

微小RNA-218通过靶向调控 *LASP1* 影响食管癌细胞的生物学行为

郑雨虹，马月，张颖，赵超，刘冉，浦跃朴，尹立红

东南大学公共卫生学院环境医学工程教育部重点实验室，江苏 南京 210009

摘要：

[目的] 微小RNA-218 (miR-218) 作为一种肿瘤抑制因子，参与多种肿瘤的发生与进展。肌动蛋白骨架蛋白1 (*LASP1*) 是一种新的肌动蛋白结合蛋白，参与细胞骨架的重组调控及细胞迁移，与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关。食管癌细胞中 miR-218 与 *LASP1* 基因间的调控关系尚未有报道，本研究对食管癌细胞中 miR-218 是否可以通过靶向调控 *LASP1* 而发挥抑癌作用进行初步探讨。

[方法] 应用实时定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 3 株食管癌细胞 (EC109、EC9706、KYSE510) 和 1 株永生化食管上皮细胞 (Het-1A) 中 miR-218 的表达水平。以 EC109 为靶细胞，分别转染 miR-218 模拟物 (miR-218 mimic)、miR-218 mimic 的空载体对照 (miR-NC)、*LASP1* 的小干扰 RNA (si-*LASP1*)、miR-218 mimic 和 si-*LASP1* (miR-218 mimic + si-*LASP1*) 以及 si-*LASP1* 的空载体对照 (si-NC)。采用 qRT-PCR 和 Western blot 法检测细胞的转染效果，采用细胞增殖与毒性检测试剂盒观察各组细胞生长曲线，采用细胞平板克隆形成实验、Transwell 小室法和流式细胞术检测细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡，通过生物信息学分析和双荧光素酶报告基因实验对 miR-218 的靶基因进行预测及验证。

[结果] KYSE510、EC109 和 EC9706 中 miR-218 表达水平分别为 Het-1A 的 0.32%、1.81% 和 2.15% (均 $P < 0.05$)。生物信息学分析结果显示 *LASP1* 的 3' 非编码区有 miR-218 的结合位点，miR-218 mimic 转染组 EC109 中 *LASP1* mRNA 表达水平是 miR-NC 转染组的 28.20% ($P < 0.05$)，Western blot 结果显示过表达 miR-218 可下调 *LASP1* 蛋白表达水平。双荧光素酶报告基因实验结果显示 *LASP1*-WT (野生型) +miR-218 mimic 组的荧光素酶活性为 0.31 ± 0.02 ，低于 *LASP1*-WT+miR-NC 组 (0.56 ± 0.04) 和 *LASP1*-MUT (突变型) +miR-218 mimic 组 (0.49 ± 0.07) (均 $P < 0.05$)。与 miR-NC 组相比，转染 miR-218 mimic 可抑制 EC109 的生长速率、迁移和侵袭能力 (均 $P < 0.05$)，促进细胞凋亡 ($P < 0.05$)。转染 si-*LASP1* 的 EC109 观察到相同的结果趋势。与 si-*LASP1* 单独转染组比较，miR-218 mimic 和 si-*LASP1* 共转染组细胞生长速率下降，平板克隆形成率降低 ($P < 0.05$)，迁移和侵袭能力降低 ($P < 0.05$)，凋亡增加 ($P < 0.05$)。

[结论] miR-218 在食管癌细胞中低表达；在 EC109 中 miR-218 可通过直接靶向调控 *LASP1* 基因的表达，抑制细胞的增殖、迁移和侵袭，促进凋亡，从而在食管癌的发展进程中发挥抑癌作用。

关键词：食管癌；miR-218；*LASP1*；增殖；迁移；侵袭；凋亡

MicroRNA-218 affects the biological behavior of esophageal cancer cells by targeting *LASP1*

ZHENG Yu-hong, MA Yue, ZHANG Ying, ZHAO Chao, LIU Ran, PU Yue-pu, YIN Li-hong (Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering of Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract:

[Objective] As a tumor suppressor, microRNA-218 (miR-218) is involved in the occurrence and progression of various tumors. Actin cytoskeleton protein 1 (LIM and SH3 domain structure protein 1, LIM and SH3 protein 1, *LASP1*) is a newly identified actin binding protein, participating in cytoskeleton reorganization regulation and cell migration, and closely related to the proliferation, invasion, and metastasis of tumor. The regulatory relationship between miR-218 and *LASP1* in esophageal cancer cells has not been reported. Therefore, this study aims to investigate whether miR-218 functions as a tumor suppressor by targeting *LASP1*.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18618

基金项目

国家自然科学基金项目 (81872588, 81573191, 81573108)

作者简介

郑雨虹 (1993—)，女，研究生；
E-mail : 2512057378@qq.com

通信作者

尹立红，E-mail : lhyin@seu.edu.cn

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-09-21

录用日期 2018-12-06

文章编号 2095-9982(2019)03-0217-09

中图分类号 R135

文献标志码 A

▶引用

郑雨虹，马月，张颖，等. 微小RNA-218通过靶向调控 *LASP1* 影响食管癌细胞的生物学行为 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (3) : 217-225.

▶本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18618

Funding

This study was funded.

Correspondence to

YIN Li-hong, E-mail: lhyin@seu.edu.cn

Competing interests None declared

Received 2018-09-21

Accepted 2018-12-06

▶To cite

ZHENG Yu-hong, MA Yue, ZHANG Ying, et al. MicroRNA-218 affects the biological behavior of esophageal cancer cells by targeting *LASP1* [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(3): 217-225.

▶Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18618

[Methods] The expression levels of miR-218 in three esophageal cancer cells (EC109, EC9706, and KYSE510) and one permanent esophageal epithelial cell (Het-1A) were detected by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). EC109 was separately transfected with miR-218 mimic, negative control of miR-218 mimic (miR-NC), small interfering RNA of *LASP1* (*si-LASP1*), miR-218 mimic + *si-LASP1*, and negative control of *si-LASP1* (*si-NC*). The cell transfection efficiency was detected by qRT-PCR and Western blot; the cell growth curve of each group was observed by cell proliferation and toxicity assay kit (Cell Counting Kit-8, CCK-8); the cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis were detected by plate clone formation experiment, Transwell assay, and flow cytometry; the target genes of miR-218 were predicted and verified by bioinformatics analysis and dual-luciferase reporter gene experiment.

[Results] The expressions of miR-218 in KYSE510, EC109, and EC9706 were 0.32%, 1.81%, and 2.15% of that in Het-1A respectively ($P < 0.05$). The results of bioinformatics analysis showed that 3' untranslated regions (3'UTR) of *LASP1* had binding sites of miR-218, and *LASP1* mRNA expression level in EC109 transfected with miR-218 mimic was 28.20% of that in miR-NC transfection group ($P < 0.05$); the Western blot results showed that overexpression of miR-218 down-regulated *LASP1* protein expression level. The dual-luciferase reporter gene experiment showed that the luciferase activity in the *LASP1*-WT (wild type) + miR-218 mimic group was 0.31 ± 0.02 , lower than those in the *LASP1*-WT + miR-NC group (0.56 ± 0.04) and the *LASP1*-MUT (mutant) + miR-218 mimic group (0.49 ± 0.07) ($P < 0.05$). Compared with the miR-NC group, transfection with miR-218 mimic inhibited the growth rate, cell plate clone formation rate, cell migration, and cell invasion ($P < 0.05$), as well as promoted cell apoptosis rate ($P < 0.05$). The same trend pattern was observed in EC109 transfected with *si-LASP1*. Compared with the EC109 transfected with *si-LASP1* alone, co-transfection with miR-218 mimic and *si-LASP1* lowered the cell growth rate, plate clone formation rate ($P < 0.05$), migration ($P < 0.05$), and invasion ($P < 0.05$), as well as elevated cell apoptosis rate ($P < 0.05$).

[Conclusion] The findings show low miR-218 expression in esophageal cancer cells. In addition, miR-218 may inhibit the proliferation, migration, and invasion and promote the apoptosis of esophageal cancer cells by directly targeting *LASP1* gene expression in EC109, playing a cancer suppressive role in the development of esophageal cancer.

Keywords: esophageal cancer; miR-218; *LASP1*; proliferation; migration; invasion; apoptosis

食管癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一^[1]。全球约70%的食管癌发生在中国，其中90%为食管鳞状细胞癌^[2]。食管癌的发生、发展是一个复杂过程，涉及多种致癌的信号传导通路，其中表观遗传学变化的作用日益受到关注^[3]。微小RNA (microRNA, miRNA/miR) 作为一种表观遗传调控方式成为研究热点。miRNA是一类长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子，通过直接与靶mRNA的3'非编码区(3'-untranslated region, 3'UTR)结合，从而导致mRNA降解或翻译抑制^[4-5]。研究表明，miRNA的异常表达与多种肿瘤的发生、发展密切相关，其主要通过调控靶mRNA发挥癌基因或抑癌基因的作用^[6]。近期有文献报道，miR-218在多种肿瘤中表达下调，包括胃癌、鼻咽癌、宫颈鳞状细胞癌、肺癌、胶质母细胞瘤等^[7-11]，表明miR-218可能具有抑癌功能，但具体作用机制仍待阐明。

肌动蛋白骨架蛋白1(LIM和SH3结构域蛋白1, LIM and SH3 protein 1, *LASP1*)是一种新的肌动蛋白结合蛋白，参与细胞骨架的重组调控及细胞迁移，在多种恶性肿瘤中高表达，并与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关^[12]。已有研究证实，在食管癌细胞中，*LASP1*基因可作为miR-203、miR-133b、miR-1的靶点^[13-15]，但其与miR-218关系尚未有文献报道。有研究指出，

在膀胱癌和前列腺癌中，miR-218可通过调控*LASP1*的表达抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭^[16-17]。本研究对食管癌细胞中miR-218是否可通过靶向调控*LASP1*而发挥抑癌作用进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人食管癌细胞株(EC109、EC9706、KYSE510)和永生化食管上皮细胞株(Het-1A)，均由东南大学公共卫生学院环境医学工程教育部重点实验室提供；RPMI1640细胞培养基(广州洁特，中国)；胎牛血清(Genial，美国)；miR-218模拟物(miR-218 mimic)、*LASP1*的小干扰RNA(*si-LASP1*)、miR-218引物和U6引物(广州锐博，中国)；*LASP1*和GAPDH的引物(南京金斯瑞，中国)；*LASP1*鼠单克隆抗体(上海圣克鲁斯，中国)；β-Actin鼠单克隆抗体(Proteintech，美国)；辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)(南京福麦斯，中国)；qRT-PCR试剂盒(Takara，日本)；Opti-MEM培养基(Gibco，美国)；细胞增殖与毒性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)(上海七海复泰，中国)；细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基，中国)；Transwell小室(Corning，美国)；基质胶(BD，美国)；双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega，美国)；野生型

及突变性 *LASP1* 基因 3'UTR- 荧光素酶表达载体的构建和测序由苏州金唯智公司提供。

1.2 实验组设计

将 EC109 分为 5 组：miR-218 组 (miR-218 mimic 转染)、miR-NC 组 (miR-218 mimic 的空载体对照)、si-*LASP1* 组 (si-*LASP1* 转染)、miR-218 mimic+si-*LASP1* 组 (miR-218 mimic 和 si-*LASP1* 共转染) 以及 si-NC 组 (si-*LASP1* 的空载体对照)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及转染 食管癌细胞 (EC109、EC9706、KYSE510) 和永生化食管上皮细胞 (Het-1A) 接种于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI1640 培养基中，置于 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养。转染前 1 d，以细胞密度 3×10^5 个/孔接种到 6 孔板、 5×10^3 个/孔接种到 96 孔板，待融合度达 50%~60% 时进行转染。整个转染过程严格按照 Invitrogen 公司提供的 LipofectamineTM2000 说明书进行。

1.3.2 qRT-PCR 检测 收集细胞提取总 RNA，分别以 *U6/GAPDH* 为内参，对 EC109 中 *miR-218*、*LASP1* 的表达水平进行检测。反转录条件为 37°C、15 min，85°C、5 s，4°C 保存。荧光定量 PCR 反应条件为 94°C 预变性 30 s，94°C、5 s，60°C、30 s，40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *miR-218*、*LASP1* 的相对表达量。

1.3.3 Western blot 检测 转染 48 h 后收集细胞，放射免疫沉淀法 (RIPA) 提取总蛋白，二喹啉甲酸 (BCA) 检测蛋白浓度。SDS/PAGE 凝胶电泳，转膜，封闭；一抗孵育：*LASP1* (1:1000) 稀释，β-Actin (1:5000) 稀释，4°C 孵育过夜。TSBT 缓冲液洗膜后，二抗 (1:2000) 稀释，室温孵育 1 h，免疫印迹化学发光试剂显影曝光。

1.3.4 CCK-8 检测细胞增殖活性 细胞接种于 96 孔板，每组设 5 个平行，同时设空白对照组，分别于转染后 24、48、72、96 h 检测细胞光密度 (*D*) 值。检测时每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，继续培养 2 h，酶标仪测定 450 nm 波长处的 *D* 值，绘制细胞生长曲线。

1.3.5 细胞平板克隆形成实验 转染 48 h 后，收集细胞，以细胞密度 1×10^3 个/孔接种于 6 孔板中，置 37°C、5%CO₂ 培养箱中连续培养 10 d，弃原培养基，PBS 洗涤 1 次，甲醛固定 15 min，PBS 洗涤 2 次，结晶紫染色 30 min，肉眼计数拍照保存，克隆形成率 = (克隆数 / 接种细胞数) × 100%。

1.3.6 Transwell 小室法检测细胞迁移和侵袭 细胞迁移和侵袭实验方法参考文献 [7, 18]，迁移实验的

具体步骤如下：转染 24 h 后，收集细胞，以细胞密度 2×10^5 个/孔种入 Transwell 上室，补足无血清培养基至 150 μL，下室加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的培养基，置于 37°C、5%CO₂ 培养箱培养 24 h 后，取出小室，甲醛固定 15 min，结晶紫染色 30 min，PBS 淋洗小室。待膜风干后，拍照、计数，比较不同处理组穿膜的细胞数量。

侵袭实验的具体步骤如下：使用 Matrigel 胶与无血清培养基按 1:8 比例配制 Matrigel 稀释液，加入 Transwell 上室底部，50 μL/孔，4°C 放置过夜。转染 24 h 后，收集细胞，以细胞密度 5×10^5 个/孔种入 Transwell 上室，后步骤同迁移实验。

1.3.7 AnnexinV-PI 双染检测细胞凋亡 转染 48 h 后，收集细胞，每组 3 个平行样，每个样取 3×10^5 个细胞，2000 r/min (离心半径 10.5 cm) 离心 5 min，弃上清，PBS 洗涤 2 次，300 μL 结合缓冲液重悬细胞。随后每孔加入 3 μL AnnexinV-FITC 和 3 μL PI 进行标记，避光室温反应 15 min，1 h 内用流式细胞仪分析细胞凋亡。

1.3.8 双荧光素酶报告基因实验 通过生物信息学方法，用靶基因预测数据库 TargetScan 预测 *miR-218* 的靶基因，获得预测值较高的靶点 (*LASP1*)，根据 *miR-218* 与 *LASP1* 的 3'UTR 的结合位点，合成 *LASP1* 的野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 3'UTR，然后将其分别克隆至载体 pmir-GLO，构建质粒 pmirGLO-WT-*LASP1* 和 pmirGLO-MUT-*LASP1*。EC109 细胞转染 WT-*LASP1*-3'UTR 或 MUT-*LASP1*-3'UTR 载体，外加 miR-NC 或 miR-218 mimic。转染 48 h 后，使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒和荧光素酶检测仪进行检测。实验结果以检测到的萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性的比值进行统计学分析。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 19.0 软件分析数据，计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组之间比较用 *t* 检验，三组及以上比较用方差分析，多组之间两两比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。采用 GraphPad Prism5 软件进行作图。

2 结果

2.1 miR-218 在受试细胞株中的表达水平

对 3 株食管癌细胞 (EC109、EC9706、KYSE510) 和 1 株永生化食管上皮细胞 (Het-1A) 中 *miR-218* 的表达水平进行检测，结果显示 *miR-218* 在 3 种食管癌细胞中的表达均低于永生化食管上皮细胞 (均 $P < 0.05$)，

见图1。

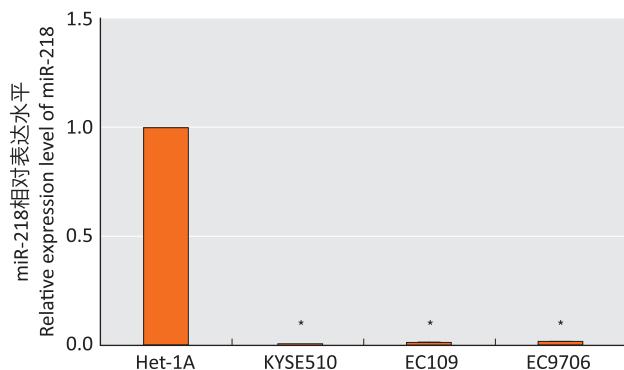
2.2 miR-218 mimic转染效率的检测

qRT-PCR检测结果显示,转染miR-218 mimic (miR-218组)的EC109中miR-218表达水平是空载体对照组(miR-NC组)的5 000多倍($P<0.05$)，说明miR-218 mimic转染成功。

2.3 过表达miR-218对食管癌细胞生物学行为的影响

2.3.1 增殖 转染24 h后,miR-218组细胞生长速率低于miR-NC组($P<0.05$) (图2A)。同时,细胞平板克隆形成实验结果(图2B、2C)也显示miR-218组细胞克隆数少于miR-NC组($P<0.05$)。

2.3.2 迁移和侵袭 Transwell实验结果(图3)显示,过表达miR-218后(miR-218组),穿透微孔膜的细胞数均明显少于miR-NC组($P<0.05$)。

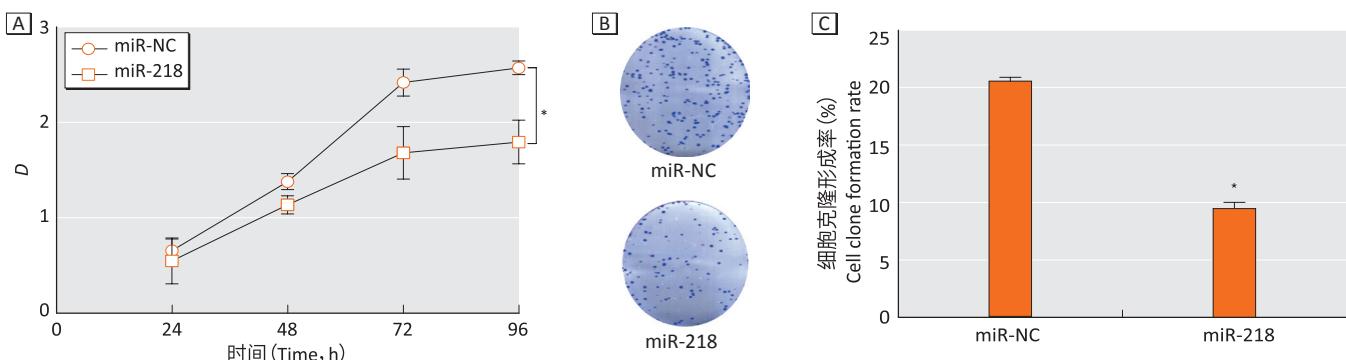


[注] * : 与 Het-1A 比较, $P<0.05$ 。

[Note] *: Compared with Het-1A, $P<0.05$.

图1 3种食管癌细胞和永生化食管上皮细胞中miR-218的表达水平

Figure 1 The expression levels of miR-218 in three kinds of esophageal cancer cells and one kind of permanent esophageal epithelial cells

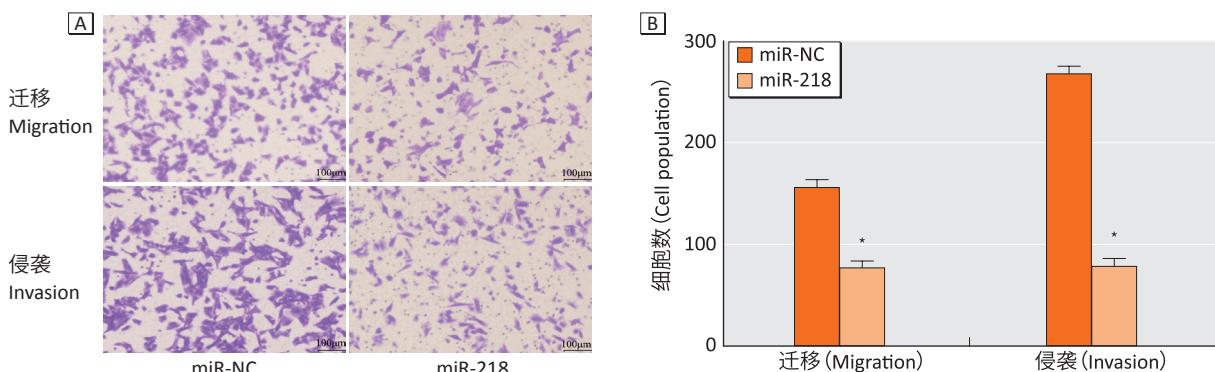


[注] A: miR-218组与miR-NC组细胞生长曲线图; B: miR-218组与miR-NC组细胞平板克隆形成实验结果; C: miR-218组与miR-NC组细胞平板克隆形成率比较; *: 与miR-NC组比较, $P<0.05$ 。

[Note] A: The cell growth curves of miR-218 group and miR-NC group; B: The plate clone formation experiment results of miR-218 group and miR-NC group; C: The comparison of plate clone formation experiment results between miR-218 group and miR-NC group; *: Compared with the miR-NC group, $P<0.05$.

图2 过表达miR-218对EC109增殖能力的影响

Figure 2 The effect of miR-218 overexpression on EC109 proliferation



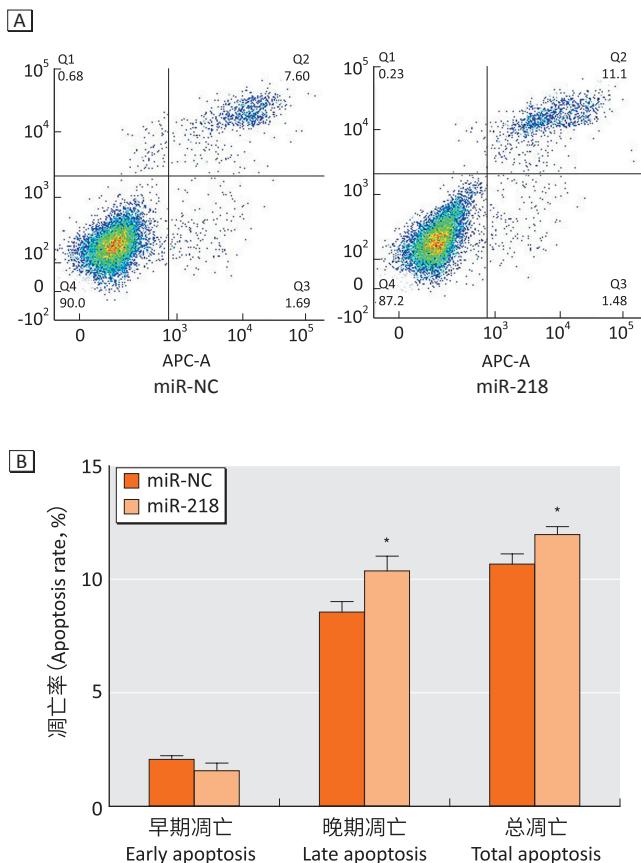
[注] A: miR-218组与miR-NC组细胞迁移和侵袭结果; B: miR-218组与miR-NC组细胞迁移和侵袭能力比较; *: 与miR-NC组比较, $P<0.05$ 。

[Note] A: The cell migration and invasion of miR-218 group and miR-NC group; B: The comparison of cell migration and invasion between miR-218 group and miR-NC group; *: Compared with the miR-NC group, $P<0.05$.

图3 过表达miR-218对EC109迁移和侵袭的影响

Figure 3 The effects of miR-218 overexpression on EC109 migration and invasion

2.3.3 凋亡 AnnexinV-PI双染检测结果(图4)显示miR-218组的总凋亡率[(12.06 ± 0.46)%]高于miR-NC组[(10.40 ± 0.97)%]($P<0.05$)。



[注] A: miR-218 组与 miR-NC 组细胞凋亡结果；B: miR-218 组与 miR-NC 组细胞凋亡率的比较；*: 与 miR-NC 组比较， $P<0.05$ 。

[Note] A: The apoptosis of miR-218 group and miR-NC group; B: Comparison of apoptosis rates between miR-218 group and miR-NC group; *: Compared with the miR-NC group, $P<0.05$.

图4 过表达miR-218对EC109凋亡的影响

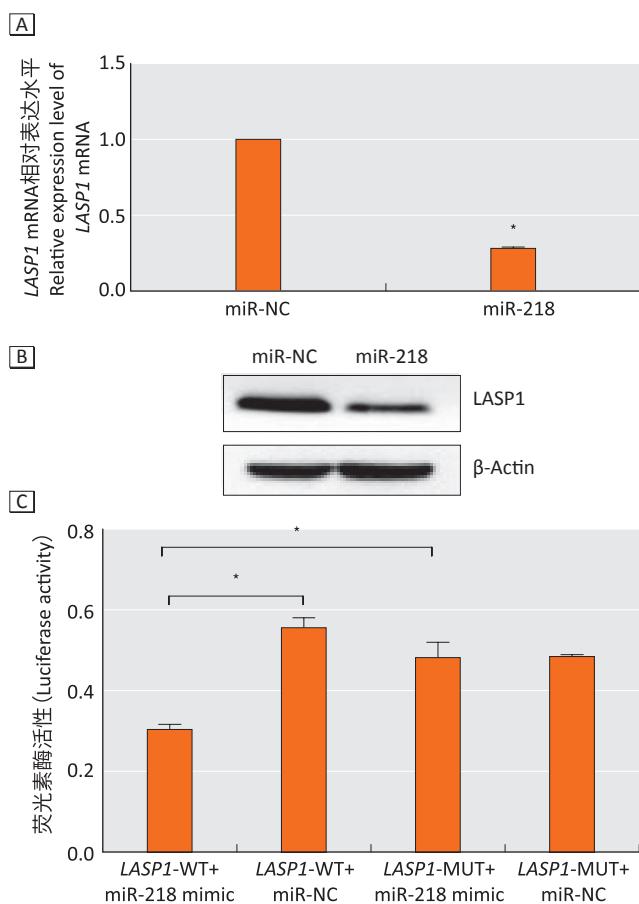
Figure 4 The effect of miR-218 overexpression on EC109 apoptosis

2.4 miR-218靶基因的预测及验证

经数据库TargetScan预测*LASP1*是miR-218的靶基因。qRT-PCR和Western blot检测结果(图5A和5B)显示,转染miR-218 mimic的EC109中*LASP1*mRNA和蛋白表达均下调(均 $P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验结果(图5C)显示,与*LASP1*-WT+miR-NC组和*LASP1*-MUT+miR-218 mimic组比较,*LASP1*-WT+miR-218 mimic转染组细胞荧光素酶活性分别减少45%和37%(均 $P<0.05$)。以上结果说明,EC109中*LASP1*是miR-218的直接靶基因。

2.5 si-LASP1转染效果的检测

qRT-PCR和Western Blot结果(图6A、B)显示,si-*LASP1*能够有效下调EC109中*LASP1*的表达($P<0.05$)。

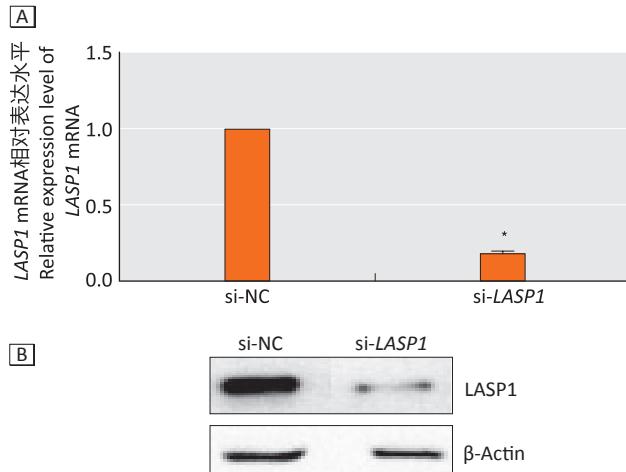


[注] A、B: 过表达miR-218对*LASP1*mRNA和蛋白表达的影响；C: 双荧光素酶报告基因实验结果比较。*: $P<0.05$ 。

[Note] A and B: The effects of miR-218 overexpression on *LASP1*mRNA and protein expression; C: Comparison of dual-luciferase reporter gene experiment results; *: $P<0.05$.

图5 miR-218靶基因的验证

Figure 5 The validation of the target genes of miR-218



[注] A、B: 转染si-*LASP1*后, EC109中*LASP1*mRNA和蛋白表达水平, *: 与si-NC组比较, $P<0.05$ 。

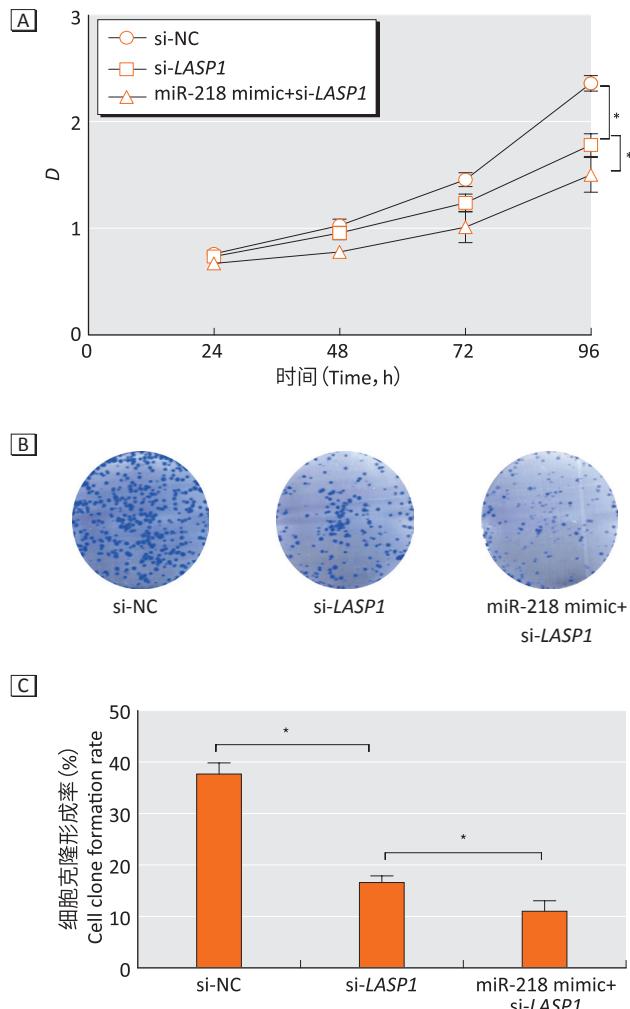
[Note] A and B: After transfecting with si-*LASP1*, the *LASP1*mRNA and protein expression of EC109; *: Compared with the si-NC group, $P<0.05$.

图6 si-*LASP1*转染效果的检测

Figure 6 Detection of si-*LASP1* transfection results

2.6 转染 si-LASP1 对食管癌细胞生物学行为的影响

2.6.1 增殖 细胞生长曲线(图7A)显示, si-LASP1转染组细胞生长速率低于阴性对照组, miR-218 mimic和si-LASP1共转染组细胞生长抑制更加明显($P<0.05$)。同时,细胞平板克隆形成实验(图7B、7C)也观察到相同结果($P<0.05$)。



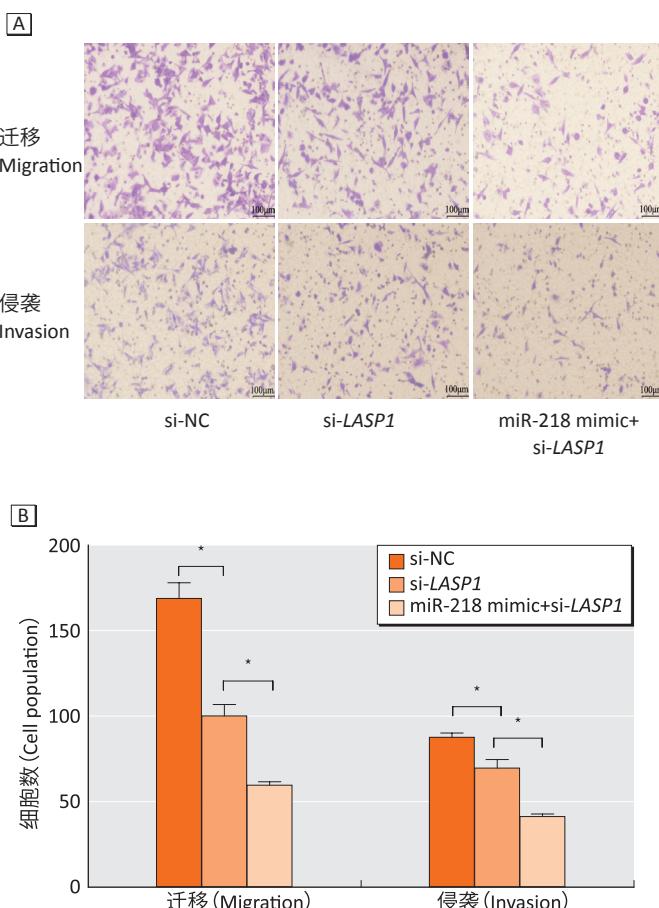
[注] A : si-NC 组、si-LASP1 组与 miR-218+si-LASP1 组细胞生长曲线图 ; B : si-NC 组、si-LASP1 组与 miR-218+si-LASP1 组细胞平板克隆形成实验结果 ; C : si-NC 组、si-LASP1 组与 miR-218+si-LASP1 组细胞平板克隆形成率比较 ; * : $P<0.05$ 。

[Note] A: The cell growth curves of si-NC group, si-LASP1 group, and miR-218 + si-LASP1 group; B: The plate clone formation experiment results of si-NC group, si-LASP1 group, and miR-218 + si-LASP1 group; C: The comparison of plate clone formation rates among si-NC group, si-LASP1 group, and miR-218 + si-LASP1 group; *: $P<0.05$.

图7 转染 si-LASP1 对 EC109 增殖能力的影响

Figure 7 The effect of si-LASP1 transfection on EC109 proliferation

2.6.2 迁移和侵袭 Transwell实验结果(图8)表明, si-LASP1转染组细胞的迁移和侵袭能力低于空载体对照组($P<0.05$), miR-218 mimic和si-LASP1共转染组细胞迁移和侵袭能力抑制作用更明显($P<0.05$)。



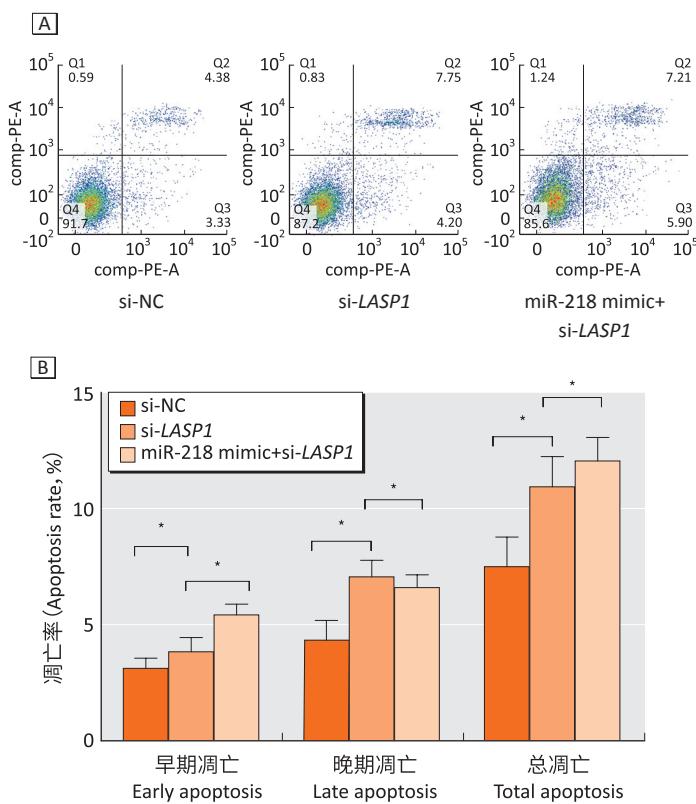
[注] A : si-NC 组、si-LASP1 组与 miR-218+si-LASP1 组细胞迁移和侵袭结果 ; B : si-NC 组、si-LASP1 组与 miR-218+si-LASP1 组细胞迁移和侵袭能力比较 ; * : $P<0.05$ 。

[Note] A: The cell migration and invasion of si-NC group, si-LASP1 group, and miR-218 + si-LASP1 group; B: The comparison of cell migration and invasion among si-NC group, si-LASP1 group, and miR-218 + si-LASP1 group; *: $P<0.05$.

图8 转染 si-LASP1 对 EC109 迁移和侵袭的影响

Figure 8 The effects of si-LASP1 transfection on EC109 migration and invasion

2.6.3 凋亡 AnnexinV-PI双染检测结果(图9)显示, si-LASP1转染组细胞总凋亡率(10.96 ± 1.30)%高于空载体对照组(7.53 ± 1.28)%($P<0.05$), miR-218 mimic和si-LASP1共转染组细胞总凋亡率最高(12.09 ± 1.01)%($P<0.05$)。



[注] A : si-NC 组、si-LASP1 组与 miR-218+si-LASP1 组细胞凋亡结果；B : si-NC 组、si-LASP1 组与 miR-218+si-LASP1 组细胞凋亡率的比较；*: P<0.05。

[Note] A: The apoptosis of si-NC group, si-LASP1 group, and miR-218 + si-LASP1 group; B: The comparison of apoptosis rates among si-NC group, si-LASP1 group, and miR-218 + si-LASP1 group; *: P<0.05.

图9 转染 si-LASP1 对 EC109 凋亡的影响

Figure 9 The effect of si-LASP1 transfection on EC109 apoptosis

3 讨论

随着食管癌研究的深入，致癌机制方面的研究不再局限于癌基因或抑癌基因，而扩展到包括整个信号通路和基因相互作用网络。单个 miRNA 可调控多个靶基因，同时调控多个细胞信号通路，进而影响多个生物学过程。miRNA 的这种特性使其成为近年来研究的热点^[19-20]。

本课题组前期在淮安地区食管癌患者癌组织和癌旁组织中筛选出一组差异表达的 miRNAs，其中 miR-218 表达下调，提示其在食管癌中具有潜在的抑癌功能^[21]。本研究采用 qRT-PCR 法检测食管癌细胞和永生化食管上皮细胞中 miR-218 的表达，发现 miR-218 在 3 种食管癌细胞中的表达水平均明显低于永生化食管上皮细胞，与组织中结果一致。miR-218 在食管癌中低表达的原因可能是 miR-218 属于多拷贝基因，分别从位于神经轴突导向因子 2 (SLIT2) 和神经轴突导向因子 3 (SLIT3) 内含子区的 4p15.31 (miR-218-1)

和 5q35.1 (miR-218-2) 上的两个位点转录，其宿主基因 SLIT2、SLIT3 在肿瘤中常因 CpG 岛高甲基化而表达抑制，考虑到 miR-218 编码基因与宿主基因的定位关系，miR-218 可能与 SLIT2、SLIT3 共同转录，被相同的机制调控，并且在 miR-218 编码基因 miR-218-1 和 miR-218-2 启动子区观察到 CpG 岛的分布^[22-23]。由此提示，miR-218 在食管癌中的低表达可能与编码基因 miR-218-1、miR-218-2 的异常甲基化有关。有研究证实了 miR-218 可通过阻滞 G1 期，从而抑制食管癌细胞的增殖^[23]。Wang 等^[24] 发现过表达 miR-218 可抑制食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭，促进细胞凋亡。这与我们的研究结果一致，提示 miR-218 在食管癌中发挥抑癌作用。

通过生物信息学分析和双荧光素酶报告基因实验，首次证实了在 EC109 中 LASP1 是 miR-218 的直接靶基因。众多研究表明 LASP1 在多种恶性肿瘤中高表达，并与肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移有关。Sui 等^[25] 发现 LASP1 在乳腺癌细胞中的表达较正常乳腺细胞表达增加，并且证明了 LASP1 的高表达与乳腺癌淋巴结转移及晚期临床分期密切相关。Gao 等^[26] 研究表明 LASP1 在鼻咽癌中表达上调，与鼻咽癌患者肿瘤进展及预后不良有关。另有研究观察到与相邻非肿瘤组织相比，非小细胞肺癌组织中 LASP1 的表达明显增加^[27]。已在多种肿瘤中证实 miR-218 可负向调控 LASP1，包括膀胱癌、前列腺癌、胃癌和宫颈癌等^[16-17, 12, 28]。本研究中转染 si-LASP1，发现 EC109 的增殖、迁移和侵袭能力受到抑制，而凋亡增加。这与过表达 miR-218 对 EC109 恶性表型的影响一致，并且 miR-218 mimic 和 si-LASP1 共转染组与 miR-218 mimic 或 si-LASP1 单独转染组比较，对 EC109 的增殖、迁移和侵袭的抑制作用以及凋亡的促进作用更加明显，说明在食管癌细胞中 miR-218 可通过直接靶向调控 LASP1 发挥抑癌作用。

综上所述，miR-218/LASP1 信号轴可能在不同癌症的恶性进展中均发挥重要作用。本研究初步证明了 miR-218 在食管癌细胞中低表达；且在 EC109 中，miR-218 可能是通过直接靶向调控 LASP1 的表达，抑制细胞的增殖、迁移和侵袭，促进凋亡，从而在食管癌发展进程中发挥抑癌的作用。miR-218/LASP1 轴为食管癌的发病机制提供了新的认识，课题组将在此基础上，结合前期在淮安食管癌高发地区人群的研究成果，进一步开展体外和体内实验进行验证，全面探讨该地区食管癌发生、发展的生物学特征，为高危人群

筛检及食管癌防控提供科学依据。

参考文献

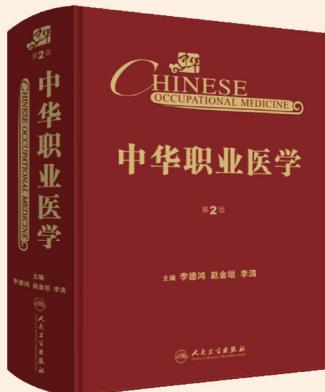
- [1] CHEN ZL, ZHAO XH, WANG JW, et al. microRNA-92a promotes lymph node metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma via E-cadherin [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (12) : 10725-10734.
- [2] ZHOU P, DONG H, HE S, et al. miR612 is associated with esophageal squamous cell carcinoma development and metastasis, mediated through TP53 [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (2) : 1855-1863.
- [3] YANG H, WEI YN, ZHOU J, et al. MiR-455-3p acts as a prognostic marker and inhibits the proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by targeting FAM83F [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21 (14) : 3200-3206.
- [4] YEH YM, CHUANG CM, CHAO KC, et al. MicroRNA-138 suppresses ovarian cancer cell invasion and metastasis by targeting SOX4 and HIF-1 α [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133 (4) : 867-878.
- [5] ZHENG B, LIANG L, WANG C, et al. MicroRNA-148a suppresses tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17 (24) : 7574-7583.
- [6] 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.
- [7] TIE J, PAN Y, ZHAO L, et al. MiR-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6 (3) : e1000879.
- [8] ALAJEZ NM, LENARDUZZI M, ITO E, et al. MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (6) : 2381-2391.
- [9] YU J, WANG Y, DONG R, et al. Circulating microRNA-218 was reduced in cervical cancer and correlated with tumor invasion [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138 (4) : 671-674.
- [10] ZHANG C, GE S, HU C, et al. MiRNA-218, a new regulator of HMGB1, suppresses cell migration and invasion in non-small cell lung cancer [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2013, 45 (12) : 1055-1061.
- [11] LIU Y, YAN W, ZHANG W, et al. MiR-218 reverses high invasiveness of glioblastoma cells by targeting the oncogenic transcription factor LEF1 [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28 (3) : 1013-1021.
- [12] WANG LL, WANG L, WANG XY, et al. MicroRNA-218 inhibits the proliferation, migration, and invasion and promotes apoptosis of gastric cancer cells by targeting LASP1 [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37 (11) : 15241-15252.
- [13] TAKESHITA N, MORI M, KANO M, et al. miR-203 inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by regulating LASP1 [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41 (5) : 1653-1661.
- [14] 何彬. MicroRNA-133b在食管鳞状细胞癌中的表达及调控 [D]. 长沙：中南大学, 2012.
- [15] DU YY, ZHAO LM, CHEN L, et al. The tumor-suppressive function of miR-1 by targeting LASP1 and TAGLN2 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31 (2) : 384-393.
- [16] CHIYOMARU T, ENOKIDA H, KAWAKAMI K, et al. Functional role of LASP1 in cell viability and its regulation by microRNAs in bladder cancer [J]. *Urol Oncol*, 2012, 30 (4) : 434-443.
- [17] NISHIKAWA R, GOTO Y, SAKAMOTO S, et al. Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting of LASP1 in prostate cancer [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105 (7) : 802-811.
- [18] TU Y, GAO X, LI G, et al. MicroRNA-218 inhibits glioma invasion, migration, proliferation, and cancer stem-like cell self-renewal by targeting the polycomb group gene Bmi1 [J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (19) : 6046-6055.
- [19] YU T, CAO R, LI S, et al. MiR-130b plays an oncogenic role by repressing PTEN expression in esophageal squamous cell carcinoma cells [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15 : 29.
- [20] LI B, WANG L, LI Z, et al. miR-3174 contributes to apoptosis and autophagic cell death defects in gastric cancer cells by targeting ARHGAP10 [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 9 : 294-311.
- [21] YANG M, LIU R, SHENG J, et al. Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29 (1) : 169-176.
- [22] YANG M, LIU R, LI X, et al. Epigenetic repression of miR-218 promotes esophageal carcinogenesis by targeting ROBO1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (11) : 27781-27795.
- [23] 杨森. miR-183和miR-218参与调控食管癌发生发展的机制研究 [D]. 南京：东南大学, 2016.
- [24] WANG T, CHEN T, NIU H, et al. MicroRNA-218 inhibits

- the proliferation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma cells by targeting BMI1 [J]. Int J Mol Med, 2015, 36 (1) : 93-102.
- [25] SUI Y, ZHANG X, YANG H, et al. MicroRNA-133a acts as a tumour suppressor in breast cancer through targeting LASP1 [J]. Oncol Rep, 2018, 39 (2) : 473-482.
- [26] GAO Q, TANG L, WU L, et al. LASP1 promotes nasopharyngeal carcinoma progression through negatively regulation of the tumor suppressor PTEN [J]. Cell Death Dis, 2018, 9 (3) : 393.
- [27] HU Z, CUI Y, ZHOU Y, et al. MicroRNA-29a plays a suppressive role in non-small cell lung cancer cells via targeting LASP1 [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9 : 6999-7009.
- [28] 邱瑜, 黄建平, 周勤仙, 等. Hsa-miR-218 靶向调控 LASP1 对宫颈癌 HeLa 细胞生长的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31 (9) : 1572-1577.

(英文编辑:汪源; 编辑:王晓宇; 校对:邱丹萍)

· 告知栏 ·

《中华职业医学》再版发行



《中华职业医学》第1版于1999年由人民卫生出版社出版,由我国已故著名的中国工程院院士何凤生教授任主编。该书在我国职业医学学科得到了全面发展的基础上,总结了我国职业病临床的实践经验和科学研究的发展成果,结合国际职业医学的发展,全面地介绍了传统工业生产方式时代产生的职业病,是指导我国职业医学临床实践和科学研究,推动我国职业医学学科发展的权威性著作。

随着科技进步和信息化时代的到来,《中华职业医学》出版近20年来,世界范围内各行各业生产方式发生了令人难以置信的变化,新兴产业不断出现,新的职业健康问题不断出现;同时信息化时代知识的传播途径发生了根本性的转变,知识已进入膨胀周期。因此,

职业医学的范畴、内容、任务都有了很大的扩展。我国的职业医学领域也发生了巨大的变化,2001年《中华人民共和国职业病防治法》颁布实施,一系列职业病防治法规规章相继出台,大大促进了我国职业医学学科的发展,取得了许多新的成就,所有这些都要求《中华职业医学》有必要再版。

再版工作由中国疾病预防控制中心职业卫生所负责,于2016年正式启动,由李德鸿研究员、赵金垣教授、李涛主任医师担任联合主编,黄金祥研究员、郝凤桐主任医师、周安寿研究员、孙道远主任医师担任副主编,王世俊教授应邀作序,100多名专家学者参与撰写,全书共240余万字。再版本本着尊重原版的基本原则,篇章设置保持一致,定位是大型学术专著,以职业病为主线,同时全面、系统地反映职业医学的基本概念和国际国内的最新进展。再版在总论中对职业医学的范畴和任务提出了一些新的概念;在职业危害的靶器官损害中对神经系统、呼吸系统、肾脏与泌尿系统等做了较多补充;对职业病的诊断原则,特别是职业暴露与疾病因果关系的判定原则做了更明确的表述。再版体现了职业性呼吸系统疾病目前在我国的重要性,除法定职业性呼吸系统疾病外,用一定篇幅介绍了职业暴露与间质性肺病和慢性阻塞性肺病以及纳米材料与职业健康等。化学物所致职业健康损害仍是本书篇幅较多的内容,不仅包括了化学物所致职业病,并按化学物种类分述了其毒理学和可能的健康损害。

再版书将于2019年4月由人民卫生出版社出版发行。书号:ISBN 978-7-117-27734-1/R·27735; 定价:298元。

余晨(中国疾病预防控制中心职业卫生所)供稿