

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002696

miR-149-5p 靶向 FGF5 调节人口腔鳞状细胞癌细胞凋亡和上皮-间质转换及微管形成

卢 霞¹,王忠朝²,邓 霞¹,范丽苑³,李文慧¹

(1. 成都医学院第二附属医院·核工业四一六医院口腔科,成都 610000;

2. 西南医科大学附属口腔医院牙周黏膜科,泸州 646000;3. 西南医科大学附属口腔医院修复科,泸州 646000)

【摘要】目的:探究 miR-149-5p 对人口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)细胞凋亡、上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及微管形成的影响及作用机制。**方法:**miR-149-5p mimic(mimic)和 pcDNA-FGF5(FGF5)单转或共转 CAL-27 细胞系,RT-PCR、Western blot 检测 FGF5 表达;双荧光素酶报告实验验证 miR-149-5p 和 FGF5 靶向关系;流式细胞术检测细胞凋亡率,Western blot 检测 Bax/Bcl-2 蛋白表达;观察 EMT 细胞形态转化,Western blot 检测 CAL-27 细胞上皮标记物 E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)及间质标记物 N-钙黏蛋白(N-cadherin, N-cad)表达;成管实验检测 CAL-27 细胞微管样形成能力,Western blot 检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达。**结果:**miR-149-5p mimic 能明显抑制 CAL-27 细胞中 FGF5 的表达($P=0.000$);miR-149-5p mimic 能明显减弱 FGF5 野生质粒的荧光素酶活性($P=0.000$);miR-149-5p mimic 可明显上调 CAL-27 细胞凋亡率及 Bax/Bcl-2 比值($P=0.000$),并逆转 FGF5 过表达导致的细胞凋亡率($P=0.014$)及 Bax/Bcl-2 比值上调($P=0.000$)。miR-149-5p mimic 抑制 EMT 细胞形态由圆形到纺锤形转变,并逆向转换 FGF5 过表达导致的间质样细胞形态。miR-149-5p mimic 可上调 CAL-27 细胞中 E-cad 的表达($P=0.000$)、下调 N-cad 的表达($P=0.000$),逆转 FGF5 过表达引起的 E-cad 表达下调($P=0.020$)和 N-cad 表达上调($P=0.000$)。miR-149-5p 过表达能明显抑制 CAL-27 细胞微管结节形成($P=0.002$),降低 VEGF 蛋白表达水平($P=0.000$),逆转过表达 FGF5 引起的 VEGF 表达上调($P=0.000$)。**结论:**miR-149-5p 能抑制 OSCC 细胞的 EMT 和微管形成能力并促进细胞凋亡,作用机制与靶向抑制 FGF5 表达有关。

【关键词】miR-149-5p; 口腔鳞状细胞癌; 上皮-间质转换; 微管形成; 细胞凋亡; FGF5

【中图分类号】R739.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-05-29

miR-149-5p targeting FGF5 regulation of apoptosis, epithelial-mesenchymal transition and microtubule formation in human oral squamous cell carcinoma

Lu Xia¹, Wang Zhongchao², Deng Xia¹, Fan Liyuan³, Li Wenhui¹

(1. Department of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Chengdu Medical College,

China National Nuclear Corporation 416 hospital; 2. Department of periodontal mucosa,

Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University; 3. Department of Prosthodontics,

Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect and mechanism of miR-149-5p in apoptosis, epithelial-mesenchymal transition(EMT) and microtubule formation in human oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods:** miR-149-5p mimic (mimic) and pcDNA-FGF5 (FGF5) were singly or co-transfected with CAL-27 cell line, and RT-PCR and Western blot were used to detected the expression FGF5; dual luciferase report test was used to verify the targeting relationship between miR-149-5p and FGF5. The apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the expression of Bax/Bcl-2 protein was detected by Western blot. The morphological transformation of EMT cells was observed, and the expression of epithelial and interstitial markers E-cadherin (E-cad) and N-cadherin (N-cad) in CAL-27 cells was detected by Western blot. The microtubule-like formation ability of CAL-27 cells was detected by tube-forming test, and the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) was detected by Western blot. **Results:** miR-149-5p mimic could significantly inhibit the expression of FGF5 in CAL-27 cells($P=0.000$); miR-149-5p mimic could significantly reduce the luciferase activity of FGF5 wild plasmid($P=0.000$); miR-149-5p mimic increased the apoptosis rate of CAL-27 cells and Bax/Bcl-2 ratio significantly($P=0.000$), and reversed the increase of apoptosis rate($P=0.014$) and Bax/Bcl-2 ratio caused by FGF5

作者介绍:卢 霞,Email:lx2020527@163.com,

研究方向:儿童口腔研究及儿童牙病、牙外伤等治疗。

通信作者:范丽苑,Email:345339473@qq.com。

基金项目:国家重点实验室开放课题资助项目(编号:VRLAB2020D05)。

优先出版:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20201111.1131.002.html>

(2020-11-12)

overexpression ($P=0.000$)。miR-149-5p mimic inhibited the EMT transformation on cell morphology from round to spindle shape, and reversely transformed the mesenchymal-like cell morphology caused by FGF5 overexpression. miR-149-5p mimic up-regulated the expression of E-cad in CAL-27 cells ($P=0.000$), down-regulated the expression of N-cad ($P=0.0009$), reversed the down-regulated expression of E-cad ($P=0.020$) and the up-regulated expression of N-cad ($P=0.000$) caused by FGF5 overexpression. miR-149-5p overexpression significantly inhibited the formation of microtubule nodules in CAL-27 cells ($P=0.002$), reduced the expression level of VEGF protein ($P=0.000$), and reversed the upregulation of VEGF expression caused by overexpression of FGF5 ($P=0.000$)。

Conclusion: miR-149-5p can inhibit EMT and microtubules formation and apoptosis promotion of OSCC cells. The mechanism of action is related to the targeted inhibition of FGF5 expression.

【Key words】 miR-149-5p; oral squamous cell carcinoma; epithelial-mesenchymal transition; microtubule formation; apoptosis; FGF5

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔颌面-头颈部最常见的恶性肿瘤之一^[1]。过去几年,OSCC 成为世界第六大最常见的癌症^[2-3]。近年来,诊断和治疗策略已得到极大优化。然而,复发和远处转移性口腔癌的预后效果仍不理想^[3]。据统计,OSCC 患者的总体 5 年生存率为 50%~60%^[4],因此需要更有效的治疗方法。microRNA (miRNA)是一类小的非编码 RNA,通过与靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区(3'UTR)碱基配对在转录后调节靶基因的表达^[5]。越来越多的证据表明,miRNA 在癌症的发生发展和转移中具有重要作用^[6-7]。例如,miR-494、miR-153 和 miR-218 通过抑制细胞增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT),从而抑制肺癌的发展和转移^[8-10]。miR-149-5p 在多种癌症中发挥作用,miR-149-5p 能抑制肾细胞癌的细胞迁移、增殖和凋亡^[11]。

miR-149-5p 通过靶向转化生长因子-β2(transforming growth factor-β2, TGF-β2)调节 OSCC 细胞对顺铂的化学敏感性,以及细胞生长和转移^[3]。成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)家族超过 23 个成员,与 FGF 酪氨酸激酶受体相连,介导生物反应^[12]。FGF5 的关键功能是调节细胞的基本程序,如增殖、凋亡和代谢等^[12]。FGF 的异常表达与细胞增殖失控、致癌作用、骨骼发育和多种病理有关^[13]。研究表明,miRNA-567 通过靶向 FGF5 抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[14]。本文旨在研究 miR-149-5p 是否通过调控 FGF5 在 OSCC 中发挥生物学功能。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人 OSCC 细胞系 CAL-27 购自美国典型培养物保藏中

心(ATCC,美国)。将细胞在含有 10% 胎牛血清(FBS,Life Technologies)、100 U/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素的 DMEM 中于 37℃、5%CO₂ 恒温恒湿箱中培养。

1.2 细胞转染

靶向 miR-149-5p 的 miRNA 模拟物(miR-149-5p mimic): 5'-UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCC-3', 其相应的阴性对照 mimic-NC(miR-NC): 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUU-3', FGF5 过表达载体 pcDNA-FGF5(FGF5) 及其阴性对照 pcDNA 载体均由上海吉玛基因提供。所有转染均使用 Lipofectamine 2000(Invitrogen, 美国) 进行, 转染后 48 h 收获细胞用于后续实验。除荧光素酶报告实验外, 其他细胞转染分组为: Control 组(未转染组)、mimic 单转染组、FGF5 单转染组、mimic+FGF5 共转染组。

1.3 RT-PCR 检测 miR-149-5p 和 FGF5 的表达

用 Trizol 试剂从各组转染细胞中提取总 RNA, 用紫外分光光度计(Thermo Fisher Scientific) 测定 RNA 的纯度和浓度。根据反转录试剂盒说明书操作, 取等质量的总 RNA 作为模板反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, PCR 循环为: 预变性 95℃ 3 min; 变性 95℃ 15 s, 退火 60℃ 30 s, 延伸 72℃ 30 s, 35 个循环; 终延伸 72℃ 5 min。

1.4 生物信息学分析和荧光素酶报告基因分析

用在线软件 Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) 分析 miR-149-5p 与 FGF5 3'UTR 之间的潜在结合位点。将含有 miR-149-5p 结合位点的 FGF5 3'UTR 野生型和突变型序列(FGF5 3'UTR-wt 和 FGF5 3'UTR-mut) 插入双荧光素酶报告载体的下游部分(吉玛基因, 上海)。将 3×10^4 个 CAL-27 细胞接种并培养到 24 孔板中, miR-149-5p mimic 或 miR-NC 分别与 FGF5 野生型或突变型载体共转染。转染 24 h 后, 根据 Dual-Luciferase® Report 报告基因试剂盒(Promega) 说明书检测, 使用 NanoQuant 酶标仪(TECAN, Infinite M200 Pro) 在 520 nm 下测量海肾荧光素酶和萤火虫荧光素酶的活性, 以测量相对转录活性。实验分组为: miR-NC+FGF5 3'UTR-wt、miR-NC+FGF5 3'UTR-mut、mimic+FGF5 3'UTR-wt、mimic+FGF5 3'UTR-mut。

1.5 流式细胞术分析细胞凋亡

使用异硫氰酸荧光素(FITC)偶联的 Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒(Invitrogen)对各转染细胞组进行凋亡检测。将转染后的 CAL-27 细胞培养 48 h 后,用胰蛋白酶消化细胞,用 PBS 洗涤,然后重悬。使用 5 μ L Annexin V-FITC/PI 在黑暗中染色 15 min。随后使用流式细胞仪(BD Biosciences,美国)检测凋亡细胞(Annexin V-FITC⁺和 PI⁺)。

1.6 Western blot 检测蛋白表达

用 RIPA 裂解缓冲液(碧云天,上海)从各组转染细胞中提取总蛋白。用 Nanodrop 2000(Thermo Fisher Scientific,美国)测量蛋白质浓度并调平后,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白质,然后将其转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上(Millipore,上海),用含有 5% 脱脂牛奶的 TBST 缓冲液封闭 2 h。然后,将膜与抗 Bax(1:1 000; ab32503, rabbit monoclonal), Bcl-2(1:1 000; ab32124, rabbit monoclonal), GAPDH(1:1 000; ab9485, rabbit monoclonal), E-cad(1:1 000; CST #3195S, rabbit monoclonal), N-cad(1:1 000; CST#13116, rabbit monoclonal), VEGF(1:1 000; Santa Cruz, sc-7269, mouse monoclonal)4℃孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,并分别与鼠抗兔二抗(bsm-0295M-HRP)和山羊抗鼠二抗(bs-40296G-HRP,博奥森,北京)37℃孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次后用 ECL(碧云天,上海)显影并用 Quantity One 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.7 EMT 形态观察

分别转染 CAL-27 细胞,于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 后光学显微镜下观察细胞形态变化并拍照。

1.8 成管实验

将 Matrigel 人工基质胶与 4℃预冷的无血清 DMEM 培养基按 1:1 比例混合,平铺于 24 孔板孔底,每孔 300 μ L,放于 5%CO₂、37℃恒温培养箱内 30 min 使胶固化。取各组转染 CAL-27 细胞用无血清 DMEM 培养基调整浓度至 1×10^5 个细胞/mL 接种于铺好胶的 24 孔板,每孔 1 mL,常规培养 8 h,每隔 2 h 观察微管样结构形成情况,光学显微镜下(100 \times)随机取 5 个视野拍照。采用 Microvision Saisam 软件分析图像,对每孔 5 个视野的微管样结构进行计数。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

用统计软件 SPSS 19.0 对所有实验数据进行统计分析。实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 OSCC 细胞中 miR-149-5p 抑制 FGF5 表达

以对照组(未转染组)中 miR-149-5p 和 FGF5 的 mRNA

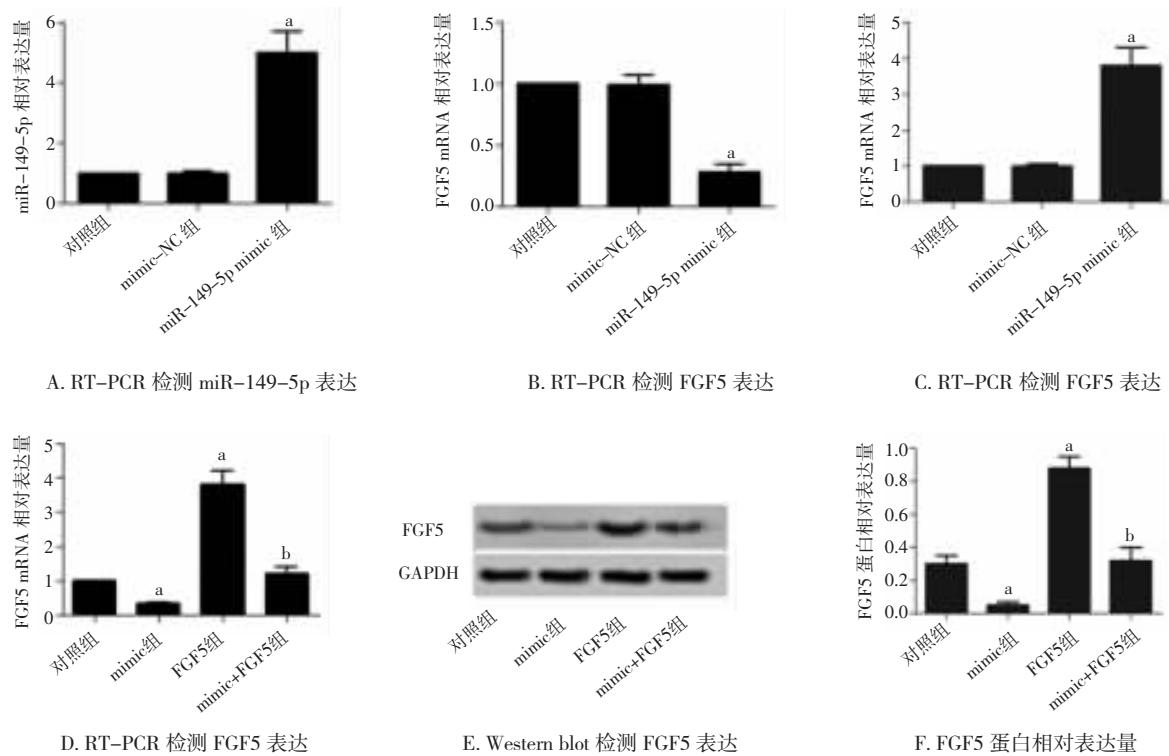
水平作为参照(1.00 ± 0.00),mimic-NC 组和 miR-149-5p mimic 组中 miR-149-5p 的表达量分别为 0.99 ± 0.08 、 5.00 ± 0.70 ,方差分析显示方差齐($F=161.6, P=0.000$)(图 1A),FGF5 的表达量分别为 0.99 ± 0.08 、 0.28 ± 0.07 ,方差分析显示方差齐($F=226.2, P=0.000$)(图 1B)。*t* 检验分析得出,与对照组相比,miR-149-5p mimic 组中 miR-149-5p 的表达量明显上调($P=0.000$),FGF5 的表达量明显下调($P=0.000$),mimic-NC 组 miR-149-5p 和 FGF5 的表达无统计学差异($P>0.05$);pcDNA 组和 pcDNA-*FGF5* 组 FGF5 的表达量分别为 0.99 ± 0.07 、 3.80 ± 0.50 ,方差分析显示方差齐($F=154.3, P=0.000$)(图 1C);*t* 检验分析得出,与对照组相比,pcDNA-*FGF5* 组 FGF5 的表达量明显上调($P=0.000$),pcDNA 组 FGF5 的表达无明显变化($P>0.05$);如图 1D、E、F 所示,方差分析 4 组 FGF5 的表达水平具有统计学意义(F 值分别为 229.1、173.1; $P=0.000$),与 FGF5 组相比,mimic+*FGF5* 组 FGF5 的 mRNA、蛋白表达水平均明显下调($P=0.000$),提示 CAL-27 细胞中 FGF5 的表达受 miR-149-5p 负调控。

2.2 OSCC 细胞中 FGF5 是 miR-149-5p 的直接靶标

使用生物信息学工具 Targetscan 分析 miR-149-5p 和 FGF5 3'UTR 的结合位点(图 2A)。然后将含有 FGF5 3'UTR 的野生型或突变型序列(FGF5 3'UTR-wt 和 FGF5 3'UTR-mut)插入荧光素酶报告质粒,并与 miR-149-5p mimic 或 miR-NC 分别共转染 CAL-27 细胞。如图 2B 所示,miR-NC+*FGF5* 3'UTR-wt 组、miR-NC+*FGF5* 3'UTR-mut 组、mimic+*FGF5* 3'UTR-wt 组、mimic+*FGF5* 3'UTR-mut 组荧光素酶活性分别为 1.10 ± 0.20 、 1.08 ± 0.16 、 0.21 ± 0.06 、 1.15 ± 0.14 ,组间具有统计学差异($F=45.8, P=0.000$)。mimic+*FGF5* 3'UTR-wt 组与 miR-NC+*FGF5* 3'UTR-wt 组相比,荧光素酶活性明显降低($P=0.000$),FGF5 结合位点突变后 miR-149-5p mimic 对荧光素酶活性的抑制作用消失。这一结果证明 FGF5 是 miR-149-5p 的直接作用靶标。

2.3 miR-149-5p 通过负调控 FGF5 促进 OSCC 细胞凋亡

对照组、mimic 组、*FGF5* 组、mimic+*FGF5* 组细胞凋亡率分别为 5.00 ± 2.00 、 29.00 ± 4.00 、 5.00 ± 2.80 、 13.00 ± 5.00 ,组间具有统计学差异($F=48.45, P=0.000$)。*t* 检验分析得出,与对照组相比,mimic 组和 mimic+*FGF5* 组细胞凋亡率明显升高(P 值分别为 0.000、0.010),*FGF5* 组细胞凋亡率无明显变化($P>0.05$);与 *FGF5* 组相比,mimic+*FGF5* 组细胞凋亡率明显升高($P=0.014$)(图 3A、B);4 组方差分析 Bax/Bcl-2 比值有统计学意义($F=261.6, P=0.000$),*t* 检验分析得出,与对照组相比,mimic 组和 mimic+*FGF5* 组 Bax/Bcl-2 比值均明显升高($P=0.000$),*FGF5* 组 Bax/Bcl-2 比值明显降低($P=0.000$);与 *FGF5* 组相比,mimic+*FGF5* 组 Bax/Bcl-2 比值明显升高($P=0.000$)(图 3C、D)。因此 miR-149-5p 通过抑制 FGF5 的表达诱导细胞凋亡。

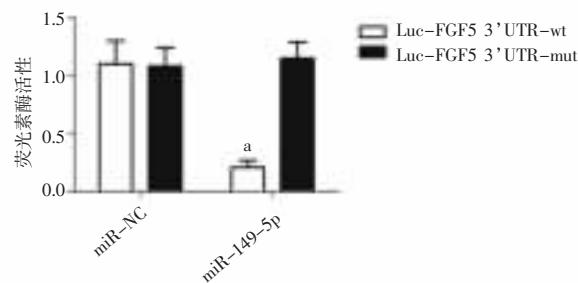


注:a,与对照组相比, $P=0.000$;b:与 FGF5 组相比, $P<0.05$

图 1 RT-PCR 和 Western blot 检测 FGF5 表达 (n=5)

Position 195–201 of FGF5 3'UTR 5' ...UCAAGCAGUCGGAGCCAGCAA...3'
hsa-miR-149-5p 3' CCCUCACUUCUGUGCCUCGGUCU ... 5'

A. Targetscan 数据库分析 miR-149-5p 靶点



注:a,与 miR-NC+FGF5 3' UTR-wt 组相比, $P<0.05$

B. 报告基因试剂盒检测荧光素酶活性

图 2 荧光素酶实验验证 miR-149-5p 与 FGF5 的靶向关系 (n=5)

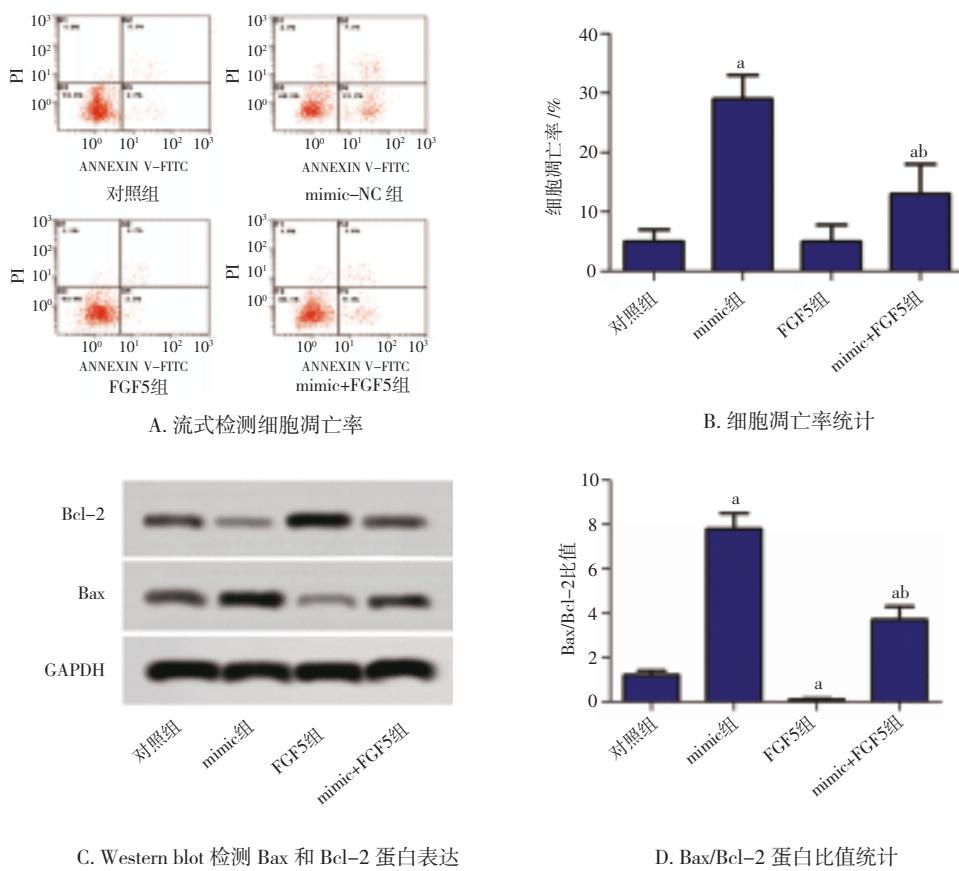
2.4 miR-149-5p 通过负调控 FGF5 抑制 OSCC 细胞的 EMT

显微观察 EMT 形态转换结果如图 4A 所示。与对照组相比, mimic 组细胞形态多为圆形, FGF5 组部分细胞由圆形变为纺锤形; mimic+FGF5 组相较于 FGF5 组细胞形态由纺锤形恢复为圆形。对照组、mimic 组、FGF5 组、mimic+FGF5 组 E-cad 和 N-cad 的表达水平方差分析具有统计学差异 (F 值分别为 50.66, 102.5, $P=0.000$) (图 4B、C)。 t 检验分析得出, 与对照组相比, mimic 组 E-cad 的表达明显上调 ($P=0.000$),

FGF5 组 E-cad 的表达明显下调 ($P=0.002$), mimic+FGF5 组 E-cad 的表达无明显变化 ($P>0.05$); 与 FGF5 组相比, mimic+FGF5 组 E-cad 的表达明显升高 ($P=0.020$)。与对照组相比, mimic 组 N-cad 的表达明显下调 ($P=0.000$), FGF5 组 N-cad 的表达明显上调 ($P=0.000$), mimic+FGF5 组 N-cad 表达无明显变化 ($P>0.05$); 与 FGF5 组相比, mimic+FGF5 组 N-cad 的表达明显下调 ($P=0.000$)。因此, miR-149-5p 通过下调 FGF5 的表达抑制 OSCC 细胞的 EMT。

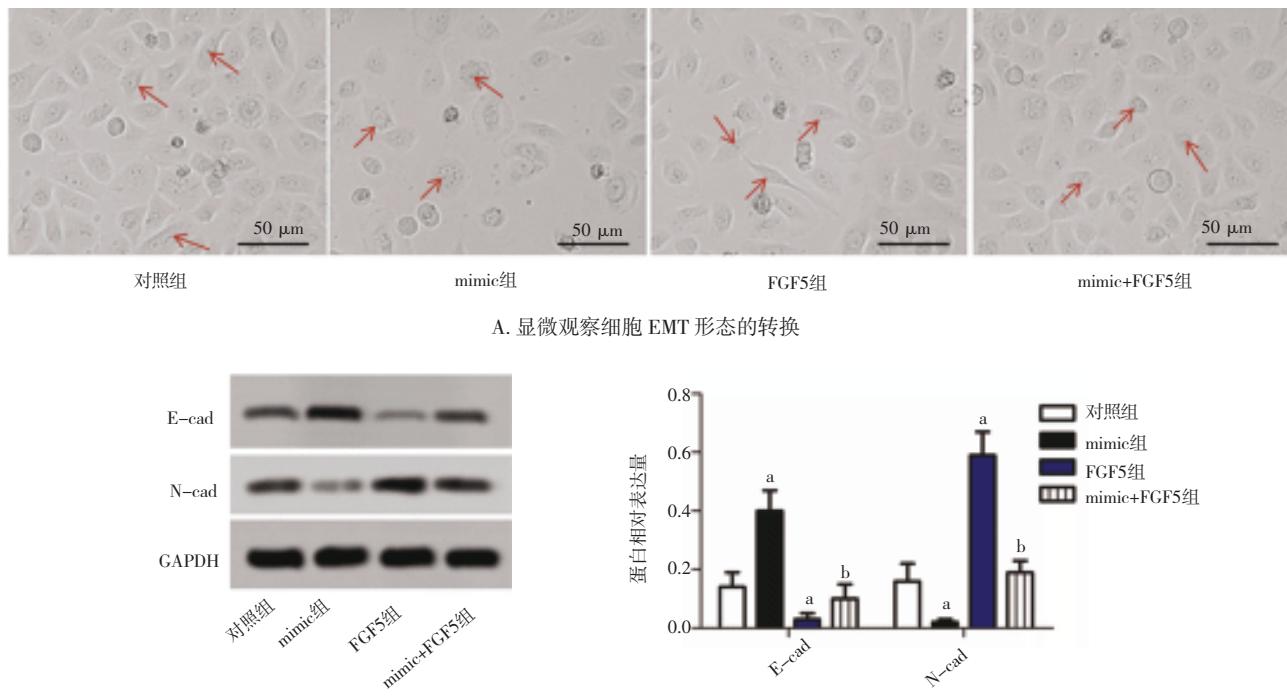
2.5 miR-149-5p 通过负调控 FGF5 抑制 OSCC 细胞微管形成

通过成管实验检测 CAL-27 细胞管腔形成能力, 从而分析该细胞成瘤及转移能力。如图 5A、B 所示, 4 组方差分析微管结节数目有统计学意义 ($F=42.17, P=0.000$)。 t 检验分析得出, 与对照相比, mimic 组微管结节数目明显减少 ($P=0.002$), FGF5 组微管结节数目明显增多 ($P=0.000$), mimic+FGF5 组微管结节数目无明显变化 ($P>0.05$); 与 FGF5 组相比, mimic+FGF5 组微管结节数目明显减少 ($P=0.000$)。对照组、mimic 组、FGF5 组、mimic+FGF5 组 VEGF 的表达水平方差分析具有统计学差异 ($F=124, P=0.000$)。 t 检验分析得出, 与对照组相比, mimic 组 VEGF 的表达明显降低 ($P=0.000$), FGF5 组 VEGF 的表达明显升高 ($P=0.000$), mimic+FGF5 组 VEGF 表达无明显变化 ($P>0.05$); mimic+FGF5 组 VEGF 的表达量相较于 FGF5 组明显降低 ($P=0.000$) (图 5C、D)。因此 miR-149-5p 通过下调 FGF5 抑制 CAL-27 细胞管腔形成。



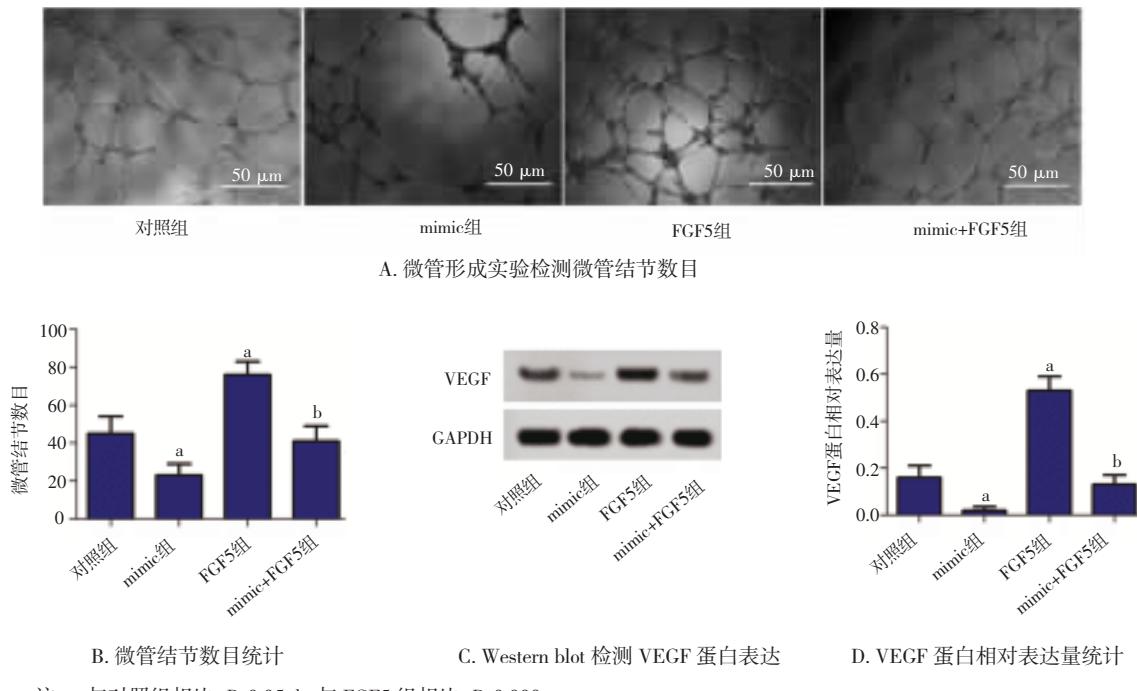
注: a, 与对照组相比, $P<0.05$; b, 与 FGF5 组相比, $P=0.000$

图 3 流式细胞术检测细胞凋亡及 Western blot 检测 Bax/Bcl-2 表达 ($n=5$)



注: a, 与对照组相比, $P<0.05$; b, 与 FGF5 组相比, $P<0.05$

图 4 EMT 形态转换及 Western blot 检测 E-cad 和 N-cad 的蛋白表达 ($n=5$)



注: a: 与对照组相比, $P<0.05$; b: 与 FGF5 组相比, $P=0.000$

图 5 成管实验及 Western blot 检测 VEGF 的表达 (n=5)

3 讨 论

OSCC 转移机制复杂, 化疗耐药, 预后差^[3]。miRNA 可通过靶向调控下游蛋白的表达影响癌症的发生和发展^[7]。研究表明, FGF5 是 miR-188-5p 在肝癌细胞中的直接靶标, 并在肝癌和多形性胶质母细胞瘤中充当致癌基因^[15]。miR-149-5p 靶向 B3GNT3 抑制肺癌细胞的生长、侵袭及肺癌的发展^[16]。本研究表明, miR-149-5p 能明显降低 OSCC 细胞中 FGF5 表达水平, 并逆转 FGF5 基因的过表达, 因此 miR-149-5p 可能靶向 FGF5。利用 TargetScan 网站分析发现, FGF5 3'UTR 上存在 miR-149-5p 结合位点, 双荧光素酶基因报告实验表明, mimic 能明显降低 FGF5 野生型质粒的荧光素酶活性而对 FGF5 突变型质粒的荧光素酶活性没有影响, 表明 FGF5 是 miR-149-5p 的直接靶标。

据报道, miR-149-5p 在各种人类肿瘤中(包括 OSCC)具有重要调节作用。研究表明, miR-149-5p 过表达明显抑制黑色素瘤细胞的增殖和集落形成, 并促进细胞凋亡^[17]。miR-149-5p 可抑制 CAL-27 细胞增殖、迁移和侵袭, 并促进其凋亡^[3]。本研究表明, 过表达 miR-149-5p 促进 OSCC 细胞凋亡, 与之相反, 过表达 FGF5 抑制 OSCC 细胞凋亡。然而, miR-

149-5p mimic 可逆转 FGF5 过表达诱导的细胞凋亡率上调。Bax、Bcl-2 属于 Bcl-2 家族, Bax 蛋白促进细胞凋亡, Bcl-2 抑制细胞凋亡。本研究表明, mimic 组 Bax/Bcl-2 比值明显升高, FGF5 过表达组 Bax/Bcl-2 比值明显降低, mimic+FGF5 组可明显逆转 FGF5 组的 Bax/Bcl-2 比值降低。因此 miR-149-5p 通过负调控 FGF5 的表达促进 OSCC 细胞凋亡。

在癌症发展过程中, EMT 是指不活动的上皮细胞转化为活动的间质细胞的关键细胞过程, 伴随有细胞形态与相关基因改变的过程^[18], 是上皮型肿瘤发生转移的一个关键步骤^[19]。据报道, miR-149 通过抑制大肠癌中的 FOXM1 抑制细胞迁移和侵袭^[20]。Luo C 等^[21]研究表明, miR-149 可通过调节 PPM1F 抑制肝细胞癌中的细胞转移。miR-149-5p 通过靶向甲状腺髓样癌中的 GIT1 抑制细胞增殖和侵袭^[22]。本研究表明, 过表达 miR-149-5p 细胞发生上皮样形态变化, 而过表达 FGF5 细胞发生间质样形态变化; 同时过表达 miR-149-5p 和 FGF5, mimic 抑制过表达 FGF5 引起的细胞间质样形态变化。发生 EMT 的肿瘤细胞, 其细胞表面黏附力较强的 E-cad 下调, 致使细胞丧失上皮极性, 胞间连接疏松, 获得了移动潜能^[23]; 同时, 间质化分子标志物 N-cad 表达上调。本研究表明, 过表达 miR-149-5p 时 E-cad 蛋白表达明显上调, N-cad 蛋白表达明显下调, 过表达 FGF5

结果与之相反;而且 miR-149-5p mimic 能够抑制 FGF5 下调 E-cad 的表达和上调 N-cad 的表达。因此 miR-149-5p 通过负调控 FGF5 阻止 EMT 进程。

肿瘤血管是肿瘤生长和转移的必要条件,其生成过程及调控机制十分复杂,微管形成实验是目前在体外研究血管生成时最常用的一种实验方法,其原理是将 Matrigel 人工基质胶铺在培养板上模拟基底膜,观察细胞在上面形成微管样结构的能力^[24]。本研究结果表明,miR-149-5p mimic 可抑制微管形成,FGF5 过表达促进微管形成,mimic 能抑制 FGF5 诱导的微管结节增加。VEGF 是血管生成的标志物,本研究结果表明 miR-149-5p mimic 能明显逆转 FGF5 过表达诱导的 VEGF 表达上调。因此 miR-149-5p 通过负调控 FGF5 抑制 OSCC 细胞管腔的形成。

综上所述,FGF5 作为 miR-149-5p 的直接靶标,受 miR-149-5p 的负调控,诱导 OSCC 细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的上皮-间质转化及管腔形成。这些发现共同证明了 miR-149-5p 通过靶向 FGF5 在 OSCC 进程中的抑癌作用,表明 miR-149-5p 有望作为 OSCC 的治疗靶标。

参 考 文 献

- [1] Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy[J]. *J Dent Res*, 2008, 87(1):14-32.
- [2] Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (review)[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(1):7-11.
- [3] Luo KL, He J, Yu DQ, et al. miR-149-5p regulates cisplatin chemosensitivity, cell growth, and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells by targeting TGFβ2[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(10):3728-3739.
- [4] Rogers SN, Brown JS, Woolgar JA, et al. Survival following primary surgery for oral cancer[J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(3):201-211.
- [5] Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1):5-20.
- [6] Peng Y, Croce CM. The role of microRNAs in human cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2016, 1:15004.
- [7] Castro D, Moreira M, Gouveia AM, et al. microRNAs in lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46):81679-81685.
- [8] Mao GM, Liu Y, Fang X, et al. Tumor-derived microRNA-494 promotes angiogenesis in non-small cell lung cancer[J]. *Angiogenesis*, 2015, 18(3):373-382.
- [9] Yuan Y, Du WJ, Wang Y, et al. Suppression of AKT expression by miR-153 produced anti-tumor activity in lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(6):1333-1340.
- [10] Shi ZM, Wang L, Shen H, et al. Downregulation of miR-218 contributes to epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in lung cancer by targeting Slug/ZEB2 signaling[J]. *Oncogene*, 2017, 36(18):2577-2588.
- [11] Jin L, Li YF, Liu JJ, et al. Tumor suppressor miR-149-5p is associated with cellular migration, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6):5386-5392.
- [12] Ornitz DM, Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2015, 4(3):215-266.
- [13] Teven CM, Farina EM, Rivas J, et al. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases[J]. *Genes Dis*, 2014, 1(2):199-213.
- [14] Liu DD, Zhang CJ, Li XL, et al. microRNA-567 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting FGF5 in osteosarcoma [J]. *EXCLI J*, 2018, 17:102-112.
- [15] Fang F, Chang RM, Yu L, et al. microRNA-188-5p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting FGF5 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(4):874-885.
- [16] Sun Y, Liu T, Xian L, et al. B3GNT3, a direct target of miR-149-5p, promotes lung cancer development and indicates poor prognosis of lung cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12:2381-2391.
- [17] Chen WQ, Zhang JH, Xu HJ, et al. The negative regulation of miR-149-5p in melanoma cell survival and apoptosis by targeting LRIG2 [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(9):4331-4340.
- [18] Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1429-1437.
- [19] Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(12):2153-2160.
- [20] Xu K, Liu XB, Mao XB, et al. microRNA-149 suppresses colorectal cancer cell migration and invasion by directly targeting forkhead box transcription factor FOXM1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(2):499-515.
- [21] Luo G, Chao YL, Tang B, et al. miR-149 represses metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting actin-regulatory proteins PPM1F [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35):37808-37823.
- [22] Ye XJ, Chen XF. miR-149-5p inhibits cell proliferation and invasion through targeting GIT1 in medullary thyroid carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1):372-378.
- [23] Zuo JH, Wen J, Lei MS, et al. Hypoxia promotes the invasion and metastasis of laryngeal cancer cells via EMT[J]. *Med Oncol*, 2016, 33(2):15.
- [24] 耿 良, 行书丽, 路 鹏, 等. 人参皂苷 Rg3 影响 EA.hy926 人血管内皮细胞侵袭、增殖及微管形成的实验研究[J]. 北京中医药, 2012, 31(2):137-140.

(责任编辑:周一青)