

miR-495-3p 靶向 BUB1 调控 STAT3 信号通路对食管癌细胞生物学行为的影响

杨 晖^{1,2,3}, 石 宁⁴, 陈晓伟^{1,2,3}, 宋雪杰^{1,2,3}, 周 茜^{1,2,3}, 司富春^{1,2,3}

摘要 目的 探讨 miR-495-3p 靶向苯并咪唑出芽抑制解除同源物蛋白 1 (BUB1) 调控信号转导及转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路对食管癌细胞生物学行为的影响。方法 使用 cDNA 芯片技术筛选出食管癌组织和正常组织差异表达基因,并用生物信息学方法进行分析。运用 TargetScan 数据库对 miRNA 的靶基因进行预测,并用双荧光素酶报告基因检测技术进行验证。将 KYSE150 细胞分为空白对照组、NC mimics 组和 miR-495-3p mimics 组。通过细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 检测细胞增殖活力。用流式细胞术测定细胞周期和凋亡。通过定量逆转录聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 测定 BUB1 mRNA 的表达水平。通过蛋白质印迹法 (Western blot) 测量 BUB1、STAT3、磷酸化 (p)-STAT3、细胞周期蛋白 B1 (CCNB1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1)、B 淋巴瘤 2 (Bcl-2)、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 和半胱氨酸蛋白酶 9 (Caspase-9) 蛋白水平。用划痕和 Transwell 小室实验测定细胞的迁移和侵袭能力。结果 差异表达基因参与生物学过程、信号通路和网络构建主要与细胞周期相关。BUB1 是关键的核心 (Hub) 基因,miR-495-3p 靶向调控 BUB1。体外实验表明,过表达 miR-495-3p 能显著抑制食管癌细胞的生长、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡和 G₂/M 期阻滞。过表达 miR-495-3p 处理后,食管癌细胞中 Caspase-3、Caspase-9 表达量升高 ($P < 0.01$),而 Bcl-2、BUB1、CCNB1、CDK1、p-STAT3 表达量降低 ($P < 0.01$)。STAT3 信号通路也被发现在此过程中发挥着重要作用。结论 miR-495-3p 可能通过下调 BUB1 介导 STAT3 信号通路影响食管癌细胞的生物学行为。

关键词 食管癌; miR-495-3p; BUB1; STAT3 信号通路; 生物学行为

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1446-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.023

食管癌是全球第七大常见癌症,病死率排名第六,食管癌患者五年生存率低于 20%,严重威胁着人类健康^[1]。MicroRNAs (miRNAs) 是一种内源性具有调控功能的非编码 RNA,多种 miRNAs 的突变或异常表达与癌症的发生发展密切相关^[2]。miR-495-3p 参与癌细胞的增殖、迁移、侵袭^[3]。但关于 miR-495-3p 在食管癌中的研究较少,其对食管癌的调控机制仍有待阐明。苯并咪唑出芽抑制解除同源物蛋白 1 (BUB1) 是一种保守的有丝分裂丝氨酸/苏氨酸激酶,BUB1 促进染色体排列并调节有丝分裂的持续时间^[4]。研究^[5]表明,BUB1 在肝癌、膀胱癌等肿瘤的发生发展中起着重要作用。然而,BUB1 在食管癌中的作用机制鲜有报道,仍需要进一步的研究。

本研究分析了食管癌组织和正常食管上皮组织中差异表达基因,并进一步探讨 miR-495-3p 靶向调控 BUB1/STAT3 信号通路对食管癌细胞生物学行为的影响,为 miR-495-3p 在食管癌中的作用机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料 人食管癌细胞株 EC9706、TE-1、EC109、KYSE150 和人正常食管上皮细胞 HEEC 来源于河南省中医方证信号传导重点实验室。Dual-Lumi™ II 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天公司; Lipofectamine™ 3000 Reagent、逆转录试剂盒购自美国 Thermo 公司; 细胞周期检测试剂盒购自南京凯基公司; 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司; TRIzol 试剂购自日本 Takara 公司; Quanti-Fast SYBR Green 聚合酶链式反应 (PCR) 试剂盒购自德国 Qiagen 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自

2024-06-18 接收

基金项目: 河南省科技发展计划项目 (编号: 222102310187、242102310582); 河南省博士后科研项目 (编号: 202103092); 河南中医药大学苗圃项目 (编号: MP2022-6); 河南省大学生创新创业训练项目 (编号: 202210471009)

作者单位: ¹ 河南中医药大学中医学学院, 郑州 450046

² 河南省中医方证信号传导重点实验室, 郑州 450046

³ 河南省中医方证信号传导国际联合实验室, 郑州 450046

⁴ 河南中医药大学医学院, 郑州 450046

作者简介: 杨 晖,男,助理研究员;

司富春,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: sifc2000@hotmail.com

武汉博士德生物公司; 兔抗 BUB1 抗体、STAT3 抗体、p-STAT3 抗体、CDK1 抗体、Bcl-2 抗体、Caspase3 抗体、Caspase9 抗体、CCNB1 抗体和 GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司; miR-495-3p 模拟物 (miR-495-3p mimics) 及其阴性对照 (miR-NC)、野生型/突变型 BUB1 (WT/MUT-BUB1) 荧光素酶报告基因载体购自上海吉玛基因公司。

1.2 方法

1.2.1 基于基因芯片技术基因组学分析

前期, 课题组运用 cDNA 芯片技术从食管癌组织和正常组织 (距离癌组织 2 cm) 中鉴定出差异常表达基因^[6]。cDNA 芯片结果已上传到 Gene expression omnibus (GEO) 数据库中 (编号: GSE199967)。使用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) 对差异表达基因进行基因本体论 (GO) 富集分析; 使用 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 构建蛋白相互作用 (Protein-protein interaction, PPI) 网络; 根据 PPI 网络结果, 在 Cytoscape (3.6.1 版本) 软件中进行可视化, 使用 CytoHubba 插件中的 MCC 算法构建 Hub 基因网络, 使用 iRegulon 插件对转录因子进行预测, 并构建转录因子靶基因网络; 运用 miRNA 靶基因预测数据库 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 软件对 miRNA 的靶基因进行预测。运用 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 软件对差异基因相互作用网络进行富集分析。

1.2.2 细胞培养

食管癌细胞株 KYSE150、EC9706、TE-1、EC109 和人正常食管上皮细胞 HEEC, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基进行培养。当细胞铺满 80% 培养皿底时进行细胞传代。

1.2.3 定量逆转录聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 实验

使用 TRIzol 试剂提取的总 RNA, 使用逆转录试剂盒进行逆转录反应, 使用 2 × SYBR Green qPCR Mix 和荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 反应, 用 2^{-ΔΔC_T} 法, 计算出 miR-495-3p 和 BUB1 的表达量。使用 Primer 6.0 设计引物序列。引物序列如下: miR-495-3p: (上游) 5'-AAACAAACAUGGUGCACUUCUU-3', (下游) 5'-GAAGUGCACCAUGUUUGU-UUUU-3'; U6: (上游) 5'-CTCGCTTCGCCAGCACA-3', (下游) 5'-AACGCTTACGAATTTGCCGT-3'; BUB1: (上游) 5'-GAAAGCATGAGCAATGGTAAA-3', (下游) 5'-CCACCTGATGCAACTTCTTATG-3'; GAPDH: (上游) 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', (下游) 5'-

GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

1.2.4 细胞转染

用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂盒进行细胞转染。本次研究分组情况为: 空白组、NC mimics 组和 miR-495-3p mimics 组。成功转染 24 h 后, 收集各组细胞用于后续实验。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖活力

将细胞 (5 × 10³ 个/孔) 的接种于 96 孔板中, 分别在转染 24、48 和 72 h 后, 用 CCK-8 检测试剂盒检测细胞活力, 用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值。

1.2.6 细胞周期检测

将细胞 (1 × 10⁵ 个/孔) 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 不同方法处理细胞继续培养 48 h, 然后在冰冷的 70% 乙醇中, -4 °C 固定过夜。以冰 PBS 洗涤 2 次, 将细胞离心, 重悬于 50 μg/ml 碘化丙啶和 10 ng/ml RNase A 的混合物中, 并在室温黑暗中孵育 30 min, 上机检测。

1.2.7 细胞凋亡检测

按照步骤 1.2.6 收集细胞。使用细胞凋亡检测试剂盒测定细胞凋亡情况。

1.2.8 划痕愈合迁移实验

将细胞 (1 × 10⁵ 个/孔) 接种于 6 孔板中, 用无菌 200 μl 移液器枪头在细胞单层上创建人工均质划痕。划伤后, 用无血清培养基洗涤细胞, 加入完全培养基, 于 0、48 h 拍照记录细胞划痕宽度, 计算细胞迁移率。

1.2.9 Transwell 侵袭实验

将 2 × 10⁴ 个细胞接种到含 Transwell 膜的上室中, 下室加入含 10% 胎牛血清的培养基。48 h 后, 将侵入下室的细胞用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 再用 0.5% 结晶紫染色 15 min, PBS 冲去多余的染料, 并使用显微镜计数。

1.2.10 双荧光素酶报告基因检测

将 BUB1 mRNA 的 3'-UTR 序列野生型 (WT) 或突变型 (MUT) 扩增并克隆到荧光素酶报告载体中。然后使用 Lipofectamine™ 3000 将 3'-UTR WT 及 3'-UTR MUT 载体与 miR-495-3p mimics 共转染到 EC9706 细胞中。转染 48 h 后, 用 PBS 洗涤细胞。然后使用双荧光素酶报告基因检测系统测定荧光素酶活性。3'-UTR WT: catttattgtttatgtaaataGTTTGTTAaaaataatcccatggaata ttccatgtaac; 3'-UTR MUT: catttattgtttatgtaaataCAAA-CAATaaaataatcccatggaataattccatgtaac。

1.2.11 Western blot 检测蛋白表达

使用 RIPA 裂解物提取蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质并转移到硝酸纤维素膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h, 然后将膜与一抗在 4 °C 下孵育过夜, 并与二抗在室温下孵育 2 h。使用 ECL 试剂盒对蛋白质条带进行可视化并进行灰度值分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析。三个以上独立重复实验结果用均数 ± 标准差 (SD) 表示,采用 *t* 检验比较两组间的差异 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基于基因芯片技术基因组学分析 运用 cDNA 芯片技术共鉴定出 19 595 种基因,差异表达基因 1 168 种,其中 614 种基因表达下调,554 种基因表达上调。火山图显示差异表达基因的分布,结果见图 1A。通过 STRING 数据库构建的蛋白相互作用网络见图 1B。

基因本体论(GO)分析显示,差异基因的生物过程主要是 DNA 复制,细胞成分主要是细胞外泌体,分子功能主要是蛋白质结合,结果见图 2A。用 IPA 软件分析 Ingenuity 经典途径发现,变化显著的信号途径是细胞周期控制、RhoA 信号通路、着丝粒信号通路,结果见图 2B。使用 Cytoscape 分析 Hub 基因发现, *BUB1*、*TOP2A*、*KIF2C*、*ASPM* 是排名靠前的 Hub 基因, *BUB1* 得分最高,结果见图 3C。使用 iRegulon 插件预测出的转录因子是 HOXD13,富集值为 4.085 构建的 HOXD13 靶基因网路,结果见图 2D。转录因子 HOXD13 结合的 DNA 基序见图 2E。

利用 IPA 软件构建差异表达基因疾病和功能网络,结果表明,“能量代谢、分子运输”(图 3A),“细

胞生长、细胞增殖”(图 3B)和“细胞形态、细胞功能”(图 3C)富集网络排名靠前,得分分别为 44、41 和 41 分。

2.2 食管癌细胞系中 miR-495-3p 和 BUB1 的表达 与人食管癌细胞 HEEC 比较,人食管癌细胞系 KYSE150、TE-1、EC109、EC9706 中 miR-495-3p 的表达下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), *BUB1* mRNA 和 BUB1 蛋白相对表达量上调 ($P < 0.01$)。其中, KYSE150 细胞中 miR-495-3p 表达水平最低, *BUB1* 表达水平最高,选取 KYSE150 细胞进行后续实验(图 4)。

2.3 miR-495-3p 抑制食管癌细胞增殖 与空白组相比, miR-495-3p mimics 组中吸光度值降低 ($P < 0.01$);随着作用时间的增加, miR-495-3p mimics 组中吸光度值与空白组之比也显著降低 ($P < 0.01$)。见图 5。

2.4 miR-495-3p 与 BUB1 靶向关系 利用 Target Scan 数据库预测结果为 miR-495-3p 在 *BUB1* mRNA 3'UTR 有特异结合位点(图 6A),表明 miR-495-3p 靶向调控 BUB1 可能性大。双荧光素酶报告实验结果表明, *BUB1*-3'UTR-Wt + miR-495-3p 组双荧光素酶活性明显低于 *BUB1*-3'UTR-Wt + NC 组; *BUB1*-3'UTR-Mut + miR-495-3p 组双荧光素酶活性与 *BUB1*-3'UTR-Mut + NC 组差异无统计学意义(图 6B)。与 NC mimics 比较, miR-495-3p mimics 组 KYSE150 细

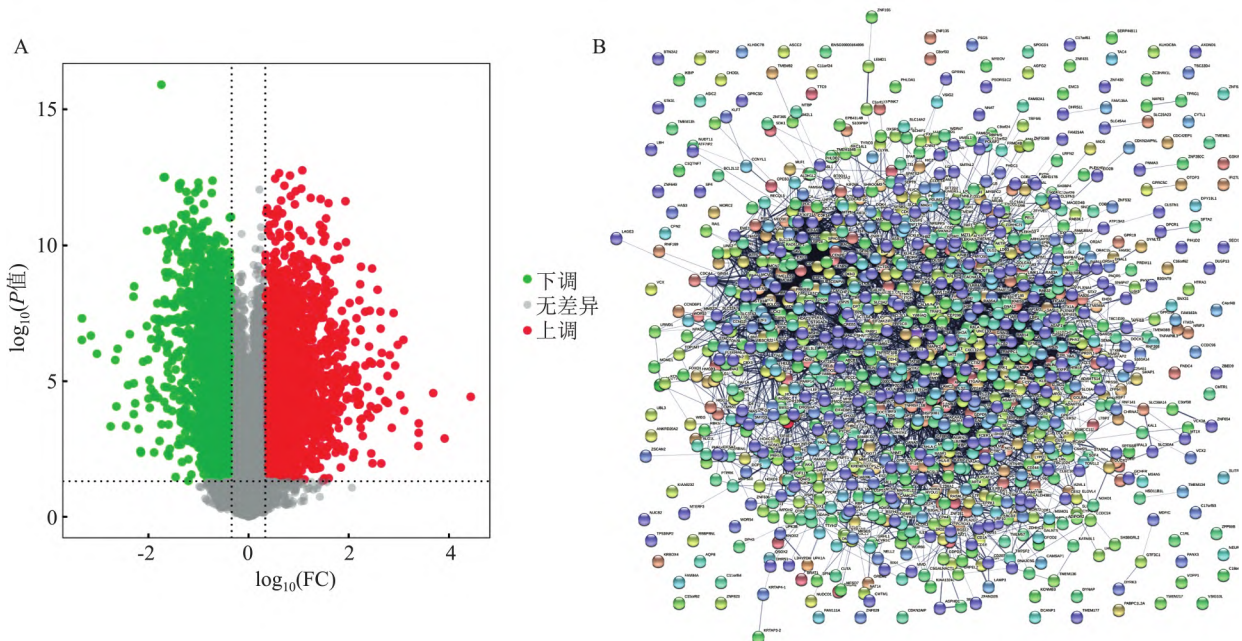


图1 差异表达基因分析

A: 火山图显示差异表达基因的分布; B: STRING 数据库构建的蛋白相互作用网络

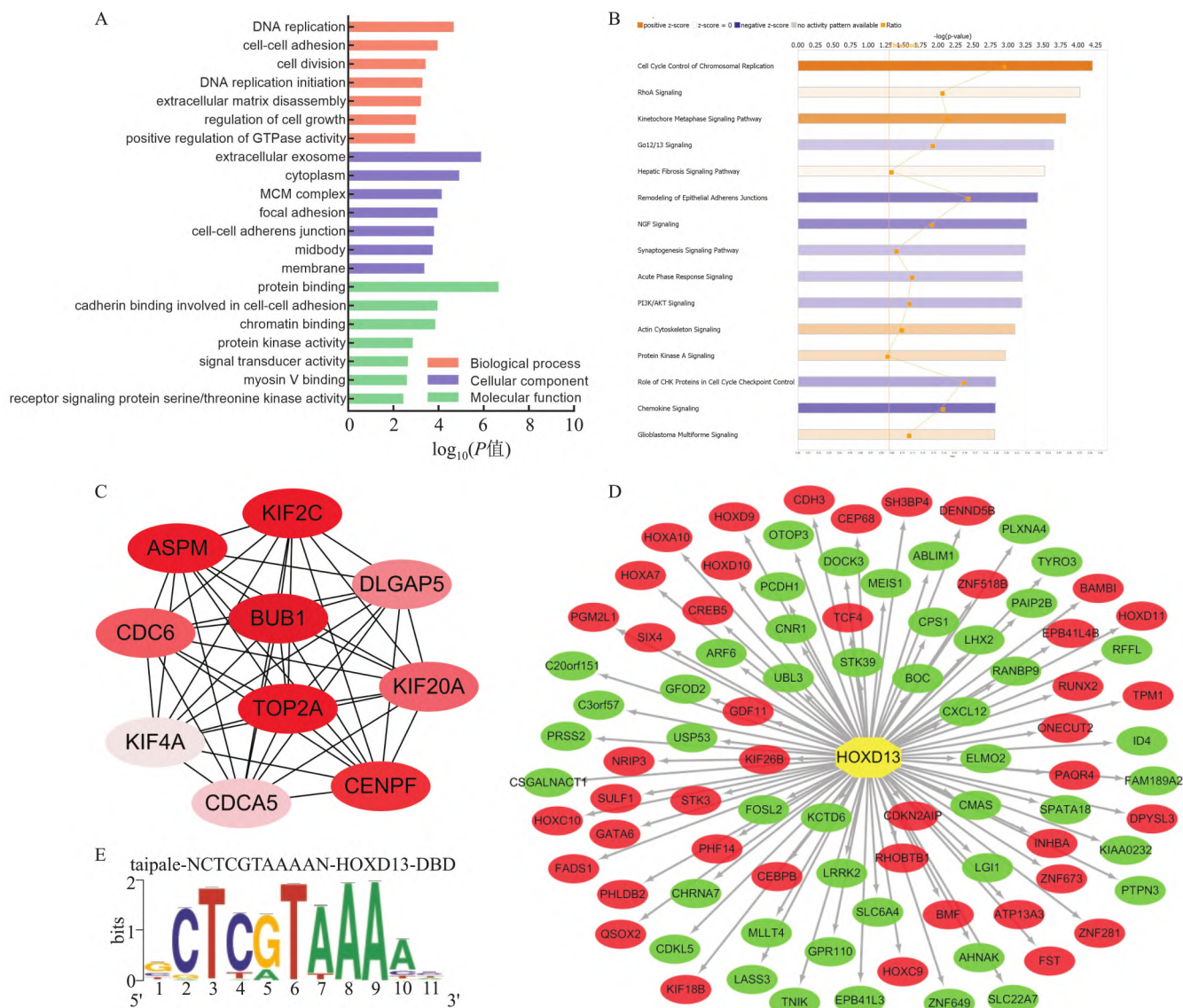


图2 差异表达基因富集分析

A: 差异表达基因的 GO 分析 ($P < 0.05$) ; B: 差异基因参与的 Ingenuity 经典途径; 黄色: 激活; 蓝色: 抑制; C: 用 Cytoscape 构建 Hub 基因网络; D: 转录因子 HOXD13 靶基因网络; 红色: 上调; 绿色: 下调; E: 转录因子 HOXD13 结合的 DNA 基序

胞 *BUB1* miRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 6C ~ E)。

2.5 miR-495-3p 对食管癌细胞 KYSE150 周期和凋亡的影响 细胞周期分析显示, miR-495-3p 作用细胞后, KYSE150 细胞出现明显 G_2/M 期细胞聚集 (图 7A)。细胞凋亡分析显示, miR-495-3p 作用细胞后, KYSE150 细胞凋亡数增加 (图 7B)。

2.6 miR-495-3p 对食管癌细胞 KYSE150 迁移和侵袭的影响 细胞迁移结果显示, miR-495-3p 作用细胞后, KYSE150 细胞的迁移个数减少 ($P < 0.01$) (图 8A、C)。细胞侵袭分析显示, miR-495-3p 作用

细胞后, KYSE150 细胞的侵袭能力降低 ($P < 0.01$) (图 8B、D)。

2.7 Western blot 检测不同蛋白的表达水平 结果显示, miR-495-3p 作用细胞后, Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), CCNB1 和 CDK1 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), p-STAT3 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), STAT3 蛋白表达无明显改变。见图 9。

3 讨论

致癌作用是一个慢性过程, 涉及不同阶段的多

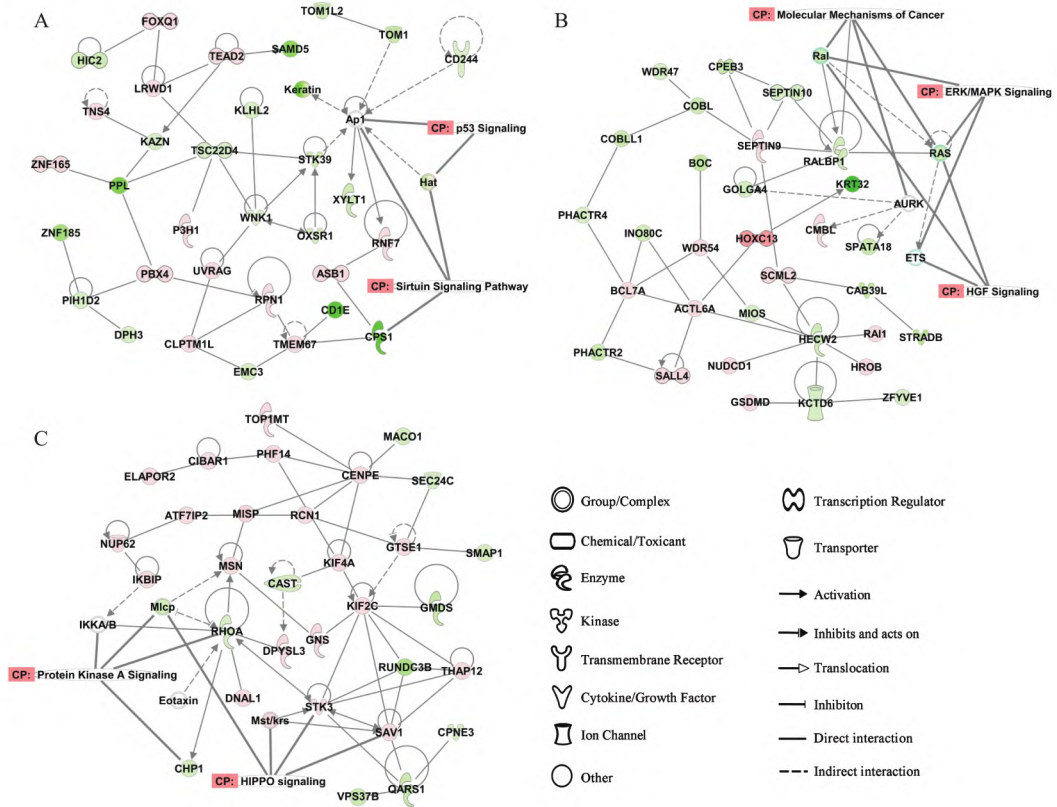


图3 差异表达基因疾病和功能网络
A ~ C: 排名靠前的富集网络; 红色: 上调; 绿色: 下调

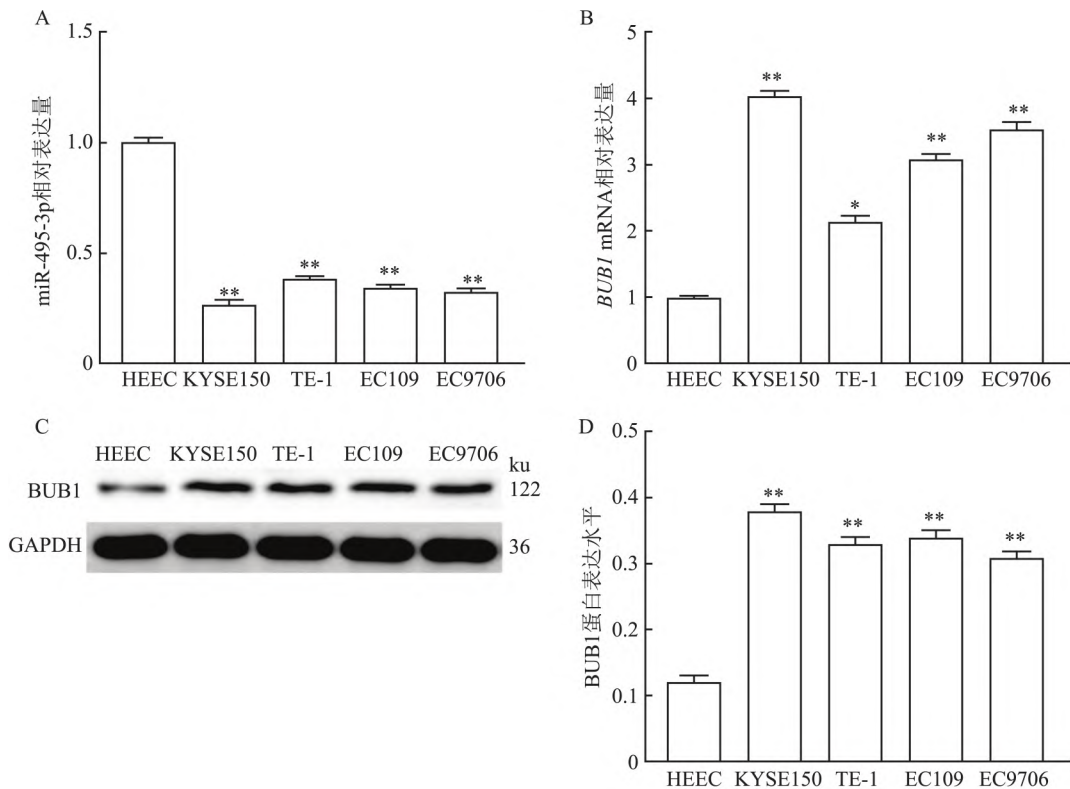


图4 不同食管癌细胞中 miR-495-3p 和 BUB1 表达水平比较

A: 不同食管癌细胞中 miR-495-3p 表达水平; B: 不同食管癌细胞中 BUB1 mRNA 表达水平; C、D: 不同食管癌细胞中 BUB1 蛋白表达水平灰带图、直方图; 与 HEEC 细胞比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

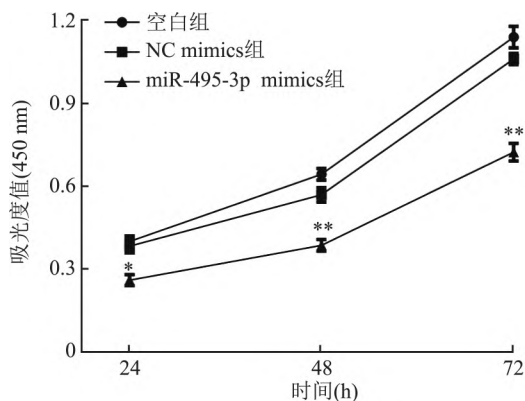


图5 miR-495-3p 抑制食管癌细胞增殖
与空白组比较: ** $P < 0.01$

个基因和途径,基因组的异常改变会导致癌细胞进展中的蛋白质组改变,继而会引起细胞癌变^[7]。本研究通过生物信息学方法分析食管癌组织和正常差异表达基因显示,大多数基因参与了细胞分裂、细胞形态、细胞生长、细胞增殖等生物学过程,这些生物学过程主要与细胞周期相关。细胞分裂过程在癌症进展中起着至关重要的作用,大多数癌症是由于调节细胞分裂的基因受损而发展的,调节细胞周期和破坏检查点的蛋白质活性会导致癌症的发展,基因组不稳定性已被认为是癌细胞的一个标志,它是由细胞周期中不同的缺陷引起的,因此,更好地了解与基因组不稳定性相关的蛋白质功能,可以增加它们用于癌症治疗的可能性。

Hub 基因是调节生物学过程的重要基因,具有高度的连接性,又称为枢纽基因。使用 Cytoscape 软

件构建 Hub 基因网络发现 *BUB1* 得分最高,是关键的 Hub 基因。*BUB1* 基因位于人类染色体 2q14 上,编码纺锤体检测的平台蛋白^[8]。*BUB1* 是一种对纺锤体组装检查点至关重要的保守激酶,在有丝分裂过程中维持正确的染色体分离和减少非整倍体的形成方面起着不可或缺的作用。非整倍体是大多数癌细胞的共同特征,这与有丝分裂中染色体错误分离率的增加相关,*BUB1* 突变,包括缺失和点突变,以及差异 *BUB1* 基因表达与致癌作用相关^[9]。越来越多的研究^[10]表明,*BUB1* 在肿瘤的发生发展中起着重要作用,当敲低 *BUB1* 时, p -SMAD2 的表达水平降低, $TGF-\beta$ 通过与 SMAD 蛋白转录因子(包括 SMAD2 和 SMAD3) 相互作用,随后形成 R-SMAD 和共同介质 SMAD 异二聚体,从而对基因表达产生影响,*BUB1* 的表达降低, $TGF-\beta$ 信号转导通路受到抑制,肿瘤细胞的生长和侵袭能力降低。该研究中, *miR-495-3p* 下调 *BUB1* 的 mRNA 水平和蛋白表达水平, *BUB1* 的低表达抑制食管癌细胞增殖, *BUB1* 可能通过影响染色体的不稳定性、非整倍体、诱导细胞凋亡和影响细胞周期信号转导通路来发挥其生物学功能。*BUB1* 具有成为食管癌分子治疗靶点的巨大潜力,但这需要在细胞或动物实验中提供更多证据。

在该研究中,用双荧光素酶实验证实 *BUB1* 是 *miR-495-3p* 的靶基因。*miR-495* 是位于人类染色体 14q32.31 位点上的一个非编码 RNA, *miR-495-3p* 具有抗癌作用^[11]。本研究发现,过表达 *miR-495-3p* 显著下调 *BUB1* 的 mRNA 水平和蛋白表达水平。诱

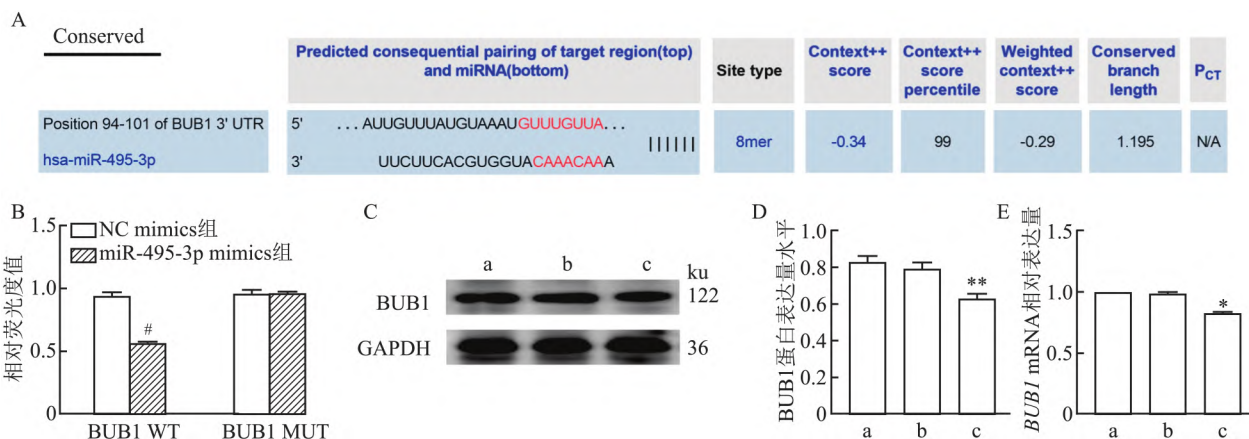


图6 miR-495-3p 靶向调控 BUB1

A: *miR-495-3p* 与 *BUB1* mRNA 3'-UTR 区结合序列; B: KYSE150 细胞双荧光素酶活性结果; C ~ E: 过表达 *miR-495-3p* 抑制 *BUB1* mRNA 和 *BUB1* 蛋白表达水平; a: 空白组; b: NC mimics 组; c: *miR-495-3p* mimics 组; 与 NC mimics 组比较: # $P < 0.01$; 与空白组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

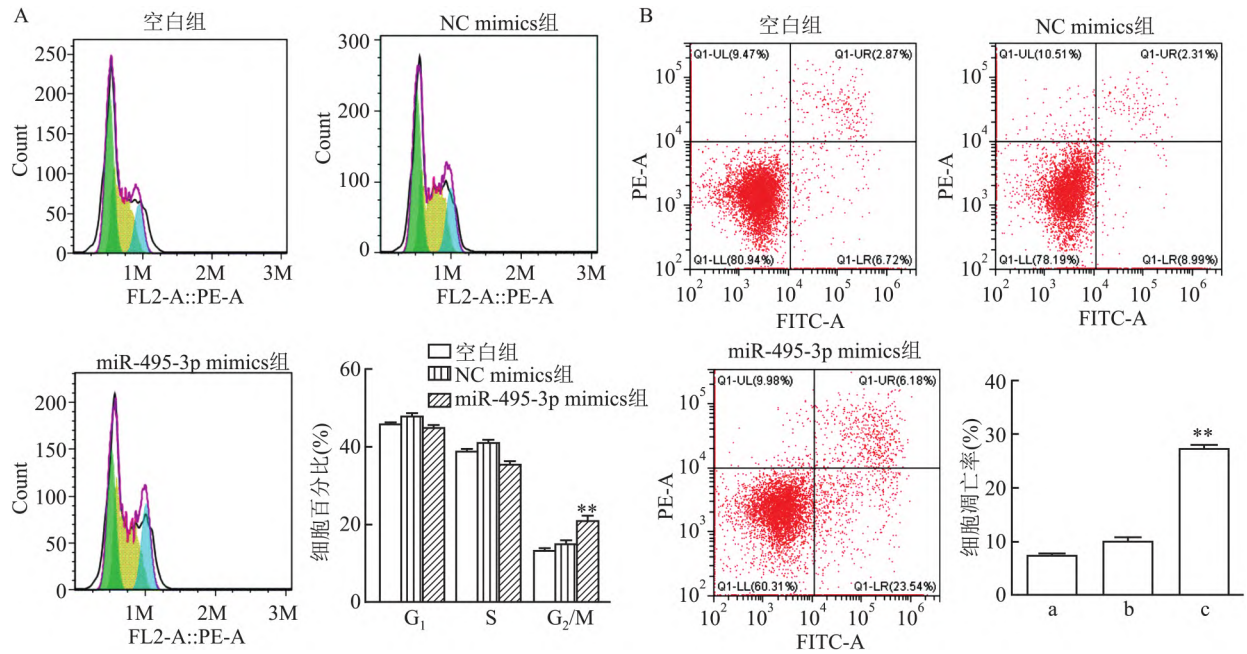


图7 miR-495-3p对食管癌细胞KYSE150周期和凋亡的影响

A: miR-495-3p对食管癌细胞KYSE150周期的影响; B: miR-495-3p对食管癌细胞KYSE150凋亡的影响; a: 空白组; b: NC mimics组; c: miR-495-3p mimics组; 与空白组比较: ** $P < 0.01$

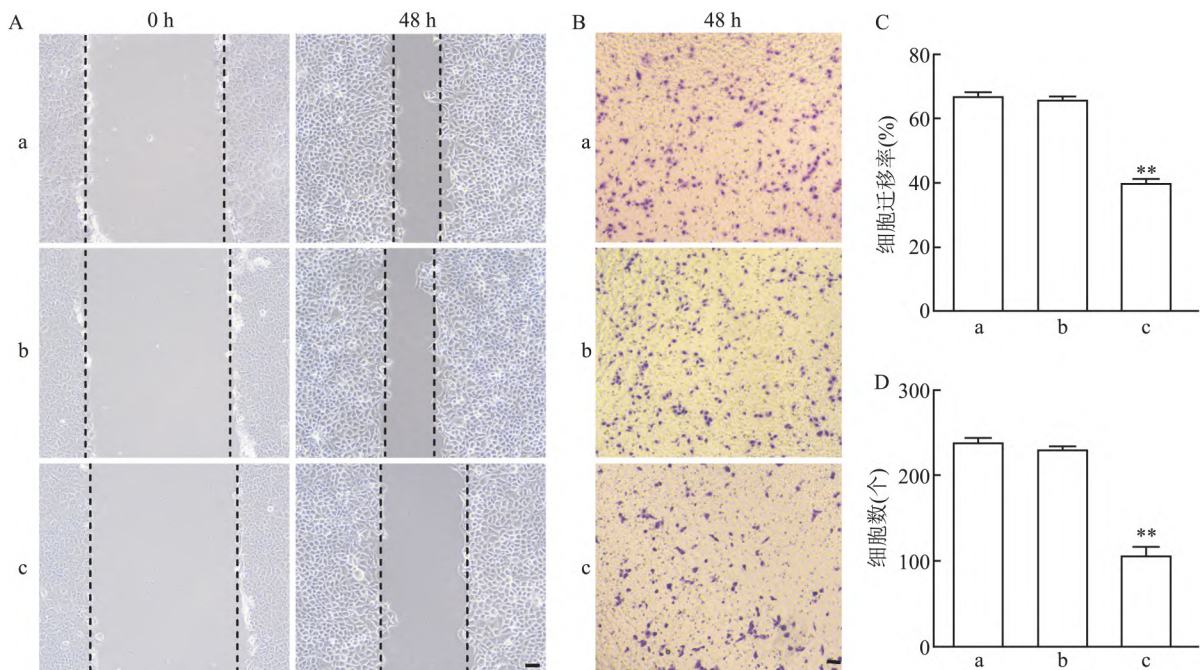


图8 miR-495-3p对食管癌细胞KYSE150迁移和侵袭的影响

A: 划痕实验 $\times 40$; B: Transwell实验 $\times 100$; C: 细胞迁移率定量分析; D: 细胞侵袭数量定量分析; a: 空白组; b: NC mimics组; c: miR-495-3p mimics组; 与空白组比较: ** $P < 0.01$

导癌细胞凋亡是癌症治疗的关键策略,在本研究中,过表达 miR-495-3p 能促进凋亡相关蛋白 Bcl-2 下调, Caspase-3 和 Caspase-9 的表达水平上调,流式细胞术结果提示,与对照组比较,过表达 miR-495-3p

显著诱导细胞凋亡。细胞有丝分裂是一个精确而复杂的过程, BUB1 在调控细胞的有丝分裂过程是必不可少的。该研究发现过表达 miR-495-3p 通过下调 BUB1 的表达,将细胞阻滞于 G₂/M 期。Cdc20 作

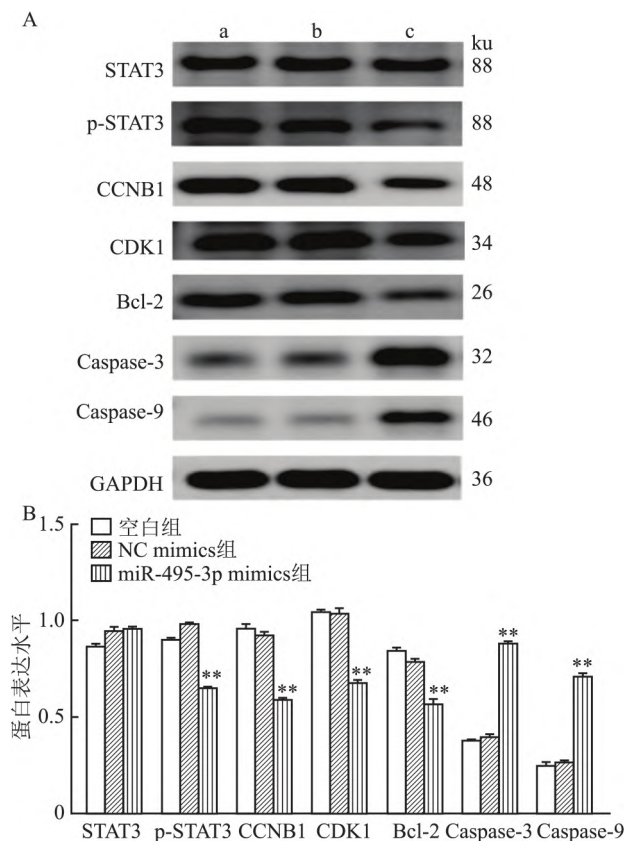


图9 Western blot 检测不同蛋白的表达水平

A: Western blot 实验结果图; B: 不同蛋白相对表达量; a: 空白组; b: NC mimics 组; c: miR-495-3p mimics 组; 与空白组比较: ** $P < 0.01$

为 BUB1 的底物,是后期促进复合物/环体(APC/C) 的激活剂,APC/C 调控细胞分裂和基因转录网络,分离酶抑制蛋白(Securin) 是 APC/C 依赖性蛋白降解的关键靶标,APC/C 激活和随后的 Securin 降解对细胞有丝分裂早期起到调控的作用。此外,细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1) 的失活与 APC/C 依赖性细胞周期蛋白 B(CCNB) 的蛋白降解相关^[12], BUB1、CCNB1 和 CDK1 表达下调,CCNB1/CDK1 形成的减少会导致细胞有丝分裂停滞于 G_2/M 期。

STAT3 是一种细胞质转录因子,调控细胞增殖、分化、凋亡、血管生成、炎症和免疫反应,STAT3 位于多种致癌信号通路的交汇处,STAT3 的持续激活与食管癌的增殖、浸润、转移等过程中起着特别重要的作用,并且与患者预后不良相关^[13],磷酸化是 STAT3 活化的主要机制,过表达的 p-STAT3 与多种恶性肿瘤之间的具有相关性^[14]。研究^[15]表明,BUB1 作为 STAT3 活性的一种新的正调节因子,使 STAT3 的 Ser727 位点磷酸化。BUB1 被招募磷酸化

STAT3,并与转录共激活子 p300 相互作用形成复合物,促进了丝氨酸磷酸化依赖性 STAT3 转录活性的增强。BUB1 不仅影响癌细胞有丝分裂,还有助于癌细胞中 STAT3 信号通路激活,BUB1 通过增加 STAT3 活性来促进癌细胞细胞的增殖,靶向 BUB1-STAT3 可能是一种潜在的可行治疗方法。本研究中,miR-495-3p 能降低食管癌 KYSE150 细胞的 BUB1 和 p-STAT3 的表达水平,但并没有降低总 STAT3 的表达水平,STAT3 是癌症治疗的一个重要的靶点,抑制 STAT3 激活或许是肿瘤治疗的一个新方向。

总之,该研究用生物信息学分析了食管癌差异表达基因,这些基因变化与细胞周期进程相关。研究表明 miR-495-3p 直接靶向 BUB1 并抑制 BUB1 表达,miR-495-3p 可能通过靶向 BUB1 介导 STAT3 信号通路影响食管癌细胞的生物学行为。研究可能会为食管癌的治疗提供新的观点。

参考文献

- [1] 黄云龙,张仁泉,姚龙,等. SAMHD1 蛋白在食管癌中的表达特点及其临床意义[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(6): 952-5.
- [2] 向辉,唐明,李阳,等. miR-664b-5p 对食管癌细胞 EC9706 和 TE-1 生物学行为的影响[J]. 安徽医科大学学报,2020,55(11): 1746-53.
- [3] Alves L F, Geraldo M V. MiR-495-3p regulates cell migration and invasion in papillary thyroid carcinoma[J]. Front Oncol, 2023, 13(1): 1039654.
- [4] Singh P, Pesenti M E, Maffini S, et al. BUB1 and CENP-U, primed by CDK1, are the main PLK1 kinetochore receptors in mitosis[J]. Mol Cell, 2021, 81(1): 67-87.
- [5] Li M, Duan X, Xiao Y, et al. BUB1 is identified as a potential therapeutic target for pancreatic cancer treatment[J]. Front Public Health, 2022, 10(1): 900853.
- [6] 岳静宇. 不同证候食管癌差异表达基因研究[D]. 郑州: 河南中医学院, 2012.
- [7] Li L, Jiang D, Zhang Q, et al. Integrative proteogenomic characterization of early esophageal cancer[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 1666.
- [8] Kim T, Gartner A. Bub1 kinase in the regulation of mitosis[J]. Anim Cells Syst (Seoul), 2021, 25(1): 1-10.
- [9] Song J J, Ni C, Dong X. bub1 as a potential oncogene and a prognostic biomarker for neuroblastoma[J]. Front Oncol, 2022, 12: 988415.
- [10] Zhu L J, Pan Y, Chen X Y, et al. BUB1 promotes proliferation of liver cancer cells by activating SMAD2 phosphorylation[J]. Oncol Lett, 2020, 19(5): 3506-12.
- [11] Zhang J L, Zhen H F, Li K, et al. miR-495-3p depresses cell proliferation and migration by downregulating HMGB1 in colorectal

- cancer[J]. *World J Surg Oncol* ,2022 ,20(1) :101.
- [12] Sunada S ,Saito H ,Zhang D , et al. CDK1 inhibitor controls G₂/M phase transition and reverses DNA damage sensitivity[J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2021 23(4) : 56 -61.
- [13] Ma R J ,Ma C ,Hu K , et al. Molecular mechanism , regulation , and therapeutic targeting of the STAT3 signaling pathway in esophageal cancer (Review) [J]. *Int J Oncol* ,2022 61(3) : 105.
- [14] Liu Y L , Yan Z X , Xia Y , et al. Ligustrazine reverts anthracycline chemotherapy resistance of human breast cancer by inhibiting JAK2/STAT3 signaling and decreasing fibrinogen gamma chain (FGG) expression [J]. *Am J Cancer Res* ,2020 ,10(3) : 939 -52.
- [15] Jiang N , Liao Y H , Wang M M , et al. BUB1 drives the occurrence and development of bladder cancer by mediating the STAT3 signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res* ,2021 ,40(1) : 378.

miR-495-3P targets BUB1 to regulate the effect of STAT3 signaling pathway on biological behavior of esophageal cancer cells

Yang Hui^{1 2 3} , Shi Ning⁴ , Chen Xiaowei^{1 2 3} , Song Xuejie^{1 2 3} , Zhou Xi^{1 2 3} , Si Fuchun^{1 2 3}

(¹Traditional Chinese Medicine School , Henan University of Chinese Medicine , Zhengzhou 450046;

²Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome and Prescription in Signaling , Zhengzhou 450046; ³Henan International Joint Laboratory of TCM

Syndrome and Prescription in Signaling , Zhengzhou 450046; ⁴Medicine College of Henan University of Chinese Medicine , Zhengzhou 450046)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-495-3p targeting budding uninhibited by benzimidazoles (BUB1) on signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway on biological behavior of esophageal cancer (EC) cells. **Methods** The differentially expressed genes in EC tissues and normal tissues were screened by the cDNA microarray technique. The differentially expressed genes were analyzed by bioinformatics methods. The target genes of miRNAs were predicted by the TargetScan database and verified by a dual luciferase gene reporter assay. KYSE150 cells were divided into blank control group , NC mimics group and miR-495-3p mimics group. The activity of KYSE150 cells were detected by the CCK-8 method. Cell cycle and apoptosis were measured by flow cytometry. The expression of *BUB1* mRNA was measured by real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) . The levels of BUB1 , STAT3 , phosphor (p) -STAT3 , cyclin dependent kinase 1 (CCNB1) , cyclin dependent kinase 1 (CDK1) , B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) , cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (Caspase-3) and cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (Caspase-9) were measured by Western blot. The migration and invasion abilities of the cells were measured by wound-healing and Transwell invasion assays. **Results** Differentially expressed genes were involved in biological processes , signaling pathways and network construction , which were mainly related to cell cycle. *BUB1* is the key (Hub) gene , and *BUB1* is the target gene of miR-495-3p. *In vitro* experiments showed that overexpression of miR-495-3p could significantly inhibit the migration and invasion of EC cells and induce apoptosis and G₂/M phase arrest. After treatment with overexpression of miR-495-3p , the expression of Caspase-3 and Caspase-9 in EC cells increased significantly(*P* < 0.01) , while the expression of Bcl-2 , BUB1 , CCNB1 , CDK1 and p-STAT3 decreased significantly(*P* < 0.01) . Moreover , the STAT3 signaling pathway might play an important role in this process. **Conclusion** miR-495-3p may influence the biological behavior of esophageal cancer cells by down-regulating BUB1-mediated STAT3 signaling pathway. **Key words** esophageal cancer; miR-495-3p; BUB1; STAT3 signaling pathway; biological behavior