

参考文献

- [1] 王昊,张毓辉,王秀峰,等.我国民族地区健康产业发展现状及战略研究[J].中国卫生经济,2018,37(3):77-82.
- [2] 王昊,张毓辉,王秀峰,等.国际健康产业发展趋势与经验研究[J].卫生软科学,2018,32(6):7-9.
- [3] 翟俊霞.河北省健康产业进入京津市场的构想与切入点[J].临床合理用药杂志,2012,5(4):179-180.
- [4] 焦旭祥.把握跨界融合大趋势 谱写健康产业新篇章[J].浙江经济,2017(15):6-8.
- [5] 魏巍,张慧颖.政策工具视角下的京津冀健康产业政策文本量化比较研究[J].中国卫生政策研究,2018,11(7):54-60.
- [6] 张车伟,赵文,程杰.中国大健康产业:属性、范围与规模测算[J].经济研究参考,2018(66):3-13,25.
- [7] 张车伟.关于发展我国大健康产业的思考[J].人口与社会,2019,35(1):18-22.
- [8] 鲍勇.中国健康产业发展机遇和挑战:基于健康中国的思考[J].中国农村卫生事业管理,2019,39(2):78-82.
- [9] 鲍勇,王魁平.基于国际经验的中国健康产业发展战略与策略[J].中华全科医学,2019,17(6):887-890.
- [10] 王禅,杨肖光,白冰,等.美国健康产业发展及对我国的启示[J].中国卫生经济,2014,33(12):116-119.
- [11] 邱灵.加快将健康产业培育成为新增长点[J].宏观经济管理,2016(11):41-43.
- [12] 王晶晶,丰志培,陶群山.安徽省健康产业发展论略[J].中国卫生事业管理,2016,33(3):229-232.
- [13] 海青山,金亚菊.大健康概念的内涵和基本特征[J].中医杂志,2017,58(13):1085-1088.
- [14] 唐钧.大健康与大健康产业的概念、现状和前瞻——基于健康社会学的理论分析[J].山东社会科学,2020(9):81-87.
- [15] 张毓辉,王秀峰,万泉,等.中国健康产业分类与核算体系研究[J].中国卫生经济,2017,36(4):5-8.
- [16] 倪春霞,张晓燕.从公共产品理论看健康产业的概念与分类[J].卫生经济研究,2016(6):9-11.
- [17] 刘治君,裴敬,罗增永,等.基于产业经济学视角的健康产业概念探析[J].卫生经济研究,2015(11):25-29.
- [18] 王婷婷,徐阳洋.关于健康产业中的互联网金融运行研究[J].新金融,2016(2):37-42.
- [19] 侯仕敏.新中国70年我国健康需求与健康产业的变迁[J].人口与健康,2019(11):31-34.
- [20] 孙燕茹,聂礼贺,陆召军,等.徐州市糖尿病病人对“互联网+医疗健康”管理模式的接受情况及影响因素的调查[J].安徽医药,2020,24(4):751-755.
- [21] 黄蓉,傅智能.基于CiteSpace的大健康产业研究可视化分析[J].社会科学动态,2020(5):57-62.

(收稿日期:2021-02-23,修回日期:2021-04-01)

引用本文:杨雪,冯志星,马海滨,等.微小RNA-107调控内质网应激对喉癌 Hep-2 细胞增殖及凋亡的影响[J].安徽医药,2022,26(5):904-907.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.05.013.

◇临床医学◇



微小RNA-107调控内质网应激对喉癌 Hep-2 细胞增殖及凋亡的影响

杨雪,冯志星,马海滨,任雪燕,单珊,韩海平

作者单位:邯郸市中心医院耳鼻喉科,河北 邯郸 056001

基金项目:河北省医学科学研究项目(20200485)

摘要: **目的** 探讨微小RNA(miR-107)调控内质网应激对喉癌 Hep-2 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 将 miR-107 类似物和阴性对照片段转染至对应组细胞中,以未转染组作为空白组。采用荧光定量 PCR(RT-PCR)检测各组 Hep-2 细胞中 miR-107 相对表达量,用蛋白质印迹法(Western blotting)检测各组 Hep-2 细胞中的内质网应激有关蛋白即蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)及活化转录因子 4(ATF4)蛋白的表达,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定 Hep-2 细胞的增殖能力,用流式细胞术检测细胞凋亡情况。**结果** 三组转染细胞 miR-107 相对表达量差异有统计学意义($\chi^2=11.50, P<0.05$)。其中 mimics 组 miR-107 的相对表达量为 (15.32 ± 1.94) ,与 mimics 组相比较,NG 组、空白组 miR-107 相对表达量均降低($P<0.05$)。三组转染细胞的 PERK 和 ATF4 蛋白表达水平均差异有统计学意义($F=70.35, 13.77, P<0.05$)。其中 mimics 组 PERK 和 ATF4 蛋白的相对表达量为 (0.53 ± 0.07) 和 (0.75 ± 0.06) ,与 mimics 组相比较,NG 组和空白组的 PERK 和 ATF4 蛋白相对表达量均降低($P<0.05$)。MTT 分析结果显示,三组细胞的增殖能力差异有统计学意义($F=21.44, 28.38, 59.14, P<0.05$)。其中 mimics 组 Hep-2 细胞增殖能力在 12、24、36 h 时分别为 (0.15 ± 0.01) 、 (0.33 ± 0.03) 和 (0.47 ± 0.04) ,与 mimics 组比较,在 12、24、36 h 后 NG 组、空白组 Hep-2 细胞增殖能力均有显著升高($P<0.05$)。三组转染细胞的细胞凋亡率比较差异有统计学意义($F=102.32, P<0.05$)。其中 mimics 组 Hep-2 细胞凋亡率为 (10.18 ± 0.93) ,与 mimics 组相比较,NG 组和空白组的细胞凋亡率均降低($P<0.05$)。**结论** 上调 miR-107 的表达能够抑制 Hep-2 细胞的增殖,促进 Hep-2 细胞凋亡,内质网应激可能在其中有重要作用。

关键词: 微小RNA-107; 内质网应激; 喉癌 Hep-2 细胞; 增殖; 凋亡

Effect of miR-107 on the proliferation and apoptosis of laryngeal carcinoma Hep-2 cells by regulating endoplasmic reticulum stress

YANG Xue, FENG Zhixing, MA Haibin, REN Xueyan, SHAN Shan, HAN Haiping

Author Affiliation: Department of Otolaryngological, Handan Central Hospital of Hebei, Handan, Hebei 056001, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of miR-107 on the proliferation and apoptosis of laryngeal carcinoma Hep-2 cells by regulating endoplasmic reticulum stress. **Methods** The miR-107 analog and negative control fragment were transfected into the corresponding group of cells, and the untransfected group was used as the blank group. Fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) was used to detect the relative expression of miR-107 in Hep-2 cells in each group, and Western blot (WB) was used to detect the expression of endoplasmic reticulum stress proteins including protein kinase R-like ER kinase (PERK) and Activating Transcription Factor 4 (ATF4) protein in Hep-2 cells in each group. Tetramethylazolazole (MTT) Chromatography was used to determine the proliferation ability of Hep-2 cells, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis. **Results** The relative expression of miR-107 in the three groups of transfected cells was significantly different ($\chi^2=11.50$, $P<0.05$). The relative expression of miR-107 in the mimics group was (15.32 ± 1.94) . Compared with the mimics group, the relative expression of miR-107 in the NG group and the blank group was decreased ($P<0.05$). The differences in the expression levels of PERK and ATF4 proteins of the three groups of transfected cells were statistically significant ($F=70.35, 13.77$, $P<0.05$). The relative expression levels of PERK and ATF4 protein in the mimics group were (0.53 ± 0.07) and (0.75 ± 0.06) . Compared with the mimics group, the relative expression levels of PERK and ATF4 proteins in the NG group and the blank group were both decreased ($P<0.05$). The results of MTT analysis showed that there was a statistically significant difference in the proliferation ability of the three groups of cells ($F=21.44, 28.38, 59.14$, $P<0.05$). The proliferation ability of Hep-2 cells in the mimics group was (0.15 ± 0.01) , (0.33 ± 0.03) and (0.47 ± 0.04) at 12, 24, and 36 h, respectively. Compared with the mimics group, the proliferation ability of Hep-2 cells in the NG group and the blank group was significantly increased after 12, 24, and 36 h ($P<0.05$). The difference in apoptosis rate of the three groups of transfected cells was statistically significant ($F=102.32$, $P<0.05$). Among them, the apoptosis rate of Hep-2 cells in the mimics group was (10.18 ± 0.93) . Compared with the mimics group, the apoptosis rate of the NG group and the blank group were both decreased ($P<0.05$). **Conclusions** Up-regulating the expression of miR-107 can inhibit the proliferation of Hep-2 cells and promote the apoptosis of Hep-2 cells. Endoplasmic reticulum stress may play an important role in it.

Key words: MiR-107; Endoplasmic reticulum stress; Laryngeal carcinoma Hep-2 cells; Proliferation; Apoptosis

喉癌是一种呼吸道最为常见的恶性肿瘤之一,在我国喉癌约占头颈部恶性肿瘤发病率的14%,约占全身癌症的1%~5%^[1-2]。尽管随着医疗技术水平的提高,在临床上针对喉癌的治疗方式有了一定的提高,但喉癌患者预后依旧效果不佳,严重影响了患者的生活质量^[3]。miR-107作为微小核糖核酸(microRNAs, miRNA)家族一员,已被证实在多种肿瘤组织中存在异常表达,参与了包括胃癌、结直肠癌和卵巢癌等多种癌症的发生、发展过程^[4-6]。内质网作为调节胞内蛋白质合成、折叠和聚积的细胞器,在病理刺激下内质网功能会受到影响,未折叠蛋白和错误折叠蛋白过度聚集于内质网,引发内质网应激反应^[7]。当内质网发生应激反应时,蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)作为感受内质网应激信号的跨膜蛋白被激活,活化转录因子4(activating transcription factor 4, ATF4)持续过表达,提高分子伴侣水平,使得细胞适应内质网应激,维持胞内稳态^[8-9]。本研究自2020年2—7月检测miR-107在喉癌Hep-2细胞中的表达,探讨miR-107调控内质网应激对细胞增殖和凋亡影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验细胞:Hep-2喉癌细胞株由中国科学院(上海)细胞库提供。

实验试剂及材料:RPMI1640培养基、胎牛血清由美国Hyclon公司提供,MTT、Trizol试剂、SYBR@Green RT-PCR试剂盒、RNA逆转录试剂盒均购自Sigma-Aldrich公司,miR-107寡聚核苷酸、PCR引物合成均由上海生工生物有限公司完成,兔抗人凋亡抑制蛋白单克隆抗体购自美国Abcam公司,兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体、山羊抗兔IgG二抗均购自美Bioword公司。

1.2 试验方法

1.2.1 Hep-2细胞培养及转染 将Hep-2细胞置于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的RPMI1640培养基中培养,在37℃、5%二氧化碳培养箱中孵育,每2天进行一次传代。参考Lipofectamine2000转染说明书进行操作,空白组不做任何干预,将miR-107类似物(miR-107 mimics)和阴性对照(negative control)片段转染至mimics组和NG组细胞中,其中转染浓度为60 nmol/L。转染后在37℃、含体积分数5%二氧化碳培养箱中孵育,收集

生长状况良好,处于对数生长期时的细胞进行后续的实验操作。

1.2.2 RT-PCR 检测各组 Hep-2 细胞中 miR-107 相对表达量 取处于转染 48 h 的 Hep-2 喉癌细胞通过 Trizol 试剂提取得到转染细胞中的总 RNA,参照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,应用 SYBRGreen 实时荧光定量 PCR 法,对 miR-107 的表达进行荧光定量分析。热循环反应条件为:95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s、60 °C 退火 20 s、72 °C 延伸 20 s 共 40 个循环。选择 U6 作为 miR-107 的内参,所得数据用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值法计算各组细胞中 miR-107 的相对表达量。

1.2.3 蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测各组 Hep-2 细胞中 PERK 及 ATF4 蛋白的表达 取处转染 48 h 的 Hep-2 喉癌细胞,加入裂解液以提取各种细胞总蛋白,二喹啉甲酸 (BCA) 法测定蛋白浓度。每孔加入 50 μ g 蛋白溶液进行电泳分离后转膜,5% 脱脂奶粉封闭,4 °C 冰箱孵育过夜,用兔抗人单克隆一抗 (工作浓度 1:5 000) 室温下孵育 2 h,再用过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (工作浓度 1:5 000) 室温下孵育 30 min,以 GAPDH 为内参,用 Bandscan 5.0 软件进行半定量分析。

1.2.4 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法测定 Hep-2 细胞的增殖能力 取对数生长期的 Hep-2 细胞以 2 000 个/孔接种于 96 孔板,每组 6 个复孔,转染 12、24、36 h 后每孔加入 5 g/L MTT 20 μ L,37 °C 孵育 4 h,弃去培养基,每孔加二甲基亚砜 150 μ L 低速振荡 10 min,置酶标仪于 570 nm 测定各孔的吸光度。吸光度值越高则意味着细胞越多。

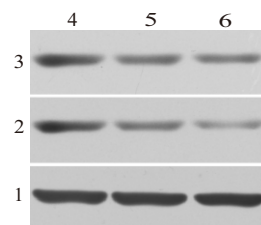
1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 用转染 48 h 后的各组细胞,经预冷的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 漂洗后,重悬收集细胞,并用 PBS 洗涤 3 次。加入 Annexin V-FITC 混匀,在室温条件下避光染色 20 min,再加入 PI,在一小时内使用流式细胞仪观察各组细胞的凋亡情况。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐的多组均值比较采用用单因素方差分析,多组间两两比较行 LSD 法,方差不齐的多组均值采用秩和检验分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hep-2 细胞中 miR-107 相对表达量 转染 48 h 后,RT-PCR 检测结果显示,三组转染细胞 miR-107 相对表达量差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.50$, $P = 0.003$)。与 mimics 组 (15.32 ± 1.94) 比较,NG 组 (0.97 ± 0.02)、空白组 miR-107 相对表达量 (0.96 ± 0.03) 均降低 ($P < 0.05$)。

2.2 Hep-2 细胞中 PERK 和 ATF4 蛋白的相对表达量 三组转染细胞的 PERK 和 ATF4 蛋白表达水平均差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 mimics 组相比,NG 组和空白组的 PERK 和 ATF4 蛋白相对表达量均降低 ($P < 0.05$)。结果见图 1、表 1。



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—活化转录因子4(ATF4);3—蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK);4—mimics 组;5—NG 组;6—空白组。

图 1 三组转染细胞中 PERK 和 ATF4 蛋白的表达

表 1 三组转染细胞中蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)及活化转录因子 4(ATF4)蛋白相对表达量的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	PERK	ATF4
mimics 组	6	0.53 ± 0.07	0.75 ± 0.06
NG 组	6	0.18 ± 0.05^{①}	0.28 ± 0.04^{①}
空白组	6	0.19 ± 0.05^{①}	0.29 ± 0.04^{①}
F 值		70.35	183.77
P 值		<0.001	<0.001

注:①与 mimics 组相比较, $P < 0.05$ 。

2.3 miR-107 对 Hep-2 细胞的增殖能力的影响 MTT 分析结果显示,mimics 组、NG 组和空白组细胞的增殖能力差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 mimics 组比较,在 12、24、36 h 后 NG 组、空白组 Hep-2 细胞增殖能力均有显著升高 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 三组转染细胞在 570 nm 光密度 (OD) 值比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-107		
		12 h	24 h	36 h
mimics 组	6	0.12 ± 0.02	0.24 ± 0.04	0.37 ± 0.04
NG 组	6	0.18 ± 0.02	0.39 ± 0.04	0.61 ± 0.05
空白组	6	0.19 ± 0.02	0.41 ± 0.05	0.63 ± 0.05
F 值		21.44	28.38	59.14
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 miR-107 对 Hep-2 细胞凋亡的影响 三组转染细胞的细胞凋亡率比较差异有统计学意义 ($F = 102.32$, $P < 0.05$)。与 mimics 组 (10.18 ± 0.93)% 比较,NG 组 (4.33 ± 0.68)% 和空白组细胞凋亡率 (4.55 ± 0.78)% 均降低 ($P < 0.05$),NG 组细胞凋亡率与空白组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

喉癌作为头颈部较为常见的恶性肿瘤之一,并

且发病率在近年来有上升趋势。有研究^[10]认为,喉癌的发生可能与吸烟、饮酒及空气污染等因素有关,且存在多种因素相互作用,但目前对其具体发病机制尚未明确,临床上喉癌的预后效果不佳。因此,喉癌发病机制及喉癌治疗靶点的研究对于喉癌的临床诊治具有重要意义。

近年来有研究表明,miRNA能够通过多种机制对癌症的发生、发展起到调控作用^[11]。研究发现,在肺癌组织中 miR-107 表达明显降低,过表达的 miR-107 通过 Notch 信号通路能够显著抑制肺癌细胞 A549 的增殖、侵袭和迁移能力^[12],贾振亚等^[13]研究也发现,上调 miR-107 的表达能够明显抑制 Hep-2 细胞的增殖。在本次研究中,取喉癌 Hep-2 细胞分别转染 miR-107 mimics、negative control 片段,目的在于促进 Hep-2 细胞中 miR-107 表达,实验结果显示,与 mimics 组相比较,NG 组、空白组 miR-107 相对表达量均降低,结果提示转染成功,可以利用此细胞用于后续实验的探讨。MTT 结果显示,成功上调 miR-107 表达的 mimics 组 Hep-2 细胞在 12、24、36 h 后的增殖能力均低于 NG 组、空白组,并且随时间的增加差异愈加明显;另一方面,与 mimics 组相比较,NG 组和空白组的细胞凋亡率均降低。这一结果提示 miR-107 与喉癌 Hep-2 细胞的增殖和凋亡密切相关,当 miR-107 过表达时,能够抑制喉癌 Hep-2 细胞的增殖,并促进其凋亡。

内质网应激是细胞在缺氧、氧化应激等各种因素刺激下,引发内质网内为折叠蛋白及错位折叠蛋白聚集,内质网调节能力失控进而导致其功能紊乱的状态^[14]。当内质网应激信号存在时,作为内质网膜上跨膜蛋白的 PERK 被激活,发生二聚化和磷酸化,同时大多数 mRNA 的翻译受到抑制,蛋白质的合成减少;而 ATF4 mRNA 表达得到促进,ATF4 过表达能够促进 Bcl-2 家族蛋白失衡,引发与细胞凋亡、氧化还原反应等有关基因的转录翻译^[8,15]。有研究表明,上调 ATF4 的表达能够诱导肝癌细胞凋亡^[16]。本次研究发现,与 mimics 组相比较,NG 组和空白组的 PERK 和 ATF4 蛋白相对表达量均降低,这一结果提示了 PERK 和 ATF4 参与了喉癌的发展过程。

综上所述,miR-107 的表达与喉癌 Hep-2 细胞增殖及凋亡有关,上调 miR-21 能够抑制喉癌 Hep-2 细胞增殖、促进喉癌 Hep-2 细胞凋亡,其作用机制可能与内质网应激有关,在一定程度上为喉癌临床治疗提供了理论参考。此外,本研究也存在一定的不足

之处,如只采用了喉癌 Hep-2 细胞实验,后续还可通过动物实验对数据进行补充,进一步探讨 miR-107 对喉癌的具体作用及其机制。

参考文献

- [1] DU L, LI H, ZHU C, et al. Incidence and mortality of laryngeal cancer in China, 2011 [J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 52-58.
- [2] 赵谦,白艳霞,张少强,等.N-myc 下游调控基因 2 蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及对人喉表皮样癌细胞生物学特性的影响[J]. 安徽医药,2020,24(10):1933-1937.
- [3] SHI X, HU WP, JI QH. Development of comprehensive nomograms for evaluating overall and cancer-specific survival of laryngeal squamous cell carcinoma patients treated with neck dissection [J]. Oncotarget, 2017, 8(18):29722-29740.
- [4] AYREMLOU N, MOZDARANI H, MOWLA SJ, et al. Increased levels of serum and tissue miR-107 in human gastric cancer: correlation with tumor hypoxia [J]. Cancer Biomarkers, 2015, 15(6):851-860.
- [5] 邹德胜,刘卓,茅利明.miR-103 和 miR-107 在结直肠癌患者血清中的表达及其临床意义[J]. 中国卫生检验杂志,2019,29(3):310-313.
- [6] 杨宗元,孙朝阳,周波,等.miR-107 靶向调控 Dicer1 促进卵巢癌细胞系侵袭转移[J]. 肿瘤防治研究,2013,40(7):660-666.
- [7] 李欲钦,熊孟连,徐德,等. 内质网应激与凋亡研究进展[J]. 分子植物育种,2018,16(23):7856-7862.
- [8] 来小丹,欧阳净,石英. 内质网应激 PERK-ATF4-CHOP 通路在苦参碱诱导视网膜母细胞瘤细胞凋亡中的作用[J]. 中国药业,2015,24(22):56-58.
- [9] 杨双艳. 内质网应激介导的 PERK-eIF2 α -ATF4 信号通路在牵张力作用下牙周膜干细胞成骨向分化中的作用研究[D]. 济南:山东大学,2016.
- [10] 朱奕,王胜资. 吸烟相关性喉癌发生机制的研究进展[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志,2015,15(3):213-215.
- [11] SINGH R, RAMASUBRAMANIAN B, KANJI S, et al. Circulating microRNAs in cancer: Hope or hype? [J]. Cancer Lett, 2016, 381(1):113-121.
- [12] 吴瑕,何君,王文军. miR-107 靶向 NID2 通过 Notch 信号通路调控肺癌细胞的增殖侵袭[J]. 中国免疫学杂志,2017, 33(11):1662-1667.
- [13] 贾振亚,曹静,范文洁,等.miR-107 对 HepG2 细胞增殖和细胞周期的影响[J]. 安徽医科大学学报,2014, (10):1400-1404.
- [14] 高轩,陈荔枝,刘振红,等. 白藜芦醇通过抑制内质网应激减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(1): 92-96.
- [15] 李晓娟,夏榕蔓,楼招欢,等. 丹参二萜醌通过 PERK-eIF2 α 通路诱导肺癌 PC9 细胞凋亡的机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2017,32(5):1897-1902.
- [16] 王旭东,黄治勇,石训仁,等. ATF4 在顺铂致肝癌细胞 HepG2 凋亡中的作用[J]. 广东医学,2017,38(9):1322-1325.

(收稿日期:2020-11-17,修回日期:2020-12-25)