

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.19.015

miR-382-5p 在口腔鳞状细胞癌中的表达及其对细胞侵袭迁移的影响和作用机制研究

宋佳凝,冯国维[△]

陕西省西安市儿童医院口腔科,陕西西安 710003

摘要:目的 研究微小 RNA-382-5p(miR-382-5p)在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中的表达水平及对肿瘤细胞侵袭迁移的影响和作用机制。方法 收集 2015 年 3 月至 2021 年 3 月西安市儿童医院收治的 12 例 OSCC 患儿癌组织和癌旁正常组织,采用实时荧光定量 RCR 法检测 miR-382-5p 和张力蛋白同源基因(PTEN)表达水平。行 CAL-27 细胞培养,转染后行 Transwell 试验,以及细胞迁移侵袭试验;采用双荧光素酶试验验证结果。结果 miR-382-5p 抑制物组和 si-NC 组迁移细胞数分别为(178.25±30.29)个和(142.46±26.83)个,两组侵袭细胞数分别为(253.32±62.08)个和(202.41±54.54)个,两组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。miR-382-5p 和 PTEN 在癌组织中的相对表达水平分别为 0.87 ± 0.31 和 0.72 ± 0.26 ,癌旁组织中相对表达水平分别为 0.62 ± 0.19 和 0.51 ± 0.20 ,癌组织和癌旁组织 miR-382-5p 和 PTEN 相对表达水平比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。PTEN-WT+miR-NC 组和 PTEN-WT+miR-382-5p 组荧光活性变化倍数比较,差异有统计学意义($P<0.05$),PTEN-MUT-miR-NC 组和 PTEN-MUT-miR-382-5p 组荧光活性变化倍数比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。miR-382-5p 抑制物+si-NC 组和 miR-382-5p 抑制物+si-PTEN 组细胞迁移数分别为(170.45±35.56)个和(274.10±81.36)个,细胞侵袭数分别为(138.96±32.25)个和(180.04±25.63)个,两组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 miR-382-5p 在 OSCC 癌组织中呈高表达,miR-382-5p 可通过调控 PTEN 水平,影响肿瘤细胞侵袭迁移。

关键词:微小 RNA-382-5p; 口腔鳞状细胞癌; 张力蛋白同源基因; 肿瘤细胞

中图分类号:R739.8

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)19-2647-04

Expression of miR-382-5p in oral squamous cell carcinoma and its effect on cell invasion and migration and its mechanism

SONG Jianing, FENG Guowei[△]

Department of Stomatology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710003, China

Abstract: Objective To study the expression level of microRNA-382-5p (miR-382-5p) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) children, as well as its effect on tumor cell invasion, migration and its mechanism. **Methods** Cancer tissues and adjacent normal tissues of 12 children with OSCC treated in Xi'an Children's Hospital from March 2015 to March 2021 were collected, the expression levels of miR-382-5p and phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) were detected by real-time fluorescence quantitative RCR. The CAL-27 cells were cultured, Transwell experiment and cell migration and invasion experiment were carried out after transfection, and the results were verified by double luciferase experiment. **Results** The number of migrating cells in miR-382-5p inhibitor group and si-NC group were 178.25 ± 30.29 and 142.46 ± 26.83 , respectively, the number of invasive cells in the two groups were 253.32 ± 62.08 and 202.41 ± 54.54 , respectively, there were significant differences between the two groups ($P<0.05$). The relative expression levels of miR-382-5p and PTEN in cancer tissues were 0.87 ± 0.31 and 0.72 ± 0.26 , respectively, which of adjacent tissues were 0.62 ± 0.19 and 0.51 ± 0.20 , respectively. There were significant differences in the relative expression levels of miR-382-5p and PTEN between cancer tissues and adjacent tissues ($P<0.05$). There was significant difference between PTEN-WT + miR-NC group and PTEN-WT + miR-382-5p group of fluorescence activity change multiple ($P<0.05$), but there was no significant difference between PTEN-MUT-miR-NC group and PTEN-MUT-miR-382-5p group ($P>0.05$). The number of cell migration in miR-382-5p inhibitor + si-NC group and miR-382-5p inhibitor + si-PTEN group were 170.45 ± 35.56 and 274.10 ± 81.36 , respectively, the number of cell invasion were 138.96 ± 32.25 and 180.04 ± 25.63 , respectively, there were sig-

nificant difference between the two groups ($P<0.05$). **Conclusion** The miR-382-5p is highly expressed in OSCC cancer, and miR-382-5p can affect the invasion and metastasis of tumor cells by regulating the level of PTEN.

Key words: microRNA-382-5p; oral squamous cell carcinoma; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; tumor cells

口腔鳞状细胞癌(OSCC)是口腔癌常见病理分型,起源于口腔黏膜基底细胞层。流行病学调查显示,国内 OSCC 的发病有年轻化趋势,国内每年约有 4.56 万 OSCC 新发病例,5 年生存率仅 30.0%^[1]。既往多关注成人 OSCC,而有关 OSCC 在儿童中的报道较少。肿瘤细胞侵袭迁移是 OSCC 不良预后的高危因素^[2]。既往研究证实,微小 RNA(miRNA)作为内源性非编码蛋白质的小分子 RNA,参与癌基因的激活或沉默表达,进而调控肿瘤细胞侵袭迁移^[3]。报道显示,miR-382-5p 在乳腺癌、胃癌等多种恶性肿瘤中异常表达^[4-5],推测 miR-382-5p 可能参与 OSCC 肿瘤细胞侵袭。抑癌基因张力蛋白同源基因(PTEN)具有蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶双重磷酸酶活性,CHEN 等^[6]提出 miR-382-5p 与 PTEN 存在靶向作用关系,推测这可能是 miR-382-5p 调控 OSCC 肿瘤细胞侵袭转移的机制之一。为验证上述结果,本研究收集本院 12 例 OSCC 患儿临床资料,并开展基础试验研究。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 3 月至 2021 年 3 月本院收治的 12 例 OSCC 患儿作为研究对象,取癌组织和癌旁组织作为检测标本。纳入标准:(1)患儿均经病理活检确诊为 OSCC^[7];(2)临床病例资料完整。排除标准:(1)合并有其他恶性肿瘤者;(2)既往接受放疗或其他抗肿瘤治疗者;(3)合并有严重心肺基础疾病或肝肾功能不全者。12 例患儿中男 7 例,女 5 例;年龄(9.42±3.36)岁;体质量指数(16.73±2.26) kg/m²;肿瘤部位:舌 4 例,口底 3 例,软腭 2 例,硬腭 2 例,唇 1 例;肿瘤分期:I 期 7 例,II 期 3 例,III 期 2 例;分化程度:低分化 6 例,中分化 5 例,高分化 1 例。

1.2 试剂 OSCC 细胞 CAL-27 由中国医学科学院肿瘤医院研究所提供,DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)及胰酶-EDTA 购自 Gibco 公司,D-hanks 液购自南京森贝伽生物科技有限公司。转染试剂盒购自上海宾智生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养和转染 采用含 10% FBS 的 DMEM 在 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中对 CAL-27 细胞进行培养,取对数生长期细胞,弃培养基后采用 D-hanks 液洗涤细胞 3 次,用 0.25%胰酶-EDTA 消化液消化细胞,在培养皿中进行传代培养。以对数生长期细胞为转染对象,种植于培养板中,培养 24 h 后,

在细胞融合度≥50%时进行转染,以 Lipofectamine RNAi Max 转染 miR-NC 和 miR-382-5p 抑制物至 CAL-27 细胞,转染方法参照转染试剂盒进行。根据转染内容不同分为 si-NC 组(以 Lipofectamine RNAi Max 转染 miR-NC)和 miR-382-5p 抑制物组(以 Lipofectamine RNAi Max 转染 miR-382-5p 抑制物)。

1.3.2 细胞迁移和侵袭试验 细胞迁移试验:取对数生长期细胞,采用无血清培养基对细胞进行培养,12 h 后用胰酶-EDTA 消化细胞,制备成 10⁶ 个/毫升浓度的细胞基液;分别在 Transwell 上室和下室加入 100 μL 细胞悬液和 500 μL 含 10% FBS 的 DMEM,在 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中培养 10 h;取出小室,擦净后用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗;采用 4%多聚甲醛固定细胞,0.1%结晶紫染色;随机取 4~6 个视野,计算视野内穿过滤膜细胞数;以平均细胞数为迁移细胞数。细胞侵袭试验:取 0.5 g/L Matrigel 人工基质胶 20 μL,置于 Transwell 上室,在 37℃条件下孵育 4.0 h,Matrigel 凝固后去残留液体,参照迁移试验方法制备细胞悬液,进行细胞染色,根据干预方法不同将试验细胞分为 miR-382-5p 抑制物+si-NC 组(转染 miR-382-5p 抑制物阴性序列对照)和 miR-382-5p 抑制物+si-PTEN 组(转染 miR-382-5p 抑制物+PTEN 小干扰 RNA),记录两组细胞侵袭迁移数。

1.3.3 qPCR 检测 癌组织和癌旁组织解冻后送检,采用 Trizol 法提取总 RNA,以 RNA 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,完成后进行 qPCR 反应,引物设计见表 1,反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,64℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参,以 2^{-ΔΔCt} 计算 miR-382-5p 和 PTEN 相对表达量。

表 1 qPCR 引物序列

RNAs	引物序列
miR-382-5p	上游 5'-GCG AAG TTG TTC GTG GTG G-3'
	下游 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'
PTEN	上游 5'-AAG ACA AAG CCA ACC GAT AC-3'
	下游 5'-CGA AGG TTT CAG ACT TTG TAA TGC-3'
GAPDH	上游 5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3'
	下游 5'-AAG TGG TGG TTG AGG GCA ATG-3'

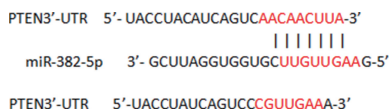
1.3.4 双荧光素酶酶试验 采用 Targetscan(<http://www.targetscan.org>)对 miR-382-5p 进行靶基因预测,PTEN mRNA 的野生型 3'-UTR 和突变型 3'-UTR 连接 psi-CHECK-2 载体,分别为 PTEN-WT 和 PTEN-MUT(CAL-27 细胞共转染 miR-NC 或 miR-382-5p 抑制物 200 nmol/L),根据共转染对象不同分别记为 PTEN-WT+miR-NC 组、PTEN-WT+miR-382-5p 组、PTEN-MUT-miR-NC 组及 PTEN-MUT-miR-382-5p 组。培养 48 h 后收集细胞裂解,采用 Dual-Luciferase® Report Assay System 双荧光报告酶检测系统进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件包对数据进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组细胞侵袭迁移试验结果 miR-382-5p 抑制物组和 si-NC 组迁移细胞数分别为(178.25±30.29)个和(142.46±26.83)个,两组侵袭细胞数分别为(253.32±62.08)个和(202.41±54.54)个,两组间比较,差异均有统计学意义($t = 3.064, 2.134; P = 0.006, 0.044$)。

2.2 miR-382-5p 靶基因 通过软件预测显示,PTEN 可能是 miR-382-5p 潜在靶基因,见图 1。miR-382-5p 和 PTEN 在癌组织中的相对表达水平分别为 0.87 ± 0.31 和 0.72 ± 0.26 ,癌旁组织相对表达水平分别为 0.62 ± 0.19 和 0.51 ± 0.20 。癌组织和癌旁组织 miR-382-5p 和 PTEN 相对表达水平比较,差异均有统计学意义($t = 2.382, 2.218; P = 0.026, 0.037$)。双荧光素酶试验检测结果显示,PTEN-WT+miR-NC 组和 PTEN-WT+miR-382-5p 组荧光活性变化倍数分别为 0.87 ± 0.12 和 0.33 ± 0.09 ,两组间比较,差异有统计学意义($t = 12.471, P < 0.05$),PTEN-MUT-miR-NC 组和 PTEN-MUT-miR-382-5p 组荧光活性变化倍数分别为 0.79 ± 0.22 和 0.77 ± 0.18 ,两组间比较,差异无统计学意义($t = 0.244, P = 0.810$)。



注:Targetscan 数据库预测显示,PTEN 3'-UTR 存在 miR-382-5p 结合位点。

图 1 Targetscan 数据库预测结果

2.3 抑制 PTEN 表达逆转 miR-382-5p 对 CAL-27 细胞迁移侵袭的影响 miR-382-5p 抑制物+si-NC 组和 miR-382-5p 抑制物+si-PTEN 组细胞迁移数分别为(170.45±35.56)个和(274.10±81.36)个,细胞侵袭数分别为(138.96±32.25)个和(180.04±25.63)个,两组间比较,差异均有统计学意义($t =$

4.044,3.455; $P = 0.001, 0.002$)。

3 讨 论

肿瘤细胞侵袭迁移是 OSCC 生长转移的重要病理基础,而肿瘤细胞与肿瘤局部微环境的相互作用与 OSCC 发生发展密切相关,二者共同作为靶点^[8],这将是优化 OSCC 治疗方案的重要方向。肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)是肿瘤微环境主要的间质细胞,来源于骨髓间充质干细胞,基础研究证实 CAFs 可通过分泌趋化因子、生长因子及细胞外基质,进而加快肿瘤血管内皮细胞增殖,促进肿瘤血管生成^[9]。曹娟等^[10]还发现 CAFs 可通过外泌体调控 OSCC 细胞生物学行为。因而,本研究选取 CAF-27 作为 OSCC 细胞进行试验。

miRNA 作为非编码单链 RNA 分子,通过与靶 mRNA 3'-UTR 区特异性位点结合,降解 mRNA,从而调控靶基因,发挥生物学功能,参与肿瘤癌变^[11]。miR-382-5p 已被证实存在多种恶性肿瘤中存在异常表达,赵树鹏等^[12]发现 miR-382-5p 可通过介导 PTEN 表达,抑制胶质瘤细胞增殖侵袭,而刘冬冬等^[13]则发现 miR-382-5p 可通过抑制 PTEN 阻断白血病 NB4 细胞分化。PTEN 编码蛋白由 N 端磷酸酶催化域和 C 端结构域 2 个结构域构成,定位于 10q23.3 染色体,是机体重要抑癌基因,PTEN 活性作用可通过磷酸化、泛素化、乙酰化等多种途径参与下游基因的调节,发挥生物学效应^[14]。PORS 等^[15]也认为 PTEN 可经细胞核参与细胞染色体 DNA 的修复,并通过 PIK/AKT 信号通路,调控肿瘤细胞迁移侵袭。另外,PTEN 通过小泛素样修饰蛋白分子翻译后途径参与肿瘤生物学行为^[16]。但 PTEN 是否参与 CAF-27 细胞分裂增殖,临床尚未形成定论。

本研究行细胞侵袭迁移试验,结果显示,miR-382-5p 可促进 OSCC 细胞侵袭,而双荧光素酶试验检测进一步说明 PTEN 为 miR-382-5p 的靶基因,提示 miR-382-5p 可与 PTEN 的 3'-UTR 区位点结合,进而调控 OSCC 生长。另外,本研究行细胞转染和 Transwell 试验检测,结果显示,miR-382-5p 抑制物+si-PTEN 组细胞侵袭迁移数显著增加,这提示抑制 PTEN 表达可逆转 miR-382-5p 抑制物对 CAL-27 细胞侵袭迁移的抑制作用。此外,本研究收集 OSCC 患儿癌组织和癌旁组织,采用 qPCR 法进一步证实 miR-382-5p 和 PTEN 在癌组织和癌旁组织中的相对表达水平不同,结果也说明 miR-382-5p 可能通过调控 PTEN 参与 OSCC 病理进程。

综上所述,miR-382-5p 在 OSCC 患儿中呈高表达,可能通过调控 PTEN 参与 CAL-27 细胞的侵袭迁移。

参考文献

[1] MUKDAD L, HEINEMAN T, ALONSO J, 等. 口腔舌鳞

状细胞癌生存率的年龄和性别分层:监测、流行病学和最终结果分析[J]. 中国口腔颌面外科杂志,2019,17(1):47-48.

[2] 贺智凤,蒲玉梅,胡勤刚. 口腔鳞状细胞癌切缘状态评估及其影响因素分析[J]. 中华口腔医学杂志,2017,52(7):445-449.

[3] YUN W,ZHANG X,ZHI W,et al. LncRNA-p23154 promotes the invasion-metastasis potential of oral squamous cell carcinoma by regulating Glut1-mediated glycolysis [J]. Cancer Lett,2018,10(10):172-183.

[4] WANG J,LUO J,LIU G,et al. Circular RNA hsa_circ_0008285 inhibits colorectal cancer cell proliferation and migration via the miR-382-5p/PTEN axis [J]. Biochem Biophys Res Commun,2020,527(2):503-510.

[5] 韩听锋,李春燕,侯青霞,等. 微小 RNA-382-5p 靶向作用核因子蛋白 90 对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 医学研究杂志,2018,47(9):139-143.

[6] CHEN X,JIANG C,SUN R,et al. Circular noncoding RNA NR3C1 acts as a miR-382-5p sponge to protect RPE functions via regulating PTEN/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Mol Ther,2020,28(3):929-945.

[7] 尚伟,郑家伟. 2019 年 NCCN 口腔咽喉癌诊疗指南更新解读[J]. 中国口腔颌面外科杂志,2019,17(6):481-485.

[8] 李兵,傅尧,符义富,等. 口腔鳞状细胞癌患者血清中 CCL2 和 VEGF 表达的初步研究[J]. 现代检验医学杂志,2017,32(4):64-66.

[9] 张雯雯,刘可可,刘璐瑶,等. 肿瘤相关成纤维细胞在口腔鳞状细胞癌中的作用及其靶向治疗的研究进展[J]. 中国

医药导报,2019,16(14):29-32.

[10] 曹娟,刘可可,刘璐瑶,等. 口腔鳞状细胞癌肿瘤微环境细胞间相互作用的研究进展[J]. 中国医药导报,2019,16(20):45-48.

[11] 汤伟伟,祝常青,何永文. microRNA 与口腔鳞状细胞癌的研究新进展[J]. 临床与病理杂志,2018,38(1):156-161.

[12] 赵树鹏,姬颖华,关庆凯,等. miR-382-5p 过表达介导 PTEN 的表达下调对人脑胶质瘤 U251 细胞恶性生物学行为的影响[J]. 四川大学学报(医学版),2020,51(5):630-635.

[13] 刘冬冬,刘北忠,袁桢,等. miR-382-5p 通过靶基因 PTEN 阻滞 NB4 细胞分化[J]. 中国细胞生物学学报,2019,41(1):63-71.

[14] 董爱芬,李旭升. PTEN、MMP-7、血清 HGF、uPA 在口腔鳞状细胞癌中的诊断价值及其与组织分化和淋巴结转移的关系[J]. 中国实验诊断学,2018,22(7):1130-1133.

[15] PORS J,TESSIER-CLOUTIER B,THOMPSON E,et al. Targeted molecular sequencing of recurrent and multifocal non-HPV-associated squamous cell carcinoma of the vulva[J]. Int J Gynecol Pathol,2020,40(4):391-399.

[16] LI J Y,HUANG W X,ZHOU X,等. Numb 通过舌癌中的 RBP-Jκ 依赖性 Notch1/PTEN/FAK 信号传导途径抑制上皮-间质转化[J]. 中国口腔颌面外科杂志,2019,17(4):315-316.

(收稿日期:2021-12-16 修回日期:2022-04-08)

(上接第 2646 页)

[10] CAO L,HU T,LU H,et al. N-MYC downstream regulated gene 4 (NDRG4), a frequent downregulated gene through dna hypermethylation, plays a tumor suppressive role in esophageal adenocarcinoma[J]. Cancers (Basel), 2020,12(9):2573.

[11] CHU D,ZHANG Z,ZHOU Y,et al. NDRG4, a novel candidate tumor suppressor, is a predictor of overall survival of colorectal cancer patients[J]. Oncotarget,2015,6(10):7584-7596.

[12] KOTIPATRUNI R P,REN X,THOTAL A D,et al. NDRG4 is a novel oncogenic protein and p53 associated regulator of apoptosis in malignant meningioma cells[J]. Oncotarget,2015,6(19):17594-17604.

[13] 曹雪娇,董丽娜,谭文华,等. NDRG4 在卵巢癌中的表达[J]. 哈尔滨医科大学学报,2017,51(5):434-437.

[14] 马欢,田小飞,李红霞. 复发性卵巢癌患者血清 NDRG4 水平表达与临床特征及预后的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志,2019,34(5):81-83.

[15] 李委佳,贾朝阳,冯书君,等. NDRG4 通过 Wnt/β-catenin

信号转导通路抑制卵巢癌细胞的迁移和侵袭能力[J]. 实用肿瘤杂志,2019,34(6):497-502.

[16] 刘巍,贾朝阳,潘文婧,等. 下调 NDRG4 表达对卵巢癌细胞增殖、凋亡的影响及机制[J]. 山东医药,2019,59(17):5-8.

[17] HAN S,LI Y,ZHANG J,et al. Roles of immune inhibitory molecule B7-H4 in cervical cancer [J]. Oncol Rep, 2017,37(4):2308-2316.

[18] YUAN L,DONG L,YU G,et al. Aberrant expression of B7-H4 may contribute to the development of hepatocellular carcinoma[J]. Mol Med Rep,2016,14(6):5015-5024.

[19] XU C H,WANG W,WANG Y C,et al. Diagnosis value of serum soluble B7-H4 expression in non-small cell lung cancer[J]. Clin Respir J,2018,12(1):134-139.

[20] 于文亮. 卵巢癌患者血清中 ROBO4、sB7-H4 含量与肿瘤病理特征的相关性研究[J]. 海南医学院学报,2019,25(11):877-880.

(收稿日期:2021-12-16 修回日期:2022-04-08)