

MiR-520b 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进舌鳞状细胞癌侵袭转移



扫码阅读电子版

翁军权 范海东 许力强 刘惠娟

深圳市人民医院口腔医学中心,暨南大学第二临床医学院 518020

通信作者:刘惠娟,Email:653865266@qq.com

【摘要】目的 研究 miR-520b 在舌鳞状细胞癌(TSCC)中的表达,探讨其在 TSCC 侵袭转移过程中的作用及分子机制。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 TSCC 组织及细胞系中 miR-520b 的表达;沉默或过表达 TSCC 细胞株 SCC-9 和 UM1 中 miR-520b 的表达后,实时荧光定量 PCR 检测细胞上皮-间质转化(EMT)相关基因表达;Transwell 小室验证细胞侵袭转移能力改变;TOP/FO 双荧光素酶报告基因系统、实时荧光定量 PCR、Western blot 等检测 miR-520b 表达对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响;生物信息学、Western blot 及双荧光素酶实验验证 miR-520b 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路的潜在靶基因 *Dickkopf 1(DKK1)*。使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,样本均数间比较采用 Student's *t* 检验。**结果** 与正常相邻组织(2.59±1.43)相比,miR-520b 相对表达量在 TSCC 组织中显著上调(5.28±1.63),差异有统计学意义($t=16.04, P=0.0005$),并且与患者中更具侵袭性的 TSCC 表型正相关(5.81±0.74 vs. 3.08±0.89, $t=12.11, P=0.0011$);过表达 miR-520b 促进 TSCC 细胞侵袭转移(SCC-9: 110.8±17.8 vs. 74.7±9.8, $t_{SCC-9}=32.58, P_{SCC-9}=0.0011$; UM1: 178.8±39.7 vs. 90.3±22.5, $t_{UM1}=99.67, P_{UM1}=0.0002$),低表达则相反(SCC-9: 74.7±9.8 vs. 30.9±7.8, $t_{SCC-9}=-31.47, P_{SCC-9}=0.0024$; UM1: 90.3±22.5 vs. 35.7±10.6, $t_{UM1}=-37.89, P_{UM1}=0.0019$);此外,过表达 miR-520b 可靶向抑制 *DKK1*,进而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进 TSCC 细胞上皮-间质转化。**结论** MiR-520b 在 TSCC 中高表达,可能通过抑制 *DKK1* 增强 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进 TSCC 侵袭转移。

【关键词】 癌,鳞状细胞;舌;肿瘤浸润;MiR-520b;Wnt/ β -catenin 信号通路;DKK1

基金项目:国家自然科学基金(青年科学基金项目 81900972);广东省自然科学基金(博士启动项目 2017A030310624)

引用著录格式:翁军权,范海东,许力强,等. MiR-520b 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进舌鳞状细胞癌侵袭转移[J/CD]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2020, 14(3): 155-163.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.03.005

MiR-520b regulates Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote invasion and metastasis of tongue squamous cell carcinoma

Weng Junquan, Fan Haidong, Xu Liqiang, Liu Huijuan

Stomatology Center, 2nd Clinical Medical College of Ji'nan University, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: Liu Huijuan, Email: 653865266@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of miR-520b in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) and explore its role and molecular mechanism in the invasion and metastasis of TSCC. **Methods** Real time quantity polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of miR-520b in different tongue squamous cell carcinoma tissues and cell lines. After silencing or over-expressing miR-520b in tongue squamous cell carcinoma cell lines SCC-9 and UM1, RT-qPCR was used to detect the expression of EMT-related genes; transwell assay was used to verify cell invasion; dual luciferase assay, RT-qPCR, Western blot, etc. were used to detect the effect of miR-520b expression in Wnt/ β -catenin signaling pathway; bioinformatics, Western blot, and dual luciferin enzyme experiments verified that miR-520b regulated the potential targeted gene *Dickkopf 1(DKK1)* in Wnt/ β -catenin signaling pathway. SPSS statistics 21.0 was used for analysis, and student's *t* test was used for comparison between

groups. **Results** Compared with normal adjacent tissues, *miR-520b* was significantly up-regulated in TSCC tissues (5.28 ± 1.63 vs. 2.59 ± 1.43 , $t = -16.04$, $P = 0.0005$), and was significantly positively correlated with the more aggressive TSCC phenotype in patients (5.81 ± 0.74 vs. 3.08 ± 0.89 , $t = 12.11$, $P = 0.0011$); overexpression of *miR-520b* promoted invasion and metastasis of TSCC cells (SCC-9: 110.8 ± 17.8 vs. 74.7 ± 9.8 , $t_{SCC-9} = 32.58$, $P_{SCC-9} = 0.0011$; UM1: 178.8 ± 39.7 vs. 90.3 ± 22.5 , $t_{UM1} = 99.67$, $P_{UM1} = 0.0002$), while low expression on the contrary suppressed (SCC-9: 74.7 ± 9.8 vs. 30.9 ± 7.8 , $t_{SCC-9} = -31.47$, $P_{SCC-9} = 0.0024$; UM1: 90.3 ± 22.5 vs. 35.7 ± 10.6 , $t_{UM1} = -37.89$, $P_{UM1} = 0.0019$). In addition, overexpression of *miR-520b* inhibited *DKK1* (negative regulator of *Wnt*/ β -*catenin* signaling pathway), thereby activating the *Wnt*/ β -*catenin* signaling pathway and promoting epithelial-mesenchymal transition (EMT) of TSCC cells. **Conclusions** *MiR-520b* is highly expressed in TSCC, which may promote the invasion and metastasis of TSCC by inhibiting *DKK1* and activating the *Wnt*/ β -*catenin* signaling pathway.

[Key words] Carcinoma, squamous cell; Tongue; Neoplasm invasiveness; *MiR-520b*; *Wnt*/ β -*catenin*; *DKK1*

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81900972); Natural Science Foundation of Guangdong (2017A030310624)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.03.005

侵袭转移是癌的十大特征之一,也是导致癌症患者死亡的主要原因^[1]。据统计,原发癌只引起约10%的癌症患者死亡,而90%的癌症患者最终死于肿瘤的侵袭转移^[1-2]。因此,了解舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)侵袭转移的分子调控机制对TSCC的治疗至关重要。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约为22个核苷酸的小分子非编码RNA,主要在转录后水平调控靶基因的表达^[3]。越来越多的研究证实,miRNA在肿瘤侵袭转移的过程中起着非常重要的调控作用^[3-5]。miRNA可通过不同信号通路调控细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)影响肿瘤的恶性进展,改变其表达可以逆转EMT和肿瘤恶性表型,进而可能达到治疗的目的^[6-7]。因而,深入研究miRNA在肿瘤侵袭转移过程中的作用及分子机制,可望为肿瘤侵袭转移的治疗和干预提供实验依据。研究发现,*miR-520b*在不同肿瘤中呈现差异性表达,并与肿瘤的侵袭转移密切相关^[8-10]。然而,*miR-520b*在TSCC中的表达和机制功能尚不清楚。因此,本研究旨在阐明*miR-520b*在TSCC中的表达,并探讨其在TSCC侵袭转移过程中的作用及分子机制,为进一步阐明TSCC侵袭转移的机理提供新的思路。

材料与方法

一、一般资料

收集深圳市人民医院口腔颌面外科2018—2019年经住院手术切除的TSCC组织及相应癌旁

2 cm外的正常口腔黏膜组织52例,其中男33例、女19例,年龄35~72岁,平均54.5岁。按国际抗癌联盟(UICC 2003)对TSCC的临床分期标准进行分类,其中:I期17例、II期21例、III期14例。按WHO病理学分级,其中:高分化鳞状细胞癌30例、中分化鳞状细胞癌17例、低分化鳞状细胞癌5例。术后病理及病理科医师重新切片确诊颈淋巴结转移29例、无颈淋巴结转移23例。

1. 纳入标准:(1)肿瘤原发部位为舌体;(2)病例实施了TSCC扩大切除根治术及同侧颈淋巴清扫术;(3)术后病理诊断为TSCC;(4)病例术前均未接受过局部或全身的放射或化学等相关抗肿瘤治疗;(5)病例经病理科医生重新切片核实为TSCC。

2. 排除标准:(1)TSCC复发或再发患者;(2)临床资料不完整病例。

本实验获深圳市人民医院医学伦理委员会批准(批准号:LL-KY-2020054),患者均知情同意并签署知情同意书。

二、主要试剂和仪器

1. 试剂:DMEM/F12培养基、澳洲胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco, 美国);磷酸盐缓冲液(PBS; pH7.2, Hyclone, 美国);青链霉素混合液(北京索莱宝);Lipofectamine™ 2000、OPTI MEM I (Invitrogen, 美国)脂质体2000、总RNA抽提试剂Trizol(Invitrogen, 美国);mirVana™ microRNA提取试剂盒(Ambion, 美国);*miR-520b* mimics:5'-CCCUCUAAAAGGAAGCACUUU-3'、*miR-520b* inhibitor:5'-CCUCUAAAAGGAAGCACUUU-3'、 β -*catenin*-siRNA:

5'-UGGUUGCCUUGCUCAACAA-3'、*TCF4*-siRNA: 5'-AAGUCCGAGAAAG GAAUCUGA-3'、*Dickkopf 1* (*DKK1*)-siRNA: 5'-GAAUAUGUGUGUCUUCUGAU U-3' (上海吉玛制药技术有限公司); β -*catenin*、*DKK1* 一抗 (CST, 美国); α -*Tubulin* 一抗 (Sigma, 美国); *p84* 一抗 (Abcam, 英国); *IgG* 二抗 (CST, 美国); Anti-Rabbit 二抗 (Abcam, 英国); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Promega, 美国); 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本); RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF、核蛋白抽取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Matrigel 基质胶 (BD, 美国)。

2. 仪器: CO₂ 培养箱 (Thermo, 美国), 电热恒温水浴锅 (上海齐欣科学仪器有限公司), ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统 (Bio-Rad, 美国), 倒置生物显微镜 (Nikon, 日本), Mx3000P 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 仪 (Stratagene, 美国), 全自动倒置荧光显微镜 (ZEISS, 美国), 转膜仪 (Bio-Rad, 美国)。

三、实验方法

1. 细胞培养: 人正常舌黏膜上皮细胞 (normal tongue squamous cell, NTSC) 为原代培养, 主要方法为将收集的舌上皮组织用含 1% 青/链霉素的 D-HANKS 液中反复冲洗, 眼科剪小心去除黏膜下多余组织, 置于 Dispase II 中性酶, 4 °C 消化 16 ~ 18 h, 终止消化, 眼科镊小心分离上皮和上皮下组织, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗上皮组织 3 次, 眼科剪剪碎上皮组织, 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 恒温消化 15 min, 加入 5 mL 完全培养基终止消化, 吹打均匀后, 1000 r/min 离心 4 min (离心半径 9.8 cm), 弃上清, 培养于含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液中。

人 TSCC 细胞系 SCC-9、SCC-15、SCC-25、UM1 和 UM2 均获赠于广东省口腔医学重点实验室。复苏后的 SCC-9、SCC-15、SCC-25、UM1、UM2 和 NTSC 分别培养于含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液中, 置于孵育箱中 (37 °C、5% CO₂) 常规培养, 每隔 24 h 换液 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

2. 实时荧光定量聚合酶链反应: 按 Trizol 操作说明提取 TSCC 组织及细胞系中总 RNA, mirVana™ microRNA 提取试剂盒提取 miRNA, 目的基因引物序列 (表 1) 由上海生工生物工程有限公司设计合成, 分别以 *U6* 和 *GAPDH* 作为内参, 对目的基因进行扩增, 实时荧光定量 PCR 反应条件为: 95 °C 3 min 预

变性 → 95 °C 12s 变性 → 62 °C 30 s 退火 → 72 °C 30 s 延伸, 共 40 个循环 → 72 °C 5 min 终末延伸, 每个目的基因 3 个复管。

表 1 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测引物序列

基因	引物序列
<i>miR-520b</i>	上游: 5'-AAAGTGCTTCCTTTTAGAGGG-3' 下游: 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'
<i>U6</i>	上游: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' 下游: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
<i>E-cadherin</i>	上游: 5'-GACCGGTGCAATCTTCAAA-3' 下游: 5'-TTGACGCCGAGAGCTACAC-3'
<i>CK18</i>	上游: 5'-AAGGCTACAAGCCCAGATT-3' 下游: 5'-CACTGTGGTGTCTCTCTCAA-3'
<i>N-cadherin</i>	上游: 5'-GTGCCATAGCCAAGGGAA-3' 下游: 5'-GCGTTCCCTGTCCACTCATAGGAG-3'
<i>Vimentin</i>	上游: 5'-TTCTTCCTGAACCTGAGAGA-3' 下游: 5'-GAGTGGGTGTCACCAGAGG-3'
<i>C-myc</i>	上游: 5'-TCAAGAGCGGAACACACAAC-3' 下游: 5'-GGCCTTTTCATTTGTTTCCA-3'
<i>LEF1</i>	上游: 5'-CACTGTAAGTGATGAGGGGG-3' 下游: 5'-TGGATCTCTTCTCCACCCA-3'
<i>CCND1</i>	上游: 5'-TTCTGCCTTTGATGTTAC-3' 下游: 5'-AGGCTGAATCAATGTCTT-3'
<i>CD44</i>	上游: 5'-AGTCCCTGGATCACCAGACAG-3' 下游: 5'-GTTTCTTGCCCTCTTGGTTGCT-3'
<i>MMP-7</i>	上游: 5'-GCATCTCCTTGAGTTGGCT-3' 下游: 5'-GAGCTACAGTGGGAACAGGC-3'
<i>DKK1</i>	上游: 5'-ATAGCACCTTGGATGGGTATTCC-3' 下游: 5'-CTGATGACCGAGACAAAACAG-5'
<i>GAPDH</i>	上游: 5'-GACTCATGACCACAGTCCATGC-3' 下游: 5'-AGAGGCAGGGATGATGTTCTG-3'

3. *MiR-520b* inhibitor 和 mimics 转染: 接种对数期的 SCC-9 和 UM1 细胞于 6 孔板中 (每孔约 4×10^5 个细胞), 按照转染试剂盒 Lipofectamine 2000 操作说明分别转染 *miR-520b* inhibitor、mimics 和随机无意义序列, 建立 *miR-520b* 沉默、*miR-520b* 过表达和对照组, 进行后续检测。

4. Western blot: 细胞转染完成后, PBS 洗涤 3 次, RIPA 细胞裂解液 4 °C 处理细胞, 并用胞浆/核蛋白提取试剂盒提取蛋白, BCA 试剂盒测定浓度, 然后以每泳道 30 μ g 总蛋白进行上样、电泳、转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶室温封闭 1 h, 与相应一抗 (1:1000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 二抗 (1:2000) 室温孵育 1 h, 电化学发光液显色、曝光、Alpha 凝胶成像系统拍照。

5. Transwell 侵袭实验: 基质胶 4 °C 冻存 24 h 变成液态后, 以无血清培养基和基质胶按 1:5 稀释, 加

入上室 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。上腔室中分别加入 100 μL 不含血清的 *miR-520b* 过表达、*miR-520b* 沉默和对照组 SCC-9 和 UM1 细胞悬液, 密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 孔, 下腔室加入 500 μL 含有 20% FBS 条件培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h。取出小室, 湿棉签擦去小室上层基质胶和细胞, PBS 洗 3 遍, 5% 戊二醛溶液固定, 结晶紫染色, 倒置显微镜下随机选取 5 个视野计数穿膜细胞数并拍照。

6. *TOP/FOP* 双荧光素酶报告基因系统检测 *Wnt/\beta-catenin* 信号通路活性: 分别将 *miR-520b* 过表达、*miR-520b* 沉默、*miR-520b* 过表达- β -*catenin*-siRNA、*miR-520b* 过表达-*TCF4*-siRNA、*miR-520b* 沉默-*DKK1*-siRNA 和对照组 SCC-9 和 UM1 细胞接种到 24 孔板(每孔约 4×10^4 个细胞), 培养 24 h。按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒操作说明, 使用 Lipofecta mine™ 2000 将 100 ng *TOP/FOP* 荧光素酶报告质粒和 5 ng pRL-TK Renilla 质粒共转染细胞, 转染细胞 48 h 后, 测定荧光信号值, 计算 *TOP/FOP* Flash 的比值。

7. 生物信息学分析: 利用在线数据库 (TargetScan、miRBase、PicTar 和 miRanda 等) 预测 *miR-520b* 调控的潜在靶基因。

8. 双荧光素酶活性报告系统验证 *miR-520b* 靶基因: 扩增 *miR-520b* 潜在靶基因 *DKK1* mRNA 的 3' 非翻译区野生型和位点突变型序列, 并与 pmirGLO 载体质粒连接, 构建 pmirGLO-*DKK1*-3' UTR 或 pmirGLO-*DKK1*-3' UTR-mut 荧光素酶报告基因质粒, 使用 Lipofecta mine™ 2000 将 pmirGLO-*DKK1*-3' UTR、pmirGLO-*DKK1*-3' UTR-mut 质粒和 *miR-520b* inhibitor 或 *miR-520b* mimics 共转染人 HEK293 后细胞。转染 48 h 后, 使用荧光素酶检测试剂盒检测、分析荧光强度。

三、统计学处理方法

实验重复三次所得均值为该样本测量值, 使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。TSCC 组织细胞与正常舌组织细胞中 *miR-520b* 相对表达量差异, 采用配对 *t* 检验分析; 比较发生了颈淋巴结转移和未发生颈淋巴结转移 TSCC 组织中 *miR-520b* 相对表达量、过表达或者沉默 *miR-520b* 对 SCC-9 和 UM1 细胞侵袭能力的影响, 以及 *miR-520b* 对靶基因 *DKK1* 的调控进而对 *Wnt/\beta-catenin* 信号通路的影响, 应用独立 *t* 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、舌鳞状细胞癌组织、细胞系中 *miR-520b* 的表达水平

实时荧光定量 PCR 分析 52 对 TSCC 和相邻正常组织 *miR-520b* 的表达, 发现 TSCC 组织中 *miR-520b* 的相对表达量 (5.28 ± 1.63) 显著高于癌旁正常组织 (2.59 ± 1.43), 差异有统计学意义 ($t = 16.04, P = 0.0005$, 图 1A)。进一步研究发现, 发生了颈淋巴结转移的 TSCC 组织 *miR-520b* 表达量 (5.81 ± 0.74) 明显高于无淋巴结未转移的表达量 (3.08 ± 0.89), 差异有统计学意义 ($t = 12.11, P = 0.0011$, 图 1B)。进一步检测 NTSC 和 5 个 TSCC 细胞系中 *miR-520b* 的表达, 发现 *miR-520b* 在 TSCC 细胞中表达量 (SCC-9: 1.96 ± 0.24 、SCC-15: 2.16 ± 0.20 、SCC-25: 2.16 ± 0.30 、UM1: 3.83 ± 0.86 、UM2: 1.76 ± 0.12) 分别比在 NTSC 中表达量 (1.088 ± 0.082) 升高, 差异均有统计学意义 ($t_{\text{SCC-9}} = 22.34, P_{\text{SCC-9}} = 0.0069$; $t_{\text{SCC-15}} = 29.47, P_{\text{SCC-15}} = 0.0062$; $t_{\text{SCC-25}} = 18.24, P_{\text{SCC-25}} = 0.0083$; $t_{\text{UM1}} = 86.11, P_{\text{UM1}} = 0.0007$; $t_{\text{UM2}} = 17.55, P_{\text{UM2}} = 0.0089$; 图 1C)。

二、*miR-520b* 表达对舌鳞状细胞癌细胞上皮-间质转化相关基因和侵袭能力的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示 (图 2A ~ 2B), 与转染随机无意义序列比较, 转染 *miR-520b* mimics 至 SCC-9 细胞后, *miR-520b* 的表达量从 1.86 ± 0.35 升高到 16.47 ± 3.16 , 增加约 8.25 倍 ($t = 115.78, P = 0.0001$), 转染 *miR-520b* mimics 至 UM1 细胞后, *miR-520b* 的表达量从 3.38 ± 0.65 升高到 24.82 ± 3.16 , 增加约 7.43 倍 ($t = 103.78, P = 0.0001$); 而转染了 *miR-520b* inhibitor 后, SCC-9 细胞的 *miR-520b* 表达量从 2.01 ± 0.31 下降到 0.49 ± 0.10 , 下降了 76.82% ($t = -75.57, P = 0.0004$), UM1 细胞的 *miR-520b* 表达量从 2.94 ± 0.72 下降到 0.86 ± 0.07 , 下降了 72.82% ($t = -72.54, P = 0.0005$)。如图 2C, 实时荧光定量 PCR 结果显示, 过表达或者沉默 SCC-9 和 UM1 细胞 *miR-520b* 表达后, 细胞内 EMT 相关标记分子发生明显改变, 过表达 *miR-520b* 可显著上调间充质标志物如 *N-cadherin* ($t_{\text{SCC-9}} = 12.35, P_{\text{SCC-9}} = 0.0098$; $t_{\text{UM1}} = 17.33, P_{\text{UM1}} = 0.0087$) 和 *Vimentin* ($t_{\text{SCC-9}} = 62.57, P_{\text{SCC-9}} = 0.0013$; $t_{\text{UM1}} = 58.87, P_{\text{UM1}} = 0.0014$) 的表达, 并同时下调上皮标志物 *E-cadherin* ($t_{\text{SCC-9}} = -71.19, P_{\text{SCC-9}} = 0.0005$; $t_{\text{UM1}} = -67.33, P_{\text{UM1}} = 0.0008$) 和 *CK18* ($t_{\text{SCC-9}} = -55.78, P_{\text{SCC-9}} = 0.001$; $t_{\text{UM1}} = -23.77, P_{\text{UM1}} = 0.0025$) 的表达, 而沉默 *miR-520b* 的表达则得到相反

的结果。进一步Transwell侵袭实验也显示过表达 *miR-520b* 后,穿过基质胶的SCC-9和UM1细胞明显增多,细胞侵袭转移能力增强(SCC-9: 110.8 ± 17.8 vs. 74.7 ± 9.8 , $t_{SCC-9} = 32.58$, $P_{SCC-9} = 0.0011$; UM1: 178.8 ± 39.7 vs. 90.3 ± 22.5 , $t_{UM1} = 99.67$, $P_{UM1} = 0.0002$;图2D~2E);而沉默 *miR-520b* 表达后,SCC-9和UM1细胞的侵袭能力则被削弱(SCC-9: 74.7 ± 9.8 vs. 30.9 ± 7.8 , $t_{SCC-9} = -31.47$, $P_{SCC-9} = 0.0024$; UM1: 90.3 ± 22.5 vs. 35.7 ± 10.6 , $t_{UM1} = -37.89$, $P_{UM1} = 0.0019$;图2D~2E)。

三、*miR-520b*对 *Wnt/β-catenin* 信号通路的影响
如图3A所示,本研究发过表达 *miR-520b* 能

显著提高 *TOP* 基因的荧光信号强度,而 *miR-520b* 沉默降低了报告基因活性。此外,Western blot结果显示过表达 *miR-520b* 显著增加了 *β-catenin* 在细胞核中的积累,而沉默 *miR-520b* 则降低核 *β-catenin* 的表达(图3B)。实时荧光定量PCR结果进一步显示,上调SCC-9和UM1细胞内 *miR-520b* 的表达后, *Wnt/β-catenin* 下游效应基因 *C-myc* ($t_{SCC-9} = 28.89$, $P_{SCC-9} = 0.0023$; $t_{UM1} = 29.90$, $P_{UM1} = 0.0022$)、*LEF-1* ($t_{SCC-9} = 25.76$, $P_{SCC-9} = 0.0034$; $t_{UM1} = 60.92$, $P_{UM1} = 0.0015$)、*CCND1* ($t_{SCC-9} = 17.88$, $P_{SCC-9} = 0.0088$; $t_{UM1} = 24.57$, $P_{UM1} = 0.0036$)、*CD44* ($t_{SCC-9} = 74.56$, $P_{SCC-9} = 0.0005$; $t_{UM1} = 65.59$,

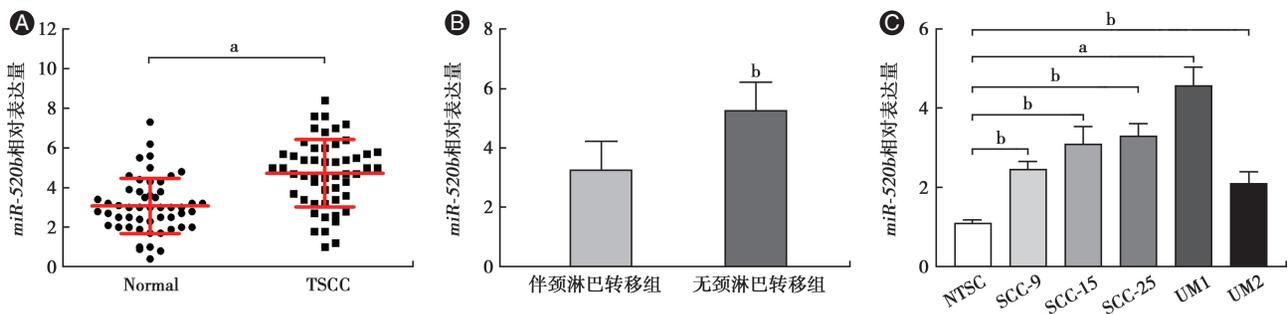


图1 *miR-520b*在舌鳞状细胞癌(TSCC)组织和正常舌上皮组织(Normal)中的表达差异 A: *miR-520b*在52对TSCC组织和相邻正常组织中的表达散点图;B:发生了颈淋巴结转移的TSCC与无颈淋巴结转移TSCC中 *miR-520b* 的表达差异;C: *miR-520b*在人正常舌鳞状细胞(NTSC)和5个TSCC细胞系(SCC-9、SCC-15、SCC-25、UM1和UM2)中的相对表达量;^a $P < 0.001$,^b $P < 0.05$

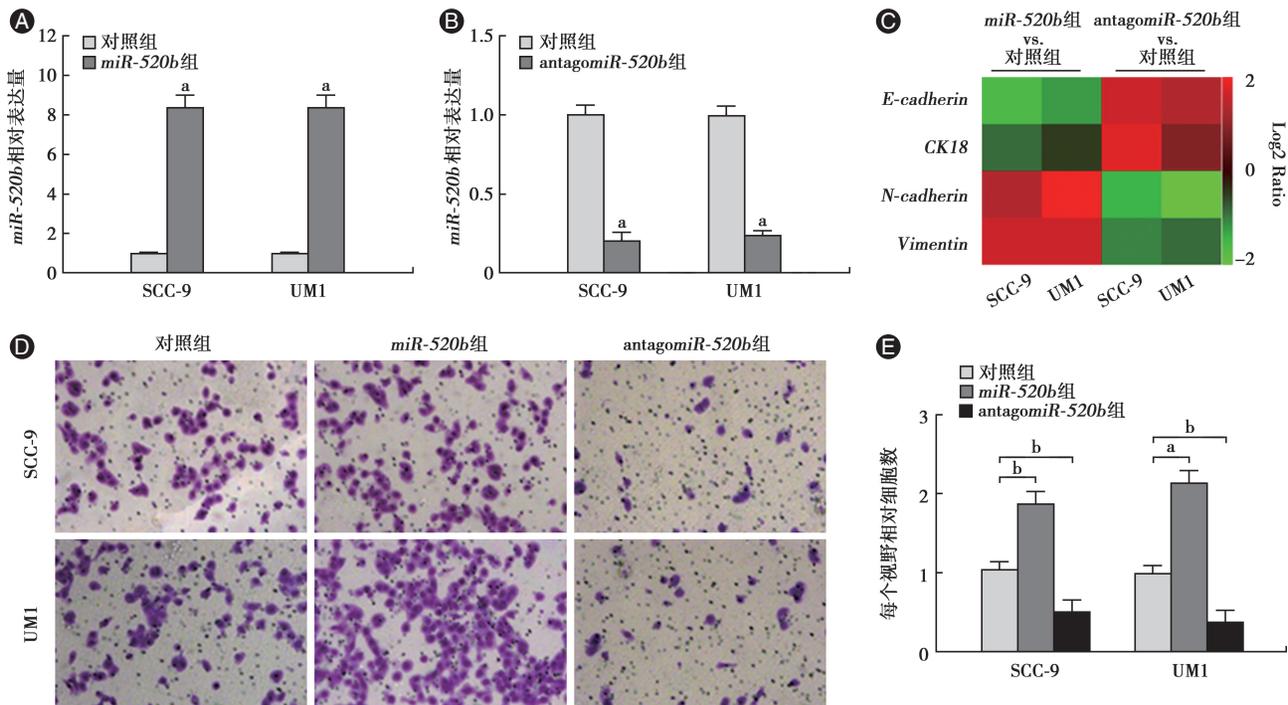


图2 *miR-520b*对SCC-9和UM1细胞上皮-间质转化(EMT)相关基因和侵袭能力的影响 A~B:实时荧光定量PCR结果显示分别转染 *miR-520b* mimics, inhibitor至SCC-9和UM1细胞后,细胞内 *miR-520b* 的表达变化;C:过表达或沉默 *miR-520b* 后,实时荧光定量PCR检测EMT相关分子(*E-cadherin*、*CK18*、*N-cadherin*和 *Vimentin*)的表达变化;D:过表达或沉默 *miR-520b* 后,SCC-9和UM1细胞茜红素染色结果(低倍放大);E:过表达或沉默 *miR-520b* 后,SCC-9和UM1细胞侵袭转移能力的改变;^a $P < 0.001$,^b $P < 0.01$

$P_{UM1} = 0.0013$)及 $MMP-7$ ($t_{SCC-9} = 25.82$, $P_{SCC-9} = 0.0084$; $t_{UM1} = 27.13$, $P_{UM1} = 0.0035$)的表达也随之增多(图3C)。为了进一步验证 Wnt/β -catenin 信号通路是 $miR-520b$ 调控 TSCC 细胞侵袭转移能力的重要信号途径,通过转染针对 Wnt/β -catenin 信号通路关键因子(β -catenin 和 $TCF4$)的小分子干扰 RNA(β -catenin-siRNA 和 $TCF4$ -siRNA)至 $miR-520b$ 过表达的 SCC-9 和 UM1 细胞中,发现沉默 β -catenin 或 $TCF4$ 的表达可以显著抵消 $miR-520b$ 过表达对 TOP 基因荧光信号的增强效应(图3D);同时,Transwell 侵袭实验显示,转染 β -catenin-siRNA 或 $TCF4$ -siRNA 至 $miR-520b$ 过表达的 SCC-9 和 UM1 细胞中,穿过基质胶的细胞明显减少,表明沉默 β -catenin 或 $TCF4$ 的表达后,削弱了 $miR-520b$ 过表达对 SCC-9 和 UM1 细胞侵袭能力的增强作用(沉默 β -catenin 组: SCC-9: 85.8 ± 11.4 vs. 125.8 ± 19.5 , $t_{SCC-9} = -29.22$, $P_{SCC-9} = 0.0025$; UM1: 104.4 ± 25.9 vs. 168.5 ± 32.5 , $t_{UM1} = -31.17$, $P_{UM1} = 0.0024$; 沉默 $TCF4$ 组: SCC-9: 79.5 ± 11.4 vs. 117.4 ± 17.5 , $t_{SCC-9} = -32.13$, $P_{SCC-9} = 0.0023$; UM1: 112.2 ± 23.7 vs. 187.9 ± 36.4 , $t_{UM1} = -38.55$, $P_{UM1} = 0.0019$; 图3E)。

四、 $DKK1$ 是 $miR-520b$ 调控 Wnt/β -catenin 信号通路的重要靶基因

为了寻找 $miR-520b$ 调控 Wnt/β -catenin 信号通路

的潜在靶基因,本课题组利用在线数据库(TargetScan、miRBase、PicTar 和 miRanda 等)预测 $miR-520b$ 可能调控的靶基因,并筛选出 $DKK1$ 基因(图4A),其是 Wnt/β -catenin 信号通路重要的负向调控分子。而 Western blot 实验结果显示,过表达 $miR-520b$ 显著降低、而沉默 $miR-520b$ 则显著上调 $DKK1$ 的表达(图4B);进一步的双荧光素酶活性报告实验结果显示,过表达 $miR-520b$ 可明显抑制 $DKK1$ 野生型 3'端非翻译区的荧光素酶活性($t = -70.67$, $P = 0.0006$),但对 $DKK1$ 3'端非翻译区突变型无影响(图4C),说明 $miR-520b$ 可通过靶向结合 $DKK1$ 的 3'端非翻译区来调控其表达。此外,为进一步确认 $DKK1$ 是 $miR-520b$ 调控 Wnt/β -catenin 信号通路的重要靶基因,本研究通过转染 $DKK1$ siRNA 至 $miR-520b$ 沉默组 SCC-9 和 UM1 细胞中,发现抑制 $DKK1$ 的表达可有效地抵消了 $miR-520b$ 沉默对 TOP/FOP 荧光素酶活性的负向作用($t_{SCC-9} = 26.32$, $P_{SCC-9} = 0.0029$; $t_{UM1} = 28.45$, $P_{UM1} = 0.0027$; 图4D),表明 $DKK1$ 可能是 $miR-520b$ 调控 Wnt/β -catenin 信号通路的重要靶基因。另一方面,本研究进一步检测了 TSCC 组织中 $miR-520b$ 和 $DKK1$ 表达之间的关系,发现 $DKK1$ 水平与 $miR-520b$ 表达呈负相关($r = -0.697$, $P = 0.0004$, 图4E),进一步提示 $DKK1$ 可能是 $miR-520b$ 调控的靶目标。

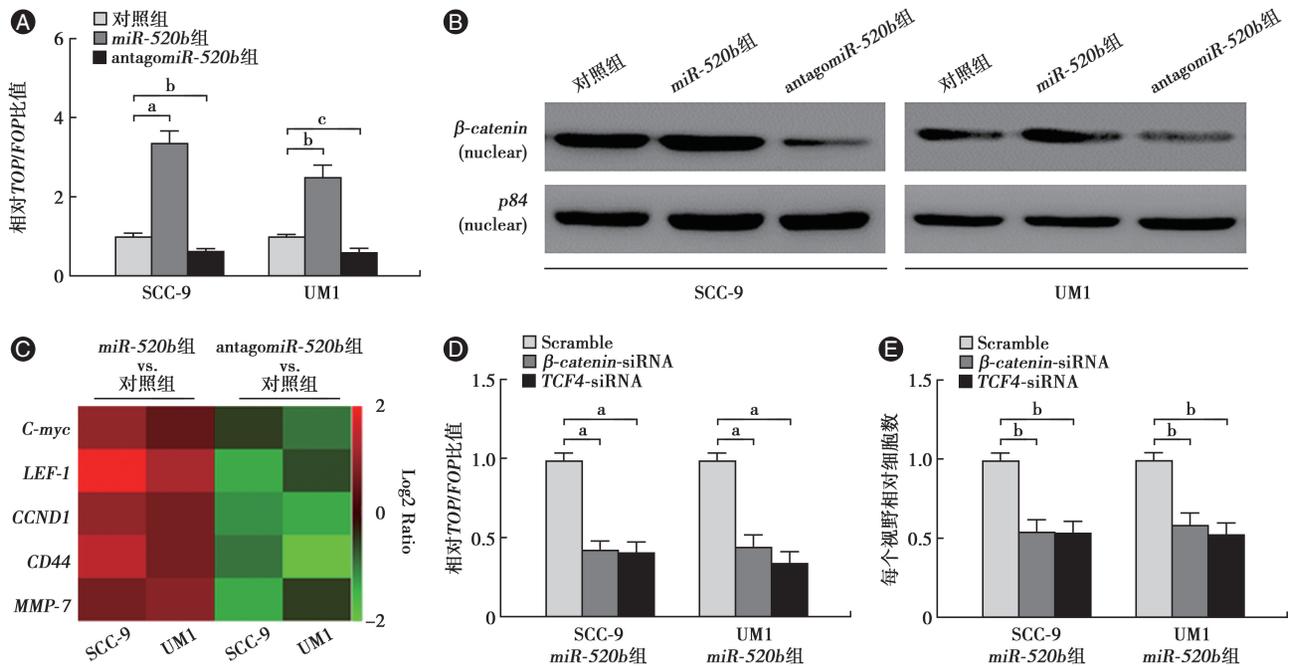


图3 $miR-520b$ 对 Wnt/β -catenin 信号通路的影响 A: 过表达或沉默 $miR-520b$ 对 SCC-9 和 UM1 细胞 TOP/FOP 双荧光素酶活性的影响; B: 过表达或沉默 $miR-520b$ 对细胞核内 β -catenin 表达的影响; C: 实时荧光定量 PCR 对 Wnt/β -catenin 下游效应基因 C -myc、 $LEF-1$ 、 $CCND1$ 、 $CD44$ 和 $MMP-7$ 的检测; D: 沉默 β -catenin 或 $TCF4$ 对 $miR-520b$ 过表达组 SCC-9 和 UM1 细胞 TOP/FOP 荧光活性的影响; E: 沉默 β -catenin 或 $TCF4$ 对 $miR-520b$ 过表达组 SCC-9 和 UM1 细胞侵袭能力的影响; * $P < 0.001$, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$

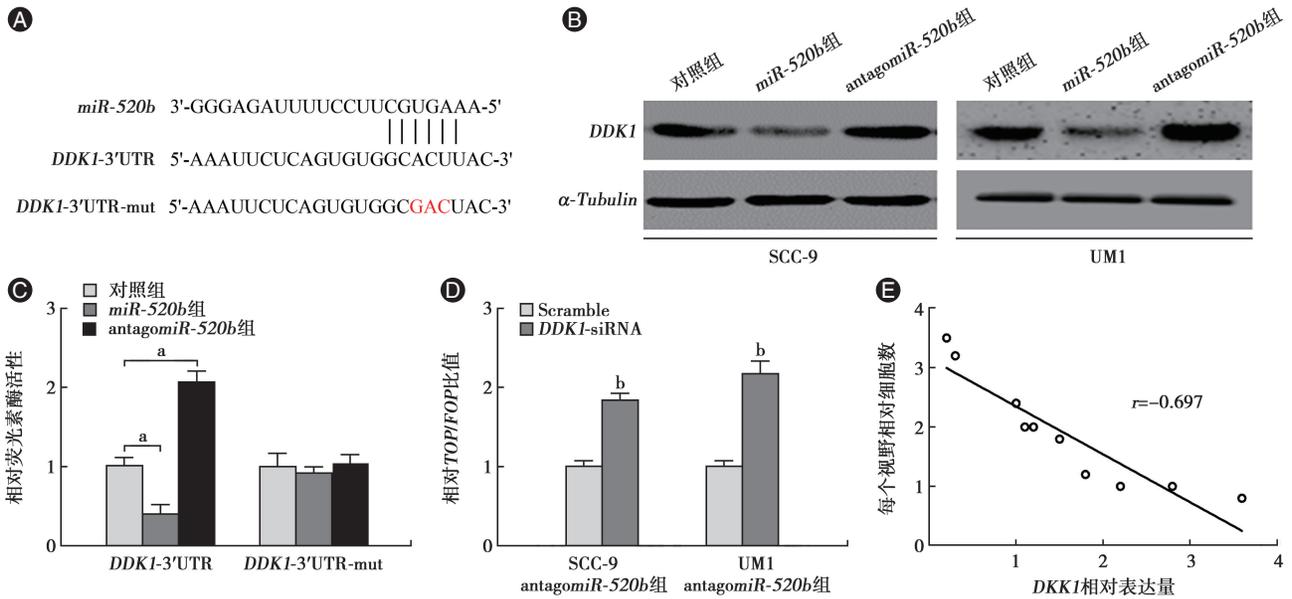


图4 DKK1是miR-520b调控Wnt/β-catenin信号通路的重要靶基因 A:生物信息学分析miR-520b对DKK1调控的靶位点及局部突变序列;B:Western blot结果显示miR-520b对DKK1表达的影响;C:荧光素酶报告基因实验验证miR-520b对DKK1调控的靶位点;D:沉默DKK1对miR-520b沉默组细胞TOP/FOP荧光素酶活性的影响;E:TSCC组织中miR-520b与DKK1相关性分析;^a*P*<0.001,^b*P*<0.01

讨论

MiRNA是调控癌细胞侵袭和转移的重要分子^[11]。因此,阐明miRNA在其中的具体作用及作用机制,可望为侵袭性肿瘤提供有价值的诊断和治疗策略。研究发现miR-520b在多种肿瘤中均有异常表达,且与肿瘤的发生和发展密切相关^[12-15]。Guan等^[12]研究显示miR-520b在卵巢癌组织中显著上调,并促进卵巢癌细胞迁移和体外侵袭。Liu等^[13]证明miR-520b通过激活Hedgehog信号通路促进小细胞肺癌的恶性进展。另有研究报道显示,miR-520b在乳腺癌细胞中表达下调,并有助于细胞侵袭转移^[14]。在肝癌细胞中,miR-520b在肝癌组织和细胞系中同样下调,而miR-520b的异位表达在体外和体内均抑制肝癌细胞的生长^[15]。以上研究表明,miR-520b在不同肿瘤中表达并不一致,且与多种肿瘤的发生和发展密切相关,但与其与TSCC发生、发展的关系鲜有报告。在本研究中,与相邻正常组织细胞相比,TSCC中miR-520b的表达显著上调,且发生了淋巴结转移的TSCC组织中miR-520b的表达量明显高于未转移的,提示miR-520b的表达可能与TSCC的发生、发展有关。

EMT指上皮来源的细胞在外因作用下,细胞的极性和细胞间的黏附力逐渐丧失,变成有侵袭性和迁移能力的间质细胞的过程^[16]。近年来,miRNA

调控EMT促进肿瘤恶性进展的分子机制受到了学者的高度重视也取得了较多的研究成果^[7]。研究发现下调miR-9-5p^[17]、miR-200^[18]、miR-205-5p^[19]等的表达,可诱导或维持EMT;相反,miR-155^[20]、miR-577^[21]、miR-522^[22]在TGF-β诱导EMT的过程中表达升高,抑制其表达可阻断EMT,细胞侵袭迁移能力降低。本研究发现,过表达miR-520b可以促进细胞EMT相关基因的表达,增强TSCC细胞侵袭转移能力;而沉默miR-520b则阻碍EMT,抑制侵袭转移,提示miR-520b的表达可能与TSCC侵袭转移密切相关。

Wnt/β-catenin信号通路是肿瘤EMT过程最重要的途径之一^[23-24],TOP/FOP双荧光素酶报告基因实验是检测Wnt/β-catenin信号通路活性的重要方法^[25]。研究发现,激活Wnt/β-catenin信号通路可上调E-cadherin的转录抑制因子Slug和Twist,从而抑制E-cadherin表达,使细胞的极性和黏附力逐渐丧失,进而激活EMT^[26]。Wnt/β-catenin信号通路拮抗剂,如分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-related protein, SFRP),其能与Wnt结合阻断信号传递,进而抑制EMT进程^[27]。进一步研究发现miRNA也参与到Wnt/β-catenin信号通路与肿瘤EMT进程中,Liu等^[28]研究发现miR-33a-5p可靶向下调PNMA1水平,激活Wnt/β-catenin信号通路,促进肝癌细胞EMT发生。Huang等^[29]研究表明,miR-370-3p可靶向抑制Wnt7a

的表达,下调 *Wnt/β-catenin* 信号通路活性,进而阻碍膀胱癌细胞 EMT。本研究发现,过表达 *miR-520b* 能明显上调 *Wnt/β-catenin* 信号通路下游基因(*C-myc*、*LEF-1*、*CCND1*、*CD44* 和 *MMP-7*) 的表达,进一步的研究发现上调 *miR-520b* 可以显著提高 *TOP* 基因的荧光信号强度并增强细胞侵袭能力,但沉默 *Wnt/β-catenin* 信号通路关键因子 *β-catenin* 或 *TCF4* 的表达可以部分抵消 *miR-520b* 过表达对 *TOP* 基因荧光信号的增强效应及削弱细胞的侵袭能力,提示 *miR-520b* 可通过调控 *Wnt/β-catenin* 信号通路参与 TSCC 细胞的侵袭转移。

研究发现, *miR-520b* 在多种肿瘤类型中表达并不一致,在肿瘤恶性进程中的作用也不一样,这种差异可以通过 *miR-520b* 靶向的基因来解释。在乳腺癌细胞中, *miR-520b* 的靶基因是 *HBXIP* 和 *IL-8*^[14],而在肝细胞癌中, *miR-520b* 靶向促分裂的蛋白激酶激酶 2 (*MEKK2*) 和细胞周期蛋白 D1^[15]。而在本研究中,发现过表达 *miR-520b* 促进 TSCC 细胞侵袭转移过程中同时还伴随着细胞内 *Wnt/β-catenin* 信号通路的异常激活。进一步的生物信息学预测了 *miR-520b* 可能靶向的 884 个基因,其中包括 *DKK1*。*DKK1* 是 DKK 家族的成员之一,能够负性调控 *Wnt/β-catenin* 信号通路活性从而发挥促癌或抑癌作用。最近的研究中发现 *DKK1* 是 miRNA 作用的靶基因, Croset 等^[30] 研究结果显示, *miRNA-30* 可直接靶向 *DKK1* 参与乳腺癌的侵袭转移。Feng 等^[31] 研究发现 *miR-590-3p* 可通过调控 *DKK1* 表达,进而影响结肠癌的发生发展。本研究首先通过生物信息学预测 *DKK1* 可能为 *miR-520b* 的靶基因。免疫印迹法也显示在蛋白表达水平上,上调 *miR-520b* 会抑制 *DKK1* 表达,而沉默 *miR-520b* 则会升高 *DKK1* 水平。双荧光素酶活性报告系统实验则进一步证实 *DKK1* 是 *miR-520b* 的靶向调控基因,提示 *miR-520b* 可能通过靶向 *DKK1* 来调控 TSCC 细胞的侵袭转移。

综上所述,本研究证实 *miR-520b* 在 TSCC 中的作用,并表明 TSCC 中高表达的 *miR-520b* 靶向抑制 *DKK1*,从而增强 *Wnt/β-catenin* 信号通路促进 TSCC EMT 和侵袭转移。本研究初步概述了 *miR-520b* 在 TSCC 中的功能及可能的机制。尽管与文献存在某些差异,但本研究的发现可能为将来的 TSCC 研究提供一定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108. DOI:10.3322/caac.21262.
- [2] Lian IeB, Tseng YT, Su CC, et al. Progression of precancerous lesions to oral cancer: results based on the Taiwan National Health Insurance Database[J]. Oral Oncol, 2013, 49(5):427-430. DOI:10.1016/j.oraloncology.2012.12.004.
- [3] Xie B, Ding Q, Han H, et al. miRCancer: a microRNA-cancer association database constructed by text mining on literature[J]. Bioinformatics, 2013, 29(5):638-644. DOI:10.1093/bioinformatics/btt014.
- [4] Yu X, Li Z. MicroRNA expression and its implications for diagnosis and therapy of tongue squamous cell carcinoma[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(1):10-16. DOI:10.1111/jcmm.12650.
- [5] Wong TS, Liu XB, Chung-Wai Ho A, et al. Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling[J]. Int J Cancer, 2008, 123(2):251-257. DOI:10.1002/ijc.23583.
- [6] Siriwardena S, Tsunematsu T, Qi G, et al. Invasion-Related Factors as Potential Diagnostic and Therapeutic Targets in Oral Squamous Cell Carcinoma-A Review[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5):E1462. DOI:10.3390/ijms19051462.
- [7] Škovicová H, Okajčėková T, Strmádel J, et al. Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis (Review) [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(3):1187-1200. DOI:10.3892/ijmm.2017.3320.
- [8] Zhang JJ, Zhou XH, Zhou Y et al. Bufalin suppresses the migration and invasion of prostate cancer cells through HOTAIR, the sponge of miR-520b[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(9):1228-1236. DOI:10.1038/s41401-019-0234-8.
- [9] Liu H, Du F, Sun L, et al. GATA6 suppresses migration and metastasis by regulating the miR-520b/CREB1 axis in gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2):35. DOI:10.1038/s41419-018-1270-x.
- [10] Cai Y, Dong ZY, Wang JY. MiR-520b inhibited metastasis and proliferation of non-small cell lung cancer by targeting CHAF1A [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(22):7742-7749. DOI:10.26355/eurrev_201811_16396.
- [11] Salinas-Vera YM, Marchat LA, Gallardo-Rincón D, et al. AngiomiRs: MicroRNAs driving angiogenesis in cancer (Review) [J]. Int J Mol Med, 2019, 43(2):657-670. DOI:10.3892/ijmm.2018.4003.
- [12] Guan R, Cai S, Sun M, et al. Upregulation of miR-520b promotes ovarian cancer growth[J]. Oncol Lett, 2017, 14(3):3155-3161. DOI:10.3892/ol.2017.6552.
- [13] Liu X, Liu J, Zhang X, et al. MiR-520b promotes the progression of non-small cell lung cancer through activating Hedgehog pathway[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(1):205-215. DOI:10.1111/jcmm.13909.

- [14] Hu N, Zhang J, Cui W, et al. miR-520b regulates migration of breast cancer cells by targeting hepatitis B X-interacting protein and interleukin-8 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 13714-13722. DOI:10.1074/jbc.M110.204131.
- [15] Zhang W, Kong G, Zhang J, et al. MicroRNA-520b inhibits growth of hepatoma cells by targeting MEKK2 and cyclin D1 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31450. DOI:10.1371/journal.pone.0031450.
- [16] Li M, Bu X, Cai B, et al. Biological role of metabolic reprogramming of cancer cells during epithelial-mesenchymal transition (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(2): 727-741. DOI: 10.3892/or.2018.6882.
- [17] Wang WX, Yu HL, Liu X. MiR-9-5p suppresses cell metastasis and epithelial-mesenchymal transition through targeting FOXP2 and predicts prognosis of colorectal carcinoma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(15): 6467-6477. DOI:10.26355/eurev_201908_18530.
- [18] Kim EJ, Kim JS, Lee S, et al. QKI, a miR-200 target gene, suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and tumor growth [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(6): 1585-1595. DOI: 10.1002/ijc.32372.
- [19] Gulei D, Magdo L, Jurj A, et al. The silent healer: miR-205-5p up-regulation inhibits epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells by indirectly up-regulating E-cadherin expression [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 66. DOI: 10.1038/s41419-017-0102-8.
- [20] Johansson J, Berg T, Kurzejamska E, et al. MiR-155-mediated loss of C/EBP β shifts the TGF- β response from growth inhibition to epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2013, 32(50): 5614-5624. DOI: 10.1038/onc.2013.322.
- [21] Luo Y, Wu J, Wu Q, et al. miR-577 Regulates TGF- β Induced Cancer Progression through a SDPR-Modulated Positive-Feedback Loop with ERK-NF- κ B in Gastric Cancer [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(6): 1166-1182. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.02.002.
- [22] Xu X, Liu M. miR-522 stimulates TGF- β /Smad signaling pathway and promotes osteosarcoma tumorigenesis by targeting PPM1A [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 18425-18434. DOI: 10.1002/jcb.29160.
- [23] Gurzu S, Kobori L, Fodor D, et al. Epithelial Mesenchymal and Endothelial Mesenchymal Transitions in Hepatocellular Carcinoma: A Review [J]. *Biomed Res Int*, 2019(1): 1-12. DOI: 10.1155/2019/2962580.
- [24] Teeuwssen M, Fodde R. Wnt Signaling in Ovarian Cancer Stemness, EMT, and Therapy Resistance [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(10): 1658. DOI: 10.3390/jcm8101658.
- [25] Wang C, Xu X, Jin H, et al. Nicotine may promote tongue squamous cell carcinoma progression by activating the Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3479-3486. DOI: 10.3892/ol.2017.5899.
- [26] Jing Y, Cui D, Guo W, et al. Activated androgen receptor promotes bladder cancer metastasis via Slug mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Lett*, 2014, 348(1-2): 135-145. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.03.018.
- [27] Zhang X, Tian Y, Yang Y, et al. Development of anticancer agents targeting the Hedgehog signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(15): 2773-2782. DOI: 10.1007/s00018-017-2497-x.
- [28] Liu P, Chen B, Gu Y, et al. PNMA1, regulated by miR-33a-5p, promotes proliferation and EMT in hepatocellular carcinoma by activating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 492-499. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09.059.
- [29] Huang X, Zhu H, Gao Z, et al. Wnt7a activates canonical Wnt signaling, promotes bladder cancer cell invasion, and is suppressed by miR-370-3p [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(18): 6693-6706. DOI: 10.1074/jbc.RA118.001689.
- [30] Croset M, Pantano F, Kan C, et al. MicroRNA-30 family members inhibit breast cancer invasion, osteomimicry, and bone destruction by directly targeting multiple bone metastasis-associated genes [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(18): 5259-5273. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3058.
- [31] Feng ZY, Xu XH, Cen DZ, et al. miR-590-3p promotes colon cancer cell proliferation via Wnt/ β -catenin signaling pathway by inhibiting WIF1 and DKK1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(21): 4844-4852.

(收稿日期:2020-01-07)

(本文编辑:王嫚)