

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.004

· 基础研究 ·

miR-452-5p 靶向 SOX7 促进食管癌 KYSE-150 细胞增殖、侵袭及 EMT

尹情, 韩俊淑, 董稚明, 郭炜, 沈素朋, 梁佳, 路军涛, 郭艳丽(河北医科大学第四医院 河北省肿瘤研究所, 河北石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 检测 miR-452-5p 在食管鳞状细胞癌(ESCC)中的表达, 并探讨其异常表达对食管癌 KYSE-150 细胞增殖、侵袭能力和 EMT 进程的影响及其分子机制。 **方法:** 收集 2012 年 3 月至 2015 年 12 月在河北医科大学第四医院就诊的 86 名 ESCC 患者的癌组织样本和对应的癌旁组织, 用 qPCR 法检测 miR-452-5p 及其他相关基因在 ESCC 组织和细胞中的表达; 向 KYSE-150 细胞中分别转染 miR-452-5p mimic 或 pcDNA3.1-SOX7 构建过表达的细胞株。分析 miR-452-5p 表达与 ESCC 病理特征和患者 5 年 OS 的关系。用 MTS、Transwell 法检测 miR-452-5p 过表达对食管癌 KYSE-150 细胞增殖、侵袭能力和 EMT 进程的影响; 用双荧光素酶报告基因实验及 TOP/FOP 报告基因系统检测 miR-452-5p 与 SRY 盒转录因子(SOX7) 3'UTR 区的结合作用及对 Wnt/ β -catenin 通路活化水平的影响。 **结果:** miR-452-5p 在 ESCC 组织中呈明显高表达($P < 0.01$), 并与 ESCC 患者的淋巴结转移、TNM 分期及 5 年 OS 密切相关(均 $P < 0.01$)。miR-452-5p 过表达明显促进食管癌 KYSE-150 细胞的增殖、侵袭能力及 EMT 进程($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。SOX7 是 miR-452-5p 的直接靶基因, miR-452-5p 通过对 SOX7 的负向调控影响了 Wnt 通路活化水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 同时, miR-452-5p 表达也受 Wnt 通路活化水平的影响($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其可能为 Wnt 通路下游靶基因。 **结论:** miR-452-5p 通过 miR-452-5p/SOX7/Wnt/miR-452-5p 正反馈环路提高 Wnt/ β -catenin 通路活化水平, 进而促进 ESCC KYSE-150 细胞的增殖、侵袭能力及 EMT 进程, miR-452-5p 有望成为 ESCC 患者靶向治疗的潜在靶点及预后评估的新型分子标志物。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; KYSE-150 细胞; miR-452-5p; SRY 盒转录因子 7; Wnt/ β -catenin 信号通路

[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)04-0294-07

miR-452-5p promotes the proliferation, invasion and EMT of esophageal cancer KYSE-150 cells via targeting SOX7

YIN Qing, HAN Junshu, DONG Zhiming, GUO Wei, SHEN Supeng, LIANG Jia, LU Juntao, GUO Yanli (Hebei Cancer Institute, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of miR-452-5p in esophageal squamous cell cancer (ESCC) tissues, and to explore the effect of aberrant miR-452-5p expression on the proliferation, invasion and EMT process of esophageal cancer KYSE-150 cells as well as the possible molecular mechanism. **Methods:** Cancer tissue samples and corresponding paracancerous tissues were collected from 86 ESCC patients treated at the Fourth Hospital of Hebei Medical University from March 2012 to December 2015. The expression levels of miR-452-5p and other related genes were detected by qPCR method. KYSE-150 cells were transfected with miR-452-5p mimic or pcDNA3.1-SOX7 to construct over-expressed cell lines. Analysis of the relationship between miR-452-5p expression and ESCC pathological features and 5-year OS of patients. MTS and transwell assay were performed to assess the effect of miR-452-5p over-expression on proliferation, invasion and EMT progress of KYSE-150 cells. The interaction between miR-452-5p and SRY-box transcription factor 7 (SOX7) 3'UTR and the activation of Wnt/ β -catenin pathway were detected by Dual-luciferase reporter gene assay and TOP/FOP reporter gene system. **Results:** The expression of miR-452-5p was significantly up-regulated in ESCC tissues ($P < 0.01$). High expression of miR-452-5p was correlated with the lymph node metastasis, TNM stage and the 5-year OS of ESCC patients (all $P < 0.01$). Over-expression of miR-452-5p significantly promoted proliferation, invasion ability and the EMT process in KYSE-150 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). SOX7 was predicted to be the direct target gene of miR-452-5p. miR-452-5p affected the activation level of Wnt pathway through targeted regulation of SOX7 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). At the same time, the expression of miR-452-5p was also regulated by the activation level of Wnt pathway, and miR-452-5p might be a downstream target gene of Wnt pathway ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** miR-452-5p promotes the activation level of Wnt pathway through miR-452-5p/SOX7/Wnt/miR-452-5p positive feedback loop, which further promoting the proliferation, invasion and the EMT process

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(No. H2020206368); 河北省医学科学研究重点课题计划资助项目(No. 20210399; No. 20170698); 河北省人才工程培养资助项目(No. 201901035)

[作者简介] 尹情(1995-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤分子病理学研究, E-mail: 1498378052@qq.com

[通信作者] 郭艳丽, E-mail: yanli800224@163.com

of esophageal cancer KYSE-150 cells. miR-452-5p is expected to be a potential target for molecular therapy and a novel molecular marker for the prognosis evaluation of ESCC patients.

[Key words] esophageal squamous cell cancer (ESCC); KYSE-150 cell; miR-452-5p; SRY-Box transcription factor 7 (SOX7); Wnt/ β -catenin signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(4): 294-300. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.004]

miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,通过特异性靶向 mRNA 的 3'-UTR 抑制靶基因的表达和蛋白质翻译。越来越多的证据表明,miRNA 在肿瘤发生发展中具有重要意义。miR-452-5p 在多种肿瘤中均异常表达,如肺癌^[1]、肝癌^[2-3]、结肠癌^[4]和肾细胞癌^[5]等,并影响肿瘤的恶性进程,而食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)中 miR-452-5p 的研究则罕有报道。LIU 等^[6]在食管癌芯片检测中发现食管癌组织中 miR-452-5p 表达较癌旁组织明显上调,但其在 ESCC 中的具体作用及机制并未阐明。本研究重点探讨 miR-452-5p 对 ESCC 细胞增殖、侵袭能力的影响,及其在 EMT 过程中的生物学作用和潜在的分子机制,以期为 ESCC 的治疗和预后评估提供新的候选标志物。

1 材料与方法

1.1 研究对象和主要试剂

收集 2012 年 3 月至 2015 年 12 月在河北医科大学第四医院就诊的 86 名 ESCC 患者的癌组织样本和对应的癌旁组织。全部患者术前均未经化疗和放疗。肿瘤组织切除术后,在 20 min 内收集标本,一部分立即用液氮转至 -80 °C 低温冰箱保存,用于提取 RNA;另一部分进行石蜡包埋,常规 H-E 染色,经病理医师诊断证实癌组织均为 ESCC,癌旁组织均为食管正常黏膜组织。86 例 ESCC 患者全部进行了随访,共有 2 人失访。本研究方案经河北医科大学第四医院伦理委员会审查通过(审批号:2019EMC012),所有入选患者均被告知并签署知情同意书。

食管癌 KYSE-150 细胞由河北医科大学第四医院生物样本库留存。TRIzol 购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒(FuGENE HD Transfection Reagent)购自 Roche 公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒、Lipofectamine™ 2000 转染试剂、MTS 试剂均购自 Promega 公司,RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,Transwell 小室及人工基膜(matrigel)购自 Corning 公司,miR-452-5p mimic 购自 GenePharma 公司, TOP-FLASH、FOP-FLASH 质粒购自 Millipore 公司,引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 细胞培养及处理

KYSE-150 细胞复苏并培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中培养。将

处于对数生长期的 KYSE-150 细胞接种在 6 孔板中 (2×10⁵ 个/孔),待细胞生长汇合度至 70%~80% 时,按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书分别将 pcDNA3.1-SOX7、阴性对照(negative control, NC)或 miR-452-5p mimic 及相应阴性对照(miR-NC)进行转染,qPCR 验证转染效率;或将 Wnt/ β -catenin 信号通路特异性激活剂 LiCl 加入培养基处理 KYSE-150 细胞,使其终摩尔浓度为 20 mmol/L,同时换以 20 mmol/L NaCl 处理细胞作为阴性对照组。

1.3 qPCR 法检测 miR-452-5p 及其他相关基因的表达

按 TRIzol 试剂说明书提取组织及 KYSE-150 细胞中总 RNA, SynergyHT 多模式微孔板检测仪(美国 Biotek 公司)测定总 RNA 的浓度和纯度。参照逆转录试剂盒说明将 RNA 逆转录成 cDNA,采用 ABI7500 qPCR 仪检测 miR-452-5p、Wnt 通路相关基因及 EMT 相关基因的表达,并分别以 U6 或 GAPDH 基因作为内参照。引物序列见表 1。目的基因的相对表达量用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算。

表 1 qPCR 引物

基因名称	引物序列(5'-3')
miR-452-5p	F: GCCGAGAAGTGTTCGAG R: CTCAACTGGTGTCTGGAG
E-cadherin	F: CGAGAGCTACACGTTACGG R: GGCCTTTGACTGTAATCACACC
N-cadherin	F: CAACTTGCCAGAAAACCTCCAGG R: ATGAAACCGGGCTATCTGCTC
SNAI1	F: ACGAGGTGTGACTAACTAT R: CGACAAGTGACAGCCATT
VIM	F: CGCCTGCAGGATGAGATTCAG R: TCAGGGAGGAAAAGTTTGAAGA
MYC	F: GGCTCCTGGCAAAGGTCA R: CTGCGTAGTTGTGCTGATGT
Cyclin D1	F: GCTGCGAAGTGGAACCATC R: CCTCCTTCTGCACACATTTGAA
MMP7	R: CTATGACGCGGGAGTTAACAT F: GAGTGAGCTACAGTGGAACA
GAPDH	F: AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG R: AGGGGTCATTGATGGCAACA

SNAI1: Snail 家族转录抑制因子 1(Snail family transcriptional repressor 1); VIM: 波形蛋白(vimentin)

1.4 MTS法检测KYSE-150细胞的增殖能力

将KYSE-150细胞接种于96孔板中(3×10^3 个/孔), 每组设置6个复孔, 分别于细胞贴壁后0、24、48和72 h时在每孔中加入20 μ L (500 μ g/mL) MTS试剂, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养2 h, 用酶标仪在490 nm波长处检测每个孔的光密度(D)值。实验重复3次。

1.5 Transwell法检测KYSE-150细胞的侵袭能力

常规消化并悬浮KYSE-150细胞于无血清培养基中, 调整细胞密度接种于预铺matrigel的上小室(1×10^5 个/孔)内, 下小室内加入600 μ L含10% FBS的RPMI 1640培养基, 培养24 h后, 用4%多聚甲醛固定细胞, 0.1%结晶紫染色5 min, 最后, 在显微镜下($\times 200$)随机对5个视野的细胞进行拍照并计数。

1.6 双荧光素酶报告基因实验验证miR-452-5p与SOX7的靶向关系

通过TargetScan软件预测miR-452-5p与SOX7(SRY-box transcription factor 7, SOX7)之间存在的互补结合位点。将含有野生型(WT)SOX7 3' UTR的核苷酸片段克隆至pmirGLO荧光素酶报告质粒载体。按照Lipofectamine™ 2000转染试剂说明书将野生型的pmirGLO-SOX7与miR-452-5p-mimic或miR-NC质粒共转染KYSE-150细胞, 继续培养48 h后收集细胞, 用双荧光素酶报告系统检测荧光素酶活性。同

时, 为了检测Wnt通路活性, 将TOP-Flash或FOP-Flash(TOP-Flash突变体)与内参照质粒pRLTK一起转染KYSE-150细胞, 并于转染48 h后用双荧光素酶报告检测系统检测荧光素酶活性。结果以TOP/FOP比值表示, 其中TOP值为转染有TOP-Flash和内参照质粒的样本中采集得到的萤火虫荧光值/海肾荧光值; FOP值为转染有FOP-Flash和内参照质粒的样本中采集得到的萤火虫荧光值/海肾荧光值。

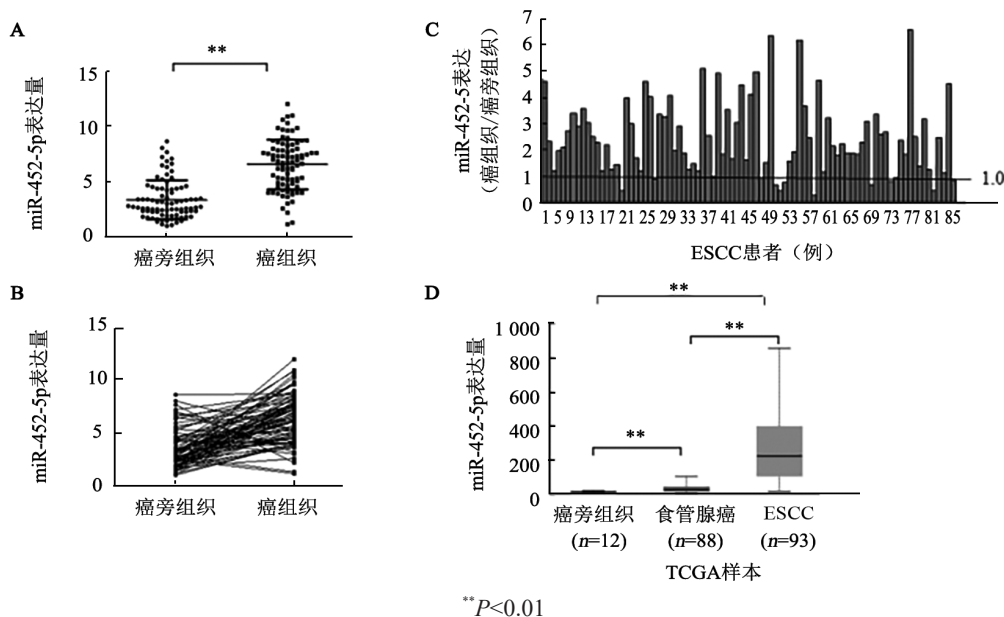
1.7 统计学处理

所有实验均独立重复3次。采用SPSS19.0统计软件对实验数据进行统计分析, 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本t检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-452-5p在ESCC组织中呈高表达

qPCR检测结果显示, ESCC组织中miR-452-5p表达量明显高于癌旁组织($P < 0.01$, 图1A、B)。与癌旁组织相比, 85.1%(74/86例)的ESCC患者癌组织中miR-452-5p呈高表达($P < 0.01$, 图1C)。UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>)网站数据分析显示, miR-452-5p在ESCC中表达明显高于癌旁组织(均 $P < 0.01$, 图1D), 与本实验检测结果一致。



A: qPCR检测miR-452-5p在ESCC和癌旁组织中的表达水平; B: miR-452-5p在每个ESCC患者的癌组织和对应癌旁组织中的表达情况; C: miR-452-5p在癌组织与对应癌旁组织表达水平的比值; D: 通过UALCAN在线工具分析miR-452-5p在癌旁、食管腺癌和ESCC组织中的相对表达情况

图1 miR-452-5p在ESCC组织中呈明显高表达

2.2 miR-452-5p表达与ESCC患者临床病理特征和OS的关系

86例ESCC患者中, 男性48例、女性38例; 年龄

39~78岁, 中位年龄57.6岁; 其中高、中分化ESCC患者49例, 低分化ESCC患者37例; 有淋巴结转移患者69例, 无淋巴结转移患者17例; 依据美国癌症联合会

临床分期标准进行分期,其中 I、II 期患者 41 例,III、IV 期患者 45 例。根据临床病理特征进行分组比较,miR-452-5p 表达水平与 ESCC 患者的淋巴结转移及 TNM 分期有关($P < 0.05$),而与患者的年龄、性别、病理分级无关($P > 0.05$,图 2A)。

应用 Log-Rank 法分析 miR-452-5p 表达高低对 ESCC 患者 5 年 OS 的影响,miR-452-5p 表达的高低以均值为分界点进行分组,其中高表达组 47 例、低表达组 39 例。分析结果显示,低表达组患者的 5 年 OS 为 23.1%(中位 OS 为 34 个月),高表达组患者 5 年 OS 为 9.2%(中位 OS 为 23 个月)。Log-Rank 检验分析结果(图 2B)显示,miR-452-5p 高表达患者的 5 年 OS 明显低于低表达患者的 5 年 OS($\chi^2 = 5.285, P = 0.022$)。

2.3 miR-452-5p 过表达促进 KYSE-150 细胞的增殖、

侵袭能力及 EMT 进程

qPCR 验证 miR-452-5p mimic 转染效果,结果显示转染组 miR-452-5p 表达明显高于相应阴性对照(miR-NC)($P < 0.01$)。MTS 法、Transwell 实验检测结果显示,与 miR-NC 对照组相比,miR-452-5p mimic 转染组 KYSE-150 细胞的增殖($P < 0.01$,图 3A)及侵袭能力($P < 0.05$,图 3B)明显增强。qPCR 法检测结果(图 3C)显示,转染 miR-452-5p mimic 促使 KYSE-150 细胞中上皮标志物 E-cadherin 的表达水平明显下调($P < 0.01$),而间质标志物 N-cadherin、SNAI1 及 VIM 表达水平明显上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。以上结果提示,miR-452-5p 促进 KYSE-150 细胞的增殖、侵袭能力及 EMT 进程。

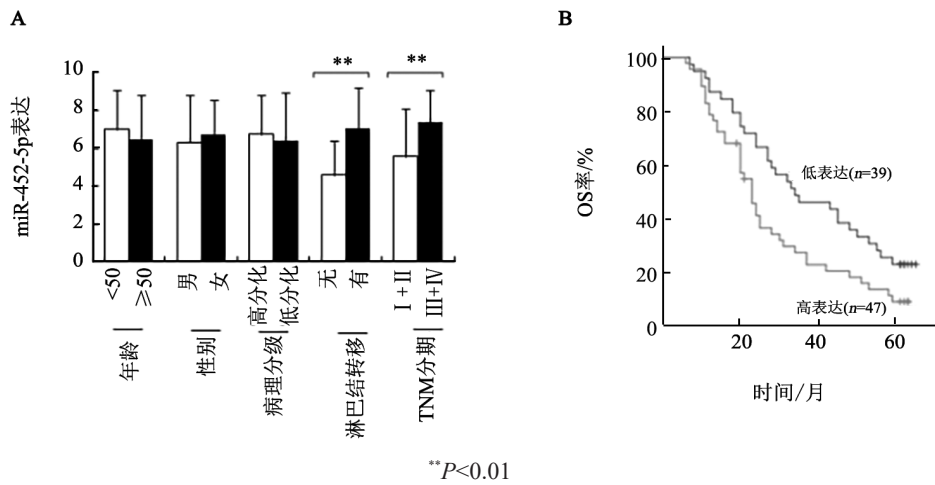


图 2 ESCC 组织中 miR-452-5p 表达与临床病理特征(A)和 OS(B)的关系

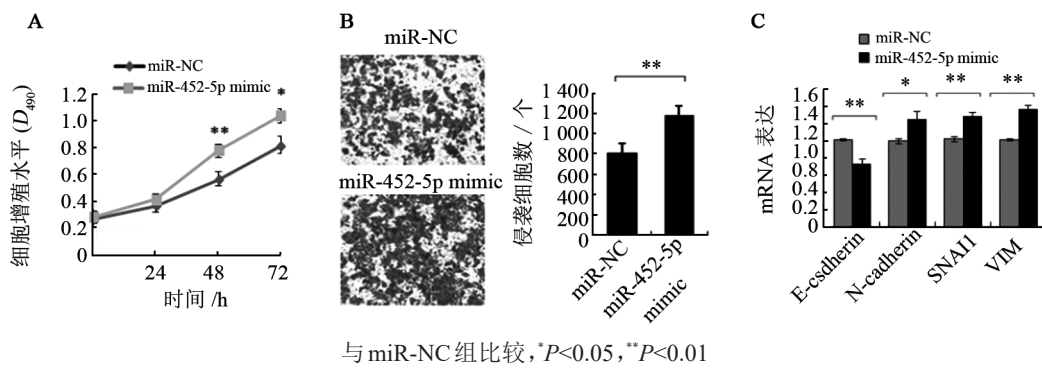


图 3 miR-452-5p 对食管癌 KYSE-150 细胞增殖(A)、侵袭能力(B, $\times 200$)及 EMT 相关基因表达(C)的影响

2.4 miR-452-5p 靶向调控 SOX7 基因并抑制其表达

为进一步明确 miR-452-5p 发挥生物学功能的可能机制,运用多个生物信息学数据库(miRDB、TargetScan7.1 和 miRWalk)预测 miR-452-5p 潜在的靶基因。取评分较高的前 30% 的基因进行交集,共得

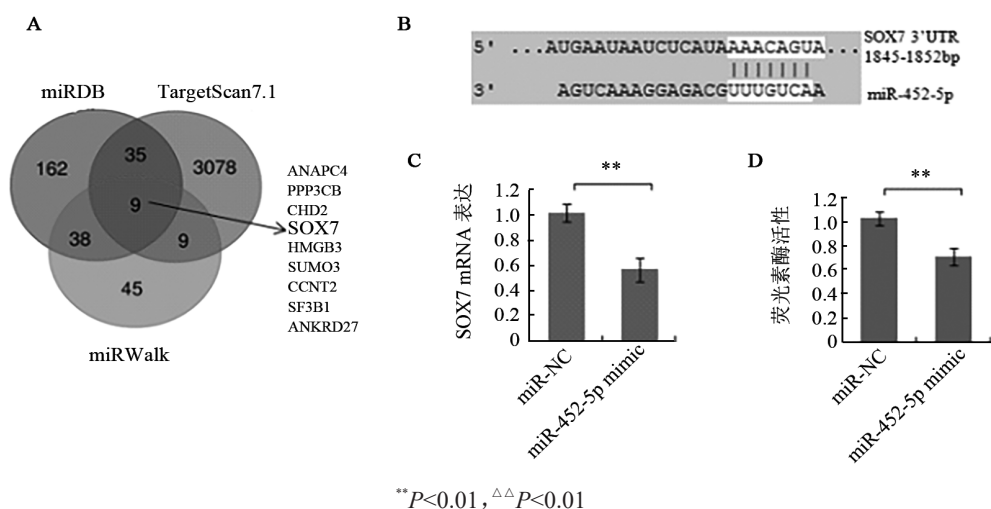
9 个基因(图 4A),其中 SOX7 被报道与多种肿瘤的发生发展密切相关,本研究选取 SOX7 基因进行下一步研究。图 4B 展示了 SOX7 与 miR-452-5p 的结合位点。在 KYSE-150 细胞中转染 miR-452-5p mimic 后,发现可明显降低 SOX7 基因的表达水平($P < 0.01$,图 4C);

双荧光素酶报告基因实验结果也显示 miR-452-5p 的过表达明显降低了荧光素酶活性($P<0.01$,图4D)。上述结果表明,miR-452-5p 通过直接结合 SOX7 基因的3'-UTR 区抑制 SOX7 基因的表达,即 SOX7 是 miR-452-5p 的直接靶基因。

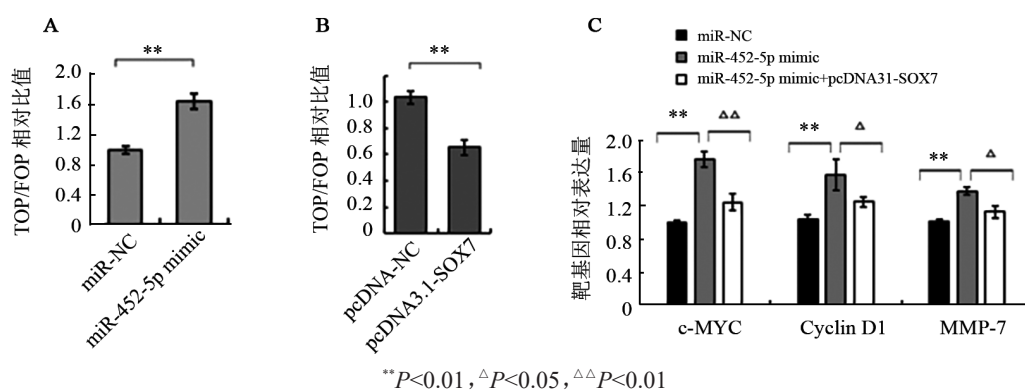
2.5 miR-452-5p 通过靶向调控 SOX7 基因的表达增强了 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性

有文献[7]指出 SOX7 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制因子之一,所以本研究要进一步探索 miR-452-5p 在 Wnt 信号转导中的作用。应用经典 TOP/FOP-Flash 报告基因系统来评估 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性,结

果表明,与对照细胞相比,过表达 miR-452-5p 显著增强了 KYSE-150 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性($P<0.01$,图 5A);而 SOX7 的过表达可导致 TOP/FOP 荧光素酶活性降低($P<0.01$,图 5B)。此外,qPCR 结果显示,miR-452-5p mimic 明显上调了 Wnt 通路靶基因 MYC、MMP-7 和 CyclinD1 的表达(均 $P<0.01$;图 5C);而 SOX7 的过表达则部分抑制了 miR-452-5p 对靶基因的上调作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$;图 5C)。以上结果表明 miR-452-5p 靶向 SOX7 抑制了 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性。



A: miRDB、TargetScan7.1 和 miRWalk 数据库共同预测 miR-452-5p 潜在的靶基因; B: TargetScan7.1 预测 SOX7 与 miR-452-5p 的结合位点; C: 应用 qPCR 检测 miR-452-5p 对 SOX7 基因表达水平的影响; D: 双荧光素酶报告基因检测 miR-452-5p 与 SOX7 基因 3'-UTR 区的结合作用
图 4 miR-452-5p 靶向 SOX7 基因并抑制其表达



A, B: TOP/FOP-Flash 报告基因系统检测 miR-452-5p(A) 及 SOX7(B) 过表达对 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化水平的影响;
C: 应用 qPCR 检测 miR-452-5p 及 SOX7 对 Wnt/ β -catenin 信号通路下游靶基因表达水平的影响
图 5 miR-452-5p 靶向 SOX7 基因并抑制 Wnt/ β -catenin 通路活化水平

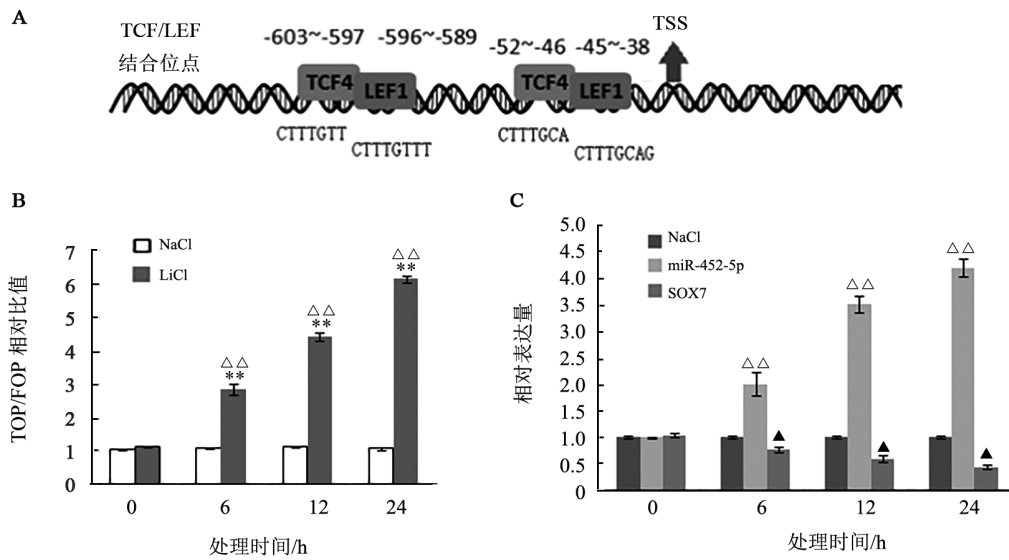
2.6 miR-452-5p 表达受 Wnt/ β -catenin 通路活化水平的影响

PROMO 网站预测发现,miR-452-5p 启动子区有多个 TCF4/LEF1 转录因子的结合位点(图 6A)。应用 Wnt 通路激活剂 LiCl 处理 KYSE-150 细胞 6、12 及

24 h,NaCl 处理作为对照组, TOP/FOP 荧光素酶活性分析表明,随着 LiCl 处理时间的增加, TOP/FOP 荧光素酶活性比值(均 $P<0.01$,图 6B) 及 miR-452-5p 的表达量也随之增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图 6C), SOX7 的表达却随着 LiCl 处理时间的增加而下降

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 图 6C)。提示 miR-452-5p 在靶向调控 Wnt 信号通路的同时也受 Wnt 通路活化水平的

影响, 其可能为 Wnt/ β -catenin 通路的下游靶基因, 即形成了 miR-452-5p/SOX7/Wnt/miR-452-5p 正反馈环路。



与 NaCl 组相比较, $**P < 0.01$; 分别与 0、6、12 h 组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; SOX7 表达量分别与 0、6、12 h 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$
A: 通过 PROMO 在线工具预测了 TCF4/LEF1 转录因子在 miR-452-5p 启动子区的结合位点; B: Wnt 信号激活剂 LiCl 处理 KYSE-150 细胞, 并利用 TOP/FOP 荧光素酶报告基因检测 Wnt/ β -catenin 通路的活性; C: 应用 qPCR 检测 LiCl 处理对 KYSE-150 细胞中 miR-452-5p 和 SOX7 表达的影响

图 6 miR-452-5p 表达受 Wnt/ β -catenin 通路活化水平的影响

3 讨论

ESCC 是消化系统最常见的恶性肿瘤, 深入了解 ESCC 发生发展的分子机制有利于寻找更安全、更有效的治疗靶点。近年来, 大量研究表明 miRNA 可作为癌基因或抑癌基因在肿瘤的发生发展中起着重要作用。miR-452-5p 的异常表达及其作用已在多种恶性肿瘤被报道, 在肝细胞癌中 miR-452-5p 可以促进癌细胞的浸润和转移^[8-9]; miR-452-5p 的高表达与肾癌的不良预后密切相关^[10]; 在尿路上皮癌中发现, miR-452-5p 在转移阳性淋巴结中高表达, 提示其具有促进转移的作用^[11]。然而, 在胰腺癌^[12]、乳腺癌^[13]中, miR-452-5p 则表现为对肿瘤的抑制。可见, miR-452-5p 的生物学功能具有很强的肿瘤特异性。本研究发现 miR-452-5p 在 ESCC 癌组织中的表达显著升高, 与在 UALCAN 数据库中分析 miR-452-5p 在 ESCC 中高表达的结果一致。在探讨 miR-452-5p 表达与 ESCC 临床病理特征之间的关系时发现, miR-452-5p 高表达与 ESCC 患者的淋巴结转移和 TNM 分期密切相关。体外功能学实验结果显示, miR-452-5p 过表达明显促进了 ESCC 细胞的增殖及侵袭能力。此外, Kaplan-Meier 分析表明, miR-452-5p 高表达与 ESCC 患者的不良预后密切相关。以上结果均提示, miR-452-5p 可能在 ESCC 侵袭、转移等恶性进程中扮演着重要的角色, 并可能是 ESCC 患者预后不良的潜在预测因子。

EMT 是癌细胞失去上皮表型并获得间充质表型的过程, 已被证实会导致肿瘤细胞的迁移和侵袭。为进一步明确 miR-452-5p 可促进 ESCC 侵袭性临床表型的潜在分子机制, 本研究首先检测了 miR-452-5p 对 EMT 进程的影响, 结果显示 miR-452-5p 过表达明显降低了上皮标志物的表达水平, 而上调了间质标志物的表达, 提示 miR-452-5p 促进了 ESCC 的 EMT 进程。接下来, 进一步探讨了 miR-452-5p 促进 ESCC EMT 进程的可能分子机制。通过生物信息学预测发现, SOX7 基因 3'UTR 区与 miR-452-5p 有潜在的结合位点, 并通过实验证明了 SOX7 是 miR-452-5p 的直接靶基因。研究指出 SOX7 在多种肿瘤中通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路发挥抑癌基因的作用, 例如脑胶质瘤^[14]、肾细胞癌^[7]、卵巢癌^[15]、结肠癌^[16]、前列腺癌^[17]等。Wnt/ β -catenin 通路调控细胞的许多生命过程, 该通路的异常活化在 EMT 进程中发挥着重要作用^[18]。Wnt/ β -catenin 信号通路在异常活化时, 通路的中心因子 β -catenin 由胞质易位于细胞核, 与 LEF/TCF 转录因子家族结合, 调节下游靶基因的转录^[19-21]; 而 SOX7 可与 TCF 竞争结合 β -catenin, 从而阻断了 β -catenin-TCF 介导的基因转录激活, 遏制 Wnt/ β -catenin 通路的活性^[7, 17]。SOX7 对 Wnt/ β -catenin 信号通路的拮抗作用促使本研究进一步探索了 miR-452-5p 在 Wnt 信号通路中的作用。TOP/FOP 荧光素酶分析及 Wnt 通路靶基因检测结果显示, miR-452-5p 通过对 SOX7 基因的抑制作用明显提高了 Wnt 通路活

性。同时,实验中发现一个有趣的现象,在应用 Wnt 通路激活剂 LiCl 处理细胞时,随着处理时间的增加,荧光素酶活性及 miR-452-5p 的表达量也随之增加,而 SOX7 的表达量则随之下降。进一步结合转录因子预测网站 PROMO 数据分析,发现在 miR-452-5p 启动子区有多个 TCF4/LEF1 转录因子的结合位点,β-catenin 与 TCF/LEF 转录因子结合促进下游靶基因的转录是 Wnt 通路活化的经典模式。以上研究结果提示,miR-452-5p 在靶向激活 Wnt/β-catenin 信号通路的同时,其本身也受 Wnt/β-catenin 通路活化影响,其自身可能为 Wnt/β-catenin 通路的下游靶基因。miR-452-5p 表达的变化进一步通过对 SOX7 的靶向调控影响了 Wnt 信号通路的活化水平,即形成了 miR-452-5p/SOX7/Wnt/miR-452-5p 正反馈环路。

综上,本研究揭示了 miR-452-5p 在 ESCC 组织中表达明显上调。miR-452-5p 的高表达促进了食管癌 KYSE-150 细胞的增殖、侵袭能力及 EMT 进程。miR-452-5p 通过 miR-452-5p/SOX7/Wnt/miR-452-5p 正反馈环路提高了 Wnt/β-catenin 通路活化水平,进而促进 KYSE-150 细胞的 EMT 进程。miR-452-5p 有望为 ESCC 患者的治疗提供潜在分子靶点,同时也为预后评估提供一种新的标志物。

[参考文献]

- [1] GAN X N, GAN T Q, HE R Q, *et al.* Clinical significance of high expression of miR-452-5p in lung squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 6418-6430. DOI:10.3892/ol.2018.8088.
- [2] YANG W, JU H Y, TIAN X F. Circular RNA-ABC10 suppresses hepatocellular carcinoma progression through upregulating NRP1/ABL2 via sponging miR-340-5p/miR-452-5p[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(5): 2347-2357. DOI:10.26355/eurrev_202003_20501.
- [3] ZHENG J X, CHENG D M, WU D Y, *et al.* miR-452-5p mediates the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via targeting COLEC10[J]. *Per Med*, 2021, 18(2): 97-106. DOI: 10.2217/pme-2020-0027.
- [4] LIN X, HAN L, GU C C, *et al.* miR-452-5p promotes colorectal cancer progression by regulating an ERK/MAPK positive feedback loop[J]. *Aging*, 2021, 13(5): 7608-7626. DOI:10.18632/aging.202657.
- [5] ZHAI W, LI S Y, ZHANG J, *et al.* Sunitinib-suppressed miR-452-5p facilitates renal cancer cell invasion and metastasis through modulating SMAD4/SMAD7 signals[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 157[2021-12-6]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30419914/>. DOI:10.1186/s12943-018-0906-x.
- [6] LIU S G, QIN X G, ZHAO B S, *et al.* Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue[J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(5): 1639-1642. DOI:10.3892/ol.2013.1251.
- [7] WANG L, FAN Y, ZHANG L, *et al.* Classic SRY-box protein SOX7 functions as a tumor suppressor regulating WNT signaling and is methylated in renal cell carcinoma[J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 254-263. DOI:10.1096/fj.201701453RR.
- [8] ZHU L Y, YANG N H, CHEN J, *et al.* LINC00052 upregulates EPB41L3 to inhibit migration and invasion of hepatocellular carcinoma by binding miR-452-5p[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(38): 63724-63737. DOI:10.18632/oncotarget.18892.
- [9] ZHENG Q L, SHENG Q, JIANG C Y, *et al.* microRNA-452 promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by targeting cyclin-dependent kinase inhibitor 1B[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 389(1/2): 187-195. DOI:10.1007/s11010-013-1940-z.
- [10] VEERLA S, LINDGREN D, KVIST A, *et al.* miRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(9): 2236-2242. DOI:10.1002/ijc.24183.
- [11] LI H Y, WU Y, LI P X. microRNA-452 suppresses pancreatic cancer migration and invasion by directly targeting B-cell-specific moloney murine leukemia virus insertion site 1[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3235-3242. DOI:10.3892/ol.2017.6566.
- [12] LI W J, LI G Y, FAN Z G, *et al.* Tumor-suppressive microRNA-452 inhibits migration and invasion of breast cancer cells by directly targeting RAB11A[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2): 2559-2565. DOI: 10.3892/ol.2017.6426.
- [13] ZHAO T S, YANG H, TIAN Y, *et al.* SOX7 is associated with the suppression of human glioma by HMG-box dependent regulation of Wnt/β-catenin signaling[J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(1): 100-107. DOI:10.1016/j.canlet.2016.02.044.
- [14] LIU H D, YAN Z Q, LI B L, *et al.* Reduced expression of SOX7 in ovarian cancer: a novel tumor suppressor through the Wnt/β-catenin signaling pathway[J/OL]. *J Ovarian Res*, 2014, 7: 87[2021-12-6]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25297608/>. DOI: 10.1186/s13048-014-0087-1.
- [15] ZHANG Y, HUANG S Y, DONG W, *et al.* SOX7, down-regulated in colorectal cancer, induces apoptosis and inhibits proliferation of colorectal cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 277(1): 29-37. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.11.014.
- [16] GUO L Z, ZHONG D S, LAU S, *et al.* SOX7 is an independent checkpoint for beta-catenin function in prostate and colon epithelial cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(9): 1421-1430. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2175.
- [17] LEI Y H, CHEN L, ZHANG G, *et al.* microRNAs target the Wnt/β-catenin signaling pathway to regulate epithelial mesenchymal transition in cancer [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(4): 1299-1313. DOI: 10.3892/or.2020.7703.
- [18] BARKER N. The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 468: 5-15. DOI:10.1007/978-1-59745-249-6_1.
- [19] CAO Y Y, GENG J X, WANG X, *et al.* RNA-binding motif protein 10 represses tumor progression through the Wnt/β-catenin pathway in lung adenocarcinoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(1): 124-139. DOI:10.7150/ijbs.63598.
- [20] WANG Z, SUN A Q, YAN A, *et al.* Circular RNA MTCL1 promotes advanced laryngeal squamous cell carcinoma progression by inhibiting C1QB ubiquitin degradation and mediating beta-catenin activation [J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 92[2021-12-6]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35366893/>. DOI:10.1186/s12943-022-01570-4.

[收稿日期] 2021-12-23

[修回日期] 2022-04-06

[本文编辑] 向正华,黄静怡