

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.22.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20211025.1531.048.html\(2021-10-26\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20211025.1531.048.html(2021-10-26))miR-134 靶向基质金属蛋白酶 1 对喉癌细胞的增殖、
凋亡、侵袭和迁移的影响^{*}陈艳丹,岑瑞祥[△],曹 炜,龚国清,彭 聪

[鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)耳鼻咽喉头颈外科,湖北黄石 435000]

[摘要] 目的 探讨 miR-134 靶向基质金属蛋白酶 1(MMP1)对喉癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响。方法 双荧光素酶报告基因实验验证 MMP1 基因是否为 miR-134 的靶向基因。转染实验分为 miR-134 mimics 组、miR-134 antagomir 组和空白对照组,采用 CCK-8、流式细胞术和 Transwell 法检测各组细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移情况,Western blot 检测过表达或降低 miR-134 对 MMP1 蛋白表达的影响。结果 双荧光素酶报告基因结果显示 miR-134 能和 MMP1 3'-UTR 端结合且明显抑制荧光素酶活性。miR-134 mimics 组细胞在转染后 24 h 的细胞活力明显低于空白对照组($P<0.01$),而 miR-134 antagomir 组明显高于空白对照组($P<0.05$)。与空白对照组凋亡率 $[(4.32\pm0.36)\%]$ 比较,miR-134 mimics 组 $[(12.02\pm0.45)\%]$ 明显增加($P<0.01$),而 miR-134 antagomir 组 $[(2.31\pm0.26)\%]$ 明显降低($P<0.05$)。与空白对照组比较,miR-134 mimics 组的细胞侵袭和迁移能力明显减弱、MMP1 蛋白表达明显降低($P<0.05$),miR-134 antagomir 组的细胞侵袭和迁移能力明显增强、MMP1 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。结论 miR-134 在转录后水平调控 MMP1 蛋白表达来影响喉癌细胞的增殖、凋亡、侵袭及迁移。

[关键词] miR-134;基质金属蛋白酶 1;喉癌;增殖;侵袭**[中图分类号]** R739.65**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)22-3793-04Effect of miR-134 targeting MMP1 on proliferation, apoptosis, invasion
and migration of laryngeal cancer cells^{*}CHEN Yandan, CEN Ruixiang[△], CAO Wei, GONG Guoqing, PEN Cong[Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Huangshi Municipal
Central Hospital (Affiliated Hospital of Hubei Polytechnic University), Edong
Healthcare Group, Huangshi, Hubei 435000, China]

[Abstract] **Objective** To determine the effects of miR-134 targeted matrix metalloproteinase 1 (MMP1) on the proliferation, apoptosis, invasion and migration of laryngeal cancer cells. **Methods** The luciferase reporter gene assay verified whether MMP1 gene being miR-134 targeted gene. The transfection experiment was divided into the miR-134 mimics group, miR-134 antagomir group and blank control group. CCK-8, flow cytometry and Transwell assay were used to detect the proliferation, apoptosis, invasion and migration of the cells in each group. Western blot was used to detect the effect of over-expression or decreasing miR-134 on protein expression of MMP1. **Results** The results of dual luciferase reporter gene showed that miR-134 could bind to the 3'-UTR of MMP1 and significantly inhibited the luciferase activity. The cellular activity after 24 h in the miR-134 mimics group was significantly lower than that in the blank control group ($P<0.01$), while the miR-134 antagomir group was significantly higher than the blank control group ($P<0.05$). Compared with the apoptosis rate $[(4.32\pm0.36)\%]$ in the blank control group, $(12.02\pm0.45)\%$ in the miR-134 mimics group was significantly increased ($P<0.01$), while $(2.31\pm0.26)\%$ in the miR-134 antagomir group was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the cellular invasion and migration abilities in the miR-134 mimics group were significantly weakened and the MMP1 protein expression was significantly decreased ($P<0.05$), while which in the miR-134 antagomir group were significantly strengthened, and the MMP1 protein expression was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** miR-134 affects the proliferation,

^{*} 基金项目:湖北省卫健委联合基金项目(WJ2019H459)。 作者简介:陈艳丹(1980—),主治医师,硕士,主要从事咽喉及头颈肿瘤研究。[△] 通信作者, E-mail: 718121448@qq.com。

apoptosis, invasion and migration of laryngeal cancer cells by regulating the expression of MMP1 protein at the post-transcriptional level.

[Key words] miR-134; matrix metalloproteinase 1; laryngeal cancer; proliferation; invasion

喉癌是一种常见的头颈部恶性肿瘤,2014 年我国喉癌发病 2.34 万例(男性 2.08 万例,女性 0.26 万例),其中死亡 1.32 万例(男性 1.15 万例,女性 0.17 万例)^[1]。由此可见,喉癌具有好发于男性、病死率高的特点。导致喉癌患者死亡的主要原因是局部复发和远处转移,目前对喉癌细胞远处侵袭转移的分子机制尚不清楚。基质金属蛋白酶家族(MMPs)被认为是细胞外基质形成、重塑、细胞分化及成型等的重要调控介质,与肿瘤细胞增殖、侵袭、转移和血管形成密切相关^[2]。高通量测序分析显示,基质金属蛋白酶 1(MMP1)在喉癌组织中普遍高表达^[3],但其具体调控机制未明。CHEN 等^[4]报道 miR-134 靶向负调控 MMP1 和 MMP3 抑制骨肉瘤细胞的侵袭和转移,提示 miR-134 可能是 MMP1 表达的调控机制之一。因此,本研究探讨 miR-134 靶向 MMP1 对喉癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响,以期对喉癌的诊治提供新的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

喉癌细胞系 Hep-2 和 HEK293T 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、1%青霉素-链霉素混合液(双抗)和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;脂质体 lipfectamine 2000(Lip2000)和 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购自日本同仁株式会社化学研究所;Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双染细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;Western blot 全套试剂购自碧云天生物技术有限公司;兔抗人 MMP1 单克隆抗体及鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(一抗)和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(二抗)均购自英国 Abcam 公司;miR-134 mimics、antagomir 和 WT MMP1 3'-UTR、Mut MMP1 3'-UTR 质粒购自上海吉凯生物科技公司。双荧光素酶报告检测试剂盒购自美国 GeneCopoeia 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染

Hep-2 细胞用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 RPMI-1640 完全培养液,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养,每 2~3 天常规传代 1 次。转染实验分为 miR-134 mimics 组、miR-134 antagomir 组和空白对照组,严格按照试剂盒说明书进行转染。

1.2.2 双荧光素酶报告基因实验

借助 miRNA 靶基因预测数据库 Targetscans,发现 MMP1 可作为 miR-134 的靶基因。为了验证预测

的 MMP1 是否为 miR-134 的目标靶基因,以及 miR-134 对 MMP1 蛋白表达的影响,进行双荧光素酶报告基因实验。按转染试剂说明书分别将 miR-134 mimics 或 mimics-NC 与 WT MMP1 3'-UTR 和 Mut MMP1 3'-UTR 荧光素酶载体共转染 HEK293T 细胞,转染 48 h 后,检测上述细胞的相对荧光强度。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖活性

收集转染后的细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,取 100 μ L 细胞悬液接种于 96 孔板的 1 孔,做 5 个副孔。待细胞融合度达 70%~80%时,向每孔中加入 10 μ L CCK-8 试剂,置于培养箱中继续培养 2~3 h,间断观察颜色变化,在波长 450 nm 处测量各孔的光密度值,以 RPMI-1640 培养基为空白对照组。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

收集转染 48 h 后的细胞,用预冷的 PBS 洗 2 次;加入 300 μ L 的 $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞,5 μ L Annexin V-FITC 摇匀,室温,避光孵育 15 min。随后加入 5 μ L PI 染色,混匀。然后再加入 100 μ L $1 \times$ Binding Buffer,上机检测细胞的凋亡率。

1.2.5 Western blot 检测 MMP1 蛋白表达

消化、收集细胞,RIPA 提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。10% SDS-PAGE 分离蛋白,将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜上;然后用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液室温封闭 2 h;加入一抗[兔抗人 MMP1 和 GAPDH 单克隆抗体(体积稀释比例均为 1:800)],置于摇床上,4℃过夜,TBST 洗膜 3 次;加入二抗[羊抗鼠 IgG(体积稀释比例为 1:1200)]常温条件下反应 1 h,再用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;显影,采用 Image J 测定条带光密度,重复 3 次。

1.2.6 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭能力

细胞迁移能力:将转染 48 h 后的细胞制成悬液,密度为 1×10^4 /mL。取 100 μ L 细胞悬液加入 Transwell 小室上室,将 600 μ L 完全培养基加入小室下室,培养 24 h,甲醛固定,0.1%结晶紫染色,洗涤,拍照,高倍镜下随机取 6 个视野计数,取其均值,重复实验 3 次。细胞侵袭能力:将 Matrigel 基质胶按 1:6 稀释后包被 Transwell 小室,4℃风干,37℃温育凝固,其余步骤同上述细胞迁移能力检测。

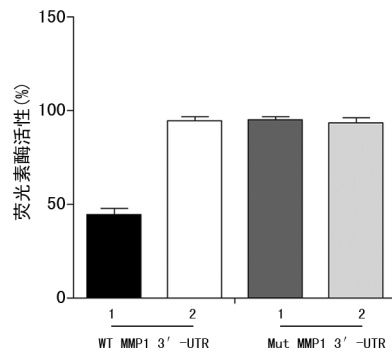
1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *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 验证实验

转染 miR-134 mimics 的 HEK293T 细胞中,WT MMP1 3'-UTR 报告载体的荧光素酶活性明显降低,与转染 mimics-NC 相比下降 55.3% ($P<0.01$);而 miR-134 mimics 对 Mut MMP1 3'-UTR 报告载体的荧光素酶活性无明显作用,见图 1。双荧光素酶报告基因实验结果与数据库结果一致,miR-134 能和 MMP1 的 3'-UTR 端结合。



1: miR-134 mimics; 2: mimics-NC。

图 1 miR-134 作用于 MMP1 3'-UTR 的荧光素酶活性分析

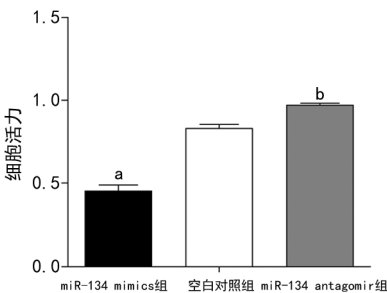
2.2 miR-134 对喉癌细胞增殖和凋亡的影响

miR-134 mimics 组细胞在转染后 24 h 的细胞活

力明显低于空白对照组 ($P<0.01$),而 miR-134 antagomir 组明显高于空白对照组 ($P<0.05$),见图 2。与空白对照组凋亡率 $[(4.32\pm0.36)\%]$ 比较,miR-134 mimics 组 $[(12.02\pm0.45)\%]$ 明显增加 ($P<0.01$),而 miR-134 antagomir 组 $[(2.31\pm0.26)\%]$ 明显降低 ($P<0.05$),见图 3。

2.3 miR-134 对喉癌细胞侵袭和迁移的影响

与空白对照组比较,miR-134 mimics 组的细胞侵袭和迁移能力明显减弱 ($P<0.05$),miR-134 antagomir 组的细胞侵袭和迁移能力明显增强 ($P<0.05$),见图 4。



^a: $P<0.01$, ^b: $P<0.05$,与空白对照组比较。

图 2 各组喉癌细胞增殖情况

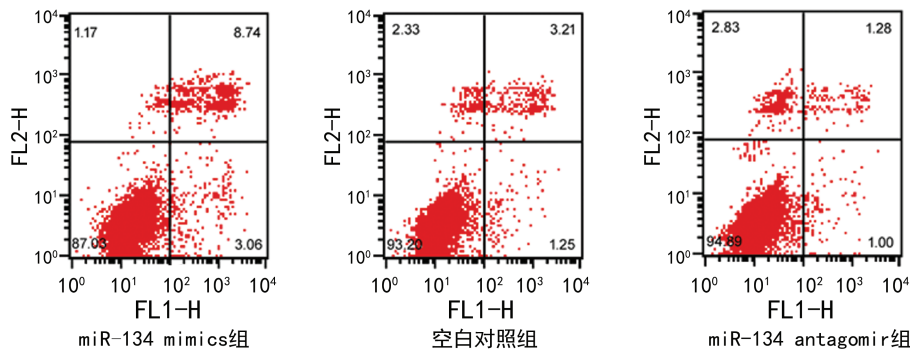


图 3 各组喉癌细胞凋亡情况

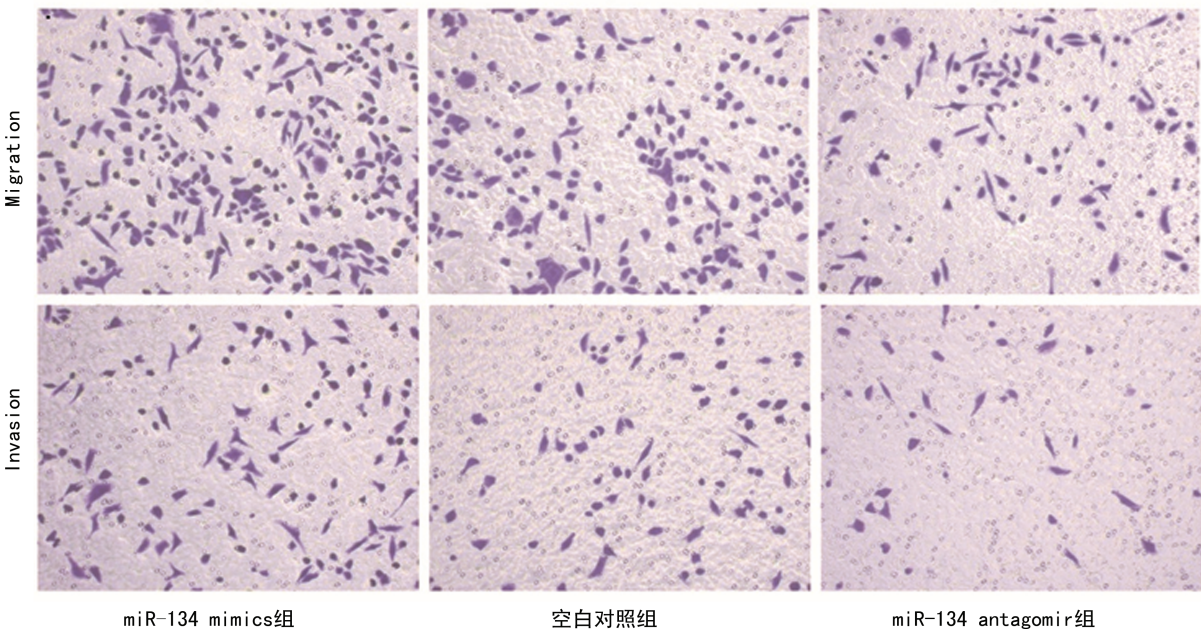


图 4 各组喉癌细胞迁移和侵袭能力 ($\times 100$)

2.4 miR-134 对 MMP1 蛋白表达的影响

与空白对照组 MMP1 蛋白表达比较,miR-134 mimics 组明显降低($P < 0.05$),而 miR-134 antagomir 组明显升高($P < 0.05$),见图 5。

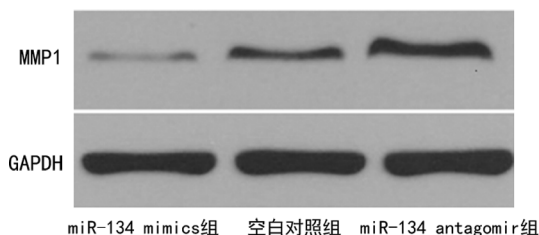


图 5 各组 MMP1 蛋白表达情况

3 讨 论

肿瘤的发生、发展、浸润和转移是多种因素参与,多步骤,肿瘤细胞自身与机体内外界复杂连续相互作用的结果,其调控网络十分复杂。miRNAs 是一类 22~25 nt 大小的非编码单链 RNA,靶向结合 miRNA 的 3'UTR,导致其降解和(或)抑制翻译,抑制靶基因蛋白表达。研究证据显示,miRNAs 是一种可促进癌症发生或者抑制癌症发生的基因调节关键因子,在控制细胞增殖、分化、凋亡、侵袭及迁移等生物学过程中发挥着重要的作用^[5]。miR-134 位于染色体 14q32,在维甲酸诱导的小鼠胚胎干细胞分化过程中表达上调,调控干细胞相关转录因子的编码序列,诱导小鼠胚胎干细胞的转录和形态学改变,从而产生新的表型^[6]。越来越多的证据表明,miR-134 通过多种方式参与头颈鳞状细胞癌发生、发展的调控过程,如 miR-134 靶向 WWOX 基因影响头颈鳞癌细胞系(OECM-1、SAS 和 HSC-3)体外致癌性、肿瘤发生和转移^[7],miR-134 靶向 PDCD7 降低上皮钙黏蛋白表达,加速口腔癌进展^[8]。CHEN 等^[4]研究显示,miR-134 在体内外靶向 MMP1 抑制骨肉瘤细胞侵袭和转移,这与本研究中的双荧光素酶报告实验结果一致,表明 miR-134 是 MMP1 转录过程中的调控因子之一。

在正常情况下,细胞外基质和细胞基底膜都受严格控制,在维持正常结构和生长进程中发挥着重要的作用。细胞外基质和细胞基底膜中 MMPs 的降解与恶性肿瘤的形成、生长、黏附、浸润和转移密不可分,这一过程是肿瘤细胞向周围组织转移的重要分子事件^[9]。研究表明,MMPs 蛋白表达异常与多种肿瘤晚期转移有关,如肺癌^[10]、结直肠癌^[11]、乳腺癌^[12]等。MMP1 位于 11q22.3,是 MMPs 的重要成员之一,它可以降解 I 型、II 型和 III 型间质胶原蛋白,为癌细胞侵入基质屏障和通过组织间质迁移扫清障碍^[13]。差异表达分析显示,MMP1 在喉癌癌灶组织中高表达,与肿瘤生存率呈显著负相关^[3,14],但 MMP1 在喉癌中的生物学作用不清。本研究表明,过表达 miR-134,下调 MMP1 蛋白表达,减少细胞增殖活性,抑制侵袭和迁移,增加细胞凋亡率,这与 miR-134/MMP1 在骨

肉瘤细胞中发挥的效应一致^[4]。MMP1 促进肿瘤发生的病理机制可能在于通过分解 I 型胶原,参与肿瘤的侵袭和转移^[15]。

本研究对 miR-134/MMP1 在喉癌细胞中的作用进行了初步研究,然而存在以下不足之处:(1)未用临床标本验证已发表文献 MMP1 在喉癌组织的高表达,且仅取 1 种喉癌细胞系进行了研究,今后应开展临床研究和扩大细胞系,以验证本研究结论和明确临床意义;(2)miR-134/MMP1 介导喉癌发生、发展的具体机制仍不清楚,后续应加强研究。

综上所述,本研究发现 miR-134 是 MMP1 表达调控机制之一,miR-134/MMP1 调控喉癌细胞基本生物学行为,为阐明其调控的分子机制提供了重要的证据,且为其防治提供了潜在的分子靶点。

参考文献

- [1] WEI K R,ZHENG R S,LIANG Z H,et al. Incidence and mortality of laryngeal cancer in China,2014[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi,2018,40(10):736-743.
- [2] SHAY G,LYNCH C C,FINGLETON B. Moving targets:emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis[J]. Matrix Biol,2015,44:200-206.
- [3] NAIR J,JAIN P,CHANDOLA U,et al. Gene and miRNA expression changes in squamous cell carcinoma of larynx and hypopharynx[J]. Genes Cancer,2015,6(7/8):328-340.
- [4] CHEN C L,ZHANG L,JIAO Y R,et al. MiR-134 inhibits osteosarcoma cell invasion and metastasis through targeting MMP1 and MMP3 in vitro and in vivo[J]. FEBS Lett,2019,593(10):1089-1101.
- [5] FAROOQI A A,QURESHI M Z,KHALID S,et al. Regulation of cell signaling pathways by berberine in different cancers: searching for missing pieces of an incomplete jig-saw puzzle for an effective cancer therapy[J]. Cancers(Basel),2019,11(4):478.
- [6] TAY Y,ZHANG J,THOMSON A M,et al. MicroRNAs to Nanog,Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation[J]. Nature,2008,455(7216):1124-1128.
- [7] LIU C J,SHEN W G,PENG S Y,et al. MiR-134 induces oncogenicity and metastasis in head and neck carcinoma through targeting WWOX gene[J]. Int J Cancer,2014,134(4):811-821.
- [8] PENG S Y,TU H F,YANG(下转第 3802 页)

- mation in human umbilical cord derived mesenchymal stem cells via blocking nuclear factor-kappaB pathway[J]. *BMC Cell Biol*, 2017, 18(1):29.
- [16] ZHOU Y, TAO T, LIU G, et al. TRAF3 mediates neuronal apoptosis in early brain injury following subarachnoid hemorrhage via targeting TAK1-dependent MAPKs and NF- κ B pathways[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1):10.
- [17] DING H, GAO G, ZHANG L, et al. The protective effects of curculigoside A on adjuvant-induced arthritis by inhibiting NF- κ B/NLRP3 activation in rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 30:43-49.
- [18] EID R A, ALHARBI S A, EL-KOTT A F, et al. Exendin-4 ameliorates cardiac remodeling in experimentally induced myocardial infarction in rats by inhibiting PARP1/NF- κ B axis in a sirt1-dependent mechanism [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20(4):401-418.
- [19] ZHANG L, LUO J, WEN H, et al. MDM2 promotes rheumatoid arthritis via activation of MAPK and NF- κ B[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 30:69-73.
- [20] DING J, QIN D, ZHANG Y, et al. SMAC mi-metic birinapant inhibits hepatocellular carcinoma growth by activating the cIAP1/TRAF3 signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(3):1251-1257.
- [21] YANG F, LI S, CHENG Y, et al. Karyopherin alpha 2 promotes proliferation, migration and invasion through activating NF-kappaB/p65 signaling pathways in melanoma cells[J]. *Life Sci*, 2020, 252:117611.
- [22] HUANG K, CHEN Y, ZHANG R, et al. Honokiol induces apoptosis and autophagy via the ROS/ERK1/2 signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2):157.
- [23] WU F, YAO H, ZHENG F, et al. Protective effects of honokiol against oxidative stress-induced apoptotic signaling in mouse podocytes treated with H₂O₂ [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(2):1278-1284.
- [24] ZHANG X, WANG K, ZHAO W, et al. TRAF3IP3 at the trans-Golgi network regulates NKT2 maturation via the MEK/ERK signaling pathway[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(4):395-406.
- (收稿日期:2021-03-18 修回日期:2021-07-26)
- (上接第 3796 页)
- C C, et al. MiR-134 targets PDCD7 to reduce E-cadherin expression and enhance oral cancer progression[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(11):2892-2904.
- [9] SU S C, HSIEH M J, YANG W E, et al. Cancer metastasis: mechanisms of inhibition by melatonin[J]. *J Pineal Res*, 2017, 62(1):112-115.
- [10] CHAO W, DENG J S, LI P Y, et al. Inotilone from *Inonotus linteus* suppresses lung cancer metastasis in vitro and in vivo through ROS-mediated PI3K/AKT/MAPK signaling pathways[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):2344-2346.
- [11] EIRO N, CARRION J F, CID S, et al. Toll-like receptor 4 and matrix met alloproteases 11 and 13 as predictors of tumor recurrence and survival in stage II colorectal cancer[J]. *Pathol Oncol Res*, 2019, 25(4):1589-1597.
- [12] ZHANG R, ZHU Z, SHEN W, et al. Golgi membrane protein 1 (GOLM1) promotes growth and metastasis of breast cancer cells via regulating matrix met alloproteinase-13 (MMP13) [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25:847-855.
- [13] ZHOU Z, MA X, WANG F, et al. A matrix met alloproteinase-1 polymorphism, MMP1-1607 (1G>2G), is associated with increased cancer risk: a meta-analysis including 21,327 patients [J]. *Dis Markers*, 2018, 2018:7565834.
- [14] HUI L, YANG N, YANG H, et al. Identification of biomarkers with a tumor stage-dependent expression and exploration of the mechanism involved in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(5):2627-2635.
- [15] ORIA V O, LOPATTA P, SCHILLING O. The pleiotropic roles of ADAM9 in the biology of solid tumors[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(13):2291-2301.
- (收稿日期:2021-02-26 修回日期:2021-07-21)