

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.16.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200313.1655.008.html\(2020-03-14\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200313.1655.008.html(2020-03-14))

miR-519d-3p 通过靶向 MECP2 抑制口腔鳞状细胞癌增殖、迁移与侵袭的研究^{*}

张孝霞,白 银,朱艺丹,陈晓华
(西安外事学院医学院口腔医学技术系,西安 710077)

[摘要] 目的 探究 miR-519d-3p 与甲基化 CpG 结合蛋白 2(MECP2)的作用关系及其对口腔鳞状细胞癌(OSCC)的影响。方法 逆转录 PCR(RT-PCR)筛选最适细胞进行后续实验。分组转染 miR-519d-3p 或 MECP2 重组表达载体,双荧光素酶报告基因实验检测靶向作用关系,CCK8 检测细胞增殖倍数,流式细胞术检测细胞周期阻滞及细胞凋亡,划痕愈合法检测细胞迁移,Transwell 法检测细胞侵袭,Western blot 检测 MECP2、E-钙粘蛋白(E-cadherin)、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、周期蛋白 D1(Cyclin D1)、活化型半胱天冬酶 3(cl-CASP3)和分泌性卷曲相关蛋白 4(SFRP4)蛋白水平,MSP 法检测 SFRP4 甲基化水平。结果 与癌旁组织比较,在 OSCC 组织标本中 miR-519d-3p 表达水平降低,MECP2 基因表达水平升高,miR-519d-3p 和 MECP2 存在靶向作用关系($P<0.05$)。与 mimics NC 组比较,miR-519d-3p mimics 组 OSCC 细胞增殖倍数降低,细胞周期阻滞,细胞凋亡率升高,细胞迁移和侵袭能力降低,MECP2、MMP-2、Cyclin D1 蛋白水平降低,E-cadherin、cl-CASP3、SFRP4 蛋白水平升高,SFRP4 基因去甲基化;MECP2 蛋白水平提高可扭转 miR-519-3p mimics 引起的上述各指标的变化。结论 miR-519d-3p 可靶向作用于 MECP2,抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移与侵袭。

[关键词] 口腔肿瘤;肿瘤,鳞状细胞;miR-519d-3p;甲基化 CpG 结合域;细胞增殖;细胞凋亡;细胞运动;肿瘤浸润

[中图法分类号] R739.8 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2020)16-2617-09

Study on miR-519d-3p inhibits proliferation,migration and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting MECP2^{*}

ZHANG Xiaoxia,BAI Yin,ZHU Yidan,CHEN Xiaohua
(Department of Dental Technology,College of Medicine,Xi'an International University,Xi'an,Shaanxi 710077,China)

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between miR-519d-3p and methylated CpG binding protein 2 (MECP2) and its effect on oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** The expression of miR-519d-3p or MECP2 gene in clinical samples and OSCC cells was detected by Real-time quantitative PCR (RT-PCR),and the optimal cells were screened for subsequent experiments. OSCC cells were transfected with miR-519d-3p or MECP2 recombinant expression vector according to the groups,dual luciferase reporter gene assay was used to test the targeting relationship,cell proliferation was measured by CCK8,cell cycle arrest and apoptosis were detected by flow cytometry,cell migration was observed by wound healing method,cell invasion was observed by Transwell assay,protein levels of MECP2,E-cadherin,matrix metalloproteinase-2 (MMP-2),cyclin D1,cleaved caspase-3 (cl-CASP3),secreted frizzled-related protein 4 (SFRP4) were determined by Western blot,SFRP4 methylation was detected by MSP. **Results** Compared with paracancerous tissue,the expression of miR-519d-3p in cancer tissue reduced,the gene expression of MECP2 elevated,there was targeting relationship between miR-519d-3p and MECP2 ($P<0.05$). Compared with the mimics NC group,the proliferation

^{*} 基金项目:陕西省科技厅重点研发项目(2017SF-161)。 作者简介:张孝霞(1985—),主治医师,硕士,主要从事口腔医学研究。

of OSCC cells decreased, cell cycle arrested, apoptotic rate increased, cell migration and invasion became weak-en, protein levels of MECP2, MMP-2 and Cyclin D1 decreased, protein levels of E-cadherin, cl-CASP3 and SFRP4 increased, SFRP4 gene was demethylated; while the increasing level of MECP2 could reverse the changes in above indicators caused by miR-519-3p mimics. **Conclusion** miR-519d-3p could target MECP2, to inhibit the proliferation, migration and invasion of OSCC cells.

[Key words] mouth neoplasms; neoplasms, squamous cell; miR-519d-3p; methyl CpG binding domain; cell proliferation; apoptosis; cell movement; neoplasm invasiveness

口腔和颈部的癌症是世界第六大癌, 口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是其中最主要的类型, 每年约有 20 万的新病例被诊断出来, 尽管包括手术、放疗和化疗在内的诸多疗法已经取得了很大的进步, 过去 30 年中 OSCC 患者的 5 年生存率依然不超过 50%, 原位的局部复发和颈部淋巴结转移是导致 OSCC 治疗失败的主要原因^[1-3]。迄今对于 OSCC 的病理机制依然有很多尚不清楚的地方, 因此阐明 OSCC 发生、发展的分子机制对于改善 OSCC 的治疗具有十分重要的意义。

MicroRNA(miRNA)是一类内源性非编码小分子 RNA 物质, 可通过与 mRNA 的 3' 非翻译区碱基配对, 从转录后水平对基因进行负调控, 抑制基因的翻译或造成 mRNA 降解。miRNA 的异常表达与各种癌症有着密切的关系^[4-6], miR-519d-3p 在许多文献报道中都被认为是一种肿瘤抑制基因, 在 OSCC 中同样发挥着抑癌的作用^[7-9]。然而对 miR-519d-3p 在 OSCC 中的作用机制研究还有很多空缺之处。甲基化 CpG 结合蛋白 2 (methyl-CpG-binding protein 2, MECP2) 是甲基化结合蛋白家族的成员, 其异常表达与包括 OSCC 在内的多种癌症的发生都有密切联系^[10]。通过生物信息学数据库预测发现 miR-519d-3p 可能与 MECP2 存在靶向相互作用, 因此推测 miR-519d-3p 对 OSCC 的作用可能与对 MECP2 的调控有关。本研究在前人研究的基础上, 通过培养 OSCC 细胞, 并转染 miR-519d-3p 和 MECP2 重组表达载体, 进一步研究了 miR-519d-3p 在 OSCC 中可能的作用机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人口腔角质细胞株 HOK 和人 OSCC 细胞株 Tca-8113、Cal-27、SCC-25、HN30 购自中国科学院上海细胞库; DMEM 细胞培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; Trizol 试剂、RIPA 试剂、BCA 蛋白

定量试剂盒、CCK8 试剂购自北京索莱宝生物科技有限公司; 逆转录试剂盒 SYBR Premix EX Taq II 购自日本 Takara 公司; 双荧光素酶报告系统购自美国 Promega 公司; 细胞周期及细胞凋亡检测试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司; 基因组 DNA 提取试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; MECP2、E-钙粘蛋白(E-cadherin)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、周期蛋白 D1(Cyclin D1)、活化型半胱天冬酶(cl-CASP3)、分泌性卷曲相关蛋白 4(SFRP4)、GAPDH 抗体购自美国 CST 公司; DNA 甲基化试剂盒购自美国 Zymo Research 公司; miR-519d-3p mimics、mimics NC 及重组载体由上海吉玛制药技术有限公司合成; 所用引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 临床标本获取

从本院头颈肿瘤外科获取 2010 年 1 月至 2016 年 12 月 30 例患者的人鳞状细胞癌和癌旁组织标本, 其中男 17 例, 女 13 例, 年龄 29~73 岁, 所有病例术前未采用其他治疗。

1.2.2 细胞培养

人口腔角质细胞株 HOK 和人 OSCC 细胞株 Tca-8113、Cal-27、SCC-25、HN30 于 37 ℃ 5% CO₂ 的环境下在 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 DMEM 细胞培养基中进行培养。

1.2.3 细胞分组处理

将 OSCC 细胞分为 SCC-25 组、mimics NC 组、miR-519d-3p mimics 组及 miR-519d-3p mimics+MECP2 组, SCC-25 组为空白对照, mimics NC 组为阴性对照, 按照 Lipofectamine 2000 提供的操作说明, miR-519d-3p mimics 转染 miR-519d-3p mimics 组细胞, miR-519d-3p 和 pCMV2-GV146-MECP2 重组载体共转染 miR-519d-3p+MECP2 组细胞, 转染 24 h 后, 收集细胞用于后续实验。

1.2.4 逆转录 PCR(RT-PCR)检测基因表达

Trizol 试剂提取各组细胞的总 RNA, 通过逆转录

试剂盒逆转录合成 cDNA, 根据 SYBR Premix EX Taq II 试剂盒提供的操作说明进行 PCR 扩增, 扩增条件具体设置为: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 10 s, 进行 40 个循环; 所用的引物序列为 miR-519d-3p: 上游 5'-TGC GGC AAA GTG CCT CCC TTT AG-3'; 下游 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3'; MECP2: 上游 5'-GCC GAG AGC TAT GGA CAG CA-3'; 下游 5'-CCA ACC TCA GAC AGG TTT CCA G-3'。2^{-ΔΔCt} 法计算基因表达水平。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达

RIPA 试剂提取各组细胞总蛋白, BCA 试剂盒定量, 进行 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 结束后将 SDS-PAGE 通过半干转膜法转移蛋白条带至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 在室温条件下使用 5% 脱脂牛奶对 PVDF 膜进行封闭处理, 2 h 后弃去残液, 使用一抗 4 °C 孵育过夜, 第 2 天使用 TBST 缓冲液对 PVDF 膜进行清洗, 使用二抗孵育 2 h 后, 滴加电化学发光 (ECL) 显色液显影, 置于凝胶成像仪扫描灰度值进行相对定量。

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测靶向作用关系

通过生物信息学数据库 Targetscan 预测 miR-519d-3p 和 MECP2 的靶向作用位点, 根据预测的位点构建包含靶向区域的 MECP2 3'-UTR 的 pGL3 luciferase promoter 野生型和突变型载体, 将野生型或突变型载体与 miR-519d-3p mimics 或 mimics NC 共转染 HEK293T 细胞, 24 h 后通过双荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活性。

1.2.7 CCK8 检测细胞增殖

按 1.2.3 的方法处理细胞后, 在常规条件下继续进行培养, 每 24 小时使用 CCK8 试剂检测细胞 450 nm 吸光度值, 持续 72 h。具体方法为: 细胞接种于 96 孔板, 加入 10 μL CCK8 试剂处理 4 h, 酶标仪检测 450 nm 吸光度值, 通过预先制作的标准曲线, 得到每个时间点细胞的增殖倍数。

1.2.8 流式细胞术检测细胞周期分布

70% 预冷酒精固定细胞, 4 °C 条件下过夜, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞并重悬, 加入 2.5 μL 的 10 mg/mL 核糖核酸酶 A, 室温避光静置 1 h, 加入 50 μL 0.1 mg/mL 碘化丙啶 (PI) 染液于 4 °C 避光染色 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡

195 μL 膜联蛋白 V (Annexin V)-异硫氰基荧光

素 (FITC) 结合液重悬细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC 试剂轻轻混匀, 室温避光静置 10 min, 离心弃上清液, 190 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 避光加入 10 μL PI 染液混匀, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.10 划痕愈合法检测细胞迁移

细胞接种于 6 孔板培养, 当细胞铺满孔底 80% 的空间时, 中枪头垂直于水平面对细胞进行划痕处理, PBS 清洗后在无血清培养基中继续培养 24 h 后通过光学显微镜观察划痕愈合情况, 划痕愈合率 = (实验组 0 h 划痕宽度 - 实验组 24 h 划痕宽度) / (mimics NC 组 0 h 划痕宽度 - mimics NC 组 24 h 划痕宽度) × 100%。

1.2.11 Transwell 法检测细胞侵袭

50 μL 基质胶加入 Transwell 小室中, 于 37 °C 待其完全凝固, 上室加入无血清培养基, 下室加入完全培养基, 将细胞接种于上室无血清培养基中, 常规条件培养 48 h 后取出, 清洗未通过膜的细胞, 4% 多聚甲醛固定过膜的细胞, 1% 结晶紫染色并通过光学显微镜观察, 每个小室取 6 个视野计数, 以均数来评价细胞的侵袭能力。

1.2.12 MSP 法检测基因甲基化水平

收集对数生长期细胞, DNA 抽提试剂盒提取细胞总 DNA, 重亚硫酸盐修饰纯化 DNA, 分别合成目的基因的甲基化引物和非甲基化引物, 对修饰纯化的 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件具体设置为: 95 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s, 非甲基化引物 62 °C 退火 30 s, 甲基化引物 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 反应进行 40 个循环后继续 72 °C 延伸 10 min。甲基化 SFRP4 引物序列为: 上游 5'-CGA GGG GGA GTT CGC GT-3'; 下游 5'-CGC GAA ATC CGA CCG CGA A-3'; 非甲基化 SFRP4 引物序列为: 上游 5'-GTT GAG GGG GAG TTT GTG T-3'; 下游 5'-AAA CCA CAA AAT CCA ACC ACA AAA C-3'; 通过 2% 琼脂糖凝胶电泳观察甲基化水平。

1.3 统计学处理

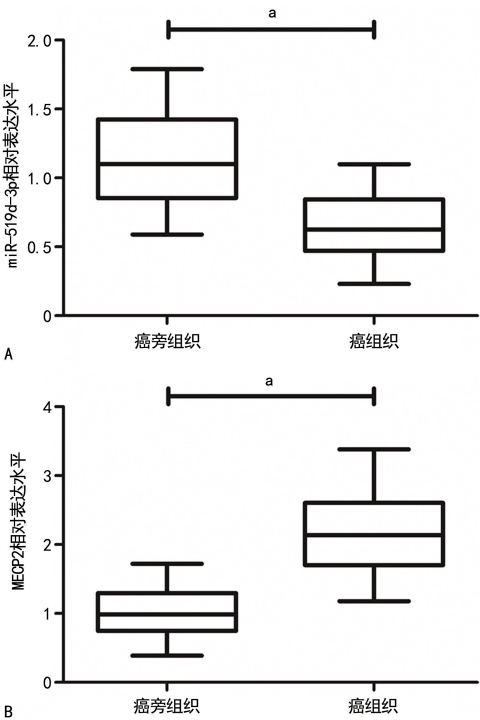
采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OSCC 临床标本中 miR-519d-3p 和 MECP2 的表达

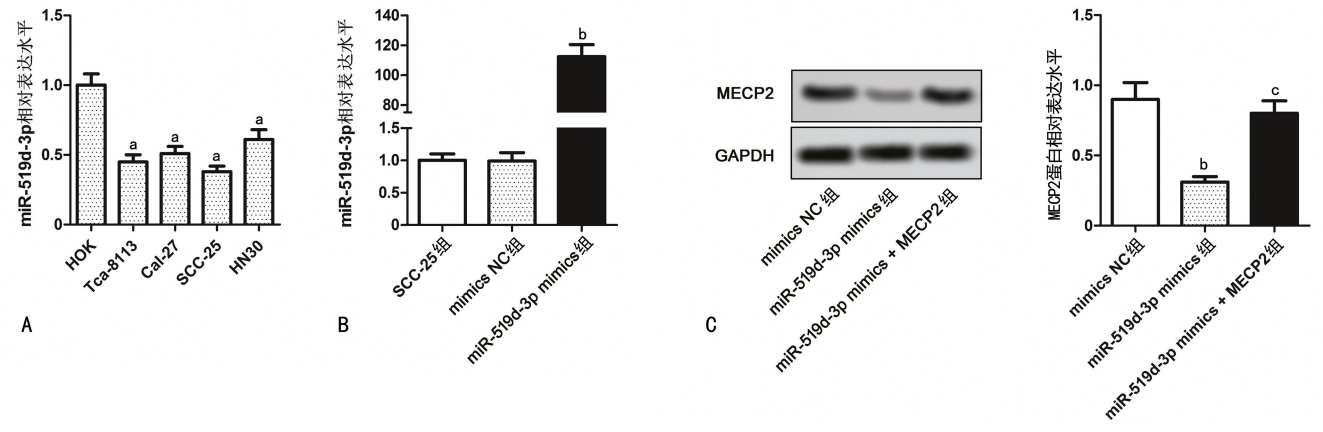
与 OSCC 癌旁组织比较, 癌组织中 miR-519d-3p 表达水平明显降低, MECP2 表达水平明显升高, 差异

有统计学意义($P<0.05$),见图 1。



A:RT-PCR 检测 miR-519d-3p 表达;B:RT-PCR 检测 MECP2 基因表达;^a: $P<0.05$ 。

图 1 RT-PCR 检测 OSCC 临床标本中 miR-519d-3p 和 MECP2 基因表达



A:RT-PCR 检测 miR-519d-3p 在正常口腔胶质细胞和 OSCC 细胞中的表达;B:RT-PCR 检测 miR-519-3p mimics 转染效果;C:SCC-25 组中 MECP2 蛋白 Western blot 检测;D:SCC-25 细胞中 MECP2 蛋白相对表达水平柱状图;^a: $P<0.05$,与 HOK 组比较;^b: $P<0.05$,与 SCC-25 组或 mimics NC 组比较;^c: $P<0.05$,与 miR-519d-3p mimics 组比较。

图 2 miR-519d-3p 和 MECP2 表达检测

2.4 miR-519d-3p 抑制 OSCC 细胞增殖

与 mimics NC 组比较,miR-519d-3p mimics 组 OSCC 细胞的 72 h 增殖倍数明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 miR-519d-3p mimics 组比较,miR-519d-3p mimics+MECP2 组 OSCC 细胞的 72 h 增殖倍数明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.2 miR-519-3p 抑制 MECP2 蛋白表达

与人口腔角质细胞株 HOK 比较,OSCC 细胞株中 miR-519d-3p 表达水平均表现出明显的下调,差异有统计学意义($P<0.05$)。选用了 miR-519d-3p 表达下调最明显的 SCC-25 进行后续实验,与未经处理的细胞比较,mimics NC 转染的细胞 miR-519d-3p 表达水平无变化,但 miR-519d-3p mimics 转染的细胞 miR-519d-3p 表达水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 mimics NC 组比较,miR-519d-3p mimics 组细胞中 MECP2 蛋白水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 miR-519d-3p mimics 组比较,miR-519d-3p mimics+MECP2 组细胞中 MECP2 蛋白水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

2.3 miR-519d-3p 靶向作用于 MECP2

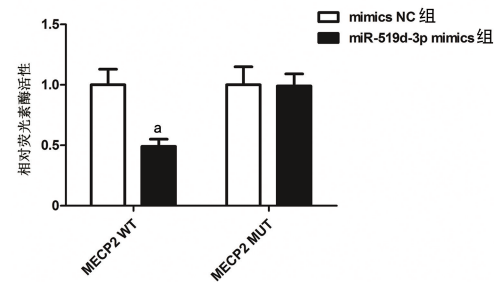
生物信息学数据库 Targetscan 预测 miR-519d-3p 和 MECP2 可能存在的靶向作用位点,与 MECP2 WT+mimics NC 比较,MECP2 WT+miR-519d-3p mimics 的荧光素酶活性明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。MECP2 MUT+miR-519d-3p mimics 与 MECP2 MUT+mimics NC 比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。

2.5 miR-519d-3p 阻滞 OSCC 细胞周期

与 mimics NC 组比较,miR-519d-3p mimics 组 OSCC 细胞的 G_1/G_0 期百分率明显升高,同时 S 期和 G_2/M 期百分率明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 miR-519d-3p mimics 组比较,miR-519d-3p mimics+MECP2 组 OSCC 细胞 G_1/G_0 期百分率明显降低,同时 S 期百分率明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

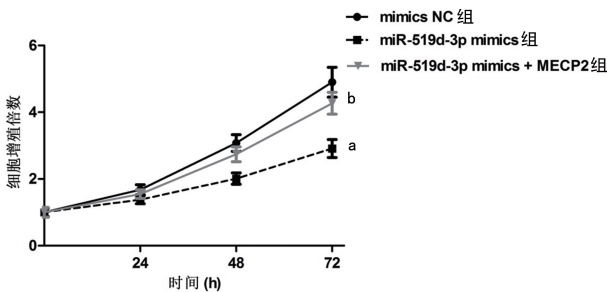
义($P<0.05$),见图 5。

Position 242-248 of MECP2 3' UTR 5' ...GCCAGAAGUAGCUUUGCACUUU... 3'
hsa-miR-519d-3p 3' GUGAGAUUUCCUCCGUGAUAAC 5'
Mutational MECP2 3' UTR 5' ...GCCAGAAGUAGCUUUGC TGAUUU... 3'



^a: $P<0.05$,与 mimics NC 组比较。

图 3 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-519d-3p 和 MECP2 靶向作用关系



^a: $P<0.05$,与 mimics NC 组比较; ^b: $P<0.05$,与 miR-519d-3p mimics 组比较。

图 4 CCK8 检测 OSCC 细胞 72 h 细胞增殖倍数变化

2.6 miR-519d-3p 诱导 OSCC 细胞凋亡

与 mimics NC 组比较,miR-519d-3p mimics 组 OSCC 细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P<$

0.05);与 miR-519d-3p mimics 组比较,miR-519d-3p mimics+MECP2 组 OSCC 细胞凋亡率明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 6。

2.7 miR-519d-3p 抑制 OSCC 细胞迁移

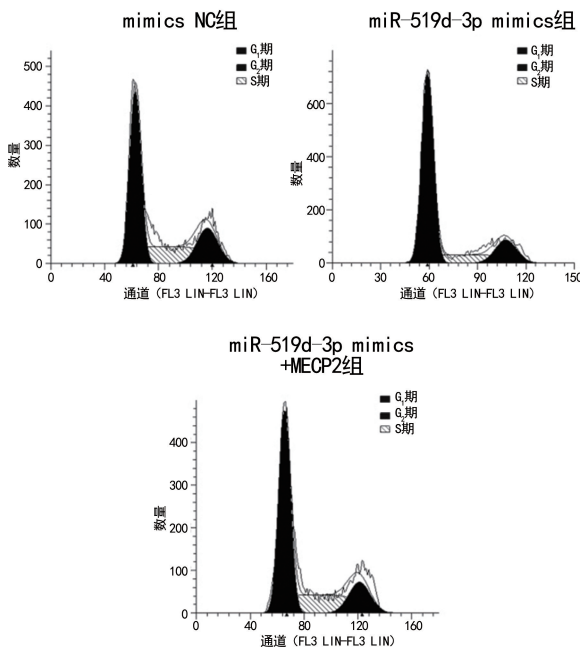
与 mimics NC 比较,miR-519d-3p mimics 组 OSCC 细胞划痕愈合百分率明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 miR-519d-3p mimics 组比较,miR-519d-3p mimics+MECP2 组 OSCC 细胞划痕愈合率明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 7。

2.8 miR-519d-3p 抑制 OSCC 细胞侵袭

与 mimics NC 组比较,miR-519d-3p mimics 组 OSCC 细胞侵袭数目明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 miR-519d-3p mimics 组比较,miR-519d-3p mimics+MECP2 组 OSCC 侵袭细胞数目明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 8。

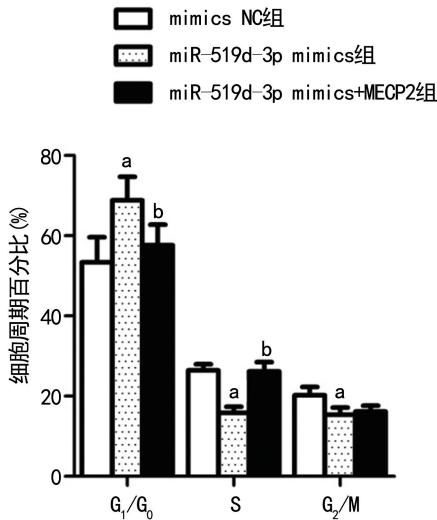
2.9 miR-519d-3p 对增殖、凋亡及转移分子标志物的调控作用

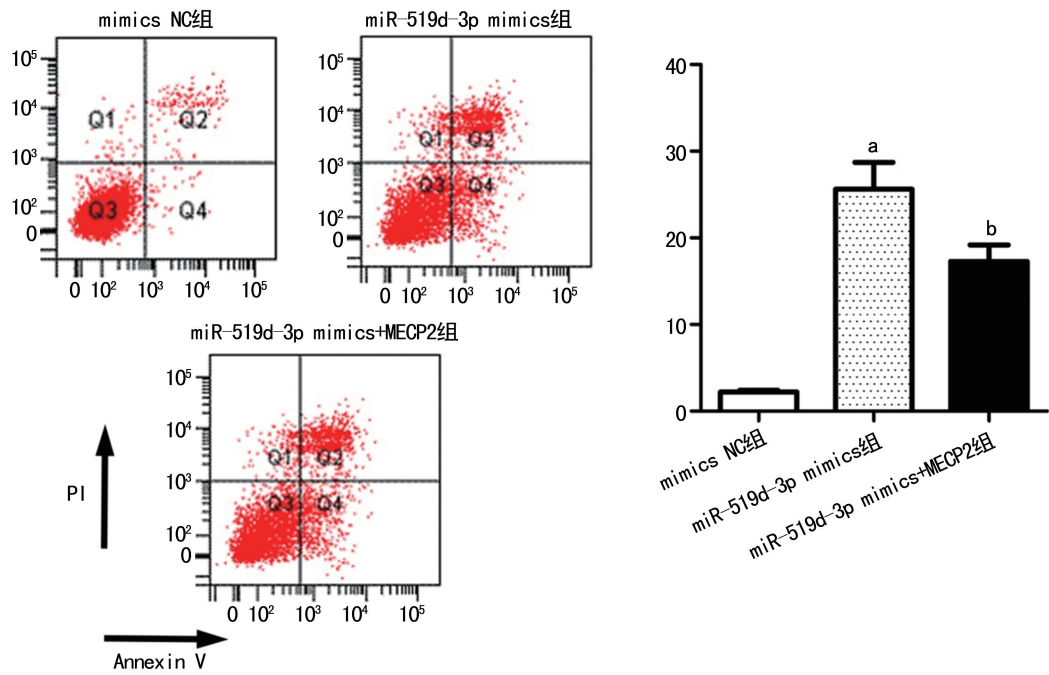
与 mimics NC 组比较,miR-519d-3p mimics 组 OSCC 细胞中 E-cadherin、cl-CASP3 蛋白水平明显升高,MMP-2、Cyclin D1 蛋白水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 miR-519d-3p mimics 组比较,miR-519d-3p mimics+MECP2 组中 OSCC 细胞中 E-cadherin、cl-CASP3 蛋白水平明显降低,MMP-2、Cyclin D1 蛋白水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 9。



^a: $P<0.05$,与 mimics NC 组比较; ^b: $P<0.05$,与 miR-519d-3p mimics 组比较。

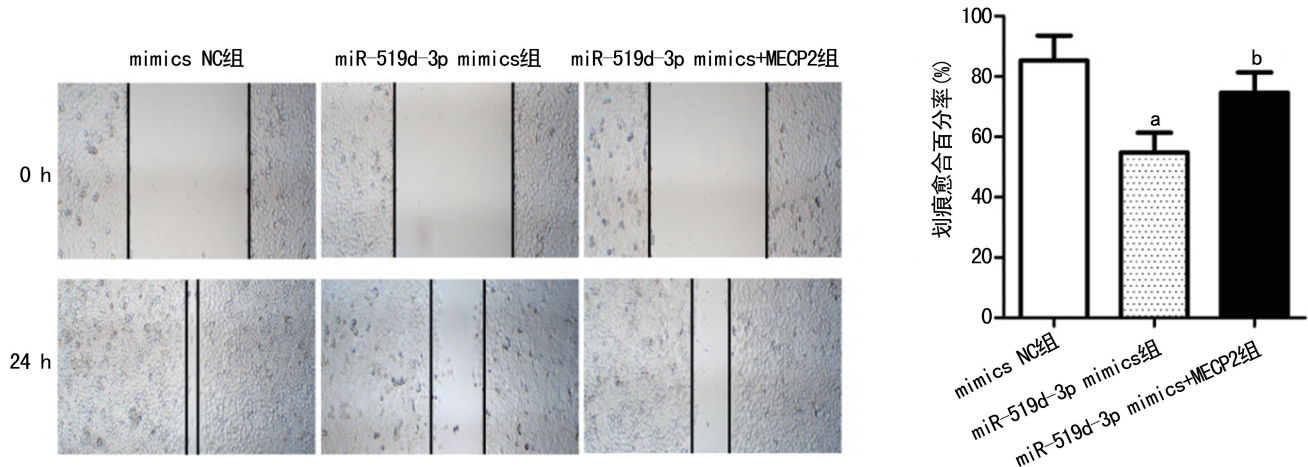
图 5 流式细胞术检测 OSCC 细胞周期分布情况





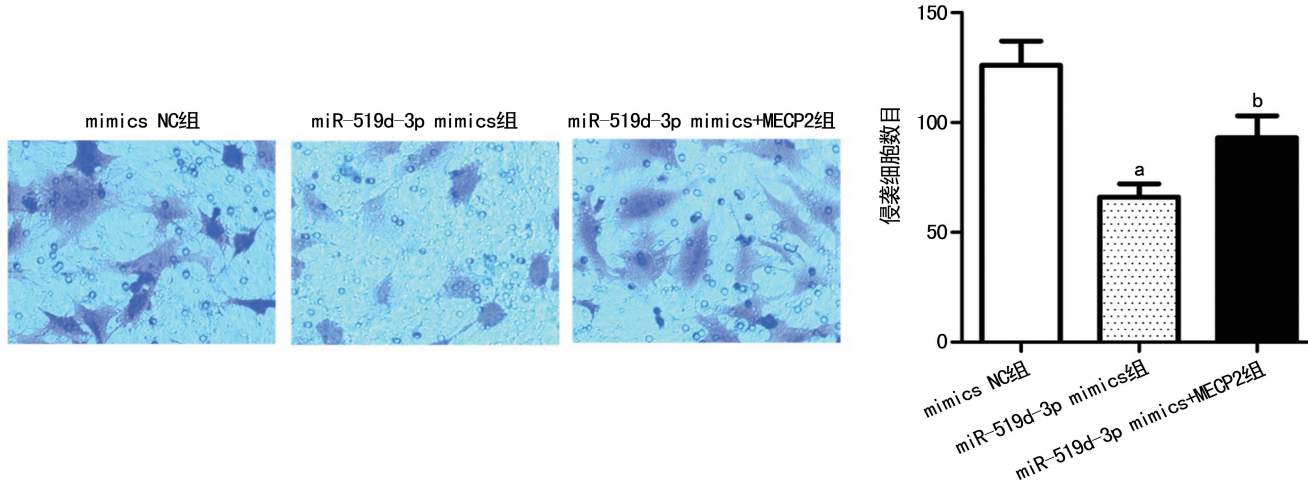
^a: $P < 0.05$, 与 mimics NC 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 miR-519d-3p mimics 组比较。

图 6 流式细胞术检测 OSCC 细胞凋亡率



^a: $P < 0.05$, 与 mimics NC 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 miR-519d-3p mimics 组比较。

图 7 划痕愈合法检测 OSCC 细胞迁移能力



^a: $P < 0.05$, 与 mimics NC 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 miR-519d-3p mimics 组比较。

图 8 Transwell 法检测 OSCC 细胞侵袭能力

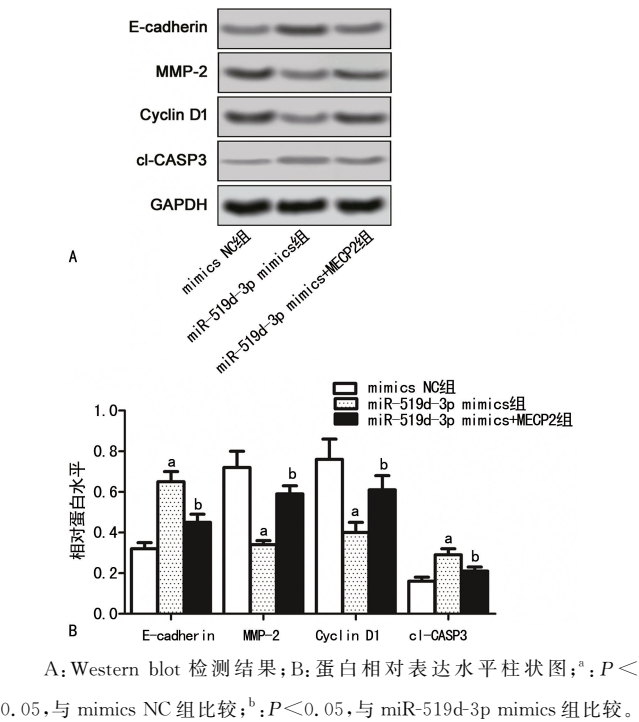


图 9 Western blot 检测 OSCC 细胞内增殖、凋亡及转移分子标志物蛋白表达情况

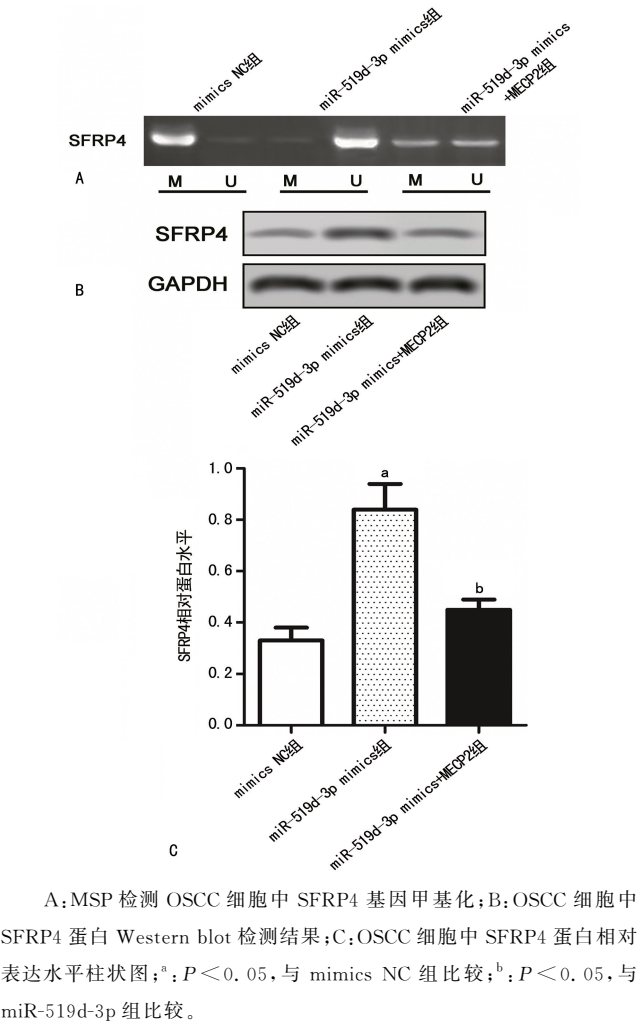


图 10 MSP 和 Western blot 检测 SFRP4 在 OSCC 细胞中甲基化及蛋白表达情况

2.10 miR-519d-3p 抑制 SFRP4 基因甲基化

在 mimics NC 组 OSCC 细胞当中, SFRP4 基因处于高甲基化状态;而在 miR-519d-3p mimics 组细胞当中, SFRP4 基因处于去甲基化状态; miR-519d-3p mimics+MECP2 组细胞中 SFRP4 基因处于一部分甲基化的状态。与 mimics NC 组比较, miR-519d-3p mimics 组 OSCC 细胞中 SFRP4 蛋白水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 miR-519d-3p mimics 组比较, miR-519d-3p mimics+MECP2 组细胞中 SFRP4 蛋白水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 10。

3 讨论

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传特性, 具有调控基因转录、保持基因组稳定性的作用, 当这一功能发生异常改变时, 会直接影响到基因转录, 在癌症的发生、发展过程中具有重要的影响^[11-12]。MECP2 可通过其甲基化结合结构域 MBD 与 DNA 的单甲基化 CpG 岛结合, 从转录水平上抑制基因的表达^[13]。有研究报道了 MECP2 敲除可抑制下游 Wnt 信号通路的激活, 从而抑制 OSCC 的增殖^[14]。miR-519d-3p 已被报道是一种 OSCC 肿瘤抑制基因, 本研究还基于生物信息学数据库的预测, 推测 miR-519d-3p 可能通过靶向作用于 MECP2 发挥 OSCC 抑制作用。此外, 本研究检测了 OSCC 临床及细胞株标本中 miR-519d-3p 和 MECP2 的基因表达水平变化, 发现相较于癌旁组织及正常组织细胞, OSCC 组织和细胞中 miR-519d-3p 表达均受到抑制, 而 OSCC 组织中 MECP2 基因表达明显升高, 进一步研究发现 OSCC 细胞中 miR-519d-3p 表达水平升高可明显抑制 MECP2 的蛋白表达水平, 提示 miR-519d-3p 与 MECP2 可能存在相互作用关系。通过双荧光素酶报告基因检测, 证实 miR-519d-3p 与 MECP2 存在靶向作用关系。

越来越多的证据表明 miRNA 在 OSCC 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭等生物学特性中扮演着重要作用^[15-16]。miR-519d-3p 在多种癌症中均发现具有抑制细胞增殖、侵袭和迁移的能力^[8,17], 然而 JIN 等^[9]对 miR-519d-3p 在 OSCC 中作用的研究却并未发现 miR-519d-3p 对 OSCC 细胞增殖的调控能力。本研究发现 miR-519d-3p 可明显抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭的能力, 同时引起 G₁/G₀ 期细胞周期阻滞及细胞凋亡率升高, 而提高 MECP2 表达可部分恢复细胞增殖、迁移和侵袭能力, 并缓解细胞周期阻滞及细胞凋亡水平。与既往研究的差异可能与选用了不同的 OSCC 细胞有关。本研究进一步检测了细胞转

移标志物 E-cadherin 和 MMP-2,细胞增殖标志物 Cyclin D1 及细胞凋亡标志物 cl-CASP3 的表达,发现 miR-519d-3p 可明显提高 E-cadherin 和 cl-CASP3 蛋白水平,降低 MMP-2 和 Cyclin D1 蛋白水平。E-cadherin 是细胞维持上皮表型必不可少的成员之一,在 E-cadherin 表达受到抑制时,会导致 β -连环蛋白(β -cantenin)在细胞质中的积累并最终引起 Wnt 通路的激活而促进肿瘤细胞增殖和转移^[18],MMP-2 参与降解肿瘤细胞周围的细胞质基质成分,对肿瘤细胞的侵袭有着重要作用,既往研究表明 miR-519d-3p 同样可靶向抑制 MMP-2 表达发挥肿瘤抑制作用^[19-20]。Cyclin D1 为 G₁/S 特异性的周期蛋白,具有促进细胞周期从 G₁ 期进入 S 期的作用^[21]。cl-CASP3 是凋亡过程中蛋白分子降解的主要执行因子,其表达水平反映了细胞凋亡的发生情况^[22]。结合以上实验结果表明,miR-519d-3p 对 MECP2 作用可抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移及侵袭。

还有研究表明,MECP2 参与了对 Wnt 通路抑制因子 SFRP 蛋白的调控,在类风湿性关节炎中,MECP2 可通过抑制 miR-152 表达,解除 miR-152 对 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1,DNMT1)的沉默,DNMT1 可通过甲基化 SFRP4 和 SFRP1,解除了 SFRP 蛋白对 Wnt 信号通路的抑制作用^[23]。PANNONE 等^[24]研究表明,SFRP4 在 OSCC 细胞中发生了甲基化,而 SFRP1 并未发生这一变化,预示着 SFRP4 的甲基化失活与 OSCC 有着密切联系。本研究发现在 OSCC 细胞中 SFRP4 发生了启动子甲基化,而 miR-519d-3p 处理可诱导 SFRP4 去甲基化,提高 MECP2 表达可部分扭转 miR-519d-3p 的作用。同时 miR-519d-3p 明显提高了 SFRP4 的蛋白表达,提高 MECP2 表达可部分扭转 miR-519d-3p 对 SFRP4 蛋白表达的促进作用。上述结果表明,miR-519d-3p 通过靶向沉默 MECP2,诱导 SFRP4 启动子去甲基化,从而提高 SFRP4 的蛋白表达。

综上所述,miR-519d-3p 可通过靶向沉默 MECP2,诱导 SFRP4 启动子去甲基化并提高其蛋白水平,进而抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移与侵袭,并促进细胞凋亡。本研究为 OSCC 的靶向治疗提供了新的参考,然而研究还存在一些不足之处,后期计划进一步探究 miR-519d-3p 对 MECP2 下游的蛋白及通路的调控,并通过动物实验验证 miR-519d-3p 的作用机制。

参考文献

[1] ZHANG L,MENG X,ZHU X W,et al. Long

non-coding RNAs in Oral squamous cell carcinoma:biologic function,mechanisms and clinical implications[J]. Mol Cancer,2019,18(1): 102-120.

[2] WANG T,REN Y,LIU R,et al. miR-195-5p suppresses the proliferation,migration,and invasion of oral squamous cell carcinoma by targeting TRIM14 [J]. Biomed Res Int,2017,2017:7378148-7378160.

[3] JERJES W,UPILE T,PETRIE A,et al. Clinico-pathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients [J]. Head Neck Oncol, 2010,2:9-29.

[4] BARTEL D P. MicroRNAs:genomics,biogenesis,mechanism,and function[J]. Cell,2004,116 (2):281-297.

[5] WILK G,BRAUN R. Integrative analysis reveals disrupted pathways regulated by microRNAs in cancer[J]. Nucleic Acids Res,2018,46 (3):1089-1101.

[6] 刘学娟,甘海宁,张丽妹,等. 循环外泌体 miRNAs 在结直肠癌中的标志作用和临床转化中的挑战[J]. 分子诊断与治疗杂志,2019,11(3): 157-163.

[7] JIANG L,SHI S,SHI Q,et al. MicroRNA-519d-3p inhibits proliferation and promotes apoptosis by targeting HIF-2 α in cervical cancer under hypoxic conditions[J]. Oncol Res,2018, 26(7):1055-1062.

[8] LI D,SONG H,WU T,et al. MiR-519d-3p suppresses breast cancer cell growth and motility via targeting LIM domain kinase 1[J]. Mol Cell Biochem,2018,444(1):169-178.

[9] JIN Y,LI Y,WANG X,et al. Dysregulation of MiR-519d affects oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis by targeting MMP3 [J]. J Cancer,2019,10(12):2720-2734.

[10] HAMIDI T,SINGH A K,CHEN T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases[J]. Epigenomics,2015,7(2):247-265.

[11] SHARMA S,KELLY T K,JONES P A. Epigenetics in cancer [J]. Carcinogenesis,2010,31: 27-36.

- [12] WANG S, WU W, CLARET F X. Mutual regulation of microRNAs and DNA methylation in human cancers[J]. *Epigenetics*, 2017, 12(3): 187-197.
- [13] DELLA R F, VACCA M, FIORINIELLO S, et al. MECP2, a multi-talented modulator of chromatin architecture[J]. *Brief Funct Genomics*, 2016, 15(6): 420-431.
- [14] ZHANG N, WEI Z L, YIN J, et al. MiR-106a * inhibits oral squamous cell carcinoma progression by directly targeting MeCP2 and suppressing the Wnt/ β -Catenin signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(11): 3542-3554.
- [15] HU J, XU J F, GE W L. MiR-497 enhances metastasis of oral squamous cell carcinoma through SMAD7 suppression[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(7): 3023-3031.
- [16] ZENG Q, TAO X A, HUANG F, et al. Overexpression of miR-155 promotes the proliferation and invasion of oral squamous carcinoma cells by regulating BCL6/cyclin D2[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(5): 1274-1280.
- [17] LI Y Y, SHAO J P, ZHANG S P, et al. miR-519d-3p inhibits cell proliferation and invasion of gastric cancer by downregulating B-Cell lymphoma 6[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2018, 154(1): 12-19.
- [18] NASS S J, HERMAN J G, GABRIELSON E, et al. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(16): 4346-4348.
- [19] 马建仓, 李宗禹, 徐金锴, 等. 沉默 RhoA 通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对甲状腺癌 TPC-1 细胞周期、侵袭及迁移能力的影响及机制研究[J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(2): 151-157.
- [20] DING J, HUANG F, WU G Y, et al. MiR-519d-3p suppresses invasion and migration of trophoblast cells via targeting MMP-2[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120321.
- [21] QIE S, DIEHL J A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(12): 1313-1326.
- [22] HUANG K H, FANG W L, LI A F, et al. Caspase-3, a key apoptotic protein, as a prognostic marker in gastric cancer after curative surgery[J]. *Int J Surg*, 2018, 52: 266-271.
- [23] MIAO C G, QIN D, DU C L, et al. DNMT1 activates the canonical Wnt signaling in rheumatoid arthritis model rats via a crucial functional crosstalk between miR-152 and the DNMT1, MeCP2[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(1): 344-353.
- [24] PANNONE G, BUFO P, SANTORO A, et al. WNT pathway in oral cancer: epigenetic inactivation of WNT-inhibitors[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(4): 1035-1041.

(收稿日期: 2019-11-20 修回日期: 2020-02-12)