DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20240510.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20240510.1116.002

miR-21-5p靶向BNC2调控食管癌的恶性生物行为的研究

邓雨函[1],阳 梦[1],吴振华[1],李 卉[2],热则耶·麦麦提祖农[3],孙晓宏[1]✉
(1.新疆医科大学附属肿瘤医院,新疆 乌鲁木齐 830011;2.新疆医科大学中心实验室,新疆 乌鲁木齐 830011;3.新疆医科大学基础医学院,新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的**:探讨miR-21-5p靶向肌成纤维细胞的身份转录因子(BNC2)调控食管癌(esophageal cancer,ESCA)细胞增殖、迁移、侵袭机制。**方法**:应用实时定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction,qRT-PCR)方法检测食管癌组织中miR-21-5P和BNC2的相对表达量并用统计学分析其是否存在表达差异。用miR-21-5p mimics和miR-21-5P inhibitor和阴性对照(NC包括mimcs NC、inhibitor NC)分别转染ECA109、KYSE30两个食管癌细胞系后,进行细胞功能试验CCK8,Transwell等实验方法观察当miR-21-5p过表达或敲低时细胞的增殖、迁移和侵袭能力是否受到影响。通过生物信息学方法预测分析miR-21-5P的靶基因并通过双荧光素酶实验、qRT-PCR和Western blot实验验证miR-21-5p与靶向基因的负向调控关系。**结果**:qRT-PCR结果显示,相对于癌旁组织,BNC2在食管癌组织中的表达量显著性降低,而miR-21-5P则显著性升高,CCK8、Transwell实验结果显示,当miR-21-5P过表达时,细胞的增殖、迁移和侵袭能力增强,反之细胞功能受到抑制。也就是说,miR-21-5P在食管恶性肿瘤中起着促癌基因的功能作用。通过生物信息学方法预测miR-21-5P的靶基因为BNC2,双荧光素酶实验结果表明miR-21-5P与野生型BNC2′-UTR靶向结合,qRT-PCR和WB实验结果表示在食管癌细胞中,当miR-21-5P过表达时,BNC2的表达量降低,当miR-21-5P被敲低时,BNC2的表达量升高。这些结果显示miR-21-5P与BNC2存在靶向关系。**结论**:在食管癌中,miR-21-5p直接靶向BNC2,其调节作用可能从而导致癌症的增殖迁移和侵袭作用。

[关键词] 食管癌;miR-21-5P;BNC2;预后;肿瘤微环境
[中图分类号] R735.1 [文献标志码] A [文章编号] 1007-1237(2024)16-1236-10

Research on how miR-21-5p targets BNC2 to control the malignant biological activity of esophageal cancer

DENG Yuhan[1], YANG Meng[1], WU Zhenhua[1], LI Hui[2], REZEYE•Maimaizunong[3], SUN Xiaohong[1]✉
(1. *Xinjiang Medical University Affiliated Tumor Hospital*, *Urumqi* 830054, *China*; 2. *Central Laboratory*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830054, *China*; 3. *School of Basic Medicine*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830054, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by Xinjiang Uygur Autonomous Region Natural Science Foundation General Project* (2016*D*01*C*3692021*D*01*C*397)

[*Author*]: *DENG Yuhan*, *E-mail*: 1269713499@*qq.com*.
[*Correspondence to*]: *SUN Xiaohong*, *Chief Physician*, *Associate Professor*, *E-mail*: 2451781680@*qq.com*.

Received: 2024-04-26 *Revised*: 2024-05-02 *JHMU*, 2024;30(16):1236-1245

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To investigate the mechanism by which the identity transcription factor (BNC2) of myoblasts targeted by miR-21-5p in controling the proliferation, migration, and invasion of esophageal cancer (ESCA) cells. **Methods**: Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to assess the relative expression levels of miR-21-5P and BNC2 in esophageal cancer tissues. And any differences in expression were statistically analyzed. Following transfection of ECA109 and KYSE30 esophageal cancer cell lines with miR-21-5p mimics and miR-21-5P inhibitor, and a negative control (NC, including mimcs NC and inhibitor NC), respectively, the cell function test CCK8, and Transwell was used to investigate the impact of

[基金项目]新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2016D01C369,2021D01C397)
[作者简介]邓雨函,E-mail:1269713499@qq.com。
[通讯作者]孙晓宏,主任医师,副教授,E-mail:2451781680@qq.com。
[收稿日期]2024-04-26 [修回日期]2024-05-02 网络出版时间:2024-05-10 15:20:22

miR-21-5p downregulation or overexpression on cell migration, invasion, and proliferation. A bioinformatics technique was utilized to identify and investigate the target genes of miR-21-5P. Then, the dual luciferase assay, Western blot, and qRT-PCR assay were employed to verify the negative regulatory relationship between miR-21-5p and the target genes.**Result**: In ESCA tumor tissues, it was possible to determine that BNC2 had reduced relative expression levels. and the relative expression levels of miR-21-5p were greater in tumor tissues by qRT-PCR detection. The outcomes of the CCK8 and Transwell studies demonstrated that overexpression of miR-21-5P increased cell invasion, migration, and proliferation. Cell invasion, migration, and proliferation were all decreased by knocking down miR-21-5P. Put differently, miR-21-5P functions as an oncogene in esophageal cancers. The bioinformatics technique predicted BNC2 to be the target gene of miR-21-5P. According to the results of the dual luciferase assay, miR-21-5P was targeted to wild-type BNC2 ′-UTR. Furthermore, miR-21-5p mimics were shown to be able to drastically lower the BNC2 gene level by western blot and qRT-PCR. On the other hand, a miR-21-5p inhibitor may dramatically raise BNC2 expression in esophageal cancer cells. These findings suggest a link of targeting between miR-21-5P and BNC2.**Conclusion**: In ESCA, miR-21-5p targets BNC2, and its regulatory role may contribute to cancer proliferation, migration, and invasion.

[**Key words**] Tumor microenvironment; BNC2; MiR-21-5P; Esophageal cancer; Prognosis

食管癌是发生在食管黏膜上皮或者腺体的恶性肿瘤，是最常见的消化道恶性肿瘤，其发生率不断上升[1]。在早期，大部分食管癌患者往往没有明显症状，而当确诊时大多已处于中晚期，其临床症状主要表现为不同程度的吞咽障碍，诊治难度较大，预后普遍较差，五年的总体生存率还不到40%[2]。因此食管癌具有预后差、死亡率高的特点[3]。研究食管癌病因相关的分子机制，筛选早期食管癌相关的生物标志物以及新的治疗靶点，对于食管癌的早期诊断以及预后都具有重要意义。

微核糖核酸（miRNA）是一类高度保守的单链非编码RNA，可通过与其下游特定mRNA的特定靶点结合来调控蛋白编码基因的表达[4]。研究发现miRNAs参与肿瘤的发生、侵袭能力、迁移和血管生成过程，以及对放化疗的耐药性[5]。因此，miRNA可以作为新的生物分子标志物，用于食管癌的早期诊断、预测预后和靶向治疗靶点[6]。miRNA-21是一种非编码RNA，通常包括miRNA-21-3p和miRNA-21-5p两个不同的成熟miRNA。二者均来自miRNA-21的前体分子，分别位于miRNA-21的3′端和5′端。在miRNA-21相关研究中，通常会特别提到miRNA-21-5p，因为它在生物学功能中的研究较多。以往研究也表明，miR-21-5p参与了许多癌症的调控，如肝癌、肾透明细胞癌、胃癌和直肠癌[7-10]。miRNA已被证明通过与其靶基因相互作用而发挥调节作用。本课题组前期收集了大量食管鳞状细胞癌（esophageal squamous cell carcinoma, ESCC）患者及癌旁组进行相应研究，发现miRNA-21在ESCC患者的血清、组织和细胞系中的表达水平均显著上调且与患者的TNM分期、淋巴结转移、肿瘤大小和较差的总生存期显著相关[11]。准确预测软件（TargetScan、miRwalk）的结果显示，BNC2可能是miR-21-5P的靶基因。miR-21-5P及其靶基因BNC2在食管癌中的表达和潜在功能尚未被研究。

已有研究表明碱性核蛋白2（basonuclin 2, BNC2）作为肌成纤维细胞的身份转录因子，属于锌指家族14，其表达在来自不同病因的小鼠和人类纤维化肝脏中都被诱导，并在人类肝纤维化消退时减少，参与了纤维化中驱动肌成纤维细胞活化的典型通路[12]。目前BNC2已在高级别浆液性卵巢癌[13,14]，肝细胞癌[15]，子宫内膜癌[16]，膀胱癌[17]等恶性肿瘤方面已有相关研究，然而，miR-21-5P及其靶基因BNC2在食管癌中的表达和潜在功能尚未被研究。

在这项研究中使用多种生物信息学和统计学方法来评估具有各种临床病理特征的ESCA患者的BNC2表达与预后的相关性，以及BNC2在ESCA中的潜在功能。列线图被进一步解释为预测患者的预后。进一步在体外过表达和敲低miR-21-5p，观察其对ESCA细胞增殖、侵袭与迁移能力的影响。进一步进行下游潜在mRNA预测，以探索BNC2在ESCA中异常低表达的机制。此外，研究了BNC2对ESCA免疫浸润的影响。本研究发现miR-21-5P靶向BNC2在ESCA中的重要作用，并提供了BNC2表达减少的潜在机制以及与肿瘤免疫浸润的潜在关系。

1 材料与方法

1.1 数据收集

RNA测序数据集及其相关临床信息可从The Cancer Genome Atlas（TCGA，https://portal.gdc.cancer.gov，访问时间为2022年4月19日）下载ESCA的HTSeq-Counts和HTSeq-FPKM文件，对数据进行分类整理，得到161例肿瘤标本和11例癌旁标本，采用Rsudio DEseq2包进行分析肿瘤和癌旁组织的差异表达。以|log2FC|值>1和$P<0.05$作为筛选食管癌mRNA差异性表达的分界点。

1.2 miRNA预测和临床相关性

TargetScan(https://www.targetscan.org/vert_80/),miRWalk(http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/)被用于预测候选结合miRNA。如上所述,只有通常出现在两个以上数据库中的预测miRNA被纳入后续分析。

UALCAN (http://ualcan.path.uab.edu/analysis-prot.html)是一个提供癌症基因组图谱(TCGA)转录组数据综合分析的在线工具。在“TCGA基因分析”片段中,使用基因符号“BNC2”片段,选择“食管癌”,得到BNC2表达与临床之间的关系。

1.3 功能富集分析

GEPIA2(http://gepia2.cancer-pku.cn/#index)在线数据库得到BNC2前100相似基因,从而集结在线数据库进行Gene Ontology(GO)分析和Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)富集通路分析结果。

1.4 TIMER数据库分析

TIMER2.0(http://timer.cistrome.org/)。研究采用了“基因模块”来研究BNC2与ESCA免疫细胞浸润之间的相关性。$P<0.05$被认为具有统计学意义

1.5 样品采集

所有样本来源于2017年1月~2019年12月在新疆医科大学附属肿瘤医院胸外科,从30名患者中采集癌症样本和相应的邻近食管组织,并立即在液氮中快速冷冻。这些样品仅用于检测miRNA和BNC2的基因表达。

1.5.1 道德声明 此项研究由新疆医科大学附属肿瘤医院伦理委员会(中国新疆维吾尔自治区)批准(K-2023064)。所有同意参与本研究的患者均签署了知情同意书。

1.6 细胞培养和试剂

具有转移能力的细胞系ECA-109,KYSE30(人食管癌细胞)细胞来自中国新疆医科大学国家实验室(中国乌鲁木齐)。ECA-109和KYSE30细胞在RPMI-1640培养基中培养,补充10%胎牛血清(FCS;Gibco;Thermo Fisher Scientific,股份有限公司,Waltham,MA,USA),并在37 ℃下保持在5%CO_2下。293T细胞在Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM;Gibco;Thermo Fisher Scientific,美国,股份有限公司)中培养。

1.6.1 细胞转染 miR-21-5P mimics(过表达)、miR-21-5P inhibitor(抑制)和阴性对照(NC包括mimicsNC、inhibitor NC)均购自上海吉玛有限公司。按照制造商的方案,用Lipofectamine 3000(Invitrogen;Thermo Fisher Scientific,股份有限公司)对ECA-109,KYSE30,细胞进行转染。简言之,在转染前,将2.5×10^5细胞在6孔板中培养24 h。将miR-21-5p inhibitor、mimics及其NC与转染试剂一起添加到细胞中,将细胞处理48 h并收获用于分析。

1.6.2 双荧光素酶报告基因测定 将细胞以2×10^5个细胞/每孔的浓度接种在24孔板中,并在24 h后用BNC2 3′-UTR野生型或BNC2 3′-UTR突变型和miR-21-5P载体共转染。转染后48 h,收集细胞,并使用Dula萤光素酶报告试剂盒进行相对萤光素酶活性测定。

1.6.3 细胞增殖 增殖实验用细胞计数试剂盒-8(CCK8)测定(Dojindo,Japan)评估细胞增殖能力。每孔1×10^3个细胞置入到96孔板中。在转染后0、12、24、48 h测量增殖率,于酶标仪处检测450 nm处的吸光度。

1.6.4 细胞迁移和侵袭测定 使用Transwell迁移检测细胞迁移及侵袭活动。将转染的ECA-109或KYSE30细胞培养24 h后,将细胞(2.5×10^5)重悬于无血清培养基中,并在上孔径室(直径8 μm的孔径;Corning股份有限公司,Corning,NY,USA)中培养,底部腔室填充有含有20%血清的培养基。经过24 h培养,细胞从膜的上表面迁移到下表面。随后,用100%的甲醇迁移的细胞进行固定,并用1%的结晶紫对其进行染色。随后,在显微镜下对这些细胞进行计数。细胞侵袭试验类似于细胞迁移试验,不同之处在于Transwell膜预涂有Matrigel(Corning股份有限公司)。

1.6.5 定量实时PCR 采用TRIzol试剂从ESCC及癌旁组织中提取出总RNA。以总RNA为样本,用PrimeScript RT reagent Kit试剂盒合成第一链cDNA(RR047A,TaKaRa Bio Inc)。采用SYBR预混料TB Green ™Premix Ex Taq™ Ⅱ(Tli RNaseH Plus)(RR820A,TaKaRa Bio Inc)进行RT-PCR反应。以上详细操作步骤均按照说明书进行。其中GAPDH和U6基因分别用作BNC2和miR-21-5P内源性参考对照。采用$2^{-\Delta\Delta CT}$方法计算相对基因的表达水平。表Ⅰ中给出了特定的有义引物。

1.6.6 蛋白印迹western blot 收集转染后各组培养48 h ESCC细胞后,将细胞中总蛋白提取。用二喹啉甲酸(BCA)法检测蛋白的浓度,取等量蛋白样品上样,随后电泳。采用湿转法将蛋白转至PDVF

膜，用5%脱脂奶粉进行封闭后，敷一抗GAPDH(1∶1 000)、BNC2(1∶600)(均来自Proteintech)。4 ℃孵育过夜，洗去一抗，加入二抗IgG(1∶5 000)室温孵育后，洗去二抗，化学发光试剂(ECL)显色，以GAPDH作为内参，计算目的蛋白的相对表达量。

1.7 数据分析

使用Excel和SPSS 27.0软件包(SPSS，Inc，Chicago，IL，USA)对所有数据进行统计计算和分析。$P<0.05$为显著性差异。

表1 引物相关序列

Tab 1 Primer related sequences

基因	引物序列
GAPDH	Forward: 5′-tgacttcaacagcgacaccca-3′ Reverse: 5′-caccctgttgctgtagccaaa-3′
BNC2	Forward:5′-AGTCTGAGTCTTCGGAGCCC-3′ Reverse: 5′-ATGACGTCCTGGTGAGAGGG-3′
miR-21-5p	Forward: 5′-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3′ Reverse: 5′-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3′
U6	Forward: 5′-GGAACGATACAGAGAGATTAGC-3′ Reverse: 5′-TGGAACGCTTCACGAATTTGC-3′
LT-h-BNC2-3UTR-wt-F	GAGCAGTAATTCTAGGCGATCGCTCGAGGCATTCACTTCCGTTAAATT
LT-h-BNC2-3UTR-wt-R	AAAGATATTTTATTGCGGCCAGCGGCCGCTAGGAAGCTACCAACGTCAC

2 结果

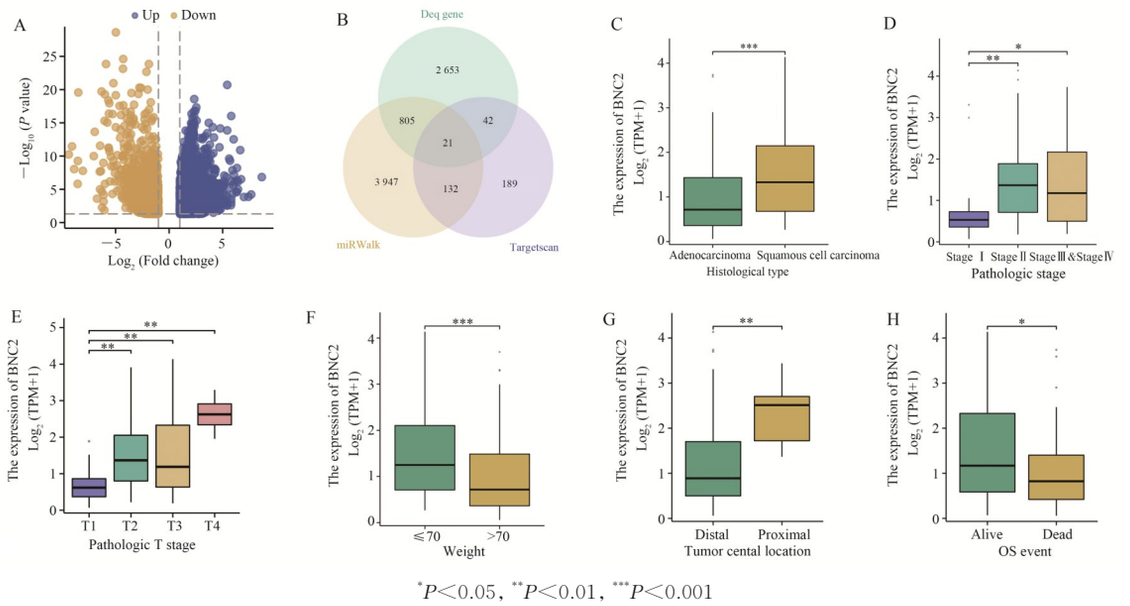
本课题组前期收集了食管鳞状细胞癌患者组织及癌旁对照组进行相应研究，发现miRNA-21在ESCA患者的组织、细胞系中的表达水平均显著上调且与患者的临床资料和较差的总生存期显著相关[11]。进一步进行下游潜在mRNA预测。通过R鉴定出个差异性食管癌差异性基因(DEq mRNA)(图1 A)，使用仙桃在线工具网站(www.xiantaozi.com)分析差异性基因形成火山图，利用miRWalk和Targetscan网站预测和筛选了miR-21-5p的候选靶基因，结合已发表的文献，最终选择并探讨了BNC2。通过过表达和敲低食管癌细胞系ECA109，KYSE30中miR-21-5P表达，行RT-qRCR检测BNC2，检测结果显示，miR-21-5p和BNC2间存在负相关性，提示miR-21-5p和BNC2间可能具有调控关系。

2.1 生信相关结果分析

使用UALCAN分析了在ESCA患者中，BNC2表达降低与癌症危险因素相关。如图1(C-H)所示；BNC2表达与临床特征的关系有显著性意义，包括(C)组织学类型，(D)病理分级，(E)病理T分期，(F)体重，(G)肿瘤中心位置，(H)临床OS(*$P<0.05$，**$P<0.01$，***$P<0.001$)。这些发现表明，BNC2表达减少可能在食管癌的进展中起重要的调控作用。

BNC2表达减少与ESCA预后不良有关。为了更好地了解BNC2在ESCA中表达的预后价值和潜在机制，GEPIA对食管癌中的BNC2进行了总体生存分析。在ESCA中，BNC2表达减少与总生存率(OS)显著相关[*OS*：*HR*=0.39，95%*CI*(0.19～0.83)，$P=0.014$]，证实BNC2表达减少与ESCA的不良预后密切相关(图2 A)。为了提供一种定量预测ESCA患者预后的方法，基于BNC2和其他独立的临床风险因素进行了列线图预测。如图2B所示，例如，一名具有低BNC2风险(7.5分)、病理T3期(57.5分)、病理N2期(40分)、病理M0期(0分)和≤60(0分)的ESCA患者的总分为105分。则1年、3年、5年的生存率分别为80.0%、20%和小于20%。结果表明，BNC2可能是区分食管癌癌和邻近对照的有前途的生物标志物。

为了更好地探索BNC2在癌症中的作用，从GEPIA2数据集中鉴定出前100个BNC2相关基因。对其进行GO和KEGG富集分析。GO分析表明，BNC2主要与阿米巴样细胞迁移、胚胎器官发育、肢体发育、附属物发育、平滑肌纤维、肌原纤维、转录阻遏物、DNA-结合转录因子结合、结构分子活性等有显著性的相关($P<0.05$)(图2 C～E)。KEGG分析提示BNC2在参与肿瘤发病过程中的“Hedgehog



$^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$

图1　A:食管癌差异性基因;B：差异性基因与miR-21-5P靶向基因交集;C～H：BNC2在食管癌中与组织学类型、病理分级、病理T分期、体重、肿瘤中心位置、OS均有显著性意义

Fig 1　A: Differentially-expressed genes of esophageal cancer; B: The intersection of differentially-expressed genes and miR-21-5P targeting genes; C-H: BNC2 was significantly associated with histological type, pathological grade, pathological T-stage, body weight, tumor center location, and OS in esophageal carcinoma

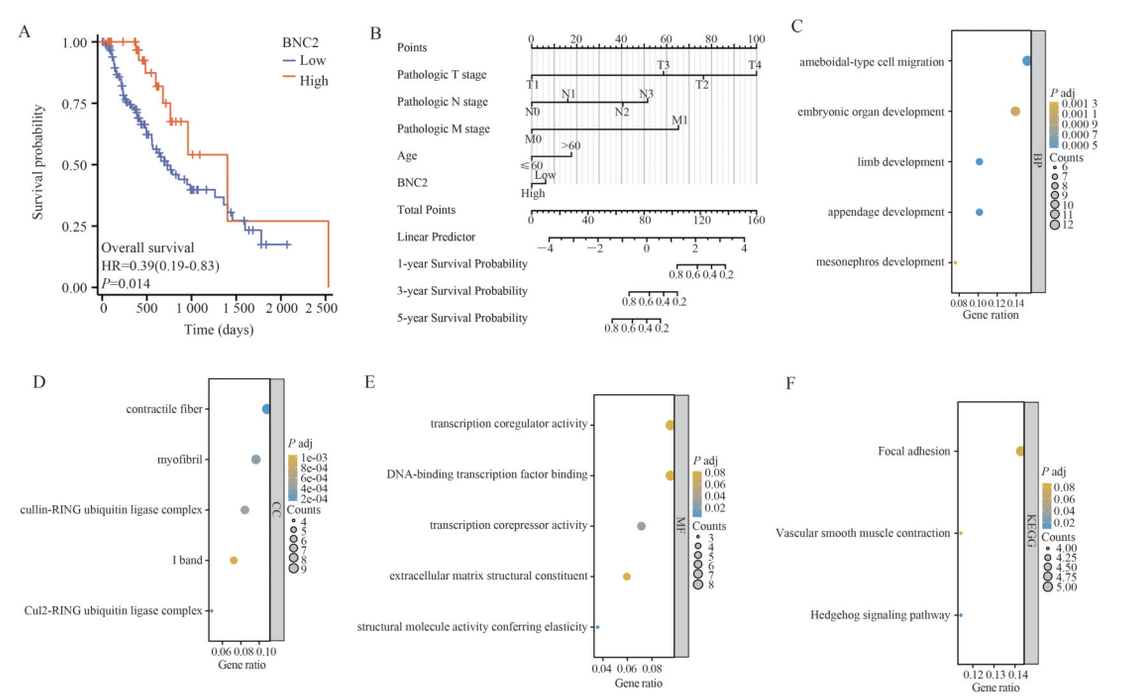


图2　A：BNC2在食管癌中总生存率;B:对于食管癌患者的预后我们基于BNC2和其他独立的临床风险因素进行了列线图预测;C～F：BNC2的富集分析

Fig 2　A: Overall survival rate of BNC2 in esophageal cancer; B: For the prognosis of patients with esophageal cancer, we made a histogram prediction based on BNC2 and other independent clinical risk factors; C-F: Enrichment analysis of BNC2

信号通路”具有显著性意义(图2F)。来自TCGA的食管癌(ESCA)中BNC2的表达与共表达基因之间的相关性分析如所示(图3A、B)。

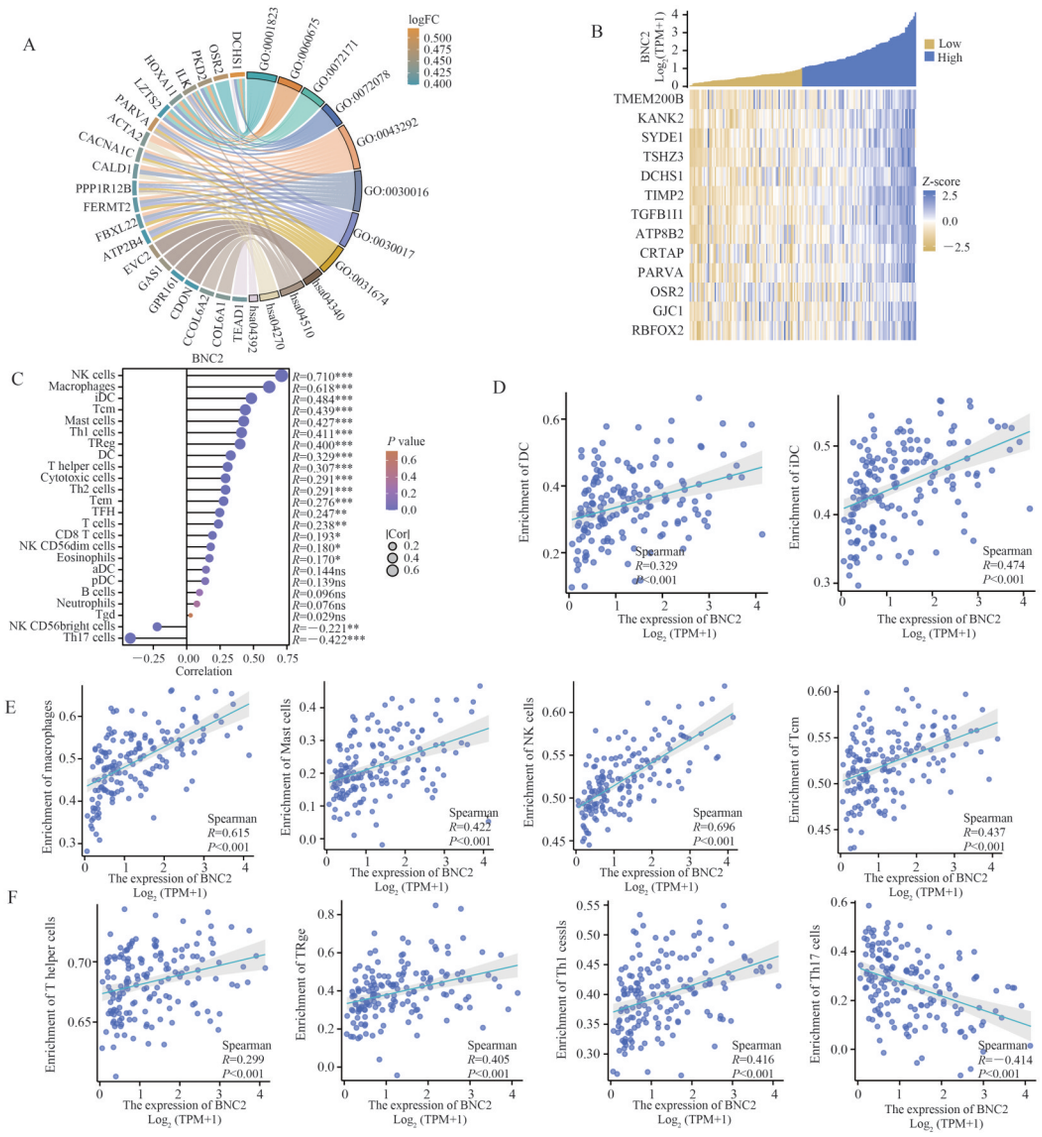


图3　A、B：BNC2前15相关基因弦图及热图；C：BNC2与24种免疫细胞相关的免疫浸润；D～F：TIMER数据库中在食管癌中BNC2的免疫相关

Fig 3　A, B: String and heat maps of the top 15 related genes of BNC2; C: BNC2 was associated with immune infiltration of 24 kinds of immune cells; D-F: Immunological correlation of BNC2 in esophageal cancer in the TIMER database

由于BNC2表达减少在调节ESCA的免疫反应中起着至关重要的作用(图3C)。为了充分研究BNC2在ESCA中的表达与免疫浸润之间的潜在关系。通过TIMER2.0分析,来探索BNC2和相关免疫细胞免疫浸润的关系。如图3D～F所示,通过ssGSEA量化的Spearman相关性分析已被应用于证明BNC2的免疫细胞浸润水平和表达水平(TPM)之间的相关性,以评估BNC2对肿瘤微环境(TME)的影响。包括DC细胞(R=0.329, P<0.001)、iDC(R=0.474, P<0.001)、巨噬细胞(R=0.615, P<0.001)、NK细胞(R=0.696, P<0.001)、肥大细胞(R=0.422, P<0.001)、辅助性T细胞(R=0.299, P<0.001)、Treg(R=0.405, P<0.001)、Tcm(R=0.437, P<0.001)、Th1细胞(R=0.416, P<0.001),BNC2与以上免疫细胞浸润呈显著正相关关系,而与Th17细胞(R=−0.414, P<0.001)则呈现显著负相关关系。

2.2　RT-qPCR结果

为了探究miR-21-5P/BNC2调控食管癌的具体机制,本研究取30例食管癌组织及30例相应癌旁组织为对照组行qRT-PCR,在ESCA肿瘤中观察到miR-21-5p高表达(图4A),BNC2较正常组织低表达(图4B)。而在转染过表达,敲低后的miR-21-5p于食管癌细胞ECA109和KYSE30后,与mimics

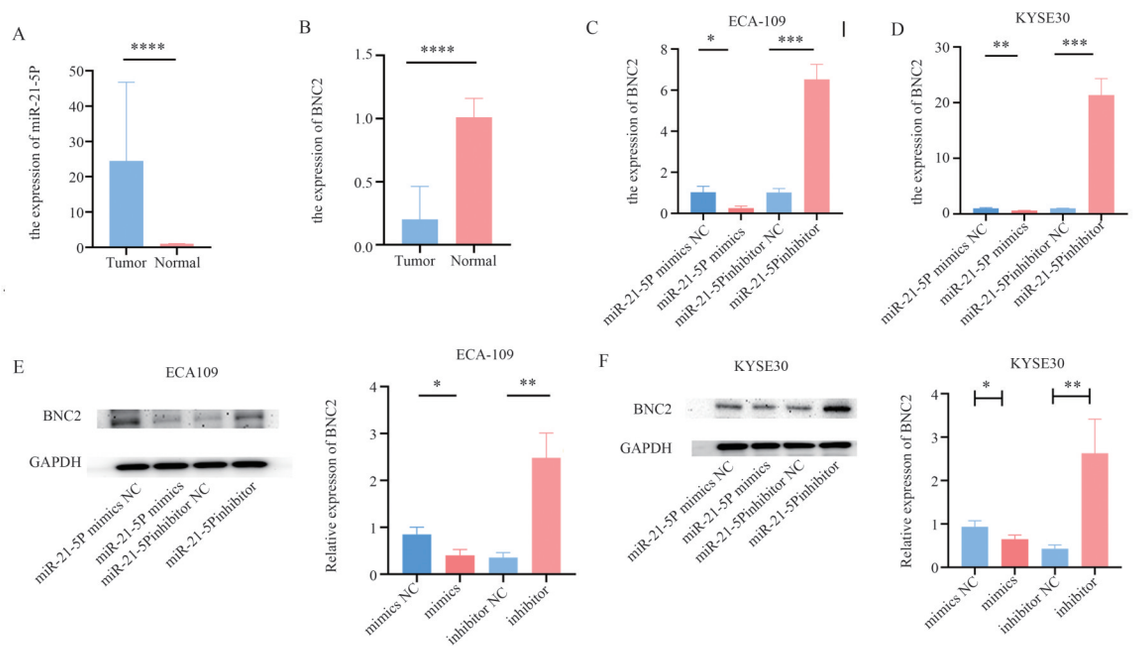
NC组相比，BNC2在miR-21-5p mimics组中的表达量明显下调（$P<0.05$）。而与inhibitor NC相比，miR-21-5p inhibitor转染ECA-109和KYSE-30细胞后，BNC2的基因水平显著升高（$P<0.05$）（图4 C、D），说明miR-21-5p可以在转录层面负调控BNC2。

2.3　Western blot

分析显示，转染miR-21-5p mimics后，ECA-109和KYSE30细胞中的BNC2对比miR-21-5p mimics NC组明显下调，相反与inhibitor NC组相比，miR-2-5p inhibitor组BNC2相对表达明显增加，具有统计学意义（图4 E、F）。，说明miR-21-5p可以在翻译层面负调控BNC2。

2.4　细胞增殖实验

进一步在体外过表达和敲低miR-21-5p，以检测其对ESCA细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响，转染于食管癌细胞ECA-109和KYSE30中，将1 000个细胞接种到96孔板的每个孔中，其中设置3个重复。在接种后0、12、24、48 h，于酶标仪处检测450 nm处的吸光度。通过CCK8实验验证了miR-21-5p过表达可以增强食管癌细胞的增殖能力，相反敲低miR-21-5p可以显著的抑制食管癌细胞的生长增殖能力，差异具有统计学意义。见图5A、B。



$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\,1$

图4　A、B：qRT-PCR结果显示miR-21-5P，BNC2在食管癌中的表达；C～F：qRT-PCR和WB显示转染ECA-109，KYSE30后，过表达及敲低miR-21-5P后BNC2的相应表达量

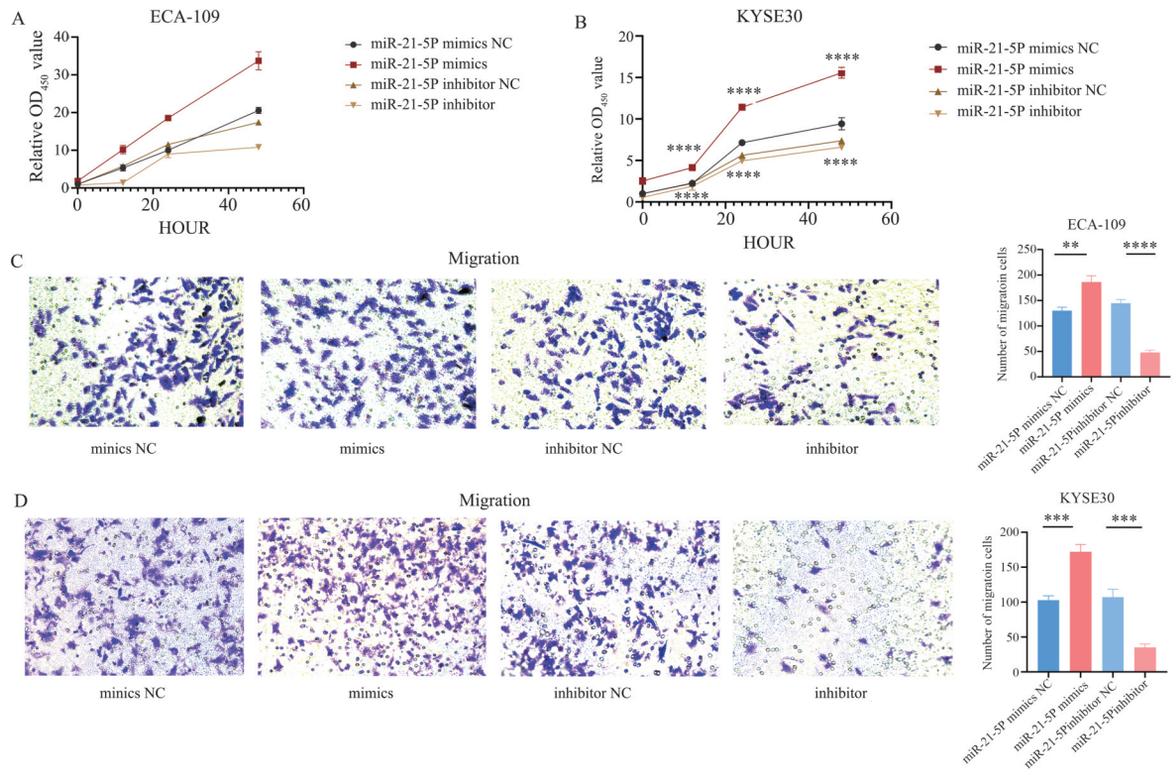
Fig 4　A，B：qRT-PCR results showed the expression of miR-21-5P and BNC2 in esophageal cancer；C-F：qRT-PCR and WB showed the corresponding expression levels of BNC2 after transfection with ECA-109 and KYSE30，overexpression and knockdown of miR-21-5P

2.5　细胞迁移和侵袭测定

使用涂有基质凝胶（直径8 μm的孔径；Corning，USA）的孔径室进行细胞侵入测定。将2.5×10^5个细胞重悬于无血清培养基中，并接种到上部室中；底部小室填充入含有20%血清的培养基。24 h后，对迁移的细胞进行染色，并使用显微镜拍摄图像。对每个腔室分析三个复孔。使用有基质凝胶的室（Corning，3422，美国）进行细胞侵袭测定。将每孔2.5×10^5个细胞重悬于上部室无血清培养基中，其他步骤同上。上述实验结果验证了在ECA109和KYSE30中与inhibitor NC组相比，miR-21-5p inhibitor组的迁移细胞数量显著减少（均$P<0.05$）。相反，miR-21-5p mimics组相比于miR-21-5p mimics NC组，细胞的数目显著增加（均$P<0.05$）（图5C、D）。侵袭细胞也获得了类似的结果。见图6。

2.6　双荧光素酶实验

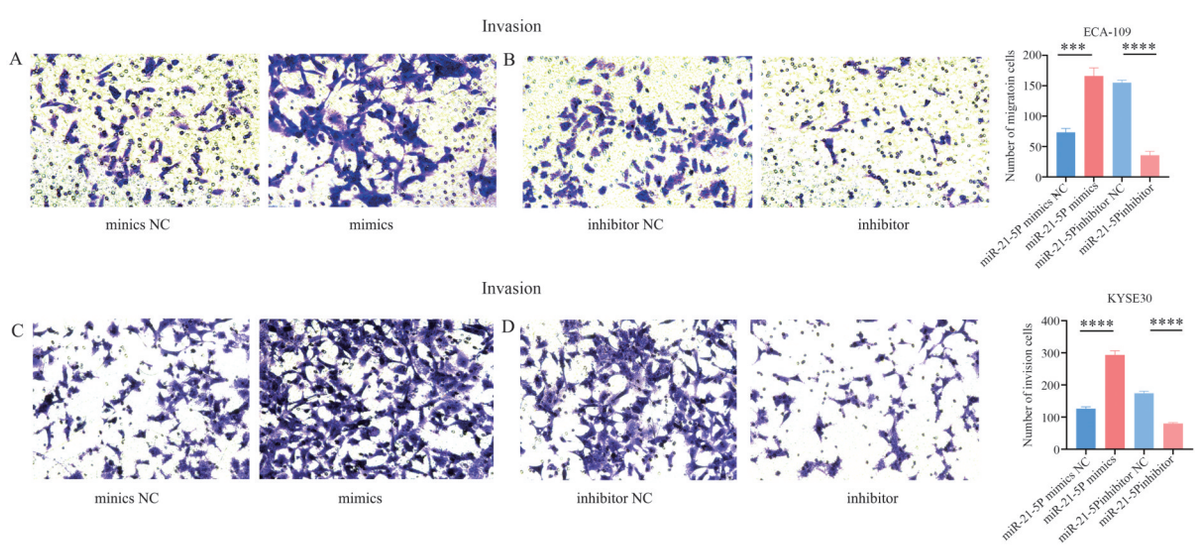
2.6.1　构建BNC2　扩增与miR-21-5p的靶基因BNC2 3′UTR序列，构建具有野生型和突变型BNC2的载体，并用于萤光素酶报告基因测定。见



$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\ 1$

图5　过表达和敲低miR-21-5P后，在CCK8，Transwell功能试验验证对细胞增殖迁移的影响

Fig 5　The effect of Transwell function test on cell proliferation and migration in CCK8 after overexpression and knock-down of miR-21-5P



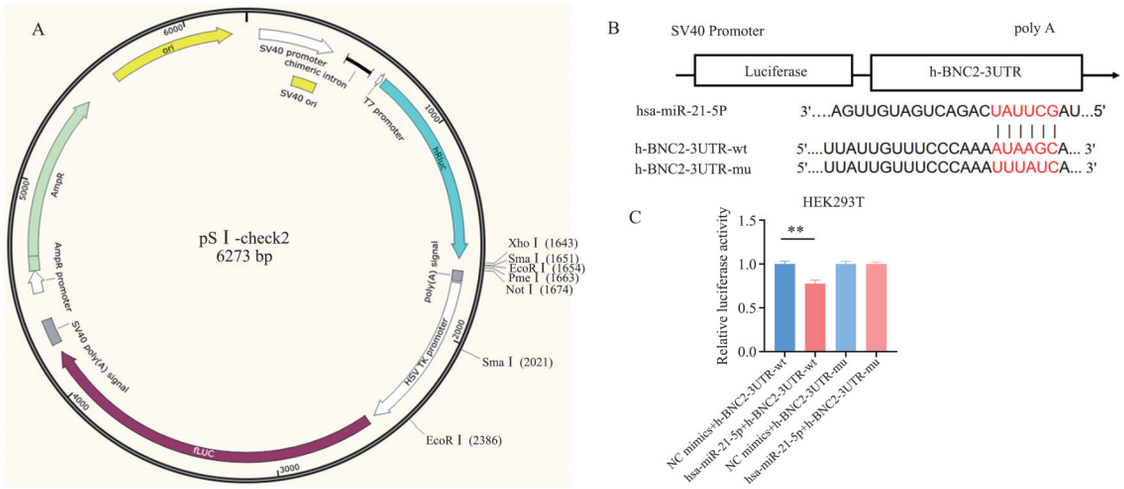
$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\ 1$

图6　过表达和敲低miR-21-5P后在Transwell功能试验验证对细胞侵袭的影响

Fig 6　The effect of overexpression and knockdown of miR-21-5P on cell invasion verified in Transwell functional tests

图7A、B。

2.6.2　双荧光素酶报告基因测定　双萤光素酶报告基因测定的结果显示，与NC组相比，用BNC2野生型载体转染的miR-21-5p mimics组中的荧光素酶活性受到显著抑制（$P<0.05$），而与NC组相比，BNC2突变型载体转染的miR-21-5pmimics组的活性没有显著改变（$P>0.05$）（图7C）。



$^{**}P<0.01$

图7 双荧光素酶验证miR-21-5P与BNC2的关系

Fig 7 The relationship between miR-21-5P and BNC2 verified by double-luciferase

3 讨论

癌症是世界范围内常见的癌症类型。然而，伴有远处转移和局部侵袭的癌症仍与预后不良有关。在这项研究中，使用多种生物信息学和统计学方法来评估具有各种临床病理特征的ESCA患者的miR-21-5p，BNC2表达与预后的相关性，以及BNC2在ESCA中的潜在功能。进一步在体外过表达和敲低miR-21-5p，以检测其对ESCA细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响。研究发现至少有1/3的蛋白质编码基因受到miRNA的调控，足以说明miRNA作用范围的广泛和对细胞整个生命过程调控的重要性。因此，可以推测，miRNA表达异常或对靶向基因的调控作用发生异常都可能是诱导肿瘤发生的因素之一[18-20]。进一步进行下游潜在mRNA预测，在本研究中，观察到miR-21-5p的过表达显著降低了BNC2的表达。为了进一步阐明BNC2和miR-21-5p之间的关系，根据PCR和WB结果显示，上调miR-21-5p或下调miR-21-5p显著增加或减少BNC2的相对基因表达。这些结果表明，miR-21-5p直接靶向BNC2，其调节作用可能从而导致癌症的增殖迁移和侵袭作用。过表达的miR-21-5p可以显著增加增殖，侵袭和迁移细胞的数量。相反，下调miR-21-5p的表达可以显著降低侵袭和迁移细胞的数量。这些结果表明，miR-21-5p及其靶基因BNC2调节ESCA细胞的侵袭、迁移和增殖。然而，下游通路的确切机制还需要进一步研究。

作者贡献度说明：

邓雨函：研究的设计，撰写手稿并进行修改。阳梦和热则耶·麦麦提祖农：处理数据收集和生物信息学分析的同时，吴振华和李卉：收集数据。孙晓宏：监督了研究的设计、数据解释、论文准备和最终稿件的批准。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J].CA Cancer J Clin, 2021,71(3):209-249.

2 Hamer PW, Hight SC, Ward IG, et al. Stricture rate after chemoradiotherapy and radiotherapy for oesophageal squamous cell carcinoma: A 20-year experience [J]. ANZ J Surg, 2019,89(4):367-371.

3 Abnet CC, Arnold M, Wei WQ. Epidemiology of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Gastroenterology, 2018,154(2):360-373.

4 Cornish AJ, Tomlinson I, Houlston RS. Mendelian randomisation: A powerful and inexpensive method for identifying and excluding non-genetic risk factors for colorectal cancer[J]. Mol Aspects Med, 2019,69:41-47.

5 Hussen BM, Hidayat HJ, Salihi A, et al. MicroRNA: A signature for cancer progression[J]. Biomed Pharmacother, 2021,138:111528.

6 Harada K, Baba Y, Ishimoto T, et al. The role of microRNA in esophageal squamous cell carcinoma [J]. J Gastroenterol, 2016,51(6):520-530.

7 Rodrigues PM, Afonso MB, Simao AL, et al. MiR-21-5p promotes NASH-related hepatocarcinogenesis[J]. Liver Int, 2023,43(10):2256-2274.

8 Xie M, Cheng B, Yu S, et al. Cuproptosis-related miR-21-5p/FDX1 axis in clear cell renal cell carcinoma and its potential impact on tumor microenvironment[J]. Cells, 2022,12(1):173.

9 Li Q, Li B, Li Q, et al. Exosomal miR-21-5p derived

from gastric cancer promotes peritoneal metastasis *via* mesothelial-to-mesenchymal transition [J]. Cell Death Dis, 2018,9(9):854.
10 Jiang R, Chen X, Ge S,et al. MiR-21-5p induces pyroptosis in colorectal cancer *via* TGFBI[J]. Front Oncol, 2020,10:610545.
11 Luo D, Huang Z, Lv H, et al. Up-regulation of microRNA-21 indicates poor prognosis and promotes cell proliferation in esophageal squamous cell carcinoma *via* upregulation of lncRNA SNHG1 [J]. Cancer Manag Res, 2020,12:1-14.
12 Bobowski-Gerard M, Boulet C, Zummo FP,et al. Functional genomics uncovers the transcription factor BNC2 as required for myofibroblastic activation in fibrosis [J]. Nat Commun, 2022,13(1):5324.
13 Cesaratto L, Grisard E, Coan M, et al. BNC2 is a putative tumor suppressor gene in high-grade serous ovarian carcinoma and impacts cell survival after oxidative stress [J]. Cell Death Dis, 2016,7(9):e2374.
14 Liu T, Yuan L, Zou X. Circular RNA circ-BNC2 (hsa_circ_0008732) inhibits the progression of ovarian cancer through microRNA-223-3p/ FBXW7 axis [J]. J Ovarian Res, 2022,15(1):95.
15 Wu Y, Zhang X, Liu Y, et al. Decreased expression of BNC1 and BNC2 is associated with genetic or epigenetic regulation in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2016,17(2):153.
16 Song K, Xu H, Wang C. The role of N6-methyladenosine methylation in the progression of endometrial cancer[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2022, 37(9): 737-749.
17 Zhang Z, Liang Z, Li D, et al. Development of a CAFs-related gene signature to predict survival and drug response in bladder cancer[J]. Hum Cell, 2022,35(2): 649-664.
18 Kim T, Croce CM. MicroRNA and ER stress in cancer [J].Semin Cancer Biol,2021,75:3-14.
19 Bian S, Sun T. Functions of noncoding RNAs in neural development and neurological diseases[J]. Mol Neurobiol, 2011,44(3):359-373.
20 Sempere LF, Azmi AS, Moore A. MicroRNA-based diagnostic and therapeutic applications in cancer medicine [J].Wiley Interdiscip Rev RNA, 2021,12(6):e1662.

[**本文编辑**] 邹 洲 宋睿璞 朱 昊

《海南医学院学报》入编《中文核心期刊要目总览》

本刊编辑部

近日,《海南医学院学报》收到北京大学图书馆的通知,入编《中文核心期刊要目总览》2023年版(即第10版)之综合性医药卫生类的核心期刊。

《中文核心期刊要目总览》首编于1992年,由北京大学图书馆联合多家单位的专家和期刊工作者采用定量评价和定性评审相结合的方法对核心期刊进行评价。其中定量评价采用被摘量、被摘率、被引量、期刊他引量、影响因子、他引影响因子、5年影响因子、5年他引影响因子、特征因子、论文影响分值、互引指数、论文被引指数、获奖或被重要检索系统收录、基金论文比、Web下载量、3年Web下载率、可被引文献比、前5年可被引文献比等18个评价指标;定性评审则是在定量评价的基础上,邀请9 473名各学科知名专家对候选期刊进行评审。最终,2023年版《中文核心期刊要目总览》从我国正在出版的中文期刊中评选出1987种核心期刊。

在此,我们向一直关心、指导和帮助《海南医学院学报》不断发展的各级领导、编委、审稿专家以及广大的作者和读者们致以诚挚的感谢!本刊主要刊登有国家重大项目资助、国家自然科学基金资助及其他各类相关基金资助的具有科学性、创新性、先进性、实用性的基础医学、临床医学、药学、公共卫生与预防医学、中医学等方面的高质量学术论文,欢迎您投稿。

海南医学院现主办2本SCI期刊:Asian Pacific Journal of Tropical Medicine、Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine;2本ESCI期刊:Journal of Acute Disease、Asian Pacific Journal of Reproduction;中国第一本全健康领域的国际性学术杂志:One Health Bulletin;北大核心期刊、中国科技核心期刊、中国核心学术期刊、《中国学术期刊影响因子年报》统计源期刊、第6届中国精品科技期刊:《海南医学院学报》。

Website:http://journals.hainmc.edu.cn
E-mail:jhmu@hainmc.edu.cn