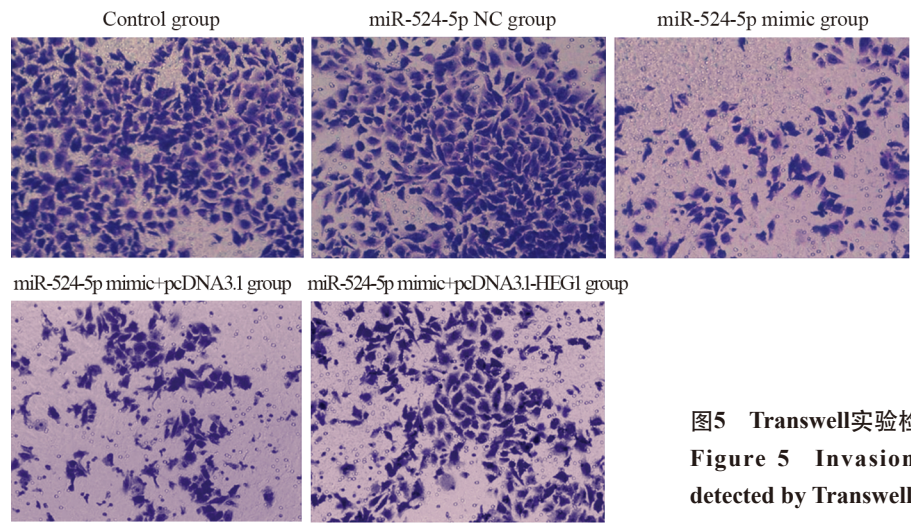
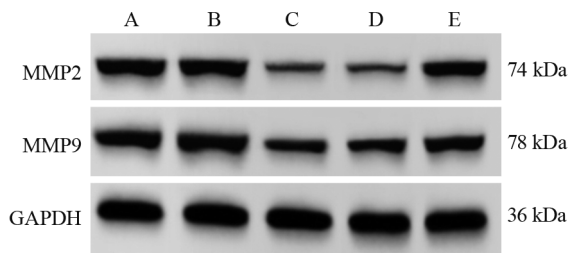


图5 Transwell实验检测KYSE30细胞侵袭能力
Figure 5 Invasion ability of KYSE30 cells detected by Transwell assay



A: Control group; B: miR-524-5p NC group; C: miR-524-5p mimic group; D: miR-524-5p mimic+pcDNA3.1 group; E: miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1 group
图6 侵袭迁移相关蛋白表达量
Figure 6 Expression of invasive- and migration-related proteins

表5 各组KYSE30细胞中侵袭迁移相关蛋白表达量比较
Table 5 Comparison of expression levels of invasion- and migration-related proteins in KYSE30 cells among all groups

Groups	MMP2	MMP9
Control group	0.85±0.09	0.81±0.08
miR-524-5p NC group	0.88±0.07	0.79±0.06
miR-524-5p mimic group	0.17±0.03*	0.36±0.05*
miR-524-5p mimic+pcDNA3.1 group	0.17±0.04	0.35±0.05
miR-524-5p mimic+pcDNA3.1-HEG1 group	0.52±0.06#	0.60±0.07#

Notes: *: $P<0.001$, compared with miR-524-5p NC group; #: $P<0.001$, compared with miR-524-5p mimic+pcDNA3.1 group.

尚未见miR-524-5p对食管癌细胞调节作用的相关性研究报道。本研究中首先通过miR-524-5p在食管癌四种不同细胞系和正常食管上皮细胞中的表达,确定了其在食管癌细胞中呈低表达。随后设置miR-524-5p过表达组探讨miR-524-5p对食管癌细胞增殖、迁移侵袭和EMT进程的影响。结果显示通过过表达miR-524-5p可以显著降低食管癌细胞的增殖能力和克隆形成,与以往研究的上调miR-524-5p可抑制胃癌细胞增殖具有一致性^[14],证明了过表达miR-524-5p可抑制食管癌细胞的增殖。



图7 miR-524-5p与HEG1 3'UTR结合位点
Figure 7 Binding site of miR-524-5p to HEG1 3 UTR

表6 miR-524-5p靶基因验证

Table 6 Validation of miR-524-5p target gene

Groups	Relative activity of luciferase	
	WT-HEG1	MUT-HEG1
Control group	1.00±0.09	0.99±0.11
miR-524-5p NC group	0.98±0.11	1.00±0.08
miR-524-5p mimic group	0.45±0.05*	1.05±0.07

Note: *: $P<0.001$, compared with miR-524-5p NC group.

完整的EMT癌细胞状态主要集中在复发癌组织中^[15]。EMT是癌细胞侵袭和转移的根源,其发生过程主要表现为上皮标志蛋白E-cadherin下调,间质标志蛋白N-cadherin、Vimentin、Snail等上调^[16-17]。EMT与恶性肿瘤的迁移、侵袭、化学耐药性相关^[18]。因此,抑制癌细胞的EMT进程对于预防恶性肿瘤复发具有重大意义。miRNA可抑制恶性肿瘤的EMT进程,如miR-451抑制胶质瘤细胞的EMT和转移^[19]; miRNA-10a-5p抑制肝癌细胞的转移^[20]。本研究结果显示,过表达miR-524-5p明显提升了KYSE30细胞的上皮标志蛋白E-cadherin表达水平,下调了间质标志蛋白N-cadherin、Vimentin、Snail的表达水平,表明过表达miR-524-5p抑制了KYSE30细胞EMT进程。癌细胞转移扩散是癌症患者死亡的主要原因,miR-524-5p过表达已被证明可以抑制乳腺癌细胞的侵袭和迁移^[13]。MMP2、MMP9是与癌细胞侵袭和迁移密切相关的蛋白,抑制其表达可有效抑制癌细胞的转移扩散进程^[21]。本研究划痕实验和Transwell实验结果均显示过表达miR-524-5p后,

KYSE30细胞侵袭迁移能力减弱,且MMP2、MMP9蛋白表达下调,说明miR-524-5p过表达可抑制KYSE30细胞的侵袭迁移。

HEG1是一种新型黏蛋白样膜蛋白,与血管生成、胚胎发育及细胞-细胞连接密切相关,在促进肿瘤进展中发挥着重要作用。已有报道显示,HEG1在恶性间皮瘤^[22]、肝细胞癌^[7]、肺腺癌^[23]中高表达,可作为肿瘤的诊断和治疗靶点。本研究通过GEPIA数据库对HEG1在EC中的表达进行分析发现HEG1在食管癌肿瘤组织中表达水平显著高于正常组织;进一步分析显示,HEG1在四种不同食管癌细胞系中的表达均高于正常食管上皮细胞,提示HEG1可能在食管癌中充当促癌基因。使用Stabase数据库对miR-524-5p的潜在靶基因进行预测,发现HEG1与miR-524-5p存在互补的结合位点,可能为miR-524-5p的下游靶基因。双荧光素酶报告基因检测证实,miR-524-5p可与HEG1的3'UTR区结合;qRT-PCR和Western blot结果显示,过表达miR-524-5p可下调HEG1表达,表明miR-524-5p可负向调控HEG1表达。因此本研究推测,HEG1可能为miR-524-5p调节KYSE30细胞恶性生物学行为的重要靶蛋白。为了验证此推测,本研究在过表达miR-524-5p的基础上采用质粒转染上调HEG1表达,结果显示上调HEG1表达可明显减弱过表达miR-524-5p对KYSE30细胞恶性生物学行为的抑制作用,提示过表达miR-524-5p可能通过下调HEG1抑制KYSE30细胞的增殖、EMT进程和侵袭迁移。

综上所述,miR-524-5p在食管癌细胞和组织中低表达,过表达miR-524-5p可以负向调节HEG1在食管癌细胞系KYSE30细胞中的表达,减轻KYSE30细胞的增殖、EMT进程和侵袭迁移能力。然而本研究仅开展了细胞实验,随后将在动物实验中进行验证,以期明确miR-524-5p在食管癌进展中的作用。

利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Watanabe M, Otake R, Kozuki R, *et al.* Recent progress in multidisciplinary treatment for patients with esophageal cancer[J]. Surg Today, 2020, 50(1): 12-20.
- [2] Uhlenhopp DJ, Then EO, Sunkara T, *et al.* Epidemiology of esophageal cancer: update in global trends, etiology and risk factors[J]. Clin J Gastroenterol, 2020, 13(6): 1010-1021.
- [3] Yang YM, Hong P, Xu WW, *et al.* Advances in targeted therapy for esophageal cancer[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 229.
- [4] Zhao Y, Xu L, Wang X, *et al.* A novel prognostic mRNA/miRNA signature for esophageal cancer and its immune landscape in cancer progression[J]. Mol Oncol, 2021, 15(4): 1088-1109.
- [5] Bian W, Li Y, Zhu H, *et al.* miR-493 by regulating of c-Jun targets

- Wnt5a/PD-L1-inducing esophageal cancer cell development[J]. Thorac Cancer, 2021, 12(10): 1579-1588.
- [6] Yao W, Jia X, Xu L, *et al.* MicroRNA-2053 involves in the progression of esophageal cancer by targeting KIF3C[J]. Cell Cycle, 2021, 20(12): 1163-1172.
- [7] Zhao YR, Wang JL, Xu C, *et al.* HEG1 indicates poor prognosis and promotes hepatocellular carcinoma invasion, metastasis, and EMT by activating Wnt/ β -catenin signaling[J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(14): 1645-1662.
- [8] Dewdney B, Hebbard L. A novel function for HEG1 in promoting metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(19): 2019-2022.
- [9] Song Q, Liu H, Li C, *et al.* miR-33a-5p inhibits the progression of esophageal cancer through the DKK1-mediated Wnt/ β -catenin pathway[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(16): 20481-20494.
- [10] Ren S, Tan X, Fu MZ, *et al.* Downregulation of miR-375 contributes to ERBB2-mediated VEGFA overexpression in esophageal cancer[J]. J Cancer, 2021, 12(23): 7138-7146.
- [11] Nguyen MT, Lin CH, Liu SM, *et al.* miR-524-5p reduces the progression of the BRAF inhibitor-resistant melanoma[J]. Neoplasia, 2020, 22(12): 789-799.
- [12] Li X, Li Z, Zhu Y, *et al.* miR-524-5p inhibits angiogenesis through targeting WNK1 in colon cancer cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020, 318(4): G827-G839.
- [13] Jin T, Zhang Y, Zhang T. miR-524-5p Suppresses Migration, Invasion, and EMT Progression in Breast Cancer Cells Through Targeting FSTL1[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2020, 35(10): 789-801.
- [14] Zhu CY, Meng FQ, Liu J. MicroRNA-524-5p suppresses cell proliferation and promotes cell apoptosis in gastric cancer by regulating CASP3[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(18): 7968-7977.
- [15] Lüönd F, Sugiyama N, Bill R, *et al.* Distinct contributions of partial and full EMT to breast cancer malignancy[J]. Dev Cell, 2021, 56(23): 3203-3221. e11.
- [16] Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, *et al.* The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(11): 5931-5937.
- [17] Chen P, Li X, Zhang R, *et al.* Combinative treatment of β -elemene and cetuximab is sensitive to KRAS mutant colorectal cancer cells by inducing ferroptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transformation[J]. Theranostics, 2020, 10(11): 5107-5119.
- [18] Pan G, Liu Y, Shang L, *et al.* EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(3): 199-217.
- [19] Nan Y, Guo L, Lu Y, *et al.* miR-451 suppresses EMT and metastasis in glioma cells[J]. Cell Cycle, 2021, 20(13): 1270-1278.
- [20] Shen D, Zhao HY, Gu AD, *et al.* miRNA-10a-5p inhibits cell metastasis in hepatocellular carcinoma via targeting SKA1[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2021, 37(9): 784-794.
- [21] Wang J, Cai H, Liu Q, *et al.* Cinobufacini Inhibits Colon Cancer Invasion and Metastasis via Suppressing Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway and EMT[J]. Am J Chin Med, 2020, 48(3): 703-718.
- [22] Naso JR, Tsuji S, Churg A. HEG1 is a highly specific and sensitive marker of epithelioid malignant mesothelioma[J]. Am J Surg Pathol, 2020, 44(8): 1143-1148.
- [23] Zou X, Zhang Y, Wang N, *et al.* HEG1 as a novel potential biomarker for the prognosis of lung adenocarcinoma[J]. Cancer Med, 2023, 12(3): 3288-3298.

[编辑: 刘红武; 校对: 邱颖慧]

作者贡献:

王娅菲: 实验操作、数据整理及文章撰写
耿天祥、陈林林: 实验操作、数据整理及分析
李治国: 数据分析
李世朋: 实验设计及文稿审核