doi:10.11659/jjssx.12E021232

·基础研究·

MiR-663b/ALDH6A1 轴通过 ROS 调节口腔鳞状细胞癌细胞增殖

许 朗[1],黄忠卫[2],鲁大鹏[3],韩 炎[4],周丽芝[5] (1.北京积水潭医院口腔科,北京 100035;2.北京王府中西医结合医院口腔科,北京 102200;3.首都医科大学附属北京口腔医院急诊综合治疗中心,北京 100050;4.文安县医院口腔科,河北 廊坊 065800;5.河北省唐山市第八医院口腔科,河北 唐山 063000)

[摘 要] **目的** 探讨 microRNA-663b(miR-663b)对口腔鳞状细胞癌(OSCC)细胞增殖的调控作用及机制。**方法** 利用基因表达汇编(GEO)数据库的 OSCC 组织芯片数据进行差异表达基因分析;采用基因富集分析(GSEA)探寻 OSCC 与 miR-663b 相关的生物学功能。将 miR-663b mimic 以及醛脱氢酶 6 家族成员 A1(ALDH6A1)过表达质粒转染至人 OSCC 细胞系 HSC-3、CAL-27;采用 CCK-8 实验、克隆形成实验及裸鼠皮下移植瘤实验检测 miR-663b 对 HSC-3、CAL-27 细胞体内、外增殖的影响;采用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-663b 与 ALDH6A1 的靶向关系。**结果** GEO 数据库组织芯片数据显示,miR-663b 在 OSCC 细胞中表达上调;GSEA 发现 miR-663b 生物学功能与调节细胞增殖、氧化还原反应及活性氧(ROS)相关。功能试验中,过表达 miR-663b 显著促进 HSC-3、CAL-27 细胞的体外增殖、克隆形成能力以及裸鼠皮下移植瘤的生长($P<0.05$),下调 ALDH6A1 蛋白表达和 ROS 水平($P<0.05$),升高 NADPH/$NADP^+$ 比值($P<0.05$);而上调 ALDH6A1 表达则显著抑制 HSC-3、CAL-27 细胞体外增殖和和克隆形成能力,上调 ALDH6A1 蛋白表达和 ROS 水平($P<0.05$),降低 NADPH/$NADP^+$ 比值($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验结果证实 miR-663b 能靶向结合 ALDH6A1 mRNA 的 3'UTR 区。**结论** miR-663b 在 OSCC 细胞中表达上调,并可通过靶向抑制 ALDH6A1 表达调节 ROS 水平,进而促进 OSCC 细胞增殖发挥致癌基因作用。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌;miR-663b;醛脱氢酶 6 家族成员 A1;活性氧;增殖

[中图分类号] R246.83 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-12-31

MiR-663b/ALDH6A1 axis regulating the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by ROS

XU Lang[1], HUANG Zhong-wei[2], LU Da-peng[3], HAN Yan[4], ZHOU Li-zhi[5] (1. Department of Stomatology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China; 2. Department of Stomatology, Beijing Royal Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing 102200, China; 3. Integrated Emergency Treatment Center, Beijing Stomatological Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China; 4. Department of Stomatology, Wen'an Hospital, Langfang Hebei 065800, China; 5. Department of Stomatology, Eighth Hospital of Tangshan City, Tangshan Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To explore the regulation effect and mechanism of microRNA-663b (miR-663b) on the proliferation of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells. **Methods** The differential expression genes were analyzed by OSCC tissue microarray data from gene expression omnibus (GEO) database. The biological functions related to miR-663b in OSCC were explored by genomic enrichment analysis (GSEA). The plasmids with overexpression of miR-663b mimic and aldehyde dehydrogenase 6 family member A1 (ALDH6A1) were transfected into human OSCC cell lines (HSC-3, CAL-27). The effects of miR-663b on the proliferation of HSC-3 and CAL-27 cells in vivo and in vitro were detected by CCK-8 experiment, clone formation assay and subcutaneous xenograft assay of nude mice. The targeting relationship between miR-663b and ALDH6A1 was verified by dual luciferase reporter gene assay. **Results** The tissue microarray data from GEO database showed that the expression of miR-663b was up-regulated in OSCC cells. GSEA showed that the biological functions of miR-663b were related to regulating the cells proliferation, redox reactions and reactive oxygen species (ROS). In functional test, overexpression of miR-663b significantly promoted the in vitro proliferation and clone formation ability of HSC-3 and CAL-27 cells, as well as the growth of subcutaneous xenograft tumors in nude mice, down-regulated the expression of ALDH6A1 protein and ROS levels, and increased NADPH/$NADP^+$ ratio ($P<0.05$). However, up-regulation of ALDH6A1 expression significantly inhibited the in vitro proliferation and clone formation ability of HSC-3 and CAL-27 cells, up-regulated the expression of ALDH6A1 protein and ROS levels, and reduced NADPH/$NADP^+$ ratio ($P<0.05$). The results of dual luciferase reporter gene assay confirmed that miR-663b could target 3' UTR region of ALDH6A1 mRNA. **Conclusion** The expression of miR-663b is up-regulated in OSCC cells, which can regulate ROS levels by targeting the inhibition of ALDH6A1 expression, thereby promoting the proliferation of OSCC cells to play an oncogene role.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; miR-663b; aldehyde dehydrogenase 6 family member A1; reactive oxygen species; proliferation

[基金项目] 北京大学口腔医学院青年基金(pkuss20200108)

[通信作者] 许 朗,E-mail:xulangdentist@163.com

口腔癌是临床常见的恶性肿瘤,其中口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)约占90%[1]。尽管目前OSCC患者的预后获得了极大改善,但其长期预后仍不容乐观,5年生存率低于50%[2]。因此,有必要深入研究OSCC发生、发展的内在机制。研究表明,微小核糖核酸(microRNA, miRNA)参与调节包括OSCC在内的多种恶性肿瘤的生物学特征[3-5];有研究发现,miR-663b在结直肠癌中表达上调,其能促进结直肠癌细胞的增殖而发挥致癌基因作用[6];此外,miR-663b在骨肉瘤细胞中表达水平升高,干扰miR-663b表达可有效诱导骨肉瘤细胞凋亡[7]。然而,miR-663b在OSCC细胞中的作用目前仍不清楚。本研究旨在通过生物信息学分析和功能实验探讨miR-663b在OSCC发生、发展中的生物学功能及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、实验动物与试剂

人OSCC细胞系HSC-3、CAL-27(丰晖生物),SPF级Nu/Nu品系裸鼠18只(北京维通利华实验动物技术有限公司),体质量15~20 g;本实验根据实验动物管理与保护的有关规定饲养动物并进行实验。

miR-663b、醛脱氢酶6家族成员A1(aldehyde dehydrogenase 6 family member A1, ALDH6A1)过表达质粒(上海吉凯基因医学科技股份有限公司),ALDH6A1一抗(英国Abcam公司),HRP标记的IgG二抗(美国BioRad公司),DMEM培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司),双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国Promega公司),NADPH/$NADP^+$比值检测试剂盒(美国Abbkine公司),Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 利用基因表达汇编(gene expression omnibus, GEO)数据库OSCC组织芯片(GSE45238、GSE28100、GSE98463)分析癌组织和正常对照样本中的差异表达miRNA,并取交集;下载TCGA数据库中头颈癌表达数据和临床信息,并挑选出OSCC患者,以miR-663b的表达水平均数分组,使用GSEA3.0软件分析miR-663b表达水平与细胞增殖、氧化还原的关系。分析GSE138206、GSE74530共同下调的基因,并与miRWalk预测miR-663b的靶基因取交集。以ALDH6A1表达水平中位数分组,基因富集分析(genomic enrichment analysis, GSEA)ALDH6A1表达水平和细胞氧化还原以及细胞增殖的关系。

1.2.2 细胞培养与转染 人OSCC细胞系HSC-3、CAL-27细胞使用含10%胎牛血清的DMEM培养基于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养,待细胞生长汇合率达85%以上后进行传代培养。采用Lipofectamine 2000将miR-663b mimic及ALDH6A1过表达质粒转染至HSC-3、CAL-27细胞。miR-663b慢病毒表达载体由上海吉凯基因医学构建、包装后转染HSC-3细胞,用于构建裸鼠皮下移植瘤模型。

1.2.3 裸鼠皮下移植瘤实验 18只裸鼠分为miR-NC组和miR-663b组,每组9只,取稳定转染miR-NC或miR-663b的HSC-3细胞约5×10^6个重悬于100 μL PBS中,分别注射到裸鼠腋下诱导OSCC皮下移植瘤模型;待成瘤后,每2 d使用标尺测量肿瘤体积,肿瘤体积(V)=0.5×瘤体长(L)×瘤体宽(W)^2;监测14 d后处死裸鼠,剥离瘤体,测量瘤体体积并称重。

1.2.4 双荧光素酶报告基因实验 根据靶基因预测数据库miRwalk预测的可能结合位点构建ALDH6A1结合位点的野生型(WT)和突变型(MUT)3'UTR序列的荧光素酶报告基因载体pmiR-ALDH6A1-WT或pmiR-ALDH6A1-MUT。将上述构建的质粒载体和miR-663b或miR-NC共转染至HSC-3细胞,培养48 h后,测定荧光素酶活性变化。

1.2.5 CCK-8检测细胞增殖 转染48 h后,将HSC-3、CAL-27细胞消化后以1 000 r/min离心5 min、PBS冲洗,使用DMEM培养基配成单细胞悬液后,以6 000个/孔的密度接种于96孔板,放入培养箱中常规培养,分别于培养0 h、24 h、48 h、72 h、96 h和120 h后加入10 μL CCK-8溶液,继续培养2 h后测定450 nm处吸光度(OD)值。

1.2.6 细胞活性氧(ROS)检测 转染48 h后,将HSC-3、CAL-27细胞以4×10^5/mL的密度接种于6孔板,于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养24 h后,使用PBS更换细胞培养液,然后将细胞与10 μmol/L DCF-DA于37 ℃、5% CO_2条件下继续培养20 min。使用Dynatech MR5000 plate reader分析每孔在488 nm处的吸光度。

1.2.7 细胞NADPH/$NADP^+$检测 转染48 h后,将HSC-3、CAL-27细胞以4×10^5/mL的密度接种于6孔板,于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养24 h后,按照NADPH/$NADP^+$比值检测试剂盒说明书步骤检测细胞中NADPH/$NADP^+$比值。

1.2.8 克隆形成实验 转染48 h后,将HSC-3、CAL-27细胞使用DMEM培养基配成单细胞悬液,以100个/孔的密度接种于6孔板,放入培养箱中常规培养,每2 d换液,2周后终止培养。分别使用中性甲醇固定、结晶紫染色后拍照,于低倍显微镜下计数大于

50 个细胞的克隆数。

1.2.9 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析

收集各组细胞后,采用 TRIzol 试剂提取总 RNA,测定其浓度和纯度后,以反转录试剂盒合成cDNA,PCR 仪进行扩增,选择 U6 为内参,根据试剂盒说明书步骤检测 miR-663b 水平,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-663b 水平。引物序列由上海生工合成,见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列
miR-663b	F:5'-CGCTAACAGTCTCCAGTC-3'
	R:5'-GCGACACCAAACTGGATGA-3'
U6	F:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'
	R:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'

1.2.10 Western blot 检测蛋白表达 BCA 法定量提取蛋白样品后,取 40 μg 蛋白,在 100 V 电压条件下经 SDS-PAGE 电泳 50 min,300 mA 转膜 1 h 至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,以 β-actin 为内参,加入 ALDH6A1 一抗于 4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次;最后加二抗室温下孵育 2 h,ECL 法显色,Image J 分析条带灰度值。

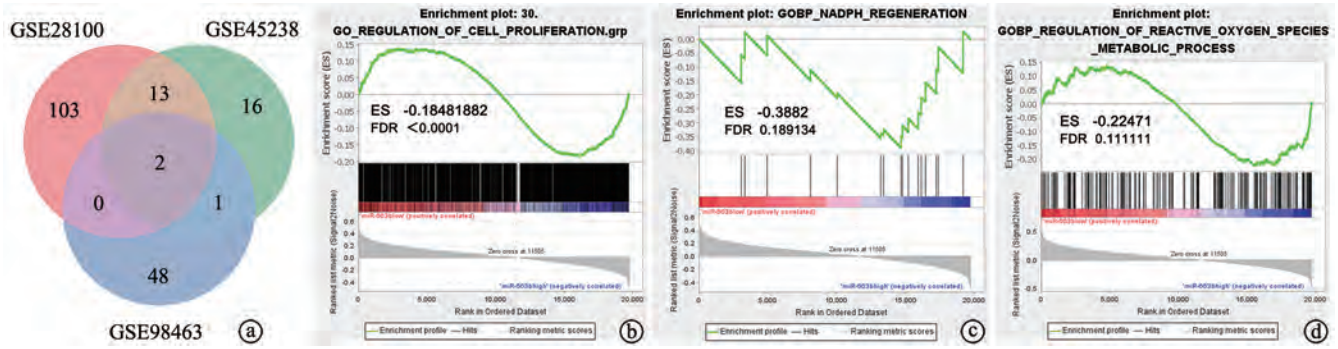
1.3 统计学方法

使用 SPSS 20.0 统计软件分析数据,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较使用 t 检验,多组间比较使用单因素方差分析,两两比较使用 *SNK* 法。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-663b 在 OSCC 细胞中的表达及与临床病理特征的关系

利用 GEO 数据库 OSCC 组织芯片(GSE45238、GSE28100、GSE98463)获取癌组织和正常对照样本中的差异表达基因并取交集发现,miR-663b 表达上调。通过进一步 GSEA 发现,miR-663b 生物学功能与调节细胞增殖、氧化还原反应及 ROS 相关,见图 1。



a:GEO 数据库 3 个数据集 GSE45238、GSE28100、GSE98463 分析所得表达下调基因韦恩图;b~d:miR-663b 生物学功能 GSEA 结果

图 1 miR-663b 在 OSCC 细胞中的表达及与临床病理特征的关系

2.2 上调 miR-663b 对 OSCC 细胞增殖的影响

与转染 miR-NC mimic 比较,HSC-3、CAL-27 细胞转染 miR-663b mimic 后,miR-663b 水平、NADPH/$NADP^+$ 比值上调($P<0.05$),ROS 水平降低($P<0.05$);上调 miR-663b 促进 HSC-3、CAL-27 细胞的体外增殖和克隆形成能力($P<0.05$),见图 2。

2.3 上调 miR-663b 对 OSCC 裸鼠皮下移植瘤生长的影响

与 miR-NC 组比较,裸鼠体内注射稳定过表达 miR-663b 的 HSC-3 细胞后,每 2 d 测量的肿瘤体积明显增加($P<0.05$),监测 14 d 后剥离的瘤体体积和质量均明显增加($P<0.05$),移植瘤组织中 miR-663b 表达显著上调($P<0.05$),提示上调 miR-663b 显著促进裸鼠皮下移植瘤的生长,见图 3。

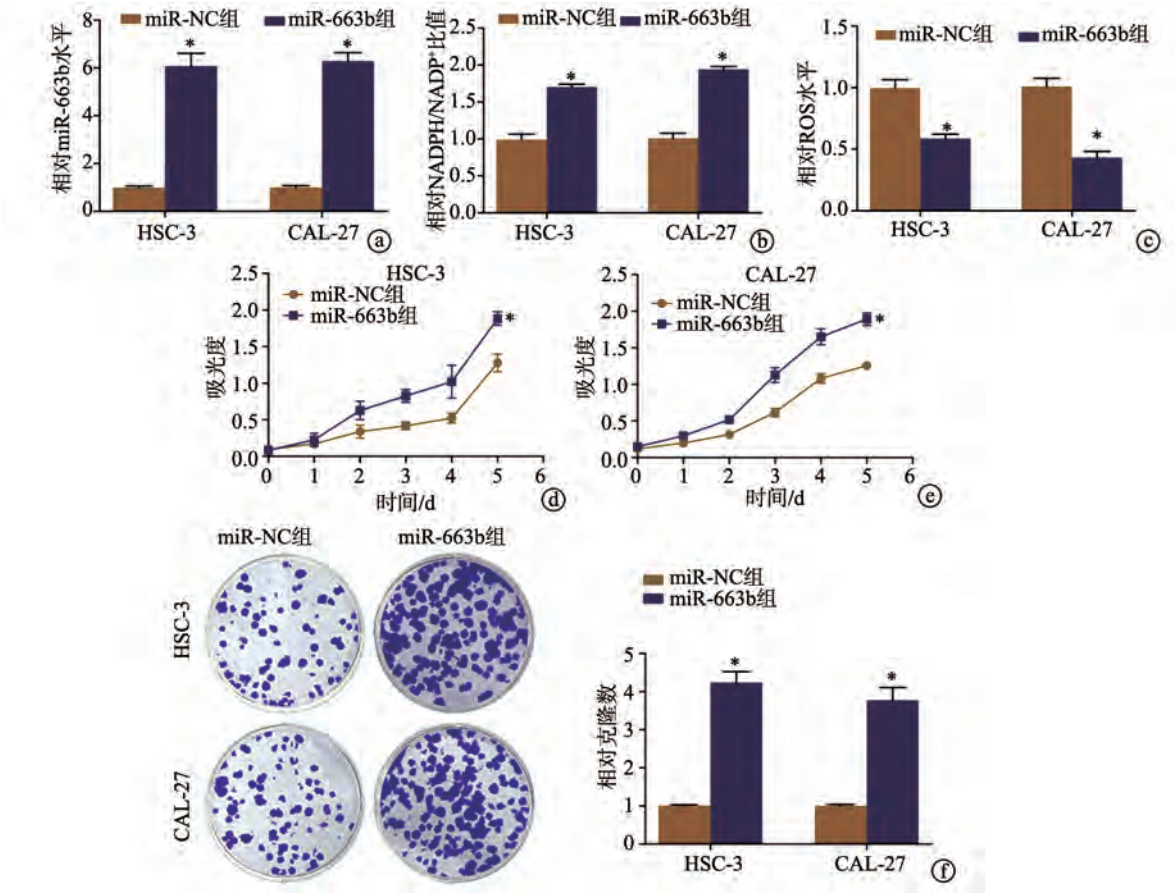
2.4 miR-663b 与 ALDH6A1 的靶向关系

GEO 2R 分析 GSE138206、GSE74530 数据中,下调的基因以及 miRwalk 预测 miR-663b 的靶基因,三者取交集。其中 ALDH3A2、ALDH6A1、CYP4B1、DIO2 被发现与氧化还原密切相关,进一步对这 4 个基因进行 GSEA 分析,结果发现 ALDH6A1 与细胞增殖和氧化还原均相关,因此选择 ALDH6A1 进一步研究。miRwalk 提示 ALDH6A1 mRNA 的 3'UTR 区与 miR-663b 存在直接结合位点。双荧光素酶报告基因实验提示,共转染 miR-663b 和野生型 ALDH6A1 3'UTR 报告基因载体后,荧光素酶活性显著降低($P<0.01$)。此外,转染 miR-663b 能显著下调 HSC-3、CAL-27 细胞的 ALDH6A1 mRNA 和蛋白表达($P<0.05$),见图 4。

2.5 miR-663b 靶向 ALDH6A1 调节 ROS 而抑制OSCC 细胞增殖

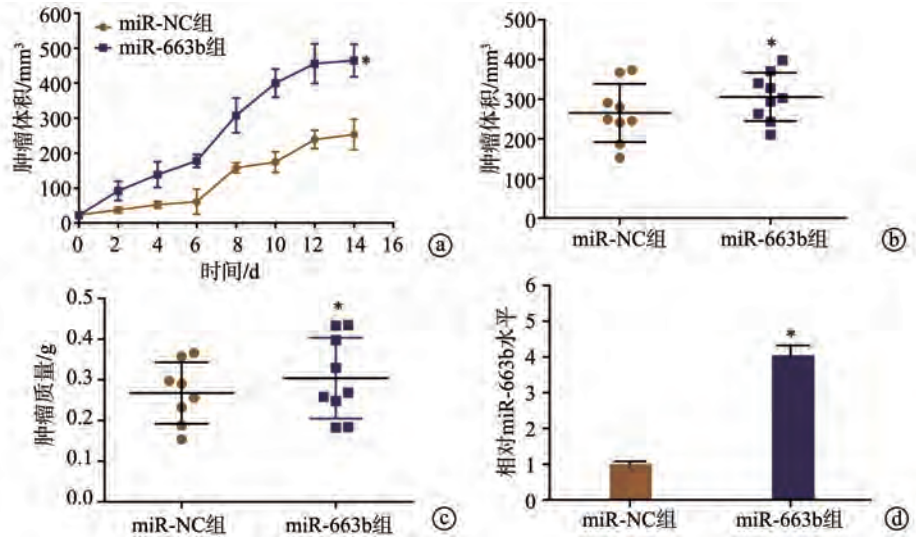
与转染 miR-NC mimic 比较,HSC-3、CAL-27 细胞转染 miR-663b mimic 显著下调 HSC-3、CAL-27 细胞的ALDH6A1蛋白表达和 ROS 水平($P<0.05$),升高 NADPH/$NADP^+$ 比值($P<0.05$),并促进其体外增殖和克隆形成能力($P<0.05$);与转染 miR-663b mimic

比较,HSC-3、CAL-27 细胞共转染 miR-663b mimic 和 ALDH6A1过表达质粒后,显著上调了 ALDH6A1 蛋白表达和 ROS 水平($P<0.05$),降低 NADPH/NADP$^+$ 比值($P<0.05$),并抑制其体外增殖和克隆形成能力($P<0.05$),见图 5。



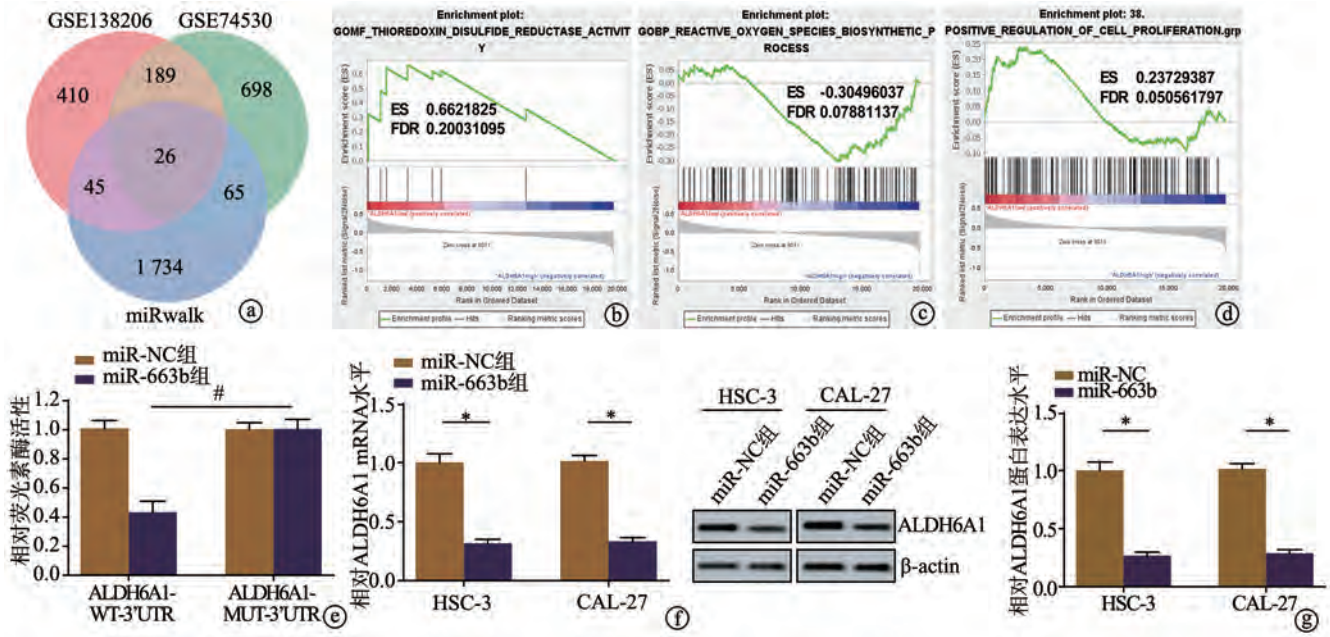
a:qRT-PCR 检测 HSC-3、CAL-27 细胞中 miR-663b 的表达;b:转染后细胞中 NADPH/NADP$^+$ 比值;c:转染后 DCF-DA 荧光探针检测细胞中 ROS 水平;d、e:CCK-8 检测细胞增殖;f:平板克隆形成实验(结晶紫染色 ×20) *:与 miR-NC 组比较,$P<0.05$

图 2 上调 miR-663b 对 OSCC 细胞增殖的影响



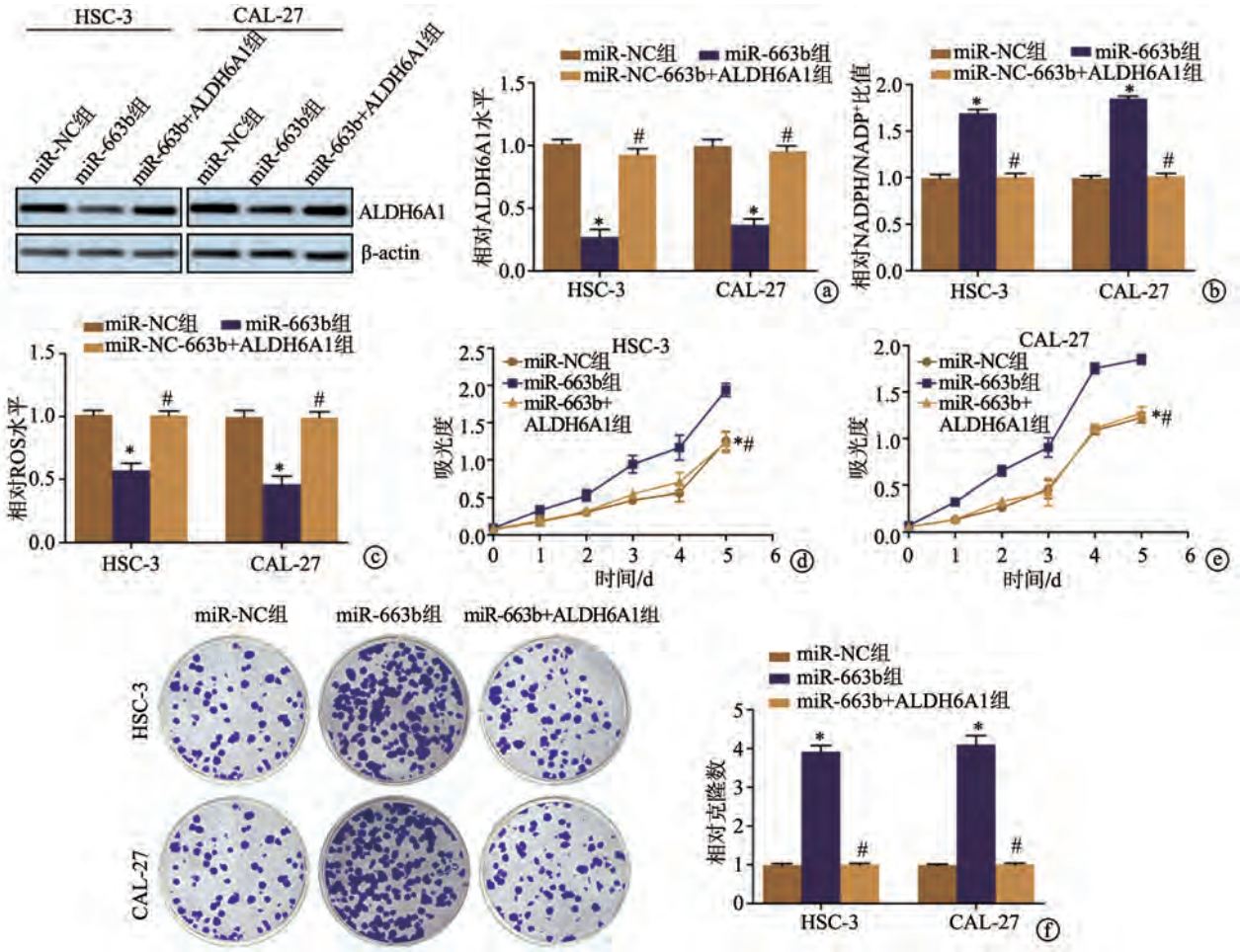
a:裸鼠皮下移植瘤体积变化;b、c:处死裸鼠后取出的肿瘤体积和质量;d:qRT-PCR 检测移植瘤组织中 miR-663b 水平 *:与 miR-NC 组比较,$P<0.05$

图 3 上调 miR-663b 对裸鼠皮下移植瘤生长的影响



a:GSE138206、GSE74530 数据集中表达下调的基因与 miRwalk 预测靶基因的韦恩图;b~d:GSEA 分析 TCGA_OSCC 数据中ALDH6A1表达水平与氧化还原和细胞增殖的关系;e:miRwalk 预测的 miR-663b 与 ALDH6A1 的 3'UTR 的结合位点;f:双荧光素酶报告基因实验验证miR-663b与ALDH6A1的靶向关系;g、h:qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 HSC-3、CAL-27 细胞 ALDH6A1 mRNA 和蛋白表达 *:$P<0.05$;#:$P<0.01$

图 4 miR-663b 与 ALDH6A1 的靶向关系



a:Western blot 检测 ALDH6A1 蛋白表达;b:转染后细胞中 NADPH/$NADP^+$ 比值;c:转染后 DCF-DA 荧光探针检测细胞中 ROS 水平;d、e:CCK-8检测细胞增殖;f:平板克隆形成实验(结晶紫染色×20) *:与 miR-NC 组比较,$P<0.05$;#:与 miR-663b 组比较,$P<0.05$

图 5 miR-663b 靶向 ALDH6A1 调节 ROS 进而抑制 OSCC 细胞增殖

3 讨论

miRNA 为内源性非编码单链 RNA,其能通过与靶 RNA 的 3'UTR 区互补配对干扰目标蛋白的合成从而达到调控靶基因的目的。研究发现,miRNA 水平异常与众多肿瘤的生物学特征具有明显关联,在不同类型肿瘤中 miRNA 可以发挥致癌因子或抑癌因子作用[8-9]。miR-663b 是一种保守的miRNA,其在结直肠癌[6]、骨肉瘤[7]中作为致癌因子发挥作用。然而,miR-663b 在 OSCC 发生、发展中的作用及机制尚不完全清楚。本研究基于 GEO 数据库的组织芯片数据分析显示,相比正常对照组织,miR-663b 在 OSCC 组织细胞中表达均显著上调,而在功能实验中,上调 miR-663b表达可明显促进 OSCC 细胞体外增殖和克隆形成能力,且在体内促进了裸鼠皮下移植瘤的生长,提示 miR-663b 在 OSCC 中同样发挥致癌因子的作用。

miRNAs 通过靶向其下游目的基因发挥调控作用,准确确认 miR-663b 的下游功能靶点有助于阐明 miR-663b 促进 OSCC 细胞体内、外增殖的详细分子机制。本研究通过 GSEA 发现,miR-663b 生物学功能与调节细胞增殖、氧化还原反应及 ROS 相关。进一步经 miRNA-mRNA 预测数据库 miRwalk 与双荧光素酶报告基因实验验证,ALDH6A1 mRNA 的 3'UTR 区被证实与 miR-663b 存在靶向结合位点,且在 OSCC 细胞中上调 miR-663b 水平能有效抑制 ALDH6A1 蛋白表达。ALDH6A1 为醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase,ALDH)家族成员之一,ALDH 家族成员可利用 NAD 或 NADP 作为辅酶将醛氧化成相应的羧酸 NADH 或 NADPH,参与肿瘤的代谢通路[10]。既往研究发现,ALDH 同工酶变异与肝细胞癌密切相关,ALDH6A1被鉴定为肝癌预后的预测因子[11]。此外,Lu 等[12]研究指出,过表达 ALDH6A1 抑制肾透明细胞癌细胞增殖,并通过生物信息学分析认为 ALDH6A1 与肿瘤代谢有关。本研究结果显示,ALDH6A1 的表达与 OSCC 进展呈负相关,与 Lu 等[12]研究中 ALDH6A1 发挥抑癌作用的结果相符合。

细胞增殖及凋亡异常是肿瘤不受限生长的重要基础[13]。NADH 的增加是肿瘤细胞代谢重构的显著特征,而过表达 ALDH6A1 会损害肿瘤细胞代谢。既往研究显示,ALDH 水平增加会诱导 NADPH/$NADP^+$ 比值降低,从而破坏线粒体膜电位,而线粒体膜电位的破坏会导致 ROS 水平升高[14]。在 OSCC 中,ROS 作为应激和呼吸的副产物,其水平下降可能是导致宿主氧化还原状态失衡的重要原因[15]。此外,在肿瘤进展过程中,ROS 在肿瘤细胞生长方面发挥重要作用,调节癌细胞中 ROS 水平可能是癌症治疗的潜在策略[16]。本研究中,上调 ALDH6A1 表达可显著下调 NADPH/$NADP^+$ 比值,上调 ROS 水平,OSCC 细胞的体外增殖被显著抑制,这与 Shin 等[11]研究中 ALDH6A1 所表现的功能相一致,且与本研究中 miR-663b 在 OSCC 细胞增殖中的调控作用完全相反。以上数据表明,miR-663b对OSCC细胞增殖的调节作用是通过靶向抑制 ALDH6A1 表达进而调节 ROS 水平而实现的。

综上所述,miR-663b 在 OSCC 细胞中表达上调,并可通过靶向抑制 ALDH6A1 表达调节 ROS 水平,进而促进 OSCC 细胞增殖发挥致癌基因作用。miR-663b 可能是 OSCC 的潜在治疗靶点。

[参考文献]

[1] Kim SY, Han YK, Song JM, et al. Aberrantly hypermethylated tumor suppressor genes were identified in oral squamous cell carcinoma (OSCC)[J]. Clin Epigenetics, 2019, 11(1): 116. doi: 10.1186/s13148-019-0715-0.

[2] Inchingolo F, Santacroce L, Ballini A, et al. Origin and initiation mechanisms of neuroblastoma[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(9): 3168. doi: 10.1007/s00441-018-2796-z.

[3] Alessandrini L, Manchi M, De Re V, et al. Proposed molecular and miRNA classification of gastric cancer[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1683. doi: 10.3390/ijms19061683.

[4] Zhu Y, Wang C, Becker SA, et al. miR-145 Antagonizes SNAI1-mediated stemness and radiation resistance in colorectal cancer[J]. Mol Ther, 2018, 26(3): 744-754. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.12.023.

[5] Jiang LH, Lv LH, Liu XX, et al. MiR-223 promotes oral squamous cell carcinoma proliferation and migration by regulating FBXW7[J]. Cancer Biomark, 2019, 24(3): 325-334. doi: 10.3233/CBM-181877.

[6] Hong S, Yan Z, Wang H, et al. miR-663b promotes colorectal cancer progression by activating Ras/Raf signaling through downregulation of TNK1[J]. Hum Cell, 2020, 33(1): 104-115. doi: 10.1007/s13577-019-00294-w.

[7] Shu Y, Ye W, Gu YL, et al. Blockade of miR-663b inhibits cell proliferation and induces apoptosis in osteosarcoma via regulating TP73 expression[J]. Bratisl Med J, 2018, 119(1): 41-46. doi: 10.4149/BLL_2018_009.

[8] Pan Y, Ye C, Tian Q, et al. miR-145 suppresses the proliferation, invasion and migration of NSCLC cells by regulating the BAX/BCL-2 ratio and the caspase-3 cascade[J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 4337-4343. doi: 10.3892/ol.2018.7863.

[9] Chen HC, Liu TF, Ouyang HB, et al. Upregulation of FTX Promotes Osteosarcoma tumorigenesis by increasing SOX4 expression via miR-214-5p[J]. Onco Targets Ther, 2018, 13(1): 7125-7136. doi: 10.2147/OTT.S238070.

doi:10.11659/jjssx.10E021064

·基础研究·

贝沙罗汀对氧糖剥夺/再灌注诱导 HT22 损伤的神经保护作用及机制研究

张雪林[1],王 松[1],田晓翠[2],董 志[2],刘海林[1] (1.重庆两江新区第一人民医院药剂科,重庆 401121;2.重庆医科大学药学院生物化学与分子药理学重点实验室,重庆 400016)

[摘 要] **目的** 探究贝沙罗汀对氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)诱导的海马神经元细胞系 HT22 损伤的保护作用及其机制。**方法** 在体外培养 HT22,并将细胞随机分为对照组(Control 组)、模型组(OGD/R 组)、药物干预组(OGD/R + Bex 组)、JNK 特异性抑制剂(SP)组(OGD/R + SP 组)及药物干预合并 SP 组(OGD/R + Bex + SP 组),使用不同浓度贝沙罗汀(0.1 ~ 9 μmol·L^{-1})或 SP 干预细胞,MTT 检测 HT22 的生存率,流式细胞仪检测细胞凋亡水平,显微镜下观察各组细胞形态,Western blot 检测各组细胞 JNK 信号通路相关蛋白的表达。**结果** 在体外模拟的 HT22 损伤的 OGD/R 模型中,与 OGD/R 组相比,9 μmol·L^{-1}贝沙罗汀能显著提高 OGD/R 状态下 HT22 生存率($P<0.05$),减少 HT22 凋亡($P<0.05$)。与 OGD/R 组相比,9 μmol·L^{-1}贝沙罗汀能显著降低凋亡相关蛋白 P-JNK、P-C-Jun、Bax、Cleaved-Caspase-3 表达水平($P<0.05$),减轻 HT22 损伤。**结论** 贝沙罗汀在体外对 OGD/R 引起的 HT22 损伤具有保护作用,其作用机制可能与抑制 JNK/Caspase-3 信号通路的激活有关。

[关键词] 贝沙罗汀;氧糖剥夺/再灌注;HT22;细胞凋亡;JNK/Caspase-3

[中图分类号] R917 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-10-14

Neuroprotective effect and mechanism of bexarotene on oxygen glucose deprivation/reperfusion-induced HT22 injury

ZHANG Xue-lin[1], WANG Song[1], TIAN Xiao-cui[2], DONG Zhi[2], LIU Hai-lin[1] (1. Department of Pharmacy, First People's Hospital of Liangjiang New District of Chongqing, Chongqing 401121, China; 2. Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of bexarotene on oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-induced hippocampal neuronal cell line HT22 injury. **Methods** HT22 were cultured in vitro and randomly divided into the Control group, the model group (the OGD/R group), the drug intervention group (the OGD/R + Bex group), the JNK specific inhibitor (SP) group (the OGD/R + SP group) and the drug intervention combined with SP group (the OGD/R + Bex + SP group). The cells were intervened with different concentrations of bexarotene (0.1 to 9 μmol·L^{-1}) or SP. MTT was used to detect the survival rate of cells. Flow cytometry was used to detect the level of cell apoptosis. The morphology of cells in each group was observed under a microscope, and the expression of JNK signaling pathway-related proteins in each group was detected by Western blot. **Results** In the OGD/R model of HT22 injury simulated in vitro, compared with the OGD/R group, 9 μmol·L^{-1} of bexarotene could significantly improve the survival rate of HT22 in the OGD/R

[基金项目] 重庆市科技局创新与应用发展专项(CSTC2019jscx-msxmX0096)

[通信作者] 刘海林,E-mail:719204899@qq.com

[10] Wang W, Wang C, Xu H, et al. Aldehyde dehydrogenase, liver disease and cancer[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(6): 921 - 934. doi: 10.7150/ijbs.42300.

[11] Shin H, Cha HJ, Lee MJ, et al. Identification of ALDH6A1 as a potential molecular signature in hepatocellular carcinoma via quantitative profiling of the mitochondrial proteome[J]. J Proteome Res, 2020, 19(4): 1684 - 1695. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00846.

[12] Lu J, Chen Z, Zhao H, et al. ABAT and ALDH6A1, regulated by transcription factor HNF4A, suppress tumorigenic capability in clear cell renal cell carcinoma[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 101. doi: 10.1186/s12967 - 020 - 02268 - 1.

[13] Puisieux A, Pommier RM, Morel AP, et al. Cellular Pliancy and the Multistep Process of Tumorigenesis[J]. Cancer Cell, 2018, 33(2): 164 - 172. doi: 10.1016/j.ccell.2018.01.007.

[14] Singh S, Brocker C, Koppaka V, et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 56: 89 - 101. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010.

[15] Hou DW, Dong HG, Wang Q. AURKA contributes to the progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) through modulating epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and apoptosis via the regulation of ROS[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 507(4): 83 - 90. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.170.

[16] Chen Q, Song S, Wang Z, et al. Isorhamnetin induces the paraptotic cell death through ROS and the ERK/MAPK pathway in OSCC cells[J]. Oral Diseases, 2021, 27(2): 240 - 250. doi: 10.1111/odi.13548.

(编辑:贺绍梅)