

mation and fibrosis via STAT3 and NF-kappa B signaling pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(8):e104255.

[10] 李寰,靳立军. 心脏肥大细胞与心肌凋亡[J]. 岭南心血管病杂志, 2012, 18(1):77-80.

[11] 王靓,侯晓燕,黄金玲,等. 苓桂术甘汤对慢性心力衰竭模型大鼠心肌组织 TNF- α 及血清 NF- κ B 和 IL-1 β 的影响[J]. 中草药, 2013, 44(5):586-589.

[12] 李燕,万汝根. N-乙酰半胱氨酸对心力衰竭兔氧化应激和核因子 NF- κ B 的干预研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(2):55-58.

[13] Wu D, Lei H, Jy W, et al. CTRP3 attenuates post-infarct cardiac fibrosis by targeting Smad3 activation and inhibiting myofibroblast differentiation[J]. J Mol Med (Berl),

• 经验交流 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.24.034

2015, 93(12):1311-1325.

[14] 张平,张再伟,邵靓. TGF- β_1 、CTGF 对慢性心力衰竭心肌纤维化进展的临床意义[J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(11):45-47, 55.

[15] 麻京豫. 抗心力衰竭颗粒对 DHF 大鼠血浆 ALD、PRA、AT-Ⅱ 及心肌细胞 TGF- β_1 的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(11):2953-2954.

[16] 王二玲,杨国杰. 心力衰竭心室重构过程中 RHO 激酶抑制剂对 MMP-2 和 TGF- β_1 水平的影响[J]. 中国实用医刊, 2013, 40(9):37-38.

(收稿日期:2016-03-07 修回日期:2016-05-27)

miR-21 对人喉鳞癌 Hep2 细胞增殖与凋亡的影响

曲 莉

(南阳市中心医院耳鼻喉二病区,河南南阳 473000)

[摘要] 目的 探讨 miR-21 对人喉鳞癌 Hep2 细胞增殖与凋亡的影响。方法 脂质体 LipofectamineTM2000 将 miR-21 inhibitor 和 miR-21 阴性对照(NC)转入 Hela 细胞,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活力,克隆实验及 Hoechst 染色分别检测细胞增殖与凋亡情况,Western blot 检测人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(PTEN)、程序化死亡蛋白 4 基因(PDCD4)、Bax、Bcl-2 表达及蛋白激酶 B(AKT)磷酸化水平。结果 与 miR-21 NC 比较,miR-21 inhibitor 能显著抑制细胞活力[(0.728 $\pm$ 0.045) vs. (0.393 $\pm$ 0.018), $P<0.01$],降低细胞克隆数目[(158.38 $\pm$ 14.47) vs. (65.52 $\pm$ 6.86), $P<0.01$],提高细胞凋亡率[(8.45 $\pm$ 0.67)% vs. (40.23 $\pm$ 3.46)%, $P<0.01$],并上调 PTEN、PDCD4、Bax 表达,下调 Bcl-2 表达及降低 AKT 磷酸化水平($P<0.01$)。结论 miR-21 inhibitor 通过 PTEN/AKT 信号通路抑制人喉鳞癌 Hep2 细胞增殖和诱导凋亡,并调节细胞凋亡相关蛋白的表达。

[关键词] miR-21;人喉鳞癌 Hep2 细胞;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R739.65 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1671-8348(2016)24-3411-03

喉鳞癌是我国耳鼻咽喉科常见的恶性肿瘤,占耳鼻咽喉科肿瘤的 36%左右,其中喉鳞状细胞癌是其主要病理类型,占 90%以上,手术治疗、化学疗法和放射治疗是其主要治疗方式,但对中晚期患者预后及 5 年生存率效果欠佳^[1]。而喉鳞癌发病机制尚未清楚,吸烟、饮酒、病毒感染、环境污染、癌基因的激活及抑癌基因的失活都可能是其病因。miRNA 是目前新发现的一类癌基因或抑癌基因,并与肿瘤的发生、发展密切相关,在肿瘤的增殖、凋亡、侵袭等生物学行为中起重要作用^[2]。已通过 miRNA 芯片技术证实 48 对喉鳞状细胞癌标本中 4 个 miRNA 表达量显著上调,包括 miR-21^[3]。也发现喉鳞状细胞癌患者血清中 miR-21 表达量显著增高,并与淋巴结转移密切相关,并能作为喉鳞状细胞癌标记物及预后的独立因子^[4]。提示 miR-21 在喉鳞癌中过表达,并作为癌基因参与喉鳞癌的发生、发展。本研究拟通过下调人喉鳞癌细胞中 Hep2 中 miR-21 的表达,探讨其对 Hep2 细胞增殖及凋亡的影响,从而为喉鳞癌的诊断及预后判断提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人喉鳞癌细胞 Hep2 购于中国科学院细胞库,目录号:TCHu21。

1.1.2 主要试剂和仪器 兔抗 Bax、Bcl-2 单克隆抗体(Epitmics 公司,美国);兔抗 PDCD4、PTEN、AKT、p-AKT 单克隆抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国);miR-21 inhibitor 及对照 miR-21 NC(上海吉玛制药技术有限公司);Hoechst 33258 染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT)法(Gibco 公司,美国);胎牛血清、DMEM 培养基(Hyclone 公司,美国)。迷你双垂直电泳仪、迷你转印电泳仪(北京六一仪器厂);ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 Hela 细胞活力 将人喉鳞癌细胞 Hep2 接种于 96 孔板,当细胞汇合度达到 50%时,用 LipofectamineTM2000 分别转染 miR-21 inhibitor 和 miR-21 阴性对照(negative control,NC)。48 h 后,加入 5 mg/mL MTT 20 μ L,继续培养 4 h 后吸弃培养液,每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 150 μ L,震荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 560 nm 处测 OD 值,以 OD 值表示细胞相对活力。

1.2.2 集落形成实验 将人喉鳞癌细胞 Hep2 接种于 96 孔板,当细胞汇合度达到 50%时,用 LipofectamineTM2000 分别转染 miR-21 inhibitor 和 miR-21 NC,48 h 后,用含 10%甲醛和

0.1%结晶紫染液固定染色。轻轻甩去染色液,拍照分析。

1.2.3 Hoechst 染色 将人喉鳞癌细胞 Hep2 接种于 6 孔板,当细胞汇合度达到 50%时,用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 miR-21 inhibitor 和 miR-21 NC。48 h 后消化收集细胞,后按照 Hoechst 33258 染色试剂盒说明书进行操作,4%多聚甲醛固定,Hoechst 33258 染色液避光染色,在荧光显微镜下观察并拍照。

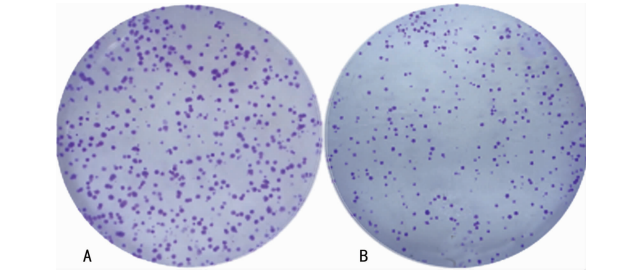
1.2.4 Western blot 将人喉鳞癌细胞 Hep2 接种于 6 孔板,当细胞汇合度达到 50%时,用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 miR-21 inhibitor 和 miR-21 NC。48 h 后消化收集细胞,加入 RIPA 裂解液裂解,离心即可获得总蛋白。根据 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白上样,跑 SDS 凝胶电泳,后湿法转膜。一抗溶液孵育,4 ℃过夜;二抗溶液中室温孵育。在凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件对各抗体条带灰度值进行统计。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

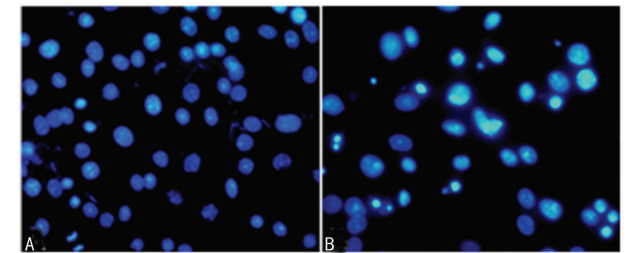
2 结 果

2.1 miR-21 inhibitor 对人喉鳞癌细胞 Hep2 活力的影响 人喉鳞癌细胞 Hep2 细胞转染 miR-21 inhibitor 和 miR-21 NC 48 h 后,经 MTT 实验发现 miR-21 inhibitor 能显著抑制细胞活力 $[(0.728 \pm 0.045) \text{ vs. } (0.393 \pm 0.018)]$,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 miR-21 inhibitor 对人喉鳞癌细胞 Hep2 克隆形成及凋亡的影响 miR-21 inhibitor 能显著减少 Hep2 细胞克隆数目 $[(158.38 \pm 14.47) \text{ vs. } (65.52 \pm 6.86)]$,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 1。miR-21 inhibitor 亦能显著提高 Hep2 细胞凋亡率 $[(8.45 \pm 0.67) \% \text{ vs. } (40.23 \pm 3.46) \%]$,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见图 2。



A:miR-21 NC;B:miR-21 inhibitor。
图 1 miR-21 inhibitor 对人喉鳞癌细胞 Hep2 克隆形成能力的影响



A:miR-21 NC;B:miR-21 inhibitor。
图 2 miR-21 inhibitor 对人喉鳞癌细胞 Hep2 凋亡的影响

2.3 miR-21 inhibitor 对人喉鳞癌细胞 Hep2 中 PDCD4、Bax 及 Bcl-2 表达量的影响 miR-21 inhibitor 能显著上调 PDCD4 及 Bax 表达 ($P < 0.01$),下调 Bcl-2 表达 ($P < 0.01$),见图 3、

表 1。

2.4 miR-21 inhibitor 对人喉鳞癌细胞 Hep2 中 PTEN/AKT 信号通路的影响 miR-21 inhibitor 能显著上调 PTEN 表达 ($P < 0.01$),降低 AKT 磷酸化水平 ($P < 0.01$),见图 4、表 2。

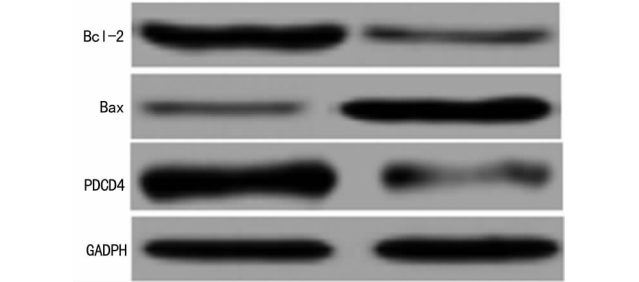


图 3 miR-21 inhibitor 对人喉鳞癌细胞 Hep2 中 PDCD4、Bax 及 Bcl-2 表达量的影响

表 1 miR-21 inhibitor 对人喉鳞癌细胞 Hep2 中 PDCD4、Bax 及 Bcl-2 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	Bcl-2	Bax	PDCD4
miR-21 NC	1.143±0.084	0.345±0.073	1.296±0.089
miR-21 inhibitor	0.367±0.027 *	1.012±0.025 *	0.379±0.063 *

* : $P < 0.01$,与 miR-21 NC 比较。

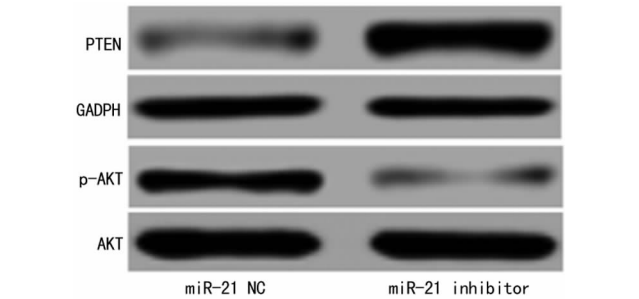


图 4 miR-21 inhibitor 对人喉鳞癌细胞 Hep2 中 PTEN/AKT 信号通路的影响

表 2 miR-21 inhibitor 对人喉鳞癌细胞 Hep2 中 PTEN/AKT 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	PTEN	p-AKT/AKT
miR-21 NC	0.354±0.026	0.612±0.062
miR-21 inhibitor	1.043±0.079 *	0.342±0.035 *

* : $P < 0.01$,与 miR-21 NC 比较。

3 讨 论

miR-21 是 2001 年 Lagos-Quintana 等在非脊椎动物和脊椎动物中首次发现的,随后在小鼠的神经元细胞及 Hela 细胞中陆续检测到,已证实 miR-21 与喉癌、大肠癌、卵巢癌、肺癌等多种肿瘤的发生、发展密切相关,其表达呈上调趋势^[2,5]。Cao 等^[3]通过 miRNA 芯片分析也证实 48 例喉鳞状细胞癌标本中 4 个 miRNA 表达量显著上调,包括 miR-21。Wang 等^[4]检测 52 例喉鳞状细胞癌患者及 52 例声带息肉患者血清中 miR-21 的表达,发现喉鳞状细胞癌患者血清中 miR-21 表达量显著增高,可作为喉鳞状细胞癌标记物及预后的独立因子。提示 miR-21 在喉鳞癌细胞中起致癌 miRNA 作用,并与喉鳞癌的发生、发展密切相关。此外,miR-21 反寡义核苷酸既能在体外显著抑制宫颈癌 SiHa 细胞增殖,诱导细胞凋亡,并能在体内抑

制 SiHa 细胞裸鼠移植瘤生长,促进其凋亡^[6-7]。miR-21 inhibitor 亦对胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、舌鳞状细胞癌细胞具有增殖抑制及凋亡诱导作用^[8-10]。说明下调 miR-21 表达能显著地影响多种肿瘤细胞的增殖与凋亡,同时已报道 PTEN、PDCD4、Bcl-2 等多个蛋白是 miR-21 在不同肿瘤细胞中的靶基因,通过靶向调节靶基因表达,影响肿瘤细胞的增殖凋亡等行为^[11]。所以本研究在此基础上,探讨 miR-21 是否通过调节相关靶蛋白的表达,从而影响喉鳞癌细胞 Hep2 的增殖与凋亡。

细胞的凋亡受细胞凋亡基因严格调控,其中研究最为广泛的是 Bcl-2 家族,Bcl-2 可显著促进癌细胞的生长增殖并阻滞癌细胞凋亡,在喉鳞癌组织呈高表达^[12]。Bax 是 Bcl-2 家族成员,与 Bcl-2 形成二聚体,维持细胞增殖凋亡平衡,Bax 在喉鳞癌组织中低表达,并参与喉癌细胞凋亡的调控^[13]。PDCD4 是新近发现的抑癌基因,可通过诱导肿瘤细胞凋亡或阻滞细胞周期,从而抑制肿瘤细胞的生长,其在人乳腺癌、肺癌、肠癌、喉癌等肿瘤中低表达,甚至缺失,与肿瘤的发生、发展密切相关^[14-16]。因此上调 Bax 及 PDCD4 表达,下调 Bcl-2 表达,能有效地促进喉癌细胞凋亡,从而抑制癌细胞增殖。本研究结果表明,miR-21 inhibitor 能显著抑制 Hep2 细胞克隆,诱导细胞凋亡,下调 Bcl-2 的表达,上调 Bax 及 PDCD4 的表达。

肿瘤的增殖与凋亡受众多信号通路调控,PI3K/AKT 信号通路就是其中一种,其具有抗凋亡通路之称,能与多种人类肿瘤的发生、发展密切相关,能通过下游多种靶蛋白表达,如 Bcl-2、PDCD4 等,参与调控肿瘤细胞生长、凋亡、血管生成及侵袭等过程。PI3K/AKT 上游蛋白 PTEN 是 miR-21 的下游靶基因,在众多肿瘤中表达低下,缺失或突变。PTEN 能将三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)去磷酸化为二磷酸脂酰肌醇(PIP2),从而负调控 PI3K/AKT 信号通路,在细胞凋亡中起重要作用。已报道 PI3K/AKT 在喉鳞癌中异常激活^[17]。下调 miR-21 的表达可通过 PTEN/AKT 信号通路抑制白血病 K562 细胞增殖及迁移^[18]。推测 miR-21 也能通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路影响喉癌细胞增殖凋亡等生物学行为。因此,本研究通过 Western blot 检测 miR-21 转染后,细胞中此信号通路蛋白的表达情况,结果表明,miR-21 inhibitor 能显著上调 PTEN 表达,降低 AKT 磷酸化水平,从而提示 miR-21 表达量下调后能通过 PTEN/AKT 信号通路抑制喉鳞癌细胞 Hep2 增殖并诱导细胞凋亡。

综上所述,miR-21 inhibitor 能显著的诱导喉鳞癌细胞 Hep2 凋亡,并抑制其克隆形成,与下调 Bcl-2 表达、上调 Bax 及 PDCD4 表达有关,可能是通过 PTEN/AKT 信号通路实现。

参考文献

- [1] Zhang W,Liu Y,Wang CW. S100A4 promotes squamous cell laryngeal cancer Hep-2 cell invasion via NF-kB/MMP-9 signal[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2014,18(9):1361-1367.
- [2] 张经波,汪荣泉. mir-21 的转录调控及在肿瘤中的作用研究进展[J]. 重庆医学,2012,41(31):3336-3337,3346.
- [3] Cao PY,Zhou L,Zhang J,et al. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck,2013,35(5):720-728.
- [4] Wang JT,Zhou YD,Lu J,et al. Combined detection of se-

- rum exosomal miR-21 and HOTAIR as diagnostic and prognostic biomarkers for laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Medical Oncology,2014,31(9):148.
- [5] Ludvikova M,Kalfert D,Pesta M,et al. MicroRNA profile in site-specific head and neck squamous cell cancer[J]. Virchows Archiv,2014,465(1):321.
- [6] Huang Y,He Y,Li J. MicroRNA-21:a central regulator of fibrotic diseases via various targets[J]. Curr Pharm Des,2015,21(17):2236-2242.
- [7] 王晓玫,许静,成志强,等. 微小 RNA-21 反义寡核苷酸对宫颈鳞癌 SiHa 细胞株细胞生物学特性影响的体内外实验研究[J]. 中华病理学杂志,2012,41(4):254-259.
- [8] Zhu W,Xu B. MicroRNA-21 identified as predictor of cancer outcome: a meta-analysis [J]. PLoS One, 2014, 9 (8): e103373.
- [9] Wang Y,Zhu Y,Lv P,et al. Targeting miR-21 with AS-miR-21 suppresses aggressive growth of human tongue squamous cell carcinoma in vivo [J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(5):4773-4781.
- [10] 齐志勇,贾永峰,张治平,等. S100A4、Bcl-2、Survivin 在喉癌组织中的表达及临床意义[J]. 现代中西医结合杂志,2014,23(9):929-932,969.
- [11] 蔡雯,崔颖,张婷婷,等. Survivin、Bax 蛋白在喉病变组织中的表达及临床意义[J]. 重庆医学,2011,40(20):1988-1990,1994.
- [12] Lankat-Buttgereit B,Göke R. The tumour suppressor Pdc4: recent advances in the elucidation of function and regulation[J]. Biol Cell,2009,101(6):309-317.
- [13] 冯国飞,李培华,尤慧华,等. 喉癌组织中程序性细胞死亡因子 4 的表达及临床意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2011,25(1):16-19.
- [14] Yao Q,Xu H,Zhang QQ,et al. MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,388(3):539-542.
- [15] Asangani IA,Rasheed SA,Nikolova DA,et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion,intravasation and metastasis in colorectal cancer[J]. Oncogene,2008,27(15):2128-2136.
- [16] Chen Y,Liu W,Chao T,et al. MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G[J]. Cancer Lett,2008,272(2):197-205.
- [17] 杨大志,姬长友. PI3K、p-Akt 蛋白在喉鳞癌中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报,2007,29(10):935-937.
- [18] 吴共发,黄绮亭,曾宇婷,等. miR-21 通过 PTEN/AKT 通路抑制白血病细胞 K562 的迁移和增殖[J]. 医学研究生学报,2013,26(10):1037-1040.