

参考文献

- [1] UMEHARA H, OKAZAKI K, MASAKI Y, et al. A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4RD): general concept and details[J]. Mod Rheumatol, 2012, 22(1):1-14.
- [2] KAMEKURA R, TAKAHASHI H, ICHIMIYA S. New insights into IgG4-related disease: emerging new CD4+ T-cell subsets[J]. Curr Opin Rheumatol, 2019, 31(1):9-15.
- [3] KAMISAWA T, ZEN Y, PILLAI S, et al. IgG4-related disease [J]. Lancet, 2015, 385(9976):1460-1471.
- [4] ZHENG K, TENG F, Li X-M. Immunoglobulin G4-related kidney disease: pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. Chronic Dis Transl Med, 2017, 3(3):138-147.
- [5] BRITO-ZERÓN P, RAMOS-CASALS M, BOSCH X, et al. The clinical spectrum of IgG4-related disease [J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(12):1203-1210.
- [6] 吴学芬, 苏玉莹, 王晨琼, 等. 免疫球蛋白 G4 相关性心血管疾病[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(12):1103-1107.
- [7] STONE JR. Aortitis, periaortitis, and retroperitoneal fibrosis, as manifestations of IgG4-related systemic disease [J]. Curr Opin Rheumatol, 2011, 23(1):88-94.
- [8] SAKAMOTO A, ISHIZAKA N, IMAI Y, et al. Serum levels of IgG4 and soluble interleukin-2 receptor in patients with abdominal and thoracic aortic aneurysm who undergo coronary angiography[J]. Atherosclerosis, 2012, 221(2):602-603.
- [9] HORIE K, TADA N, YAMAGUCHI K, et al. Immunoglobulin G4-related constrictive pericarditis identified by cytological examination of pericardial effusion: a case report[J]. J Med Case Rep, 2016, 10(1):359.
- [10] KABARA M, NAKAGAWA N, CHINDA J, et al. Diagnosis of IgG4-related systemic disease by cytology of large pericardial effusion with fine needle aspiration[J]. Int J Cardiol, 2011, 148(3):392-393.
- [11] IBE T, NAKAMURA T, TANIGUCHI Y, et al. IgG4-related effusive constrictive pericarditis[J]. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2016, 17(6):707.
- [12] RAISSIAN Y, NASR SH, LARSEN CP, et al. Diagnosis of IgG4-related tubulointerstitial nephritis [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(7):1343-1352.
- [13] KAWANO M, SAEKI T, NAKASHIMA H, et al. Proposal for diagnostic criteria for IgG4-related kidney disease [J]. Clin Exp Nephrol, 2011, 15(5):615-626.
- [14] 陈昱, 郑可, 叶文玲, 等. IgG4 相关性泌尿系统损害的临床特点分析[J]. 中华肾脏病杂志, 2015, 31(1):7-12.
- [15] 姚启凤, 徐子涵, 常文静, 等. IgG4 相关性淋巴结病的诊治与鉴别诊断要点[J]. 安徽医药, 2019, 23(11):2121-2124.
- [16] WICK MR, O'MALLEY DP. Lymphadenopathy associated with IgG4-related disease: diagnosis & differential diagnosis [J]. Semin Diagn Pathol, 2018, 35(1):61-66.
- [17] 赵丽丽, 刘霞, 王荣, 等. IgG4 相关疾病的临床病理分析[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2018, 27(4):306-310, 401.
- [18] 耿聆, 丁素玲. IgG4 相关疾病临床病理分析及研究进展[J]. 诊断病理学杂志, 2017, 24(5):379-381.

(收稿日期:2020-09-07, 修回日期:2020-11-03)

引用本文: 尚念红. 微小 RNA-7-5p 靶向调节锌指蛋白核转录因子 4 基因抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖和诱导凋亡的体外研究[J]. 安徽医药, 2021, 25(12):2470-2474. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.12.032.

◇ 临床医学 ◇



微小 RNA-7-5p 靶向调节锌指蛋白核转录因子 4 基因抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖和诱导凋亡的体外研究

尚念红

作者单位: 新汶矿业集团莱芜中心医院肿瘤科, 山东 济南 271100

摘要: **目的** 探讨微小 RNA(miR)-7-5p 对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡及锌指蛋白核转录因子 4(KLF4) 基因表达调控的影响。**方法** 研究起止时间为 2018 年 3—10 月。实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-7-5p 在人正常口腔黏膜成纤维细胞 hOMF 及口腔鳞状细胞癌细胞 SCC25、Cal127 和 Tca8113 中的表达量。将 miR-7-5p 模拟物(miR-7-5p mimics)及阴性对照序列(mimics Control)分别转染至 SCC25 细胞, 分为三组: Control 组(未转染的 SCC25 细胞)、NC 组(转染 mimics Control 的 SCC25 细胞)、miR-7-5p 组(转染 miR-7-5p mimics 的 SCC25 细胞)。以 qRT-PCR 检测 miR-7-5p 在 SCC25 细胞中的转染效果; MTT 法检测 miR-7-5p 对 SCC25 细胞增殖的影响; 流式细胞术检测 miR-7-5p 对 SCC25 细胞凋亡的影响; 通过双荧光素酶报告基因实验、qRT-PCR 和蛋白质印迹法(Western blotting)检测 miR-7-5p 对 KLF4 的靶向关系。**结果** miR-7-5p 在 3 种口腔鳞状细胞癌细胞 SCC25、Cal127 和 Tca8113 中的表达量[(0.21±0.02)、(0.43±0.04)、(0.48±0.05)]明显低于人正常口腔黏膜成纤维细胞 hOMF(1.00±0.09)($P<0.05$); 转染 miR-7-5p mimics 能够上调 SCC25 细胞中 miR-7-5p 的表达($P<0.05$); miR-7-5p 过表达能够明显抑制 SCC25 细胞增殖能力[Control 组、NC 组 72 h 吸光度(1.43±0.13)、(1.46±0.15)比 miR-7-5p 组(0.81±0.09)]($P<0.05$), 并诱导细胞凋亡[Control 组、NC 组 凋亡率(9.48±2.65)%、(10.21±3.02)%比 miR-7-5p 组(24.41±8.15)%]($P<0.05$); 双荧光素酶报告基因实验结果表明 miR-7-5p 过表达可抑制 KLF4-Wt 报告基因载体细胞相对荧光活性; qRT-PCR 和 Western blotting 进一步证

实了 miR-7-5p 能够靶向调节 KLF4 mRNA 和蛋白表达。**结论** miR-7-5p 直接靶向调控 KLF4 基因的表达来抑制口腔鳞状细胞癌 SCC25 细胞增殖,诱导细胞凋亡。

关键词: 口腔肿瘤; 癌,鳞状细胞; 微小 RNA-7-5p; 锌指蛋白核转录因子 4 基因; 增殖; 凋亡

Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells by miR-7-5p targeting KLF4 gene

SHANG Nianhong

Author Affiliation: Oncology Department, Xinwen Mining Group Laiwu Central Hospital, Jinan, Shandong 271100, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of microRNA(miR)-7-5p on proliferation, apoptosis and regulation of zinc finger protein nuclear factor 4 (KLF4) gene expression in oral squamous cell carcinoma cells. **Methods** The study started from March 2018 and ended in October 2018. Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expressions of miR-7-5p in human normal oral mucosal fibroblast hOMF and oral squamous cell carcinoma cells SCC25, Cal127 and Tca8113; miR-7-5p mimics and mimics Control were transfected into SCC25 cells, respectively. The cells were assigned into the following three groups: Control group (untransfected SCC25 cells), NC group (SCC25 cells transfected with mimics Control) and miR-7-5p group (SCC25 cells transfected with miR-7-5p mimics). The transcriptional effect of miR-7-5p in SCC25 cells was detected by qRT-PCR. The proliferation of SCC25 cells by miR-7-5p was detected by MTT assay. The effect of miR-7-5p on apoptosis of SCC25 cells was detected by flow cytometry. The targeting relationship of miR-7-5p to KLF4 was detected by double luciferase reporter gene assay, qRT-PCR and Western blotting. **Results** The expressions of miR-7-5p in three oral squamous cell carcinoma cells SCC25, Cal127 and Tca8113 were significantly lower [(0.21±0.02), (0.43±0.04), (0.48±0.05)] than that in normal oral mucosa fibroblast hOMF (1.00±0.09) ($P<0.05$). Transfection of miR-7-5p mimics significantly up-regulated the expression of miR-7-5p in SCC25 cells ($P<0.05$). Overexpression of miR-7-5p significantly inhibited the proliferation [(72 h absorbance: Control group (1.43±0.13), NC group (1.46±0.15) vs. miR-7-5p group (0.81±0.09)] of SCC25 cells and induced apoptosis [apoptosis rate: Control group (9.48±2.65)%, NC group (10.21±3.02)% vs. miR-7-5p group (24.41±8.15)%] ($P<0.05$). Dual luciferase reporter gene assay results showed that miR-7-5p overexpression significantly inhibited the relative fluorescence activity of KLF4-Wt reporter vector cells. Results of qRT-PCR and Western blotting further confirmed that miR-7-5p can target KLF4 mRNA and protein expression. **Conclusion** MiR-7-5p directly targets the expression of KLF4 gene to inhibit the proliferation of oral squamous cell carcinoma SCC25 cells and induce apoptosis.

Key words: Mouth neoplasms; Carcinoma, squamous cell; MiR-7-5p; KLF4 gene; Proliferation; Apoptosis

口腔癌是最常见的头颈癌类型,口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)占口腔癌总数的约 90%,全世界每年诊断出新病例超过 30 万^[1]。虽然 OSCC 的诊断和临床治疗方面取得了一定进步,但 OSCC 病人的 5 年总生存率无显著提高,仍然小于 50%^[2]。因此,探究 OSCC 发生和进展的分子机制对于鉴定新的、有效治疗靶标是必不可少的。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性、小的非编码 RNA 分子,长度约为 22 个核苷酸。它们通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区(3'-UTR)中的互补序列结合并调节转录后或翻译水平的基因表达来影响肿瘤的生物学过程^[3]。目前已证明多种 miRNA 参与 OSCC 的生理和病理过程,包括细胞增殖、凋亡、迁移、代谢和分化。例如,如 miR-133a-3p 在 OSCC 中的表达降低并充当肿瘤抑制因子,miR-196a-5p 在 OSCC 细胞凋亡中起关键作用,miR-361-5p 表达下调与淋巴结转移和 OSCC 预后不良^[4-6]。这些发现支持 miRNA 在口腔肿瘤发生和进展中的起

关键作用。近期研究发现,与正常健康组织相比,OSCC 组织中 miR-7-5p 的表达量明显下调^[7]。miR-7-5p 在人类几种癌症类型中异常表达,包括非小细胞肺癌、结直肠癌和食管鳞状细胞癌^[8-10]。然而,miR-7-5p 在人 OSCC 中的潜在作用和作用机制仍有待确定。因此本实验旨在探究 miR-7-5p 对 OSCC 细胞增殖和凋亡的影响及可能的作用机制,研究起止时间为 2018 年 3—10 月。

1 材料与方法

1.1 材料 人正常口腔黏膜成纤维细胞株 hOMF 由上海艾研生物科技有限公司提供;OSCC 细胞株 SCC25、Cal127 和 Tca8113 由美国 ATCC 细胞库提供;RPMI 1640 培养基由美国 Hyclone 公司提供;胎牛血清、Lipofectamine 2000 转染试剂由美国 Invitrogen 公司提供;miR-7-5p 模拟物(miR-7-5p mimics)及阴性对照序列(mimics Control)由广州锐博生物科技有限公司提供;Trizol 试剂、反转录试剂盒由赛默飞世尔公司提供;SYBR Primix Ex Taq 检测试剂盒

由日本 TaKaRa 公司提供;噻唑蓝(MTT)试剂由美国 Sigma 公司提供;膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)细胞凋亡检测试剂盒由大连 TaKaRa 公司提供;RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、蛋白发光液均由上海碧云天生物技术研究提供;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜由美国 Millipore 公司提供;双荧光素酶报告基因检测试剂盒由美国 Promega 公司提供;锌指蛋白核转录因子 4(KLF4)3'-UTR 野生型(KLF4-Wt)和 KLF4 3'-UTR 突变型(KLF4-Mut)荧光素酶重组载体质粒由广州辉骏生物科技有限公司提供;KLF4 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体由美国 Abcam 公司提供;辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白 G(IgG)由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.2 细胞培养 OSCC 细胞 SCC25、Cal127、Tca8113 及正常口腔黏膜成纤维细胞 hOMF 均培养在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基中,置 5% 二氧化碳、37 °C 培养箱中进行培养。使用倒置显微镜观察细胞生长状态,待细胞铺满瓶底 90% 时用胰蛋白酶消化细胞,以 1:3 比例进行传代,取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3 细胞转染及分组 将 OSCC 细胞 SCC25 接种到细胞培养板中,过夜培养,待细胞融合度为 50% 时,使用脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂将 miR-7-5p mimics(终浓度为 50 nmol/L)及 mimics Control(终浓度为 50 nmol/L)分别转染至 SCC25 细胞。实验分为三组:Control 组(未转染的 SCC25 细胞)、NC 组(转染 mimics Control 的 SCC25 细胞)、miR-7-5p 组(转染 miR-7-5p mimics 的 SCC25 细胞)。转染 6 h 时更换新的培养液,于 37 °C 培养箱继续培养。

1.4 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 分别采用 Trizol 法提取 OSCC 细胞 SCC25、Cal127、Tca8113 及正常口腔黏膜成纤维细胞 hOMF 中总 RNA,提取转染 48 h 后各组 SCC25 细胞中总 RNA,根据反转录试剂盒说明书配制反应体系,并合成第一链互补 DNA(cDNA),然后使用 SYBR Primix Ex Taq 检测试剂盒以 cDNA 为模板,进行 qRT-PCR 检测。以 U6 为内参,分析细胞中 miR-7-5p mRNA 相对表达量,扩增条件设置为:95 °C 5 min,95 °C 20 s,60 °C 30 s,72 °C 15 s,共设 40 个循环,以相对量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。采用同样的方法分析转染 48 h 后各组 SCC25 细胞中 KLF4 mRNA 相对表达量。

1.5 MTT 法检测 分别将转染 24、48、72 h 后各组 SCC25 细胞种植到 96 孔板中,每组细胞在各个时间点设置 3 个复孔,向每孔细胞中加入浓度为 5 g/L 的

MTT 溶液 20 μ L,37 °C 继续培养 4 h,取出细胞培养板,弃去上清培养液,再向细胞中加入 150 μ L 二甲基亚砷溶液,混匀后继续孵育 30 min,使用酶标仪检测各孔细胞 450 nm 波长处吸光度,实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡率 分别收集转染 48 h 后各组 SCC25 细胞,约为 1×10^5 个细胞,以 PBS 洗涤 2 次,向细胞中加入 100 μ L Binding Buffer 结合缓冲液重悬细胞,向细胞悬液中加入 Annexin V-FITC 试剂 10 μ L,轻轻混匀,在室温下避光反应 15 min,离心收集细胞,再加入预冷的 PBS 重悬细胞,再向细胞悬液中加入 PI 染液 10 μ L,避光孵育 5 min,在流式细胞仪上检测各组 SCC25 细胞凋亡情况。

1.7 双荧光素酶报告基因实验 TargetScan 等生物信息学预测软件预测结果显示,KLF4 3'-UTR 存在与 miR-7-5p 靶向结合的位点,提示 KLF4 可能是 miR-7-5p 直接靶基因。根据预测结果分别构建 KLF4-Wt 载体质粒和 KLF4-Mut 载体质粒,该部分由广州辉骏生物科技有限公司完成。将 KLF4-Wt 和 KLF4-Mut 载体质粒分别与 miR-7-5p mimics 或 mimics Control 共转染至 SCC25 细胞,每组设 6 个复孔,转染 48 h 后,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒分别检测萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性,计算各组细胞相对荧光活性。

1.8 蛋白质印迹法(Western blotting)检测 收集转染 48 h 后各组 SCC25 细胞,加入 RIPA 细胞裂解液,在冰上裂解提取细胞中总蛋白,使用 BCA 检测试剂盒对蛋白样品进行定量检测,取 40 μ g 蛋白样品行 SDS-PAGE 电泳,电转至 PVDF 膜上,将膜置于 5% 脱脂奶粉中封阻 1 h,PBST 洗膜 3 次,然后加入 1:1 000 稀释的 KLF4 一抗,4 °C 过夜杂交,PBST 洗膜 3 次,加入 1:3 000 稀释的二抗,室温杂交 2 h,PBST 洗膜 3 次,加入 ECL 发光液,显影、成像、拍照,以 GAPDH 为内参条带,采用 Image J 图像分析软件分析条带灰度,分别计算各组 SCC25 细胞中 KLF4 蛋白的相对表达量。

1.9 统计学方法 使用 SPSS 21.0 对实验数据进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以两独立样本 *t* 检验分析比较两组间差异,以单因素方差分析比较多组间差异,以 SNK-*q* 检验分析比较多组间的两两间差异。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-7-5p 在 OSCC 细胞中表达下调 qRT-PCR 结果显示,miR-7-5p 在人正常口腔黏膜成纤维细胞 hOMF 及 3 种不同 OSCC 细胞中的表达量比较, $F=319.810$, $P < 0.001$ 。与 hOMF (1.00 ± 0.09) 比较,miR-7-5p 在 3 种不同 OSCC 细胞 SCC25 (0.21 ± 0.02)、

Cal127(0.43±0.04)和Tca8113(0.48±0.05)中的表达量有不同程度的下调($P<0.05$)。在3种不同OSCC细胞中,SCC25细胞miR-7-5p的基础表达量最低,因此选择SCC25细胞株进行后续实验。

2.2 miR-7-5p mimics 转染效果检测 qRT-PCR检测结果显示,Control组、NC组及miR-7-5p组SCC25细胞中miR-7-5p的表达量比较, $F=547.999$, $P<0.001$ 。miR-7-5p组(5.96±0.62)明显高于Control组(1.00±0.11)和NC组(0.97±0.10)($P<0.05$),而Control组和NC组相比较差异无统计学意义($P>0.05$)。提示过表达miR-7-5p的SCC25细胞株构建成功。

2.3 过表达miR-7-5p抑制SCC25细胞增殖 MTT法检测结果显示,miR-7-5p组SCC25细胞吸光度在48 h和72 h时低于Control组和NC组($P<0.05$),Control组和NC组SCC25细胞在24、48、72 h时吸光度均差异无统计学意义($P>0.05$)。表明miR-7-5p过表达能够抑制SCC25细胞增殖。见表1。

表1 过表达miR-7-5p对口腔鳞状细胞癌SCC25细胞24、48、72 h时增殖吸光度的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	24 h	48 h	72 h
Control组	3	0.51±0.03	1.02±0.08	1.43±0.13
NC组	3	0.54±0.05	0.98±0.09	1.46±0.15
miR-7-5p组	3	0.42±0.03 ^{①②}	0.63±0.05 ^{①②}	0.81±0.09 ^{①②}
F值		24.488	73.112	76.528
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与Control组比较, $P<0.05$ 。②与NC组比较, $P<0.05$ 。

2.4 过表达miR-7-5p促进SCC25细胞凋亡 流式细胞术检测结果显示,Control组、NC组及miR-7-5p组SCC25细胞凋亡率比较, $F=23.168$, $P<0.001$ 。miR-7-5p组SCC25细胞凋亡率(24.41±8.15)%明显高于Control组(9.48±2.65)%和NC组(10.21±3.02)%($P<0.05$),而Control组和NC组SCC25细胞凋亡率相比较差异无统计学意义($P>0.05$)。说明miR-7-5p过表达能够诱导SCC25细胞发生凋亡。

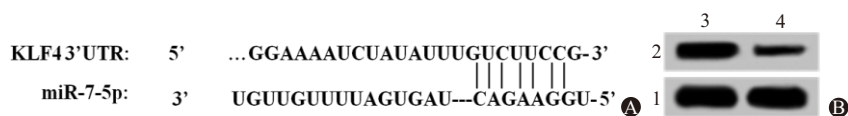
2.5 miR-7-5p靶向调控KLF4基因 TargetScan等生物信息学软件预测结果显示(图1A),miR-7-5p与KLF4 3'-UTR存在互补配对碱基,提示KLF4可能是miR-7-5p的直接靶基因。双荧光素酶报告基因实验分析结果表明,与NC组(1.00±0.10)比较,KLF4-

Mut载体质粒miR-7-5p mimics转染后SCC25细胞相对荧光活性(1.00±0.11)差异无统计学意义($t=0.117$, $P=0.913$),而KLF4-Wt载体质粒miR-7-5p mimics转染后SCC25细胞相对荧光活性(0.26±0.03)降低($t=16.830$, $P<0.001$),提示miR-7-5p能够靶向结合野生型KLF4 3'-UTR序列。qRT-PCR结果显示,miR-7-5p组SCC25细胞中KLF4 mRNA(0.33±0.03)低于NC组(1.00±0.10)($t=11.115$, $P<0.001$),蛋白质印迹法检测结果(图1B)也显示其蛋白表达水平(0.42±0.04)低于NC组(0.12±0.01)($t=12.603$, $P<0.001$)。提示miR-7-5p能够负向调控KLF4的表达。

3 讨论

多项研究表明miRNA在多种癌症的生物学特征中具有十分重要的作用,如细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移^[11-12]。miRNA在多种癌症中的关键作用支持其作为治疗靶标的潜在用途。近年来已经报道了多种miRNA参与OSCC的发生和发展,可作为OSCC诊断和治疗的分子标志物^[13-14]。miR-7-5p属于miR-7家族,其在多种癌症类型中表达下调,表明其在肿瘤发生和肿瘤进展中的起重要作用。据报道,miR-7-5p在胃癌中下调并与肿瘤淋巴结转移和远处转移相关,miR-7-5p通过调控PTEN/PI3K/AKT信号转导通路抑制胃癌细胞侵袭和迁移^[15]。Zhu等^[16]报道,miR-7-5p在胰腺导管腺癌组织和细胞系中的表达显著下降,细胞功能测定表明,miR-7-5p通过靶向SOX18抑制PANC-1细胞的增殖,迁移和侵袭。miR-7-5p在肿瘤中表现出低表达,并且是关键的负调节因子。之前的研究显示,与邻近的正常组织相比,miR-7-5p在OSCC组织中表达下调^[7]。鉴于此,我们推测miR-7-5p在OSCC中也可能起到肿瘤抑制作用。然而,目前未见关于OSCC中miR-7-5p的表达或功能的研究。本研究初步证实了miR-7-5p作为肿瘤抑制剂起作用,抑制OSCC的发展。在本实验中,miR-7-5p在OSCC细胞系中的表达明显低于人正常口腔黏膜成纤维细胞。研究表明,miR-7-5p的过表达能够抑制OSCC细胞增殖,诱导细胞凋亡。此外,miR-7-5p通过直接靶向其mRNA的3'-UTR而负调节KLF4表达。

KLF4作为关键的转录因子,其参与调节细胞增



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—KLF4;3—NC组;4—miR-7-5p组。

图1 miR-7-5p靶向调节锌指蛋白核转录因子4(KLF4):A为miR-7-5p和KLF4 3'-UTR靶向结合示意图;B为蛋白质印迹法检测NC组与miR-7-5p组口腔鳞状细胞癌SCC25细胞中KLF4蛋白表达水平

殖、分化、迁移和凋亡,并参与正常组织稳态的发展和维持。越来越多的证据表明,KLF4在癌症进展和发展中起着抑癌或致癌基因的关键作用^[17-18]。目前研究显示,KLF4在OSCC中呈高表达,扮演致癌基因的角色^[19]。最近报道指出,miR-7-5p介导肝细胞生长因子的活性以抑制包括KLF4致癌基因,其抑制正常细胞(至少乳腺上皮细胞MCF-10A)发展成癌细胞^[20]。Huang等^[21]研究发现,KLF4可作为miR-7的靶标参与环状RNA ciRS-7调节的食管鳞状细胞癌的迁移和侵袭。microRNA-转录因子自我调节反馈环是基因表达的稳态调节的关键机制,反馈环的失调与肿瘤发生和进展紧密相关。Wei等^[22]研究发现,KLF4-miR-7自身调节反馈环的不平衡通过削弱microRNA加工促进前列腺癌细胞生长。以上研究表明,miR-7可能通过调节KLF4的表达在肿瘤中发挥作用。为了更好地理解miR-7-5p的肿瘤抑制作用,本实验使用生物信息学软件分析并鉴定KLF4作为miR-7-5p的靶基因。使用双荧光素酶报告基因实验测定,进一步证实KLF4是miR-7-5p的直接靶标。miR-7-5p过表达伴随着OSCC细胞中KLF4的表达下调。提示miR-7-5p抑制SCC25细胞增殖,诱导细胞凋亡可能与靶向调节KLF4的表达有关。

总之,miR-7-5p在OSCC细胞系中表达下调,并通过抑制KLF4起到肿瘤生长抑制剂的作用。新发现的miR-7-5p/KLF4轴提供了对OSCC发生机制的深入了解,并为OSCC提供了潜在的治疗靶点。本实验只在SCC25细胞中探究miR-7-5p靶向KLF4基因对SCC25细胞增殖和凋亡的影响尚显不足,后续实验将在不同细胞系及动物模型中进行证实。

参考文献

- [1] HEMA KN, SMITHA T, SHEETHAL HS, et al. Epigenetics in oral squamous cell carcinoma [J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2017, 21(2):252-259.
- [2] KIM JW, PARK Y, ROH JL, et al. Prognostic value of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein expression in oral cavity cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2016, 21(5):883-889.
- [3] GANJU A, KHAN S, HAFEEZ BB, et al. miRNA nanotherapeutics for cancer[J]. Drug Discov Today, 2017, 22(2):424-432.
- [4] 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.
- [5] WANG L, WEI Y, YAN Y, et al. CircDOCK1 suppresses cell apoptosis via inhibition of miR-196a-5p by targeting BIRC3 in OSCC[J]. Oncol Rep, 2018, 39(3):951-966.
- [6] 蒋俊豪,朱宏飞,杨雅,等.微小RNA-361-5p在口腔鳞状细胞癌中的表达及与预后的关系[J].临床肿瘤学杂志,2017,22(10):885-890.
- [7] 裴浩,黄莹莹,李海朋,等.miR-7在口腔鳞状细胞癌中的表达及潜在临床意义[J].安徽医科大学学报,2018,53(7):1048-1052.
- [8] 胡洪林.miR-7-5p通过靶向抑制EGFR表达减弱人非小细胞肺癌的增殖和侵袭能力[J].临床肺科杂志,2018,23(6):1005-1009.
- [9] LIU ML, ZHANG Q, YUAN X, et al. Long noncoding RNA RP4 functions as a competing endogenous RNA through miR-7-5p sponge activity in colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(9):1004-1012.
- [10] LI RC, KE S, MENG FK, et al. CiRS-7 promotes growth and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via regulation of miR-7/HOXB13[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(8):838-850.
- [11] HOSSEINAH LI N, AGHAPOUR M, PHG D, et al. Treating cancer with microRNA replacement therapy: a literature review[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(8):5574-5588.
- [12] SEOK H, LEE H, JANG ES, et al. Evaluation and control of miRNA-like off-target repression for RNA interference [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(5):797-814.
- [13] TANDON D, DEWANGAN J, SRIVASTAVA S, et al. miRNA genetic variants: as potential diagnostic biomarkers for oral cancer [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(2):281-289.
- [14] FARAH CS, FOX SA, DALLEY AJ. Integrated miRNA-mRNA spatial signature for oral squamous cell carcinoma: a prospective profiling study of Narrow Band Imaging guided resection [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):823-835.
- [15] PAN H, LI T, JIANG Y, et al. Overexpression of circular RNA ciRS-7 abrogates the tumor suppressive effect of miR-7 on Gastric cancer via PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1):440-446.
- [16] ZHU W, WANG Y, ZHANG D, et al. MiR-7-5p functions as a tumor suppressor by targeting SOX18 in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 497(4):963-970.
- [17] WANG B, SHEN A, OUYANG X, et al. KLF4 expression enhances the efficacy of chemotherapy drugs in ovarian cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(3):486-492.
- [18] YANG X, ZHANG D, LIU S, et al. KLF4 suppresses the migration of hepatocellular carcinoma by transcriptionally upregulating monoglyceride lipase [J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(6):1019-1029.
- [19] YOSHIHAMA R, YAMAGUCHI K, IMAJYO I, et al. Expression levels of SOX2, KLF4 and brachyury transcription factors are associated with metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma [J]. Oncol Lett, 2016, 11(2):1435-1446.
- [20] JEONG D, HAM J, PARK S, et al. MicroRNA-7-5p mediates the signaling of hepatocyte growth factor to suppress oncogenes in the MCF-10A mammary epithelial cell [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):15425-15434.
- [21] HUANG H, WEI L, QIN T, et al. Circular RNA ciRS-7 triggers the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma via miR-7/KLF4 and NF- κ B signals [J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(1):73-80.
- [22] WEI LZ, WANG YQ, CHANG YL, et al. Imbalance of a KLF4-miR-7 auto-regulatory feedback loop promotes prostate cancer cell growth by impairing microRNA processing [J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(2):226-244.

(收稿日期:2019-07-25,修回日期:2019-10-16)