

吴凯,任强. MiR-338-3p 通过靶向 WNK1 影响食管癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 85-92.

Wu K, Ren Q. Mechanism of miR-338-3p affecting esophageal cancer cell proliferation, migration, invasion and apoptosis by targeting WNK1 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 85-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.013

MiR-338-3p 通过靶向 WNK1 影响食管癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的机制研究

吴 凯,任 强

(淮北矿工总医院心胸外科,安徽 淮北 235000)

【摘要】 目的 探讨 miR-338-3p 影响食管癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的分子机制及其对 WNK1 的靶向调控作用。**方法** 体外培养人正常食管上皮细胞株 Het-1A 与人食管癌细胞 Eca-109、EC-1、EC9706,采用 qRT-PCR 与 Western blot 分别检测 miR-338-3p、WNK1 的表达水平;以 EC9706 细胞为研究对象,分别将 miR-con、miR-338-3p mimics、si-con、si-WNK1、miR-338-3p mimics 与 pcDNA、miR-338-3p mimics 与 pcDNA-WNK1 转染至 EC9706 细胞;MTT 法检测细胞增殖、流式细胞术检测细胞凋亡、Transwell 小室实验检测迁移及侵袭能力;双荧光素酶报告实验检测 miR-338-3p 与 WNK1 的靶向关系。**结果** 与 Het-1A 比较,食管癌细胞 Eca-109、EC-1、EC9706 中 miR-338-3p 的表达显著下调 ($P<0.05$),WNK1 mRNA 及蛋白表达显著上调 ($P<0.05$);转染 miR-338-3p mimics 或 si-WNK1 可明显降低 EC9706 细胞的活力、迁移及侵袭细胞数 ($P<0.05$),增加 EC9706 细胞的凋亡率 ($P<0.05$);双荧光素酶报告实验证实 miR-338-3p 靶向结合 WNK1;共转染 miR-338-3p mimics 与 pcDNA-WNK1 可明显逆转转染 miR-338-3p mimics 对细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的作用。**结论** miR-338-3p 可靶向下调食管癌中的 WNK1,进而抑制食管癌细胞的增殖、迁移及侵袭,和诱导细胞凋亡。

【关键词】 miR-338-3p;WNK1;食管癌;增殖;迁移;侵袭;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0085-08

Mechanism of miR-338-3p affecting esophageal cancer cell proliferation, migration, invasion and apoptosis by targeting WNK1

WU Kai, REN Qiang

(Department of Cardiothoracic Surgery, Huaibei Miners General Hospital, Huaibei 235000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the molecular mechanism of miR-338-3p in the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of esophageal cancer cells and its targeted regulation of WNK1. **Methods** Human normal esophageal epithelial cell line Het-1A and human esophageal cancer cell lines Eca-109, EC-1, and EC9706 were cultured *in vitro*. The expression levels of miR-338-3p and WNK1 were measured by qRT-PCR and Western blot, respectively. In EC9706 cells, miR-con, miR-338-3p mimics, si-con, si-WNK1, miR-338-3p mimics and pcDNA, and miR-338-3p mimics and pcDNA-WNK1 were transfected into EC9706 cells. MTT assays were used to detect cell proliferation, flow cytometry was used to detect apoptosis, and Transwell assays were used to detect migration and invasion abilities. A dual luciferase reporter assay was used to assess the relationship between miR-338-3p and WNK1. **Results** Compared with Het-1A, the expression levels of miR-338-3p in esophageal cancer cell lines Eca-109, EC-1, and EC9706 were reduced

significantly ($P < 0.05$) and the expression levels of WNK1 mRNA and protein were increased significantly ($P < 0.05$). Transfection of miR-338-3p mimics or si-WNK1 significantly reduced the viability, migration, and invasion of EC9706 cells ($P < 0.05$), and increased the apoptosis rate of EC9706 cells ($P < 0.05$). The dual luciferase reporter assay confirmed that miR-338-3 targeted WNK1. Cotransfection of miR-338-3p mimics and pcDNA-WNK1 obviously reversed the effects of miR-338-3p mimics on cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis. **Conclusions** MiR-338-3p downregulates WNK1 in esophageal cancer, thereby inhibiting the proliferation, migration, and invasion of esophageal cancer cells and inducing apoptosis.

【Keywords】 miR-338-3p; WNK1; esophageal cancer; proliferation; migration; invasion; apoptosis

食管癌是临床常见的恶性肿瘤,近年来,食管癌发病率逐年上升,基因异常表达、致癌信号通路的激活等均可促进食管癌的发生^[1]。miRNA 属于非编码单链小 RNA 分子,其可通过与靶基因结合从而调控靶基因表达,miRNA 异常表达可影响多种肿瘤发生及发展^[2]。既往研究显示 miRNA 表达上调或下调均可能参与食管癌发生及发展过程,并可通过调控靶基因表达从而影响食管癌细胞增殖、凋亡等生物学行为^[3-5]。miR-338-3p 在胃癌组织中表达下调^[6]。生物信息学分析显示 WNK1 可能是 miR-338-3p 的靶基因,研究表明 WNK1 表达量升高并可能促进肾癌发生及发展^[7]。但 miR-338-3p 是否可通过靶向 WNK1 影响食管癌发生发展过程尚未可知。因此,本研究通过检测食管癌细胞系中 miR-338-3p、WNK1 的表达,探讨 miR-338-3p 对食管癌细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响及二者的靶向关系。

1 材料和方法

1.1 细胞

人正常食管上皮细胞株 Het-1A、人食管癌细胞 Eca-109、EC-1、EC9706 购自美国 ATCC 公司。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM、胎牛血清、青霉素、链霉素、Opti-MEM 减血清培养基购自美国 Gibco 公司;miR-338-3p mimics、miR-con、si-WNK1、si-con、anti-miR-338-3p、anti-miR-con 购自上海吉玛制药技术有限公司;qRT-PCR 试剂盒(20181203)购自北京天根生化科技有限公司;MTT(20181116)购自上海泽叶生物科技有限公司;细胞凋亡试剂盒(APOAF MSDS)购自美国 Sigma 公司;双荧光素酶活性检测试剂盒购自北京索莱宝;兔抗人 WNK1 抗体购自武汉友联特生物技术有限公司;兔抗人 PCNA、MMP-2、MMP-9、Cleaved caspase-3 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公

司;FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞转染及实验分组

取对数生长期 EC9706 细胞,待细胞生长至 70% 融合度时将培养基更换为 Opti-MEM 减血清培养基,参照 Lipofectamine2000 转染试剂分别将 miR-con、miR-338-3p mimics、si-con、si-WNK1、miR-338-3p mimics 与 pcDNA、miR-338-3p mimics 与 pcDNA-WNK1 转染至 EC9706 细胞,分别记作 miR-con 组、miR-338-3p 组、si-con 组、si-WNK1 组、miR-338-3p + pcDNA 组、miR-338-3p + pcDNA-WNK1 组。同时将未经转染的 EC9706 细胞作为 NC 组。

1.3.2 qRT-PCR 检测细胞中 miR-338-3p、WNK1 mRNA 的表达水平

收集 Het-1A、Eca-109、EC-1、EC9706 细胞及各组转染后的 EC9706 细胞,采用 TRIzol 法提取细胞中的总 RNA。检测 RNA 浓度与纯度。反转录合成 cDNA。qRT-PCR 反应条件:95℃ 120 s,94℃ 45 s,60℃ 30 s,70℃ 45 s,共 40 次循环。计算 miR-338-3p、WNK1 mRNA 的相对表达量。miR-338-3p 正向引物 5'-ATCCAGTGCCTGTCGTGG-3',反向引物 5'-TGCTTCCAGCATCAGTGAT-3';WNK1 正向引物 5'-CAGAGTGAGCAGCCAACAGA-3',反向引物 5'-CCACGGACTGAGGCATACTT-3';β-actin 正向引物 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',反向引物 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3';U6 正向引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.3.3 MTT 检测细胞增殖

EC9706 细胞每毫升 2.5×10^4 个接种于 96 孔板,每孔 100 μL,加 MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,应用酶标仪检测各孔吸光度值(OD)。

1.3.4 流式细胞术评估 EC9706 细胞凋亡率

EC9706 细胞在 500 μL 结合缓冲液中重悬,参

照试剂盒说明书操作,应用流式细胞仪、FlowJo 软件分析各组 EC9706 细胞的凋亡率。

1.3.5 Transwell 实验测定 EC9706 细胞迁移及侵袭

EC9706 细胞迁移测定:将各组转染后的 EC9706 细胞(每毫升 2×10^5 个),Transwell 小室上室与下室分别加入细胞悬浮液(200 μ L)与 DMEM 培养基(600 μ L),继续培养 24 h,多聚甲醛固定后进行结晶紫溶液染色,观察迁移细胞数。EC9706 细胞侵袭实验:Transwell 小室上室使用稀释的 Matrigel 基质胶(100 μ L),包被 5 h。后续按照 EC9706 细胞迁移测定的步骤检测侵袭细胞数。

1.3.6 双荧光素酶报告基因检测 miR-338-3p 的靶基因

TargetScan 预测 miR-338-3p 与 WNK1-3' UTR 存在结合位点,构建野生型载体 WT-WNK1、突变型载体 MUT-WNK1(美国 Promega 公司),于 EC9706 细胞中分别共同转染 WT-WNK1、MUT-WNK1 与 miR-con、miR-338-3p mimics,收集 48 h 后的 EC9706 细胞进行荧光素酶活性测定。

1.3.7 Western blot 检测 EC9706 细胞中 WNK1 蛋白、PCNA 蛋白、Cleaved caspase-3 蛋白、MMP-2 蛋白及 MMP-9 蛋白表达

提取细胞总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,SDS-PAGE 分离蛋白,转膜,封闭 2 h,依次分别加入一抗稀释液与二抗稀释液,通过 Image J 软件进行各条带灰度值的分析。

1.4 统计学方法

实验数据在 SPSS 21.0 统计学软件中整理分析,结果表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),两组间、多组间数据比较分别采用独立样本 *t* 检验、单因素方差分析, $P < 0.05$ 代表差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 正常食管上皮细胞和食管癌细胞中 miR-338-3p 和 WNK1 的表达

见图 1、表 1,qRT-PCR 法与 Western blot 法分别检测食管癌细胞 Eca-109、EC-1、EC9706 中 miR-338-3p、WNK1 mRNA 及蛋白的表达量,结果显示,食管癌细胞 Eca-109、EC-1、EC9706 中 miR-338-3p 的表达量显著低于 Het-1A 细胞,WNK1 mRNA 和 WNK1 蛋白的表达量显著高于 Het-1A 细胞($P < 0.05$)。表明 miR-338-3p 在食管癌中呈低表达,而 WNK1 在食

管癌细胞中呈高表达。

2.2 转染 miR-338-3p 抑制食管癌细胞 EC9706 增殖和诱导细胞凋亡

见图 2、表 2,MTT 法、流式细胞术分别检测细胞活力及凋亡率,采用 Western blot 法检测 PCNA、Cleaved caspase-3 蛋白表达量,结果显示,miR-338-3p 组食管癌细胞 EC9706 的细胞活力、PCNA 蛋白表达量低于 miR-con 组($P < 0.05$),而细胞凋亡率和 Cleaved caspase-3 蛋白表达量显著高于 miR-con 组($P < 0.05$)。表明 miR-338-3p 过表达能够抑制食管癌细胞增殖及促进细胞凋亡。

2.3 转染 miR-338-3p 抑制食管癌细胞 EC9706 迁移和侵袭

Transwell 实验检测细胞迁移及侵袭,Western blot 法检测 MMP-2、MMP-9 蛋白水平,结果显示,与 miR-con 组比较,miR-338-3p 组食管癌细胞 EC9706 的迁移细胞数、侵袭细胞数、MMP-2、MMP-9 蛋白水平显著降低($P < 0.05$),见图 3、表 3。表明 miR-338-3p 过表达可抑制食管癌细胞迁移及侵袭。

表 1 qRT-PCR 检测正常食管上皮细胞和食管癌细胞中 miR-338-3p 和 WNK1 mRNA 的表达及 Western blot 检测 WNK1 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 1 qRT-PCR to detect the expression of miR-338-3p and WNK1 mRNA in normal esophageal epithelial cells and esophageal cancer cells, and Western blot to detect the expression of WNK1 protein

分组 Groups	miR-338-3p	WNK1 mRNA	WNK1 蛋白 WNK1 protein
Het-1A	1.04 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.04
Eca-109	0.52 $\pm$ 0.08*	4.04 $\pm$ 0.40*	0.53 $\pm$ 0.06*
EC-1	0.48 $\pm$ 0.06*	4.58 $\pm$ 0.45*	0.69 $\pm$ 0.07*
EC9706	0.39 $\pm$ 0.05*	5.15 $\pm$ 0.48*	0.82 $\pm$ 0.08*
<i>F</i>	178.121	204.239	93.745
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

注:与 Het-1A 组相比较,* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the Het-1A group, * $P < 0.05$.

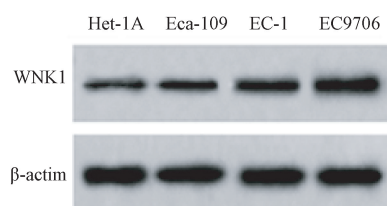
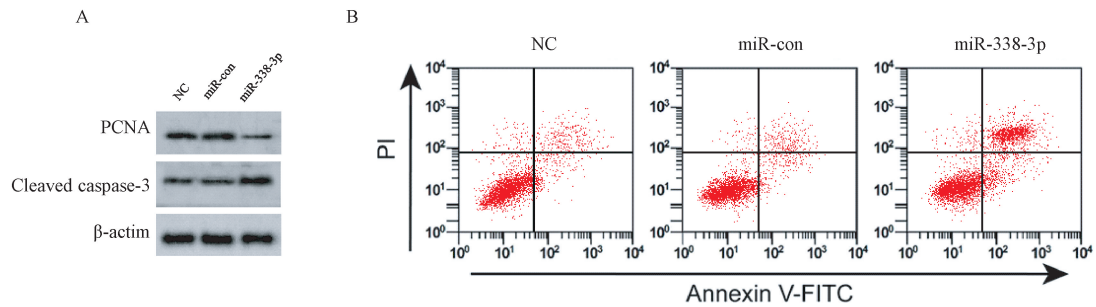


图 1 正常食管上皮细胞和食管癌细胞中 WNK1 蛋白表达
Figure 1 WNK1 protein expression in normal esophageal epithelial cells and esophageal cancer cells



注:A:转染 miR-338-3p 对细胞中 PCNA、Cleaved caspase-3 蛋白表达的检测;B:转染 miR-338-3p 对细胞凋亡的检测。

图 2 转染 miR-338-3p 对食管癌细胞 EC9706 凋亡和 PCNA、Cleaved caspase-3 蛋白表达生物影响

Note. A, Detection of PCNA and Cleaved caspase-3 protein expression in cells by transfection of miR-338-3p. B, Detection of cell apoptosis by transfection of miR-338-3p.

Figure 2 Biological effects of miR-338-3p transfection on apoptosis and expression of PCNA and cleaved caspase-3 protein in esophageal cancer cell line EC9706

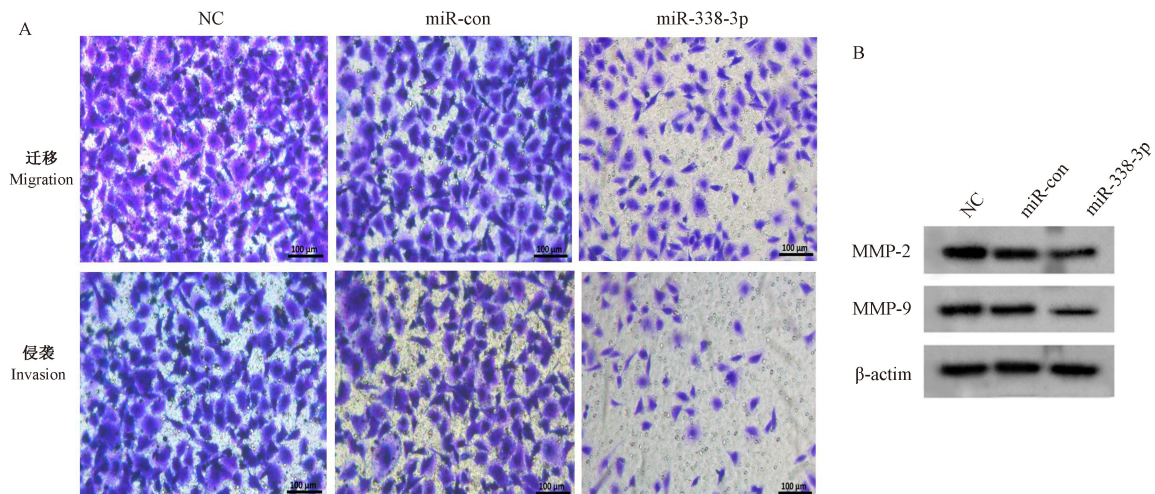
表 2 转染 miR-338-3p 对食管癌细胞 EC9706 凋亡和 PCNA、Cleaved caspase-3 蛋白表达生物影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Biological effects of miR-338-3p transfection on apoptosis and expression of PCNA and cleaved caspase-3 protein in esophageal cancer cell line EC9706

分组 Groups	miR-338-3p	PCNA	Cleaved caspase-3	细胞凋亡率 (%) Cell apoptosis rate	细胞活力 (%) Cell viability
NC	0.98±0.08	0.58±0.07	0.22±0.02	2.92±0.35	101.32±5.44
miR-con	0.94±0.11	0.62±0.08	0.25±0.03	3.45±0.56	97.36±6.58
miR-338-3p	7.58±0.68 *	0.29±0.06 *	0.72±0.07 *	15.26±1.44 *	63.45±5.93 *
<i>F</i>	820.192	58.772	342.435	523.627	108.266
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-con 组相比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with miR-con group, * $P < 0.05$.



注:A:转染 miR-338-3p 对细胞迁移侵袭的检测;B:转染 miR-338-3p 对细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的检测。

图 3 转染 miR-338-3p 对食管癌细胞 EC9706 中迁移、侵袭、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响

Note. A, Detection of cell migration and invasion by transfection of miR-338-3p. B, Detection of MMP-2 and MMP-9 protein expression in cells by transfection of miR-338-3p.

Figure 3 Effects of miR-338-3p transfection on migration, invasion and expression of MMP-2 and MMP-9 in EC9706 cells

2.4 miR-338-3p 靶向、调控 WNK1

TargetScan 软件预测发现 miR-338-3p 与 WNK1 存在互补序列,见图 4A。双荧光素酶报告实验结果显示 miR-338-3p 过表达可降低 WT-WNK1 荧光素酶活性($P<0.05$),而对 MUT-WNK1 荧光素酶活性无明显影响($P>0.05$),见表 4。与 miR-con 组比较,miR-338-3p 组细胞中 WNK1 蛋白水平显著降低($P<0.05$);与 anti-miR-con 组比较,anti-miR-338-3p 组细胞中 WNK1 蛋白水平显著升高($P<0.05$),见图 4B、表 5。表明 miR-338-3p 可靶向结合 WNK1,并可负向调控 WNK1 的表达。

2.5 沉默 WNK1 抑制食管癌细胞增殖、迁移和侵袭

MTT 法、流式细胞术、Transwell 实验分别检测细胞活力、凋亡率、迁移及侵袭,Western blot 法检测 PCNA、MMP-2、MMP-9、Cleaved caspase-3 蛋白水平,结果显示,与 si-con 组比较,si-WNK1 组 EC9706 细胞活力、PCNA、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达量显著

减少,而 EC9706 细胞凋亡率和 Cleaved caspase-3 蛋白水平明显增强,迁移细胞数与侵袭细胞数显著减少($P<0.05$),见图 5、表 6。表明沉默 WNK1 可抑制食管癌细胞增殖、迁移及侵袭。

2.6 过表达 WNK1 部分逆转 miR-338-3p 对食管癌细胞的抑制作用

MTT 法、流式细胞术、Transwell 实验分别检测细胞活力、凋亡率、迁移及侵袭,Western blot 法检测 PCNA、MMP-2、MMP-9、Cleaved caspase-3 蛋白水平,结果显示,与 miR-338-3p + pcDNA 组比较,miR-338-3p + pcDNA-WNK1 组 EC9706 细胞的活力、PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白水平比 miR-338-3p + pcDNA 组显著增加,但 EC9706 细胞凋亡率和 Cleaved caspase-3 蛋白水平较 miR-338-3p + pcDNA 组显著减少,且 EC9706 细胞的迁移、侵袭细胞数比 miR-338-3p + pcDNA 组显著提高($P<0.05$),见表 7、图 6。表明 WNK1 过表达能够拮抗 miR-338-3p 过表达对食管癌细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用。

表 3 转染 miR-338-3p 抑制食管癌细胞 EC9706 迁移和侵袭($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 3 Transfection of miR-338-3p inhibits migration and invasion of esophageal cancer cell line EC9706

分组 Groups	MMP-2	MMP-9	迁移细胞数 Cell migration number	侵袭细胞数 Cell invasion number
NC	1.12±0.09	0.77±0.08	294.53±15.73	127.64±8.37
miR-con	1.15±0.11	0.74±0.08	278.59±19.17	117.92±11.70
miR-338-3p	0.62±0.07*	0.44±0.05*	114.04±8.48*	62.64±5.74*
F	95.343	58.765	392.503	138.349
P	0.000	0.000	0.000	0.000

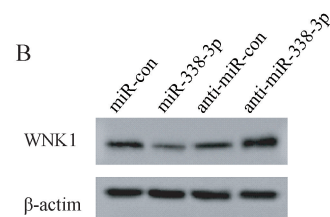
注:与 miR-con 组相比较, * $P<0.05$ 。

Note. Compared with the miR-con group, * $P<0.05$.

A

WNK1 3'UTR-WT 5' UUUCCAGUGUUGCUUGCUGGAC 3
 miR-338-3p 3 GUUGUUUUAGUGACUACGACCU 5'
 WNK1 3'UTR-MUT 5' UUUCCAGUGUUGCUACGACCUC 3

B



注:A:miR-338-3p 与 WNK1 存在互补序列;B:Western blot 检测 WNK1 蛋白表达量。

图 4 miR-338-3p 与 WNK1 存在互补序列并调控 WNK1 蛋白表达

Note. A, miR-338-3p and WNK1 had complementary sequences. B, Western blot was used to detect the expression of WNK1 protein.

Figure 4 miR-338-3p has complementary sequence with WNK1 and regulates WNK1 protein expression

表 4 双荧光素酶报告实验($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 4 Double luciferase report experiment

分组 Groups	野生型 WNK1WT-WNK1	突变型 WNK1MUT-WNK1
miR-con	1.07±0.07	1.12±0.09
miR-338-3p	0.55±0.08*	1.15±0.08
t	14.675	0.747
P	0.000	0.466

注:与 miR-con 组比较, * $P<0.05$ 。

Note. Compared with miR-con group, * $P<0.05$.

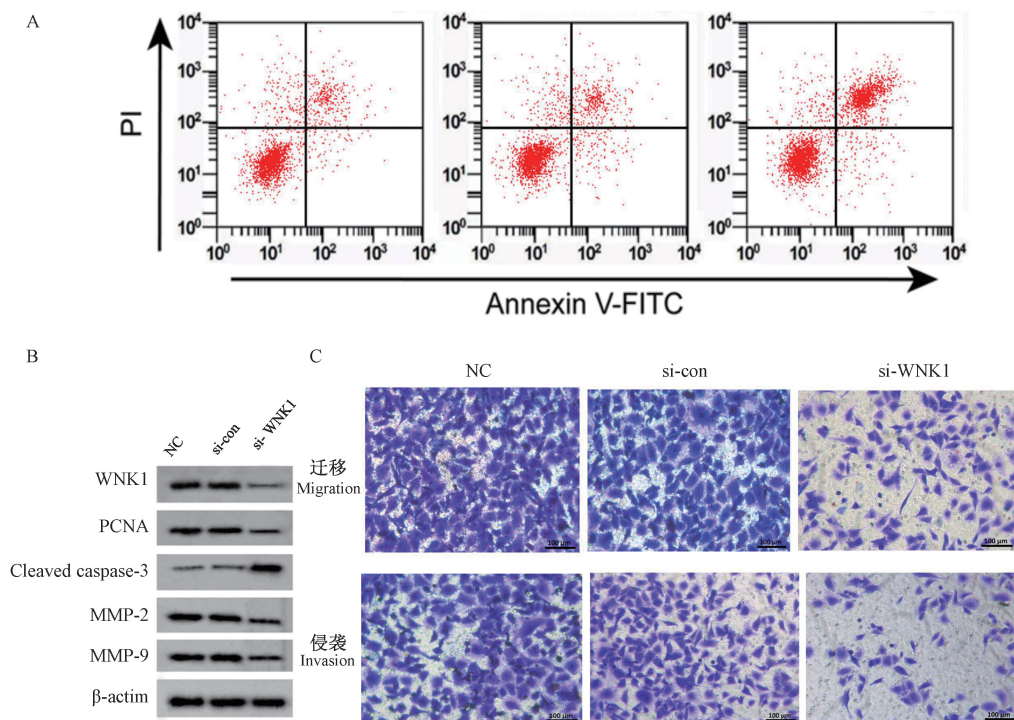
表 5 miR-338-3p 靶向调控 WNK1 表达($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 5 miR-338-3p targets WNK1 expression

分组 Groups	WNK1
miR-con	0.63±0.06
miR-338-3p	0.28±0.04*
anti-miR-con	0.58±0.06
anti-miR-338-3p	1.25±0.09 [#]
F	353.112
P	0.000

注:与 miR-con 组比较, * $P<0.05$;与 anti-miR-con 组比较, [#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with miR-con group, * $P<0.05$. Compared with anti-miR-con group, [#] $P<0.05$.



注:A:沉默 WNK1 对细胞凋亡的检测;B:沉默 WNK1 对细胞中 WNK1、PCNA、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的检测;C:沉默 WNK1 对细胞迁移侵袭的检测。

图 5 沉默 WNK1 对食管癌细胞 EC9706 凋亡、迁移、侵袭和 WNK1、PCNA、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响

Note. A, Silencing WNK1 to detect cell apoptosis. B, Detection of WNK1, PCNA, MMP-2 and MMP-9 protein expression in cells by silencing WNK1. C, Detection of cell migration and invasion by silencing WNK1.

Figure 5 Effects of WNK1 silencing on apoptosis, migration, invasion and protein expression of WNK1, PCNA, MMP-2 and MMP-9 in esophageal cancer cell line EC9706

表 6 沉默 WNK1 抑制食管癌细胞 EC9706 增殖、迁移和侵袭 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 6 Silencing WNK1 inhibits proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cell line EC9706

分组 Groups	WNK1	PCNA	Cleaved caspase-3	MMP-2	MMP-9	迁移细胞数 Cell migration number	侵袭细胞数 Cell invasion number	细胞凋亡率 (%) Cell apoptosis rate	细胞活力 (%) Cell viability
NC	0.71±0.07	0.55±0.04	0.25±0.02	0.73±0.05	0.61±0.04	291.53±18.26	121.94±9.84	3.25±0.65	99.72±5.49
si-con	0.68±0.05	0.52±0.05	0.28±0.03	0.70±0.07	0.63±0.06	285.07±19.42	114.34±11.96	3.82±0.76	95.37±7.41
si-WNK1	0.17±0.04*	0.22±0.03*	0.82±0.08*	0.35±0.03*	0.32±0.05*	94.43±8.27*	55.07±6.64*	15.81±1.54*	68.68±5.86*
F	276.300	179.820	360.818	145.193	105.545	434.622	127.450	402.845	63.879
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 si-con 组比较, * $P<0.05$ 。

Note. Compared with the si-con group, * $P<0.05$.

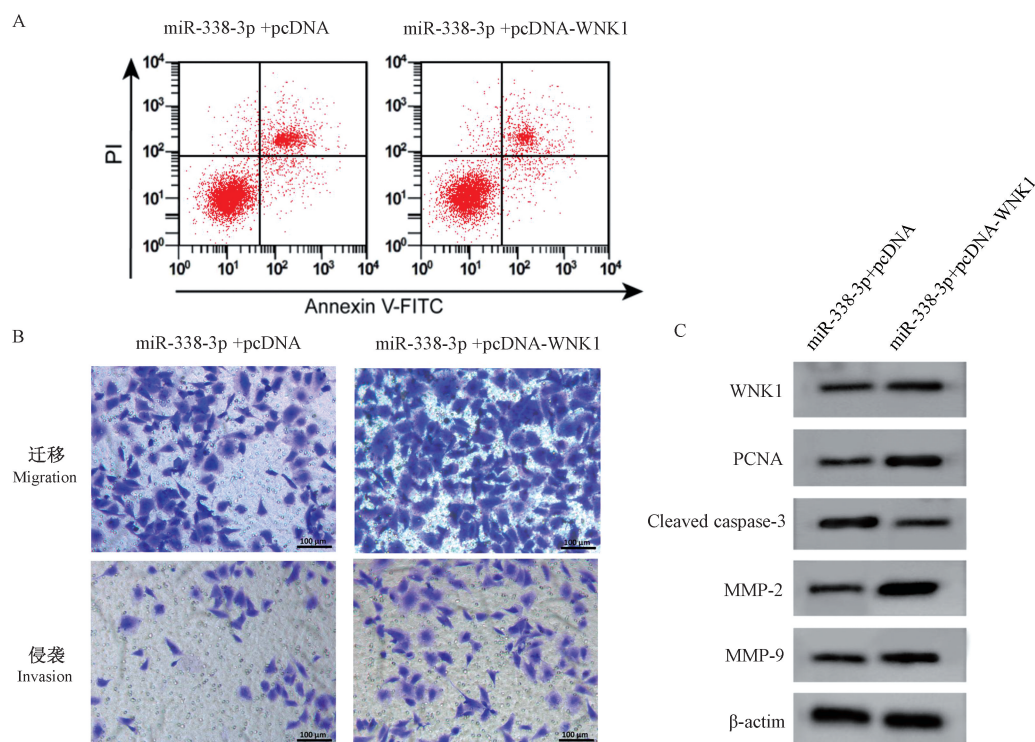
表 7 miR-338-3p 和过表达 WNK1 抑制食管癌细胞 EC9706 增殖、迁移和侵袭 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 7 miR-338-3p and WNK1 overexpression inhibit proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cell line EC9706

分组 Groups	WNK1	PCNA	Cleaved caspase-3	MMP-2	MMP-9	迁移细胞数 Cell migration number	侵袭细胞数 Cell invasion number	细胞凋亡率 (%) Cell apoptosis rate	细胞活力 (%) Cell viability
miR-338-3p+pcDNA	0.35±0.05	0.28±0.04	0.68±0.05	0.32±0.06	0.39±0.04	113.37±18.48	51.86±6.64	15.92±1.53	98.31±8.46
miR-338-3p+pcDNA-WNK1	0.54±0.06*	0.63±0.07*	0.44±0.06*	0.78±0.07*	0.65±0.06*	194.58±12.26*	84.27±7.39*	7.28±1.06*	142.54±15.83*
F	19.359	13.024	9.219	14.968	10.817	10.994	9.787	13.926	7.393
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 miR-338-3p+pcDNA 组比较, * $P<0.05$ 。

Note. Compared with miR-338-3p+pcDNA group, * $P<0.05$.



注:A:miR-338-3p 和过表达 WNK1 对细胞凋亡的检测;B:miR-338-3p 和过表达 WNK1 对细胞迁移侵袭的检测;C: miR-338-3p 和过表达 WNK1 对细胞中 WNK1、PCNA、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达量

图 6 miR-338-3p 和过表达 WNK1 对食管癌细胞 EC9706 凋亡、迁移、侵袭和 WNK1、PCNA、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响

Note. A, Detection of apoptosis by miR-338-3p and overexpression of WNK1. B, Detection of miR-338-3p and overexpression of WNK1 on cell migration and invasion. C, miR-338-3p and overexpression of WNK1 affect the expression of WNK1, PCNA, MMP-2 and MMP-9 proteins in cells.

Figure 6 Effects of miR-338-3p and WNK1 overexpression on apoptosis, migration, invasion and protein expression of WNK1, PCNA, MMP-2 and MMP-9 in esophageal cancer cell line EC9706

3 讨论

miR-338-3p 在肾癌、宫颈癌、非小细胞肺癌细胞中表达下调,并可调控细胞的生物学过程,如增殖、迁移及侵袭等^[8-10]。本研究数据表明,miR-338-3p 在食管癌细胞系 Eca-109、EC-1、EC9706 中的表达下调,与上述研究结果相似,提示 miR-338-3p 在食管癌发生过程中可能发挥抑癌基因作用。本研究结果显示 miR-338-3p 过表达后食管癌细胞增殖能力显著降低,进一步分析显示 miR-338-3p 过表达后可抑制食管癌细胞中 PCNA 的表达,PCNA 表达量升高可促进细胞增殖^[11]。本研究结果提示 miR-338-3p 过表达可能通过抑制食管癌细胞 PCNA 的表达,发挥抗食管癌增殖、迁移及侵袭,和促食管癌细胞凋亡的作用,还可增强 Cleaved caspase-3 表达,抑制 MMP-2、MMP-9 表达,与相关文献报道相似^[12-13]。提示 miR-338-3p 过表达可促进细胞凋亡及抑制食管癌细胞迁移及侵袭。

miR-93 通过抑制 WNK1 表达从而抑制三阴性乳腺癌细胞迁移及侵袭^[14]。研究表明 WNK1 在肿瘤细胞中表达上调并可促进细胞迁移^[15]。与上述研究结果相似,本研究结果显示 WNK1 在食管癌中表达上调,沉默 WNK1 表达能减弱食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并诱导食管癌细胞的凋亡,双荧光素酶报告实验进一步证实 WNK1 是 miR-338-3p 的靶基因。本研究结果显示 WNK1 过表达后,miR-338-3p 过表达调控食管癌细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的作用被逆转。

综上所述,miR-338-3p 在食管癌细胞中呈低表达,WNK1 的表达量明显升高,miR-338-3p 过表达可抑制食管癌细胞增殖、迁移及侵袭,并可促进细胞凋亡,其作用机制可能与靶向 WNK1 而上调 Cleaved caspase-3 表达及抑制 PCNA、MMP-2、MMP-9 表达有关,miR-338-3p 可能成为食管癌靶向治疗的潜在靶点。但仍需进行体内动物实验验证 miR-338-3p 的抑癌基因作用。

参考文献:

- [1] Zhou P, Dong H, He S, et al. miR612 is associated with esophageal squamous cell carcinoma development and metastasis, mediated through TP53 [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1855-1863.
- [2] Liu L, Zhao Z, Zhou W, et al. Enhanced expression of miR-425 promotes esophageal squamous cell carcinoma tumorigenesis by targeting SMAD2 [J]. J Genet Genomics, 2015, 42(11): 601-611.
- [3] 汤喻, 刘军豪, 史祖宣, 等. miR-133b 通过下调转胶蛋白抑制食管鳞癌细胞的增殖和侵袭能力 [J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(2): 91-96.
- [4] 戴芳, 刘涛, 郑树涛, 等. MiR-106b 对食管癌 KYSE150 细胞的生长及细胞上皮间质转化的影响 [J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(12): 1466-1470.
- [5] 时军利, 王磊, 王春青, 等. miR-9-5p 通过靶向 FOXO1 基因调控食管癌细胞增殖、侵袭和迁移 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2019, 28(6): 644-649.
- [6] 刘超, 王薇, 韩梅, 等. miR-338-3p 在胃癌组织中的表达及其意义 [J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(3): 308-311.
- [7] Kim JH, Hwang KH, Eom M, et al. WNK1 promotes renal tumor progression by activating TRPC6-NFAT pathway [J]. FASEB J, 2019, 33(7): 8588-8599.
- [8] 孙超, 王学民, 曹赫然, 等. miR-338-3p 靶向 TCF4 对人肾癌细胞增殖、凋亡和转移的调节 [J]. 医学分子生物学杂志, 2019, 16(1): 62-68.
- [9] Qian W, Huang T, Feng W. Circular RNA HIPK3 promotes EMT of cervical cancer through sponging miR-338-3p to Up-regulate HIF-1 α [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12(1): 177-187.
- [10] Yang Z, Lin X, Zhang P, et al. Long non-coding RNA LINC00525 promotes the non-small cell lung cancer progression by targeting miR-338-3p/IRS2 axis [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 124(1): 109858-109868.
- [11] 钱估, 王燊婵, 张学俭, 等. CDK14 对人食管癌细胞增殖的影响及其可能机制研究 [J]. 胃肠病学, 2016, 21(10): 585-591.
- [12] 巫雪茹, 郑世勤, 严展鹏, 等. 澳洲茄边碱诱导食管癌细胞 KYSE150 凋亡及其机制研究 [J]. 医学研究生学报, 2019, 32(8): 803-808.
- [13] 郭小琦, 梁英平, 薛锋, 等. shRNA 沉默 HMGA2 对食管癌 ECA109 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 癌症进展, 2017, 15(11): 1269-1272, 1281.
- [14] Shyamasundar S, Lim JP, Bay BH. miR-93 inhibits the invasive potential of triple-negative breast cancer cells in vitro via protein kinase WNK1 [J]. Int J Oncol, 2016, 49(6): 2629-2636.
- [15] Zhu W, Begum G, Pointer K, et al. WNK1-OSR1 kinase-mediated phospho-activation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter facilitates glioma migration [J]. Mol Cancer, 2014, 13: 31-41.

〔收稿日期〕2020-11-18