

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. 西南医科大学附属医院牙周黏膜科, 泸州 646000; 3. 西南医科大学附属医院口腔医院修复科, 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 carcinomaLu 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 detect the expression of 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- β 2(transforming growth factor- β 2, TGF- β 2)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'-UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC-3', 其相应的阴性对照 mimic-NC(miR-NC): 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C、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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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。实验结果均以均数 \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

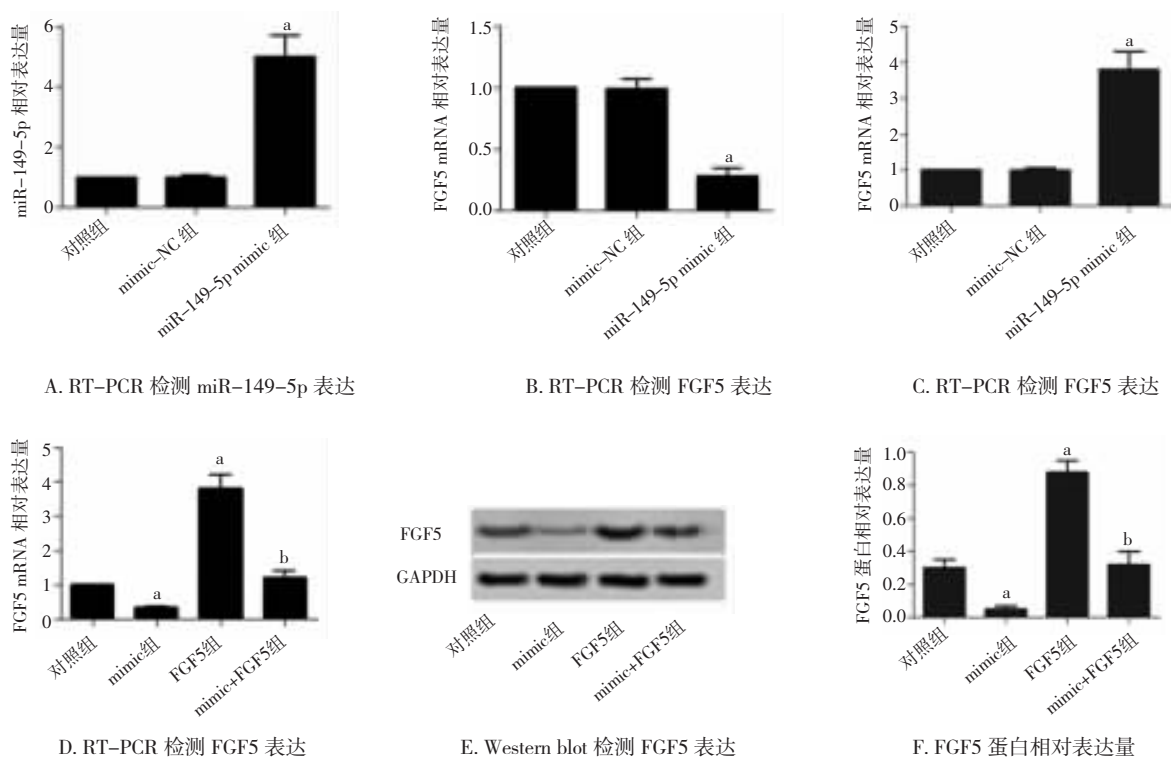
水平作为参照 (1.00 ± 0.00), mimic-NC 组和 miR-149-5p mimic 组中 miR-149-5p 的表达量分别为 0.99 ± 0.08 、 5.00 ± 0.70 , 方差分析显示方差齐 ($F=161.6$, $P=0.000$) (图 1A), FGF5 的表达量分别为 0.99 ± 0.08 、 0.28 ± 0.07 , 方差分析显示方差齐 ($F=226.2$, $P=0.000$) (图 1B)。*t* 检验分析得出, 与对照组相比, miR-149-5p mimic 组中 miR-149-5p 的表达量明显上调 ($P=0.000$), FGF5 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。

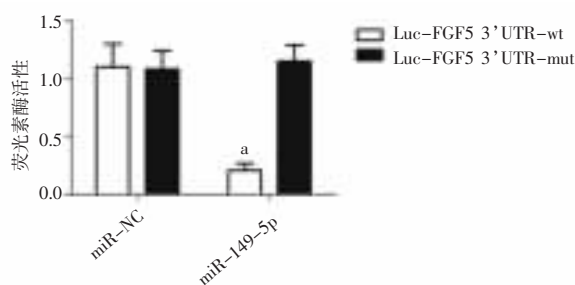


注:a,与对照组相比, $P=0.000$;b:与 FGF5 组相比, $P<0.05$

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

Position 195-201 of FGF5 3'UTR 5' ...UCAAGCAGUCGAGCAGCCAGAA...3'
hsa-miR-149-5p 3' CCCUCACUUCUGGCCUGGUCU ...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, $P<0.05$

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

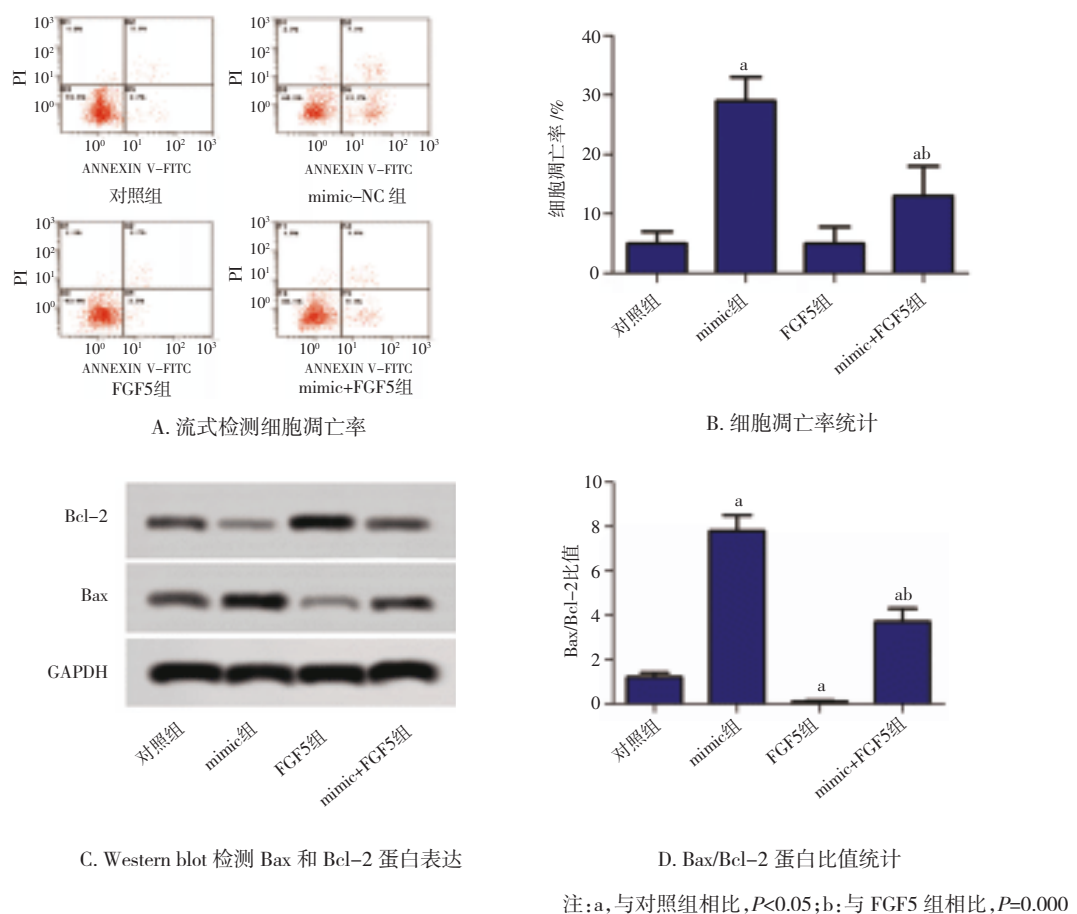
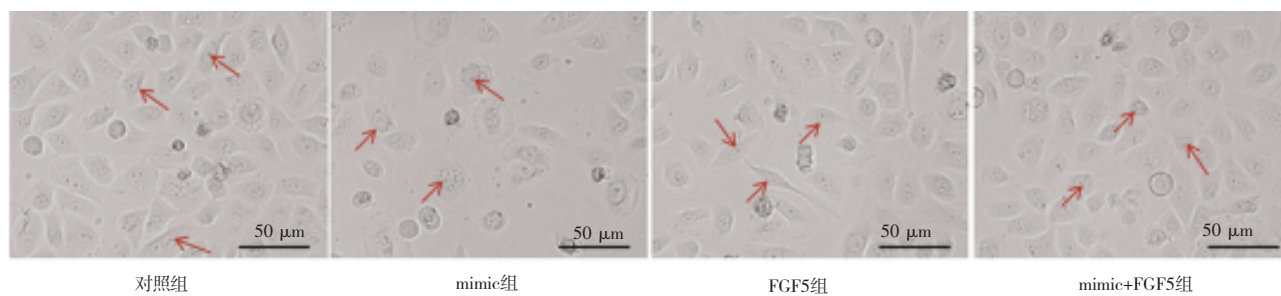
2.4 miR-149-5p 通过负调控 FGF5 抑制 OSCC 细胞的 EMT

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($P=0.000$),

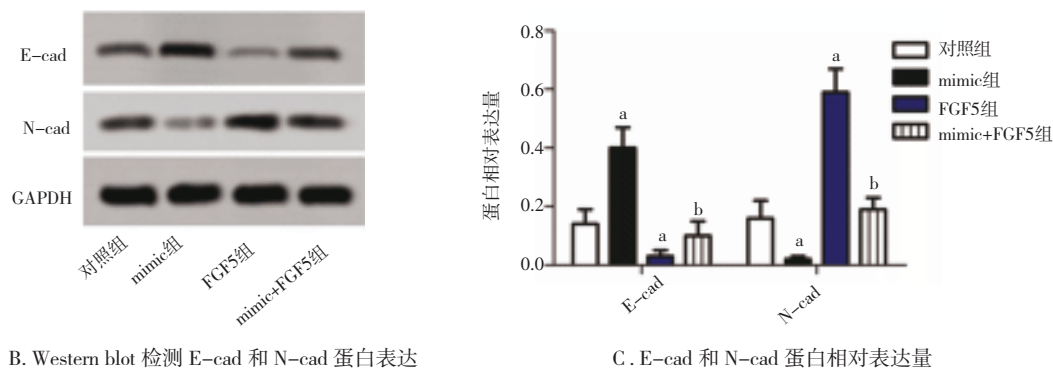
FGF5 组 E-cad 的表达明显下调($P=0.002$),mimic+FGF5 组 E-cad 的表达无明显变化($P>0.05$);与 FGF5 组相比,mimic+FGF5 组 E-cad 的表达明显升高($P=0.020$)。与对照组相比,mimic 组 N-cad 的表达明显下调($P=0.000$),FGF5 组 N-cad 的表达明显上调($P=0.000$),mimic+FGF5 组 N-cad 表达无明显变化($P>0.05$);与 FGF5 组相比,mimic+FGF5 组 N-cad 的表达明显下调($P=0.000$)。因此,miR-149-5p 通过下调 FGF5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

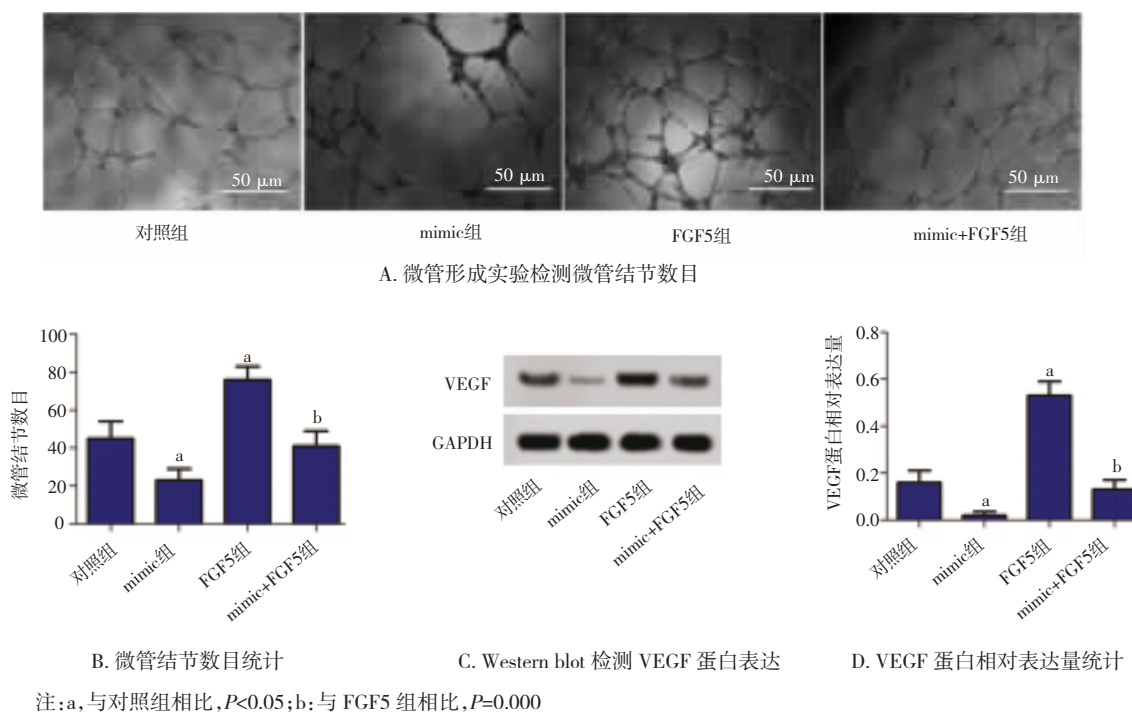
2.5 miR-149-5p 通过负调控 FGF5 抑制 OSCC 细胞微管形成

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。

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

A. 显微观察细胞 EMT 形态的转换

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

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^[5]。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)