

in China[J].J Comp Eff Res, 2019, 8(13):1125-1141.

[2] RATNADIWAKARA M, MOHENSKA M, ĀNKÖ ML. Splicing factors as regulators of miRNA biogenesis - links to human disease [J].Semin Cell Dev Biol, 2018, 79(1):113-122.

[3] WANG Z, SUN L, JIA K, et al. miR-9-5p modulates the progression of Parkinson's disease by targeting SIRT1[J].Neurosci Lett, 2019, 701:226-233.

[4] NOWEK K, WIEMER E, JONGEN-LAVRENCIC M. The versatile nature of miR-9/9\* in human cancer[J].Oncotarget, 2018, 9(29):20838-20854.

[5] WORBS T, HAMMERSCHMIDT SI, FÖRSTER R. Dendritic cell migration in health and disease [J].Nat Rev Immunol, 2017, 17(1):30-48.

[6] 纪雯婷, 胡京红, 于雪, 等. 麻黄细辛附子汤干预树突状细胞IL-4/STAT6的研究[J].世界中医药, 2018, 13(9):2272-2275, 2280.

[7] SATO K, UTO T, FUKAYA T, et al. Regulatory Dendritic Cells[J].Curr Top Microbiol Immunol, 2017, 410(1):47-71.

[8] LUTZ MB. Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction[J].Front Immunol, 2012, 3(1):123.

[9] 刘茂茂, 陈杰, 欧阳瑶. 树突状细胞、过表达细胞因子转导抑制因子1的树突状细胞及T细胞在慢性阻塞性肺疾病发病机制中的研究进展[J].安徽医药, 2018, 22(9):1643-1646.

[10] TAKENAKA MC, QUINTANA FJ. Tolerogenic dendritic cells[J].Semin Immunopathol, 2017, 39(2):113-120.

[11] 王迪, 柴小青, 疏树华, 等. 氟比洛芬酯对食管癌患者围术期外周血树突状细胞亚群数量的影响[J/OL].安徽医药, 2015, 19(12):2384-2388.

[12] STUMPFHOVA Z, HEZOVA R, MELI AC, et al. MicroRNA profiling of activated and tolerogenic human dendritic cells[J/OL].Mediators Inflamm, 2014, 2014:259689. DOI: 10.1155/2014/259689.

[13] LI J, RODRIGUEZ JP, NIU F, et al. Structural basis for DNA recognition by STAT6[J].Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(46):13015-13020.

[14] YAMAOKA K, MAESHIMA K, KUBO S, et al. Regulation of inflammation through JAK3-Stat6 pathway in dendritic cells[J].Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2012, 35(1):62-68.

[15] SZANTO A, BALINT BL, NAGY ZS, et al. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARγ-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells[J].Immunity, 2010, 33(5):699-712.

[16] YANG Q, WEI J, ZHONG L, et al. Correction for Yang et al., "Cross talk between histone deacetylase 4 and STAT6 in the transcriptional regulation of arginase 1 during mouse dendritic cell differentiation" [J/OL].Mol Cell Biol, 2017, 37(17):e00289-17. DOI: 10.1128/MCB.00289-17. Print 2017 Sep 1.

(收稿日期:2019-11-07, 修回日期:2019-12-23)

引用本文:张炜,魏珍星,郭洁,等.微小RNA-129-5p在喉鳞状细胞癌中的表达及对细胞增殖、侵袭的影响[J].安徽医药, 2021, 25(1):22-27. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.01.006.

◇ 药学研究 ◇



## 微小RNA-129-5p在喉鳞状细胞癌中的表达及对细胞增殖、侵袭的影响

张炜<sup>1</sup>, 魏珍星<sup>1</sup>, 郭洁<sup>1</sup>, 张严乐<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>郑州大学附属洛阳中心医院耳鼻咽喉头颈外科, 河南 洛阳 471000;

<sup>2</sup>河南科技大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 河南 洛阳 471000

**摘要:** **目的** 研究微小RNA-129-5p在喉鳞状细胞癌中的表达及对细胞增殖、侵袭的影响。**方法** 采用实时定量实时荧光定量PCR仪(RT-qPCR)检测喉鳞状细胞癌、癌旁组织及喉鳞状细胞癌Hep-2细胞中miR-129-5p表达水平,转染miR-129-5p模拟物(mimics)喉鳞状细胞癌Hep-2细胞设为mimics组,转染miR-129-5p mimics空白对照组(NC)喉鳞状细胞癌Hep-2细胞设为mimics-NC组,将未转染喉鳞状细胞癌Hep-2细胞设为NC组。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法、平板克隆试验检测各组喉鳞状细胞癌Hep-2细胞增殖情况;采用Transwell各组喉鳞状细胞癌Hep-2细胞侵袭情况;采用蛋白质印迹法试验检测各组喉鳞状细胞癌Hep-2细胞增殖、侵袭相关蛋白表达水平。**结果** 与癌旁组织(1.03±0.14)比较,喉鳞状细胞癌组织中miR-129-5p(0.48±0.08)表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。同一时间和不同时间NC组、mimic-NC组miR-129-5p表达水平、喉鳞状细胞癌Hep-2细胞增殖抑制率、平板克隆形成率、侵袭细胞数、一抗鼠源原癌基因(c-Myc)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)蛋白水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。同一时间与NC组、mimics-NC组比较, mimics组miR-129-5p表达水平、喉鳞状细胞癌Hep-2细胞增殖抑制显著增加( $P < 0.05$ ),与24 h比较,48 h mimics组miR-129-5p表达水平、喉鳞状细胞癌Hep-2细胞增殖抑制显著增加( $P < 0.05$ )。平板克隆形成率为(98.96±10.60)%、(97.57±10.82)%、(46.91±9.03)%、侵袭细胞数为(235.62±36.18)、(227.31±35.90)、(94.38±19.86)个、c-Myc(3.92±0.71)、(3.89±0.60)、(2.18±0.46)、Cyclin D1(1.54±0.27)、(1.52±0.30)、(0.39±0.08)、MMP-2(1.12±0.28)、(1.11±0.25)、(0.36±0.07)、MMP-9(1.03±0.14)、(0.98±0.13)、(0.29±0.05)蛋白水平均显著降低(均 $P < 0.05$ )。**结论** miR-129-5p在喉鳞状细胞癌组织中低表达,上调miR-129-5p

可抑制喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖及侵袭。

**关键词:** 喉肿瘤; 转染; microRNA-129-5p; 细胞周期蛋白 D1; 人喉表皮样癌细胞(Hep-2 细胞); 基质金属蛋白酶类; 增殖; 侵袭

## The expression of miR-129-5p in laryngeal squamous cell carcinoma and its effects on cell proliferation and invasion

ZHANG Wei<sup>1</sup>, WEI Zhenxing<sup>1</sup>, GUO Jie<sup>1</sup>, ZHANG Yanle<sup>2</sup>

*Author Affiliations:* <sup>1</sup>Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang, Henan 471000, China; <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China

**Abstract: Objective** To study the expression of miR-129-5p in laryngeal squamous cell carcinoma and its effects on cell proliferation and invasion. **Methods** Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of miR-129-5p in laryngeal squamous cell carcinoma, para-cancerous tissues and Hep-2 cells of laryngeal squamous cell carcinoma. MiR-129-5p mimics transfected laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells were assigned to mimics group, Hep-2 cells of laryngeal squamous cell carcinoma transfected with miR-129-5p mimics-NC blank control group were set as mimics-NC group, and the untransfected laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells were assigned to NC group. The proliferation of laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells was detected by MTT assay and plate cloning test, the invasion of Hep-2 cells in each group of laryngeal squamous cell carcinoma was studied by Transwell, Western blot (WB) was used to detect the expressions of proliferation and invasion-related proteins in Hep-2 cells of laryngeal squamous cell carcinoma. **Results** Compared with the para-cancerous tissues ( $1.03 \pm 0.14$ ), the expression level of miR-129-5p ( $0.48 \pm 0.08$ ) in laryngeal squamous cell carcinoma was significantly lower ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in the expression of miR-129-5p, the inhibition rate of proliferation of laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells, the rate of plate cloning, the number of invasive cells, c-Myc, Cyclin D1, matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) protein levels between NC group and mimic-NC group at the same time and at different time ( $P > 0.05$ ). At the same time, compared with NC group and mimics-NC group, the expression of miR-129-5p and the proliferation inhibition of laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells in mimics group increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with 24h, the expression of miR-129-5p and the proliferation inhibition of laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells in 48h mimics group increased significantly ( $P < 0.05$ ). Plate cloning rate ( $98.96 \pm 10.60$ ), ( $97.57 \pm 10.82$ ), ( $46.91 \pm 9.03$ )%, number of invasive cells ( $235.62 \pm 36.18$ ), ( $227.31 \pm 35.90$ ), ( $94.38 \pm 19.86$ ) individual, c-Myc ( $3.92 \pm 0.71$ ), ( $3.89 \pm 0.60$ ), ( $2.18 \pm 0.46$ ), Cyclin D1 ( $1.54 \pm 0.27$ ), ( $1.52 \pm 0.30$ ), ( $0.39 \pm 0.08$ ), MMP-2 ( $1.12 \pm 0.28$ ), ( $1.11 \pm 0.25$ ), ( $0.36 \pm 0.07$ ) and MMP-9 ( $1.03 \pm 0.14$ ), ( $0.98 \pm 0.13$ ), ( $0.29 \pm 0.05$ ) protein levels were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expression of miR-129-5p is low in laryngeal squamous cell carcinoma tissues. Up-regulation of miR-129-5p can inhibit the proliferation and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells.

**Key words:** Laryngeal neoplasms; Transfection; MicroRNA-129-5p; Cyclin D1; Human epithelial type 2 (HEP-2); Matrix metalloproteinases; Proliferation; Invasion

喉癌是一种临床常见头颈部恶性肿瘤,其中约 85%~90% 为喉鳞状细胞癌,在耳鼻咽喉科肿瘤中排第 3 位,且近来发病率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。虽然手术、放化疗等治疗方式对提高病人 5 年生存率已有很大突破,但手术致残、放化疗出现的严重不良反应等限制其应用,导致此种疾病仍严重威胁人类健康<sup>[2]</sup>。研究报道,空气污染、病毒感染、饮酒、吸烟、抑癌基因失活及原癌基因激活等因素是导致喉鳞状细胞癌发生的危险因素,但迄今为止,喉鳞状细胞癌的病因及发病机制尚未完全阐明<sup>[3]</sup>。微小 RNA

(microRNA, miRNA) 是一类非编码小 RNA,长度约 18~25 个核苷酸<sup>[4]</sup>,在细胞增殖、凋亡、能量代谢等过程及肿瘤发生发展中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。近来研究报道,微小 RNA-129-5p (microRNA-129-5p, miR-129-5p) 下调与肺癌、脑胶质瘤、乳腺癌等多种癌症发生、发展及癌细胞增殖分化有关<sup>[6-8]</sup>,但关于 miR-129-5p 在喉鳞状细胞癌中的作用鲜有研究。故本研究拟通过检测喉鳞状细胞癌组织中 miR-129-5p 表达水平,探究 miR-129-5p 对喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖、侵袭的影响,以期对喉鳞状细胞癌的治疗提

供一定理论参考。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取郑州大学附属洛阳中心医院2015年1月至2019年2月收治的喉鳞状细胞癌病人58例,癌变组织切除手术中采集喉鳞状细胞癌及距离喉鳞状细胞癌组织大于1 cm处癌旁正常喉粘膜上皮组织标本,置于液氮中保存备用。所有病人术前均未接受放化疗及生物治疗,且均经病理证实。研究对象或其近亲属签署知情同意书,本研究所用方法符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》,且经郑州大学附属洛阳中心医院伦理委员会审核批准后实施(伦理批号20150327)。

**1.2 细胞、主要仪器及试剂** 喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞株(批号 JKCS0277,美国 ATCC)购自上海晶抗生物工程有限公司;总 RNA 提取试剂(Trizol)、二甲基亚砜(DMSO)、蛋白抽提及二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒均购自上海碧云天有限公司,批号分别为 R0016、ST038、P0028、P0010S; PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa)、microRNA 定量(qRT-PCR)试剂盒(TaKaRa)均购自大连宝生物科技有限公司,批号分别为 RR037A、638315; DMEM/F-12 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司,批号分别为 12634010、10099141; miR-129-5p mimics、miR-129-5p mimics NC 购自上海吉玛生物科技有限公司; Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒(批号:11668027,美国, Thermo 公司); 噻唑蓝(MTT)、一抗鼠源原癌基因(c-Myc)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloprotein2, MMP-2)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloprotein9, MMP-9)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体、二抗羊抗鼠 IgG 均购自美国 Invitrogen,批号分别为 V13154、13-2500、33-3500、MA5-14186、MA5-14228、MA5-15739、B-2752。紫外分光光度计、二氧化碳培养箱均购自美国 Thermo 公司; RT-qPCR7500 仪、MODEL550 型酶标仪均购自美国 Bio-Rad 公司; IX73 倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 RT-qPCR 检测喉鳞状细胞癌组织及 Hep-2 细胞中 miR-129-5p 水平** Trizol 提取喉鳞状细胞癌、癌旁组织及 Hep-2 细胞中总 RNA,紫外分光光度计检测总 RNA 浓度及纯度。反转录制备互补 DNA(cDNA)。实时荧光定量 PCR 仪(RT-qPCR)检测样品中 miR-129-5p 水平。反应体系(20 μL): TB Green Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)(2×) 10 μL, ROX Reference Dye or Dye II (50×) 0.4 μL,

cDNA (50 ng/μL) 2 μL, 上下游引物(10 μM)各 0.8 μL, ddH<sub>2</sub>O 6.0 μL。反应条件设置为: 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s; 60 °C, 34 s, 40 个循环。以 U6 为内参,采用 2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算 miR-129-5p 的相对表达水平。

表 1 实时荧光定量聚合酶链反应引物序列

基因	引物序列
miR-129-5p	正向引物: 5'-CGGCGGTTTTTTCGCGGTGGGCT-3'
	反向引物: 5'-CAACCTGGAGGACTCCATGCTG-3'
U6	正向引物: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'
	反向引物: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTGTCAT-3'

注: miR-129-5p 为微小 RNA-129-5p, U6 为内参。

**1.3.2 细胞培养及转染** 细胞培养: Hep-2 细胞复苏后接种于 DMEM/F-12 培养基[含有 10% 胎牛血清(FBS)、1% 青链霉素], 置于 37 °C 5% 二氧化碳培养箱培养。

细胞转染: (1) 转染前 1 d (细胞汇合至 30% ~ 50%) 更换不含抗生素培养基, (2) 用无血清 opti-MEM 培养基 50 mL 分别稀释 1.25 mL 微小 RNA-129-5p 模拟物(miR-125-5p mimics), 2.5 mL miR-125-5p 模拟物-空白对照组(mimics-NC), 轻轻混匀, 室温静置 5 min; (3) 用无血清 opti-MEM 培养基 50 mL 稀释 1 mL 转染试剂脂质体(Lipofectamine)2000, 室温静置 5 min; (4) 将“(2)”与“(3)”分别轻轻混匀, 室温静置 20 min; (5) 将 miR-125-5p mimics/NC 转染试剂混合液分别逐滴加入培养板中, 轻轻混匀。分别设转染 miR-125-5p mimics 为 mimics 组, 转染 miR-125-5p mimics NC 为 mimics-NC 组, 另设无任何转染的 Hep-2 细胞为空白对照组(NC), 每组 6 个重复。(6) 培养 4 ~ 6 h 后, 更换新鲜生长培养基, 置于 37 °C 5% 二氧化碳培养箱分别培养 24 h、48 h、72 h。

**1.3.3 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖** 取对数期生长的 Hep-2 细胞, 以约 5.0×10<sup>4</sup> 个/孔的浓度接种于 96 孔板, 添加培养液 200 微升/孔。分别转染 miR-129-5p mimics/NC 培养 24 h、48 h、72 h, 另设阴性对照组, 转染步骤及分组同 1.3.2。培养结束后用 MTT 试剂盒检测 mimics 组、mimics-NC 组、NC 组各孔细胞增殖情况。细胞增殖抑制率 = (1 - 实验组 OD/NC 组 OD) × 100%。

**1.3.4 平板克隆试验检测喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞克隆能力** 取对数期 Hep-2 细胞, 胰酶消化后以 200 个/孔接种于 6 孔板, 细胞贴壁后, 更换培养基并转染 miR-129-5p mimics/NC 处理 48 h, 设置阴性对照组, 按照 1.3.2 项下进行转染和分组, 每组设置 6 个复孔。于培养箱中继续培养 14 d, 待肉眼可见克隆集落时停止培养。甲醛固定, 瑞氏染液染色, 显微

镜下观察,以单个克隆中细胞数 > 50 作为克隆计数,实验重复 3 次,取平均值。平板克隆形成率 = (平均克隆数/每孔加入单细胞数) × 100%。

**1.3.5 Transwell 试验检测喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞侵袭能力** 本研究参照相关文献方法,在 Transwell 板上进行操作<sup>[6-9]</sup>。倒置显微镜观察穿过膜的细胞数,每张膜随机取 5 个视野,计算每个视野穿过膜微孔的细胞数,取平均值。

**1.3.6 喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖及侵袭相关蛋白检测** 收集转染后各组培养 48 h 喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞,提取细胞总蛋白。二喹啉甲酸(BCA)测量蛋白浓度后取等量蛋白质样品(60 微克/孔)上样,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳。湿转法将蛋白转至 NC 膜,5% 脱脂奶粉封闭,加一抗细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)抗体 1:500;c-Myc 抗体 1:500;基质金属蛋白酶 2(MMP-2)抗体 1:500;基质金属蛋白酶 9(MMP-9)抗体 1:1 000;β 肌动蛋白(β-actin)抗体 1:500;4 ℃ 孵育过夜,洗去一抗,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗 IgG(1:5 000)室温孵育 1 h,洗去二抗,化学发光试剂(ECL)显色,以 β-actin 为内参,计算目的蛋白的相对表达量。

**1.4 统计学方法** 本研究数据采用 SPSS 20.0 进行统计,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间有差异进一步行帮弗朗尼(Bonferroni post hoc)*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-129-5p 在喉鳞状细胞癌及癌旁组织中的表达水平比较** 与癌旁组织(1.03 ± 0.14)比较,喉鳞状细胞癌组织中 miR-129-5p(0.48 ± 0.08)表达水平显著降低( $t = 25.977, P < 0.001$ )。

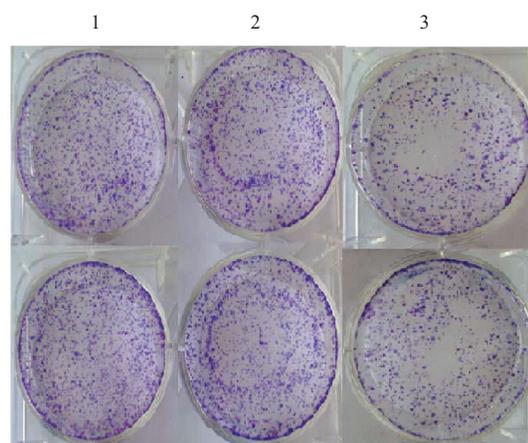
**2.2 上调 miR-129-5p 抑制喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖** 与 NC 组、mimics-NC 组比较, mimics 组 miR-129-5p 表达水平、Hep-2 细胞增殖抑制率均显著增加( $P < 0.05$ )。与 24 h 比较, mimics 组 48 h miR-129-5p 表达水平、喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖抑制率显著增加( $P < 0.05$ )。与 48 h 比较, mimics 组 72 h miR-129-5p 表达水平、喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖抑制率增加,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。不同转染时间, NC 组、mimics-NC 组 miR-129-5p 表达水平、喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖抑制率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。提示 48 h 转染效果最好,可用于下游试验。详见表 2。

**2.3 上调 miR-129-5p 抑制喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞克隆形成** NC 组(98.96 ± 10.60)%、mimics-NC 组

(97.57 ± 10.82)% 平板克隆形成率比较,差异无统计学意义( $t = 0.334, P = 0.970$ )。与 NC 组、mimics-NC 组比较, mimics 组(46.91 ± 9.03)% 喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞平板克隆形成率显著降低( $t = 12.523, 12.188$ , 均  $P < 0.001$ )。详见图 1。

表 2 上调 miR-129-5p 抑制喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖/ $\bar{x} \pm s$

组别	复孔数	miR-129-5p	增殖抑制率/%
NC	6		
24 h		1.08 ± 0.13	0.02 ± 0.01
48 h		1.09 ± 0.14	0.03 ± 0.02
72 h		1.07 ± 0.14	0.04 ± 0.02
mimics-NC	6		
24 h		1.01 ± 0.15	0.04 ± 0.02
48 h		1.03 ± 0.16	0.05 ± 0.02
72 h		1.02 ± 0.15	0.07 ± 0.03
mimics	6		
24 h		3.17 ± 0.62	23.68 ± 3.64
48 h		4.22 ± 0.79	50.98 ± 6.13
72 h		4.24 ± 0.77	52.74 ± 6.44
时间 <i>F, P</i> 值		249.759, < 0.001	1 052.993, < 0.001
组间 <i>F, P</i> 值		4.013, 0.025	51.905, < 0.001
交互 <i>F, P</i> 值		3.850, 0.009	51.705, < 0.001



注: 1—空白对照组; 2—miR-129-5p 模拟物-空白对照组; 3—miR-129-5p 模拟物。

图 1 miR-129-5p 对喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞克隆能力的影响 (每组选取了两张平板克隆)

**2.4 上调 miR-129-5p 抑制喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞侵袭** 与 NC 组(235.62 ± 36.18)、mimics-NC 组(227.31 ± 35.90)侵袭细胞数比较,差异无统计学意义( $t = 0.645, P = 0.893$ )。与 NC 组、mimics-NC 组比较, mimics 组喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞侵袭细胞数显著减少( $t = 10.955, 10.310$ , 均  $P < 0.001$ )。详见图 2。

**2.5 上调 miR-129-5p 抑制喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖相关 c-Myc、Cyclin D1 蛋白表达** NC 组、

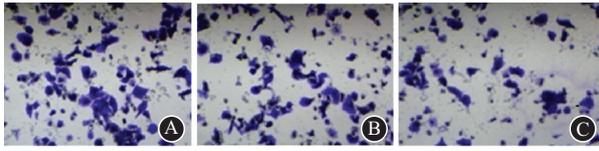


图2 显微镜下侵袭喉鳞状细胞癌Hep-2细胞数量(200×):A为空白对照组;B为miR-125-5p模拟物-空白对照组;C为miR-125-5p模拟物

mimics-NC组 c-Myc、Cyclin D1 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与NC组、mimics-NC组比较,mimics组喉鳞状细胞癌Hep-2细胞 c-Myc、Cyclin D1 表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。详见表3、图3。

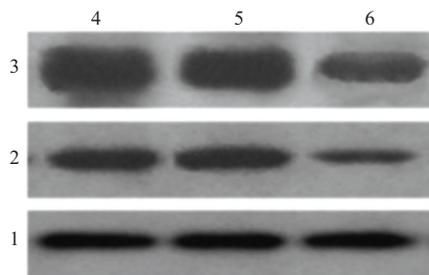
表3 喉鳞状细胞癌Hep-2细胞增殖相关c-Myc、Cyclin D1蛋白表达水平 $\bar{x} \pm s$

组别	复孔数	c-Myc/ $\beta$ -actin	Cyclin D1/ $\beta$ -actin
NC组	6	3.92 $\pm$ 0.71	1.54 $\pm$ 0.27
mimics-NC组	6	3.89 $\pm$ 0.60	1.52 $\pm$ 0.30
mimics组	6	2.18 $\pm$ 0.46 <sup>①②</sup>	0.39 $\pm$ 0.08 <sup>①②</sup>
F值		16.601	46.069
P值		<0.001	<0.001

注:c-Myc为一抗鼠源原癌基因; $\beta$ -actin为 $\beta$ -肌动蛋白;Cyclin D1为细胞周期蛋白D1;NC为空白对照组;mimics-NC为miR-125-5p模拟物-空白对照组;mimics为miR-125-5p模拟物。

①NC组与mimics组比较, $t = 7.118, 11.858$ ,均 $P < 0.001$ 。

②mimics-NC组与mimics组比较, $t = 6.995, 11.652$ ,均 $P < 0.001$ 。



注:1— $\beta$ -肌动蛋白;2—细胞周期蛋白D1;3—抗鼠源原癌基因;4—为空白对照组;5—miR-125-5p模拟物-空白对照组;6—miR-125-5p模拟物。

图3 WB检测喉鳞状细胞癌Hep-2细胞增殖相关c-Myc、Cyclin D1蛋白表达

**2.6 下调 miR-129-5p 抑制喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞侵袭相关 MMP-2、MMP-9 蛋白表达** NC组、mimics-NC组 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与NC组、mimics-NC组比较,mimics组Hep-2细胞MMP-2、MMP-9蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。详见表4、图4。

### 3 讨论

随着近来高通量测序及芯片技术的发展,人们对miRNA的功能研究不断深入,越来越多研究发现,miRNA异常表达与包括喉癌在内的多种恶性肿

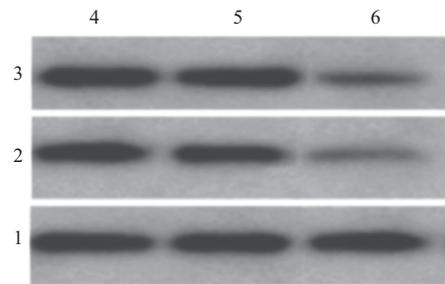
表4 喉鳞状细胞癌Hep-2细胞侵袭相关MMP-2、MMP-9蛋白表达水平 $\bar{x} \pm s$

组别	复孔数	MMP-2/ $\beta$ -actin	MMP-9/ $\beta$ -actin
NC组	6	1.12 $\pm$ 0.28	1.03 $\pm$ 0.14
mimics-NC组	6	1.11 $\pm$ 0.25	0.98 $\pm$ 0.13
mimics组	6	0.36 $\pm$ 0.07 <sup>①②</sup>	0.29 $\pm$ 0.05 <sup>①②</sup>
F值		23.461	78.938
P值		<0.001	<0.001

注:NC为空白对照组,mimics-NC为miR-125-5p模拟物-空白对照组,mimics为miR-125-5p模拟物,MMP-2为基质金属蛋白酶2, $\beta$ -actin为 $\beta$ -肌动蛋白,MMP-9为基质金属蛋白酶9。

①NC组与mimics组比较 $t = 7.118, 11.858$ ,均 $P < 0.001$ 。

②mimics-NC组与mimics组比较 $t = 6.995, 11.652$ ,均 $P < 0.001$ 。



注:1— $\beta$ -肌动蛋白;2—基质金属蛋白酶9;3—基质金属蛋白酶2;4—为空白对照组;5—miR-125-5p模拟物-空白对照组;6—miR-125-5p模拟物。

图4 WB检测喉鳞状细胞癌Hep-2细胞侵袭相关MMP-2、MMP-9蛋白表达

瘤发生发展密切相关<sup>[10-11]</sup>。miRNA在喉癌中上调表达,可发挥促癌基因作用,miRNA下调表达,则发挥抑癌基因作用。范钰等<sup>[2]</sup>研究报道,miR-21在喉癌组织中上调表达,下调miR-21可抑制喉鳞状细胞癌Hep-2细胞增殖及侵袭。侯素平等<sup>[12]</sup>研究报道,miR-1264在喉鳞状细胞癌组织中下调表达,上调miR-1264可抑制喉鳞状细胞癌Hep-2细胞增殖、迁移及侵袭能力。Cheng等<sup>[6]</sup>研究报道,miR-129-5p在肺癌组织中显著下调,miR-129-5p可通过靶向抑制血管内皮生长因子(VEFG)抑制肺癌H1299细胞、SPS-A1细胞增殖迁移和侵袭能力。Han, Wang<sup>[13]</sup>研究报道,miR-129-5p在骨肉瘤及细胞系中显著下调,miR-129-5p可通过直接靶向抑制Rho-相关蛋白激酶1(ROCK1)基因抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭。本研究结果发现,miR-129-5p在喉鳞状细胞癌组织中表达水平显著低于癌旁组织,提示miR-129-5p下调可能与喉鳞状细胞癌发生有关。

为进一步验证miR-129-5p与喉鳞状细胞癌的关系,本研究以喉鳞状细胞癌Hep-2细胞为模型,采用脂质体转染miR-129-5p mimics、MTT、平板克隆、侵袭等体外细胞试验探讨miR-129-5p多喉鳞状细

胞癌 Hep-2 细胞生物学行为的影响,结果发现,与 NC 组及 mimics-NC 组比较,转染 miR-129-5p mimics 48h 使 miR-129-5p 显著上调 4 倍以上,且对喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖抑制率达 50% 以上,提示转染 miR-129-5p mimics 48 h 转染效率及抑制效率最佳,可用于下游试验。

侵袭和转移是恶性肿瘤的重要生物学特征,侵袭和转移能力也是癌细胞区别与正常细胞的最基本特征,是导致恶性肿瘤复发病情恶化,最终死亡的病理基础<sup>[14-15]</sup>。研究发现,过表达 miR-129-5p 与骨癌细胞、骨肉瘤细胞、乳腺癌细胞等多种肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭能力有关<sup>[8,13-14]</sup>。本研究结果发现,与 NC 组、mimics-NC 组比较,mimics 组喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞平板克隆形成率及侵袭细胞数目显著降低,提示过表达 miR-129-5p 可抑制喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖、侵袭能力。原癌基因 c-Myc 和 G1/S 特异性周期蛋白 Cyclin D1 在肿瘤细胞中的高表达,可加速肿瘤细胞增殖及恶化程度<sup>[16-17]</sup>。MMP 家族蛋白成员 MMP-2、MMP-9,可破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,促进其侵袭、转移<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,与 NC 组、mimics-NC 组比较,mimics 组喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞中 c-Myc、Cyclin D1 蛋白及 MMP-2、MMP-9 蛋白表达显著降低,进一步验证 miR-129-5p 可影响喉鳞状细胞癌细胞增殖及侵袭,提示 miR-129-5p 可能在喉鳞状细胞癌中发挥类似抑癌基因作用。

综上所述,miR-129-5p 在喉鳞状细胞癌组织中低表达,上调 miR-129-5p 可抑制喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞增殖、侵袭能力。但关于 miR-129-5p 的靶向调控基因及影响喉鳞状细胞癌 miR-129-5p 增殖、侵袭的靶向调控基因及可能相关通路尚不清楚,后期需进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] LI P, HU W, ZHU Y, et al. Treatment and predictive factors in patients with recurrent laryngeal carcinoma: A retrospective study [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(5): 3145-3152.
- [2] 范钰, 蒋孟林, 沈荣, 等. 下调微小 RNA-21 对人肿瘤 Hep-2 细胞生长和侵袭的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(1): 198-201.
- [3] 王轶, 周玉琳, 覃泽平. miR-155 对喉鳞状细胞癌 Hep2 细胞增殖影响及机制 [J]. *中国公共卫生*, 2017, 33(7): 1070-1074.
- [4] 王国栋, 黄建涛, 赵云富, 等. miR-141 抑制头颈部鳞癌细胞增殖 [J]. *第二军医大学学报*, 2015, 36(12): 1314-1318.
- [5] WONG N, KHWAJA SS, BAKER CM, et al. Prognostic microRNA signatures derived from the cancer genome atlas for head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Cancer Med*, 2016, 5(7): 1619-1628.
- [6] CHENG XK, LIN WR, JIANG H, et al. MicroRNA-129-5p inhibits invasiveness and metastasis of lung cancer cells and tumor angiogenesis via targeting VEGF [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7): 2827-2837.
- [7] ZENG H, WANG J, CHEN T, et al. Downregulation of long non-coding RNA Opa interacting protein 5-antisense RNA 1 inhibits breast cancer progression by targeting sex-determining region Y-box 2 by microRNA-129-5p upregulation [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(1): 289-302.
- [8] GU X, GONG H, SHEN L, et al. MicroRNA-129-5p inhibits human glioma cell proliferation and induces cell cycle arrest by directly targeting DNMT3A [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(9): 2834-2847.
- [9] 范钰, 徐娟, 周永静, 等. RNA 干扰下调叉头转录因子 M1 基因对人肿瘤细胞生长、克隆和侵袭的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(7): 1543-1546.
- [10] 李金花, 杨文君, 崔彩霞. microRNA 与喉癌 [J]. *中国医师杂志*, 2015, 17(4): 617-620.
- [11] 徐洁欢, 向琳, 李耀军, 等. miRNA-381 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *中国当代医药*, 2020, 27(21): 22-25.
- [12] 侯素平, 赵娟霞, 杨丽娟, 等. miR-1264 对喉癌 Hep2 细胞增殖和迁移的影响 [J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(3): 273-278.
- [13] HAN C, WANG W. MicroRNA-129-5p suppresses cell proliferation, migration and invasion via targeting ROCK1 in osteosarcoma [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4777-4784.
- [14] YU SN, LIU GF, LI LY, et al. Analgesic effects of microRNA-129-5p against bone cancer pain through the EphB1/EphrinB2 signaling pathway in mice [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 2876-2885.
- [15] 李国彬, 张占成, 王新颜. 上调 miR-200b 对人喉癌 Hep-2 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2018, 32(4): 53-57.
- [16] YUDHANI RD, ASTUTI I, MUSTOFA M, et al. Metformin modulates cyclin d1 and p53 expression to inhibit cell proliferation and to induce apoptosis in cervical cancer cell lines [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(6): 1667-1673.
- [17] DU J, FAN JJ, DONG C, et al. Inhibition effect of exosomes-mediated Let-7a on the development and metastasis of triple negative breast cancer by down-regulating the expression of c-Myc [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(12): 5301-5314.
- [18] URRUTIA G, LAURITO S, CAMPOY E, et al. PAX6 promoter methylation correlates with MDA-MB-231 cell migration, and expression of MMP2 and MMP9 [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(10): 2859-2866.
- [19] 孙健, 张磊, 房丹, 等. RECK 及 MMP-2、MMP-9 在神经母细胞瘤组织中的表达与肿瘤侵袭转移研究 [J]. *中华小儿外科杂志*, 2019, 40(2): 167-171.

(收稿日期: 2019-09-02, 修回日期: 2020-12-21)