

## • 口腔肿瘤研究 •

## miR-146a 在口腔鳞癌组织及细胞中的表达及功能研究

王丽萍 郭雪琪 闫勇勇 查骏 陈伟鸿 魏永祥 朱昕欣 管红兵 葛林虎\*

(广州医科大学附属口腔医院, 广州口腔疾病研究所, 口腔医学重点实验室 广东 广州 510140)

**[摘要]** 目的:探究 miR-146a 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)组织及细胞中的表达及其对口腔鳞癌细胞生物学行为能力的影响。方法:采用荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 OSCC 组织及细胞中 miR-146a 的表达,观察 miR-146a 对 OSCC 细胞增殖、侵袭、迁移等能力的影响。结果:与癌旁组织相比 OSCC 组织中 miR-146a 呈明显高表达( $P < 0.05$ );与正常口腔上皮细胞 HOK 相比,OSCC 细胞系 Scc9、Scc25、Cal27 中 miR-146a 表达水平明显偏高( $P < 0.05$ )。上调 miR-146a 表达后,Scc9 及 Cal27 的细胞增殖能力明显增加( $P < 0.05$ ),Scc9、Scc25、Cal27 的侵袭和迁移能力明显增加( $P < 0.05$ );抑制 miR-146a 表达后,Scc9、Scc25、Cal27 的侵袭和迁移能力明显降低( $P < 0.05$ )。结论:miR-146a 在 OSCC 和口腔癌细胞中呈明显高表达,对于促进口腔癌的增殖、侵袭和迁移具有重要意义。

**[关键词]** miR-146a 口腔鳞状细胞癌 miRNA

**[中图分类号]** R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2017)11-1204-05

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.11.018

**Effect and Function Role of miR-146a in Oral Squamous Cell Carcinoma Tissues and Cell Lines.** WANG Li-ping, GUO Xue-qi, YAN Yong-yong, ZHA Jun, CHEN Wei-hong, WEI Yong-xiang, ZHU Xin-xin, GUAN Hong-bing, GE Lin-hu\*. Key Laboratory of Oral Medicine, Guangzhou Institute of Oral Disease, Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, China.

**[Abstract]** **Objective:** To explore the expression and its functional role of miR-146a in oral squamous cell carcinoma (OSCC) tissues. **Methods:** RT-PCR was performed to detect the expression level of miR-146a in OSCC tissues and OSCC cell lines. CCK8 assay, transwell assay and wound healing assay were performed to observe cell proliferation, invasion and migration abilities. **Results:** The expression of miR-146a was significantly higher in OSCC tissues compared to the adjacent tissues ( $P < 0.05$ ), and the expression of miR-146a in OSCC cell lines such as Scc9, Scc25, and Cal27 were substantially higher than the normal oral epithelial cells (HOK) ( $P < 0.05$ ). The proliferation, invasion and migration abilities were substantially enhanced in Scc9 and Cal27 cells transfected with miR-146a mimics ( $P < 0.05$ ). The invasion and migration abilities were substantially decreased in Scc9, Scc25, and Cal27 cells transfected with miR-146a inhibitor ( $P < 0.05$ ), but the proliferation abilities showed no statistically differences in Scc9, Scc25, and Cal27 cells transfected with miR-146a inhibitor. **Conclusion:** miR-146a shows a significant expression in OSCC tissues and cell lines, is correlated with proliferation, invasion and migration of OSCC.

**[Key words]** miR-146a OSCC miRNA

口腔癌是最常见的头颈部恶性肿瘤,以鳞状细胞癌为主,每年约有 50 万新增病例,患者可合并有不同程度的局部复发及远处转移表现,一般预后较

差<sup>[1]</sup>。MicroRNAs(miRNAs)是一类只有 20~24 个核苷酸的单链非编码 RNAs,在肿瘤细胞的增殖、侵袭、远处转移、肿瘤血管生成以及免疫逃避等生物学行为中发挥着重要作用<sup>[2,3]</sup>。研究表明,口腔癌中存在多种 miRNA 表达异常,如 miR-196 呈明显高表达,具有一定的促癌活性<sup>[4]</sup>。miR-146a 在不同物种间的序列高度保守性,在生物体的生理、病理过程中发挥重要的作用<sup>[5]</sup>。有关口腔癌组织标本的基因芯片分析结果显示,有淋巴结转移组口腔癌

**基金项目** 广东省科学技术厅基金项目(编号:2014807-49)

广州市荔湾区科技信息化局基金项目(编号:20141216070)

**作者简介** 王丽萍(1969~),女,浙江人,学士,主任医师,主要从事口腔种植的临床治疗工作及研究。

\* 通讯作者 葛林虎, E-mail:

患者的 miR-146a 表达水平明显高于无淋巴结转移组,提示 miR-146a 在口腔癌的发生发展中具有一定的作用<sup>[6]</sup>。为进一步明确 miR-146a 在口腔癌中的表达和功能,本研究构建体外研究模型,探讨 miR-146a 在口腔癌细胞中的生物学作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验试剂 miR-146a-5p mimics、miR-146a-5p control、miR-146a-5p inhibitor、miR-146a-5p neqative ncontrol(Thermo Fisher Scientific),DMEM-F12 培养基、RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(GIBCO 公司),TRIZOL(In-vitrogen 公司),SYBR Premix Ex Taq(TAKARA 公司),Matrigel(BD 公司),siRNA Transfection Reagent(Signa 公司),CCK8 试剂盒(同仁)。

1.1.2 细胞株 人正常口腔角质上皮细胞系 HOK 细胞、人舌鳞癌细胞系 Scc25 细胞、Cal27 细胞及 Scc9 细胞均购于 ATCC 官网。

1.1.3 口腔癌组织及正常组织 口腔癌及癌旁组织来源于广州医科大学附属口腔医院,取得患者同意并签署书面知情同意书,经病理检查确诊为口腔鳞癌,术前均未经化疗、放疗及免疫治疗。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HOK 培养于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中,Scc9 及 Cal27 培养于含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基中,Scc25 培养于含

10% 胎牛血清以及 400  $\mu\text{g/L}$  氢化可的松的 DMEM/F12 培养基中,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中常规培养。每隔 1~2 d 换液,并根据细胞的生长情况进行消化传代。

1.2.2 qRT-PCR 口腔癌组织标本的总 RNA 按照 RNAprep Pure Micro Kit 说明操作,细胞总 miRNA 采用 Trizol 法,用紫外分光光度仪测定总 RNA 浓度与纯度, $A_{260} : A_{280}$  在 1.8~2.0。按照 miRNA 反转录试剂盒操作说明进行反转录,参照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq TM 试剂盒说明进行 qRT-PCR 检测,反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  20 s,40 个循环,所有试验重复 3 次,采用相对定量分析按照  $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct}(\text{实验组})-\Delta\Delta\text{Ct}(\text{对照组}))}$  求出 miR-146a 表达水平。miR-146a 正向引物以及内参引物均由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成,见表 1。

1.2.3 microRNA mimics 和 inhibitor 转染 取对数生长期细胞  $1.5 \times 10^5$  个接种于 6 孔板,以次日贴壁细胞量达 50%~60% 为宜,次日分别以 miR-146a mimics 和 miR-146a inhibitor 转染不同孔中。用双无 DMEM 培养基 100  $\mu\text{L}$  分别稀释 10 nmol/L miR-146a mimics,miR-146a inhibitor 以及阴性对照序列,另各取 80  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O,20  $\mu\text{L}$  5  $\times$  transfection buffer,4  $\mu\text{L}$  genmute 到 5  $\mu\text{L}$  上述双无 DMEM 培养基中,轻轻混匀后室温下孵育 20 min,加入不同孔槽中,然后每孔加入 1 mL 完全培养基,常规培养 48 h,检测 miR-146a 表达水平。

表 1 RT-PCR 引物

Table 1 Primers used for RT-PCR

基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
U6	GGAACGATACAGAGAAGATTAGC	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
miR-146a	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	

1.2.4 细胞增殖实验 收集转染 miR-146a mimics,miR-146a inhibitor 及阴性对照序列后的细胞接种于 96 孔板中,每孔 3000 个,培养箱中常规培养,分别于 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK8 试剂,培养箱中放置 2 h,用酶标仪测定其在 450 nm 处的 A 值。

1.2.5 细胞迁移实验 取对数生长期的转染 miR-146a mimics,miR-146a inhibitor 以及阴性对照序列后的细胞制成  $5 \times 10^5$  个/mL 无血清细胞悬液,向每个 Transwell 小室中加入 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液,并在 24 孔板每孔对应加入 600  $\mu\text{L}$  的完全培养基,将小室放入孔中,培养箱培养 24 h,进行固定及染色。计数穿过微孔移到滤膜下层的细胞总数,共

计数中央及四周各 5 个视野并取其平均值。

1.2.6 细胞侵袭实验 用无血清培养基对 8 g/L 的 Matrigel 胶进行水化,取 50  $\mu\text{L}$  包被于 Transwell 小室底部,37  $^{\circ}\text{C}$  静置 2 h,取对数生长期的转染 miR-146a inhibitor 以及阴性对照序列后细胞制成  $1 \times 10^6$  个/mL 无血清细胞悬液,向每个铺胶的 Transwell 小室中加入 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液,并在 24 孔板每孔对应加入 600  $\mu\text{L}$  的完全培养基,然后将小室放入孔中,培养箱培养 24 h,进行细胞固定及染色。计数穿过微孔移到滤膜下层的细胞总数,共计数中央及四周各 5 个视野并取其平均值。

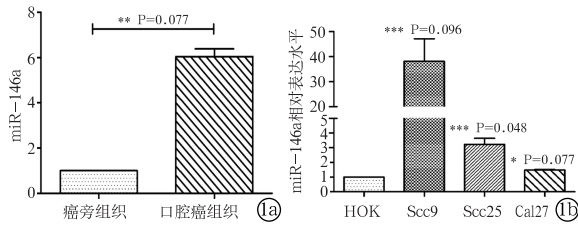


图1 口腔癌组织及细胞系中 miR-146a 表达水平

Fig. 1 The expression level of miR-146a in OSCC tissues and OSCC cell lines.

1.3 统计学分析 应用 SPSS20.0 统计软件进行分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,若数据符合正态分布、方差齐,则采用两独立样本  $t$  检验;若方差不齐,则采用近似  $t$  检验;若数据非正态分布,则采用 Wilcoxon 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

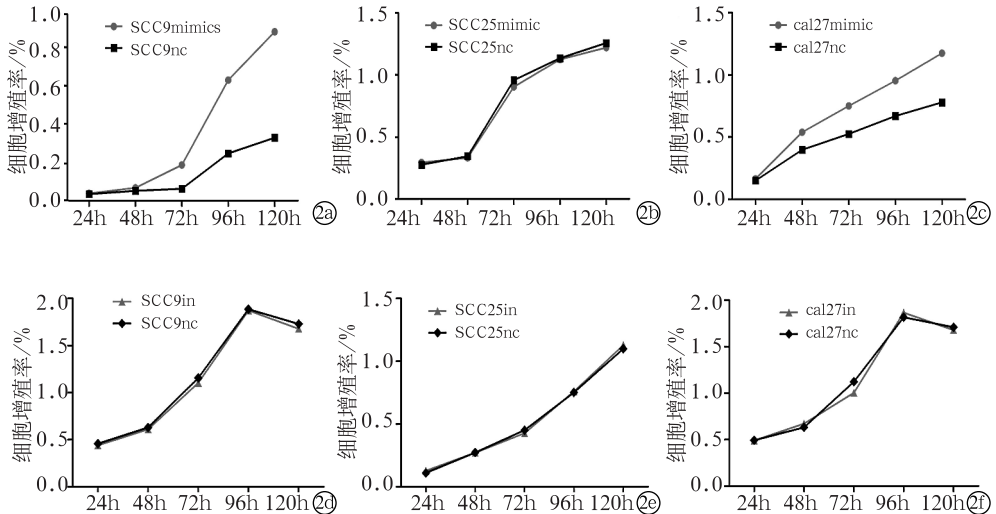


图2 转染 miR-146a mimics 和 miR-146a inhibitor 后不同 OSCC 细胞系增殖情况

Fig. 2 The proliferation abilities of OSCC cell lines transformed with miR-146a mimics and miR-146a inhibitor.

### 2.3 miR-146a 对口腔癌细胞迁移能力的影响

Transwell 迁移结果显示,与阴性对照组相比,转染 miR-146a mimics 的 Sc9、Sc25 : Cal27 细胞穿过人工基底膜的细胞数明显增多,细胞迁移能力明显增强(图 3a,  $P < 0.05$ )。转染 miR-146a inhibitor 后,Sc9、Sc25 : Cal27 细胞穿过人工基底膜的细胞数减少,细胞迁移能力明显降低(图 3b,  $P < 0.05$ )。

### 2.4 miR-146a 对口腔癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭结果显示,与阴性对照组相比,转染 miR-146a mimics 的 Sc9、Sc25 及 Cal27 细胞穿过人工基底膜的细胞数明显增多,细胞侵袭能力明显增强(图 4a,  $P < 0.05$ )。转染 miR-146a inhibitor 后,Sc9、Sc25、Cal27 细胞穿过人工基底膜的细胞数则明显减少,细胞侵袭能力明显降低(图 4b,  $P < 0.05$ )。

2.1 miR-146a 在口腔癌组织及细胞系中的表达水平 qRT-PCR 结果显示,6 例口腔鳞状细胞癌组织中 miR-146a 表达水平明显高于相应的癌旁组织(图 1a,  $P < 0.05$ )。相较于 HOK 细胞,Sc9、Sc25 及 Cal27 中 miR-146a 则呈明显高表达(图 1b,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 miR-146a 对口腔癌细胞增殖能力的影响

CCK8 结果显示,转染 miR-146a mimics 48 h、72 h、96 h、120 h 后,Sc9 及 Cal27 细胞增殖活性明显高于阴性对照组(图 2a, 2c,  $P < 0.05$ ),转染 miR-146a mimics 后,Sc25 细胞增殖活性则无明显改变(图 2b,  $P > 0.05$ )。转染 miR-146a inhibitor 后 Sc9、Sc25 及 Cal27 细胞增殖活性与对照组相比无明显差异(图 2d、2e、2f,  $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

MicroRNAs(miRNAs)是一类单链小分子非编码 RNA,具有物种保守性,在细胞周期、分化、生长、凋亡以及各种应激反应中扮演着重要角色<sup>[7]</sup>。现已发现许多实体瘤中都有各自特异的 miRNA 表达谱,尽管目前并不完全清楚这些异常表达的 miRNA 是否是影响肿瘤发生发展及预后的根本原因,但是,这些 miRNA 在肿瘤中的作用却是显而易见的。

miRNA-146 是近年来研究较多的 miRNA 之一,位于人第 5 号染色体 LOC285628 基因上,成熟序列位于第二外显子上,在不同物种间的序列高度保守,提示其在生物体的生理、病理过程中可能发挥重要的作用<sup>[8]</sup>。有学者利用 Genomatix 及 MatInspector 软件包分析 miR-146 的启动子,发



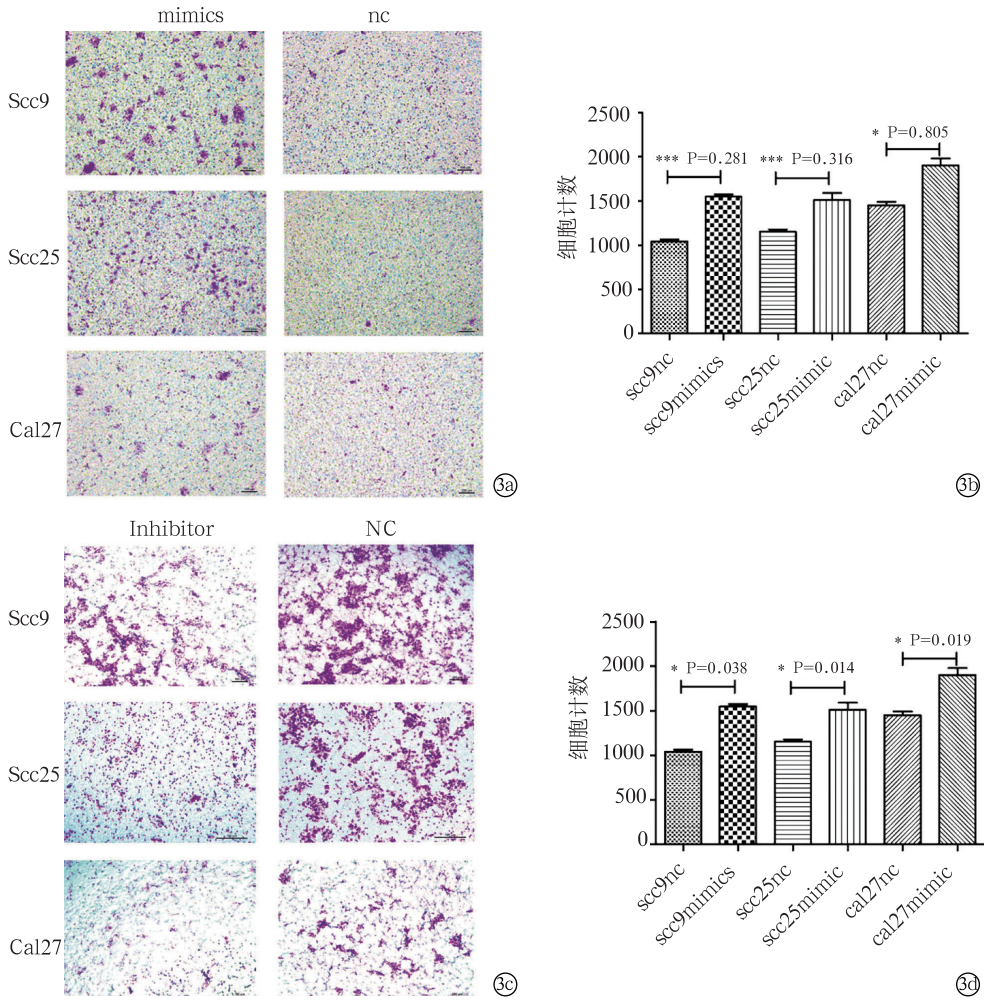


图 3 转染 miR-146a mimics 和 miR-146a inhibitor 后不同 OSCC 细胞系迁移情况

Fig. 3 The migration abilities of OSCC cell lines transformed with miR-146a mimics and miR-146a inhibitor.

现 miR-146a 的启动子位于其基因上游 550 bp 且有一 NF- $\kappa$ B 结合位点,并受上游基因的调节,进一步证实 miR-146 家族可参与调节 NF- $\kappa$ B 相关信号通路<sup>[9]</sup>。尽管有临床研究指出,OSCC 患者血清中 miR-146a 的表达明显高于健康对照组,且外源性增加 miR-146a 表达可直接靶控 IRAK1, TRAF6 和 NUMB 基因的表达并激活 NF- $\kappa$ B 通路,增加多种 OSCC 细胞的致癌性,但并未进一步明确其表达与口腔癌细胞增殖、迁移、侵袭等生物学特性之间的相关性<sup>[10]</sup>。

研究结果显示,在 OSCC 组织中 miR-146a 的表达水平明显高于癌旁组织,提示 miR-146a 在一定程度上可看作是 OSCC 发生的潜在生物学标志之一。此外,在 Scc9、Scc25 及 Cal27 等 OSCC 细胞株中,miR-146a 表达水平也明显高于正常角质上皮细胞 HOK ( $P < 0.05$ )。本文对 Scc9、Scc25 及 Cal27 细胞中 miR-146a 的表达水平进行了外源性干扰,在转染 miR-146a mimics 以及 miR-146a

inhibitor 的基础上,对 Scc9、Scc25 及 Cal27 细胞增殖、迁移及侵袭能力的改变进行对比研究。研究结果显示,外源性高表达 miR-146a 可在一定程度上促进 OSCC 细胞增殖、迁移及侵袭能力的增加,与此同时,抑制 OSCC 癌细胞中 miR-146a 的表达,则可明显抑制 OSCC 细胞迁移及侵袭等生物学行为的进行,提示 miR-146a 在口腔癌的发生及发展过程中具有一定的促进作用,可通过影响 OSCC 细胞增殖、侵袭、迁移等生物学行为参与肿瘤发生发展的机制调节。另有研究指出,OSCC 患者的血清样本中 miR-146a 呈明显的异常高表达<sup>[10]</sup>,且在多种恶性肿瘤患者血清中,miR-146a 均有相对特定的 miRNA 表达谱,血清样本检测作为一种简便易行,安全无创同时可避免内源性 RNA 酶降解的癌前诊断手段,临床诊治中具有积极意义。

综上所述,miR-146a 具有一定促癌基因作用,在 OSCC 细胞增殖、迁移、侵袭过程中具有重要意义,但关于 miR-146a 调控 OSCC 的具体分子作

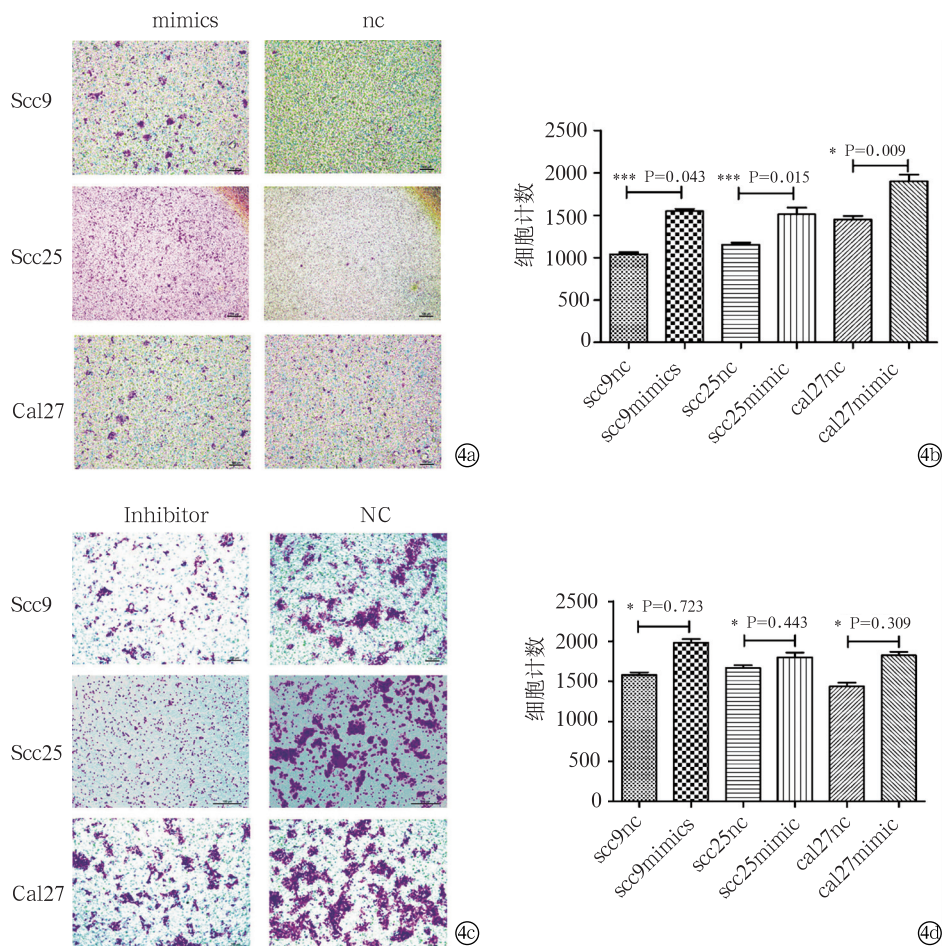


图 4 转染 miR-146a mimics 和 miR-146a inhibitor 后不同 OSCC 细胞侵袭情况

Fig. 4 The invasion abilities of OSCC cells transfected with miR-146a mimics and miR-146a inhibitor.

用机制尚不明确,明确 OSCC 中 miR-146a 的生物学意义对肿瘤诊治及预后判断均具有积极作用,笔者将通过进一步高通量测序分析帮助探索 miR-146a 在口腔癌发生发展过程中的具体作用机制。

参考文献

[1] 俞力夫,代晓明,李逸松. mRNA 差异表达与口腔鳞状细胞癌相关研究进展[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(1): 100-104

[2] Kiko T, Nakagawa K, Tsuduki T, et al. MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease [J]. Journal of Alzheimers Disease, 2014, 39(2): 253-259

[3] Müller M, Kuiperij H B, Claassen J A, et al. MicroRNAs in Alzheimer's disease; differential expression in hippocampus and cell-free cerebrospinal fluid [J]. Neurobiology of Aging, 2014, 35(1): 152-158

[4] Liu C J, Tsai M M, Tu H F, et al. miR-196a, Overexpression and miR-196a2, Gene Polymorphism Are Prognostic Predictors of Oral Carcinomas [J]. Annals of Surgical Oncology, 2013, 20(3): 406-414

[5] Wu D, Xi Q Y, Cheng X, et al. miR-146a-5p inhibits TNF- $\alpha$ -induced adipogenesis via targeting insulin receptor

in primary porcine adipocytes [J]. Journal of Lipid Research, 2016, 57(8): 1360-1372

[6] Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, et al. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010, 23(4): 1229-1234

[7] 常黎然,杜军,李二红,等. microRNA-21 在口腔鳞状细胞癌中的表达与预后关系[J]. 口腔医学研究, 2015, 31(9): 927-930

[8] Yuwen DL1, Sheng BB, Liu J, et al. MiR-146a-5p level in serum exosomes predicts therapeutic effect of cisplatin in non-small cell lung cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(11): 2650-2658

[9] Pauley K M, Stewart C M, Gauna A E, et al. Altered miR-146a expression in Sjögren's syndrome and its functional role in innate immunity [J]. European Journal of Immunology, 2011, 41(7): 2029-2039

[10] Hung PS, Liu CJ, Chou CS, et al. miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79926