

## miR-132 抑制舌癌细胞增殖、侵袭及迁移

高丽荣<sup>1</sup>, 王毅军<sup>1</sup>, 周贤<sup>2</sup>, 聂廷洪<sup>1</sup>, 张建全<sup>1</sup>

(1. 天津市宝坻区人民医院 口腔科, 天津 301800; 2. 天津市口腔医院 口腔颌面外科, 天津 300041)

**摘要:** 为研究 miR-132 在舌癌中的表达情况, 收集病理诊断确诊为舌癌的 20 例患者舌癌组织及癌旁组织, 通过 RT-PCR 检测 miR-132 在舌癌及癌旁组织中的表达水平。应用 mimics 转染 CAL-27 细胞株, 采用平板克隆、MTT 实验检测 miR-132 过表达组、对照组舌癌细胞的增殖活性。Transwell 实验研究 miR-132 与舌癌细胞迁移作用的关系。结果显示, miR-132 在舌癌组织中的表达水平( $0.56 \pm 0.05$ )显著低于癌旁组织( $1.43 \pm 0.12$ ,  $P < 0.001$ )。舌癌组织中 miR-132 的表达水平随着病理分级恶性程度的升高而降低( $P < 0.05$ )。细胞克隆形成实验及 MTT 实验结果显示, miR-132 mimics 组的细胞活性及增殖明显受抑制( $P = 0.0032$ ,  $P < 0.001$ )。Transwell 实验显示, miR-132 mimics 组的细胞过膜数量[( $89 \pm 15$ )/视野]明显低于对照组[( $380 \pm 25$ )/视野]( $P = 0.002$ )。提示 miR-132 在舌癌组织中表达下降, miR-132 在舌癌的增殖和转移过程中发挥重要作用, 其可作为舌癌的潜在临床预后标志物, 为舌癌的预后判断及治疗提供参考。

**关键词:** 基因芯片; 舌癌; 微小 RNA-132; 生物学特性

**中图分类号:** R73-37

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-2478(2019)04-0297-05

舌癌是一种高度恶性肿瘤, 其发病率在口腔肿瘤中居第 1 位<sup>[1]</sup>, 目前我国舌癌发病率及死亡率呈逐年上升趋势<sup>[2]</sup>。早期舌癌的治疗以手术为主, 晚期舌癌手术效果欠佳, 其复发率相对较高, 复发后治疗的效果也不够理想。因此, 舌癌的早期诊断和治疗非常重要。目前越来越多的证据证明非编码 RNA, 即 miRNA, 能够控制肿瘤细胞的生长<sup>[3-5]</sup>。很多研究显示, miRNA 参与舌癌肿瘤增殖、侵袭和转移的调控<sup>[6-8]</sup>。miR-132 位于人的第 17 号染色体上, 是 CAMP 反应元件结合蛋白(CAMP-response element binding protein, CREB)的靶标, 通过调控下游靶基因而发挥作用。Lages 等<sup>[9]</sup>研究发现, miR-132 在神经胶质母细胞瘤、肺癌、胃癌、前列腺癌中表达下调。Zheng 等<sup>[10]</sup>研究发现, 结直肠癌细胞系 miR-132 高表达后抑制细胞增殖, 抑制细胞周期进程, 抑制细胞的迁移和侵袭。Guo 等<sup>[11]</sup>研究发现, 肺癌患者 miR-132 低表达, 肺癌组织 miR-132 的表达检测有助于预测淋巴结转移情况和患者预后。然而 miR-132 在舌癌中的作用还未见报道, 因此本研究旨在探讨 miR-132 在舌癌中的表达及其对舌癌细胞生物学特性的影响。

### 1 资料与方法

**1.1 基因芯片数据** 从 GEO 数据库下载 GSE69002 原始 CEL 文件, 包括 3 例舌癌患者唾液样本(实验组)和 4 例正常人唾液样本(对照组)<sup>[12]</sup>, 利用 R 软件读取原始文件后, 使用 Affy 包中的 RMA 算法标准化数据<sup>[13]</sup>, 得到 miRNA 的表达矩阵, 将预处理后得到的 miRNA 表达矩阵文件用 R 软件读入, 利用 R 软件中 limma 包对 3 例舌癌细胞样本和 4 例正常对照样本进行差异表达分析<sup>[14]</sup>, 并应用贝叶斯检验方法进行多重检验校正。差异 miRNA 筛选标准为:  $P < 0.05$ , 基因表达值倍数变化(fold change, FC)  $\geq 2$  或  $\leq -2$ 。

**1.2 组织样本与细胞** 本研究组织样本来自于天津市宝坻区人民医院 2012 年 1 月至 2018 年 12 月 20 例舌癌患者的癌组织及其相应癌旁组织, 患者男性 12 例、女性 8 例, 年龄( $62.3 \pm 7.5$ )岁。舌癌细胞株 CAL-27 购自 ATCC, 采用 MEM 培养基培养(购自 HyClone 公司)。FCS 购自 Gibco 公司。

**1.3 试剂及材料** miR-132 mimics 寡聚核苷酸和转染试剂购于 Qiagen 公司; 引物由 Inventroge 公司合成(表 1)。

**1.4 RT-PCR** 采用试剂盒提取舌癌组织及癌旁组织中的总 RNA, 用 RT-PCR 测定各组 miR-132 表达量, 内参使用 U6 进行标准化。CAL-27 细胞转

收稿日期: 2019-01-07

作者简介: 高丽荣(1973—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事口腔颌面外科学研究

通信作者: 高丽荣(E-mail: gaoliong@126.com)

染 48 h 后, 根据总 RNA 提取试剂盒说明书分别提取各组总 RNA, 再反转录合成 cDNA 的第 1 链。RT-PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。RT-PCR miR-132 表达量计算公式为: 相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\Delta Ct = Ct_{miR-132} - Ct_{U6}$ 。

表 1 RT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
miR-132 mimics	上游 TGGATGATGGCACTGTTGGAA
	下游 CATTTGGCCACCCCTCAAATATAA
U6	上游 CGCTTCGGCAGCACATATACTA
	下游 CGCTTCACGAATTTGCGTGCTCA

**1.5 舌癌细胞株转染实验** 将对数生长期的 CAL-27 细胞接种于 6 孔板, 待细胞密度融合为 60%~70% 时将细胞分为 2 组, 分别进行 miR-132 mimics 及空白载体转染, 转染后 48 h 收集细胞内 RNA, 检测 miR-132 表达水平。

**1.6 细胞克隆形成实验** 取 miR-132 mimics 及空白载体转染的 CAL-27 细胞, 以 800/孔接种于 6 孔板, 在细胞培养箱中温育 1~3 周, 待细胞克隆形成, 使用 4% 多聚甲醛固定细胞, 0.1% 结晶紫对细胞群落进行染色, 计集落数。

**1.7 MTT 实验** 取 miR-132 mimics 及空白载体转

染的 CAL-27 细胞, 以 3 000/孔接种于 96 孔板培养, 在实验结束前 4 h 加入 5 mg/mL 的 MTT 20  $\mu$ L, 继续培养 4 h 后弃培养液, 各孔加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 150  $\mu$ L, 室温振荡 10 min。于酶标仪上测定光密度 [ $D(490\text{ nm})$ ]。

**1.8 Transwell 实验** 将 Transwell 小室置于 24 孔板后, 加入转染组和对照组细胞, 小室内加入 200 mL 无血清培养基, 24 孔板内加入 600 mL 有血清培养基。培养 24 h 后取出 Transwell 小室, 擦除未通过小室滤膜的细胞, 采用 0.1% 结晶紫对迁移细胞进行染色、漂洗、固定, 任取镜下 5 个视野进行计数, 每组实验重复 3 次, 观察其迁移情况。

**1.9 统计学处理** 使用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析。研究数据服从正态分布, 各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组比较采用  $t$  检验, 多组比较采用方差分析, 组内两两比较采用 LSD 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 GSE69002 表达谱芯片生物信息学分析** 舌癌细胞样本和正常对照样本差异表达 miRNA 一共 1 203 个, 其中上调 miRNA 660 个, 下调 miRNA 543 个(图 1)。miR-132 在舌癌细胞样本中明显下调, 提示 miR-132 在舌癌细胞中表达受抑制, 其可能与舌癌的发生、发展相关。

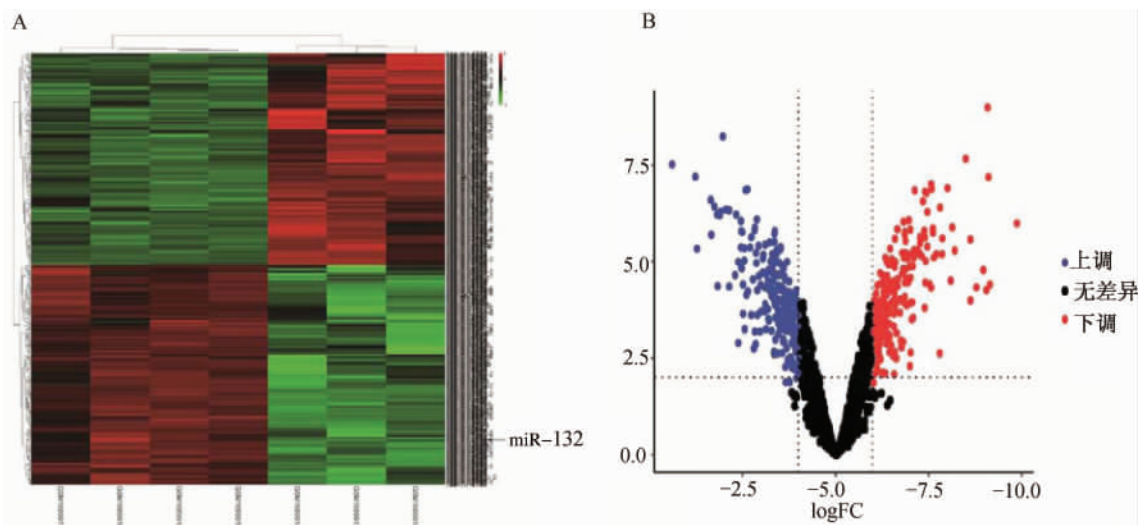


图 1 miR-132 在舌癌芯片中的表达

注: A. 热图; B. 火山图

**2.2 miR-132 在舌癌组织及癌旁组织中表达水平的比较** 采用 RT-PCR 检测 miR-132 在舌癌组织

及癌旁组织中的表达水平。miR-132 在舌癌组织中的表达水平 ( $0.56 \pm 0.05$ ) 显著低于癌旁组织 ( $1.43$

$\pm 0.12$ ) ( $P < 0.001$ ), 进一步验证了基因芯片的结果。(图 2)

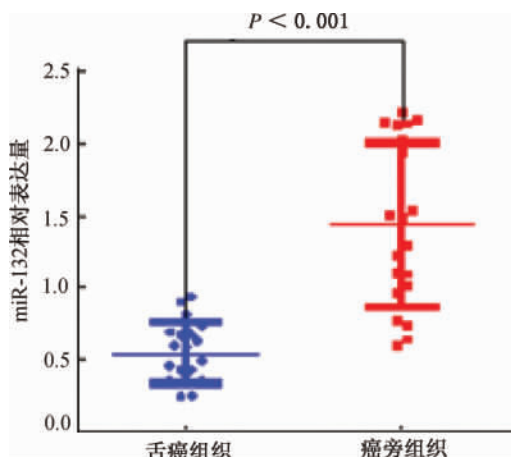


图2 miR-132在舌癌组织及癌旁组织中的表达

**2.3 miR-132的表达与舌癌病理分级的关系** 为进一步研究 miR-132 与舌癌发生的关系, 对舌癌样本的病理分级与 miR-132 表达水平的关系进行了分析。低分级(T1期)组内 miR-132 的表达处于较高水平, T2、T3期舌癌组织的 miR-132 表达较低分级组低, T4期舌癌组织表达水平最低, miR-132 的表达水平与病理分级呈负相关( $H=6.528$ ,  $P < 0.05$ )。(图 3)

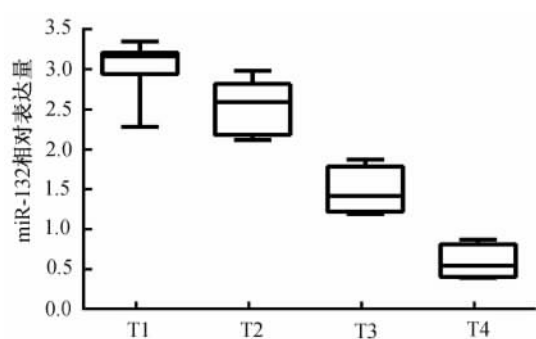


图3 miR-132的表达与舌癌病理分级的关系

**2.4 miR-132质粒转染CAL-27细胞** 将2组细胞(miR-132 mimics组、对照组)进行转染, 培养48 h提取RNA检测。PCR结果显示, miR-132 mimics组 miR-132 表达水平显著高于对照组( $P < 0.01$ )。(图 4)

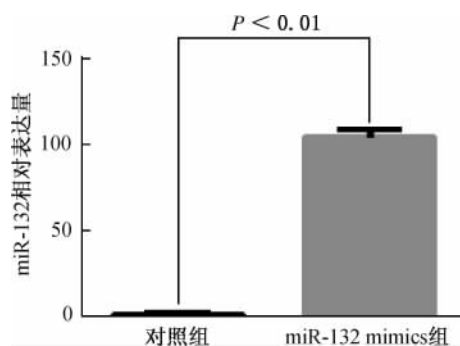


图4 miR-132过表达质粒转染CAL-27细胞后的表达情况

## 2.5 miR-132对CAL-27细胞增殖活性的影响

MTT实验检测 miR-132 对 CAL-27 细胞增殖的影响。miR-132 mimics 转染后48 h, 用MTT实验分别检测 CAL-27 细胞 miR-132 mimics 组和对照组舌癌细胞的活性。结果显示, miR-132 mimics 转染显著抑制舌癌细胞的增殖( $P < 0.001$ , 图 5)。细胞克隆形成实验同样表明, 与对照组相比, miR-132 mimics 组中的舌癌细胞 CAL-27 的集落数显著减少( $P=0.0032$ )。(图 6)

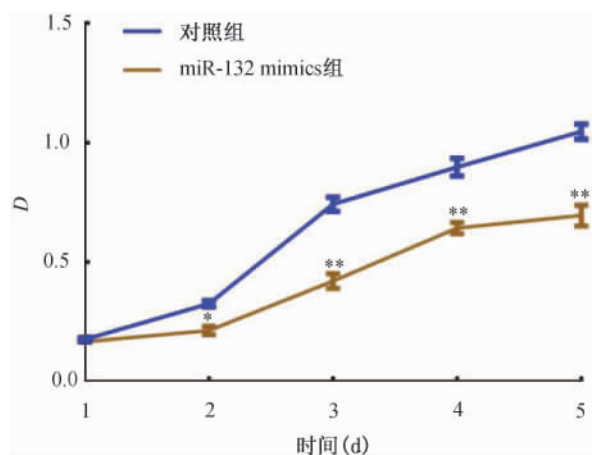


图5 miR-132 mimics 转染的 CAL-27 舌癌细胞 MTT 实验结果  
注: 与对照组比较, \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$

**2.6 转染后舌癌细胞的体外迁移能力** 用 Transwell 实验观察 2 组质粒转染的 CAL-27 舌癌细胞的过膜数量, 对 miR-132 调控的舌癌细胞的迁移能力进行研究。miR-132 mimics 组的细胞过膜数量  $[(89 \pm 15)/\text{视野}]$  明显低于对照组  $[(380 \pm 25)/\text{视野}]$  ( $P=0.002$ )。(图 7)

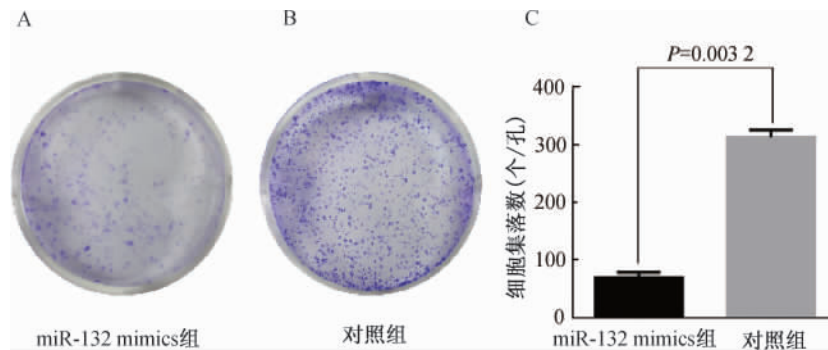


图6 miR-132 mimics 转染的舌癌细胞 CAL-27 的细胞克隆形成实验结果

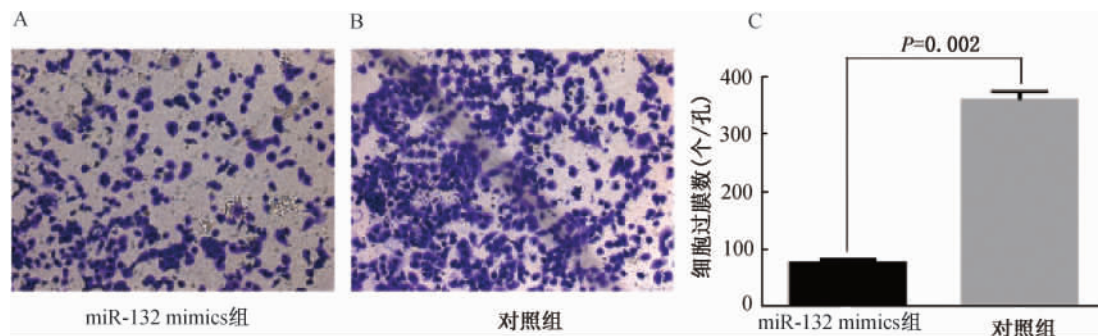


图7 miR-132 mimics 转染的 CAL-27 舌癌细胞 Transwell 实验结果

### 3 讨论

舌癌是临床常见的恶性肿瘤之一，其临床死亡率呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。早期舌癌的治疗以手术切除为主，但由于舌癌早期症状不明显，大多患者就诊时已属中晚期，且因肿瘤细胞局部浸润和远端转移，患者失去根治性手术的机会，高复发率也是造成舌癌预后不理想的原因之一<sup>[10]</sup>。因此，早期诊断和治疗是保障舌癌患者具有良好预后的关键因素。寻找舌癌早期诊断标志物对及时诊治舌癌具有重要意义。近年来，miRNA 以其在生物学过程中多样化的调节作用而备受关注<sup>[15-16]</sup>。各种肿瘤异常的 miRNA 表达谱为研究肿瘤发生提供了新思路。

miR-132 作为 miRNA 中的一员，在多种肿瘤的发生、发展中起到重要的作用。miR-132 最早在肺癌、恶性胶质瘤、乳腺癌中被发现，后逐渐受到更多关注。研究者们发现 miR-132 在卵巢癌、甲状腺癌、结直肠癌及神经胶质母细胞瘤中起肿瘤抑制作用<sup>[9-11]</sup>，然而 miR-132 在舌癌的发生、发展中究竟起什么作用，尚不清楚。本研究收集舌癌组织及癌旁组织样本，并检测样本的 miR-132 表达量进行分析。研究结果显示，miR-132 在舌癌组织中的表达量明显低于癌旁组织。对收集到的舌癌组织以病理分级进行分组，比较不同病理分级的舌癌组织中

miR-132 的表达情况，研究发现在舌癌组织中 miR-132 的表达量随病理分级恶性程度的升高而降低，高分级（T4 期）组中 miR-132 表达量最低。miR-132 在不同病理级别舌癌组织中的表达量存在显著差异，随着舌癌病理分级的升高，表达量降低，提示 miR-132 的表达可能与舌癌的发生、发展相关。基于以上的实验研究结果，我们成功使用 miR-132 mimics 转染 CAL-27 细胞株，并进一步对转染细胞进行了 MTT 实验、细胞克隆形成实验及 Transwell 实验。MTT 实验结果显示，miR-132 mimics 转染显著抑制舌癌细胞的增殖，细胞克隆形成实验同样表明，与对照组相比，miR-132 mimics 组中的舌癌细胞 CAL-27 的集落数显著减少。Transwell 实验结果显示，与对照组相比，miR-132 mimics 组的细胞过膜数量减少。MTT 实验、细胞克隆形成实验及 Transwell 实验结果验证了 miR-132 的表达水平确与舌癌细胞的迁移能力相关，miR-132 的表达量增加可以抑制舌癌细胞的增殖、迁移。

综上所述，舌癌组织中 miR-132 的表达水平较正常组织低，且随着癌组织病理分级恶性程度的升高而降低。过表达 miR-132 可抑制舌癌细胞的增殖、转移，提示 miR-132 对舌癌的发生、发展发挥重要作用，且与舌癌的增殖、转移密切相关，其

可作为舌癌的潜在临床诊治靶点。测定 miR-132 的表达量可作为预测舌癌预后的生物标志物, 这为舌癌治疗提供了新思路。

## 参考文献

- [1] Edge SB, Compton CC. The American joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(6): 1471-1474.
- [2] Mitsudo K, Hayashi Y, Minamiyama S, *et al.* Chemoradiotherapy using retrograde superselective intra-arterial infusion for tongue cancer: Analysis of therapeutic results in 118 cases[J]. *Oral Oncol*, 2018, 79: 71-77.
- [3] Lu J, Getz G, Miska EA, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838.
- [4] He L, Thomson JM, Hemann MT, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 828-833.
- [5] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259-269.
- [6] He Q, Chen Z, Cabay RJ, *et al.* MicroRNA-21 and microRNA-375 from oral cytology as biomarkers for oral tongue cancer detection[J]. *Oral Oncol*, 2016, 57: 15-20.
- [7] Rabinowits G, Bowden M, Flores LM, *et al.* Comparative analysis of microRNA expression among benign and malignant tongue tissue and plasma of patients with tongue cancer [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 191.
- [8] Zhou XL, Wu JH, Wang XJ, *et al.* Integrated microRNA-mRNA analysis revealing the potential roles of microRNAs in tongue squamous cell cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1): 885-894.
- [9] Lages E, Guttin A, El Atifi M, *et al.* MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20600.
- [10] Zheng YB, Luo HP, Shi Q, *et al.* MiR-132 inhibits colorectal cancer invasion and metastasis via directly targeting ZEB2 [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(21): 6515-6522.
- [11] Guo H, Zhang X, Chen Q, *et al.* MiR-132 suppresses the migration and invasion of lung cancer cells by blocking USP9x-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(1): 224-234.
- [12] Duz MB, Karatas OF, Guzel E, *et al.* Identification of miR-139-5p as a saliva biomarker for tongue squamous cell carcinoma: A pilot study[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2016, 39(2): 187-193.
- [13] Gautier L, Cope L, Bolstad BM, *et al.* Affy-analysis of affymetrix genechip data at the probe level[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(3): 307-315.
- [14] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, *et al.* Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
- [15] Kai Y, Peng W, Ling W, *et al.* Reciprocal effects between microRNA-140-5p and Adam10 suppress migration and invasion of human tongue cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 448(3): 308-314.
- [16] Boldrup L, Troiano G, Gu X, *et al.* Evidence that circulating proteins are more promising than miRNAs for identification of patients with squamous cell carcinoma of the tongue[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(61): 103437-103448.

## MiR-132 inhibiting proliferation, migration and invasion of tongue cancer

GAO Li-rong<sup>1</sup>, WANG Yi-jun<sup>1</sup>, ZHOU Xian<sup>2</sup>, NIE Ting-hong<sup>1</sup>, ZHANG Jian-quan<sup>1</sup>(1. *Stomatology department, Baodi Hospital, Tianjin 301800, China*; 2. *Oral and Maxillofacial Surgery, Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin 300041, China*)

**Abstract:** To study the expression of miR-132 in tongue cancer, cancer and paracancerous tissues were collected from 20 patients with tongue cancer and miR-132 expression was detected by RT-PCR. The CAL-27 cell line was transfected with miR-132 mimics, and the proliferation and viability in the miR-132 mimics group and the control group were detected by cell colony forming and MTT assays respectively. Transwell assay were performed to explore the effect of miR-132 on migration of tongue cancer cells. the results showed that the expression of miR-132 in tongue cancer tissues ( $0.56 \pm 0.05$ ) was significantly lower than that in the adjacent normal tissues ( $1.43 \pm 0.12$ ,  $P < 0.001$ ). The expression of miR-132 in tongue cancer tissues decreased with the increase of malignancy of pathological grade ( $P < 0.05$ ). Cell colony forming and MTT assays showed that the cell viability and proliferation in the miR-132 mimics group were significantly inhibited ( $P = 0.0032$ ,  $P < 0.001$ ). Transwell experiments showed that the number of cells rested on the membranes in the miR-132 mimics group [ $(89 \pm 15) / \text{field}$ ] was significantly reduced than that in the control group [ $(380 \pm 25) / \text{field}$ ] ( $P = 0.002$ ). In conclusion, this study shows that miR-132 expression decreases in tongue cancer tissue, and miR-132 plays an important role in the proliferation and metastasis of tongue cancer, which suggesting that miR-132 might be used as a potential clinical prognostic marker for the prognosis and treatment of tongue cancer.

**Key words:** genechip; tongue cancer; microRNA-132; biological characteristics