

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2024.24.0167

• 基础研究 •

miR-1-3p通过调控STC2抑制人食管鳞状细胞癌细胞的恶性生物学行为

于凡¹, 王佳琪², 高常林², 司嘉鑫², 吕微², 贾云泷², 刘丽华^{2,3,4}

miR-1-3p Inhibits Malignant Biological Behavior of Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells by Regulating STC2

YU Fan¹, WANG Jiaqi², GAO Changlin², SI Jiaxin², LYU Wei², JIA Yunlong², LIU Lihua^{2,3,4}

1. Department of Thoracic Surgery, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. Department of Tumor Immunotherapy, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 3. Cancer Research Institute of Hebei, Shijiazhuang 050011, China; 4. International Cooperation Laboratory of Stem Cell Research, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding Author: LIU Lihua, E-mail: lihualiu567@hotmail.com

Abstract: Objective To explore the effect of miR-1-3p on the malignant biological behavior of human esophageal squamous cell carcinoma cells and the potential mechanisms. **Methods** The Gene Expression Omnibus (GEO) database was analyzed to screen differentially expressed miRNAs in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). qRT-PCR was used to detect the expression of miR-1-3p in human ESCC cell lines (KYSE30, KYSE150, KYSE410, KYSE510, and Eca109) and normal esophageal epithelial cell line HET-1A. CCK-8, wound healing, Transwell assays, and flow cytometry were applied to detect the effect of miR-1-3p on the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of ESCC cells. Bioinformatics tool was used to predict the target genes of miR-1-3p. A Kaplan-Meier survival curve was drawn to analyze the correlation between STC2 expression and overall survival of patients in the ESCC cohort of the TCGA database. Fluorescence *in situ* hybridization was performed to verify the subcellular location of miR-1-3p in ESCC cells, and dual-luciferase reporter gene assay was performed to validate the regulation of miR-1-3p on stanniocalcin 2 (STC2). RNA immunoprecipitation assays were used to detect the binding of miR-1-3p and STC2. Western blot assay was performed to determine the effect of miR-1-3p on the expression of STC2 and endoplasmic reticulum stress pathway-related proteins, including p-PERK, p-eIF2 α , and ATF4. CCK-8, wound healing, Transwell assays, and flow cytometry were applied to detect the effect of STC2 overexpression and knockdown on the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of ESCC cells. **Results** The expression of miR-1-3p was lower in ESCC cell lines than in HET-1A cells (all $P < 0.05$). The transfection of miR-1-3p mimic decreased the proliferation, invasion, and migration of ESCC cells (all $P < 0.05$) and promoted the apoptosis of ESCC cells (all $P < 0.001$). Bioinformatics tool showed that STC2 was a target gene of miR-1-3p. The expression of STC2 in ESCC tissues was higher than that in normal esophageal epithelial tissues in the ESCC cohort of TCGA database and was negatively correlated with prognosis (all $P < 0.05$). miR-1-3p was located in the cytoplasm and can directly bind to STC2 mRNA. The transfection of miR-1-3p mimic downregulated the expression of STC2, p-PERK, p-eIF2 α , and ATF4 (all $P < 0.05$). The overexpression of STC2 promoted the proliferation, invasion, and migration (all $P < 0.05$) and inhibited the apoptosis of ESCC cells (all $P < 0.05$). Knockdown of STC2 inhibited the proliferation, invasion, and migration (all $P < 0.05$) and promoted the apoptosis of ESCC cells (all $P < 0.05$). **Conclusion** miR-1-3p inhibits the malignant biological

behavior and promotes the apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma cells by regulating STC2 possibly by suppressing the endoplasmic reticulum stress.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; miR-1-3p; Stanniocalcin 2; Endoplasmic reticulum stress

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 82203079); Hebei Natural Science Fund for Young Scholars (No. H2020206341)

收稿日期: 2024-03-01; 修回日期: 2024-04-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (82203079); 河北省自然科学基金青年科学基金 (H2020206341)

作者单位: 1. 050011 石家庄, 河北医科大学第四医院胸外科; 2. 050011 石家庄, 河北医科大学第四医院肿瘤免疫治疗科; 3. 050011 石家庄, 河北省肿瘤研究所; 4. 050011 石家庄, 河北医科大学国际合作研究干细胞实验室

通信作者: 刘丽华 (1972-), 女, 博士, 主任医师, 主要从事肿瘤临床与基础研究, E-mail: lihualiu567@hotmail.com, ORCID: 0000-0002-1201-4624

作者简介: 于凡 (1985-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事胸部肿瘤的诊治和相关分子机制研究, ORCID: 0009-0005-8893-2965

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

摘要: **目的** 探讨miR-1-3p对人食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞的恶性生物学行为的影响及其可能的作用机制。**方法** 利用基因表达数据库(GEO)筛选ESCC中差异表达的miRNA。采用qRT-PCR检测人ESCC细胞KYSE30、KYSE150、KYSE410、KYSE510和Eca109及正常食管上皮细胞HET-1A中miR-1-3p的表达水平。CCK-8试剂盒、划痕愈合和Transwell实验以及流式细胞术分别检测转染miR-1-3p mimic对ESCC细胞增殖、迁移和侵袭、凋亡能力的影响。使用生物信息学工具预测miR-1-3p的靶基因, Kaplan-Meier法分析癌症基因组图谱(TCGA)数据库中STC2表达水平与患者预后的关系。采用FISH检测miR-1-3p的亚细胞定位, 双荧光素酶报告基因验证miR-1-3p与STC2的靶向关系。RNA免疫沉淀(RIP)实验检测miR-1-3p与STC2的结合。Western blot法检测转染miR-1-3p mimic对ESCC细胞中STC2及内质网应激相关蛋白p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4表达水平的影响。CCK-8、划痕愈合、Transwell实验和流式细胞术分别检测过表达和敲低STC2对ESCC细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡能力的影响。**结果** ESCC细胞中miR-1-3p的表达水平均低于HET-1A细胞(均 $P<0.05$), 转染miR-1-3p mimic可抑制ESCC细胞增殖、迁移和侵袭能力(均 $P<0.05$), 促进ESCC细胞凋亡(均 $P<0.001$)。生物信息学工具预测miR-1-3p的靶基因为STC2, ESCC组织中STC2的表达水平高于正常食管上皮组织, 与预后呈负相关(均 $P<0.05$)。miR-1-3p位于胞质, 并可直接与STC2 mRNA结合。转染miR-1-3p mimic可下调STC2、p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4蛋白的表达水平(均 $P<0.05$)。过表达STC2可促进ESCC细胞增殖、迁移和侵袭能力(均 $P<0.05$), 抑制ESCC细胞凋亡(均 $P<0.05$)。敲低STC2可抑制ESCC细胞增殖、迁移和侵袭能力(均 $P<0.05$), 促进ESCC细胞凋亡(均 $P<0.05$)。**结论** miR-1-3p通过靶向调控STC2抑制ESCC细胞的恶性生物学行为, 促进ESCC细胞凋亡, 可能是通过抑制内质网应激发挥作用。

关键词: 食管鳞状细胞癌; miR-1-3p; 斯钙素

2; 内质网应激

中图分类号: R735.1

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

食管癌是中国死亡率第4位的恶性肿瘤, 其中鳞状细胞癌是最常见的食管癌病理类型^[1]。食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是一种高分子异质性、有独特肿瘤微环境的恶性肿瘤, 具有生长迅速、易复发转移和易产生治疗抵抗等生物学特性^[2-4]。虽然ESCC的治疗取得了很大进展, 但患者的生存获益仍无显著改善, 5年生存率约为20%^[5]。基因的异常表达在肿瘤细胞的恶性生物学行为中发挥重要作用, 因此阐明ESCC发生发展的相关分子机制有可能为ESCC的诊断和治疗提供新的思路。

微小RNA(miRNA)在基因表达的调控中发挥至关重要的作用, 在肿瘤诊断和治疗中具有广阔前景, 已成为肿瘤领域的研究热点^[6-7]。miR-1-3p是一种在多种肿瘤中表达水平下调的miRNA, 已被证实能够抑制胃癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、肝癌等多种肿瘤的发生发展^[8-11]。然而, miR-1-3p在ESCC中的作用机制尚未完全明确。本研究主要探讨miR-1-3p/STC2轴对ESCC细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及其可能的作用机制, 以期筛选ESCC诊断的生物标志物和治疗靶点提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人正常食管上皮细胞HET-1A购于上海中乔新舟生物科技有限公司, 人ESCC细胞KYSE30、KYSE150、KYSE410、KYSE510和Eca109均购于武汉普诺赛生命科技公司。

1.2 试剂

人食管上皮细胞HET-1A专用培养基购于上海中乔新舟生物科技有限公司, RPMI 1640培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自以色列Biological Industries公司, 总RNA提取试剂TRIzol、Lipofectamine™ 3000购自美国Invitrogen公司, 反转录试剂盒、蛋白marker购自美国Thermo Fisher公司, 引物由上海生物工程有限公司合成, qPCR试剂购自上海翌圣公司, Transwell小室购自美国Corning公司, FISH试剂盒、RIPA裂解液、 β -actin抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司, CCK8试剂盒、BCA试剂盒、抗体稀释液、ECL显影液购自亚科因生物技术有限公司, 凋亡试剂盒购自BD Biosciences公司, miR-1-3p mimic和miRNA mimic NC由苏州吉玛基因股份有限公司合成。STC2 mRNA 3'-UTR-WT和STC2 mRNA 3'-UTR-MUT报告基因质粒购自上海汉恒生物科技有限公司。RIP试剂盒购自广州佰信生物科技有限公司。STC2、Ago2抗体购自美国Abcam公司, PERK、p-PERK、p-eIF2 α 抗体购自江苏亲科生物研究中心有限公司, eIF2 α 、ATF4抗体购自杭州华安生物技术有限公司, p-ATF4抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, HRP山羊抗兔二抗购自河北瑞帕特生物科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 ESCC转录组数据获取及分析 从基因表达数据文库GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载GSE114110、GSE55856、GSE59973和GSE43732 RNA微阵列数据集, 4个数据集均为未经治疗的ESCC患者。用R语言的limma包筛选ESCC组织

及其配对癌旁组织差异表达的miRNA, 筛选条件: $|\log_2FC| > 2$, $P < 0.05$ 。从癌症基因组图谱数据库TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 检索食管癌队列的转录组数据和临床信息, 使用R语言的DESeq2包筛选ESCC组织和癌旁组织的差异表达基因, 筛选条件: $|\log_2FC| > 2$, $P < 0.05$ 。利用R语言的ggplot2包绘制火山图。使用omicshare平台 (<https://www.omicshare.com/tools/>) 绘制韦恩图。

1.3.2 细胞培养、转染及分组 在37℃、5% CO₂培养箱中使用HET-1A人食管上皮细胞专用培养基常规培养人正常食管上皮细胞HET-1A, 使用含10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的RPMI 1640培养基常规培养KYSE30、KYSE150、KYSE410、KYSE510和Eca109细胞。按照Lipofectamine™ 3000说明书步骤, 取对数生长期细胞, 使用miRNA mimic NC、miR-1-3p mimic、STC2 overexpression NC、STC2 overexpression以及miRNA inhibitor NC、miR-1-3p inhibitor、si-STC2 NC、si-STC2分别对KYSE410细胞和KYSE510细胞进行转染, 转染48 h后, 采用qRT-PCR法检测转染效率。

1.3.3 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 法检测ESCC细胞中miR-1-3p的表达水平 采用TRIzol法提取细胞总RNA, 紫外分光光度计测量纯度及含量, 使用Thermo Fisher反转录试剂盒以5 μg总RNA为模板, 将RNA反转录为cDNA, 以此cDNA为模板, 以U6或GAPDH为内参照, 进行qPCR扩增, 反应条件: 95℃ 5 min, 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 共40个循环。引物序列: miR-1-3p的正向引物序列为5'-GCGCGTGGAATGT-AAAGAAGT-3', 反向引物序列为5'-AGTGCAGGG-TCCGAGGTATT-3'; U6的正向引物序列为5'-CTC-GCTTCGGCAGCACATA-3', 反向引物序列为5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; STC2的正向引物序列为5'-CAGCGGGAATGCTACCTCAA-3', 反向引物序列为5'-CACATTGCCATCCTTGCTGG-3'; GAPDH的正向引物序列为5'-ACAACTTTGGTATC-GTGGAAGG-3', 反向引物序列为5'-GCCATCAC-GCCACAGTTTC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算miR-1-3p和STC2的相对表达水平。实验重复3次。

1.3.4 CCK-8法检测miR-1-3p对ESCC细胞增殖能力的影响 取对数生长期的各组KYSE410细胞和KYSE510细胞, 调整密度为每毫升 2×10^4 个, 取100 μl接种于96孔板, 设置6个复孔, 使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养至细胞贴壁后, 分别在接种后第1~4天, 弃原培养基并每孔加入100 μl含

10% CCK-8试剂的RPMI 1640培养基, 在37℃、5%CO₂培养箱中常规孵育1 h后, 用酶标仪检测各孔在450 nm波长处的吸光度。

1.3.5 划痕愈合实验检测miR-1-3p对ESCC细胞迁移能力的影响 取对数生长期的各组KYSE410细胞和KYSE510细胞, 调整密度为每毫升 7×10^5 个, 取1 ml接种于6孔板, 设置3个复孔, 在6孔板后画3条平行线做标记, 当细胞融合度达90%时, 用200 μl无菌微量移液吸头在细胞中划1条垂直于背面平行线的直线, 用PBS洗涤3次, 更换为不含胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、5%CO₂培养箱中常规培养, 分别于0 h和24 h在倒置显微镜下观察并拍照。

1.3.6 Transwell实验检测miR-1-3p对ESCC细胞迁移和侵袭能力的影响 取对数生长期的各组KYSE410细胞和KYSE510细胞, 用不含胎牛血清的RPMI 1640培养基将细胞密度调整为每毫升 2×10^5 个, 取200 μl接种于Transwell小室的上室, 检测侵袭能力时提前用Matrigel基质胶包被Transwell小室的上室, 设置3个复孔, 下室为含20%胎牛血清的RPMI 1640培养基, 在37℃、5%CO₂培养箱中常规培养24 h后取出小室, 弃去上室液体, PBS洗涤后用棉签轻轻将上室中未侵袭的细胞擦去, 用4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗涤后用0.1%结晶紫染色10 min, PBS洗涤后在倒置显微镜下随机选取3个视野拍照, 统计穿膜细胞数。

1.3.7 流式细胞术检测miR-1-3p对ESCC细胞凋亡率的影响 取各组KYSE410细胞和KYSE510细胞, 调整细胞密度为每毫升 1×10^5 个, 取100 μl细胞悬液加至流式管, 在Annexin V-FITC/PI溶液中反应15 min, 加入结合缓冲液静置1 h, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 统计早期凋亡和晚期凋亡细胞的占比之和作为细胞凋亡率。

1.3.8 荧光原位杂交技术 (FISH) 检测miR-1-3p在ESCC细胞中的定位 生物素标记的miR-1-3p探针由武汉赛维尔生物科技有限公司设计和合成。探针序列为: 5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3'。KYSE410细胞和KYSE510细胞在提前放入盖玻片的24孔板培养, 待细胞融合度达50%时停止培养, PBS洗涤后用4%多聚甲醛室温固定15 min, PBS洗涤后用通透剂室温破膜10 min, PBS洗涤后用预热的杂交液40℃预杂交30 min后, 细胞与miR-1-3p探针在37℃杂交过夜, 利用Cy3检测生物素标记的miR-1-3p探针, 细胞核使用DAPI染色, 荧光显微镜观察荧光信号。

1.3.9 双荧光素酶报告基因实验验证miR-1-3p与STC2的结合关系 构建STC2突变型 (MUT) 和野

生型 (WT) 报告基因质粒, 通过体外转染, 将 KYSE410 细胞分为 4 组: STC2 mRNA 3'-UTR-WT+miRNA mimic NC、STC2 mRNA 3'-UTR-WT+miR-1-3p mimic、STC2 mRNA 3'-UTR-MUT+miRNA mimic NC 和 STC2 mRNA 3'-UTR-MUT+miR-1-3p mimic, 每组设置 3 个复孔。培养 48 h 后按照双荧光素酶试剂盒说明书检测细胞的荧光素酶活性。

1.3.10 RNA 免疫沉淀 (RIP) 实验检测 miR-1-3p 和 STC2 的结合 收集对数生长期的 KYSE410 细胞, 细胞总量为 2×10^7 个, 在 RIP 裂解缓冲液中裂解后, 与磁珠以及 Ago2 或 IgG 抗体在摇床上 4°C 孵育过夜, 回收抗体并完成纯化后, 进行 qRT-PCR 检测沉淀物中 miR-1-3p 和 STC2 的富集情况。

1.3.11 Western blot 检测 miR-1-3p 对 STC2 和内质网应激相关蛋白表达水平的影响 胰蛋白酶收获各组 KYSE410 细胞和 KYSE510 细胞, 分别加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂, 提取磷酸化蛋白时同时加入磷酸酶抑制剂, 提取细胞总蛋白。BCA 法进行细胞总蛋白定量, 各取 $30\text{ }\mu\text{g}$ 的样品煮沸 10 min , 置于冰上冷却。采用 12% SDS-PAGE 分离蛋白质, 将蛋白质转移至 PVDF 膜, 快速封闭液室温封闭 30 min 。加入 β -actin (1:1 000)、STC2 (1:1 000)、PERK (1:500)、p-PERK (1:1 000)、eIF2 α (1:500)、p-eIF2 α (1:500)、ATF4 (1:1 000)、p-ATF4 (1:500) 一抗于 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次 (15 分钟/次), 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:1 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次 (15 分钟/次), 采用 ECL 显影液显影, 使用 Image J 软件分析图像, 以 β -actin 为内参, 以各个检测蛋白条带的灰度值之比表示蛋白的相对表达量。

qRT-PCR、CCK-8、划痕愈合、Transwell、流式细胞术、Western blot 等实验均重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 SPSS26.0、GraphPad Prism 8 和 R4.2 软件进行统计学分析并作图。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法, 两组间生存时间的比较采用 Log-rank 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-1-3p 在 ESCC 细胞中低表达

分析 GSE114110、GSE55856、GSE59973 和 GSE43732 数据集, 发现在 ESCC 组织中 miR-1-3p 的表达水平均低于癌旁组织 (均 $P<0.05$, 图 1), 选择 $|\log_2\text{FC}|$ 更大的 miR-1-3p 进一步研究。采用 qRT-PCR 法检测 miR-1-3p 在 ESCC 细胞中的表达水平,

结果显示, miR-1-3p 在 ESCC 细胞 KYSE30、KYS-E150、KYSE410、KYSE510 和 Eca109 细胞中的表达水平均低于 HET-1A 细胞 (均 $P<0.05$)。miR-1-3p 表达最低的 KYSE410 和 KYSE510 细胞被用于进行后续研究。

2.2 miR-1-3p 抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移、侵袭能力

ESCC 细胞中分别转染 miRNA mimic NC 和 miR-1-3p mimic, qRT-PCR 法检测转染效率。结果显示, miR-1-3p mimic 组 ESCC 细胞中 miR-1-3p 的表达水平高于 miRNA mimic NC 组 (均 $P<0.001$, 图 2A), 表明在 KYSE410 和 KYSE510 细胞中成功建立过表达 miR-1-3p 的细胞模型。

CCK-8、划痕愈合和 Transwell 实验结果显示, 与 miRNA mimic NC 组相比, miR-1-3p mimic 组 KYSE410 和 KYSE510 细胞的增殖、迁移和侵袭能力均显著降低 (均 $P<0.05$, 图 2B~D)。以上结果说明 miR-1-3p 可显著抑制 ESCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 在 ESCC 中发挥了抑癌作用。

2.3 miR-1-3p 促进 ESCC 细胞凋亡

将转染 miRNA mimic NC 和 miR-1-3p mimic 的 ESCC 细胞进行流式细胞术检测, 结果显示, 与 miRNA mimic NC 组相比, miR-1-3p mimic 组 KYSE410 和 KYSE510 细胞的凋亡率均显著升高 (均 $P<0.001$), 见图 3。说明 miR-1-3p 能够促进 ESCC 细胞凋亡。

2.4 STC2 是 miR-1-3p 的靶基因, 在 ESCC 组织中高表达, 与预后呈负相关

通过在线生物信息学数据库 (TargetScan、microT、miRanda、miRmap、PITA、PicTar) 预测 miR-1-3p 下游的潜在结合基因。交集结果显示共有 113 个 miR-1-3p 可能调控的靶基因 (图 4A)。TCGA 数据库 ESCC 队列分析结果表明, 与正常食管上皮组织相比, ESCC 组织中有 1 137 个表达水平上调的基因和 1 284 个表达水平下调的基因 (图 4B)。经过交叉分析得到 4 个基因, 其中仅 STC2 为上调的基因 (图 4C), 提示 STC2 可能是与 miR-1-3p 结合的下游靶基因。

TCGA 数据库分析结果表明, STC2 在 ESCC 组织中高表达 (均 $P<0.05$), 见图 4D~F。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示 STC2 高表达患者的 OS 较 STC2 低表达患者更短 ($P<0.01$, 图 4G)。ROC 曲线提示 STC2 能够作为预测 ESCC 患者 OS 的独立生物标志物 ($P<0.001$, 图 4H)。以上结果表明 STC2 在 ESCC 中高表达, 与患者预后不良密切相关。

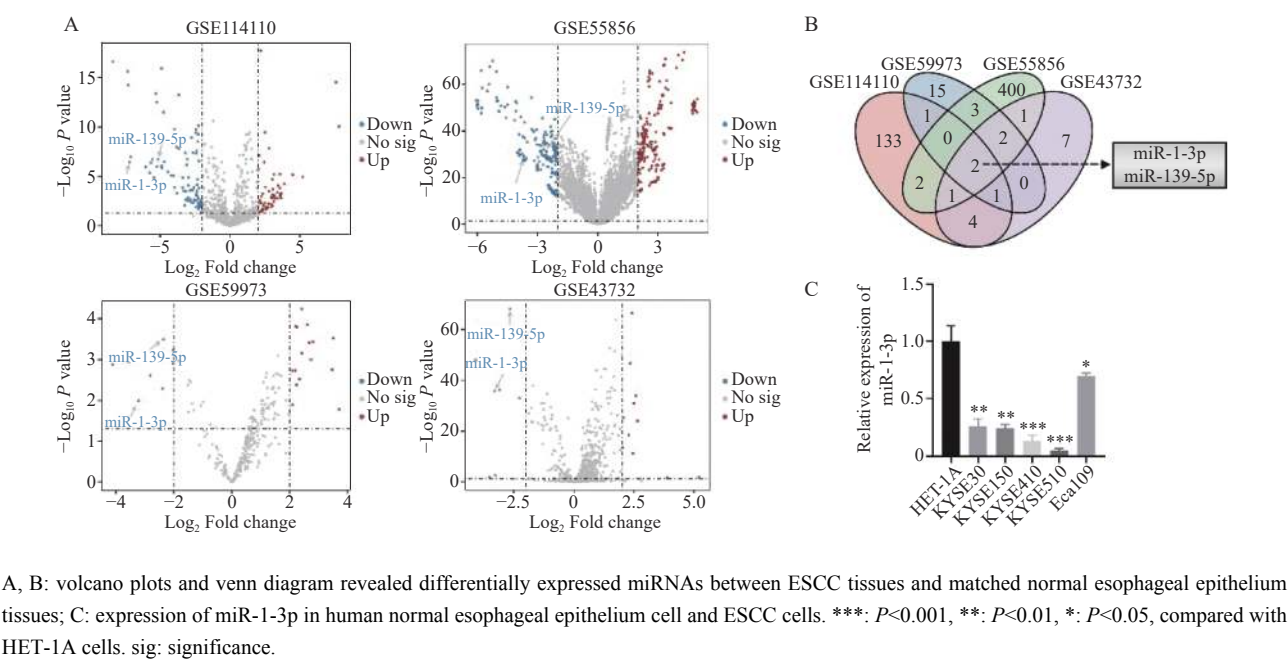


图 1 miR-1-3p在ESCC组织和细胞中的表达

Figure 1 Expression of miR-1-3p in ESCC tissue and cells

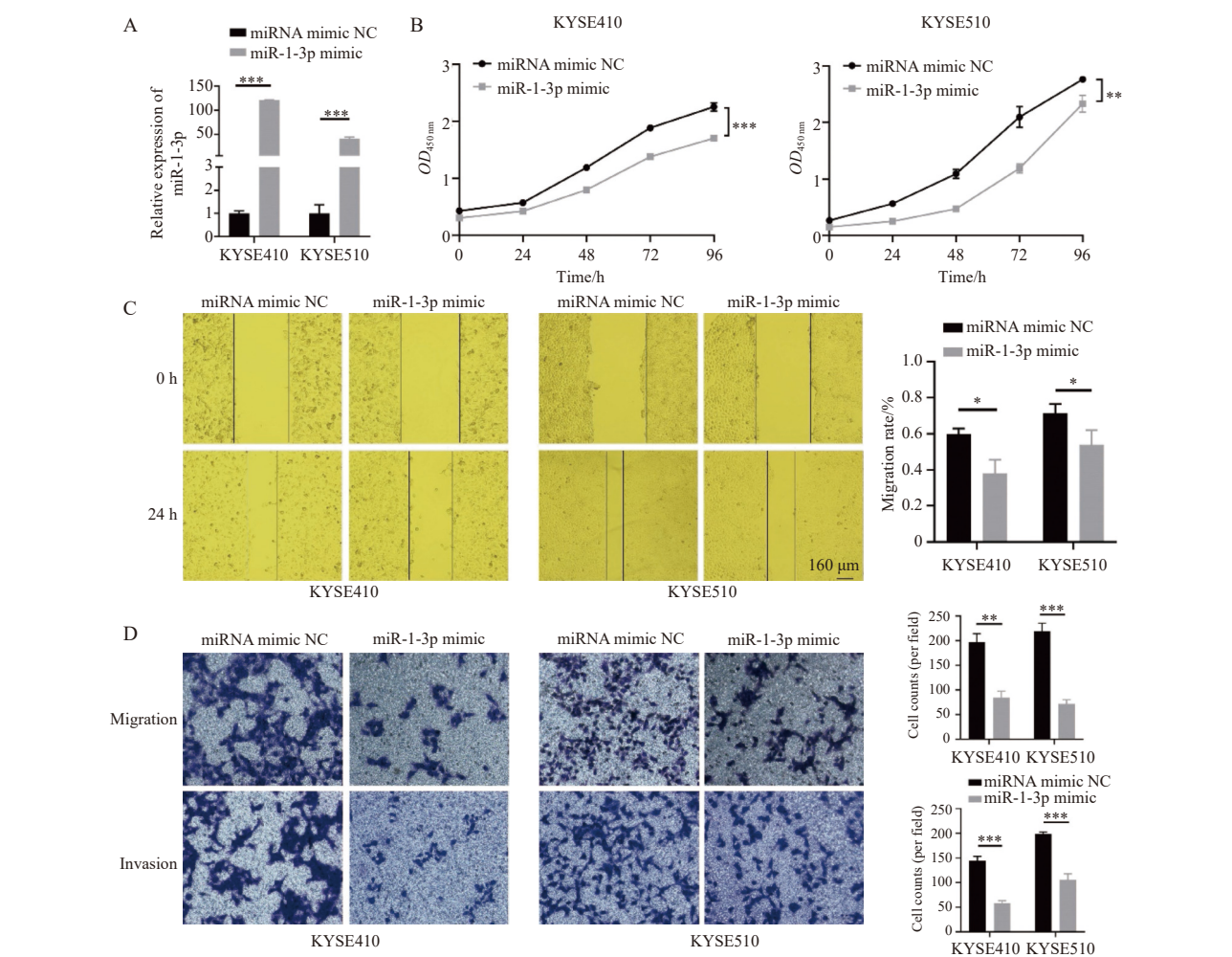


图 2 miR-1-3p抑制ESCC细胞增殖、迁移、侵袭

Figure 2 miR-1-3p inhibited proliferation, migration, and invasion of ESCC cells

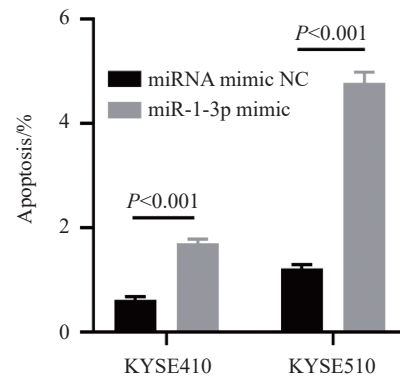
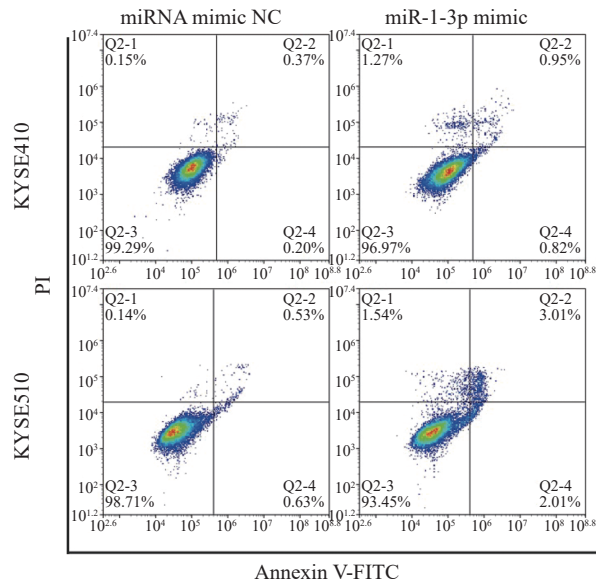


图3 流式细胞术检测miR-1-3p促进ESCC细胞凋亡
Figure 3 miR-1-3p promoted apoptosis of ESCC cells

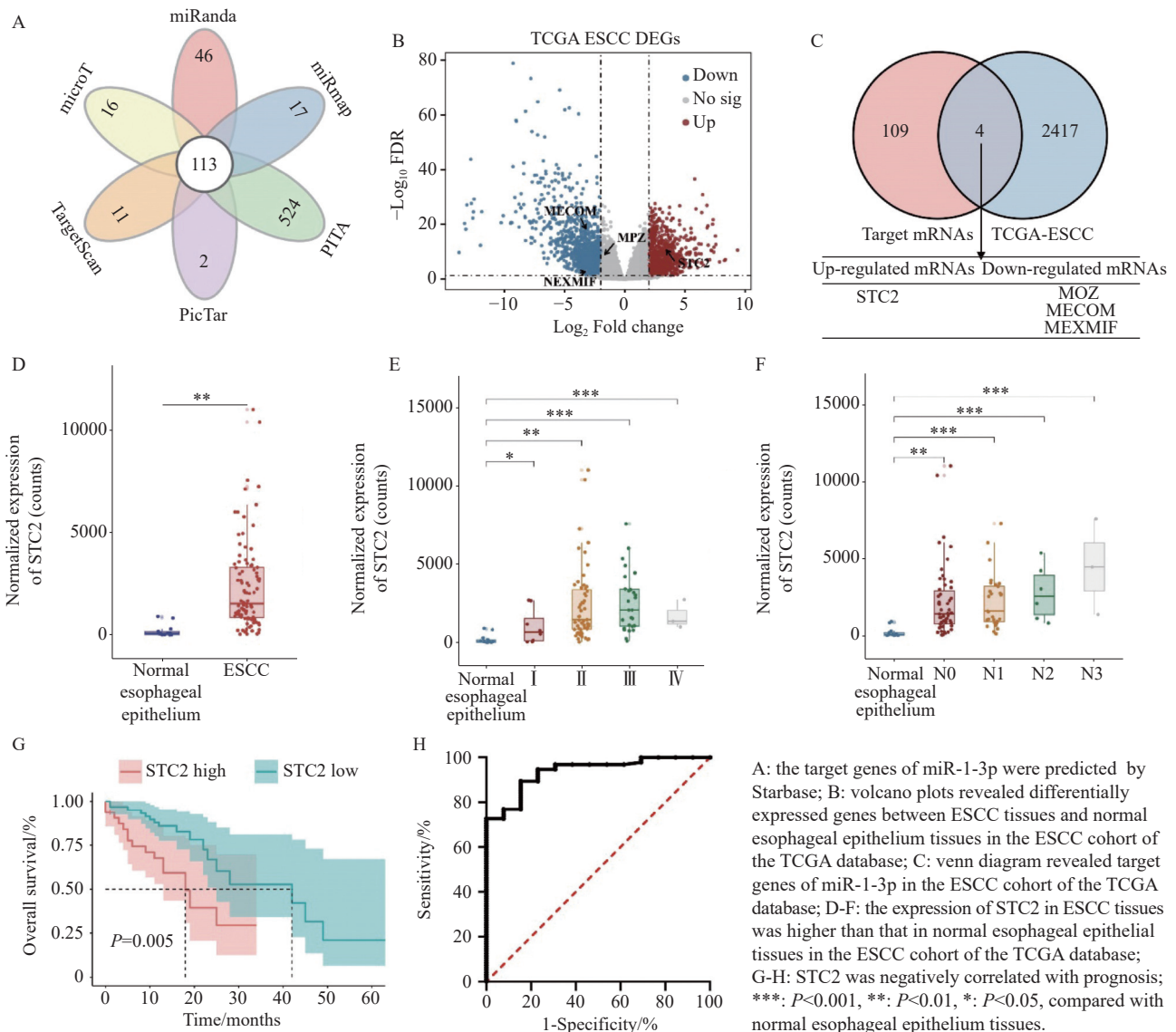


图4 STC2是miR-1-3p的靶基因，与患者预后负相关

Figure 4 STC2 was a target gene of miR-1-3p and negatively correlated with prognosis

2.5 在ESCC细胞中miR-1-3p与STC2 mRNA 3'-UTR结合

Starbase数据库进行预测分析发现, STC2 mRNA的3'-UTR上有一个潜在的与miR-1-3p相互作用的结合位点(图5A)。通过FISH证实miR-1-3p主要位于ESCC细胞的细胞质中(图5B)。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 转染miR-1-3p mimic显著降低了转染STC2 mRNA 3'-UTR-WT组细胞的荧光素酶活性($P<0.01$, 图5C), 但STC2 mRNA 3'-UTR-MUT组细胞的荧光素酶活性未降低, 说明miR-1-3p和STC2 mRNA可以发生相互作用。RIP实验结果进一步证实miR-1-3p和STC2 mRNA的相互作用($P<0.05$, 图5D)。此外, Western blot检测miR-1-3p对STC2表达的影响结果显示, miR-1-3p mimic组KYSE410和KYSE510细胞中STC2的表达水平均低于miRNA mimic NC组(均 $P<0.05$, 图5E)。

2.6 miR-1-3p通过调控STC2影响内质网应激

STC2可通过调控内质网应激发挥促癌作用^[12], 为探索miR-1-3p对内质网应激的影响, 我们进行了Western blot实验, 结果显示, miR-1-3p mimic组KYSE410和KYSE510细胞中STC2、p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4蛋白的相对表达水平均低于miRNA mimic NC组(均 $P<0.05$, 图6)。

为探索miR-1-3p是否通过调控STC2的表达发挥抑癌作用, 本研究进行了过表达和敲低STC2的挽救实验。CCK-8、划痕愈合、Transwell实验和流

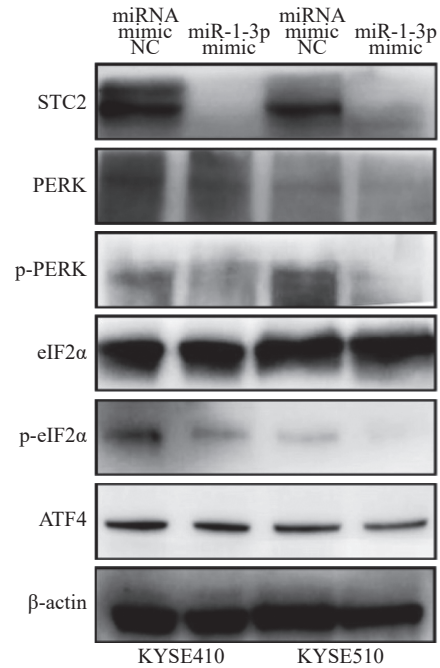


图6 miR-1-3p抑制ESCC细胞内质网应激相关蛋白表达

Figure 6 miR-1-3p inhibited the expression of endoplasmic reticulum stress pathway-related proteins in ESCC cells

式细胞术结果显示, 与miR-1-3p mimic+STC2 overexpression NC组相比, miR-1-3p mimic+STC2 overexpression组KYSE410和KYSE510细胞的增殖、迁移和侵袭能力均显著升高(均 $P<0.05$, 图7), 凋亡率下降(均 $P<0.05$, 图8)。与miR-1-3p inhibitor+si-STC2 NC组相比, miR-1-3p inhibitor+si-STC2组KYSE410和KYSE510细胞的增殖、迁移和侵袭能力均显著下降(均 $P<0.05$, 图9), 凋亡率升高(均 $P<0.05$, 图10)。以上结果表明, miR-1-3p可

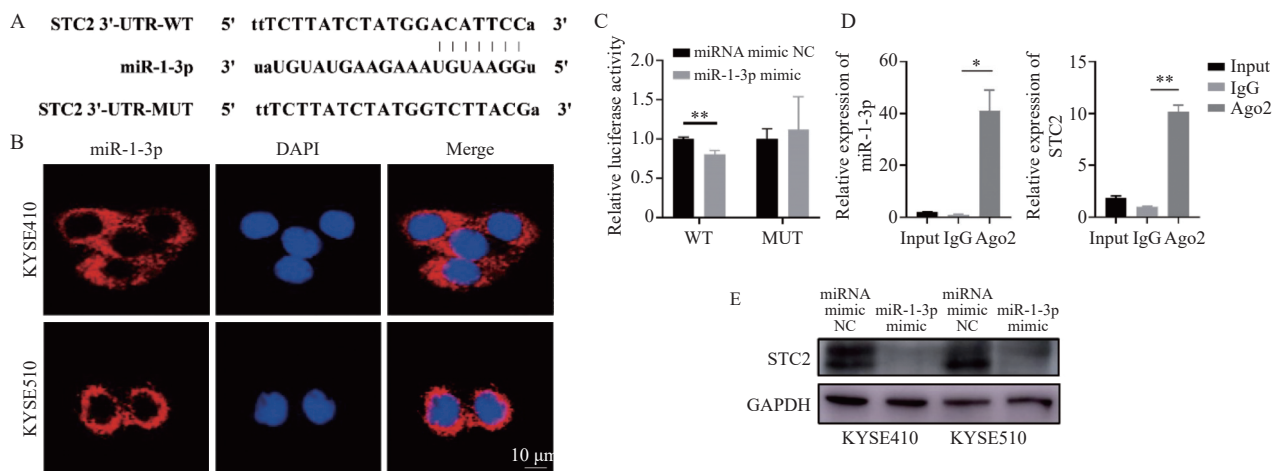
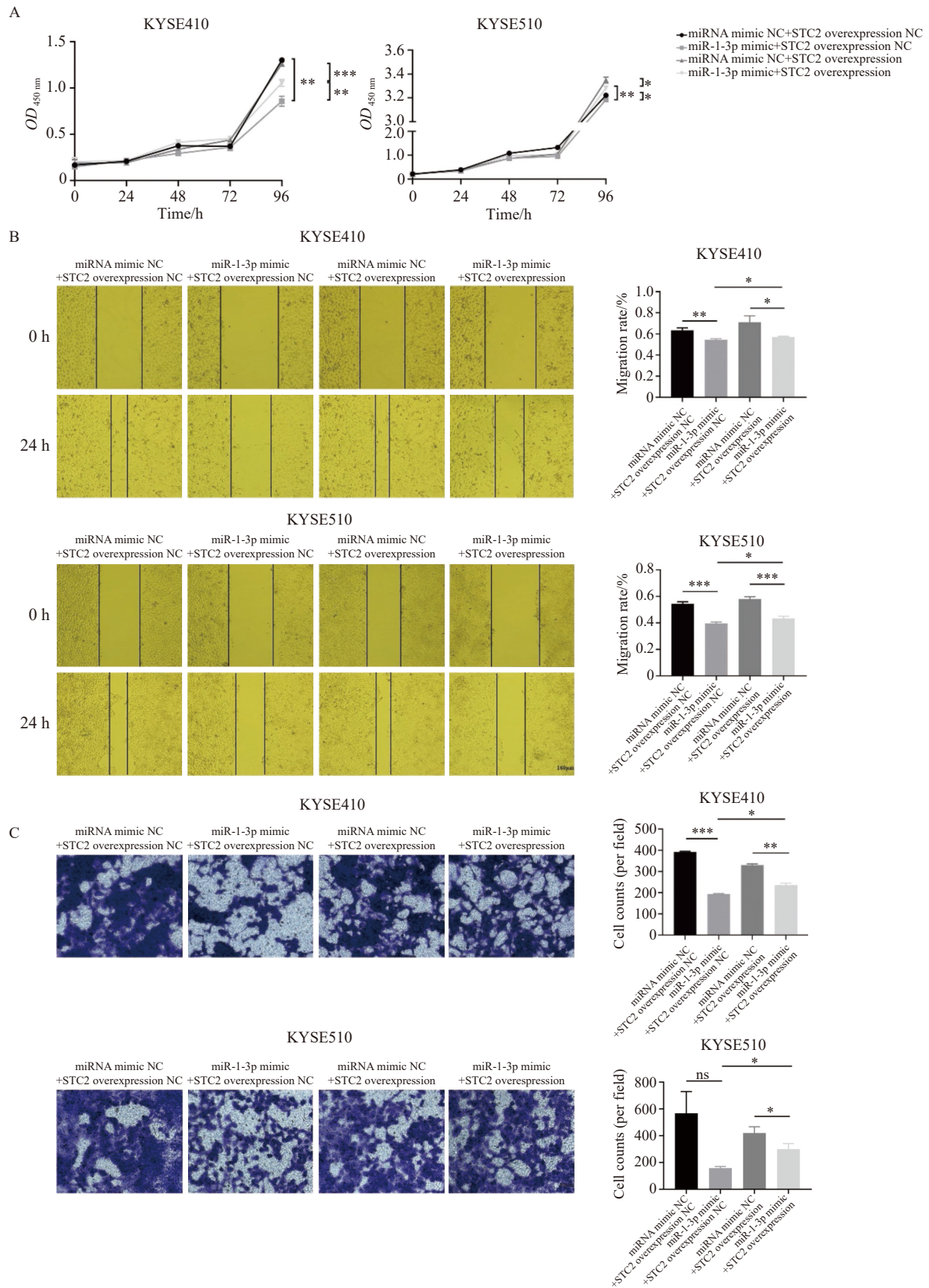


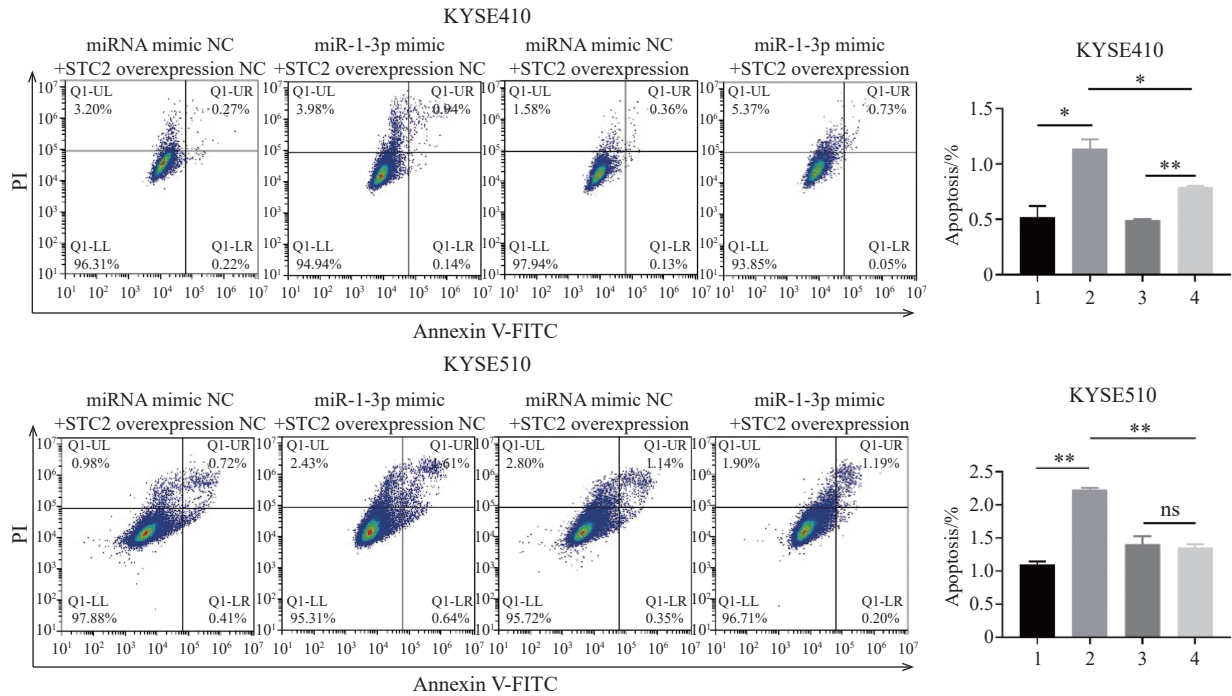
图5 ESCC细胞中miR-1-3p与STC2 mRNA 3'-UTR结合
Figure 5 miR-1-3p sponges STC2 mRNA 3'-UTR in ESCC cells



A-C: CCK-8, wound healing, and Transwell assays showed the effects of STC2 overexpression on the proliferation, migration, and invasion of ESCC cells. ***, $P < 0.001$, **, $P < 0.01$, *, $P < 0.05$, ns: no significance.

图7 过表达STC2促进ESCC细胞增殖、迁移和侵袭

Figure 7 STC2 overexpression promoted proliferation, migration and invasion of ESCC cells



*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ns: no significance. 1: miRNA mimic NC+STC2 overexpression NC; 2: miR-1-3p mimic+STC2 overexpression NC; 3: miRNA mimic NC+STC2 overexpression; 4: miR-1-3p mimic+STC2 overexpression.

图8 过表达STC2抑制ESCC细胞凋亡

Figure 8 STC2 overexpression inhibited apoptosis of ESCC cells

通过调控STC2抑制内质网应激从而在ESCC中发挥抑癌作用。

3 讨论

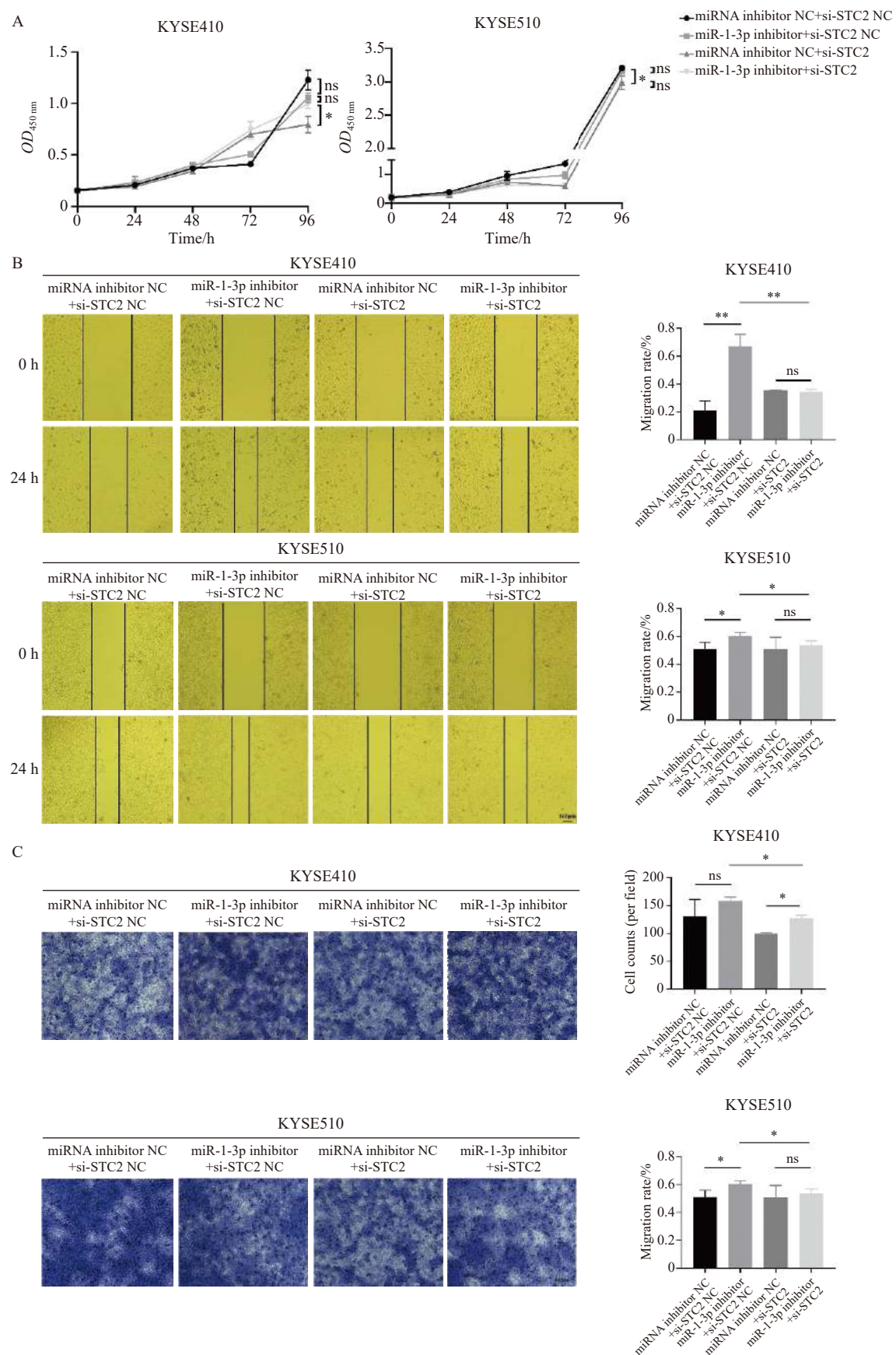
食管癌早期症状隐匿，大多数患者在确诊时已经处于中晚期^[13]。多项研究成果表明，miRNA在ESCC的发生发展中发挥重要作用，有望成为肿瘤进程中的新型治疗靶标^[14-16]。miR-1-3p是一种重要的抑癌miRNA，参与影响多种人类肿瘤细胞的恶性生物学行为，在多种恶性肿瘤中表达水平降低。例如，在结直肠癌中，miR-1-3p可通过下调NAMPT抑制肿瘤进展；在肺腺癌中，miR-1-3p/CELSR3轴可抑制肿瘤恶性表型；在肝细胞癌中，miR-1-3p/ORC6轴可诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡^[17-19]。然而，miR-1-3p在ESCC发生发展中的作用及相关机制尚未完全阐明。

本研究通过分析GEO数据库中ESCC患者肿瘤组织的miRNA表达数据，发现ESCC组织中miR-1-3p的表达水平较正常食管上皮组织显著降低。为验证miR-1-3p在ESCC细胞中的表达水平，进一步通过qRT-PCR检测证实了miR-1-3p在ESCC细胞中呈低表达状态，提示miR-1-3p可能在ESCC发生发展过程中发挥抑癌作用。维持增殖信号、激活侵袭和转移以及抵抗细胞死亡是肿瘤的重要恶性生物学行

为特征^[20]，本研究通过体外细胞实验探讨miR-1-3p在ESCC中的功能，结果表明miR-1-3p可抑制ESCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力，促进ESCC细胞的凋亡。以上结果说明miR-1-3p在ESCC的发生发展过程中作为抑癌miRNA发挥作用。

miRNA存在多种作用机制，其中通过种子序列与靶mRNA的3'-UTR上的互补序列结合，抑制靶mRNA的翻译或诱导其降解，最终在转录后水平调控基因表达是最常见的功能机制^[21-22]。本研究首先通过数据库分析筛选出miR-1-3p下游的靶基因STC2，TCGA数据库ESCC队列患者数据的分析结果显示，STC2在不同病理分期和淋巴结转移分级的ESCC组织中表达水平均较正常食管上皮组织显著升高。通过双荧光素酶报告基因实验和RIP实验验证了miR-1-3p和STC2 mRNA 3'-UTR的潜在结合性，Western blot证实了在ESCC细胞中miR-1-3p能够与STC2的结合从而下调其表达水平。

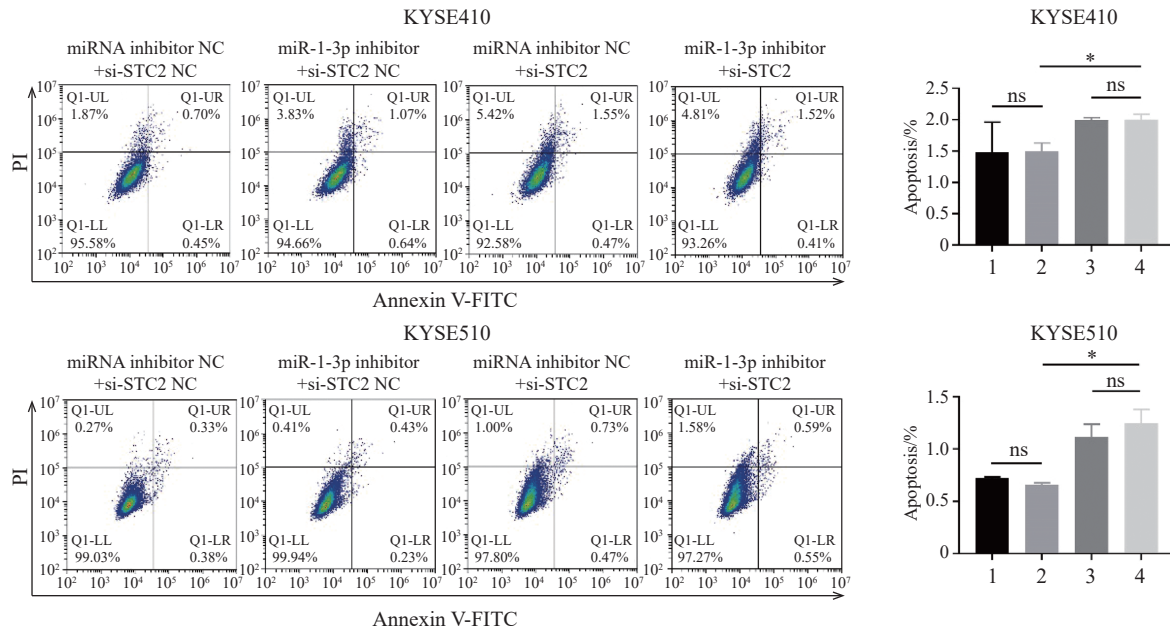
STC2最初作为一种调节钙和磷酸盐分泌的糖蛋白激素被发现^[23]。近期研究表明，STC2可通过调节未折叠蛋白反应（unfolded protein response, UPR）的PERK-eIF2 α -ATF4通路调控内质网应激的严重程度及其下游CHOP和JNK/NF- κ B通路的激活，起到细胞保护作用^[12, 24]。当细胞处于缺氧、营养缺乏及氧化应激等病理状态下时，错误折叠或未



A-C: CCK-8, wound healing, and Transwell assays showed the effects of STC2 knockdown on the proliferation, migration, and invasion of ESCC cells. **: $P<0.01$, *: $P<0.05$, ns: no significance.

图9 敲低STC2抑制ESCC细胞增殖、迁移和侵袭

Figure 9 STC2 knockdown inhibited the proliferation, migration, and invasion of ESCC cells



*: $P < 0.05$; ns: no significance. 1: miRNA inhibitor NC+si-STC2 NC; 2: miR-1-3p inhibitor+si-STC2 NC; 3: miRNA inhibitor NC+si-STC2; 4: miR-1-3p inhibitor+si-STC2.

图 10 敲低STC2促进ESCC细胞凋亡

Figure 10 STC2 knockdown promoted apoptosis of ESCC cells

折叠的蛋白质在内质网腔内过多蓄积，导致内质网应激，并进一步激活UPR^[25]。UPR通过减少蛋白质的转录翻译、增加错误折叠蛋白质的降解、上调分子伴侣促进蛋白折叠等多种方式缓解内质网应激、恢复内质网稳态^[26]。随后激活的UPR可以恢复内质网稳态，有利于细胞存活，促进肿瘤的发生发展、血管形成、免疫逃逸以及耐药，而持续加重的UPR则会诱导细胞凋亡^[27-31]。内质网应激在恶性肿瘤中广泛激活，慢性内质网应激已成为恶性肿瘤的标志之一^[32]。因此抑制UPR或激活内质网应激可能是有效的治疗手段。在ESCC中，抑制内质网应激可促进凋亡抑制肿瘤进展^[33]。本研究已经证实miR-1-3p可促进ESCC细胞凋亡，为探索其对内质网应激的影响，接下来通过Western blot检测了miR-1-3p对内质网应激PERK感受器通路的蛋白表达水平的影响，结果表明miR-1-3p可显著降低p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4蛋白的表达水平。同时，本研究还通过干预STC2的表达水平进行挽救实验，结果表明过表达和敲低STC2能够分别拮抗miR-1-3p mimic和miR-1-3p inhibitor对ESCC细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。以上结果提示，miR-1-3p可能通过调控STC2的表达来抑制内质网应激相关的PERK-eIF2 α -ATF4效应通路进而抑制ESCC进展。

综上所述，miR-1-3p在ESCC细胞中低表达，

miR-1-3p通过下调STC2的表达抑制ESCC细胞增殖、迁移、侵袭，并可通过抑制内质网应激促进凋亡。本研究为筛选ESCC诊断和治疗的生物标志物提供了潜在靶点，并为进一步阐释ESCC的发病机制奠定了理论基础。

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] Feng R, Su Q, Huang X, *et al.* Cancer situation in China: what does the China cancer map indicate from the first national death survey to the latest cancer registration?[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2023, 43(1): 75-86.
- [2] An L, Li M, Jia Q. Mechanisms of radiotherapy resistance and radiosensitization strategies for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 140.
- [3] Morgan E, Soerjomataram I, Rungay H, *et al.* The global landscape of esophageal squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma incidence and mortality in 2020 and projections to 2040: new estimates from GLOBOCAN 2020 [J]. *Gastroenterology*, 2022, 163(3): 649-658. e2.
- [4] He S, Xu J, Liu X, *et al.* Advances and challenges in the treatment of esophageal cancer[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11): 3379-3392.
- [5] Sui X, Chen C, Zhou X, *et al.* Integrative analysis of bulk and single-cell gene expression profiles to identify tumor-associated macrophage-derived CCL18 as a therapeutic target of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1):

- 51.
- [6] Pelletier D, Rivera B, Fabian MR, *et al.* miRNA biogenesis and inherited disorders: clinico-molecular insights[J]. *Trends Genet*, 2023, 39(5): 401-414.
- [7] Kim T, Croce CM. microRNA: trends in clinical trials of cancer diagnosis and therapy strategies[J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(7): 1314-1321.
- [8] Deng P, Li K, Gu F, *et al.* LINC00242/miR-1-3p/G6PD axis regulates Warburg effect and affects gastric cancer proliferation and apoptosis[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 9.
- [9] Du G, Yu X, Chen Y, *et al.* miR-1-3p suppresses colorectal cancer cell proliferation and metastasis by inhibiting YWHAZ-mediated epithelial-mesenchymal Ttransition[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 634596.
- [10] Liu PJ, Chen YH, Tsai KW, *et al.* Involvement of microRNA-1-FAM83A axis dysfunction in the growth and motility of lung cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8833.
- [11] Tadros SA, Attia YM, Maurice NW, *et al.* Thymoquinone suppresses angiogenesis in DEN-induced hepatocellular carcinoma by targeting miR-1-3p[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15904.
- [12] Joshi AD. New insights into physiological and pathophysiological functions of stanniocalcin 2[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 172.
- [13] Shan MA, Altorki N, Patel P, *et al.* Improving outcomes in patients with oesophageal cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(6): 390-407.
- [14] Fong LY, Huebner K, Jing R, *et al.* Zinc treatment reverses and anti-Zn-regulated miRs suppress esophageal carcinomas in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(20): e2220334120.
- [15] Guo M, Lian J, Liu Y, *et al.* Loss of miR-637 promotes cancer cell stemness via WASH/IL-8 pathway and serves as a novel prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Biomark Res*, 2022, 10(1): 77.
- [16] Xue ST, Zheng B, Cao SQ, *et al.* Long non-coding RNA LINC00680 functions as a ceRNA to promote esophageal squamous cell carcinoma progression through the miR-423-5p/PAK6 axis[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 69.
- [17] Lv X, Zhang J, Zhang J, *et al.* A negative feedback loop between NAMPT and TGF- β signaling pathway in colorectal cancer cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 187-198.
- [18] Miao H, Zeng Q, Xu S, *et al.* miR-1-3p/CELSR3 participates in regulating malignant phenotypes of lung adenocarcinoma cells[J]. *Curr Gene Ther*, 2021, 21(4): 304-312.
- [19] Chen H, Bao L, Hu J, *et al.* ORC6, negatively regulated by miR-1-3p, promotes proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 652292.
- [20] Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31-46.
- [21] Khanbabaei H, Ebrahimi S, García-Rodríguez JL, *et al.* Non-coding RNAs and epithelial mesenchymal transition in cancer: molecular mechanisms and clinical implications[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 278.
- [22] 王娅菲, 耿天祥, 陈林林, 等. miR-524-5p调控HEG1表达对食管癌细胞上皮间质转化的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2023, 50(11): 1059-1065. [Wang YF, Geng TX, Chen LL, *et al.* Effect of miR-524-5p on Epithelial-mesenchymal Transition in Esophageal Cancer Cells by Regulating HEG1 Expression[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2023, 50(11): 1059-1065.]
- [23] Jiang K, Yin X, Zhang Q, *et al.* STC2 activates PRMT5 to induce radioresistance through DNA damage repair and ferroptosis pathways in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Redox Biol*, 2023, 60: 102626.
- [24] Qie S, Sang N. Stanniocalcin 2 (STC2): a universal tumour biomarker and a potential therapeutical target[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 161.
- [25] Limia C, Sauzay C, Urra H, *et al.* Emerging roles of the endoplasmic reticulum associated unfolded protein response in cancer cell migration and invasion[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(5): 631.
- [26] Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum stress in lung disease[J]. *Eur Respir Rev*, 2017, 26(144): 170018.
- [27] Chee YH, Samali A, Robinson CM. Unfolded protein response at the cross roads of tumourigenesis, oxygen sensing and drug resistance in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(6): 188814.
- [28] Izadpanah A, Willingham K, Chandrasekar B, *et al.* Unfolded protein response and angiogenesis in malignancies[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(2): 188839.
- [29] Salvagno C, Mandula JK, Rodriguez PC, *et al.* Decoding endoplasmic reticulum stress signals in cancer cells and antitumor immunity[J]. *Trends in Cancer*, 2022, 8(11): 930-943.
- [30] Akman M, Belisario DC, Salaroglio IC, *et al.* Hypoxia, endoplasmic reticulum stress and chemoresistance: dangerous liaisons[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 28.
- [31] Celik C, Lee SYT, Yap WS, *et al.* Endoplasmic reticulum stress and lipids in health and diseases[J]. *Prog Lipid Res*, 2023, 89: 101198.
- [32] Wang H, Mi K. Emerging roles of endoplasmic reticulum stress in the cellular plasticity of cancer cells[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1110881.
- [33] Yin X, Zhang P, Xia N, *et al.* GPx8 regulates apoptosis and autophagy in esophageal squamous cell carcinoma through the IRE1/JNK pathway[J]. *Cell Signal*, 2022, 93: 110307.

[编辑: 邱颖慧; 校对: 刘红武]

作者贡献:

于 凡: 设计研究方案、实验操作及论文撰写

王佳琪: 部分实验操作、论文撰写及修改

高常林: 数据分析

司嘉鑫: 部分实验操作、数据分析

吕 微: 部分实验操作、论文撰写及修改

贾云龙: 数据分析、论文审阅及修改

刘丽华: 论文整体设计、撰写及修改