doi:10.11659/jjssx.10E020082

·基础研究·

沉默 miR-31-5p 抑制口腔鳞状细胞癌的增殖及凋亡

王恩程[1],索 南[1],张 蕾[1],张婷婷[1],钱 军[2] (1.辽阳市中心医院口腔科,辽宁 辽阳 111000;2.北京大学口腔医院第二门诊部,北京 100081)

[摘 要] **目的** 探究 miR-31-5p 对口腔鳞状细胞癌(OSCC)细胞增殖和凋亡的作用及与线粒体活性之间的关系。**方法** RT-qPCR 检测OSCC 组织和细胞中 miR-31-5p 的表达。利用 Lipofectamine 2000 将 miR-NC、miR-31-5p mimic、miR-31-5p inhibitor 分别转染至 SCC-25 和 CAL-27 细胞内,将细胞分为 Control 组、miR-NC 组、miR-31-5p inhibitor 组和 miR-31-5p mimic 组。克隆形成实验检测细胞增殖,微管形成实验检测微管数目,流式细胞术检测细胞凋亡,JC-1 染色评估线粒体活性,ELISA 检测超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量;蛋白印迹法检测 Ki67、survivin、VEGF、Bcl-2、Bax 和 c-Myc 蛋白表达水平。**结果** RT-qPCR 检测结果显示,miR-31-5p 在 OSCC 组织和细胞中均高表达($P<0.05$);与 Control 组比较,沉默 miR-31-5p 可显著降低 SCC-25 和 CAL-27 细胞克隆形成和微管形成数目($P<0.05$),并提高细胞凋亡率($P<0.05$);蛋白印迹实验结果表明,沉默 miR-31-5p 可降低 Ki67、survivin、VEGF 和 c-Myc 蛋白表达水平及 Bcl-2/Bax 比率($P<0.05$)。沉默 miR-31-5p 可显著降低 SCC-25 和 CAL-27 细胞中JC-1线粒体活性($P<0.05$),抑制 SOD 活性并增加 MDA 含量($P<0.05$)。**结论** 沉默 miR-31-5p 通过破坏线粒体活性抑制 OSCC 细胞的增殖并诱导其凋亡。

[关键词] miR-31-5p;口腔鳞癌;JC-1 染色;超氧化物歧化酶;增殖

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-10-26

Silencing miR-31-5p inhibits the proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells

WANG En-cheng[1],SUO Nan[1],ZHANG Lei[1],ZHANG Ting-ting[1],Qian Jun[2] (1.Department of Stomatology,Liaoyang Central Hospital,Liaoyang Liaoning 111000,China;2.Second Outpatient Department,Peking University Hospital of Stomatology,Beijing 100081,China)

Abstract: Objective To explore the effects of miR-31-5p on the proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell and its relationship with mitochondrial activity. **Methods** The expression of miR-31-5p in OSCC tissues and cells was detected by RT-qPCR. MiR-NC,miR-31-5p mimic and miR-31-5p inhibitor were transfected into SCC-25 and CAL-27 cells respectively by Lipofectamine 2000,and the cells were divided into the Control group,the miR-NC group,the miR-31-5p inhibitor group and the miR-31-5p mimic group. Cell proliferation was detected through clone formation test,the number of microtubules was detected through microtubule formation,cell apoptosis was detected through flow cytometry,mitochondrial activity was evaluated by JC-1 staining,the levels of superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) were detected by ELISA,and the protein expression levels of Ki67,survivin,VEGF,Bcl-2,Bax and c-Myc were detected by Western blot. **Results** RT-qPCR results showed that miR-31-5p was highly expressed in OSCC tissues and cells ($P<0.05$). Compared with the Control group,silencing miR-31-5p significantly reduced clone formation and microtubule formation of SCC-25 and CAL-27 cells ($P<0.05$),and increased the rate of apoptosis ($P<0.05$). Western blot experiments showed that silencing miR-31-5p significantly reduced the protein expression levels of Ki67,survivin,VEGF,c-Myc and the ratio of Bcl-2/Bax ($P<0.05$). Silencing miR-31-5p significantly reduced JC-1 mitochondrial activity in SCC-25 and CAL-27 cells ($P<0.05$),inhibited SOD activity and increased MDA content ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing miR-31-5p inhibits the proliferation of OSCC cells and induces their apoptosis by destroying mitochondrial activity.

Keywords: miR-31-5p;oral squamous cell carcinoma;JC-1 staining;superoxide dismutase;proliferation

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma,OSCC)是口腔癌的主要形式,约占口腔癌的 90%[1]。据报道,OSCC 的发病率不断增加,截至 2017 年底,全球新增 OSCC 1 688 780 例,死亡 600 920 例[2-3]。OSCC的高发病率主要归因于吸烟和饮酒[4]。此外,OSCC 还与长期营养不良、病毒感染和不良口腔卫生有关[5]。对于 OSCC 的治疗,尽管目前外科手术、化学疗法和放射疗法均取得了长足的进步,但患者 5 年生存率一直偏低[6]。因此,揭示 OSCC 细胞增殖、转移及凋亡等病程生理过程的内部机制并寻找新的治疗策略至关重要。近年来,microRNAs 被认为是多种癌症诊断和治疗的新的生物标志物。miR-31-5p是口腔癌的

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(2019-ZD-0746)

[通信作者] 王恩程,E-mail:blueswang0306@126.com

潜在循环生物标志物和治疗靶标[7]。Kao 等[8]研究发现 microRNA miR-31 可作用于口腔癌的线粒体,影响其活性,而线粒体损伤与细胞新陈代谢和凋亡有关。但是关于 miR-31-5p 表达与 OSCC 细胞生物学活性的关系,及其与线粒体损伤之间关系的研究还未见报道。故本研究就 miR-31-5p 对 OSCC 细胞增殖和凋亡的影响及与线粒体损伤之间的关系展开探讨,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

RPMI-1640 培养基购自上海慧颖生物科技有限公司,青霉素、链霉素和胎牛血清购自上海素尔生物科技有限公司,miR-NC、miR-31-5p mimic、miR-31-5p inhibitor 及各种引物由河南省生物工程技术研究中心设计并合成,Lipofectamine 2000 转染试剂购自上海伟进生物科技有限公司,cDNA 逆转录试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司,SYBR-Green PCR 试剂盒购自上海天筛科技有限公司,BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、E2F3 兔来源的单克隆抗体购自上海艾博抗生物科技有限公司。CytoFLEX 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司,Gel Doc XR + 凝胶成像系统购自美国伯乐公司。

1.2 组织来源及细胞培养

收集 2018 年 5 月至 2020 年 5 月在辽阳市中心医院口腔科进行手术治疗的OSCC患者的癌组织及癌旁组织,所有患者均同意参加本研究并签署知情同意书。本研究根据《赫尔辛基宣言》的道德准则进行,并经辽阳市中心医院伦理委员会批准。

正常口腔细胞系(HOK)和 OSCC 细胞系(SCC-4、SCC-9、SCC-25、CAL-27、NH-6、TCA8113)均购自美国典型培养物保藏中心。所有细胞于 37 ℃、5% CO_2下在 10% 胎牛血清、100 μg/mL 的链霉素和 100 U/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养基中培养。

1.3 RT-qPCR 检测 miR-31-5p mRNA 的表达

将收集的癌组织及癌旁组织剪碎并研磨,用 QIAzol裂解试剂提取总 RNA,用 cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA。将正常细胞系 HOK 和 OSCC 细胞系 SCC-4、SCC-9、SCC-25、CAL-27、NH-6、TCA8113 分别接种于 6 孔板中,当细胞达到近 85% 融合时,用 QIAzol 裂解试剂提取总 RNA,再通过 cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA,并按照 SYBR-Green PCR 试剂盒说明书进行 RT-qPCR 测定。miR-31-5p 的表达水平通过 RT-qPCR 分析评估。所有步骤均使用 All-in-One™ miRNA RT-qPCR检测试剂盒(GeneCopoeia)完成。以 U6 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$方法计算 mRNA 表达量。

1.4 细胞转染

取对数生长期细胞并按照约 1×10^5/孔接种于 6 孔板,于 37 ℃、5% CO_2下培养。当细胞达到 85% 融合,根据 Lipofectamine 2000 说明书将 100 nmol/L miR-NC、miR-31-5p mimic、miR-31-5p inhibitor 质粒分别转染 SCC-25 和 CAL-27 细胞,并分为 Control 组(未转染任何质粒)、miR-NC 组(转染 miR-NC 质粒)、miR-31-5p mimic 组(转染 miR-31-5p mimic 质粒)和 miR-31-5p inhibitor 组(转染 miR-31-5p inhibitor 质粒)。

1.5 克隆形成实验

将各组细胞按约 1×10^5/孔接种于 6 孔板,于 37 ℃、5% CO_2培养。直到长出肉眼可见的菌落,弃去培养液,100% 甲醇固定菌落,0.25% 结晶紫染色 30 min,清水清洗。将 6 孔板倒置并叠加一张带网格的透明胶片,直接计数细胞克隆数。

1.6 微管形成实验

各组细胞培养 48 h 后,将基质胶与 4 ℃预冷的无血清 RPMI-1640 培养基以 1∶1的比例混合,置于 24 孔板底部,每孔 300 μL,并于 5% CO_2、37 ℃的培养箱中固化 30 min。在无血清 RPMI-1640 培养基中将细胞浓度调整为 1.0×10^5/mL。每 4 h 观察微管结构。在 100 倍显微镜下随机取 5 个视野并计数每 5 个视野的微管状结构。使用 Microvision Saisam 软件分析图像。

1.7 流式细胞术

将各细胞培养 48 h 后,用胰酶消化,3 500 r/min 离心 5 min,再按 1.0×10^5/mL 重悬细胞。细胞悬液中加入 5 μL FITC 标记的 Annexin-V 和 5 μL 碘化丙啶,暗处理 15 min 后用 CytoFLEX 流式细胞仪分析细胞凋亡情况。细胞凋亡率(%) = 早期细胞凋亡率(%) + 晚期细胞凋亡率(%)。

1.8 ELISA 检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量

取各组对数生长期 SCC-25 和 CAL-27 细胞,制备细胞悬液并于 4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,反应孔加入样品液,37 ℃孵育 40 min,用洗涤液洗涤 3 次,每次 2 min,然后加入生物素标记的抗体于 37 ℃避光孵育 30 min,洗涤 3 次后加入链霉亲和素混匀,37 ℃避光孵育 30 min,最后加入显色剂避光显色 10 ~ 15 min,滴加终止液终止反应,终止反应后 5 min 内置酶标仪中,于 450 nm 波长处测吸光值。

1.9 JC-1 染色检测线粒体损伤

SCC-25 和 CAL-27 细胞的 JC-1 染色方法参考文献[9]。加入 DAPI 使最终浓度为 10 mg/L 以显示细胞核。选取对数生长期的 SCC-25 和 CAL-27 细胞,加入 0.25% 胰酶消化后,吹打成单细胞悬液,并调整细胞密度为 3×10^5/mL,接种于 6 孔板中,每孔加入 3 mL 细胞培养液,放入培养箱中培养。细胞贴壁后,各组细胞经过相应处理后,吸去细胞培养基,加入 PBS 冲洗 1 次,然后加入 1 mL 细胞培养基。每孔加入 1 mL 1× JC-1染色液,轻轻晃动使其充分混匀,重新置入培养箱中培养 20 min。按照比例,将 5× JC-1 染色缓冲液配制成 1× JC-1 染色缓冲液,置于冰上备用。染色结束后,弃上清液,用 1×JC-1 缓冲液清洗细胞 2 次。加入 2 mL 全培养基,置于荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察结果并采集图片。以荧光显微镜及荧光分光光度计观察及检测荧光值。

1.10 蛋白印迹法检测相关蛋白表达水平

各组细胞用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液在冰上裂解,16 440 r/min 离心 10 min,收集上清。采用 BCA 试剂盒检测上清中蛋白浓度,并添加蛋白上样的缓冲液以制备蛋白样品。每孔上样量为 30 μg,12% SDS-PAGE 分离后转膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入兔来源的单克隆一抗 VEGF(ab32152,1∶250)、Ki67(ab92742,1∶5 000)、survivin(ab134170,1∶1 000)、Bcl-2(ab182858,1∶2 000)、Bax(ab32503,1∶1 000)、c-Myc(ab32072,1∶1 000)、GAPDH(ab8245,1∶1 000),4 ℃ 孵育 12 h,缓冲液洗膜 3 次;加入山羊抗兔多克隆二抗(1∶2 000),室温孵育 1 h 后加显影液,于 Gel Doc XR + 凝胶成像系统中曝光,使用 ImagePro plus 6.0 软件分析蛋白条带,蛋白的相对表达水平为目标蛋白积分吸光度值与内参蛋白 GAPDH 积分吸光度值比值。

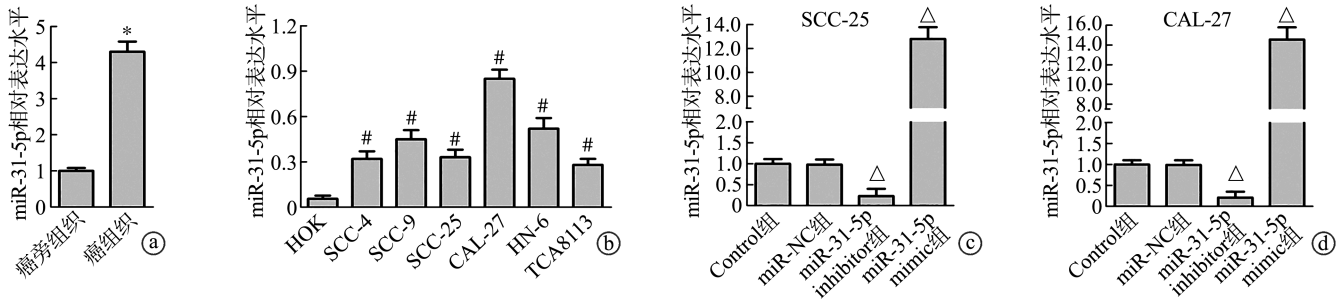
1.11 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,图形采用 GraphPad Prism 6.0 绘制。实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组间比较采用 *Student t* 检验,多组间比较用 *Duncan* 法多重性比较,$P<0.05$ 为差异有统计学意义,$P<0.01$ 为差异有极显著统计学意义。

2 结果

2.1 miR-31-5p 在 OSCC 中的表达情况

与 OSCC 癌旁组织相比,癌组织中 miR-31-5p 表达升高(图 1a,$P<0.05$);与正常细胞 HOK 相比,OSCC细胞系 SCC-4、SCC-9、SCC-25、CAL-27、NH-6 和 TCA8113 中 miR-31-5p 表达升高(图 1b,$P<0.01$);选择 SCC-25 和 CAL-27 细胞进行后续实验。分别将 miR-31-5p mimic 和 miR-31-5p inhibitor 转染至 SCC-25 和 CAL-27 细胞中,结果显示,与 Control 组比较,转染 miR-31-5p mimic 的细胞中 miR-31-5p 表达水平显著上升,而转染 miR-31-5p inhibitor 的细胞中 miR-31-5p 表达水平显著下调(图 1c、d,$P<0.05$),表明转染成功,可进行后续试验。

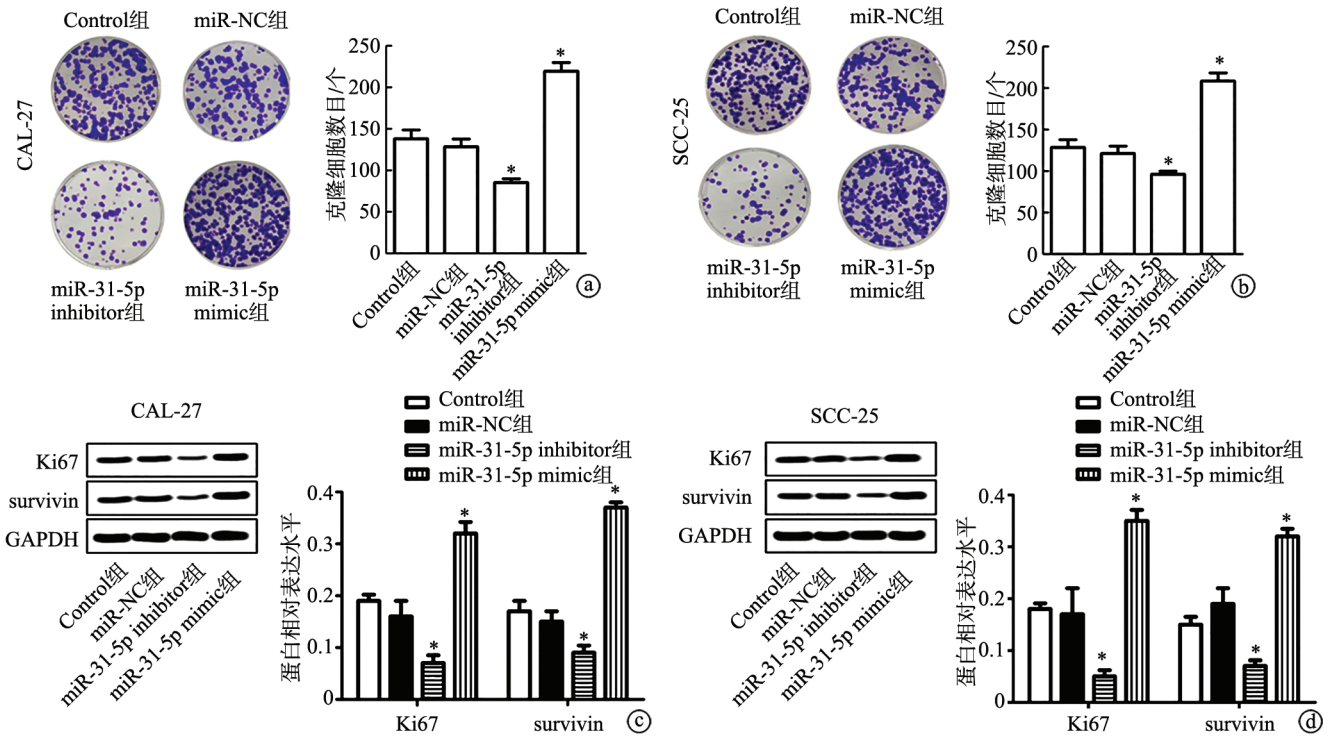


a:OSCC 组织中 miR-31-5p mRNA 的表达水平;b:正常细胞和 OSCC 细胞系中 miR-31-5p mRNA 的表达水平;c、d:转染后 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 miR-31-5p mRNA 的表达水平 *:与癌旁组织比较,$P<0.05$;#:与 HOK 细胞比较,$P<0.01$;△:与 Control 组比较,$P<0.05$

图 1 RT-qPCR 检测 miR-31-5p mRNA 的表达水平

2.2 沉默 miR-31-5p 抑制 SCC-25 和 CAL-27 细胞增殖

克隆形成实验结果显示,与 Control 组比较,miR-NC组 SCC-25 和 CAL-27 克隆细胞数无明显变化($P>0.05$),miR-31-5p inhibitor 组 SCC-25 和 CAL-27 克隆细胞数显著减少($P<0.01$),miR-31-5p mimic 组 SCC-25 和 CAL-27 克隆细胞数显著增加($P<0.01$)。蛋白印迹实验结果亦显示,与 Control 组比较,miR-NC 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 Ki67 和 survivin 蛋白水平无显著变化($P>0.05$),miR-31-5p inhibitor 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 Ki67 和 survivin 蛋白水平显著降低($P<0.01$),miR-31-5p mimic 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 Ki67 和 survivin 蛋白水平显著升高($P<0.01$),见图 2。以上结果表明,沉默 miR-31-5p 抑制 SCC-25 和 CAL-27 细胞增殖。



a、b:克隆形成实验检测 CAL-27、SCC-25 细胞克细胞数;c、d:克隆形成实验和蛋白印迹实验检测 CAL-27、SCC-25 细胞中增殖相关蛋白 Ki67 和 survivin 表达水平 *:与 Control 相比,$P<0.01$

图 2 克隆形成实验和蛋白印迹实验检测细胞增殖情况

2.3 沉默 miR-31-5p 抑制 SCC-25 和 CAL-27 细胞微管形成

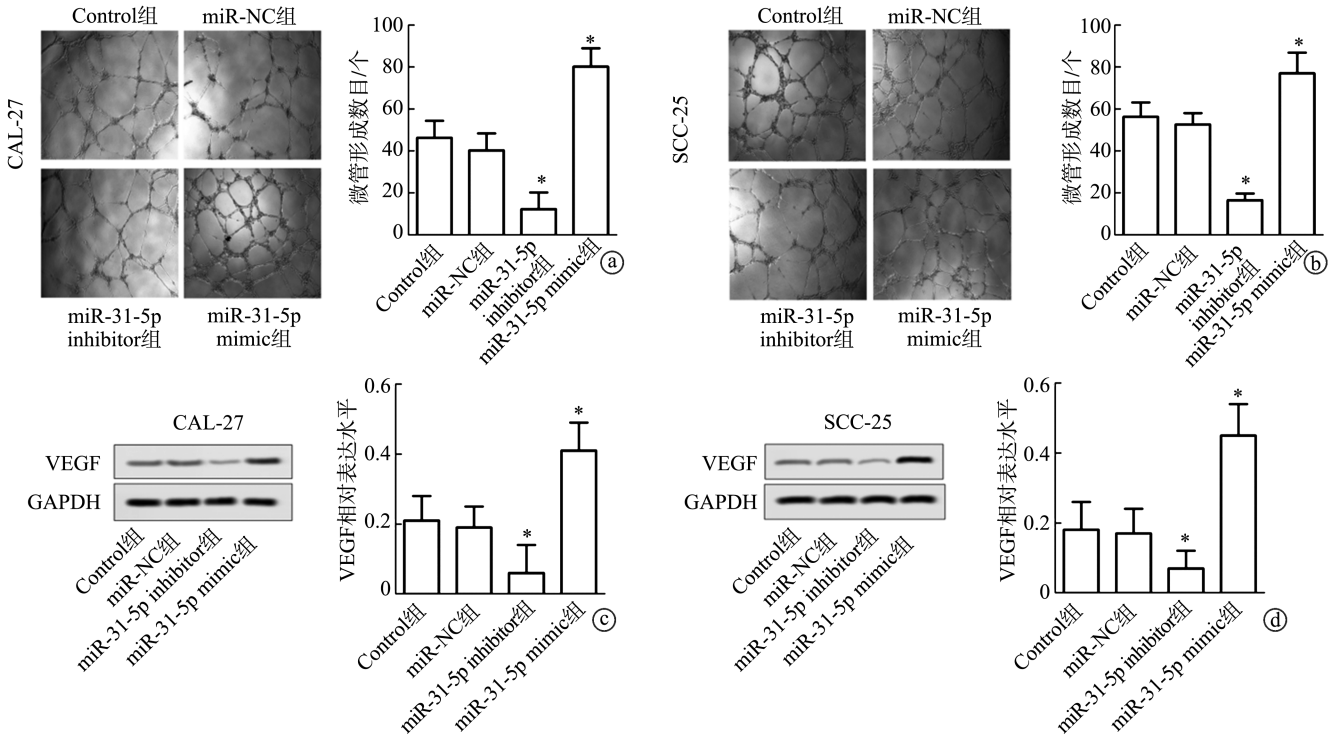
与 Control 组比较,miR-NC 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞微管形成数无显著变化($P>0.05$),miR-31-5p inhibitor 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞微管形成数显著减少($P<0.01$),miR-31-5p mimic 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞微管形成数显著增加($P<0.01$)。蛋白印迹实验结果亦显示,与 Control 组比较,miR-NC 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 VEGF 蛋白水平无显著变化($P>0.05$),miR-31-5p inhibitor 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 VEGF 蛋白水平显著降低($P<0.01$),miR-31-5p mimic 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 VEGF 蛋白水平显著升高($P<0.01$),见图 3。以上结果表明,沉默miR-31-5p抑制 SCC-25 和 CAL-27 细胞微管形成。

2.4 沉默 miR-31-5p 促进 SCC-25 和 CAL-27 细胞凋亡

流式细胞术检测结果显示,与 Control 组比较,miR-NC 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞凋亡率无显著变化($P>0.05$),miR-31-5p inhibitor 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞凋亡率显著提高($P<0.01$),miR-31-5p mimic 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞凋亡率显著下降($P<0.01$)。蛋白印迹实验结果亦显示,与 Control 组比较,miR-NC 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 Bcl-2/Bax 比率和 c-Myc 水平无显著变化($P>0.05$),miR-31-5p inhibitor 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 Bcl-2/Bax 比率和 c-Myc 水平显著下降,miR-31-5p mimic 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 Bcl-2/Bax 比率和 c-Myc 水平显著上升($P<0.01$),见图 4。以上结果表明,沉默 miR-31-5p 可促进 SCC-25 和 CAL-27 细胞凋亡。

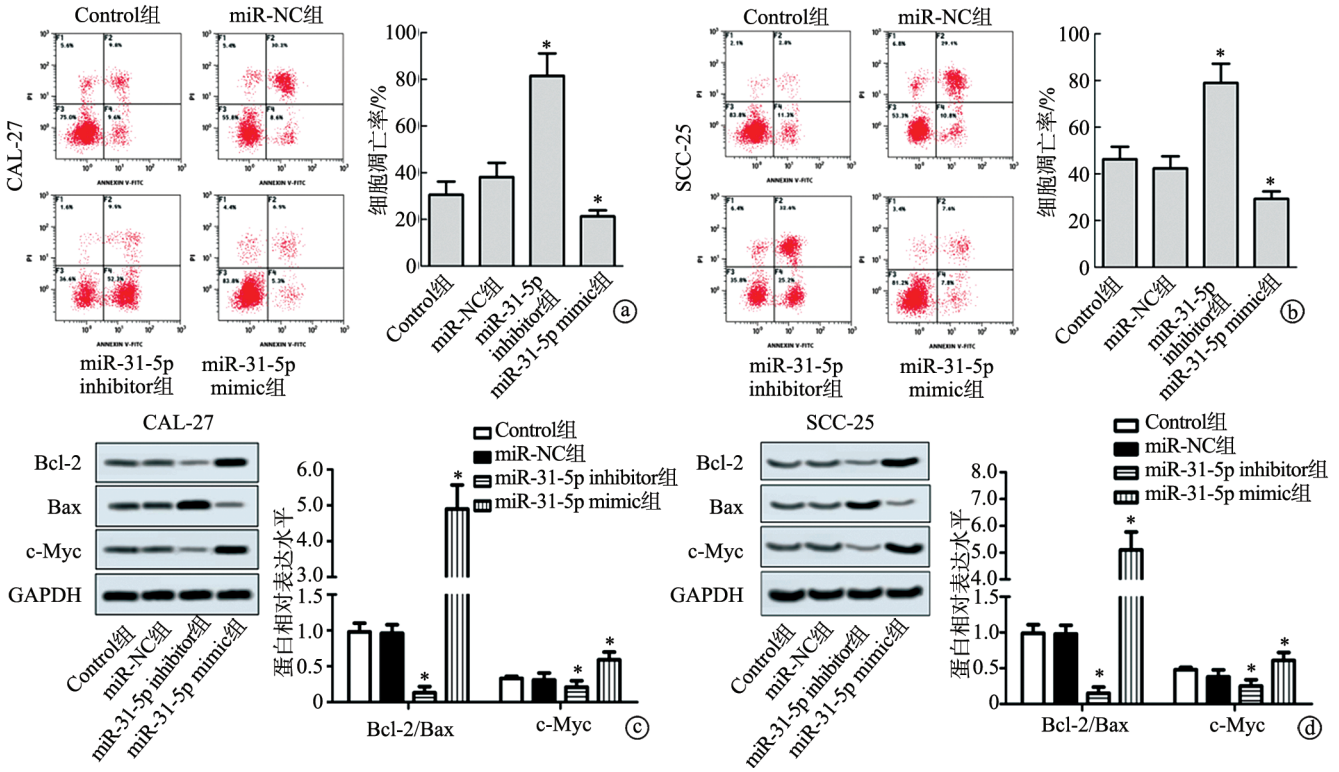
2.5 沉默 miR-31-5p 促进 SCC-25 和 CAL-27 细胞线粒体损伤

与 Control 组比较,miR-NC 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞 JC-1 线粒体活性无变化($P>0.05$),miR-31-5p inhibitor 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 JC-1 线粒体活性显著降低($P<0.01$),miR-31-5p mimic 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 JC-1 线粒体活性显著升高(图 5a、b,$P<0.01$)。与 Control 组比较,miR-NC 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 SOD 活性和 MDA 含量无显著变化($P>0.05$),miR-31-5p inhibitor 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 SOD 活性显著降低而 MDA 含量显著上升($P<0.01$);miR-31-5p mimic 组 SCC-25 和 CAL-27 细胞中 SOD 活性显著上升而 MDA 含量显著降低(图 5c、d,$P<0.01$)。以上结果表明,沉默 miR-31-5p 促进 SCC-25 和 CAL-27 细胞线粒体损伤。



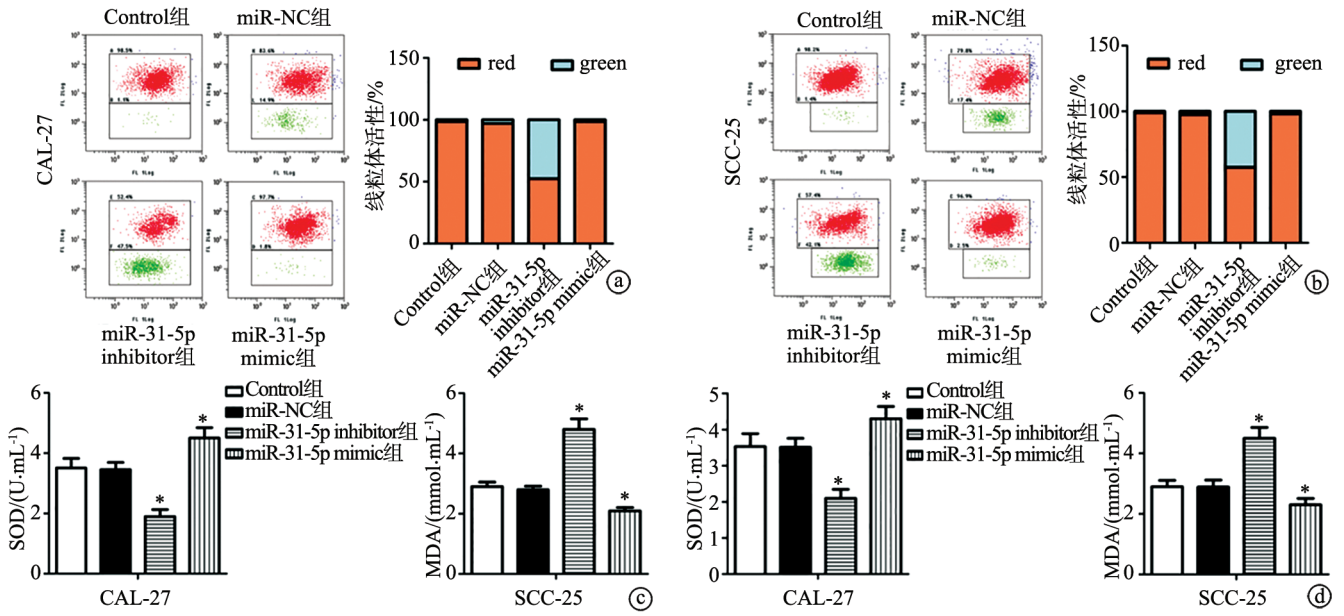
a、b:微管形成实验检测 CAL-27、SCC-25 细胞微管形成;c、d:蛋白印迹实验检测 CAL-27、SCC-25 细胞中 VEGF 蛋白水平 *:与 Control 组比较,$P<0.01$

图 3 微管形成实验和蛋白印迹实验检测细胞微管形成情况



a、b:流式细胞术检测 CAL-27、SCC-25 细胞凋亡;c:蛋白印迹实验检测 CAL-2、SCC-25 细胞中 Bax、Bcl-2 和 c-Myc 蛋白水平 *:与 Control组相比,$P<0.01$

图 4 流式细胞术和蛋白印迹实验检测 SCC-25 和 CAL-27 细胞凋亡情况



a、b:JC-1 染色检测 CAL-27、SCC-25 细胞线粒体活性;c、d:CAL-27、SCC-25 细胞中 SOD 活性和 MDA 含量 *:与 Control 组比较,$P<0.01$

图 5 沉默 miR-31-5p 破坏 SCC-25 和 CAL-27 细胞线粒体活性

3 讨论

OSCC 由于复发率高且缺乏有效的早期治疗策略,其治疗仍然是临床面临的难题[10]。OSCC 的发病机制与口腔鳞状细胞的无限制生长和增殖密切相关[11-12]。近年来,随着生物医学的发展,分子生物学标志物的针对性治疗成为了医学研究的热点。miRNA 是用于癌症的分子诊断和靶向治疗的靶标[13]。miRNA具有调节细胞增殖、分化、转移、侵袭和凋亡等多种生物学功能,其表达情况与人类多种癌症的发生、发展、诊断和预后相关。研究发现,miRNA-137 mimic 可显著降低 OSCC HSC-2 的细胞活力、侵袭和增殖能力[14];环状 miRNA-1290 可作为晚期 OSCC 患者放化疗及预后判断的潜在生物标志物[15];miR-31-5p 是口腔癌的潜在生物标志物[7]。研究表明,miR-31-5p 在结直肠癌中高表达[16]。为了研究 miR-31-5p 在 OSCC 中的表达情况,本研究检测了癌旁组织和癌组织、正常细胞和癌细胞中 miR-31-5p 表达水平,结果发现,miR-31-5p在 OSCC 细胞和组织中均高表达。

正常情况下,在复杂的生物体内,各种细胞通过动态增殖和凋亡以使细胞数目达到平衡,但是在癌症机体内,细胞的过度增殖和异常凋亡破坏了这种平衡[17]。因此,调控肿瘤细胞增殖和凋亡平衡对于癌症治疗至关重要。研究显示,miR-31-5p 通过 PI3K/AKT/Bcl-2 信号通路调控 14-3-3ε 抑制前列腺癌 22RV1 细胞存活和增殖[18]。过表达 miR-31-5p 可抑制肾上皮肾细胞癌细胞增殖、迁移、侵袭和细胞周期,而下调 miR-31-5p 可促进细胞增殖、迁移和侵袭[19]。为了探讨沉默 miR-31-5p 对 OSCC 中 SCC-25 和 CAL-27 细胞增殖和凋亡的影响,本研究运用克隆细胞形成实验和流式细胞术检测细胞的凋亡水平,结果显示,沉默 miR-31-5p 可显著抑制 SCC-25 和 CAL-27 细胞克隆形成和微管形成,并诱导 SCC-25 和 CAL-27 细胞凋亡,表明沉默 miR-31-5p 可显著诱导 SCC-25 和 CAL-27 细胞凋亡,并抑制 SCC-25 和 CAL-27 细胞增殖。Ki67 也称为 Ki67 抗原,已经成为预测多种类型癌症患者临床预后的成熟标记物,同时也是癌细胞增殖的标记物[20]。survivin 是 OSCC 的有效诊断和预后标志物,同时也是 OSCC 细胞增殖的标记物[21]。本研究蛋白印迹实验结果显示,沉默 miR-31-5p 可降低 Ki67 和 survivin 的表达,说明沉默 miR-31-5p 可抑制 SCC-25 和 CAL-27 细胞增殖。

线粒体是细胞中最重要的动态细胞器之一,参与运输、融合和裂变等多种活动,并在氧化磷酸化和能量代谢中起关键作用。线粒体活性障碍被认为是全身异质性、表型异常和遗传变异的主要原因[22-23]。线粒体膜电位变化可用于评估线粒体活性变化和细胞早期凋亡现象[24]。有研究发现,Neferine 通过诱导线粒体功能障碍对视网膜母细胞瘤发挥抑制增殖和侵袭的作用[25]。JC-1 是一种特殊的线粒体染料,通常被用作膜电位的报告分子。JC-1 在与线粒体结合后可显示荧光变化,该变化是驱动染料聚集的膜电位的函数。通

常将2种荧光强度的比率测量值作为相对膜电位的测量值。2种染料均非常适合实时成像,并根据实验程序报告膜电位的变化,可进一步反映线粒体功能的状态[26]。为了探究沉默miR-31-5p对SCC-25和CAL-27细胞线粒体损伤的影响,本研究运用ELISA检测SOD活性、MDA含量和JC-1染色检测细胞线粒体功能障碍,结果显示,沉默miR-31-5p可显著增强线粒体膜电位变化,增强JC-1线粒体活性,提示沉默miR-31-5p可导致线粒体活性破坏并诱导SCC-25和CAL-27细胞凋亡;流式细胞术检测结果表明,沉默miR-31-5p可诱导细胞凋亡率上升。Bcl-2/Bax比率可作为预测OSCC预后的有效指标[27]。c-Myc诱导的长链非编码RNA SNHG16的上调促进了OSCC的进展和癌变[28]。本研究蛋白印迹实验结果表明,沉默miR-31-5p可降低Bcl-2/Bax比率和c-Myc水平,表明沉默miR-31-5p可促进SCC-25和CAL-27细胞凋亡。

综上所述,沉默miR-31-5p可显著抑制SCC-25和CAL-27细胞增殖并诱导其凋亡,并且可破坏线粒体活性。因此,我们推测,沉默miR-31-5p通过破坏线粒体活性抑制OSCC增殖并诱导其凋亡。但本实验仅为体外细胞实验,结果具有局限性,有待通过动物体内实验进一步验证。

[参考文献]

[1] Liang XY, Deng M, Zhang C, et al. Combined class I histone deacetylase and mTORC1/C2 inhibition suppresses the initiation and recurrence of oral squamous cell carcinomas by repressing SOX2[J]. Cancer Lett, 2019, 454: 108 - 119. doi: 10.1016/j.canlet.2019.04.010.

[2] He BX, Lin XZ, Tian FG, et al. MiR-133a-3p inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) proliferation andinvasion by suppressing COL1A1 [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 338 - 346. doi: 10.1002/jcb.26182.

[3] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. Ca A Cancer J Clin, 2007, 57(1): 43 - 66. doi: 10.3322/canjclin.57.1.43.

[4] Tanaka F, Yamamoto K, Suzuki S, et al. Strong interaction between the effects of alcohol consumption and smoking on oesophageal squamous cell carcinoma among individuals with ADH1B and/or ALDH2 risk alleles[J]. Gut, 2010, 59(11): 1457 - 1464. doi: 10.1136/gut.2009.205724.

[5] Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features[J]. Oral Oncol, 2010, 46(6): 414 - 417. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.009.

[6] Marsh D, Suchak K, Moutasim KA, et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients[J]. J Pathol, 2011, 223(4): 470 - 481. doi: 10.1002/path.2830.

[7] Lu Z, He Q, Liang J, et al. miR-31-5p is a potential circulating biomarker and therapeutic target for oral cancer[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 16: 471 - 480. doi: 10.1016/j.omtn.2019.03.012.

[8] Kao YY, Chou CH, Yeh LY, et al. MicroRNA miR-31 targets SIRT3 to disrupt mitochondrial activity and increase oxidative stress in oral carcinoma[J]. Cancer Lett, 2019, 456: 40 - 48. doi: 10.1016/j.canlet.2019.04.028.

[9] Elefantova K, Lakatos B, Kubickova J, et al. Detection of the mitochondrial membrane potential by the Cationic Dye JC-1 in L1210 cells with massive overexpression of the plasma membrane ABCB1 drug transporter [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): 233 - 239. doi: 10.3390/ijms19071985.

[10] Li X, Cheng T, He Y, et al. High glucose regulates ERp29 in hepatocellular carcinoma by LncRNA MEG3-miRNA 483-3p pathway[J]. Life Sci, 2019, 232: 116602. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116602.

[11] Liu S, Liu LH, Hu WW, et al. Long noncoding RNA TUG1 regulates the development of oral squamous cell carcinoma through sponging miR-524-5p to mediate DLX1 expression as a competitive endogenous RNA[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 20206 - 20216. doi: 10.1002/jcp.28620.

[12] Liu X, Fu Y, Huang J, et al. ADAR1 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition and stem-like cell phenotype of oral cancer by facilitating oncogenic microRNA maturation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 315. doi: 10.1186/s13046-019-1300-2.

[13] Xu Z, Shi Y. High expression of mir-155 and mir-21 in the recurrence or metastasis of non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2019, 18(1): 758 - 763. doi: 10.3892/ol.2019.10337.

[14] Sun C, Li J. Expression of MiRNA-137 in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. J BUON, 2018, 23(1): 167 - 172.

[15] Nakashima H, Yoshida R, Hirosue A, et al. Circulating miRNA-1290 as a potential biomarker for response to chemoradiotherapy and prognosis of patients with advanced oral squamous cell carcinoma: a single-center retrospective study[J]. Tumour Biol, 2019, 41(3): 1010428319826853. doi: 10.1177/1010428319826853.

[16] Peng H, Wang L, Su Q, et al. MiR-31-5p promotes the cell growth, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting NUMB[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 208 - 216. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.048.

[17] 伍丹丹,董卫国,马静静,等. 陈皮素对胰腺癌panc-1细胞增殖和凋亡影响及机制探讨[J]. 医学分子生物学杂志,2018,15(3):125 - 130. doi:10.3870/j.issn.1672-8009.2018.03.001.

[18] Zhao J, Xu H, Duan Z, et al. miR-31-5p Regulates 14-3-3 ε to Inhibit prostate cancer 22RV1 cell survival and proliferation via PI3K/AKT/Bcl-2 signaling pathway[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 6679 - 6694. doi: 10.2147/CMAR.S247780.

[19] Li Y, Quan J, Chen F, et al. MiR-31-5p acts as a tumor suppressor in renal cell carcinoma by targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 517 - 526. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.102.

[20] Chen Y, Klingen TA, Wik E, et al. Breast cancer stromal elastosis is associated with mammography screening detection, low Ki67 expression and favourable prognosis in a population-based study[J]. Diagn Pathol, 2014, 9: 230. doi: 10.1186/s13000-014-0230-8.

[21] Ajithkumar M, Murali CR, Vani NV. Prognostic implication of survivin expression in oral squamous cell carcinoma-an immunohistochemical study[J]. J Contemp Dent Pract, 2019, 20(5): 577 - 581.

[22] Kisilevsky E, Freund P, Margolin E. Mitochondrial disorders and the eye[J]. Surv Ophthalmol, 2020, 65: 294 - 311. doi: 10.1016/j.survophthal.2019.11.001.

doi:10.11659/jjssx.09E020111

·基础研究·

敲低干细胞关键转录因子 FoxD3 对胃癌细胞 SGC-7901 的影响

刘世光[1],田伶伶[1],史冬梅[1],王 聪[2],刘 聪[3] (1.辽阳市中心医院肿瘤内科,辽宁 辽阳 111000;2.辽宁省肿瘤医院肿瘤内科,辽宁 沈阳 110000;3.铁岭市中心医院肿瘤内科,辽宁 铁岭 112000)

[摘 要] **目的** 探究 shRNA FoxD3 对胃癌细胞 SGC-7901 生长、运动及上皮间质转化的影响。**方法** 将 shRNA FoxD3 载体和空质粒载体转染至 SGC-7901 细胞,根据处理方式不同,将细胞分为 Control 组、shRNA-NC 组和 FoxD3-shRNA2 组。克隆形成实验检测细胞克隆形成率;Transwell 检测侵袭细胞数;划痕实验检测细胞划痕愈合率;显微镜观察上皮间质转化形态学变化;Western blot 检测 Ki67、增殖细胞核抗原(PCNA)、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)蛋白表达水平。**结果** 与 Control 组比较,FoxD3-shRNA2 组克隆形成率降低($P<0.05$),Ki67、PCNA 蛋白表达降低($P<0.05$),侵袭细胞数减少($P<0.05$),划痕愈合率降低($P<0.05$),上皮间质转化受到抑制,E-cadherin 蛋白表达升高($P<0.05$),N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** shRNA FoxD3 可抑制 SGC-7901 细胞的增殖、侵袭、迁移和上皮间质转化。

[关键词] 胃癌;叉头框蛋白 D3;增殖;上皮间质转化

[中图分类号] R735.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2020-09-25

Effect of knockdown of key transcription factor FoxD3 on gastric cancer cell line SGC-7901

LIU Shi-guang[1], TIAN Ling-ling[1], SHI Dong-mei[1], WANG Cong[2], LIU Cong[3] (1. Department of Medical Oncology, Liaoyang Central Hospital, Liaoyang Liaoning 111000, China; 2. Department of Medical Oncology, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang Liaoning 110000, China; 3. Department of Medical Oncology, Tieling Central Hospital, Tieling Liaoning 112000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of shRNA FoxD3 on the growth, motility and epithelial-mesenchymal transformation of gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** The shRNA FoxD3 vector and empty plasmid vector were transfected into SGC-7901 cells, and the cells were divided into the Control group, the shRNA-NC group and the FoxD3-shRNA2 group according to different treatment methods. The rate of cell clone formation was detected by clonal formation assay; the number of invaded cells were detected by Transwell; the cell scratch healing rate was detected by scratch test; the morphological changes of epithelial-mesenchymal transformation was observed under microscope; the protein expression levels of Ki67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), E-cadherin, N-cadherin and Vimentin were detected by Western blot. **Results** Compared with the Control group, the FoxD3-shRNA2 group had lower rate of cell clone formation ($P<0.05$), lower protein expression of Ki67 and PCNA ($P<0.05$), less invaded cells ($P<0.05$), and lower scratch healing rate ($P<0.05$). And the epithelial-mesenchymal transformation in the FoxD3-shRNA2 group was inhibited and the protein expression of E-cadherin was increased ($P<0.05$), while the protein expressions of N-cadherin and Vimentin were decreased in the FoxD3-shRNA2 group compared with those in the Control group ($P<0.05$). **Conclusion** ShRNA FoxD3 can inhibit the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transformation of SGC-7901 cells.

Keywords: gastric cancer; Forkhead box D3; proliferation; epithelial-mesenchymal transformation

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(20180550046)

[通信作者] 刘世光,E-mail:Lsg565363@163.com

[23] Smith GM, Gallo G. The role of mitochondria in axon development and regeneration[J]. Dev Neurobiol, 2018, 78: 221 – 237. doi: 10.1002/dneu.22546.

[24] Ma ZJ, Lu L, Yang JJ, et al. Lariciresinol induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial-mediated apoptosis pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 821: 1 – 10. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.12.027.

[25] Wang J, Dong Y, Li Q. Neferine induces mitochondrial dysfunction to exert anti-proliferative and anti-invasive activities on retinoblastoma [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2020, 245(15): 1385 – 1394. doi: 10.1177/1535370220928933.

[26] Smith GM, Gallo G. The role of mitochondria in axon development and regeneration[J]. Dev Neurobiol, 2018, 78(3): 221 – 237. doi: 10.1002/dneu.22546.

[27] Zhang M, Zhang P, Zhang C, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2009, 38(3): 307 – 313. doi: 10.1111/j.1600 – 0714.2008.00689.x.

[28] Li S, Zhang S, Chen J. c-Myc induced upregulation of long non-coding RNA SNHG16 enhances progression and carcinogenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Gene Ther, 2019, 26(11 – 12): 400 – 410. doi: 10.1038/s41417 – 018 – 0072 – 8.

(编辑:龙小芬)