doi:10.11659/jjssx.05E019089

·基础研究·

miR-149-5p 靶向 CDK6 对口腔鳞状细胞癌细胞生长、侵袭和迁移的影响

王 强[1],于 彬[1],唐 兰[1],刘 宇[1],吴 燕[2] (1.德阳市口腔医院正畸科,四川 德阳 618000;2.成都大学附属医院口腔科,四川 成都 610000)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-149-5p 靶向 CDK6 对口腔鳞状细胞癌(OSCC)细胞生长、侵袭和迁移的影响。**方法** 利用 Lipofectamine[2000]将 miR-149-5p mimic 质粒、mimic-NC 质粒、CDK6 质粒分别或联合转染进入 Tca8113 细胞,运用基因预测软件预测 miR-149-5p 的靶基因,采用双荧光素酶实验验证靶向关系,RT-PCR 检测 miR-149-5p 与 CDK6 mRNA 的表达,MTT 法检测细胞活性,克隆形成实验检测细胞生长情况,流式细胞术检测细胞周期分布和细胞凋亡情况,Transwell 法检测细胞侵袭能力,划痕实验检测细胞迁移能力,Western blot 检测 CDK6、C-Myc、和 Cyclin D1 的表达,裸鼠右后肢腹侧皮下注射构建 OSCC 移植瘤模型,并测定移植瘤体积和重量,同时采用免疫组化检测 Ki67 和 Vimentin 的表达。**结果** miR-149-5p 在 OSCC 细胞中低表达,与 CDK6 在 3′UTR 区存在结合位点,miR-149-5p 直接靶向抑制 CDK6;miR-149-5p 过表达能够明显降低 Tca8113 细胞活性和克隆数目,并增强 G0/G1 期细胞周期阻滞,增加凋亡率,减少侵袭数目,降低伤口愈合率,且下调 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达,而加入 CDK6 后能够反转这些现象;miR-149-5p 过表达会使体内移植瘤的重量和体积明显减少,并使移植瘤的 Ki67 和 Vimentin 的阳性细胞比率明显减少。**结论** miR-149-5p靶向 CDK6 对口腔鳞状细胞癌细胞生长、侵袭和迁移具有抑制作用。

[关键词] miR-149-5p;CDK6;口腔鳞状细胞癌;生长;侵袭;迁移

[中图分类号] R739.8 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-05-20

Inhibition of miR-149-5p on the growth, invasion and migration of oral squamous cell carcinoma cells by targeting CDK6

WANG Qiang[1], YU Bin[1], TANG Lan[1], LIU Yu[1], WU Yan[2] (1. Orthodontics Department, Deyang Stomatological Hospital, Deyang Sichuan 618000, China; 2. Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu Sichuan 610000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of miR-149-5p targeting CDK6 on the growth, invasion and migration of oral squamous cell carcinoma cells. **Methods** The miR-149-5p mimic plasmid, mimic-NC plasmid, and CDK6 plasmid were transfected into Tca8113 cells by Lipofectamine[2000]. The targeting gene was predicted by gene prediction software, the targeting relationship was verified by fluorescein experiment, and the expression of miR-149-5p and CDK6 mRNA were detected by RT-PCR. Cell viability was detected by MTT assay, cell growth was detected by colony formation assay, cell cycle distribution and apoptosis were detected by flow cytometry, and cell invasion ability was detected by Transwell assay. The cell migration ability was examined by a scratch test, and the expression of CDK6, C-Myc, and Cyclin D1 were detected by Western blot. The OSCC xenograft model was established by subcutaneous injection of the right hind limb of nude mice. The volume and weight of the transplanted tumor were determined. The expression of Ki67 and Vimentin were detected by immunohistochemistry. **Results** miR-149-5p had been under-expressed in OSCC cells, miR-149-5p and CDK6 had binding sites in the 3′UTR region, miR-149-5p had been directly targeted to CDK6; Overexpression of miR-149-5p significantly reduced the activity and number of clones of Tca8113 cell line, enhanced the cell cycle arrest in G0/G1 phase, increased the apoptosis rate, reduced invasion number and wound healing rate, and decreased C-Myc, Cdk6, Cyclin D1 protein expression, but the inability to reverse these phenomena after the addition of CDK6. The overexpression of miR-149-5p significantly reduced the weight and volume of the transplanted tumor, and significantly reduced the ratio of Ki67 and Vimentin positive cells in the transplanted tumor. **Conclusion** miR-149-5p inhibits the growth, invasion and migration of oral squamous cell carcinoma cells by targeting CDK6.

Keywords: miR-149-5p; CDK6; oral squamous cell carcinoma; growth; invasion; migration

口腔癌是口腔内出现一系列恶性肿瘤的总称,占全身恶性肿瘤的3%~5%,其中约90%是口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)[1]。口腔癌的发病机制极其复杂,吸烟、饮酒、病毒感染、营养不良、饮食习惯不良等均是诱发因素,已有研究证明吸烟和饮酒是与口腔癌最相关的两个致病因素[2]。OSCC 呈逐

[基金项目] 四川省医学会科研课题(185823)

[通信作者] 王 强,E-mail: klnt1udwgah@sina.com

年上升趋势,每年新增病例约 27.5 万[3]。尽管 OSCC 的治疗方法(如化疗、手术切除、放疗等)有很大改进,但是 OSCC 患者 5 年总体生存率仍不尽人意,仅为 66%[4]。OSCC 已经严重威胁到人们的健康,因此有必要进行深入研究以揭示其发生的内在机制,以期发现 OSCC 潜在的治疗方法。已有研究报道,miR-149-5p 在肾细胞癌、黑色素瘤、肝癌等多种癌症中低表达,而过表达 miR-149-5p 能够抑制肾细胞癌、黑色素瘤、肝癌等多种癌症的发生和发展[5-7]。CDK6 是调节细胞周期的关键因子,是进入 G1 期的关键,已有研究表明 OSCC 细胞中 CDK6 过表达[8]。本研究主要探讨 miR-149-5p 靶向 CDK6 对口腔鳞状细胞癌细胞生长、侵袭和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

正常人类口腔细胞系 Hs 680.Tg 和 Fadu、SCC-25、CAL-27、Tca8113 等 4 株人 OSCC 细胞系,均购自 ATCC。miR-149-5p mimic 质粒、mimic-NC 质粒、CDK6 质粒及各引物均由上海基因制药有限公司设计并合成。DMEM 培养基(上海善然生物科技有限公司,货号:SH3002.01B),胎牛血清(素尔生物科技有限公司,货号:16000-044),Lipofectamine^{2000} 转染试剂(上海恪敏生物科技有限公司,货号:11668-027),QIAzol 裂解试剂(北京鸿跃创新科技有限公司,货号:79306),cDNA逆转录试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司,货号:GK8030-20),SYBR-Green PCR 试剂盒(赛默飞世尔科技公司,货号:4309155),双荧光素酶报告基因检测试剂盒(北京原平皓生物技术有限公司,货号:GN201-01),RIPA 裂解缓冲液(南京海克尔生物科技有限公司,货号:SBJ-0999),BCA 试剂盒(上海易色医疗科技有限公司,货号:BC201),MTT 试剂盒(上海泽叶生物科技有限公司,货号:ZY111105),CDK6 抗体、C-Myc 抗体、Cyclin D1 抗体、Ki67 抗体、Vimentin 抗体(碧云天生物科技有限公司,货号:AC256、AM926、AC853、AF1738、AF0318),裸鼠购自四川夏派森医药科技有限公司(许可证:SYXK(川)2017-203)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Hs680.Tg 和 4 株人 OSCC 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 ℃、5% CO_2 孵育箱培养。

1.2.2 细胞转染 取对数期细胞,接种于 6 孔板(1×10^6/孔)。当达到 80% 融合时,根据 Lipofectamine^{2000} 说明书将 100 nmol/L miR-149-5p mimic 质粒、mimic-NC 质粒、CDK6 质粒分别或联合转染进入 Tca8113 细胞。

1.2.3 RT-PCR 检测 miR-149-5p 与 CDK6 mRNA 的表达 采用 QIAzol 裂解试剂提取总 RNA,采用 cDNA逆转录试剂盒合成 cDNA。RT-PCR 采用 SYBR-Green PCR 试剂盒说明书进行操作。U6 作为 miR-149-5p mRNA 的内参,GAPDH 作为 CDK6 mRNA 的内参,使用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 方法计算。U6 的上游引物序列:5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′,U6 的下游引物序列:5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′;miR-149-5p 的上游引物序列:5′-GTCTTCACTCCCGTGCTTGT-3′,miR-149-5p 的下游引物序列:5′-CCCGAAACACCCGTAAGATA-3′;GAPDH 的上游引物序列:5′-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3′,GAPDH 的下游引物序列:5′-GCCATCACGCCACAGTTTC-3′;CDK6 的上游引物序列:5′-GTCTCACCCATACTTCCAGGACC-3′,CDK6 的下游引物序列:5′-GGGACCCATAAGCCACCAAG-3′。

1.2.4 双荧光素酶报告检测靶向关系 收集生长至对数期的 Tca8113 细胞,铺于 96 孔板,每孔约4×10^3 个细胞,24 h 后,分别转染 mimic-NC + CDK6 WT、mimic-NC + CDK6 MUT、miR-149-5p mimic + CDK6 WT、miR-149-5p mimic + CDK6 MUT,根据双荧光素酶报告基因试剂盒说明进行测定,用萤火虫荧光素酶活性和肾荧光素酶活性比值表示荧光素酶的相对活性。

1.2.5 Western blot 检测 CDK6、C-Myc 和 Cyclin D1 的表达 用 RIPA 裂解液提取各组 A549 细胞总蛋白,并用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度,然后经 SDS-PAGE 分离蛋白后,用半干转膜仪转移蛋白质至 PVDF 膜,并用脱脂牛奶室温封闭蛋白 2 h,再加入一抗(CDK6:1∶1 000,C-Myc:1∶1 000,Cyclin D1:1∶200)在 4 ℃封闭过夜,接着加入对应二抗室温封闭 1 h,最后滴 ECL 曝光。

1.2.6 MTT 法检测细胞活性 根据 MTT 试剂盒说明进行操作,取对数期 Tca8113 细胞 100 μL 加入 96 孔板(1×10^4/孔),在 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养不同时间,加入 10 μL 溶液 A,再培养 4 h,小心吸弃培养基,加入溶液 B,于摇床上低速振荡 10 min,在 570 nm波长处测定吸光值。

1.2.7 克隆形成实验检测细胞生长 转染 24 h 后,将细胞接种于 96 孔板(2×10^3/孔),直到可见菌落(约 12 d)。用甲醇固定菌落,0.25% 结晶紫染色 30 min,肉眼计数菌落数量。

1.2.8 流式细胞术检测细胞周期分布 培养 48 h

后,用胰蛋白酶消化转染细胞,离心,用 PBS 悬浮,细胞悬液由 75% 乙醇在冰上固定 12 h。加入 100 μL PI 和 100 μL RNA 酶,在黑暗的房间里孵化 30 min 后,采用流式细胞仪 FACS 方法分析细胞周期进展。

1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡 培养 48 h 后,胰酶消化转染细胞,离心,按 1×10^6/mL 的浓度重悬。细胞悬液中加入 5 μL Annexin-V-FITC 和5 μL PI,在黑暗的房间里孵化 15 min,然后用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.2.10 Transwell 法检测细胞侵袭能力 培养 48 h 后,将细胞消化成单细胞悬液(5×10^4/mL)。在 Transwell 小室上室用 Matrigel 包被,下室加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养 1 mL。孵育 24 h 后,除去膜上层细胞,将通过膜侵袭的细胞固定染色,在显微镜下观察。侵入细胞数表示为每视野的平均细胞数。

1.2.11 划痕实验检测细胞迁移能力 将各组 Tca8113 细胞消化铺满单层后用小号枪头垂直划痕,加入无血清培养基,在 5% CO_2、37 ℃恒温的培养箱培养 24 h 后,分别在显微镜下拍照,用 Image J 软件分析。

1.2.12 移植瘤实验 将裸鼠随机分为 Tca8113 组和 miR-149-5p mimic 组,每组 10 只,雌雄各半。在各组裸鼠右后肢腹侧皮下分别注射 0.2 mL 的 1×10^7/mL Tca8113 细胞和转染 miR-149-5p mimic 的 Tca8113 细胞悬液。然后继续在 SPF 条件下正常饮食饲养,观察裸鼠皮下成瘤情况,测定移植瘤体积。第 30 天用颈椎脱位法处死裸鼠,完整取出皮下移植瘤,电子天平称重,Western blot 检测 CDK6、C-Myc、和 Cyclin D1 的表达。

1.2.13 免疫组化检测 Ki67 和 Vimentin 的表达

经常规 10% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,脱蜡水化,然后过氧化物酶阻断内源性过氧化物酶活性,非免疫性动物血清阻断非特异性反应。再分别加入鼠抗人 Ki67(1∶100)和 Vimentin 抗体(1∶100),4 ℃过夜,然后滴加生物素标记二抗,DAB 显色,蒸馏水冲洗,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,最后封片观察统计。免疫组化阳性细胞其细胞核有棕色颗粒沉着,显微镜下随机选取 5 个视野,每个视野阳性率 = 阳性细胞数/总细胞数 ×100%。

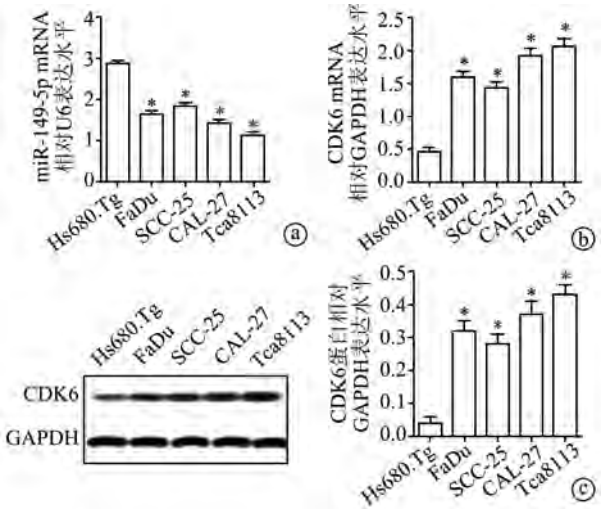
1.3 统计学分析

所有统计数据采用 SPSS 21.0 处理,图形使用 GraphPad Prism 6.0 构建。测量数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组比较使用 t 检验,多组比较使用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-149-5p 在 OSCC 细胞中表达下调,而 CDK6 表达上调

与 Hs680.Tg 细胞比较,miR-149-5p mRNA 在 4 个 OSCC 细胞系中的表达明显下调(图 1a);与 Hs680.Tg 细胞比较,CDK6 mRNA 和蛋白在 4 个 OSCC 细胞系中的表达均明显上调(图 1b、c),差异均有统计学意义($P<0.01$)。在 4 个 OSCC 细胞系中,细胞系 Tca8113 显著效果最明显,故选择细胞系 Tca8113 做后续实验。

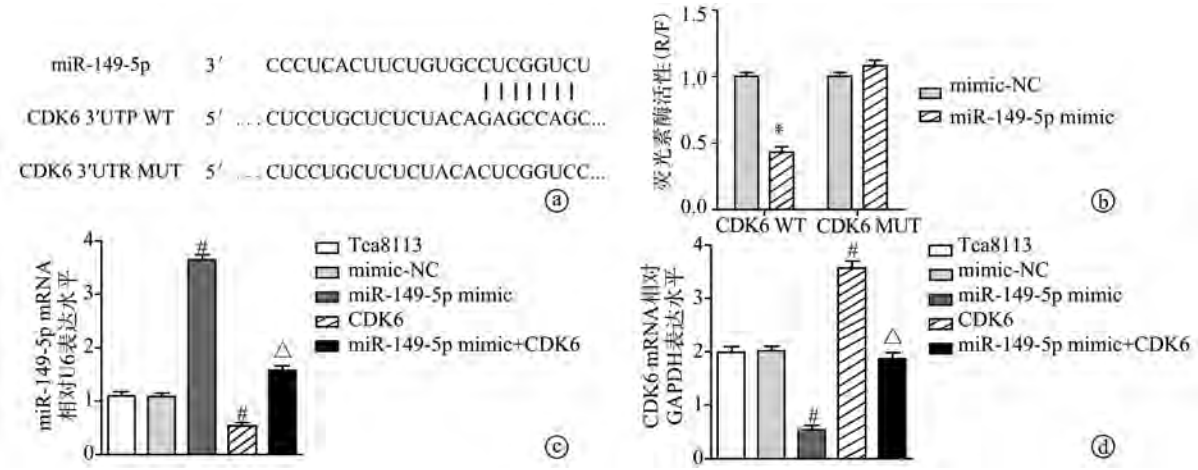


a:RT-PCR 检测 miR-149-5p mRNA 在正常口腔细胞和 OSCC 细胞中表达;b:RT-PCR 检测 CDK6 mRNA 在正常口腔细胞和 OSCC 细胞中表达;c:Western blot 检测 CDK6 蛋白在正常口腔细胞和 OSCC 细胞中表达 *:与 Hs680.Tg 比较,$P<0.01$

图 1 miR-149-5p 在 OSCC 细胞中表达下调而 CDK6 表达上调

2.2 miR-149-5p 直接靶向 CDK6

根据 TargetScan 数据库的预测,CDK6 3′UTR 区与 miR-149-5p 存在结合位点(图 2a)。为了进一步验证 miR-149-5p 直接作用于 CDK6,本研究进行了荧光素酶报告基因实验,miR-149-5p 高表达明显抑制了含有野生型 CDK6 质粒的荧光素酶活性,但对突变型 CDK6 质粒的荧光素酶活性无影响(图 2b)。与 Tca8113 组细胞比较,mimic-NC 组细胞中 miR-149-5p 和 CDK6 mRNA 的表达无明显变化,而 miR-149-5p mimic 组细胞中 miR-149-5p mRNA 表达明显上调、CDK6 mRNA 表达明显下调,CDK6 组细胞中 miR-149-5p mRNA 表达明显下调、CDK6 mRNA 表达明显上调;与 miR-149-5p mimic 组比较,miR-149-5p mimic + CDK6 组细胞中 miR-149-5p mRNA 表达明显下调、CDK6 mRNA 表达明显上调(图 2c、d),差异均有统计学意义($P<0.01$)。



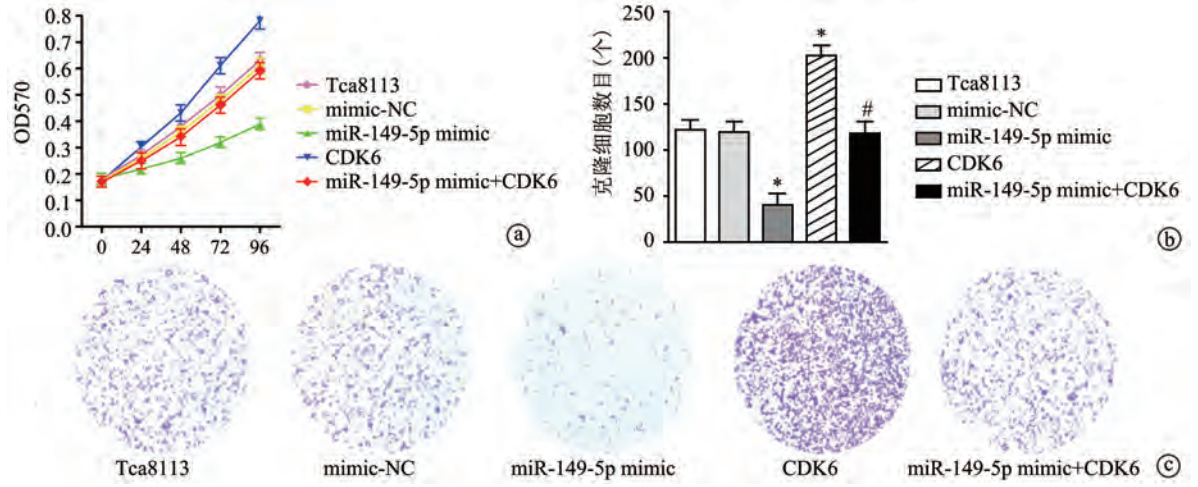
a:TargetScan 数据库预测 CDK6 3′UTR 区与 miR-149-5p 存在结合位点;b:双荧光素酶报告基因实验检测 miR-149-5p 与 CDK6 靶向关系;c:RT-PCR 检测 miR-149-5p mRNA 各组细胞中表达;d:RT-PCR 检测 CDK6 mRNA 各组细胞中表达 *:与 mimic-NC 组比较,$P<0.01$;#:与 Tca8113 组比较,$P<0.01$;△:与 miR-149-5p mimic 组比较,$P<0.01$

图 2 miR-149-5p 直接靶向 CDK6

2.3 miR-149-5p 靶向 CDK6 抑制 OSCC 细胞生长

MTT 结果显示,与 Tca8113 组细胞比较,mimic-NC 组细胞活性无明显变化,而 miR-149-5p mimic 组细胞活性明显降低,CDK6 组细胞活性明显增高;与 miR-149-5p mimic 组比较,miR-149-5p mimic + CDK6 组细胞活性明显增高(图 3a),差异有统计学意义($P<0.01$)。

克隆形成实验结果显示,与 Tca8113 组细胞比较,mimic-NC 组细胞克隆数目无明显变化,而 miR-149-5p mimic 组细胞克隆数目明显减少,CDK6 组细胞克隆数目增多;与 miR-149-5p mimic 组比较,miR-149-5p mimic + CDK6 组细胞克隆数目明显增多(图 3b、c)。



a:MTT 法检测各组细胞活性;b:克隆形成实验检测各组细胞生长情况;c:克隆(结晶紫染色,×100) *:与 Tca8113 组比较,$P<0.01$;#:与 miR-149-5p mimic 组比较,$P<0.01$

图 3 miR-149-5p 靶向 CDK6 对 OSCC 细胞活性及克隆的影响

流式细胞术结果显示,与 Tca8113 组细胞比较,mimic-NC 组细胞周期无明显变化,miR-149-5p mimic 组细胞 G0/G1 期细胞周期阻滞增强,CDK6 组细胞 G0/G1 期细胞周期阻滞减弱;与 miR-149-5p mimic 组比较,miR-149-5p mimic + CDK6 组细胞 G0/G1 期细胞周期阻滞减弱(图 4a),差异有统计学意义($P<0.01$)。

流式细胞术结果显示,与 Tca8113 组细胞比较,mimic-NC 组细胞凋亡率无明显变化,miR-149-5p mimic 组细胞凋亡率明显升高,CDK6 组细胞凋亡率明显降低;与 miR-149-5p mimic 组比较,miR-149-5p mimic + CDK6 组细胞凋亡率明显降低(图 4b),差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 miR-149-5p 靶向 CDK6 抑制 OSCC 细胞侵袭和迁移

Transwell 结果显示,与 Tca8113 组细胞比较,mimic-NC 组每视野侵袭数目无明显变化,miR-149-5p mimic 组每视野侵袭数目明显减少,CDK6 组每视野侵

袭数目增多;与 miR-149-5p mimic 组比较,miR-149-5p mimic + CDK6 组每视野侵袭数目明显增多(图 5a),差异有统计学意义($P<0.01$)。

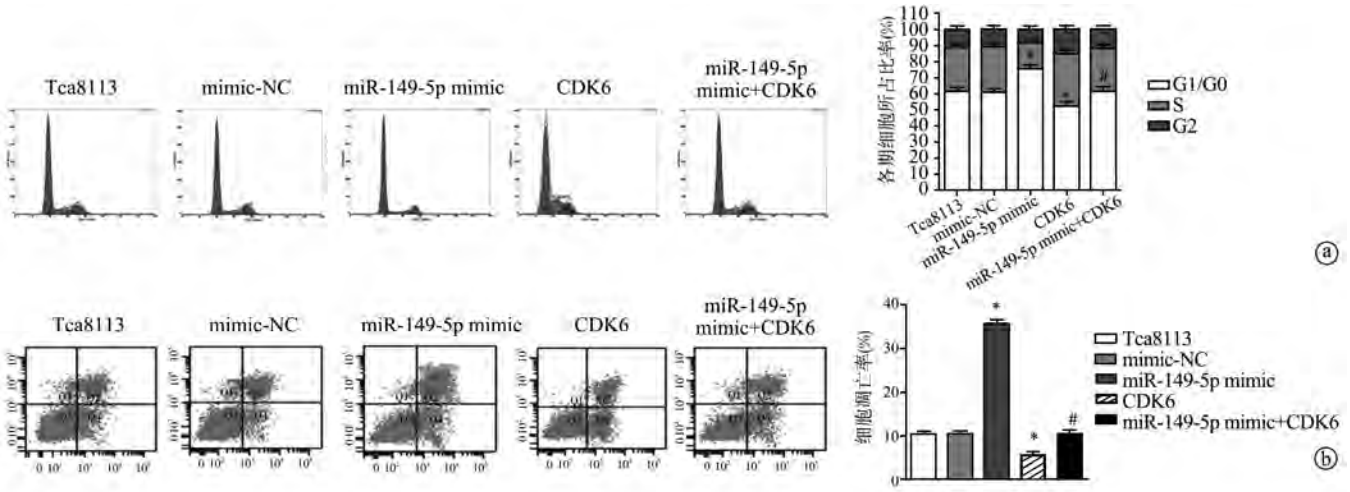
细胞划痕实验显示,与 Tca8113 组细胞比较,mimic-NC 组细胞伤口愈合率无明显变化,miR-149-5p mimic 组细胞伤口愈合率明显降低,CDK6 组细胞伤口愈合率明显增高;与 miR-149-5p mimic 组比较,miR-149-5p mimic + CDK6 组细胞伤口愈合率明显增高(图 5b),差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.5 miR-149-5p 靶向 CDK6 抑制 OSCC 细胞 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 表达

Western blot 结果显示,与 Tca8113 组细胞比较,mimic-NC 组细胞 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达无明显变化。miR-149-5p mimic 组细胞 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达明显下调,CDK6 组细胞 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达明显上调;与 miR-149-5p mimic 组比较,miR-149-5p mimic + CDK6 组细胞 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达明显上调(图 6),差异有统计学意义($P<0.01$)。

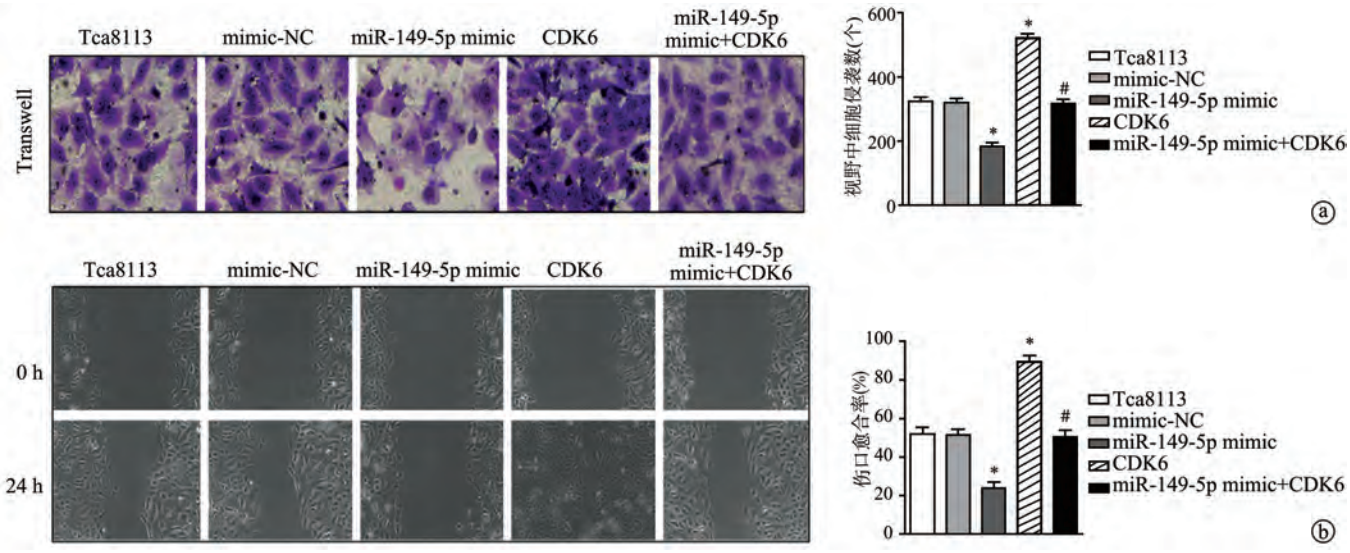
2.6 miR-149-5p 抑制 OSCC 移植瘤的发生和发展

OSCC 移植瘤实验显示,与 Tca8113 组比较,miR-149-5p mimic 组大鼠体内移植瘤的质量和体积明显减少(图 7a、b);与 Tca8113 组比较,miR-149-5p mimic 组大鼠体内移植瘤 Ki67 和 Vimentin 的阳性细胞比率明显减少(图 7c);与 Tca8113 组比较,miR-149-5p mimic 组大鼠体内移植瘤 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达明显下调(图 7d),差异有统计学意义($P<0.01$)。



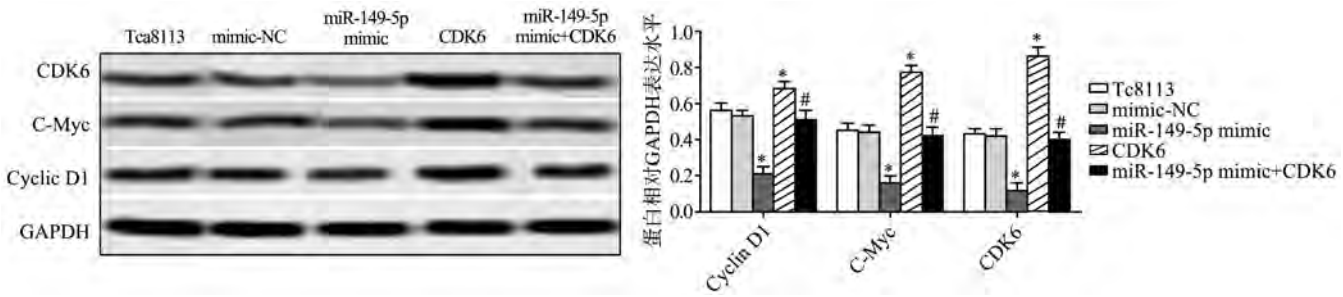
a:流式检测各组细胞周期;b:流式检测各组细胞凋亡 *:与 Tca8113 组比较,$P<0.01$;#:与 miR-149-5p mimic 组比较,$P<0.01$

图 4 miR-149-5p 靶向 CDK6 对 OSCC 细胞周期和凋亡的影响



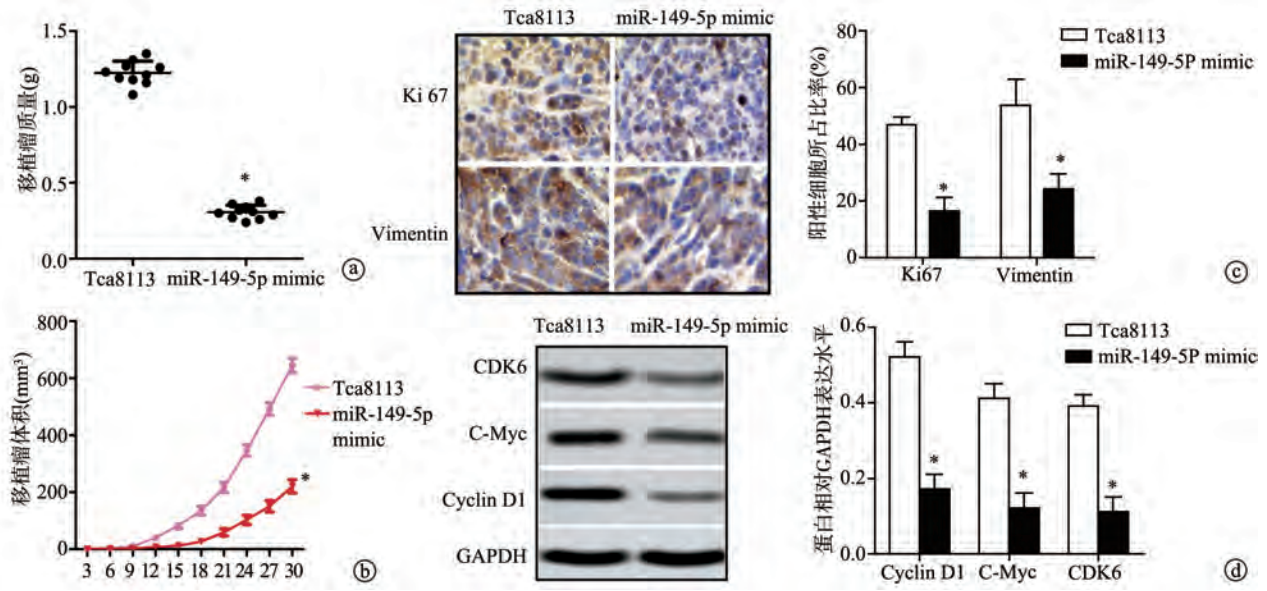
a:Transwell 法检测各组细胞侵袭能力(×400);b:划痕实验检测细胞迁移能力(×200) *:与 Tca8113 组比较,$P<0.01$;#:与 miR-149-5p mimic 组比较,$P<0.01$

图 5 miR-149-5p 靶向 CDK6 对 OSCC 细胞侵袭和迁移的影响



*:与 Tca8113 组比较,$P<0.01$; #:与 miR-149-5p mimic 组比较,$P<0.01$

图 6 Western blot 检测各组细胞 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达



a:移植瘤质量;b:移植瘤体积;c:免疫组化检测移植瘤中 Ki67 和 Vimentin 的表达(×400);d:Western blot 检测移植瘤 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达 *:与 Tca8113 组比较,$P<0.01$

图 7 miR-149-5p 对 OSCC 移植瘤的影响

3 讨论

OSCC 是一种高风险的癌症,通过局部复发和转移严重威胁患者的生命健康,且其发病率在逐年上升,因此,导致 OSCC 的潜在分子机制受到越来越多的关注[9-10]。大量异常表达的 miRNA 在 OSCC 中被发现。Guo 等[11]证明 miR-92a 通过靶向 FOXP1 表达调控 OSCC 细胞生长;Sun 等[12]发现 miR-143 通过靶向己糖激酶 2 抑制 OSCC 细胞生长、侵袭和葡萄糖代谢;Wang 等[13]报道 miR-195-5p 通过靶向 TRIM14 抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭。已有研究发现在肾细胞癌、黑色素瘤、肝癌等多种肿瘤细胞中,miR-149-5p 均呈低表达,推测其具有肿瘤抑制因子的作用[5-7]。本研究显示,miR-149-5p 在 OSCC 细胞中表达下调,这与裴浩等[14]的研究结果相一致。

miRNA 参与基因转录后水平的调控,成熟的 mRNA 通过特定序列与靶基因 mRNA 的 3′未翻译区域结合,导致靶基因的 mRNA 降解或者翻译受抑制,继而发挥相应的作用[15]。众所周知,一个 miRNA 能够调控多个靶基因,如 miR-149-5p 靶向 LRIG2 在黑色素瘤细胞存活和凋亡中起负调控作用;miR-149 还可通过靶向 FUT1 影响骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡和自噬[6,16-17]。为了更好地了解导致 miR-149-5p 在 OSCC 中作用的精确分子机制,本研究使用 TargetScan 检索了 miR-149-5p 的潜在靶基因,证实 CDK6 3′UTR 区与 miR-149-5p 存在结合位点,CDK6 最终被鉴定为 miR-149-5p 的直接靶标,且过表达 miR-149-5p 抑制 CDK6 表达;同时,CDK6 在 OSCC 细胞中表达上调,过表达 miR-149-5p 能够抑制这种上调。CDK6 是哺乳动物细胞关键的细胞周期调控因子,通过与细胞周期蛋白 D 结合促进肿瘤抑制因子 Rb 的磷酸化,在 Rb 磷酸化后,Cyclin E 激活 CDK2,使 Rb 进一步磷酸化,从而使细胞越过 G1 限制点[18]。因此,CDK6 在细胞周期从 G0 期进入 G1 期中起关键调控作用。CDK6 通过调控细胞周期影响细胞的增殖、凋亡、分化等生命活动,从而对肿瘤的发生起调控作用。已有研究表明,CDK6

在癌症的发生、发展中具有重要作用,并可将其作为潜在治疗靶点。有研究显示,以 CDK6 作为靶点可抑制多种肿瘤的发生,如 miR-29a 通过靶向 CDK6 抑制神经鞘瘤细胞的增殖和运动,miR-200a 通过靶向 CDK6 调控 CDK4/6 抑制剂在转移性黑色素瘤中的作用,miR-494 通过靶向 CDK6 抑制骨肉瘤细胞的增殖和运动[19-21]。本研究发现,miR-149-5p 过表达能够明显降低 Tca8113 细胞活性、克隆数目,并增强 G0/G1 期细胞周期阻滞,增加凋亡率,减少侵袭数目,降低伤口愈合率,下调 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达;而加入 CDK6 后能够反转这些现象,这说明 miR-149-5p 通过靶向 CDK6 来抑制 OSCC 细胞生长、侵袭和迁移,证实了 miR-149-5p 通过靶向 CDK6 抑制口腔鳞状细胞癌发生发展的假设。

综上所述,本研究发现 OSCC 细胞中 miR-149-5p 的表达下调,可能通过靶向 CDK6 抑制 OSCC 细胞活性、克隆、侵袭和迁移,促进 G0/G1 期细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡,并抑制 OSCC 细胞 C-Myc、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达。深入研究 miR-149-5p 和 CDK6 基因在人类口腔鳞状细胞癌的发生、发展中的作用及其调节机制,将为人类 OSCC 的特异性治疗提供新的思路和依据,为此,下一步我们将对 miR-149-5p 靶向 CDK6 抑制 OSCC 细胞相关信号通路进行研究。

[参考文献]

[1] He B,Lin X,Tian F,et al. miR-133a-3p inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) proliferation and invasion by suppressing col1a1 [J]. J Cell Biochem,2018,119(1):338 - 346. doi:10.1002/jcb.26182.

[2] He B, Chen F, Yan L, et al. Independent and joint exposure to passive smoking and cooking oil fumes on oral cancer in chinese women:a hospital-based case-control study[J]. Acta otolaryngol, 2016,136(10): 1074 - 1078. doi:10.1080/00016489.2016.1185539.

[3] Sinevici N, O'Sullivan J. Oral cancer: deregulated molecular events and their use as biomarkers [J]. Oral Oncol,2016,61(1):12 - 18. doi: 10.1016/j.oraloncology.2016.07.013.

[4] Mucke T, Mitchell DA, Ritschl LM, et al. Influence of tumor volume on survival in patients with oral squamous cell carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol,2015,141(6):1007 - 1011. doi:10.1007/s00432 - 014 - 1881 - 2.

[5] Jin L, Li Y, Liu J, et al. Tumor suppressor miR-149-5p is associated with cellular migration, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma [J]. Mol Med Rep,2016,13(6):5386 - 5392. doi: 10.3892/mmr.2016.5205.

[6] Chen W, Zhang J, Xu H, et al. The negative regulation of miR-149-5p in melanoma cell survival and apoptosis by targeting lrig2 [J]. Am J Transl Res,2017,9(9):4331. doi:10.1028/PMC562227.

[7] 耿亚军, 李树栋, 刘申政, 等. microRNA-149-5p 过表达对肝癌细胞 HepG2 和 Bel-7402 增殖及迁移的抑制作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(6):1126 - 1130. doi:10.3969/j.issn.1001 - 5256.2017.06.022.

[8] Andisheh-Tadbir A, Ashraf MJ, Jeiroodi N. Expression of CDK6 in oral squamous cell carcinomas[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2018,19(4): 1013 - 1016. doi:10.22034/APJCP.2018.19.4.1013.

[9] Chen D, Yan W, Liu Z, et al. Downregulation of miR-221 enhances the sensitivity of human oral squamous cell carcinoma cells to adriamycin through upregulation of timp3 expression [J]. Biomed Pharmacother, 2016,77(2):72 - 78. doi:10.1016/j.biopha.2015.12.002.

[10] Zeng Q, Tao X, Huang F, et al. Overexpression of miR-155 promotes the proliferation and invasion of oral squamous carcinoma cells by regulating Bcl6/cyclin D2 [J]. Int J Mol Med,2016,37(5):1274 - 1280. doi: 10.3892/ijmm.2016.2529.

[11] Guo J, Wen N, Yang S, et al. miR-92a regulates oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth by targeting FOXP1 expression [J]. Biomed Pharmacother,2018,104(2):77 - 86. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.025.

[12] Sun X, Zhang L. microRNA-143 suppresses oral squamous cell carcinoma cell growth, invasion and glucose metabolism through targeting hexokinase 2 [J]. Biosci Rep, 2017, 37(3): 4. doi: 10.1042/BSR20160404.

[13] Wang T, Ren Y, Liu R, et al. miR-195-5p suppresses the proliferation, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting TRIM14[J]. Bio Med Res Int,2017,2017(10):1 - 13. doi: 10.1155/2017/7378148.

[14] 裴 浩. miR-149 在口腔鳞癌细胞株 KB 中的表达及其对 MMP-9 的靶向调节作用[J]. 口腔颌面外科杂志, 2015, 25(5):321. doi: 10.3969/j.issn.1005 - 4979.2015.05.002.

[15] Shi Y, Huang X, Chen G, et al. miR-632 promotes gastric cancer progression by accelerating angiogenesis in a TFF1-dependent manner [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):14. doi:10.1186/s12885 - 018 - 5247 - z.

[16] Xu RD, Feng F, Yu XS, et al. miR-149-5p inhibits cell growth by regulating TWEAK/FN14/PI3K/AKT pathway and predicts favorable survival in human osteosarcoma[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018,32(12):1 - 12. doi:10.1177/2058738418786656.

[17] Wang Z, Hu J, Pan Y, et al. miR-140-5p/miR-149 affects chondrocyte proliferation, apoptosis, and autophagy by targeting FUT1 in osteoarthritis [J]. Inflammation,2018,41(3):1 - 13.

[18] Sridhar J, Akula N, Pattabiraman N. Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors [J]. Aaps,2006,8(1):204 - 221. doi: 10.1208/aapsj080125.

[19] Ma J, Li T, Yuan H, et al. microRNA-29a inhibits proliferation and motility of schwannoma cells by targeting CDK6 [J]. J Cell Biochem, 2018,119(3):2617 - 2626. doi:10.1016/j.jid.2017.03.039.

[20] Bustos MA, Ono S, Marzese DM, et al. miR-200a regulates CDK4/6 inhibitor effect by targeting CDK6 in metastatic melanoma [J]. J Invest Dermatol,2017,137(9):1955 - 1964.

[21] Yuan W,Wang D,Liu Y,et al. miR-494 inhibits cell proliferation and metastasis via targeting of CDK6 in osteosarcoma[J]. Mol Med Rep, 2017,16(6):8627 - 8634. doi:10.3892/mmr.2017.7709.

(编辑:陈庆利)