

miR-7 在口腔鳞状细胞癌中的表达及潜在临床意义

裴浩, 黄莹莹, 李海朋, 芮航, 夏冬景

摘要 目的 研究 miR-7 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中的表达及潜在临床意义。方法 获取原发性 OSCC 患者肿瘤组织 53 例及正常健康组织 27 例,利用 qRT-PCR 检测各组织中 miR-7 的表达,并分析其与上皮间质转化的相关性。利用质粒转染技术将含 miR-7 序列片段的质粒导入 OSCC 细胞株 SCC9 中,通过建立过表达 miR-7 的 SCC9 细胞进一步验证 miR-7 与 OSCC 上皮间质转化的关系。结果 与健康组

组织比较,miR-7 在 OSCC 肿瘤组织中的表达显著降低($P < 0.01$);miR-7 的表达与上皮间质转化过程呈显著相关性($P < 0.001$)。与对照组细胞比较,过表达 miR-7 促进 SCC9 细胞 E-cadherin 的表达,抑制 Fibronectin 的表达($P < 0.01$)。结论 miR-7 在 OSCC 中低表达,与上皮间质转化过程高度相关。

关键词 miR-7; 口腔鳞状细胞癌; 上皮间质转化
中图分类号 R 781.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)07-1048-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.012

2018-03-05 接收

基金项目: 河南省高校科技创新人才支持计划(编号: 16IRTS THN025)

作者单位: 河南南阳医学高等专科学校第一附属医院口腔科, 南阳 473058

作者简介: 裴浩,男,副主任医师,责任作者, E-mail: peihao0621@126.com

微小 RNA(microRNA) 是一类长度在 18-22nt 左右的单链非编码核苷酸序列,其主要功能之一是参与调控编码 mRNA 的翻译及降解^[1]。研究报道,

[14] Peng X D, Xu P Z, Chen M L, et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2 [J]. *Development*, 2003, 17(11): 1352-65.

[15] Jia D, Heersche J N. Insulin-like growth factor-1 and -2 stimulate osteoprogenitor proliferation and differentiation and adipocyte forma-

tion in cell populations derived from adult rat bone [J]. *Bone*, 2000, 27(6): 785-94.

[16] Wong A, Hardy K L, Kitajewski A M, et al. Propranolol accelerates adipogenesis in hemangioma stem cells and causes apoptosis of hemangioma endothelial cells [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2012, 130(5): 1012-21.

Effects of IGF-2 on proliferation and adipogenesis differentiation of hemangioma-derived stem cells

Zhang Kui, Lou Yin, Xie Juan, et al

(Dept of Plastic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of insulin-like growth factor-2 (IGF-2) on the proliferation and adipogenesis differentiation of hemangioma-derived stem cells. **Methods** The proliferating infantile hemangiomas tissues resected from three patients were collected. After collagenase digestion and separation, CD133 immunomagnetic beads were adsorbed to obtain hemangioma-derived stem cells. CCK-8 assay of different concentrations of IGF-2 on the proliferation of HemSCs, cells were cultured in EGM-2/FBS-10% containing IGF-2 (100 ng/ml), IGF-2 plus OSI-906 (IGF-2: 100 ng/ml; OSI-906: 1 μmol/L), IGF-2 plus LY294002 (IGF-2: 100 ng/ml; LY294002: 10 μmol/L), LY294002 (10 μmol/L) or no treatment, the protein expression of C/EBPα, C/EBPβ, PPARγ, adiponectin, p-AKT and total AKT were detected. **Results** IGF-2 significantly enhanced HemSCs proliferation *in vitro*, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Western blot showed that the expression of C/EBPα, C/EBPβ, PPARγ, adiponectin and p-AKT in IGF-2 group were increased compared with the other groups. **Conclusion** IGF-2 may affect the adipogenesis differentiation of HemSCs through the IGF-1R/PI3K/AKT pathway.

Key words insulin-like growth factor 2; infantile hemangiomas stem cells; proliferation; adipogenesis differentiation

在多种肿瘤组织中存在 miRNA 的表达异常,近年来关于其直接参与调控肿瘤发生发展的研究也得到充分认定^[2]。既往研究^[3-4]表明,在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)中也存在大量 miRNAs 的表达异常,多种 miRNAs 被证实直接参与调控 OSCC 的发生发展过程。miR-7 作为常见的 miRNAs 之一,已被证实参与调控胃肠道肿瘤及乳腺癌的发生发展过程^[5-6],然后在 OSCC 中的角色及具体机制仍不明确。现通过分析 miR-7 在 OSCC 中的表达及与上皮间质转化的关系,以期明确 miR-7 在 OSCC 中的角色及潜在临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2015 年 8 月~2016 年 12 月来河南南阳医学高等专科学校第一附属医院口腔科就诊并确诊为 OSCC 患者 53 例作为癌症组,均为原发病灶,尚未接受任何其他治疗措施。获取健康口腔黏膜组织标本 27 例作为对照组。所有标本获取前均获得患者知情同意,并通过医院伦理委员会批准。SCC9 细胞株来自中国科学院上海细胞所,由河南南阳医学高等专科学校第一附属医院中心实验室惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 利用 TRIzol(美国 Roche 公司)对组织或细胞中的总 RNA 进行抽提。利用逆转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司)对提取的 RNA 进行逆转录获取 cDNA。然后利用 PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)对 cDNA 进行 PCR 扩增,引物序列详见表 1。反应条件为:93 °C 2 min, 93 °C 1 min 55 °C 2 min, 共 40 个循环。每个样本设置 3 个复孔,U6 作为 miR-7 的内参基因,GAPDH 作为 Fibronectin 和 E-cadherin 的内参基因,计算每个样本的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值。

表 1 引物序列

名称	引物序列(5'-3')
U6	F: CGCTTCGGCAGCACATATAC R: TTCACGAATTTGCGTGTTCAT
miR-7	F: GTGTGCGGAAATGCTTCTGCTA R: GCGAGCACAGAATTAATACGAC
GAPDH	F: GATTCACCCATGGCAAATTC R: AGCATCGCCCACTTGATT
Fibronectin	F: CCATCGCAAACCGCTGCCAT R: AACACTTCTCAGCTATGGGCTT
E-cadherin	F: ATCCTACTGGACGGTTCG R: TTGGCTAATGGCACTTGA

1.2.2 Western blot 离心收集培养中的 SCC9 细胞,利用 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)裂解细胞获取细胞总蛋白,并及时保存于 -80 °C 冰箱。利用 BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定样品蛋白浓度。蛋白电泳前调整蛋白量保持一致。利用 10% 凝胶电泳进行蛋白分离,采用 PVDF 膜(Millipore 公司)进行转膜。5% 脱脂奶粉室温封闭,分别加入 1:1 000 稀释的 Rabbit anti human GAPDH(美国 Cell Signaling Technology 公司)、Rabbit anti human Fibronectin(美国 Cell Signaling Technology 公司)和 Rabbit anti human E-cadherin(英国 Abcam 公司)4 °C 摇床过夜, PBST 洗膜 3~5 次,分别加入 1:3 000 的 Goat anti rabbit-HRP(美国 Cell Signaling Technology 公司)室温孵育 2 h, PBST 洗涤 3~5 次, ECL 曝光,并利用 Image J 计数各组的灰度值。

1.2.3 细胞质粒转染实验 收集培养中的 SCC9 细胞,用 50 μ l Opti-MEM 稀释 0.8 μ g 含 miR-7(miR-7 过表达组)或对照 Vector 的质粒 DNA(阴性对照组)(Invitrogen, Carlsbad, CA),同时设等体积不含任何质粒 DNA 的 Opti-MEM 稀释液作为对照(空白对照组),轻轻吹吸 3~5 次混匀,室温静置 5 min。轻轻颠倒混匀转染试剂,用 50 μ l Opti-MEM 稀释 2.0 μ l Lipofectamine TM2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)轻轻吹吸 3~5 次混匀,室温静置 5 min。混合转染试剂和质粒 DNA 稀释液,轻轻吹吸 3~5 次混匀,室温静置 20 min。转染复合物以每孔 100 μ l 的剂量加入到 24 孔细胞板中,前后轻摇细胞板混合均匀。将细胞板置于 500 μ g/ml G418 培养基中,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,当细胞达到 90% 以上汇合率时将细胞转移至培养瓶中继续培养。根据细胞生长状况及时进行换液,直到稳定表达转染质粒的细胞达到一定数量后收集样品进行后续实验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对 *t* 检验,两组以上均数比较采用方差分析,使用 Pearson 分析指标间的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-7 在 OSCC 肿瘤组织及健康组织中的表达 荧光定量 PCR 结果显示:相较于健康组织,miR-7 在 OSCC 肿瘤组织中的表达水平显著降低($t = 21.91, P < 0.000 1$),见图 1。

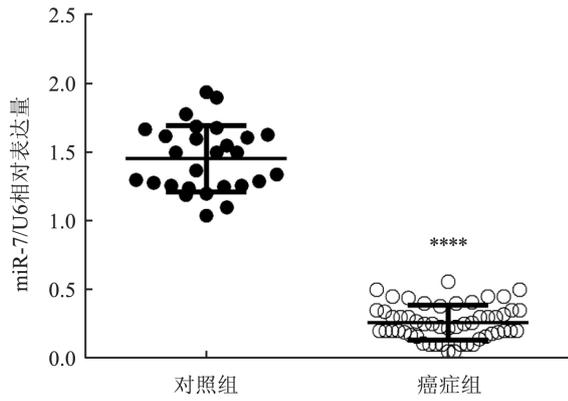


图1 miR-7 在 OSCC 肿瘤组织及健康组织中的表达
与对照组比较: **** $P < 0.0001$

2.2 miR-7 与 OSCC 临床病理特征的关系 miR-7 在 OSCC 肿瘤组织中的表达与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位等因素无关,而与转移情况有关,具体表现为: miR-7 在转移性 OSCC 患者中的表达显著低于非转移性患者 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 miR-7 与 OSCC 上皮间质转化的相关性 以上结果表明 miR-7 的表达与 OSCC 有无转移高度有关。为了明确 miR-7 是否与 OSCC 上皮间质转化过程有关,本研究检测了 53 例 OSCC 肿瘤组织及 27 例正常健康组织中 miR-7 及上皮标志基因 E-cad-

herin 和间质标志基因 Fibronectin 的表达情况。Pearson 相关分析显示,在 OSCC 组织中,miR-7 与 E-cadherin 的表达呈显著正相关 ($r = 0.7520, P < 0.001$);而与 Fibronectin 的表达呈显著负相关 ($r = -0.7932, P < 0.001$),而在正常组织中的表达无明显相关性,见图 2。

表 2 miR-7 与 OSCC 临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

指标	例数	miR-7 的表达	P 值	t/ F 值
性别			0.132	1.529
男	25	0.32 ± 0.06		
女	28	0.35 ± 0.08		
年龄(岁)			0.189	1.3310
≥60	36	0.38 ± 0.07		
<60	17	0.34 ± 0.15		
肿瘤大小(cm)			0.643	0.4658
≥3	27	0.36 ± 0.18		
<3	26	0.33 ± 0.28		
转移情况			0.004	3.0340
无	29	0.44 ± 0.12		
有	24	0.35 ± 0.09		
部位			0.798	0.3373
颊	14	0.33 ± 0.09		
舌	17	0.35 ± 0.11		
口底	12	0.36 ± 0.08		
牙龈	10	0.32 ± 0.15		

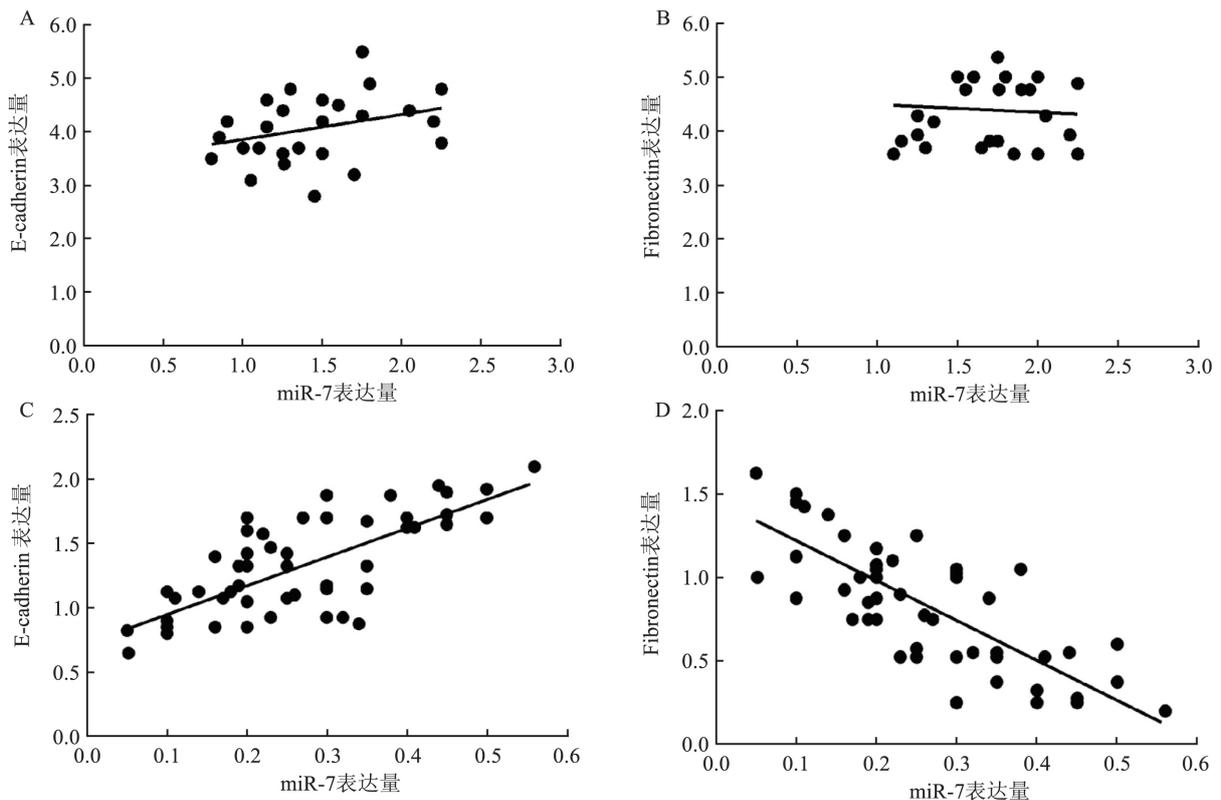


图 2 miR-7 与上皮间质转化的相关性

A: 27 例正常健康组织中 miR-7 和 E-cadherin 表达的相关性分析; B: 27 例正常健康组织中 miR-7 和 Fibronectin 表达的相关性分析; C: 53 例 OSCC 肿瘤组织中 miR-7 和 E-cadherin 表达的相关性分析; D: 53 例 OSCC 肿瘤组织中 miR-7 和 Fibronectin 表达的相关性分析

2.4 miR-7 对 SCC9 细胞 E-cadherin 和 Fibronectin 基因表达的影响 通过质粒转染构建过表达 miR-7 的 SCC9 细胞。结果显示,相比于对照组细胞,转染后的 SCC9 细胞 miR-7 相对表达量显著增强, E-cadherin 的 mRNA 水平显著升高 ($t = 3.42$), Fibronectin 的 mRNA 水平显著下降 ($t = 2.13$), 见图 3。

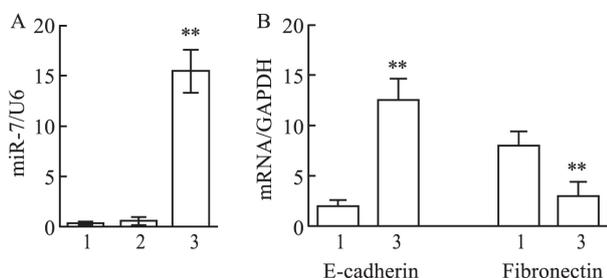


图3 过表达 miR-7 对 OSCC 上皮间质转化过程的影响

A: 空白对照组, 阴性对照组及 miR-7 过表达组 SCC9 细胞中 miR-7 的表达; B: 空白对照组及 miR-7 过表达组 SCC9 细胞中 E-cadherin 和 Fibronectin 的 mRNA 表达水平; 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: miR-7 过表达组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

2.5 miR-7 对 SCC9 细胞 E-cadherin 和 Fibronectin 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,相比于空白对照组细胞,过表达 miR-7 的 SCC9 细胞的 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($t = 1.41$), 而 Fibronectin 蛋白表达水平显著降低 ($t = 0.84$), 见图 4。以上结果进一步证实 miR-7 在 OSCC 上皮间质转化过程中的调控作用。

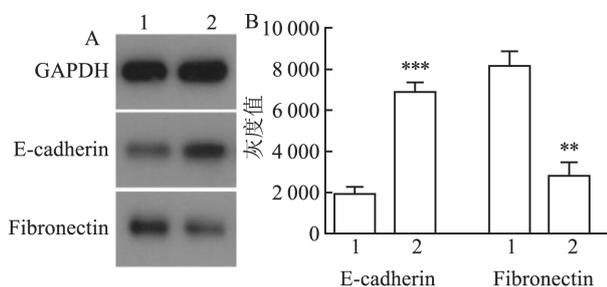


图4 miR-7 对 SCC9 细胞 E-cadherin 和 Fibronectin 蛋白表达的影响

A: 空白对照组及 miR-7 过表达组 SCC9 细胞中 E-cadherin 和 Fibronectin 的蛋白表达水平; B: 灰度值统计图, 数据来源于 3 次独立实验; 1: 空白对照组; 2: miR-7 过表达组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

OSCC 是威胁人类健康的常见头颈部肿瘤之

一,因其具有侵袭性及转移性特征导致其总体生存率较差^[7]。通过对 OSCC 组织标本进行 miRNA 微矩阵芯片分析发现,有大量的 miRNA 较正常组织存在差异化表达,既存在高表达 miRNA 又有低表达 miRNA^[8-9]。因其差异化表达的特异性及灵敏性,近年来基于其作为诊断及治疗 OSCC 的生物学指标技术的研究也得到一定的发展^[10]。同时,深入研究显示,miRNA 虽不能编码蛋白质,但其可直接参与调控肿瘤相关蛋白质的合成及降解,因此在肿瘤的治疗及预防中也发挥重要的作用^[11]。本研究显示 miR-7 在 OSCC 中存在明显低表达,且相比于非转移性患者,其在转移性 OSCC 患者中的表达显著降低,提示其可能参与 OSCC 的恶化转化进程。近年来研究^[12]显示,上皮间质转化在 OSCC 肿瘤细胞侵袭及远处转移过程中发挥重要作用。在上皮间质转化过程中,肿瘤细胞间紧密连接被破坏,细胞极性消失,细胞骨架重塑;进而上皮标志物蛋白 E-cadherin 表达下降,细胞紧密连接蛋白相关蛋白 claudin 1 表达下降;同时肿瘤细胞开始表达间质标志物 Vimentin, Fibronectin 和 α -SMA 等^[13]。因此肿瘤细胞获得了向邻近正常组织侵袭的能力,同时也通过血液和淋巴途径向远处转移。发生上皮间质转化的患者肿瘤组织常与其侵袭及转移性有显著相关性^[14]。本研究显示 miR-7 在转移性 OSCC 中的表达较非转移性显著降低,而其表达与 E-cadherin 的表达呈显著正相关,而与 Fibronectin 的表达呈显著负相关,也间接印证了 OSCC 中 Fibronectin 表达增加,而 E-cadherin 表达下降与肿瘤转移的相关性^[9]。同时发现,miR-7 与上皮间质转化的相关性,因此认为正常生理水平的 miR-7 对维持口腔上皮细胞正常形态,阻止其向肿瘤转化具有重要意义。同时提示提高体内 miR-7 水平可在一定程度上抑制 OSCC 的上皮间质转化,进而降低肿瘤的侵袭及转移率,增加患者的生存率。未来,miR-7 能否作为临床上可靠的诊断及治疗 OSCC 的指标仍需进一步研究,同时 miR-7 如何调控 OSCC 进展的分子机制仍需进一步探索。

综上所述,研究表明在 OSCC 中存在 miR-7 的明显低表达,且与 OSCC 上皮间质转化过程高度相关,提示 miR-7 在 OSCC 发生发展过程中起重要作用,可作为诊断及治疗 OSCC 的潜在生物学指标。

参考文献

- [1] Tran N, Hutvagner G. Biogenesis and the regulation of the maturation of miRNAs [J]. Essays Biochem, 2013, 54: 17-28.

- [2] Schwarzenbach H. The clinical relevance of circulating, exosomal miRNAs as biomarkers for cancer [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15(9): 1159–69.
- [3] Radhika T, Jeddy N, Nithya S, et al. Salivary biomarkers in oral squamous cell carcinoma – An insight [J]. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2016, 6 (Suppl 1): S51–4.
- [4] Manikandan M, Deva Magendhra Rao A K, Arunkumar G, et al. Oral squamous cell carcinoma: microRNA expression profiling and integrative analyses for elucidation of tumorigenesis mechanism [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15: 28.
- [5] Shi Y, Luo X, Li P, et al. miR-7-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells mainly by targeting REG-γ [J]. *Cancer Lett*, 2015, 358(1): 27–36.
- [6] Xie J, Chen M, Zhou J, et al. miR-7 inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer cells by suppressing epidermal growth factor receptor expression [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4): 1715–22.
- [7] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(1): 69–90.
- [8] Yan Y, Wang X, Venø M T, et al. Circulating miRNAs as biomarkers for oral squamous cell carcinoma recurrence in operated patients [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 8206–14.
- [9] Troiano G, Boldrup L, Ardito F, et al. Circulating miRNAs from blood, plasma or serum as promising clinical biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review of current findings [J]. *Oral Oncol*, 2016, 63(6): 30–7.
- [10] Zhou Y, Kolokythas A, Schwartz J L, et al. microRNA from brush biopsy to characterize oral squamous cell carcinoma epithelium [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(1): 67–78.
- [11] Wang H. Predicting cancer-related miRNAs using expression profiles in tumor tissue [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2014, 15(5): 438–44.
- [12] Natarajan J, Chandrashekar C, Radhakrishnan R, et al. Critical biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in the head and neck cancers [J]. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10(5): 512–8.
- [13] Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(3): 488–94.
- [14] Göppel J, Möckelmann N, Münscher A, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition regulating transcription factors in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(10): 5435–40.

Expression and potential clinical significance of miR-7 in oral squamous cell carcinoma

Pei Hao, Huang Yingying, Li Haipeng, et al

(Dept of Stomatology, The Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Henan Nanyang 473058)

Abstract Objective To investigate the expression and potential clinical significance of miR-7 in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** Cancer tissues from 53 OSCC patients and healthy tissue from 27 people were collected. The levels of miR-7 in each tissue were detected by quantitative RT-PCR; the correlation between miR-7 and epithelial mesenchymal transition (EMT) were analyzed. Plasmid of miR-7 was conducted into SCC9 cells to confirm the role of miR-7 in OSCC. **Results** Compared with the healthy tissue, the levels of miR-7 in OSCC tissue were decreased significantly ($P < 0.01$); the expression of miR-7 in OSCC tissue were highly correlated with epithelial mesenchymal transition ($P < 0.001$). Compared with the control cells, overexpression of miR-7 promoted E-cadherin expression, but inhibited Fibronectin expression in SCC9 cells ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-7 is low expressed in OSCC, which is highly correlated with epithelial-mesenchymal transition.

Key words miR-7; oral squamous cell carcinoma; epithelial mesenchymal transition