

miR-23b 对口腔癌转移影响

杨 青, 潘 悦, 肖桂山*

(大连理工大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 口腔癌转移是威胁全世界生命健康的问题,有效的靶向治疗对口腔癌患者尤为重要.近年来,microRNA(miRNA)作为一种微小的非编码 RNA 在肿瘤转移中发挥着重要的作用,因此,开展了体外探究 miR-23b 在口腔癌转移中的作用.利用实时荧光定量核酸扩增检测系统(qRT-PCR)检测了 miR-23b 在口腔正常细胞和口腔癌细胞中的表达差异,结果显示 miR-23b 在口腔癌细胞中的表达明显高于口腔正常细胞中的表达,且随着口腔癌转移程度的增加而增高($P<0.05$).在此基础上,通过给细胞转染 miR-23b mimics 的方法过表达 miR-23b,以探究该 miRNA 对口腔癌转移的作用.实验结果发现,增加口腔原位癌细胞 Um-2 中 miR-23b 的表达后,该细胞的转移能力显著增强,表明 miR-23b 在口腔癌转移中发挥着重要作用,可能成为临床口腔癌的治疗靶点和口腔癌检测标志物.

关键词: 口腔癌;miR-23b;口腔癌转移;标志物

中图分类号: R739.85

文献标识码: A

doi: 10.7511/dllgxb202001002

0 引 言

口腔癌是发生在口腔部位恶性肿瘤的总称,大部分属于鳞状上皮细胞癌,口腔鳞状细胞癌占口腔癌发病率的 90%.在临床实践中,口腔癌包括牙龈癌、舌癌、唇癌以及发生于颜面部皮肤黏膜的癌症等.口腔癌是一种较易发生在头颈部的恶性肿瘤,其发病率在全身常见恶性肿瘤中位列第 6 位^[1].在大多数国家,口腔癌患者的 5 a 存活率约为 50%,其中唇癌的存活率较高,可以达到 90%,下咽癌的存活率最低^[2].一般来说,临床晚期(TNM 临床分期Ⅲ、Ⅳ期)患者的 5 a 存活率会急剧下降^[3],发病率较高的舌癌在Ⅰ期的 5 a 存活率约为 80%,而在Ⅳ期的 5 a 存活率降至 15%^[4].同时,患者随年龄的增加患口腔癌的概率也会有所升高^[5].

对于口腔癌来说,主要的致病因素是吸烟、饮酒和咀嚼槟榔等不良生活习惯^[6-8].大概 80%的口腔癌患者有吸烟的习惯,这些病人患致死性头颈癌的风险是不吸烟者的 5~7 倍^[9].超过 50%被诊断出口腔癌的患者临床显示有饮酒的历史,

酒精和烟草的协同作用可以增加致癌物亚硝胺的黏膜通透性,因此会显著增加患口腔癌的概率^[6].口腔鳞状细胞癌是侵袭性病变,存在神经周围生长,它具有显著的复发率并且经常转移到颈部淋巴结^[10].研究表明,Ⅰ/Ⅱ期隐匿性颈部转移的发生率高达 42%^[11],至少有 50%的晚期头颈癌患者会在治疗的前两年发现局部或远处复发^[12].口腔癌易转移,一旦发生转移,预后极差,迫切需要开发用于口腔癌早期临床诊断和预后的生物标记物,以及治疗口腔癌的新方法^[13].

microRNA(miRNA)是一类长度为 20~24 个核苷酸的内源性小分子 RNA,广泛分布在细胞中,具有重要的调节作用^[14].近年来大量研究发现,miRNA 的作用机制一般是通过不完全互补结合靶基因并抑制靶基因的表达翻译,从而使一些基因表达异常,进而使细胞内过程发生紊乱,产生炎症、应激反应、分化、凋亡等现象^[15-16].由于各个方面的生物学影响,miRNA 的异常表达均有可能导致一些肿瘤的发生^[13].

近来有研究表明,一些 miRNA 在口腔癌中表达异常并对口腔癌的发生发展起到至关重要的

作用,它们通过控制肿瘤基因的表达来实现对癌细胞增殖和转移的调控^[17].一些 miRNA 在口腔癌中的表达上调,而有些 miRNA 表达下调,与正常组比较均会具有显著性差异^[18].这种差异性表达提示 miRNA 可能与口腔癌的发生发展有关,因此 miRNA 可能成为一种新型的口腔癌诊断标记物并为口腔癌的靶向治疗提供新的方法^[19].已有研究表明 miR-23b 在癌症中异常表达,并靶向参与癌症的发生发展,如增殖、迁移、侵袭和转移^[20].然而,miR-23b 在口腔癌转移中的作用却少有人研究,本文首先检测 miR-23b 在口腔正常细胞和口腔癌细胞中的表达差异,根据差异性利用体外细胞转染 miRNA 的 mimics 或 inhibitor 的方法人工干预 miRNA 的表达,再利用转移实验检测该 miRNA 对口腔癌转移的作用.

1 材料与方法

材料:DMEM/F12 培养基、DMEM 培养基、Trypsin-EDTA、胎牛血清购自 Gibco; Trizol、Lip2000 购自 Invitrogen;miR-23b mimics 购自吉玛基因;miR-23b 引物 F: TCATCACATTGCCAGGG、R:GAGCAGGGTCCGAGGT 购于金思瑞生物科技有限公司;MTT 购自索莱宝;其余试剂均为国产分析纯.

细胞培养:将 Um-1 和 Um-2 于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养,将 NHOKs、HN4 和 Cal-27 于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,条件为恒温 37℃、5% CO₂.

细胞转染:转染前一天,将对数生长期的 Um-2 细胞消化后接种到 6 孔板上,无血清培养 24 h,第二天转染时的细胞汇合度达到 50%~80% 时,将含 Lip2000 转染试剂和 miR-23b mimics/NC 的复合物加到不含 FBS 培养基的培养孔中,十字形轻摇培养板,使得充分混匀.细胞培养在 37℃、5% CO₂ 培养箱中,5 h 后换成含 10% 胎牛血清培养基,24~96 h 后收集细胞,用于后续实验.

RNA 提取:培养细胞,收获细胞 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 个,移入 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL Trizol,混匀,室温静置 5 min;加入 0.2 mL 氯仿,振荡 15 s,静置 2 min;4℃、12 000g 条件下离心 15 min,取上清;清液转移至新的无 RNA 酶离心管中,加入 0.2 mL 异丙醇,室温静置 5 min,4℃、12 000g 条件下离心 10 min;加入 1 mL 浓

度为 75% 的乙醇,温和振荡离心管,4℃、8 000g 条件下离心 5 min,弃去上清液;室温晾干 5~10 min,以 DEPC 水溶解 RNA 沉淀,用 DU730 测得 RNA 样品浓度.

qRT-PCR:反转录实验完成后在 Roche LC480 仪器上进行 qPCR 反应,设置以下反应程序.预变性:95℃ 30 s,20℃/s,1 个循环;PCR 反应:95℃ 5 s,20℃/s,60℃ 20 s,20℃/s,共 40 个循环;熔解曲线分析:95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s,1 个循环.

MTT 法测定细胞活力:取对数生长期细胞进行 miR-23b mimics 及 NC 转染 5 h 后,将细胞消化、离心、重悬、计数并与每孔 100 μL 细胞混合液接种于 96 孔板中,于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后每孔加入 10 μL 的浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,每次选取 3 个复孔,加入 MTT 4 h 后每孔加入 150 μL 的 DMSO,振板 5 min,使用酶标仪在 490 nm 波长下测定吸光度.

细胞划痕实验:取对数生长期的细胞 Um-2 接种于 6 孔板中,当细胞密度达到 80%~90% 时,进行 miR-23b mimics 及 NC 转染,培养 5 h 后,使用 200 μL 枪头比着直尺均匀用力划线,并用 PBS 轻轻冲洗 3 次,以便洗去划碎的细胞,最后在 6 孔板背面做好标记.用无血清的培养基培养,分别在 0 h 和 24 h 拍照.

数据分析:所有结果数据的平均值用 $\pm$ SD 表示,用 *t* 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 的值被认为具有统计学意义.

2 实验结果

2.1 qRT-PCR 法检测口腔正常细胞和癌细胞中 miR-23b 的差异性

通过 qRT-PCR 法检测口腔正常细胞和癌细胞中 miR-23b 的表达,共选取了 5 种细胞进行实验,其中 NHOKs 为口腔正常细胞,Um-2 和 HN4 为口腔原位癌细胞系,Cal-27 和 Um-1 为口腔癌转移细胞系.由图 1 可见,该 miRNA 在口腔癌细胞中的表达显著高于口腔正常细胞,且随着口腔癌转移程度的增加而增高,即在口腔癌转移细胞系中表达最高.

2.2 MTT 法确定 miR-23b mimics 的转染浓度

为了进一步确定 miR-23b 在口腔癌中的作用,选取了 miR-23b 表达较低的口腔原位癌细胞系 Um-2 并转染不同浓度的 miR-23b mimics,通

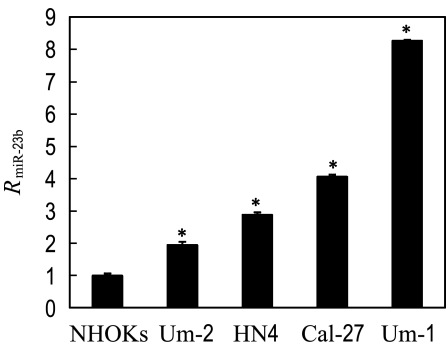


图 1 miR-23b 在口腔正常细胞和癌细胞系中的表达情况

Fig. 1 miR-23b expression in oral normal cell and oral cancer cell lines

过 MTT 法检测细胞活力确定 miR-23b mimics 的转染浓度. Um-2 转染 miR-23b mimics 后正常培养 24 h, 并检测细胞活力. 从图 2 中可见, 100 nmol/L 是 miR-23b mimics 不引起 Um-2 细胞杀伤的最大转染浓度.

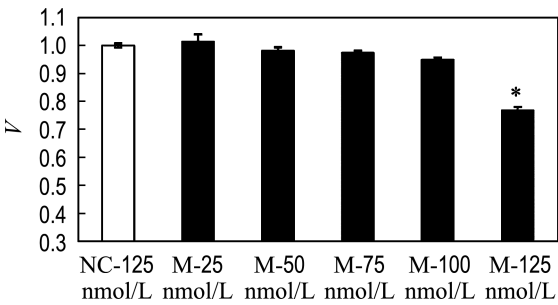


图 2 miR-23b mimics 浓度筛选结果

Fig. 2 Screening results of miR-23b mimics concentration

2.3 Um-2 细胞转染 miR-23b mimics 后的效率检测以及转染前后形态学变化

Um-2 细胞转染 100 nmol/L 浓度的 miR-23b mimics/NC 后, 用 qRT-PCR 检测其转染效率. 结果发现, Um-2 细胞转染 miR-23b mimics 后, 由图 3 可见 miR-23b 在细胞中的表达是对照组的 6 倍, 且由图 4(a) 可见转染后荧光显示良好, 说明转染效率较高, 可用于后续实验. Um-2 转染 miR-23b mimics 后的细胞形态发生了改变, 由图 4(b)、(c) 可见, Um-2 细胞本来呈现出原位癌细胞的形态, 聚团生长, 过表达 miR-23b mimics 后细胞生长较为分散, 且有梭形的形态. 细胞形态学的改变从侧面说明, 过表达 miR-23b mimics 可以改变细胞形态, 起到促进癌细胞转移的作用.

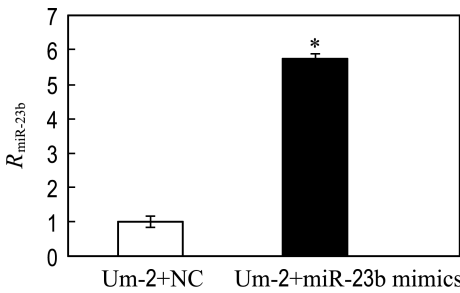
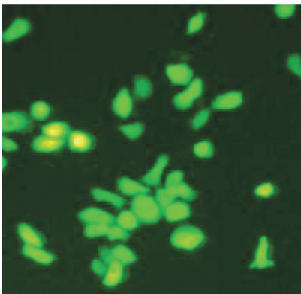
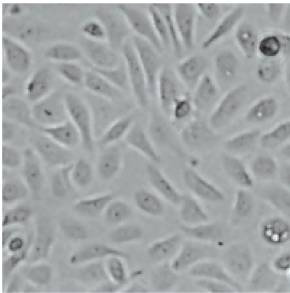


图 3 qRT-PCR 检测 Um-2 细胞转染 miR-23b mimics 的效率

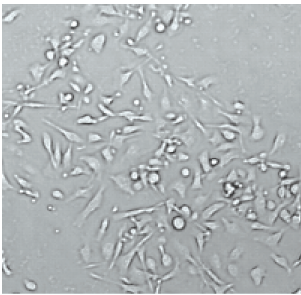
Fig. 3 qRT-PCR detection of efficiency of Um-2 cells transfected with miR-23b mimics



(a) Um-2+100 nmol/L miR-23b mimics



(b) 0 h, Um-2+100 nmol/L miR-23b mimics



(c) 24 h, Um-2+100 nmol/L miR-23b mimics

图 4 miR-23b mimics 荧光序列转染结果图和转染 miR-23b mimics 后 Um-2 的细胞形态学变化

Fig. 4 Fluorescence picture of Um-2 cells transfected with miR-23b mimics and morphological changes of Um-2 after transfection of miR-23b mimics

2.4 miR-23b 对口腔癌细胞转移能力的影响

Um-2 细胞分别转染 50、75 和 100 nmol/L 浓度的 miR-23b mimics, 24 h 后利用划痕实验检测细胞的转移能力. 由图 5 可见, 转染 miR-23b

mimics 的浓度越大, Um-2 细胞迁移的距离越大, 间接说明 Um-2 细胞的转移能力增强, 该实验表明过表达 miR-23b 可以促进口腔癌的转移.

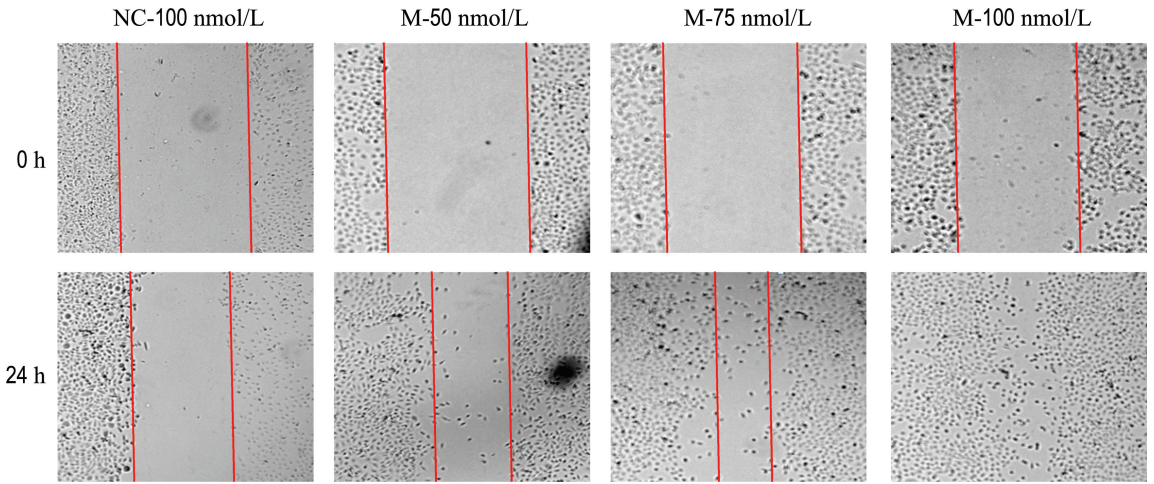


图 5 Um-2 转染 miR-23b mimics 24 h 后的划痕实验结果

Fig. 5 Scratch test results after Um-2 transfection of miR-23b mimics for 24 h

3 结 语

口腔癌是一种由多因素导致的疾病, 致病机制尚未明确. 大量证据表明, 异常表达的 miRNA 与人类肿瘤发生、转移和耐药性密切相关. 口腔癌的预后不良, 主要原因是癌细胞较易通过淋巴结向远处转移. 因此, 探索新的肿瘤标记物 miRNA, 可以为口腔癌的诊断提供新的策略, 探究 miRNA 参与肿瘤的具体机制可能为口腔癌治疗提供新的想法. 本研究发现, miR-23b 在口腔癌细胞中的表达明显高于口腔正常细胞中的表达, 且随着口腔癌转移程度的增加而增高. 在此基础上, 通过给口腔原位癌细胞 Um-2 转染 miR-23b mimics 的方法外界增加 miR-23b 的表达, 结果发现过表达 miR-23b 可以增强细胞的转移能力. 但是其具体的靶向机制尚未清楚, 有待进一步研究.

上述结果表明, miR-23b 在口腔癌转移中发挥重要作用, 可能成为临床口腔癌的治疗靶点和口腔癌检测的标志物. 当然, miRNA 在口腔癌中的作用机制研究仍处于探索阶段, 其具体的参与机制尚未清晰, 因此要从根源上解决口腔癌的诊断和治疗难题, 仍需要继续深入探索.

参考文献:

[1] 张陈平. 口腔癌治疗规范的思考 [J]. 中国肿瘤临

床, 2010, 37(16): 905-907.

ZHANG Chenping. Consideration of standardized treatment protocols for oral cancer [J]. **Chinese Journal of Clinical Oncology**, 2010, 37(16): 905-907. (in Chinese)

[2] WARNAKULASURIYA S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer [J]. **Oral Oncology**, 2009, 45(4/5): 309-316.

[3] NEVILLE B W, DAY T A. Oral cancer and precancerous lesions [J]. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2002, 52(4): 195-215.

[4] RUBIN P, WILLIAMS J P. **Clinical Oncology: A Multidisciplinary Approach for Physicians and Students** [M]. 8th ed. Philadelphia: Saunders, 2001.

[5] WARNAKULASURIYA S, MAK V, MOLLER H. O64 relative survival among young people with oral cancer in South East England [J]. **Oral Oncology Supplement**, 2007, 2(1): 76.

[6] DEEPAK K. Oral cancer [J]. **Mayo Clinic Proceedings**, 2007, 82(7): 878-887.

[7] RAM H, SARKAR J, KUMAR H, *et al.* Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis [J]. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, 2011, 10(2): 132-137.

[8] SUGERMAN P B, SHILLITOE E J. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence

- for and against a causal relationship [J]. **Oral Diseases**, 1997, **3**(3): 130-147.
- [9] JOVANOVIĆ A, SCHULTEN E, KOSTENSE P J, *et al.* Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma [J]. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 1993, **22**(10): 459-462.
- [10] OKURA M, AIKAWA T, SAWAI N Y, *et al.* Decision analysis and treatment threshold in a management for the N0 neck of the oral cavity carcinoma [J]. **Oral Oncology**, 2009, **45**(10): 908-911.
- [11] HO C M, LAM K H, WEI W I, *et al.* Occult lymph node metastasis in small oral tongue cancers [J]. **Head & Neck**, 1992, **14**(5): 359-363.
- [12] WEBER R S, BERKEY B A, FORASTIERE A, *et al.* Outcome of salvage total laryngectomy following organ preservation therapy - The Radiation Therapy Oncology Group Trial 91-11 [J]. **Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery**, 2003, **129**(1): 44-49.
- [13] CHAWLA J P S, IYER N, SOODAN K S, *et al.* Role of miRNA in cancer diagnosis, prognosis, therapy and regulation of its expression by Epstein-Barr virus and human papillomaviruses: With special reference to oral cancer [J]. **Oral Oncology**, 2015, **51**(8): 731-737.
- [14] HA Minju, KIM V N. Regulation of microRNA biogenesis [J]. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2014, **15**(8): 509-524.
- [15] DI LEVA G, GAROFALO M, CROCE C M. MicroRNAs in cancer [J]. **Annual Review of Pathology**, 2014, **9**: 287-314.
- [16] PENG Y, CROCE C M. The role of MicroRNAs in human cancer [J]. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2016, **1**: 15004.
- [17] FABBRI M. MicroRNAs and cancer: Towards a personalized medicine [J]. **Current Molecular Medicine**, 2013, **13**(5): 751-756.
- [18] SASAHIRA T, KIRITA T, KUNIYASU H. Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review [J]. **International Journal of Clinical Oncology**, 2014, **19**(3): 431-436.
- [19] COURTHOD G, FRANCO P, PALERMO L A, *et al.* The role of microRNA in head and neck cancer: current knowledge and perspectives [J]. **Molecules**, 2014, **19**(5): 5704-5716.
- [20] GROSSI I, SALVI A, BAIOCCHI G, *et al.* Functional role of microRNA-23b-3p in cancer biology [J]. **MicroRNA**, 2018, **7**(3): 156-166.

Effect of miR-23b on oral cancer metastasis

YANG Qing, PAN Yue, XIAO Guishan*

(School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Oral cancer metastasis is a problem that threatens life around the world. Effective targeted therapy is especially important for patients with oral cancer. In recent years, it is found that microRNA (miRNA) plays an important role as a tiny non-coding RNA in tumor metastasis. For this reason, an in-vitro study of the role of miR-23b in oral cancer metastasis is carried out. Real-time fluorescent quantitative nucleic acid amplification detection system (qRT-PCR) is used to detect the differential expression of miR-23b in normal oral cells and oral cancer cells, and it is found that the expression of miR-23b in oral cancer cells is significantly higher than that in normal oral cells, and increases with the increase of oral cancer metastasis ($P < 0.05$). Further, the effect of this miRNA on oral cancer metastasis is investigated by transfecting miR-23b mimics to increase the expression of miR-23b. The experimental results show that the expression of miR-23b in Um-2 cells of oral cancer cells is increased, and the metastatic ability of the cells is significantly enhanced, which indicates that miR-23b plays an important role in oral cancer metastasis and may become a therapeutic target for clinical oral cancer and a new marker for oral cancer detection.

Key words: oral cancer; miR-23b; oral cancer metastasis; marker