

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.027

microRNA-21 对人舌鳞癌细胞的增殖和凋亡的影响 *

初旭¹ 刘永兴² 党新文³ 周永红⁴ 赵咪⁵

(1 宝鸡市第五人民医院耳鼻喉科 陕西 宝鸡 722405; 2 宝鸡市第五人民医院神经外科 陕西 宝鸡 722405;

3 宝鸡市第五人民医院外二科 陕西 宝鸡 722405; 4 宝鸡市第五人民医院骨科 陕西 宝鸡 722405;

5 宝鸡市第五人民医院耳鼻喉科 陕西 宝鸡 722405)

摘要 目的:探讨 microRNA-21(miR-21)对人舌鳞癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法:**选取 8 例舌鳞癌组织和 4 例癌旁组织为研究材料,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)法对舌鳞癌及癌旁组织中的 miR-21 相对表达量进行检测,利用人工合成的 miR-21mimic 对人舌鳞癌 Tca8113 细胞进行瞬时转染,采用 qRT-PCR 法对 Tca8113 细胞中 miR-21 相对表达量进行检测,采用四唑盐比色法(MTT)法对 Tca8113 细胞增殖情况进行检测,采用流式细胞术对 Tca8113 细胞周期与凋亡情况进行检测。**结果:**舌鳞癌组织中 miR-21 的相对表达量(3.502 ± 0.674),高于癌旁组织(0.998 ± 0.192),差异有统计学意义($P < 0.05$)。miR-21mimic 导致了 Tca8113 细胞中的 miR-21 相对表达量上调(6.864 ± 1.324),明显高于对照 scramble 组[(0.997 ± 0.187), $P < 0.05$],对 Tca8113 细胞的增殖发挥了促进作用 ($P < 0.05$)。经 miR-21mimic 转染之后,Tca8113 细胞进入 S 期的细胞出现了明显的增加 [(27.4 ± 5.1)% vs (48.6 ± 8.7)%, $P < 0.05$],处于 G1 期的细胞出现了显著的减少[(56.3 ± 9.6)% vs (36.2 ± 7.2)%, $P < 0.05$],细胞凋亡数量出现了显著减少[(9.4 ± 2.3)% vs (18.6 ± 3.9)%, $P < 0.05$]。**结论:**miR-21 在舌鳞癌组织中高表达,过表达 miR-21 有效促进了 Tca8113 细胞的增殖,抑制细胞的凋亡,miR-21 在舌鳞癌诊断和治疗可能具有一定的新型靶点价值。

关键词:miR-21; 舌鳞癌; 流式细胞术; 实时定量荧光聚合酶链式反应

中图分类号:R739.86 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)10-1940-04

Effect of microRNA-21 on Proliferation and Apoptosis of Human Tongue Squamous Carcinoma Cell*

CHU Xu¹, LIU Yong-xing², DANG Xin-wen³, ZHOU Yong-hong⁴, ZHAO Mi⁵

(1 Department of Ear-nose-throat, The Fifth People's Hospital, Baoji, Shaanxi, 722405, China; 2 Department of neurosurgery, The Fifth

People's Hospital, Baoji, Shaanxi, 722405, China; 3 2nd surgical, The Fifth People's Hospital, Baoji, Shaanxi, 722405, China;

4 Department of orthopedics, The Fifth People's Hospital, Baoji, Shaanxi, 722405, China;

5 Department of Ear-nose-throat, The Fifth People's Hospital, Baoji, Shaanxi, 722405, China)

ABSTRACT Objective: The aim of this study is to investigate the effect of microRNA-21(miR-21) on proliferation and apoptosis of human tongue squamous carcinoma cell. **Methods:** The miR-21 expression was detected in 8 tongue squamous cell carcinoma tissues and 4 adjacent tissues by Real-time quantitative PCR (qRT-PCR). Artificially synthesized miR-21 mimic was transiently transfected into human tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cell, and then the expression of miR-21 was tested by qRT-PCR. MTT assay was used to detect the cell proliferation of Tca8113 cell, apoptosis and cell cycle of Tca8113 cell were measured by flow cytometry. **Results:** The miR-21 expression of tongue squamous carcinoma tissues was higher than that in adjacent tissues [(3.502 ± 0.674) vs (0.998 ± 0.192), ($P < 0.05$)]. The transient transfection of miR-21 mimic into Tca8113 cell significantly increased the miR-21 expression of Tca8113 cell [(6.864 ± 1.324) vs (0.997 ± 0.187), $P < 0.05$], promoted cell proliferation, raised the cell proportion in S phase [(27.4 ± 5.1)% vs (48.6 ± 8.7)%, $P < 0.05$], reduced the cell proportion in G1 phase [(56.3 ± 9.6)% vs (36.2 ± 7.2)%, $P < 0.05$], and inhibited cell apoptosis [(9.4 ± 2.3)% vs (18.6 ± 3.9)%, $P < 0.05$]. **Conclusions:** miR-21 was over-expressed in tongue squamous carcinoma tissues. Transient transfections of miR-21 mimic lead to increased proliferation and reduced apoptosis in Tca8113 cell, which suggested that miR-21 maybe a target for the treatment of tongue squamous carcinoma.

Key words: miR-21; Squamous cell carcinoma of the tongue; Flow cytometry; real-time quantitative fluorescence polymerase chain reaction

Chinese Library Classification(CLC): R739.86 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1940-04

前言

微小 RNA(microRNAs)是一类非编码小分子 RNA,长度

* 基金项目:国家自然科学基金项目(NSFC81700904)

作者简介:初旭(1971-),主治医师,医学学士,电话:13636751123,E-mail:13636751123@163.com

(收稿日期:2018-01-20 接受日期:2018-02-15)

为 18~26 个核苷酸,其主要功能是与靶标基因 3'-UTR 进行配对而发挥降解靶标基因 mRNA 或抑制其翻译的作用,在调控发育、细胞分化、增殖和凋亡等众多的生物活动和疾病进程中均发挥着重要的作用。microRNAs 也是与恶性肿瘤关系极为密切的一类基因标志物,在癌症的发生和发展中扮演着重要的角色,有报道称有超过 50% 的人类 miRNAs 基因位于恶性肿瘤相关的区域^[1]。相关研究结果提示,在一些实体肿瘤中,microRNA-21(miR-21)的表达水平可呈现显著的升高,miR-21 可以通过抑制下游靶点影响激活剂蛋白 -1 等的表达水平,进而对肿瘤细胞的增殖、侵袭能力产生影响^[2,3],但 miR-21 在舌鳞癌中的功能研究尚未涉及。本研究针对 miR-21 对 Tca8113 细胞增殖、周期与凋亡的影响进行了研究,报道如下。

1 材料和方法

1.1 研究材料

选取在医院口腔科行手术切除并保存的 8 例舌鳞癌组织和 4 例瘤旁组织作为研究材料,全部病例经过病理确诊为初发舌鳞癌患者,未发现远处器官转移,术前未进行任何治疗。人舌鳞癌 Tca8113 细胞购自中国典型培养物保藏中心。

1.2 实验方法

表 1 q RT-PCR 引物序列

Table 1 Q RT-PCR primer sequences

RNAs	Primers	Sequences
miR-21	Forward	5'-GCCCCGTAGCTTATCAGACTGATG -3'
	Reverse	5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	Forward	5'- CTCGCTTCGGCAGCACA -3'
	Reverse	5'- AACGCTTCACGAATTTGCGT -3'

1.2.4 四唑盐比色法 (MTT) 检测 将处于对数生长期的 Tca8113 细胞制成单细胞悬液,将其接种于 96 孔板,分别设置 6 个复孔和空白对照孔,待细胞密度达到要求后进行 scramble 和 miR-21 mimic 转染,而后分五次加入 MTT 液,继续进行 Tca8113 细胞培养 4 h 后每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷充分反应,应用酶标仪读取各孔吸光度。

1.2.5 流式细胞术 (FCM) 检测 应用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 对转染后 48 h 的 Tca8113 细胞单细胞悬液洗涤 3 次而后弃去上清液,加入 PBS、无水乙醇后混匀密封,在 4℃ 的温度下过夜,样品以 800 r/min 的速度离心 5 min 后应用 PBS 进行洗涤、吹悬,加入 RNase 和碘化丙啶后在 4℃ 的温度下孵育 20 min,应用流式细胞仪在 488 nm 波长下读取 DNA 表达量,以增殖指数 (PI) 代表细胞的增殖能力。应用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 对转染后 48 h 的 Tca8113 细胞单细胞悬液洗涤 3 次而后弃去上清液进行重悬,以 1000 r/min 的速度离心 5 min 后弃去上清液,经洗涤、孵育、重悬后加入碘化丙啶在 4℃ 温度下孵育 20 min,应用流式细胞仪在 488 nm 波长下利用双变量流式细胞术散点图检测 Tca8113 细胞的凋亡情况。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 for Windows 统计软件包进行数据的统计分析,服从正态分布的计量数据以 "均数 $\pm$ 标准差" 的形式表

1.2.1 miR-21 mimic 合成 通过查询 Sanger microRNA 序列数据库 (miRBase) 确定 miR-21 成熟体序列,委托赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司进行 miR-21 mimic 序列及对照序列合成,合成的 miR-21 mimic 序列为 5'-AACAUCAUCUCU-GAUAAGCUAAU-3', 对照序列为 5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3'。

1.2.2 细胞培养和转染 Tca8113 细胞用含 10% 胎牛血清 (HyClone 公司) 的高糖 DMEM (Gibco 公司),置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱 (Thermo 公司) 培养。在 6 孔板中接种 Tca8113 细胞,当 Tca8113 细胞的汇合比例增加 50%~70% 时,对每孔转染 100 nmol 的 miR-21 mimic,对细胞培养 48 h 后收集 Tca8113 细胞进行检测。

1.2.3 qRT-PCR 检测 采用试剂盒 (Invitrogen 公司) 提取舌鳞癌组织和 Tca8113 细胞中总 RNA,定量后,根据 miRNA 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行反转录,以 U6 作为内参检测 miR-21 的相对表达量,相关引物序列见表 1。引物序列均由赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司合成。反应条件为:预变性 95℃ 10 min, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 连续反应 40 个循环,直接读取 miR-21、U6 的循环阈值 (Ct 值),以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 miR-21 的相对表达量。

示,两正态、方差齐样本的比较采用独立样本 t 检验进行分析,上述假设检验为双侧检验,检验水平 α 为 0.05, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-21 在舌鳞癌和癌旁组织中的表达情况

对 8 例舌鳞癌组织与 4 例瘤旁组织检测其 miR-21 的表达,舌鳞癌组织中 miR-21 的相对表达量 (3.502 ± 0.674),明显高于瘤旁组织 (0.998 ± 0.192),差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 1。

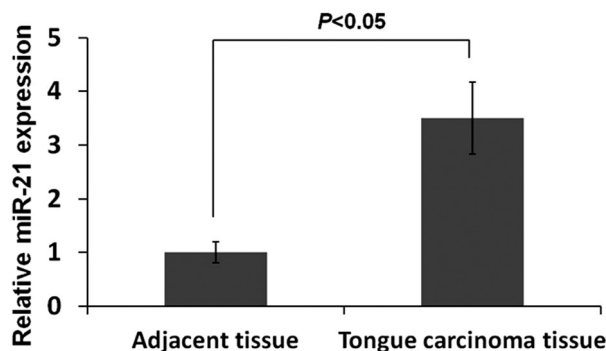


图 1 舌鳞癌与癌旁组织中 miR-21 的相对表达情况

Fig.1 The relative expression of miR-21 in tongue squamous cell carcinoma and para cancerous tissue

2.2 转染后 Tca8113 细胞中 miR-21 的表达情况

miR-21 mimic 转染 Tca8113 细胞 48 h 后, qRT-PCR 检测 miR-21 的表达水平, 结果显示, mimic 组 miR-21 表达水平 (6.864 ± 1.324) 明显高于对照 scramble 组 (0.997 ± 0.187 , $P < 0.05$), 见图 2。

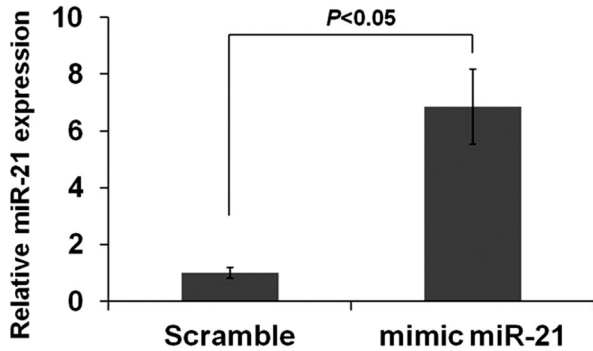


图 2 转染后 Tca8113 细胞 miR-21 的相对表达情况

Fig.2 The relative expression levels of miR-21 in Tca8113 after transfection with miR-21 mimic

2.3 转染后 Tca8113 细胞的增殖情况

MTT 检测结果发现, 转染 48 h 后, mimic miR-21 组 Tca8113 细胞增殖能力明显强于对照 scramble 组 ($P < 0.05$), 见图 3。

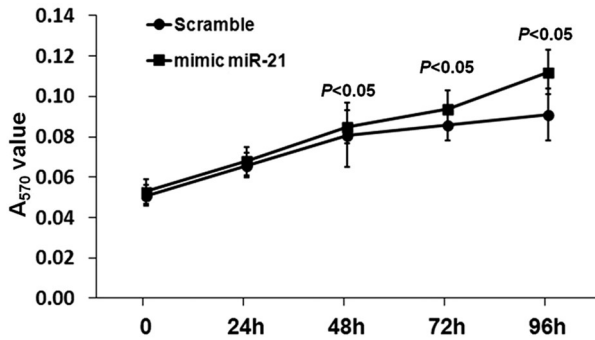


图 3 转染后 Tca8113 细胞的增殖情况

Fig.3 Proliferation of Tca8113 after transfection with miR-21 mimic

2.4 转染后 Tca8113 细胞的细胞周期情况

FCM 检测结果显示: 与转染对照 scramble 的 Tca8113 细胞相比较, S 期: (27.4 ± 5.1)%, G1 期 (56.3 ± 9.6), 转染 miR-21 mimic 的 Tca8113 细胞处于 S 期的数量 (48.6 ± 8.7)% 出现了显著的增加, 而处于 G1 期的细胞数量 (36.2 ± 7.2)% 出现了显著的减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。

2.5 转染后 Tca8113 的细胞凋亡情况

FCM 检测结果显示, mimic miR-21 组的 Tca8113 细胞凋亡细胞 (9.4 ± 2.3)% 明显少于对照 scramble 组 [$(18.6 \pm 3.9)\%$, $P < 0.05$], 见图 5。

3 讨论

舌癌是指原发于舌前游动部的恶性肿瘤, 有超过 50% 的舌癌发生于舌中三分之一的边缘部, 舌癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一, 我国舌癌病例约占所有口腔恶性肿瘤病例的 40%, 是占比最多的口腔恶性肿瘤, 占全身所有恶性肿瘤病例

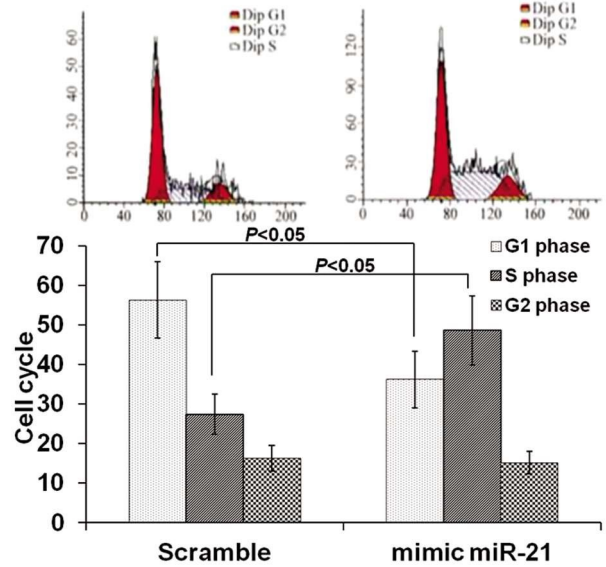


图 4 转染后 Tca8113 的细胞周期情况

Fig.4 Cell cycle of Tca8113 after transfection with miR-21 mimic

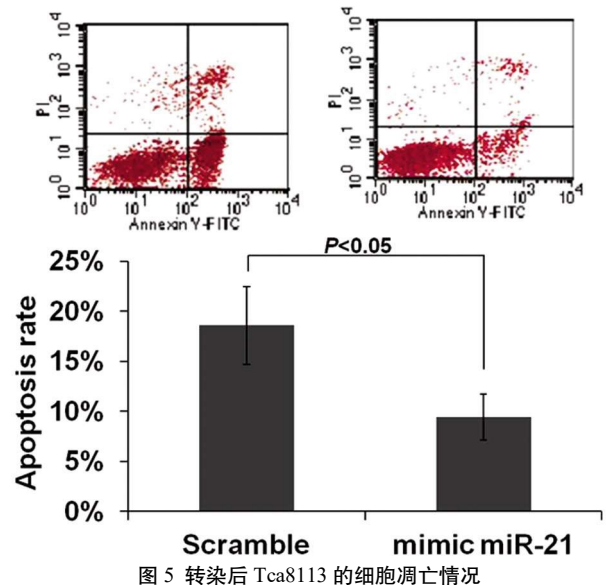


图 5 转染后 Tca8113 的细胞凋亡情况

Fig.5 Apoptosis of Tca8113 after transfection with miR-21 mimic

的 0.94%^[4,5]。舌鳞状细胞癌是最常见的舌癌病理类型, 具有恶性程度高、侵袭性强、易出现早期淋巴结转移等特点。目前, 临床上针对舌癌主要以根治性手术治疗为主, 但舌癌的肿瘤细胞易经淋巴和血液循环向全身各部位转移, 分化程度低的中、晚期患者在术后易出现复发, 放化疗均不能达到满意的治疗效果, 患者的预后通常较差^[6,7]。随着分子生物学技术和基因组研究的不断深入, 以基因靶点为依据对恶性肿瘤进行诊断和治疗已成为临床和基础研究的热点领域, 而舌癌具有位置表浅、可视性强等特点, 这均为基因研究和基因治疗提供了有利条件^[8,9]。近年来的研究结果显示, 舌癌的发生、发展、复发转移和预后等情况均与相关基因的表达失衡有关, 研究者已先后发现了 COX-2、 β -catenin、Survivin 等相关基因通路均可对舌癌肿瘤细胞凋亡基因进行调控, 进而影响病情的发展和进程^[10,11]。

研究证明, microRNAs 能够在肿瘤的发生、发展、侵袭转移及耐药中发挥重要调节作用, 还能够对肿瘤干细胞发挥调节作用, 促进或抑制肿瘤干细胞增殖性的维持并调控肿瘤干细胞的

分化,从而影响肿瘤的病理进程,因此,有的学者将与癌症相关的 miRNA 命名为 "oncomirs"^[12]。有研究^[13]发现 75% 的 miRNA 定位于已经被证明的在肿瘤中会发生改变的染色体区域,miRNA 的遗传变异、扩增、缺失或基因沉默都可能引起特定的肿瘤发生或提高个体的肿瘤易感性。研究证实:miR-21 能够作为原癌基因在多种实体恶性肿瘤中出现表达量的上调,同时还通过多种机制参与了细胞的增生、分化、凋亡等病理过程。在众多耐药的恶性肿瘤细胞中,miR-21 也能通过下调靶基因 PTEN 来发挥抑制肿瘤细胞凋亡、增加肿瘤细胞的生长、转移和侵袭的作用^[14,15],同时在多种实体肿瘤明显表达异常^[16],对肿瘤患者的诊断和预后有一定的临床价值^[17,18]。有文献^[19,20]报道 miR-21 可能通过调节同源丢失性磷酸酶 - 张力蛋白基因(PTEN)、程序性死亡蛋白 4 (PDCD4)、原肌球蛋白 1 (TPM1)、组织金属蛋白酶抑制因子 - 3 (TIMP3)、Fas 配体(Fas L)、肿瘤相关蛋白 63(TAP63)等下游基因来影响肿瘤细胞的增殖和凋亡。

本研究通过检测舌鳞癌组织 miR-21 的表达,发现舌鳞癌组织中 miR-21 呈高表达,相对表达量为 (3.502 ± 0.674) ,明显高于癌旁组织 (0.998 ± 0.192) 。Tca8113 细胞瞬时转染 miR-21 mimic 后,可见处于 S 期细胞出现了显著的增多 $[(48.6 \pm 8.7)\% \text{ vs } (27.4 \pm 5.1)\%, P < 0.05]$,而处于 G1 期细胞出现了显著的减少 $[(36.2 \pm 7.2)\% \text{ vs } (56.3 \pm 9.6)\%, P < 0.05]$,这提示了 miR-21 能够使 Tca8113 细胞出现增殖能力的增强和凋亡数量的抑制,故 miR-21 有望作为新生物学靶点用于舌鳞癌的诊断和治疗,但需要开始进一步的基础和临床研究探索舌鳞癌中 miR-21 相对表达量上调的具体机制、确定其对舌鳞癌细胞影响的下游靶基因和信号通路。

参考文献(References)

- [1] Aquino-Jarquín G. Emerging Role of CRISPR/Cas9 Technology for MicroRNAs Editing in Cancer Research [J]. Cancer Res, 2017, 77(24): 6812-6817
- [2] Yang L, Feng Y, Qi P, et al. Mechanism of serum miR-21 in the pathogenesis of familial and triple negative breast cancer [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2016, 30(4): 1041-1045
- [3] Sazanov AA, Kiselyova EV, Zakharenko AA, et al. Erratum to: Plasma and saliva miR-21 expression in colorectal cancer patients [J]. J Appl Genet, 2017, 58(2): 239
- [4] Hori Y, Kubota A, Yokose T, et al. Predictive Significance of Tumor Depth and Budding for Late Lymph Node Metastases in Patients with Clinical N0 Early Oral Tongue Carcinoma [J]. Head Neck Pathol, 2017, 11(4): 477-486
- [5] Liao CT, Lee LY, Hsueh C, et al. Clinical Outcomes in pT4 Tongue Carcinoma are Worse than in pT3 Disease: How Extrinsic Muscle Invasion Should be Considered? [J]. Ann Surg Oncol, 2017, 24(9): 2570-2579
- [6] Santos MA, Guinot JL, Tortajada MI, et al. High-dose-rate interstitial brachytherapy boost in inoperable locally advanced tongue carcinoma [J]. Brachytherapy, 2017, 16(6): 1213-1218
- [7] Wang K, Veivers D. Tumour thickness as a determinant of nodal metastasis in oral tongue carcinoma [J]. ANZ J Surg, 2017, 87(9): 720-724
- [8] Wang X, Liu X, Liu C, et al. Validation of reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human tongue carcinoma cell lines and tissue [J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 3951-3957
- [9] Morita T, Uzawa N, Mogushi K, et al. Characterizing Genetic Transitions of Copy Number Alterations and Allelic Imbalances in Oral Tongue Carcinoma Metastasis [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2016, 55(12): 975-986
- [10] Fasanaro E, Staffieri C, Cappellesso R, et al. Prognostic Significance of Serine-Phosphorylated STAT3 Expression in pT1-T2 Oral Tongue Carcinoma [J]. Clin Exp Otorhinolaryngol, 2015, 8(3): 275-280
- [11] Chou HY, Chueh FS, Ma YS, et al. Bufalin induced apoptosis in SCC-4 human tongue cancer cells by decreasing Bcl-2 and increasing Bax expression via the mitochondria-dependent pathway [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6): 7959-7966
- [12] Liu W, Ma R, Yuan Y. Post-transcriptional Regulation of Genes Related to Biological Behaviors of Gastric Cancer by Long Noncoding RNAs and MicroRNAs [J]. J Cancer, 2017, 8(19): 4141-4154
- [13] Yang Y, Hu Z, Zhou Y, et al. The clinical use of circulating microRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers for lung cancers [J]. Oncotarget, 2017, 8(52): 90197-90214
- [14] Hu N, Yin JF, Ji Z, et al. Strengthening Gastric Cancer Therapy by Trastuzumab-Conjugated Nanoparticles with Simultaneous Encapsulation of Anti-MiR-21 and 5-Fluorouridine [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(6): 2158-2173
- [15] Xia H, Zhang W, Zhang B, et al. miR-21 modulates the effect of EZH2 on the biological behavior of human lung cancer stem cells in vitro [J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 85442-85451
- [16] Dai X, Fang M, Li S, et al. miR-21 is involved in transforming growth factor β 1-induced chemoresistance and invasion by targeting PTEN in breast cancer [J]. Oncol Lett, 2017, 14(6): 6929-6936
- [17] Wu Y, Song Y, Xiong Y, et al. MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth and Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(3): 945-958
- [18] Esmatabadi MJD, Farhangi B, Montazeri M, et al. Up-regulation of miR-21 decreases chemotherapeutic effect of dendrosomal curcumin in breast cancer cells [J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(4): 350-359
- [19] Wang X, Hang Y, Liu J, et al. Anticancer effect of curcumin inhibits cell growth through miR-21/PTEN/Akt pathway in breast cancer cell [J]. Oncol Lett, 2017, 13(6): 4825-4831
- [20] Du G, Cao D, Meng L. miR-21 inhibitor suppresses cell proliferation and colony formation through regulating the PTEN/AKT pathway and improves paclitaxel sensitivity in cervical cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(5): 2713-2719