

PJA1 及 miR-130a 基因在口腔肿瘤组织中的表达及相关性分析

许旭东, 王银龙, 朱友明, 汪 聪

摘要 目的 研究 PJA1 及 miR-130a 在口腔肿瘤组织中的表达情况, 明确对肿瘤细胞迁移增殖的影响, 并探究两种基因之间的相互作用。方法 收集 15 组口腔肿瘤及其瘤旁组织, 提取组织内 RNA, 应用 qRT-PCR 法检测组织中 PJA1 及 miR-130a 的表达情况; 构建 PJA1 过表达、miR-130a 过表达及两者同时过表达的口腔肿瘤细胞株 SCC-3, 应用 MTT 实验和 Wound scratch assay 实验分别检测细胞增殖与迁移的影响。结果 qRT-PCR 结果表明 PJA1 在口腔肿瘤组织中的表达明显低于瘤旁组织 ($P < 0.05$), miR-130a 在口腔肿瘤组织中的表达明显高于瘤旁组织 ($P < 0.05$); MTT 和 Wound scratch assay 实验结果表明 PJA1 过表达可以抑制肿瘤细胞的增殖与迁移, miR-130a 过表达可以促进肿瘤细胞的增殖与迁移, 两者同时过表达 PJA1 可以抑制 miR-130a 促进肿瘤细胞增殖与迁移的能力。结论 PJA1 在口腔肿瘤组织中低表达, 具有抑制肿瘤细胞增殖和迁移的能力; miR-130a 在口腔肿瘤组织中高表达, 具有促进肿瘤细胞增殖和迁移的能力; miR-130a 可能通过抑制了 PJA1 从而促进肿瘤细胞的增殖和迁移。

关键词 口腔肿瘤; PJA1; miR-130a; 增殖; 迁移

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)11-1622-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.009

口腔肿瘤比较多见, 系头颈部肿瘤的重要组成

2017-07-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31501103); 安徽省自然科学基金(编号: 1508085QC62)

作者单位: 安徽医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 合肥 230032

作者简介: 许旭东, 男, 硕士研究生;

王银龙, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangylah@sina.com

部分, 被认为是一种基因分子疾病, 可能受到体内外多种因素的调控, 其细胞形态、组织结构非常复杂。目前临床上多以手术切除为主, 但是因解剖部位的特殊, 术后继发畸形影响面貌、功能及身心健康。随着分子生物学的发展, 对于肿瘤的研究也踏入了基因水平, 寻找口腔肿瘤相关基因, 通过基因治疗可以有针对性的、特异性的诊治口腔肿瘤。PJA1 是一种肿瘤抑制基因, 被证实可以诱导宫颈癌 Hela 细胞的凋亡^[1]; miR-130a 定位于染色体 11q12.1 上, 在多种肿瘤组织中表达增高^[2-5]。目前, 关于 PJA1 及 miR-130a 在口腔肿瘤组织中的表达及两者之间的作用研究较少。该研究取 15 组口腔肿瘤和瘤旁组织, 检测 PJA1 及 miR-130a 的表达水平, 同时检测 PJA1 及 miR-130a 对肿瘤细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及培养条件 人口腔肿瘤细胞株 SCC-3 及病毒包装所用 293T 细胞由安徽医科大学口腔实验室提供。细胞培养在含 10% 胎牛血清、青霉素、链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 5% CO₂、饱和湿度、37℃ 培养箱内。

1.1.2 标本组织来源 收集 2015 年 1 月~10 月安徽医科大学附属口腔医院口腔颌面外科术中切除的口腔肿瘤组织及瘤旁组织 15 组。所有病例未做过局部扩大切除手术, 已通过病理学检查证实, 并且术前未接受放射治疗、化学药物治疗等, 无其他疾病。将切除后的组织置于冻存管内, 立即放置在液

testing at 2, 4, 8, 12 weeks. **Results** All the 24 rabbits were in analysis and no injection and diaphysis was found around the incision. At 12 weeks after operation, new bone formation significantly increased in the TACS@ EG-HBC/pBMP4/G treatment. It demonstrated significant increase in BMC and BMD values ($P < 0.05$) compared to the other two groups at 2, 4, 8 and 12 weeks. X-ray also showed the reunion of bone marrow cavity at 12 weeks. HE staining: new bone trabecula interconnected turned into lamellar bone. Immunohistochemistry: protein BMP4 staining with brown color was apparent. It also showed the bending stiffness of regenerated new bones at 12 weeks have no statistical differences compared with the normal radius. **Conclusion** TACS@ EG-HBC/pBMP4/G is biosecurity and can be used to repair bone defect.

Key words chitosan; gene therapy; bone morphogenetic protein 4; critical bone defects; repair

氮罐中保存。同时记录标本组织的详细资料。

1.1.3 菌种和载体 *E. coli* DH5 α 菌株由安徽医科大学口腔实验室保存; 实验所使用的慢病毒包装系统是 4 质粒包装系统, 包括 1 个慢病毒表达载体和 3 个慢病毒包装载体 (中国科学技术大学提供)。miR-130a mimics 由上海吉玛制药技术有限公司合成。

1.1.4 试剂与仪器 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 10% 胎牛血清 (美国 HyClone 公司); 逆转录反应试剂盒、QRT 反应试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); 质粒提取试剂盒 (美国 Axygen 公司); RNA 抽提试剂、细胞裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司); 24 孔、12 孔、6 孔板 (美国 Corning Costar 公司); 培养箱 (德国 Heraeus 公司); 超净工作台 (苏州净化设备公司); 倒置显微镜 (德国 Lecia 公司); PCR 扩增仪 (英国 Techne 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PJA1 的设计合成及扩增 在 Pubmed 上检索人源性 PJA1 的 CDS 序列后, 通过 Primer 5.0 软件设计出 PJA1 的基因引物序列, 上游基因引物序列为 5'-GCGAATTCCAATGGGTCAGGAATCTAGCA-AGCCT-3', 下游基因引物序列为 5'-GCCGATCCT-TAGAGTGGGGGAGGGAACATGCA-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应包括: 模板 DNA 1 μ l, 上游引物 1 μ l, 下游引物 1 μ l 2 $\times$ Pfu PCR Maste Mix 15 μ l, 用超纯水补齐总体积为 30 μ l。在 PCR 仪上进行 PCR 反应。将反应产物置于琼脂糖凝胶电泳实验, 在紫外监测仪上观察电泳结果, 回收条带。

1.2.2 质粒的构建 用设计的限制性内切酶, 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切相应 DNA 片段和载体, 将产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收后的酶切产物和载体用 T4 连接酶连接 1 h, 完成含 PJA1 基因的质粒构建, 然后转入 *E. coli* DH5 α 菌中, 涂琼脂糖板, 第 2 天挑点摇菌 (摇床 37 $^{\circ}$ C、200 r/min), 最后通过手抽酶切验证, 测序获得含有 PJA1 片段载体的大肠杆菌 DH5 α 菌株。

1.2.3 慢病毒包装 2 μ g PLKO.1 空载或 PLKO.1-PJA1, 2 μ g pREV, 2 μ g pGag 和 1 μ g pVSVG 转染入 293T 细胞中, 用纯 DMEM 培养基培养 6 h 后更换含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养 24 h 后, 收集培养基上清液, 使用 0.45 μ m Millipore 一次性针头式过滤器过滤。

1.2.4 病毒感染 过滤后含有病毒的上清液分别

感染 SCC-3 细胞, 同时加入 4 μ g/ml 聚凝胺, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养并加入 5 μ g/ml 嘌呤霉素盐酸盐, 24 h 后筛选细胞。

1.2.5 Wound scratch assay 实验 实验分为 4 组: 空载对照组、PJA1 过表达组、miR-130a 过表达组及 PJA1 + miR-130a 同时过表达组, 将细胞密度为 5×10^5 /ml 的 SCC-3 细胞铺于 6 孔板, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 24 h 后长至 90% 后均匀划出 2 条划痕, 细胞用 Hoechst 染色后, 0、48 h 时在荧光显微镜下观察划痕两侧细胞向中间生长的情况, 同时拍照记录。

1.2.6 MTT 实验 将 SCC-3 细胞分为空载对照组、PJA1 过表达组、miR130a 过表达组及 PJA1 + miR-130a 同时过表达组 4 组, 以 2 000 个/孔均匀接种于 96 孔板, 每孔加入 200 μ l 培养基培养, 每组设 3 个复孔, 待细胞贴壁后, 按时间梯度加入药物, 加入 20 μ l MTT 溶液 (终浓度为 5 g/L), 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后吸走上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ l, 震荡 10 min, 用酶联免疫检测仪测定各孔吸收值, 绘制细胞生长柱状图。

1.2.7 qRT-PCR 检测 PJA1 及 miR-130a mRNA 的表达水平 取 100 mg 冻存的口腔肿瘤组织及瘤旁组织, TRIzol 法提取总 RNA, 后进行逆转录得到 cDNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。qRT-PCR 法检测 PJA1 基因及 miR-130a 基因 mRNA 的相对表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据间的分析采用单因素方差分析及 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PJA1 及 miR-130a 载体在 SCC-3 细胞株中的表达 应用 qRT-PCR 法分别检测空载对照组、PJA1 过表达组、miR-130a 过表达组及 PJA1 + miR-130a 同时过表达组 4 组 SCC-3 细胞株中 miR-130a 基因 mRNA 的表达水平相对于空载对照组 SCC-3 细胞株中的表达水平。miR-130a 过表达组及 PJA1 + miR-130a 同时过表达组 SCC-3 细胞株中 miR-130a 基因 mRNA 的表达水平高于空载对照组 SCC-3 细胞株 (图 1A), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明过表达 miR-130a 的 SCC-3 细胞株中过表达 miR-130a 成功, 可用于后续实验。

Western blot 法分别检测空载对照组、PJA1 过

表达组、miR-130a 过表达组及 PJA1 + miR-130a 同时过表达组 SCC-3 细胞株中 PJA1 的蛋白表达水平,图 1B 显示 PJA1 过表达组及 PJA1 + miR-130a 同时过表达组中检测到 flag-PJA1 的表达,表明过表达 flag-PJA1 的 SCC-3 细胞株中过表达 flag-PJA1 成功,可用于后续实验。

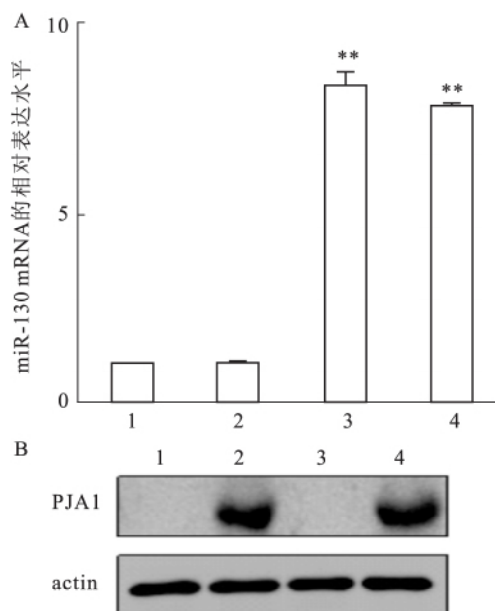


图1 miR-130a 和 PJA1 在 SCC-3 细胞株中的表达

A: 各组 SCC-3 细胞株中 miR130-a mRNA 的相对表达水平; B: 各组 SCC-3 细胞株中 PJA1 的蛋白表达水平; 1: 空载对照组; 2: PJA1 过表达组; 3: miR-130a 过表达组; 4: PJA1 + miR-130a 同时过表达组; 与空载对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 PJA1 及 miR-130a 对细胞迁移的影响 通过划痕实验可以看出,当培养口腔肿瘤 SCC-3 细胞株 48 h 后空载对照组与 PJA1 过表达组、miR-130a 过表达组及 PJA1 + miR-130a 同时过表达组比较,过表达 PJA1 后细胞迁移速度低于空载对照组,miR-130a 过表达组向中间迁移速度高于空载对照组,但是在过表达 miR-130a 的同时过表达 PJA1,SCC-3 细胞的迁移速度明显较 miR-130a 过表达组慢,三组与空载对照组比较均差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明 PJA1 过表达可抑制细胞的迁移能力,miR-130a 过表达可促进细胞的迁移能力,两者同时过表达 PJA1 抑制了 miR-130a 对于细胞迁移能力的促进作用,说明 miR-130a 可能通过抑制了 PJA1 促进 SCC-3 细胞的迁移能力。见图 2。

2.3 PJA1 及 miR-130a 对细胞增殖的影响 通过 MTT 实验检测空载对照组与 PJA1 过表达组、miR-130a 过表达组及 PJA1 + miR-130a 同时过表达组

SCC-3 细胞株增殖能力。在培养 SCC-3 细胞株 48 h 后,PJA1 过表达组较空载对照组细胞增殖能力明显降低,miR-130a 过表达组较空载对照组细胞增殖能力则明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);而两者同时过表达 PJA1 抑制了 miR-130a 对于细胞增殖能力的促进作用,说明 miR-130a 可能通过抑制了 PJA1 促进 SCC-3 细胞的增殖能力。见图 3。

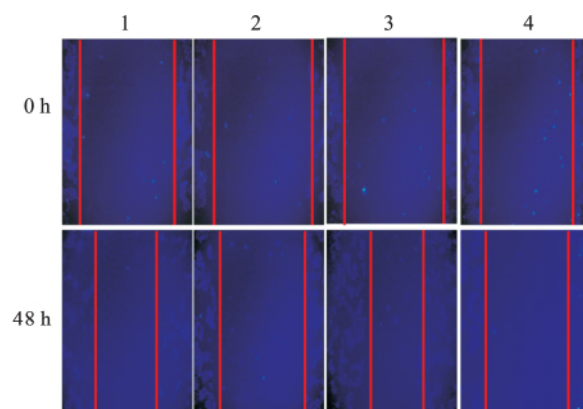


图2 PJA1 及 miR-130a 对肿瘤细胞迁移能力的影响

Hoechst 染色 $\times 100$

1: 空载对照组; 2: PJA1 过表达组; 3: miR-130a 过表达组; 4: PJA1 + miR-130a 同时过表达组

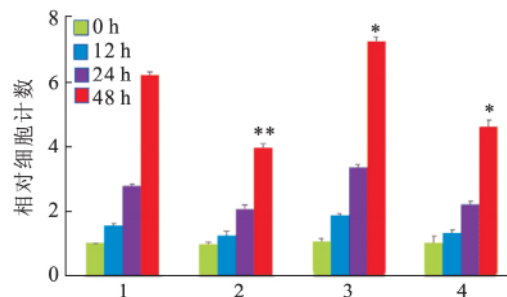


图3 PJA1 及 miR-130a 对肿瘤细胞增殖能力的影响

1: 空载对照组; 2: PJA1 过表达组; 3: miR-130a 过表达组; 4: PJA1 + miR-130a 同时过表达组; 与空载对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 PJA1 及 miR-130a 在标本组织中的表达 在 15 对口腔肿瘤组织和瘤旁组织中通过 qRT-PCR 法检测 PJA1 基因 mRNA 的表达水平,差异有统计学意义($P < 0.05$)。11 例瘤旁组织 PJA1 基因 mRNA 的表达水平均高于肿瘤组织,2 例瘤旁组织 PJA1 基因 mRNA 的表达水平相较肿瘤组织变化不大,2 例瘤旁组织 PJA1 基因 mRNA 的表达水平则低于相应的肿瘤组织。表明在口腔肿瘤组织中,PJA1 基因的表达水平呈现下调趋势,见图 4。

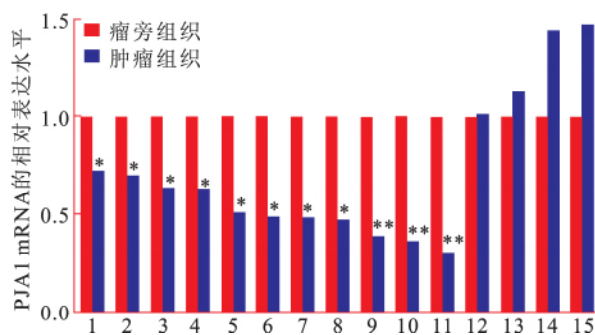


图4 口腔肿瘤组织及瘤旁组织中 PJA1 的表达

1~15: 口腔肿瘤和瘤旁组织标号; 与瘤旁组织比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

同样检测标本中 miR-130a 基因 mRNA 的表达水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。11 例瘤旁组织 miR-130a 基因 mRNA 的表达水平均低于相应的肿瘤组织, 2 例瘤旁组织 miR-130a 基因 RNA 的表达水平相较肿瘤组织变化不大, 2 例瘤旁组织 miR-130a 基因 RNA 的表达水平则高于肿瘤组织。表明在口腔肿瘤组织中, miR-130a 基因的表达水平呈现上调趋势, 见图 5, 同时表明肿瘤组织和瘤旁组织中 miR-130a 与 PJA1 的表达水平呈相反趋势。

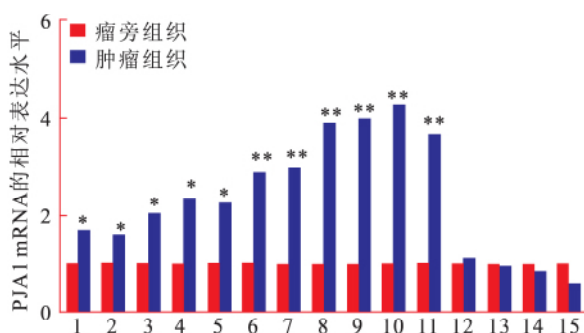


图5 口腔肿瘤组织及瘤旁组织中 miR-130a 的表达

1~15: 口腔肿瘤和瘤旁组织标号; 与瘤旁组织相比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

和全身肿瘤一样, 口腔肿瘤的病因与发病条件至今仍然被认为是一个非常复杂的问题。大多数人接受“癌瘤病因综合作用的概念”。近年来随着分子生物学研究的发展, 很多学者指出: 肿瘤是一种基因分子疾病^[6]。研究^[7-8]证明, 在组织细胞中存在一些癌基因和抑癌基因, 如果激活癌基因或者使抑癌基因的失活都可以导致肿瘤发生。较为经典的治疗方法是手术切除为主, 如果是恶性肿瘤还可以

采用三联疗法: 即手术 + 放疗 + 化疗, 但是这些传统方法对患者的身体和心理健康影响较大, 后遗症也较多, 使患者的生活质量下降, 临床上迫切需要新的治疗手段。基因治疗引起了广泛的重视, 从基因水平寻找方法, 将外源性的基因导入体内使致病基因失活或者取代致病基因等方法有着非常重要的临床意义^[9]。

研究^[10-12]表明, miR-130a 通过一定的信号转导通路促进了肝癌细胞上皮间充质转化的发生, 使肝癌细胞的迁移能力增加。Chen et al.^[13]研究发现, miR-130a 能下调抗血管生成因子(生长终止特异性同源盒基因和同源异型基因 A5)的表达, 从而促进肿瘤血管的生长。PJA1 基因编码一种泛素连接酶, 又称 E3 泛素蛋白连接酶, 位于 X 染色体上。PJA1 可以通过 caspase 通路促进宫颈癌 Hela 细胞凋亡^[1]。

本研究中 MTT 和 Wound scratch assay 实验结果表明 PJA1 过表达可以抑制肿瘤细胞的增殖与迁移, miR-130a 过表达可以促进肿瘤细胞的增殖与迁移, 两者同时过表达 PJA1 可以抑制 miR-130a 促进肿瘤细胞增殖与迁移的能力。提示 PJA1 及 miR-130a 参与口腔肿瘤的发生及发展, 通过一定的机制对口腔肿瘤细胞周期的调控, 影响了肿瘤细胞的迁移和生长, miR-130a 可能抑制了 PJA1 对肿瘤细胞的作用。同时, 在检测的 15 对口腔肿瘤组织中有 11 对 PJA1 基因呈相对低表达, 而这 11 例肿瘤组织 miR-130a 基因呈相对高表达, 肿瘤组织和瘤旁组织中 miR-130a 与 PJA1 的表达水平呈相反趋势, 提示 miR-130a 可能通过调控 PJA1 影响口腔肿瘤的发生。表明口腔肿瘤的发生可能是一个多种因素共同作用形成的复杂过程, 不是一种基因调控细胞的增殖与迁移, 是多种基因综合产生的结果。

综上所述, PJA1 在口腔肿瘤组织中表达是下调的, miR-130a 在口腔肿瘤组织中表达是上调的, 在口腔肿瘤的发生发展中发挥重要作用, 可能影响肿瘤细胞的增殖、生长和迁移等生物学过程。本研究显示, 在口腔肿瘤细胞中可能由于 miR-130a 的高表达抑制了 PJA1 的表达, 但是这其中的信号转导通路及具体机制尚未阐明, 还需要大量的基础研究。本研究为进一步探讨 PJA1 及 miR-130a 在口腔肿瘤中的作用机制提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 徐玮玮. PJA1 诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡的初步研究[J]. 临

- 床医学实践 2014 , 23(3) : 202 - 4.
- [2] Qiu S , Lin S , Hu D , et al. Interactions of mir-323/mir-326/mir-329 and mir-130a/mir-155/mir-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients [J]. *J Transl Med* , 2013 , 11: 10.
- [3] Liu S G , Qin X G , Zhao B S , et al. Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue [J]. *Oncol Lett* 2013 , 5(5) : 1639 - 42.
- [4] Zhao B S , Liu S G , Wang T Y , et al. Screening of microRNA in patients with esophageal cancer at same tumor node metastasis stage with esophageal cancer at same tumor node metastasis stage with different prognoses [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* , 2013 , 14(1) : 139 - 43.
- [5] Sand M , Skrygan M , Sand D , et al. Expression of microRNAs in basal cell carcinoma [J]. *Br J Dermatol* 2012 , 167(4) : 847 - 55.
- [6] 李 伟 , 王银龙 , 朱友明 , 等. SBP1 基因在涎腺肿瘤中的表达及相关性分析 [J]. *安徽医科大学学报* 2016 , 51(10) : 1449 - 53.
- [7] Shepelev M V , Kalinichenko S V , Vikhreva P N , et al. Selection of microRNA for providing tumor specificity of transgene expression in cancer gene therapy [J]. *Mol Biol(Mosk)* 2016 , 50(2) : 327 - 35.
- [8] Birkeland A C , Ludwig M L , Spector M E , et al. The potential for tumor suppressor gene therapy in head and neck cancer [J]. *Dis-cov Med* 2016 , 21(113) : 41 - 7.
- [9] Bali A , Bali D , Sharma A. An overview of gene therapy in head and neck cancer [J]. *Indian J Hum Genet* , 2013 , 19(3) : 282 - 90.
- [10] 李振涛. miRNA-130a 在肝癌组织中的表达 [J]. *肿瘤基础与临床* 2014 , 27(4) : 282 - 3.
- [11] 莫翠菊 , 秦雪 , 康晓楠 , 等. 肝细胞生长因子(HGF) 诱导肝癌 Huh7 细胞发生上皮间质转化(EMT) 后细胞膜表面糖蛋白糖谱的变化 [J]. *复旦学报(医学版)* 2014 , 41(2) : 198 - 204.
- [12] 邱历伟 , 潘刘翊 , 姚登福. micro RNA 在肝癌诊治中的研究进展 [J]. *胃肠病学和肝病杂志* 2015 , 24(5) : 501 - 5.
- [13] Chen Y , Gorski D H. Regulation of angiogenesis through a microRNA(miR-130a) that downregulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA 5 [J]. *Blood* , 2008 , 111(3) : 1217 - 26.

Expression of PJA1 and miR-130a in oral tumor tissue and their correlation

Xu Xudong , Wang Yinlong , Zhu Youming , et al

(Dept of Oral and Maxillofacial Sugery , The Affiliated Stomatological
Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To study the expression level of PJA1 and miR-130a in oral tumor tissue and to determine the effect on tumor cell migration and proliferation , and to explore the interaction between the two genes. **Methods**

15 groups of oral tumor and adjacent tissues were collected and their mRNA was extracted. The expression level of PJA1 and miR-130a was detected by qRT-PCR. Overexpression of PJA1 , overexpression of miR-130a , overexpression of both PJA1 and miR-130a in SCC-3 were constructed. The effect of cell proliferation was examined by MTT assay , and the effect of cell migration was determined through Wound scratch assay. **Results** qRT-PCR revealed that the expression of PJA1 in oral tumor tissues was obviously lower than that in adjacent tissues($P < 0.05$) , the expression of miR-130a in oral tumor tissues was significantly higher than that in adjacent tissues($P < 0.05$) . MTT and Wound scratch assay demonstrated that overexpression of PJA1 could inhibit the proliferation and migration of SCC-3 , overexpression of miR-130a could promote the proliferation and migration of SCC-3. PJA1 could inhibit the ability of miR-130a to promote the proliferation and migration of SCC-3 when both of them were overexpressed at the same time. **Conclusion** The expression level of PJA1 is down-regulated in oral tumor tissues , PJA1 can inhibit tumor cell proliferation and migration. The expression level of miR-130a is up-regulated in oral tumor tissues , miR-130a can promote tumor cell proliferation and migration. MiR-130a may promote oral tumor cell proliferation and migration by inhibiting PJA1.

Key words oral tumor; PJA1; miR130a; proliferation; migration