

LncRNA MIR31HG 通过诱导细胞周期阻滞抑制食管鳞癌细胞增殖活性

陈晓琦 陈欣菊* 张传雷 王新亭 翼爱英

(河南中医药大学第一附属医院消化肿瘤科, 郑州 450000)

摘要 本研究探讨 lncRNA MIR31HG 对食管鳞癌细胞增殖活性的影响。利用定量 PCR 检测 MIR31HG 在食管鳞癌标本及其癌旁组织、人食管上皮细胞系 Het-1A 和食管鳞癌细胞系 Eca-109、EC-1、KYSE30 中的表达; 采用过表达质粒 pcDNA3.1-MIR31HG 在食管鳞癌细胞系中过表达 MIR31HG; MTT 法和 SRB 法检测细胞增殖率; 细胞周期分析试剂盒检测细胞周期进程; Caspase3 活性检测试剂盒分析 Caspase3 活性; PCR 和 Western blot 法检测 p53、Caspase3 及 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白质表达水平。结果显示, 食管癌组织中 MIR31HG 表达水平显著低于癌旁组织($P < 0.05$); 与 Het-1A 细胞相比, Eca-109、EC-1、KYSE30 细胞中 MIR31HG 的表达均显著下调($P < 0.05$), 提示 MIR31HG 可能介导食管癌的发生发展。转染 pcDNA3.1-MIR31HG 可显著上调食管癌细胞中 MIR31HG 的 mRNA 表达($P < 0.01$), 且 MIR31HG 过表达可显著抑制食管癌细胞增殖活性($P < 0.05$), 减少 S 期细胞数($P < 0.05$), 增加 G1 期细胞数($P < 0.05$), 提示 MIR31HG 可能通过阻碍细胞周期 G1 期~S 期进程抑制食管癌细胞增殖活性。此外, MIR31HG 过表达显著增加 Caspase3 活性, 增加 Caspase3 和 p53 的 mRNA 和蛋白质表达水平, 同时抑制 Bcl-2 mRNA 和蛋白质表达水平。这表明, MIR31HG 可通过抑制食管癌细胞的增殖活性阻碍食管癌的发生发展, 这可为食管癌的诊断和治疗提供新策略。

关键词 lncRNA, MIR31HG, 食管鳞癌, 细胞增殖, 细胞周期

学科分类号 R735.1

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0452

食管癌是最常见的消化道肿瘤, 其发病率和死亡率位于中国癌症前列^[1]。近 10 年来, 食管鳞状细胞癌(ESCC)已发展成为最常见的食管癌类型^[2], 是世界范围内癌症相关死亡的主要原因之一^[3]。尽管通过放化疗合并手术切除等手段可改进食管癌的治疗疗效, 其预后仍不理想^[4]。因此, 亟待充分了解食管癌发生发展的遗传和分子机制, 发掘有效的食管癌的诊断和治疗手段。

长非编码 RNA (lncRNA) 是一类长度大于 200 个核苷酸且缺失编码能力的 RNA 分子^[5], 可通过表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等方式调控基因的表达水平。研究表明 lncRNA 在许多生物学过程中发挥重要作用, 如细胞生长、分化、免疫反应等^[6-7]。MIR31HG 是新发现的一种肿瘤相关 lncRNA, 其定位在人染色体 9(9p21.3)^[8], 被发现在胃癌组织中低表达, 且过表达 MIR31HG 能抑制胃癌细胞的增殖, 抑制肿瘤的发展^[9]。此外, 基

因谱分析发现, MIR31HG 在胰腺癌中高表达, 且敲除 MIR31HG 可抑制胰腺癌细胞的生长^[10]。MIR31HG 被发现与食管癌的不良预后密切相关, 但其在食管癌中的生物学功能仍未阐明^[11]。本研究检测了人 ESCC 组织和细胞系中 MIR31HG 的表达, 探索了改变 MIR31HG 表达对 ESCC 细胞生长的影响及其可能机制, 以期对诊断和治疗食管癌提供新策略。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

12 例健康人食管黏膜上皮组织(对照组)、21 例食管癌组织以及癌旁组织均取自河南中医药大学

* 通讯联系人。

Tel: 18538193183, E-mail: xin_j_chen@163.com

收稿日期: 2018-03-01, 接受日期: 2018-05-30

第一附属医院消化肿瘤科, 并与患者及家属签署知情同意书, 且研究经过河南中医药大学伦理委员会审批通过.

人食管上皮传代细胞系 Het-1A 及食管癌细胞系 Eca-109、EC-1 与 KYSE30 均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC); RPMI1640 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司; 过表达质粒 pcDNA3.1-MIR31HG 构建于上海吉玛生物制药有限公司; 引物由大连宝生物工程有限公司合成; Caspase3 活性检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒均购于上海 BlueGene 公司; Trizol 试剂和实时定量 PCR 试剂盒均购于大连 TaKaRa 公司; M-MLV 反转录试剂盒购自 Promega 公司; ECL 发光试剂盒、RIPA 裂解液和 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒购自碧云天生物公司; 抗体均购自 Abcam 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 Het-1A、Eca-109、EC-1 与 KYSE30 4 种细胞复苏, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养于含 10% FBS 与 1% 的青 - 链霉素的 RPMI1640 培养基, 3 d 换液一次, 并且将细胞浓度调整为 1.0×10⁵/L 用于后续实验.

1.2.2 实时定量 PCR

收集不同处理组的细胞, 用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 取 2 μg RNA 用 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA, 以 β-actin 为内参, 实时荧光定量 PCR 试剂盒检测 MIR31HG 表达水平. MIR31HG 引物: 上游 5' AAAATTGTGTGAGGAGGACATGG 3', 下游 5' TTCATCCCAACATTCTTGGATCT 3', 产物大小为 262 bp; β-actin 引物: 上游引物 5' AGTGTGACATGGTGCATCTC 3', 下游引物 5' TGCCCTGAGGCACTCTTCCAG 3', 产物大小为 456 bp. PCR 反应条件: 94℃ 变性 30 s, 94℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min. 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 相对表达量.

1.2.3 MIR31HG 的过表达和细胞转染

取对数生长期的巨噬细胞种于 6 孔板中, 待细胞融合度至 80% 时, 按照 Lipofectamine™ 2000 说明书操作步骤, 转染 pcDNA3.1-MIR31HG 及其阴性对照 pcDNA3.1. 转染结束后更换完全培养基, 继续培养 48 h.

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖

各组细胞包括稳定转染 pcDNA3.1-MIR31HG

的细胞分别接种于含有 10% FBS 培养基的 96 孔板, 每孔 2 000 个细胞分别培养 12 h、24 h、48 h、72 h, 利用 MTT 试剂盒, 检测 A₅₇₀ 的吸光度, 细胞相对存活率使用第 0 d 进行归一化处理. 所有的实验都进行 3 次. 稳定转染 pcDNA3.1-MIR31HG 的细胞被接种于 60 mm 的培养皿待生长 2 w 后, 使用甲醇固定, 0.5% 结晶紫染色, 计数并处理数据.

1.2.5 SRB 法检测细胞增殖

各组细胞包括稳定转染 pcDNA3.1-MIR31HG 的细胞均接种于含有 10% FBS 培养基的 96 孔板, 细胞调整密度为 1×10⁶, 细胞培养 1、2、3、4 d, 每孔加入 50 μl 预冷的三氯乙酸(TCA), 静置 5 min 后, 4℃ 反应 1 h, 去离子水去除 TCA. 待干燥后, 每孔中加入 100 μg SRB 反应 30 min 后弃掉染色液, 使用乙酸冲洗, 然后加入 Tris 溶液振荡 20 min, 最后使用酶标仪检测 A₄₉₂ 的吸光度.

1.2.6 细胞周期分析

收集不同处理组的细胞, 根据说明书指示使用碘化丙啶(Life Technologies)对细胞进行染色, 并使用 FACS Calibur Flow Cytometer (BD Biosciences) 对 G0/G1、S 以及 G2/M 期的细胞中 DNA 含量进行检测.

1.2.7 Caspase3 活性检测

Caspase3 活性检测试剂盒分析细胞活性. 待细胞密度长到 80%~90% 时, PBS 洗 3 遍, 加入 1 ml 胰酶, 37℃ 消化 3 min, 吹打细胞液至单细胞悬液. 将不同处理药品加入的培养板中孵育 48 h. 离心 2 min, PBS 洗涤 2 次, 加入 100 μl 裂解缓冲液, 冰上放置 15 min, 涡旋振荡 15 s, 离心 5 min. 取 10 μl 蛋白质上清液, 加入 90 μl 检测缓冲液中, 加入 10 μl Ac-LEHD-pNA, 避光反应 1~2 h 后检测结果.

1.2.8 Western blot 检测

待细胞密度长到 80%~90%, 用 PBS 洗 3 遍, 加入蛋白质裂解液以裂解细胞, BAC 法检测蛋白质浓度. 配制 SDS-PAGE 凝胶行蛋白质电泳后将凝胶中蛋白质转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 3 h, 分别加入相应的抗体 Bcl-2、Caspase3 及 GAPDH, 孵育过夜后 PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加二抗, 孵育 3 h 后 PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, ECL 法显色.

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析. 结果以均

数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 t 检验或方差分析. $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 食管癌组织与细胞中 MIR31HG 表达下调

实时定量 RT-PCR 检测 MIR31HG 在正常食管黏膜上皮组织(对照组)、食管癌组织及其癌旁组织中的表达, 结果如图 1a 所示, 与对照组相比, 食

管癌组织中 MIR31HG 的表达显著下调($P < 0.05$), 而癌旁组织中 MIR31HG 的表达无显著差异($P > 0.05$). 进一步检测 MIR31HG 在人食管上皮细胞系 Het-1A 和食管癌细胞系 Eca-109、EC-1 以及 KYSE30 中的表达, 结果显示, 与 Het-1A 细胞相比, 食管癌细胞 Eca-109、EC-1、KYSE30 中 MIR31HG 的表达均显著下调(图 1b, $P < 0.05$).

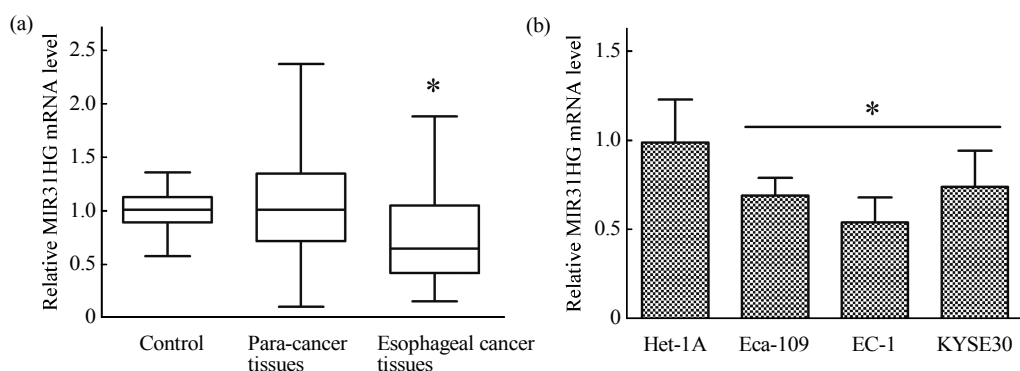


Fig. 1 The expression of lncRNA MIR31HG in esophageal tissues and cells

(a) The mRNA level of MIR31HG in esophageal tissues. Normal esophageal epithelial tissue was served as control. $*P < 0.05$ vs. control. (b) The mRNA level of MIR31HG in esophageal cells. $*P < 0.05$ vs. Het-1A.

2.2 过表达 MIR31HG 显著抑制食管癌细胞增殖活性

MIR31HG 在多种肿瘤细胞中表现抗增殖活性^[12], 因此采用 MTT 和 SRB 两种方法检测其对食管癌细胞增殖活性的影响. 转染 pcDNA3.1-MIR31HG 后, 食管癌细胞 Eca-109、EC-1、KYSE30 中的 MIR31HG 表达均显著上调(图 2a, $P < 0.01$). MTT 检测显示, 与对照组相比, 转染 pcDNA3.1-MIR31HG 后, 食管癌细胞 Eca-109、EC-1、KYSE30 的增殖活性均显著降低(图 2b~2e, $P < 0.05$). SRB 法检测结果亦显示, 转染 pcDNA3.1-MIR31HG 后, Eca-109、EC-1、KYSE30 细胞的增殖活性均显著降低(图 2f, $P < 0.05$).

2.3 过表达 MIR31HG 阻滞细胞周期进程

为进一步探究 MIR31HG 影响食管癌细胞增殖的机制, 检测 MIR31HG 对食管癌细胞 Eca-109、EC-1、KYSE30 细胞周期进程的影响. 结果显示, 过表达 MIR31HG 后, Eca-109、EC-1、KYSE30

细胞的 S 期细胞数显著性减少($P < 0.05$), 而 G1 期细胞数显著增加($P < 0.05$)(图 3), 提示 MIR31HG 可能通过阻滞细胞 G1 到 S 期的进程抑制食管癌细胞的增殖活性.

2.4 MIR31HG 过表达影响食管癌细胞 Caspase3、p53 及 Bcl-2 的表达

为进一步分析 MIR31HG 影响食管癌细胞活性的机制, 检测各组细胞的 Caspase3 活性. 结果显示, 与对照组相比, 过表达 MIR31HG 后, 食管癌细胞 Eca-109、EC-1、KYSE30 的 Caspase3 活性均显著增加(图 4a, $P < 0.05$). 采用 qRT-PCR 与 Western blot 检测 Caspase3、p53 及 Bcl-2 在 Eca-109、EC-1 和 KYSE30 细胞中的 mRNA 和蛋白质表达水平. 结果显示, 与对照组比, 过表达 MIR31HG 后, Caspase3、p53 的 mRNA 和蛋白质表达均显著上调(图 4b, c, $P < 0.05$), 而 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白质表达均显著下调(图 4b, c, $P < 0.05$).

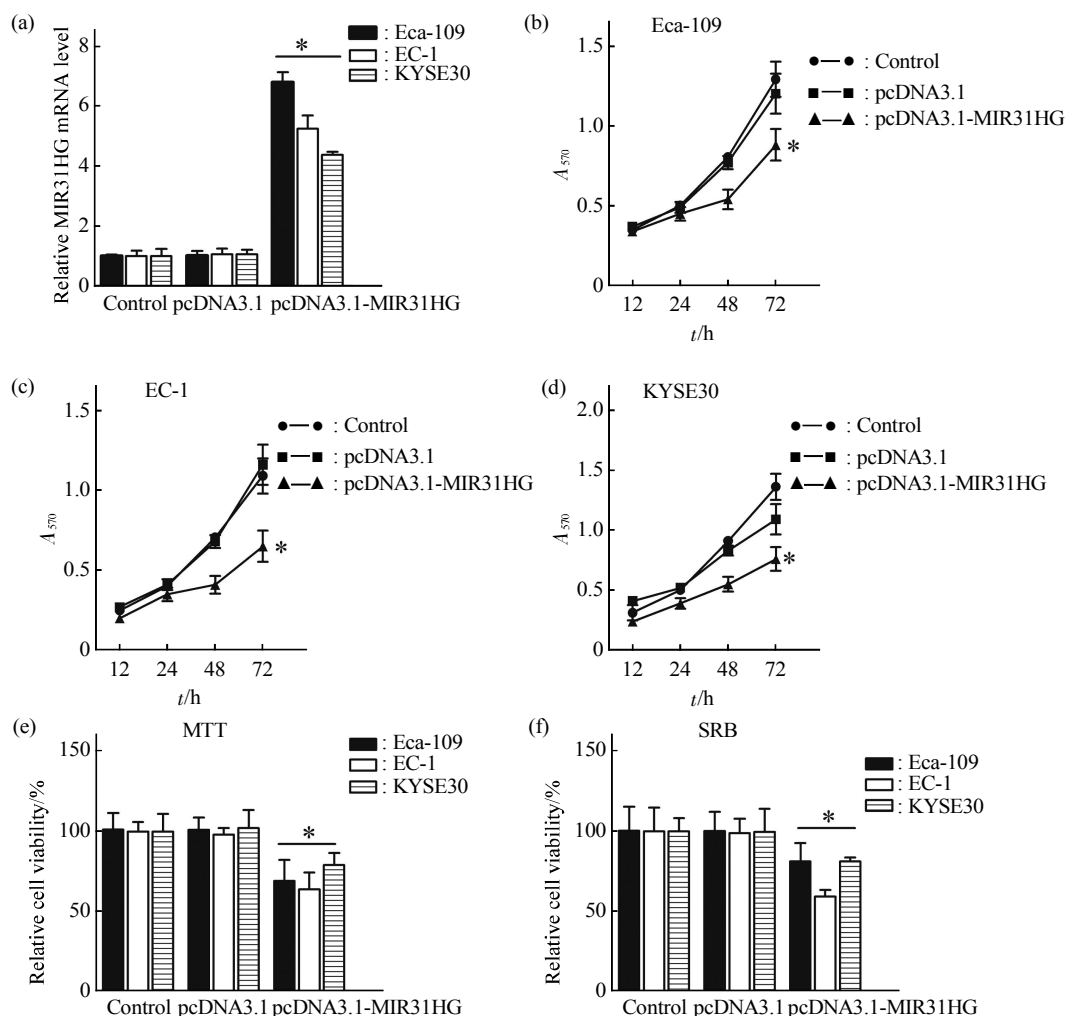


Fig. 2 Overexpression of MIR31HG inhibits the viability of esophageal cancer cells

Esophageal cancer cells Eca-109, EC-1 and KYSE30 were transfected with pcDNA3.1-MIR31HG or pcDNA3.1 vector, respectively. The untransfected cells were served as control. (a) The mRNA level of MIR31HG in Eca-109, EC-1 and KYSE30 cells was examined by qRT-PCR. * $P < 0.05$ vs. Control. (b, c, d, e) Cell viability of Eca-109, EC-1 and KYSE30 cells was detected by MTT method. (f) Cell viability of Eca-109, EC-1 and KYSE30 cells was determined by SRB method. * $P < 0.05$ vs. Control.

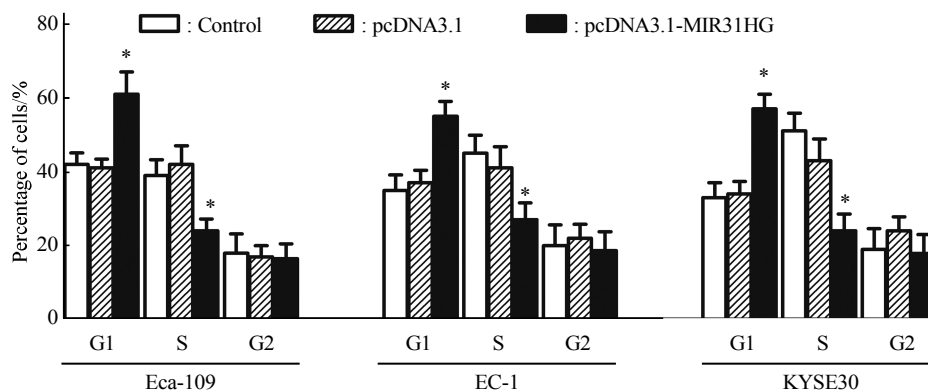


Fig. 3 Overexpression of MIR31HG blocks cell cycle progression of esophageal cancer cells

Esophageal cancer cells Eca-109, EC-1 and KYSE30 were transfected with pcDNA3.1-MIR31HG or pcDNA3.1 vector, respectively. The untransfected cells were served as control. Cell cycle progression of Eca-109, EC-1 and KYSE30 cells was analyzed by flow cytometry. * $P < 0.05$ vs. Control.

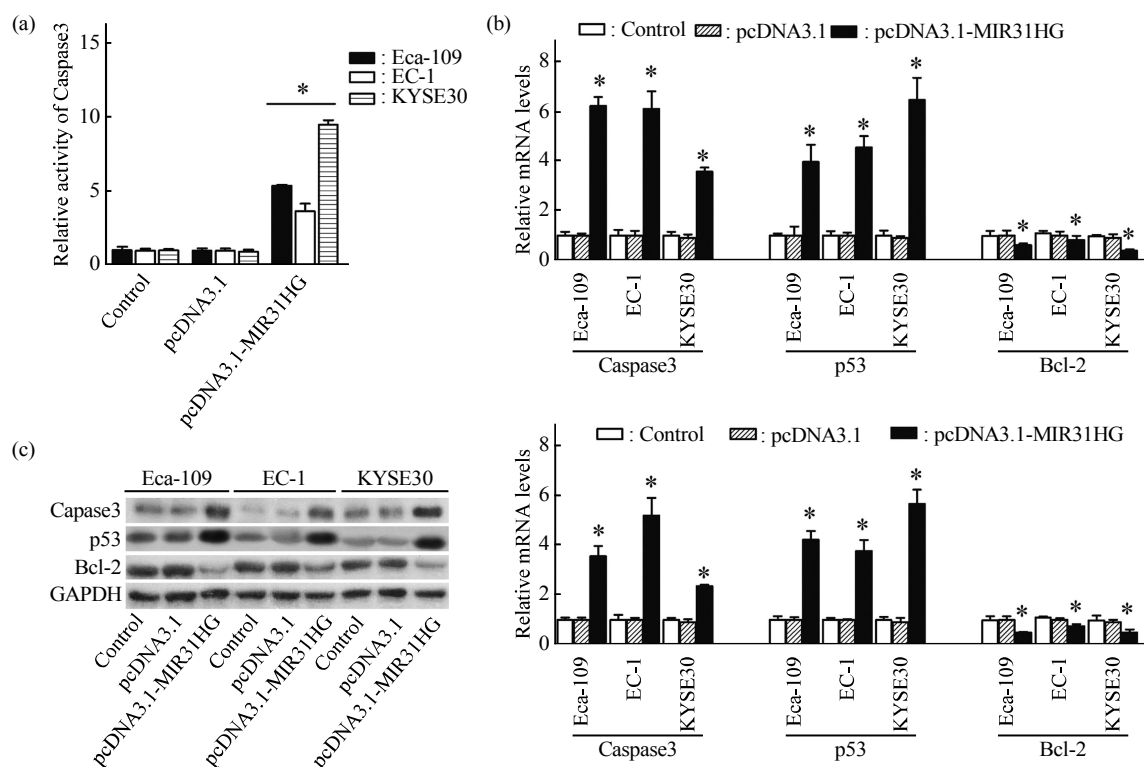


Fig. 4 The effects of MIR31HG on the expression of Caspase3, p53, and Bcl-2 in esophageal cancer cells

Esophageal cancer cell lines Eca-109, EC-1 and KYSE30 were transfected with pcDNA3.1-MIR31HG or pcDNA3.1 vector, respectively. The untransfected cells were used as Control. (a) The activity of Caspase3 in Eca-109, EC-1 and KYSE30 cells was measured by Caspase3 Activity Assay Kit. * $P < 0.05$ vs. Control. (b) The mRNA levels of Caspase3, p53 and Bcl-2 in Eca-109, EC-1 and KYSE30 cells were examined by qRT-PCR. * $P < 0.05$ vs. Control. (c) The protein levels of Caspase3, p53 and Bcl-2 in Eca-109, EC-1 and KYSE30 cells were determined by Western blot. * $P < 0.05$ vs. Control.

3 讨 论

近年来,手术切除、新辅助化学疗法、放射治疗以及生物治疗在食管癌的临床治疗上得到广泛应用,但预后差仍是食管癌治疗难以攻克的难题^[4],且其内在分子机制仍不明确^[13]。研究表明多种 lncRNA 的异常表达均可介导消化道疾病以及消化道肿瘤的发生发展^[3, 14],包括食管癌^[5]。因此,明确在食管癌发生发展中异常表达的 lncRNA,并进一步解析其在食管癌发生发展中的生物学功能及相关分子机制,有助于更好地了解食管癌的发生发展机制,从而为食管癌的预防和治疗提供新的思路。

MIR31HG 是一类在胃肠道中表达丰富的 lncRNA^[15],已被发现可以介导胃癌、胰腺癌以及结直肠癌等消化道肿瘤的发生发展^[9-10, 15]。研究表明,在胃癌组织中, MIR31HG 表达水平较低,且 MIR31HG 低表达的胃癌患者其肿瘤更大,病情更

严重,预后也相对较差^[9]。在胰腺癌患者风险基因筛查中发现, MIR31HG 在胰腺癌中高表达,且表现为致癌性^[10]。本研究发现,与正常食管黏膜上皮组织相比, MIR31HG 在食管癌组织中显著低表达。进一步的检测发现, MIR31HG 在食管癌细胞系 Eca-109、EC-1 和 KYSE30 中的表达较正常食管上皮细胞系 Het-1A 亦显著下调。这些结果与先前报道 MIR31HG 在食管癌组织中较其癌旁组织显示低表达相一致^[11],且 MIR31HG 表达水平低的食管癌患者其肿瘤表现更低分化和高转移特性,患者总生存率也更低^[11],提示 MIR31HG 的异常下调可能促进食管癌的发生发展。

lncRNA 作为调控基因表达的一类长链 RNA,对肿瘤细胞的生长、侵袭、迁移等细胞行为均存在不同程度的调控^[14]。为了探究 MIR31HG 在食管癌发生发展中的具体生物学功能,本研究构建了 MIR31HG 过表达载体,并建立稳定转染 MIR31HG

过表达载体的食管癌细胞系。MTT 和 SRB 法检测显示, 过表达 MIR31HG 可显著抑制食管癌细胞 Eca-109、EC-1 和 KYSE30 的增殖活性。这一发现与报道表明过表达 MIR31HG 可显著抑制胃癌细胞增殖活性相一致^[9], 亦表明 MIR31HG 可能负调控食管癌的发生发展。进一步分析细胞周期进程发现, MIR31HG 过表达后, Eca-109、EC-1 和 KYSE3 细胞的 S 期细胞数均显著减少, 而 G1 期细胞数均显著增加, 提示 MIR31HG 可阻滞食管癌细胞 G1 到 S 期的进程, 表明 MIR31HG 可能通过诱导细胞 G1/S 期阻滞进而抑制食管癌细胞的增殖活性。然而, 有研究发现敲除 MIR31HG 可诱导胰腺癌细胞 G1/S 期阻滞^[10], 这与本研究结果不符, 这可能与细胞类型和细胞微环境有关, 还需进一步的探讨研究。

癌细胞的持续生长与异常激活的细胞增殖以及减少的细胞凋亡均密切相关。研究发现 MIR31HG 可诱导胰腺癌细胞的凋亡^[10], 而在非小细胞肺癌细胞中过表达 MIR31HG 可减少细胞凋亡^[16]。本研究发现, MIR31HG 过表达可导致 Eca-109、EC-1 和 KYSE3 细胞的 Caspase3 活性、Caspase3 和 p53 的 mRNA 和蛋白质表达水平均显著增加, 同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白质表达水平均显著降低。这一发现表明 MIR31HG 可能通过增加 Caspase3 活性和抑制 Bcl-2 的表达促进食管癌细胞的凋亡, 进而负调控食管癌的发生发展。

综上所述, 本研究发现, MIR31HG 可通过诱导细胞周期阻滞抑制食管癌细胞的增殖活性, 通过增加 Caspase3 活性和抑制 Bcl-2 的表达促进食管癌细胞的凋亡, 进而负调控食管癌的发生发展。本研究为食管癌的诊断、治疗及预防提供了新的靶向和思路。然而, MIR31HG 在食管癌细胞中扮演的抗增殖促凋亡角色所涉及的具体机制、靶标分子、信号通路仍然是未知的, 需要今后进一步的探讨。

参 考 文 献

- [1] 邵永富, 蒋孝明, 朱梦颖, 等. 长链非编码 RNA 在消化系统肿瘤发生中的作用. 中国细胞生物学学报, 2013, **35**(9): 1357-1366
Shao Y F, Jiang X M, Zhu M Y, *et al.* Chinese Journal of Cell Biology 2013, **35**(9): 1357-1366
- [2] 张夏林, 李建民, 王晶, 等. 上消化道多原发癌研究进展. 山西医药杂志, 2014(12): 1382-1386
Zhang X L, Li J M, Wang J, *et al.* Shanxi Medical Journal, 2014 (12):1382-1386
- [3] Keane M G, Shah A, Pereira S P, *et al.* Novel biomarkers and endoscopic techniques for diagnosing pancreaticobiliary malignancy. F1000 Research, 2017, **6**:1643
- [4] Ilson D H. The role of radiation therapy in upper gastrointestinal cancers. Clinical Advances in Hematology & Oncology H & O, 2017, **15**(5): 366-376
- [5] Hidetaka S, Takatsugu I, Keisuke M, *et al.* Noncoding RNA expression aberration is associated with cancer progression and is a potential biomarker in esophageal squamous cell carcinoma. International Journal of Molecular Sciences, 2015, **16**(11): 27824-27834
- [6] Wei J W, Huang K, Yang C, *et al.* Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). Oncology Reports, 2017, **37**(1): 3-9
- [7] Kim C, Kang D, Lee E K, *et al.* Long noncoding RNAs and RNA-binding proteins in oxidative stress, cellular senescence, and age-related diseases. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, **2017**(3): 2062384
- [8] Montes M, Nielsen M M, Maglieri G, *et al.* The lncRNA MIR31HG regulates p16INK4A expression to modulate senescence. Nature Communications, 2015, **6**: 6967
- [9] Nie F Q, Ma S, Xie M, *et al.* Decreased long noncoding RNA MIR31HG is correlated with poor prognosis and contributes to cell proliferation in gastric cancer. Tumor Biology, 2016, **37**(6): 7693-7701
- [10] Yang H, Liu P, Zhang J, *et al.* Long noncoding RNA MIR31HG exhibits oncogenic property in pancreatic ductal adenocarcinoma and is negatively regulated by miR-193b. Oncogene, 2016, **35**(28): 3647-3657
- [11] Ren Z P, Chu X Y, Xue Z Q, *et al.* Down-regulation of lncRNA MIR31HG correlated with aggressive clinicopathological features and unfavorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2017, **21**(17): 3866-3870
- [12] Huang Y, Jin C, Zheng Y, *et al.* Knockdown of lncRNA MIR31HG inhibits adipocyte differentiation of human adipose-derived stem cells *via* histone modification of FABP4. Scientific Reports, 2017, **7**(1): 8080
- [13] Vellayappan B A, Soon Y Y, Ku G Y, *et al.* Chemoradiotherapy versus chemoradiotherapy plus surgery for esophageal cancer. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017, **8**: CD010511
- [14] Li H, Ma S Q, Huang J, *et al.* Roles of long noncoding RNAs in colorectal cancer metastasis. Oncotarget, 2017, **8** (24): 39859-39876
- [15] Liu Z, Bai J, Zhang L, *et al.* Conditional knockout of microRNA-31 promotes the development of colitis associated cancer. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2017, **490**(1): 62-68
- [16] Bing W, Hong J, Wang L, *et al.* Increased MIR31HG lncRNA expression increases gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines through the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway. Oncology Letters, 2017, **13**(5): 3494-3500

LncRNA MIR31HG Inhibits The Proliferation of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells by Inducing Cell Cycle Arrest

CHEN Xiao-Qi, CHEN Xin-Ju*, ZHANG Chuan-Lei, WANG Xin-Ting, YI Ai-Ying

(Department of Digestive Oncology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

Abstract The aim of present study is to investigate the effects and the mechanism of lncRNA MIR31HG on the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells. The mRNA levels of MIR31HG were tested by qPCR in specimens of esophageal cancer and para-carcinoma tissues, as well as in esophageal epithelial cell line Het-1A and in ESCC cell lines Eca-109, EC-1 and KYSE30. MIR31HG was overexpressed in Eca-109, EC-1 and KYSE30 cells by using overexpression plasmid pcDNA3.1-MIR31HG. Cell proliferation was then tested by both MTT and SRB methods. Cell cycle progression was detected by using Cell Cycle Assay Kit, and the activity of Caspase3 in cells was tested by Caspase3 Activity Assay Kit. The mRNA and protein levels of p53, Caspase3 and BCL-2 were measured by qPCR and Western blot. The expression of MIR31HG was significantly decreased in esophagus cancer comparing with para-carcinoma tissues, as well as in Eca-109, EC-1, KYSE30 cells comparing with Het-1A ($P < 0.05$). Transfection of pcDNA3.1-MIR31HG significantly increased MIR31HG expression in ESCC cell lines ($P < 0.01$), inhibited cell viability, reduced S-phase cells numbers and increased the G1-phase cells numbers ($P < 0.05$). These results suggested that MIR31HG may reduce cell viability of ESCC cells through impeding cell cycle. Moreover, MIR31HG overexpression also significantly increased Caspase3 activity, Caspase3 and p53 expression and decreased Bcl-2 expression in ESCC cells ($P < 0.05$). Taken together, these results suggest that MIR31HG may hinder the development of esophageal cancer by inhibiting the proliferation of ESCC cells, which may provide a new strategy for the diagnosis and treatment of esophageal cancer.

Key words lncRNA, MIR31HG, esophagus carcinoma, cell proliferation, cell cycle

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0452

*Corresponding author.

Tel: 86-18538193183, E-mail: xin_j_chen@163.com

Received: March 1, 2018 Accepted: May 30, 2018