·论 著·

# miR-203a-3p通过靶向调控GATA6抑制食管鳞癌细胞的增殖和侵袭

殷彩桥[1]，方呈祥[2]，陈 婷[1]，黄 慧[1]，郑 轶[1]，谭家武[1]，张继乔[1]，张 辉[1]

1. 湖北民族大学附属民大医院消化内科，湖北 恩施 445000；
2. 湖北民族大学附属民大医院肿瘤科，湖北 恩施 445000

［**摘要**］ **背景与目的：**生物信息学分析提示*GATA6*是miR-203a-3p的潜在靶基因，明确miR-203a-3p通过靶向调控GATA6抑制食管鳞癌细胞的增殖和侵袭。**方法：**采用Lipofectamine™RNAiMAX对培养的KYSE-70和KYSE-180细胞瞬时转染。采用实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction，RTFQ-PCR）检测miR-203a-3p和GATA6的表达水平。采用蛋白质印迹法（Western blot）检测GATA6蛋白的水平。质粒联合转染后检测相对萤光素酶活性。对食管鳞癌患者标本进行恶性肿瘤与异型增生组织miR-203a-3p和GATA6的表达检测。**结果：**RTFQ-PCR及Western blot检测结果显示，与对照组比较，*GATA6*基因和蛋白的表达在miR-203a-3p转染组中降低，在miR-203a-3p inhibitor组却升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与对照组比较，miR-203a-3p转染组KYSE-70细胞增殖能力下降，miR-203a-3p inhibitor组中却升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。在KYSE-180中虽然差异无统计学意义，但其趋势却与KYSE-70一致。与对照组比较，在KYSE-70和KYSE-180细胞系中，侵袭细胞数值/视野在miR-203a-3p转染组中均明显下降（$P<0.01$），在miR-203a-3p inhibitor组中却明显升高（$P<0.05$）。与miR-203a-3p掠夺型+*GATA6*野生型组和miR-203a-3p野生型+*GATA6*突变型组比较，相对萤光素酶活性在miR-203a-3p野生型+GATA6野生型组中降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与异型增生组织相比较，100%（10/10）食管鳞癌患者miR-203a-3p在恶性肿瘤组织的表达下调，而GATA6表达水平上调。**结论：**miR-203a-3p通过靶向调控GATA6抑制食管鳞癌细胞的增殖和侵袭能力。

［**关键词**］ 食管鳞状细胞癌；miR-203a-3p；GATA6；增殖；侵袭
DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.06.006
**中图分类号：**R735.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-3639 (2020)06-0441-08

**miR-203a-3p inhibits cell proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by targeting GATA6**

YIN Caiqiao[1], FANG Chengxiang[2], CHEN Ting[1], HUANG Hui[1], ZHENG Yi[1], TAN Jiawu[1], ZHANG Jiqiao[1], ZHANG Hui[1] (1. Department of Gastroenterology, Minda Hospital of Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei Province, China; 2. Department of Oncology, Minda Hospital of Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei Province, China)

Correspondence to: YIN Caiqiao E-mail: 915683258@qq.com

［**Abstract**］ **Background and purpose:** Bioinformatics analysis showed that *GATA6* was a potential target gene for miR-203a-3p. This study aimed to determine whether miR-203a-3p could inhibit proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells by targeting GATA6. **Methods:** Transient transfection was performed with Lipofectamine™RNAiMAX in cultured KYSE-70 and KYSE-180 cell lines. The expressions of miR-203a-3p and GATA6 were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR). GATA6 protein expression was detected by Western blot. The relative luciferase activity was further detected by dual-luciferase reporter assay after co-transfection with plasmid by FuGENE reagent. The expression levels of miR-203a-3p and GATA6 in esophageal malignant and dysplastic tissues were determined by RTFQ-PCR after

**基金项目：**中国国家留学基金管理委员会2016年地方合作项目（留金法［2016］5113号，201608420206）；
湖北民族学院博士启动基金项目（鄂民院科技字［2014］8号，MY2014B021）。
通信作者：殷彩桥 E-mail: 915683258@qq.com

microdissection of specimens. **Results:** The RTFQ-PCR and Western blot results showed that, compared with the control group, the expression levels of GATA6 mRNA and protein were significantly decreased in miR-203a-3p mimic transfection group, while significantly increased in the miR-203a-3p inhibitor transfection group ($P$<0.05). The expression levels of GATA6 and miR-203a-3p were inversely correlated. Compared with the control group, the cell proliferation viability in the KYSE-70 cell line was decreased in the miR-203a-3p mimic transfection group, while increased in the miR-203a-3p transfection group, which was statistically significant ($P$<0.05). Although it did not reach statistical significance in the KYSE-180 cell line, its trend was consistent with that of the KYSE-70 cell line. Compared with the control group, the relative number of invasive cell per field in the miR-203a-3p mimic transfection group decreased significantly ($P$<0.01), while increased in the miR-203a-3p inhibitor transfection group ($P$<0.05), which had significant statistical significance. Compared with miR-203a-3p scrambled + GATA6 wild type group and miR-203a-3p wild type +GATA6 mutant group, relative luciferase enzyme activity in miR-203a-3p wild type+GATA6 in wild type group significantly decreased ($P$<0.05). Compared with the dysplastic tissues, the miR-203a-3p expression in esophageal malignant tissues decreased in all the ESCC patients, while GATA6 expression level increased. **Conclusion:** miR-203a-3p could inhibit the proliferation and invasion ability of ESCC by targeting GATA6.

［**Key words**］ Esophageal squamous cell carcinoma; miR-203a-3p; GATA6; Proliferation; Invasion

食管癌发病率和死亡率分别位于全球肿瘤的第8位和第6位，严重威胁着人类的生命和健康。食管鳞状细胞癌（esophageal squamous cell carcinoma，ESCC）是食管癌的主要病理分型，在发展中国家，食管癌患者中约80%属于ESCC，高死亡率与临床诊断时病情已属于晚期有关，中国是ESCC的高发地区[1-2]。微小核糖核酸（micro-ribonucleic acids，microRNAs，miRNAs）是一种包含19~22个核苷酸的进化保守的小的非编码单链RNA，通过碱基配对在其目标信使RNA（messenger RNA，mRNA）的3’未翻译区域（3’-UTR），参与调节不同细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡等重要的肿瘤细胞生物学过程[3-4]。许多miRNAs高度保守，可以通过影响多种靶基因的表达来参与到多种细胞功能途径中，而miRNAs表达的改变和肿瘤发生有关。miRNAs可以作为恶性肿瘤的早期诊断和临床靶向治疗的新的候选者[5-6]。miR-203a-3p是影响上皮细胞生长、分化以及功能的重要分子，并多在上皮源性肿瘤中发挥着防癌、抑癌的作用[7-9]。转录因子GTAT6是高度保守的锌转录因子家族的一员，在早期胚胎发生过程中高表达，在后期胚胎发生过程中定位于内皮细胞，从而在调控细胞分化和老化、器官形成和肿瘤发生、发展中发挥重要作用[10]。不同的miRNAs通过不同的信号通路降低*GATA6*表达后降低细胞的增殖侵袭能力，影响乳腺癌[11]、食管癌[12-15]等肿瘤的发生、发展过程。我们通过www.mirbase.org和http://mircancer.ecu.edu等工具进行生物信息学分析提示GATA6是miR-203a-3p的潜在靶基因，miR-203a-3p可能通过调节GATA6在ESCC中发挥肿瘤抑制作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 生物信息学分析和靶基因预测

主要利用www.mirbase.org和http://mircancer.ecu.edu网站以及其他在线工具进行生物信息学分析和miRNAs的靶基因预测。

### 1.2 细胞培养

ESCC细胞株（KYSE-70和KYSE-180）（由美国约翰斯·霍普金斯大学的Steve Meltzer博士实验室赠送）在RPMI-1640培养液中培养，辅以10%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）和1%青霉素及1%链霉素，在37 ℃、$CO_2$体积分数为5%的细胞培养箱中培养。

### 1.3 miRNAs转染实验

将KYSE-70和KYSE-180细胞（$2\times10^5$细胞/孔）分别种植在24孔细胞培养板中。在37 ℃、$CO_2$体积分数为5%的的条件下温育24 h，细胞生长达到了70%~80%的培养孔板面积时，使用Lipofectamine™RNAiMAX（购自美国Life Technologies公司）在Opti-MEM无血清培养液（购自美国Life Technologies公司）中

将miR-203a-3p模拟物（miR-203a-3p mimic，Cat#4464066，购自美国Life Technologies公司）、miR-203a-3p模拟物阴性对照组（mock，miRVana™ miRNA Mimic，Negative Control，Cat# 4464059，购自美国Life Technologies公司）、miR-203a-3p抑制物（miR-203a-3p inhibitor，Cat# 4464084，购自美国Life Technologies公司）、miR-203a-3p抑制物阴性对照组（Inhibitor mock，miRVana™ miRNA Inhibitor，Negative Control，Cat# 4464077，购自美国Life Technologies公司）分别瞬时转染到细胞中并继续培养48 h，进行后续实验。

### 1.4 RNA提取和实时荧光定量聚合酶链反应（real–time fluorescence quantitative polymerase chain reaction，RTFQ–PCR）检测

用TRIzol试剂（购自美国Invitrogen公司）提取总RNAs，选择TaqMan™ MicroRNA反转录试剂盒（购自美国Applied Biosystems公司），用采用miR-203a-3p茎环引物（lot#p179813-000 C03，购自美国Applied Biosystems公司）对RNAs进行反转录后进一步做RTFQ-PCR实验。iScript™RT supermix（购自美国Applied Biosystems公司）用于CYBR Green对RNAs进行反转录，iQTM CYBR Green Supermix和GATA6引物（lot#p163274538，购自美国Applied Biosystems公司）分别用作RTFQ-PCR检测。U6和18S作为内参基因。使用QuantStudio Design&Analysis Software进行RTFQ-PCR分析。

### 1.5 蛋白质印迹法（Western blot）检测

对KYSE-70和KYSE-180采用瞬时转染miRNAs，分成miR-203a-3p模拟物组和模拟物阴性对照组以及miR-203a-3p抑制物组和抑制物阴性对照组，转染后培养48 h，用磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered solution，PBS）洗2次，然后加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液（购自美国ThermoFisher公司），在冰上放置10 min，在12 000×*g*离心10 min，收集上清液（即蛋白质液），用纳米液滴系统（nanodrop system）测量蛋白质浓度。蛋白质样品煮沸10 min变性，装入十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）（10%）凝胶进行电泳，并转移到PVDF膜（购自美国Millipore公司）上。用5%脱脂牛奶的PBS-T（含0.1%Tween）在室温下对膜封闭30 min，然后加入一抗（兔多克隆GATA6抗体，1∶1 000；购自美国ThermoFisherr公司，Cat#PA1-104），在4 ℃温育24 h，PBS-T冲洗后再加入二抗（兔抗IgG 抗体，1∶2 000；购自美国Epitomics公司），在37 ℃温育2 h后PBS-T冲洗。用增强化学发光试剂（购自美国Pierce公司）检测信号，在SuperSignal West Pico Chemoluminescence system（美国Pierce公司）检测结合抗体。兔多克隆β-actin抗体（1∶1 000；购自美国ThermoFisher公司，Cat#PA1-46296）作为对照组。整个实验操作程序都严格按照试剂盒说明进行。

### 1.6 细胞存活率分析

将miRNAs转染的细胞种植在96孔（1 000个细胞/孔）细胞培养板中，在达到70%~80%的培养孔面积时，在每孔中加入活细胞代谢物还原剂噻唑蓝［3- (4,5-dimethylthiahiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide，MTT］，并在37 ℃、$CO_2$体积分数为5%的条件下温育3 h，然后每孔加入100 μL二甲基亚砜（dimethylsulfoxide，DMSO），在37 ℃、$CO_2$体积分数为5%的温育30 min，然后使用ELX800荧光分析仪（购自美国Bio-Tek公司）读取吸光度（*D*）值。

### 1.7 细胞体外侵袭能力测定

使用Matrigel基质胶（购自美国BD公司）进行了基底膜基质凝胶细胞体外侵袭能力分析。在每个实验开始之前，将500 μL的放置至室温的无血清的RPMI-1640培养基添加到上室和下室，在37 ℃、$CO_2$体积分数为5%的细胞培养箱中水化2 h，将miR-203a-3p mimics、mock（NC miR-mimics）和miR-203a-3p inhibitor、inhibitor-mock（NC miR-inhibitor）转染48 h的细胞种植到上室（$16\times10^4$个细胞/室）。下室加入含10%FBS的RPMI-1640培养液，在37 ℃、$CO_2$体积分数为5%的细胞培养箱培养48 h。用Diff-Quick staining

solution试剂盒按试剂盒要求程序对各组侵袭细胞进行固定，染色，并使用倒置显微镜进行计数。细胞计数在5个不重叠的随机区域进行，计数侵袭细胞。

### 1.8 双萤光素酶报告实验

将KYSE-70和KYSE-180细胞分别种植在24孔培养板（$2\times10^5$细胞/孔），使用FuGENE转染试剂（FuGENE Transfection Reagent，购自美国Promega公司）将100 ng的pEZX-GATA6-3'UTR （野生型*GATA6*：Cat#HimT088468-MT0；突变型*GATA6*：Cat#CS-HimT088468-MT05-01）与100ng pEZX-miR-203a-3p（野生型miR-203a-3p：Cat#HimR0249-MR04-10，掠夺型pEZX-scrambled，GeneCopoeia）进行联合质粒转染，使用双萤光素酶报告系统（secrete-pair dual luciferase reporter assay，ThermoFisher，Cat#LF032）检测相对萤光素酶活性，每个样品都是用Glomax仪器（购自美国Promega公司）测定3次。

### 1.9 FFPE标本微解剖及RNAs提取

为检测miR-203a-3p和GATA6在食管癌患者食管组织的表达水平，对ESCC患者的4%的甲醛溶液固定石蜡包埋（formalin-fixed and paraffin-embedded，FFPE）标本进行微解剖，用ABI RecoverAll™总核酸分离试剂盒（购自美国Ambion公司）分别提取食管恶性肿瘤组织与异型增生组织总RNAs。

### 1.10 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学处理。数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用双侧Student's *t*检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

## 2 结　果

### 2.1 miR–203a–3p在ESCC转染实验中的表达水平

提取转染miR-203a-3p mimics、mock（NC miR-mimics）和miR-203a-3p inhibitor、inhibitor-mock（NC miR-inhibitor）48 h的KYSE-70和KYSE-180细胞的总RNA，进一步做TaqMan RTFQ-PCR。结果显示，与对照组比较，miR-203a-3p在miR-203a-3p mimics转染组的表达明显升高（$P<0.01$），而其表达在miR-203a-3p inhibitor组中明显下降（$P<0.01$，图1），提示miRNAs转染成功。

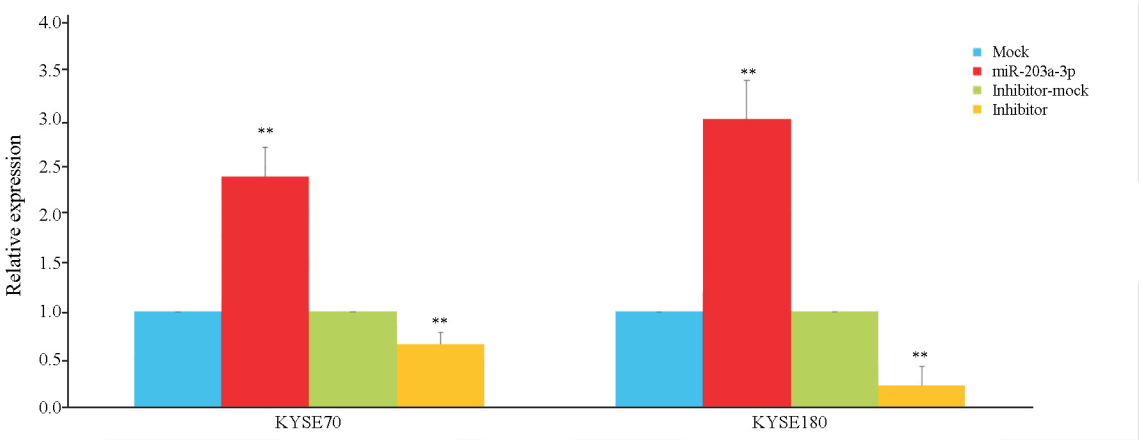


图 1 miR–203a–3p在ESCC miRNAs转染实验中的表达水平

**Fig. 1 miR-203a-3p expression in ESCC miRNAs transfection assay**

Compared with the control group, the expression of miR-203a-3p in the miR-203a-3p mimics transfection group was significantly increased, while the expression was significantly decreased in the miR-203a-3p inhibitor group, all cell lines were successfully transfected; $P<0.01$

### 2.2 miR–203a–3p下调*GATA6*基因的表达水平

提取转染miR-203a-3p mimics、mock（NC miR-mimics）和miR-203a-3p inhibitor、inhibitor-mock（NC miR-inhibitor）48 h的KYSE-70和KYSE-180细胞的总RNA，进一步做CYBR green RTFQ-PCR检测GATA6的表达水平。结果显示，与对照组相比较，GATA6在miR-203a-3p mimic转染组中的表达水平明显降低，而在miR-203a-3p inhibitor转染组中的表达明显升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。GATA6和miR-203a-3p的

表达水平呈反向关系（图2）。

### 2.3 miR-203a-3p下调GATA6蛋白的表达水平

从转染48 h的培养细胞中提取蛋白质后严格按Western blot检测方法进行操作，用Image J软件对Western blot条带扫描后进行定量和统计学处理。结果显示，与对照相比，GATA6蛋白（$45\times10^3$）条带信号在miR-203a-3p转染组减弱，而在miR-203a-3p inhibitor转染组中的信号增强（$P<0.05$，图3）。

### 2.4 miR-203a-3p抑制细胞增殖能力

MTT检测结果显示，与对照组相比，在KYSE-70细胞株中细胞增殖能力在miR-203a-3p mimic转染组中下降，而在miR-203a-3p转染组中却升高，其差异有统计学意义（$P<0.05$），KYSE-180细胞株中虽然差异无统计学意义，但其趋势却与KYSE-70细胞株一致（图4）。

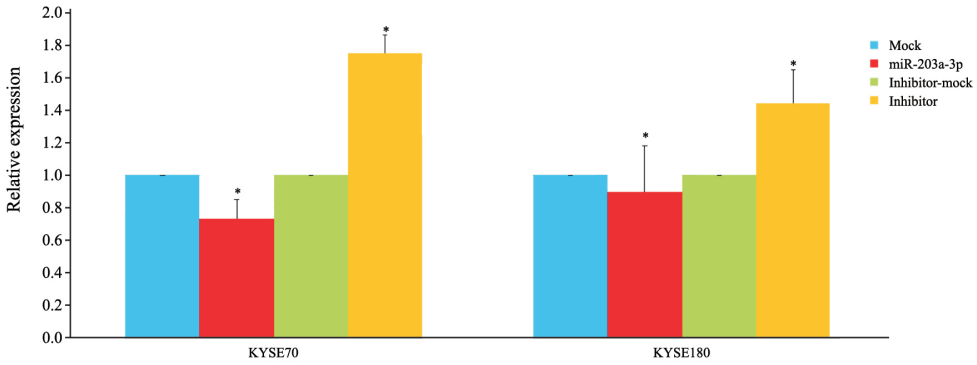


图 2 ESCC miRNAs转染实验中miR-203a-3p下调GATA6的表达水平

**Fig. 2 The expression of GATA6 was down-regulated by miR-203a-3p transfection in the ESCC cell lines**

Compared with control group,GATA6 expression was downregulated when miR-203a-3p mimic was transfected, while its expression was increased when inhibitor was transfected in ESCC cell lines; $P<0.05$

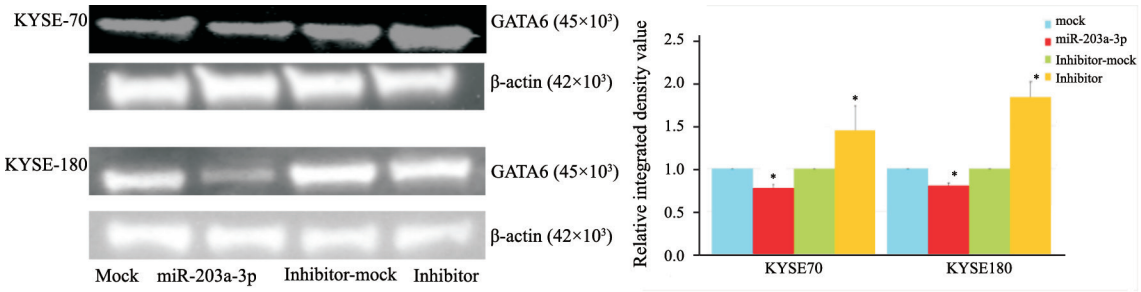


图 3 Western blot检测发现miR-203a-3p能降低GATA6蛋白表达水平

**Fig. 3 miR-203a-3p decreased GATA6 protein expression by Western blot assay in ESCC cell lines**

A: The band image of GATA6 protein expression; B: Relative integrated density value of the band; $P<0.05$

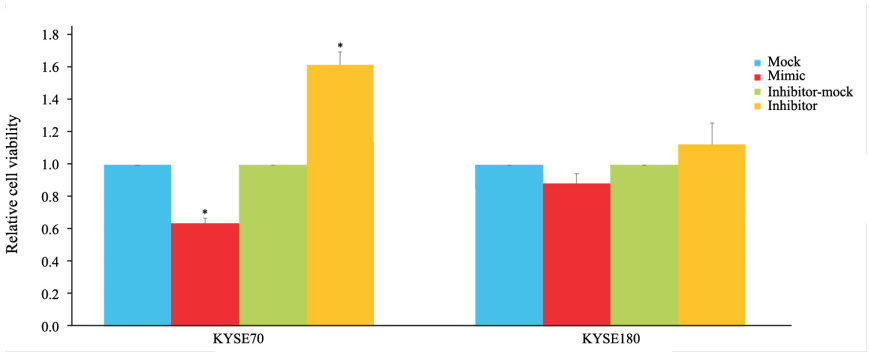


图 4 MTT检测中miR-203a-3p降低ESCC细胞增殖能力

**Fig. 4 miR-203a-3p decreased cell viability detected by MTT assay in ESCC cells**

Compared with control group, cell viability decreased in miR-203a-3p mimic group, while increased in miR-203a-3p inhibitor group in ESCC cell lines; $P<0.05$

### 2.5 miR–203a–3p抑制细胞侵袭能力

使用Matrigel基质胶进行细胞体外侵袭能力实验。结果显示，与对照组相比较，相对侵袭细胞数值/视野在miR-203a-3p mimic转染组中均明显下降（$P$<0.01），而在miR-203a-3p inhibitor转染组中KYSE-70细胞株却升高（$P$<0.05），差异均有统计学意义（图5）。

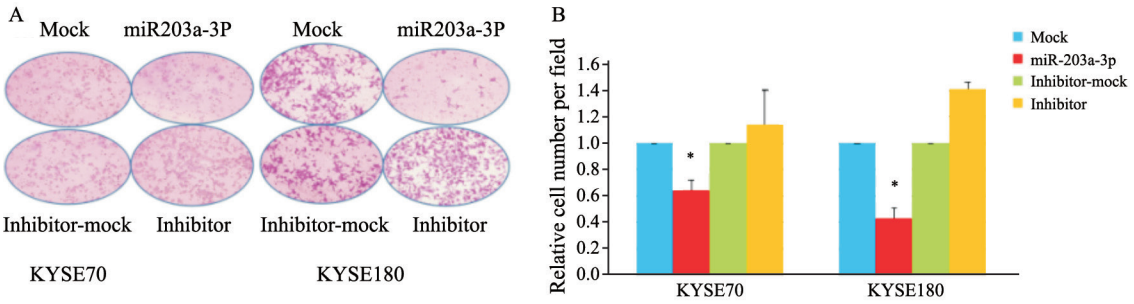


图 5 miR–203a–3p降低ESCC细胞系的侵袭能力

**Fig. 5 miR-203a-3p decreased invasion in ESCC cell lines**

A: Invasive cells under the microscope (×10); B: Relative invasive cell numbers per field. Compared with control group, cell invasion capacity was decreased after transfection with miR-203a-3p mimic, but increased after transfection with miR-203a-3p inhibitor

### 2.6 miR–203a–3p是通过与GATA6的3’–UTR的结合部位直接绑定而起到靶向调控作用

双萤光素酶报告分析结果显示，与miR-203a-3p掠夺型+*GATA6*野生型组和miR-203a-3p野生型+*GATA6*突变型组相比，相对萤光素酶活性在miR-203a-3p野生型+*GATA6*野生型组中明显降低，差异均有统计学意义（$P$<0.05）。miR-203a-3p是通过与GATA6的3’-UTR的结合部位直接绑定而起到靶向调控作用（图6）。

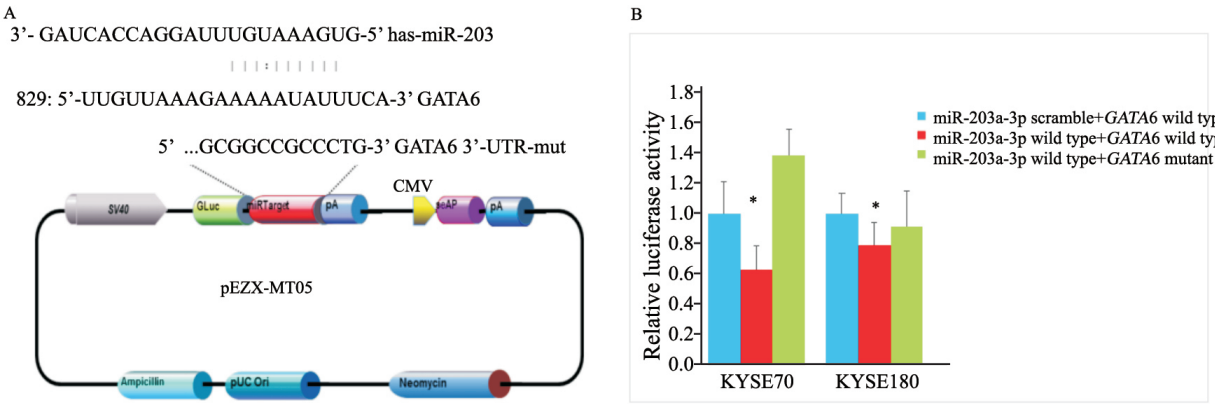


图 6 miR–203a–3p通过直接绑定在GATA6的3’–UTR而发挥靶向调控作用

**Fig. 6 miR-203a-3p targets GATA6 by directly binding to its 3’-UTR**

A: Location of the miR-203a-3p binding site at the 3’-UTR of GATA6 corresponding to the miR-203a-3p sequence; B: Luciferase assays confirmed that miR-203a-3p targets GATA6 by directly binding to its 3’-UTR. Relative luciferase activity was measured by dual luciferase reporter assay after co-transfection with miR-203a-3p or miR-203a-3p-scrambled control, and GATA6 (wild type or mutant) by FuGENE Reagent for 48 h

### 2.7 食管鳞癌患者恶性肿瘤组织中miR–203a–3p低表达而GATA6高表达

用RTFQ-PCR检测食管鳞癌患者恶性肿瘤组织与异型增生组织中miR-203a-3p和GATA6，与异型增生组织相比较，100%（10/10）食管鳞癌患者miR-203a-3p在恶性肿瘤组织中表达下调，而GATA6的表达水平上调（图7）。

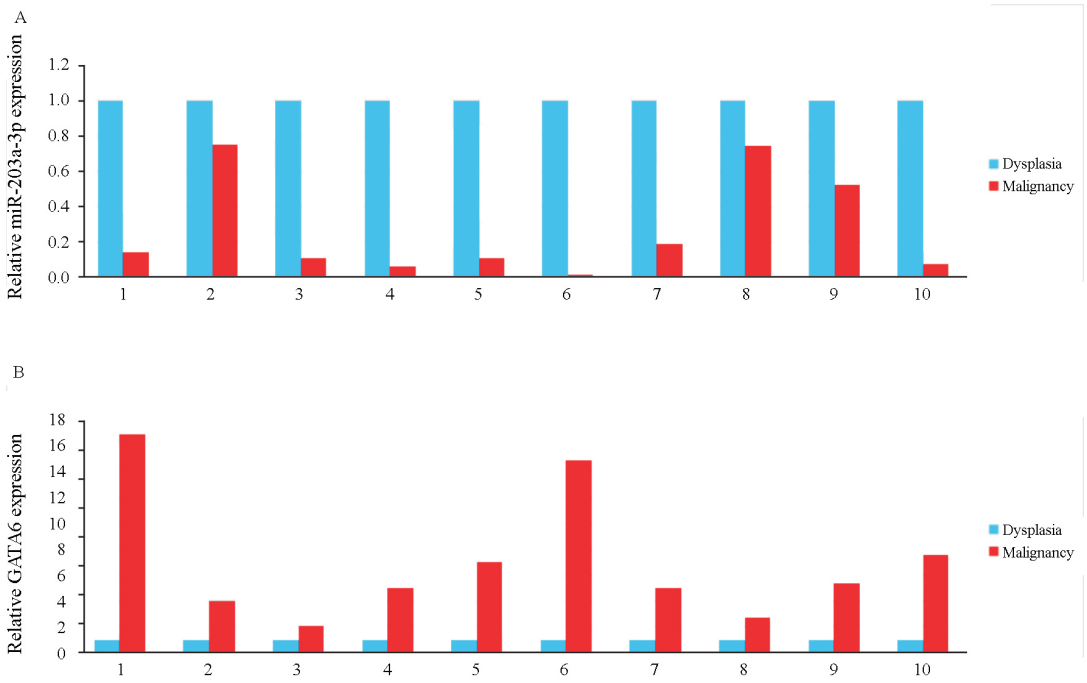


图 7　食管鳞癌病人恶性肿瘤组织中miR–203a–3p低表达而GATA6高表达

**Fig. 7　Down-regulation of miR203a-3p and up-regulation of GATA6 in malignant tissues of ESCC patient**

A: Expression of miR-203a-3p in ESCC and their adjacent dysplasia tissues was examined by RTFQ-PCR, 100% (10/10) had lower expression of miR-203a-3p in malignancy compared with dysplasia; B: Expression of GATA6 in ESCC and their adjacent dysplasia tissues was examined by RTFQ-PCR, 100% (10/10) had higher expression of GATA6 in malignancy compared with dysplasia

## 3　讨　　论

我们的生物信息学分析表明，miR-203a-3p是食管癌的一种肿瘤抑制性miRNAs，*GATA6*是其潜在的靶向调控基因，本研究目的就是验证我们的假设是否成立。RTFQ-PCR实验发现，与对照组相比，*GATA6*基因和蛋白的表达水平在miR-203a-3p mimic转染组中明显降低，而在miR-203a-3p inhibitor转染组中却明显升高，差异均有统计学意义（$P$<0.05）。进一步Western blot结果显示，与对照组相比，GATA6蛋白（相对分子质量45×$10^3$）条带信号在miR-203a-3p转染组中减弱，而在miR-203a-3p inhibitor转染组中的信号增强。RTFQ-PCR及Western blot实验结果一致，证明GATA6和miR-203a-3p的表达水平呈反向关系，在ESCC中miR-203a-3p可明显下调GATA6的表达。miR-203a-3p位于染色体14q32.33的区域，同时也是位于该染色体的一段不稳定的易丢失区域，在许多类型的恶性肿瘤中表达缺失或下调，成熟的miR-203a-3p被认为具有重要的抑癌作用。*GATA*是基因启动子中一段保守序列，*GATA6*是*GATA*家族中的一员，作为转录调节因子，调节中胚层及内胚层来源的细胞分化，在多种肿瘤疾病中成为促癌基因[10-15]。本研究显示，miR-203a-3p mimic转染后的KYSE-70细胞株中细胞增殖生存能力明显下降（$P$<0.05），虽然在KYSE-180中差异无统计学意义，但其趋势却与KYSE-70一致。Liu等[16]在胃贲门腺癌中和Chi等[17]在非小细胞肺癌中以及Jiang等[8]在鼻咽癌中的研究均提示miR-203a-3p可以降低肿瘤细胞增殖的作用，本研究结果与以上研究结论一致，miR-203a-3p可抑制ESCC细胞增殖。在临床上不可切除的肿瘤或转移是造成部分患者死亡的原因，本研究的Matrigel基质胶细胞体外侵袭能力实验结果显示，在miR-203a-3p mimic转染组中相对侵袭细胞数值/视野均明显下降（$P$<0.01），侵袭细胞显著减少，由此可见miR-203a-3p可降低食管癌细胞的增殖及侵袭能力。这为miR-203a-3p抑制ESCC中的细胞侵袭和转移提供了重要线索。miR-203a-3p抑制细胞侵袭和转移的研究结果在肺癌[18-19]及乳腺癌[20]和食管癌[21]等

之中也得到证实。为了证实GATA6的3'-UTR是否为miR-203a-3p在ESCC细胞的功能靶点，进一步测定质粒联合转染细胞中的萤光素酶活性，结果显示，相对萤光素酶活性在miR-203a-3p野生型+*GATA6*野生型组中明显降低，提示miR-203a-3p是通过与GATA6的3'-UTR的结合部位直接绑定而起到靶向调控作用。另外，本研究检测了10例食管鳞癌患者的食管恶性肿瘤组织与周围异型增生组织中miR-203a-3p及GATA6的表达水平，发现与异型增生组织相比较，100%（10/10）食管鳞癌患者miR-203a-3p在恶性肿瘤组织的表达下调，而GATA6的表达水平上调，进一步印证了我们在细胞水平的研究结果。本研究的不足之处是临床病例数较少，我们将收集更多临床患者标本来进一步验证miR-203a-3p对GATA6的调控作用。综合以上所有实验结果，我们认为miR-203a-3p通过靶向调控GATA6抑制食管鳞癌细胞的增殖和侵袭。

［参 考 文 献］


［1］ ABBAS G, KRASNA M. Overview of esophageal cancer［J］. Ann Cardiothorac Surg, 2017, 6 (2): 131–136.

［2］ CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China［J］. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115–132.

［3］ PALANICHAMY J K, RAO D S. miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic understanding［J］. Front Genet 2014, 5 (54): 1–10.

［4］ IORIO M V, CROCE C M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics.A comprehensive review［J］. EMBO Mol Med, 2012, 4 (3): 143–159.

［5］ ZHANG H C, TANG K F. Clinical value of integrated-signature miRNAs in esophageal cancer［J］. Cancer Med, 2017, 6 (8): 1893–1903.

［6］ MENG X R, LU P, MEI J Z, et al. Expression analysis of miRNA and target mRNAs in esophageal cancer［J］. Braz J Med Biol Res, 2014, 47 (9): 811–817.

［7］ 吴晓斌, 许红英, 徐 慧. miR-203a-3p通过靶向PRMT5抑制胃癌细胞增殖［J］. 现代肿瘤医学, 2017, 25 (14): 2226–2230.
WU X B, XU H Y, XU H. miR-203a-3p inhibits the proliferation of gastric cancer cells by targeting PRMT5［J］. J Mod Oncol, 2017, 25 (14): 2226–2230.

［8］ JIANG N, JIANG X, CHEN Z, et al. MiR-203a-3p suppresses cell proliferation and metastasis through inhibiting LASP1 in nasopharyngeal carcinoma［J］. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36 (1): 138.

［9］ CHI Y, JIN Q, LIU X, et al. miR-203 inhibits cell proliferation, invasion, and migration of non-small cell lung cancer by downregulating RGS17［J］. Cancer Sci, 2017, 108 (12): 2366–2372.

［10］ 赵 蔚, 赵艳滨, 张诗博. 转录调节因子GATA6在肿瘤中的研究进展［J］. 现代肿瘤医学, 2018, 26 (6): 955–957.
ZHAO W, ZHAO Y B, ZHANG S B. Research progress of transcriptin regulator GATA6 in tumor［J］. J Mod Oncol, 2018, 26 (6): 955–957.

［11］ SONG Y, TIAN T, FU X, et al. GATA6 is overexpressed in breast cancer and promotes breast cancer cell epithelial-mesenchymal transition by upregulating slug expression［J］. Exp Mol Pathol, 2015, 99 (3): 617–627.

［12］ CHIA N Y, DENG N, DA K, et al. Regulatory crosstalk between lineage-survival oncogenes KLF5, GATA4 and GATA6 cooperatively promotes gastric cancer development［J］. Gut, 2015, 64 (5):707–719.

［13］ SULAHIAN R, CASE Y F, SHEN J, et al. An integrative analysis reveals functional targets of GATA6 transcriptional regulation in gastric cancer［J］. Oncogene, 2014, 33 (49): 5637–5648.

［14］ SONG S H, JEON M S, NAM J W, et al. Aberrant GATA2 epigenetic dysregulation induces a GATA2/GATA6 switch in human gastric cancer［J］. Oncogene, 2018, 37 (8): 993–1004.

［15］ WU C S, WEI K L, CHOU J L, et al. Aberrant JAK/STAT signaling suppresses TFF1 and TFF2 through epigenetic silencing of GATA6 in gastric cancer［J］. Int J Mol Sci, 2016, 14 (9): 2467–2480.

［16］ LIU W, DONG Z M, LIANG J, et al. Downregulation of potential tumor suppressor miR-203a by promoter methylation contributes to the invasiveness of gastric cardia adenocarcinoma［J］. J Cancer Invest, 2016, 34 (10): 506–516.

［17］ CHI Y, JIN Q, LIU X, et al. miR-203 inhibits cell proliferation, invasion, and migration of non-small cell lung cancer by downregulating RGS17［J］. Cancer Sci, 2017, 108 (12): 2366–2372.

［18］ ZHENG J, WANG F, LU S, et al. LASP-1, regulated by miR-203, promotes tumor proliferation and aggressiveness in human non-small cell lung cancer［J］. Exp Mol Pathol, 2016, 100 (11): 116–124.

［19］ ZHOU Y, LIANG H, LIAO Z, et al. miR-203 enhances let-7 biogenesis by targeting LIN28B to suppress tumor growth in lung cancer［J］. Sci Rep, 2017, 7 (2): 680–686.

［20］ LIN J, WANG L, GAO J, et al. MiR-203 inhibits estrogen-induced viability, migration and invasion of estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells［J］. Exp Ther Med, 2017, 14 (3): 2702–2708.

［21］ LI P D, HU J L, MA C, et al. Upregulation of the long non-coding RNA PVT1 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression by acting as a molecular sponge of miR-203 and LASP1［J］. Oncotarget, 2017, 8 (21): 34164–34176.


（收稿日期：2018-10-10 修回日期：2020-03-10）