

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.10.009

## miR-200c 对舌癌 Tca8113 细胞增殖和凋亡的影响\*

朱名毅<sup>1</sup>,姚金光<sup>2</sup>,刘津<sup>2</sup>,姜艳<sup>1△</sup>

(1.右江民族医学院科学实验中心,广西百色 533000;2.右江民族医学院附属医院,广西百色 533000)

**[摘要]** **目的** 探讨 miR-200c 对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 将 miR-200c 的模拟物通过脂质体转染到人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞内,通过四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖能力、流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡率、Western blot 检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和 Bcl-2 蛋白的表达。**结果** 与对照组相比,miR-200c 模拟物 20、40、80 nmol/L 组的 Tca8113 细胞生长受到明显抑制,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),miR-200c 模拟物的浓度越大,作用时间越长,抑制效果越明显( $P < 0.05$ );转染 miR-200c 模拟物 48 h 后,Tca8113 细胞停滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );Western blot 证明 20、40、80 nmol/L 组 Bcl-2 蛋白表达量明显低于对照组,而 Caspase-3 蛋白表达量明显高于对照组( $P < 0.05$ )。**结论** miR-200c 过表达可抑制舌癌 Tca8113 细胞增殖并诱导细胞凋亡。

**[关键词]** 舌肿瘤;miR-200c;细胞增殖;细胞凋亡

**[中图分类号]** R793.86

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)10-1322-03

### Effects of miR-200c on proliferation and apoptosis of tongue carcinoma Tca8113 cells\*

Zhu Mingyi<sup>1</sup>, Yao Jingguang<sup>2</sup>, Liu Jin<sup>2</sup>, Jiang Yan<sup>1△</sup>

(1. Medical Scientific Experimental Center, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China;

2. Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of miR-200c on proliferation and apoptosis of tongue squamous cell carcinoma (TCCS) Tca8113 cells. **Methods** The mimics of miR-200c were transfected into Tca8113 cells using liposome. The Tca8113 cell proliferation was detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The flow cytometry assay was used to determine the cell cycle and the apoptosis rate of Tca8113 cell. The protein expression levels of Bcl-2 and Caspase-3 in Tca8113 cell was detected by Western-blot. **Results** The 20,40,80 nmol/L miR-200c mimics groups inhibited the growth of Tca8113 cells, the difference compared with the control group showing statistical significance ( $P < 0.05$ ). The greater the miR-200c mimics concentration and the longer duration of action, the more significant the inhibition effect ( $P < 0.05$ ). After 48h transfecting by miR-200c mimics, the Tca8113 cells were arrested in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phases of cell cycle, and the apoptosis rate of the miR-200c mimics groups was significantly increased, the difference compared with the control group showing statistical significance ( $P < 0.05$ ); Western blot verified that the expression amount of Bcl-2 protein in the 20,40,80 nmol/L miR-200c groups was significantly lower than that in the control group, while the expression amount of Caspase-3 protein was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The overexpression of miR-200c might inhibit the proliferation of Tca8113 cell and induces their apoptosis.

**[Key words]** tongue neoplasms; miR-200c; cell proliferation; apoptosis

微 RNA(microRNA, miRNA)是近年来发现的一类由 18-25 个短寡核苷酸组成的内源性非编码单链小分子 RNA。miRNA 广泛存在于各种生物中,参与细胞的发育、分化、增殖、凋亡、迁移等多种生物学过程<sup>[1]</sup>。miRNA 可作为癌基因或抑癌基因,与许多肿瘤的发生、发展密切相关,目前的研究发现舌鳞癌中存在 miRNA 差异性表达,改变某些特异 miRNA 的表达水平,可影响舌癌的发生、发展<sup>[2-3]</sup>。miR-200c 具有调节下游靶基因表达的作用,在肿瘤中 miR-200c 主要通过调控转录因子的表达参与肿瘤转移的上皮间质转化过程<sup>[4-6]</sup>。很少有文献报道 miR-200c 在肿瘤细胞增殖、凋亡过程中的作用及其机制。本文通过体外将 miR-200c 模拟物转染入舌癌细胞,上调 miR-200c 的表达,观察其对舌癌细胞增殖、凋亡的影响,并检测 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的变化,分析其相关机制。

### 1 材料与方

**1.1 材料** 人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞株由广西医科大学卞晓聪教师赠送。miRNA 模拟物及其阴性对照由上海吉玛制

药技术有限公司合成,miR-200c 模拟物序列:5'-UAA UAC UGC CGG GUA AUG AUG GA-3';miR-200c 模拟物阴性对照序列:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3';miRNA inhibitor negative control-FAM 序列:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'。RPMI 1640 培养液和胎牛血清购自美国 HYCLONE 公司。Opti-MEM I 培养液和 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。四甲基偶氮唑盐(MTT)和细胞周期检测试剂盒购自美国 sigma 公司,细胞凋亡检测试剂盒购自 BD 公司,二甲基亚砜(DMSO)购自上海生物工程公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和瞬时转染** 将舌鳞癌细胞株 Tca8113 复苏后,接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,加入含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液,置于培养箱中(37 ℃、5% CO<sub>2</sub>) 常规培养,选择对数生长期细胞用于实验。转染前 1 d,选择生长状态良好的 Tca8113 细胞,用

\* 基金项目:广西高等学校科研资助项目(201204LX329);右江民族医学院科研资助项目[右医科字(2011)1号]。 作者简介:朱名毅(1982-),讲师,硕士研究生,主要从事肿瘤分子生物学研究。 △ 通讯作者, Tel:(0776)2837119;E-mail:jiangyan19852005@126.com。

100  $\mu$ L 无抗生素 RPMI 1640 培养液按  $3 \times 10^3$  每孔的浓度接种到 96 孔板, 24 h 后细胞浓度为 50%~70% 时进行转染实验。其具体步骤为: 先用 12.50  $\mu$ L Opti-MEM I 稀释 miRNA 模拟物; 再将 0.25  $\mu$ L Lipofectamine 2000 加入到 12.50  $\mu$ L Opti-MEM I 中, 室温静置 5 min; 然后把二者混匀, 室温放置 20 min; 最后把混合液全部均匀加入到 96 孔板中, 继续培养 4 h 后换成含血清和抗生素的 RPMI 1640 培养液进行后续实验。将羧基荧光素 (carboxyfluorescein, FAM) 标记的 miR-200c 阴性对照转染到 Tca8113 细胞中, 细胞常规培养 24 h 后, 在荧光显微镜下观察转染效率。

1.2.2 MTT 法检测 miR-200c 对 Tca8113 细胞增殖的影响

为了解 miR-200c 模拟物 (mimics)、转染试剂以及背景效应之间的差异, 以排除非序列特异性的效应, 本研究在预实验中设计了 3 组对照: (1) 空白对照组 (A 组); (2) 脂质体试剂对照组 (B 组); (3) miR-200c 模拟物阴性对照组 (C 组)。Tca8113 细胞接种于 96 孔板后, 在同样的实验条件下, 先观察以上 3 组细胞之间生长情况, 证实它们对细胞的生长没有明显影响, 后续的实验中均以 B 组作为对照组。实验组分为 20、40、80 nmol/L 组, 按上述转染方法分别将终浓度为 20、40、80 nmol/L 的 miR-200c 模拟物转染 Tca8113 细胞, 常规孵育 24、48、72 h 后, 弃培养液, 每孔加入质量浓度 5 g/L 的 MTT 溶液 20  $\mu$ L 继续培养 4 h 后, 洗净该盐, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。每组细胞设 5 个平行孔, 重复 3 次实验。用酶标仪测量各孔的吸光度值 (A 值), 以细胞增殖率反映细胞增殖情况, 细胞增殖率 = 转染细胞 A 值 / 对照细胞 A 值  $\times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞术检测 miR-200c 对细胞周期的影响

Tca8113 细胞转染 miR-200c 模拟物 48 h 后, 对常规胰酶消化、离心收集转染后的细胞, 用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 之后加入 2 倍体积的预冷 70% 乙醇于 4  $^{\circ}$ C 固定过夜, 第 2 天 PBS 洗涤 2 次后, 加 500  $\mu$ L PBS (含 100  $\mu$ g/mL RNaseA, 50 g/mL 溴化乙锭), 于 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 200 目筛网过滤后上机检测细胞周期, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.4 流式细胞术检测 miR-200c 对细胞凋亡的影响

Tca8113 细胞转染 miR-200c 模拟物 48 h 后, 以适量胰酶消化, 离心收集转染后的细胞, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 用 500  $\mu$ L Binding Buffer 调整细胞浓度为  $(1 \sim 5) \times 10^5$  个/mL, 向重悬液中加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 染色, 随后加入 5  $\mu$ L 碘化丙啶 (PI) 染色, 室温下避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测凋亡率, 实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测 miR-200c 对细胞 Bcl-2 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase-3) 蛋白表达的影响

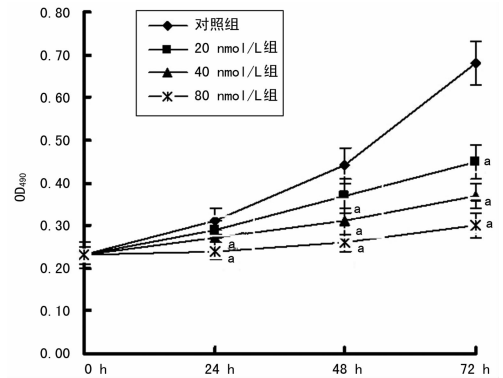
Tca8113 细胞转染 miR-200c 模拟物 48 h 后, 常规胰酶消化, 离心收集转染后的细胞, 加入适量含有苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的细胞裂解液于冰上裂解细胞, 提取总蛋白, 用蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量。15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜。37  $^{\circ}$ C 下用 10% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入 Bcl-2、Caspase-3 抗体, 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜孵育, 洗膜后加入二抗, 室温孵育 2 h, 洗膜后加入增强化学发光 (ECL) 试剂曝光、显影, 以  $\beta$ -actin 为内参。将胶片扫描后, 用 Image Pro PLUS 7.0 软件分析 Bcl-2、Caspase-3 和  $\beta$ -actin 的灰度值, 以目的蛋白与内参照  $\beta$ -actin 的比值为目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数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 miR-200c 转染效率的观察 FAM 标记的 miR-200c 阴性对照转染 Tca8113 细胞 24 h 后, 在荧光显微镜下观察, 发现大部分细胞均含有荧光, 转染效率可达到 90% 以上。

2.2 miR-200c 对 Tca8113 细胞增殖的影响 Tca8113 细胞经转染 miRNA-200c 模拟物后, 细胞增殖比未转染的细胞明显减缓。转染 24 h 时, 40、80 nmol/L 组 miRNA-200c 模拟物对细胞生长抑制与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 转染 48、72 h 时, 3 组不同浓度 miRNA-200c 模拟物对细胞生长抑制与对照组比较, 均差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), miRNA-200c 模拟物的浓度越大, 其抑制效果越明显, 见图 1。



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

图 1 miR-200c 对 Tca8113 细胞增殖的影响

2.3 流式细胞术检测 miR-200c 对细胞周期和凋亡的影响 与对照组比较, 实验组 miR-200c 模拟物可以使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例增加、S 期细胞比例减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); miR-200c 模拟物还可以使细胞的凋亡率明显增加, 且 miR-200c 模拟物浓度越大, 凋亡率越高 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组细胞周期和凋亡情况比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	凋亡率
对照组	62.36 $\pm$ 1.11	23.34 $\pm$ 0.86	4.03 $\pm$ 0.32
20 nmol/L 组	65.62 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	21.21 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	9.36 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>
40 nmol/L 组	70.33 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	17.39 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>	15.48 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup>
80 nmol/L 组	72.45 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	16.59 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	18.76 $\pm$ 1.51 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

2.4 miR-200c 对 Tca8113 细胞 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 以对照组组目的蛋白/ $\beta$ -actin 的比值为 1, Western blot 法检测结果显示, 转染 miR-200c 模拟物 48 h 后, 随着 miR-200c 模拟物浓度增加, 20、40、80 nmol/L 组细胞 Bcl-2 蛋白相对表达量递减, 细胞 Caspase-3 蛋白相对表达量递增, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 各组细胞 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Bcl-2	Caspase-3
对照组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
20 nmol/L 组	0.78 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.57 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
40 nmol/L 组	0.62 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	2.74 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
80 nmol/L 组	0.37 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	3.56 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

3 讨 论

研究表明舌癌具有独特的 miRNA 表达谱, miRNA 的表

达改变在舌癌的发生、发展中发挥着重要的作用。李莎莎等<sup>[7]</sup>学者采用 RT-qPCR 和原位杂交法检测发现 miR-21 在舌鳞癌细胞及组织标本中都呈高表达;舌鳞癌分化程度越低,miR-21 表达越高;miR-21 表达与患者生存期呈负关;miR-21 高表达患者的预后较低表达者差。Jia 等<sup>[8]</sup>学者认为 miR-195 的低表达与舌鳞癌大小和临床分期有关,同时 miR-195 的低表达还能降低患者的生存时间;增加 miR-195 在舌癌细胞 SCC-15 和 CAL27 中的表达,可以抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,与降低周期素 D1(Cyclin D1)和 Bcl-2 的表达有关。miR-200c 是 miR-200 家族成员之一,近年来许多研究表明,miR-200c 在头颈部肿瘤、乳腺癌、胰腺癌、肾癌膀胱癌和肝癌等肿瘤中呈低表达<sup>[9]</sup>。miR-200c 参与肿瘤发生、发展、转移和耐药等过程,miR-200c 在肺癌患者血清中呈低表达,高表达 miR-200c 会降低肺癌患者的生存时间;miR-200c 也能通过靶向作用蛋白锌指 E 盒结合同源盒蛋白 1/2(ZEB1/2),上调 E-钙黏蛋白的表达,从而抑制肿瘤转移过程中的上皮间质转化过程;此外 miR-200c 不但能提高肿瘤细胞对药物的敏感性,也能增加肿瘤细胞对化疗药物的耐药性<sup>[10]</sup>。王晟<sup>[11]</sup>发现 miR-200c 在高度恶性乳腺癌细胞株和乳腺癌标本中呈低表达,过表达乳腺癌细胞株的 miR-200c,可以下调 G13 信号通路、突触传递信号通路、神经冲动传递信号通路和细胞内代谢负调控信号通路等基因的表达,还发现内皮素受体 A(EDNRA)可能是 miR-200c 的调控靶点。本研究通过 MTT 实验检测发现舌癌 Tca8113 细胞转染 miR-200c 模拟物,上调 miR-200c 的表达,可抑制细胞的增殖;miR-200c 模拟物浓度越大,对细胞增殖的抑制率越高。流式细胞术结果显示,miR-200c 能够使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多,而 S 期细胞减少,从而抑制舌癌细胞的生长。

Bcl-2 家族的表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素之一,bcl-2 基因家族包括促进凋亡基因如 bax 等和抑制凋亡的基因如 bcl-2 等,过表达 bcl-2 或下调 bax 可抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[12-13]</sup>。细胞凋亡的过程也就是 Caspase 酶被激活,引起“瀑布式”级联反应,对底物进行切割,降解 DNA 修复酶,使染色体、细胞骨架和核蛋白等裂解成小片段,最终导致细胞死亡<sup>[14]</sup>。Bcl-2 能够通过抑制细胞色素 C 的释放,从而阻断 Caspase 断裂重要的细胞内基质,细胞凋亡信号逐级放大,激活的 Caspase-3 介导细胞死亡<sup>[15]</sup>。本研究还发现,miR-200c 模拟物转染舌癌 Tca8113 细胞后,细胞凋亡率显著增加,而且与 miR-200c 模拟物浓度呈正相关。Western-blot 结果显示 Bcl-2 蛋白表达水平下降,而 Caspase-3 蛋白表达水平增高,说明上调 Tca8113 细胞中 miR-200c 的表达,可以降低 Bcl-2 的表达,从而激活 Caspase-3 酶的活性,促进细胞凋亡。

综上所述,上调舌癌细胞中 miR-200c 的表达后,Tca8113 细胞增殖水平明显受到抑制,流式细胞术检测显示 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增加,细胞凋亡率也明显增加,Western-blot 结果显示细胞 Bcl-2 蛋白表达水平降低,Caspase-3 活化增强。本实验初步证明 miR-200c 可以作为舌癌的一种抑癌基因,能够降低与抗凋亡相关基因 Bcl-2 的表达,通过激活 Caspase-3 的活化从而抑制舌癌细胞增殖促进其凋亡。针对 miR-200c 的治疗策略可能会给舌癌的治疗提供新的思路和治疗靶点。

## 参考文献

[1] Okamura K, Ladewig E, Zhou L, et al. Functional small RNAs are generated from select miRNA hairpin loops in flies and mammals[J]. *Genes Dev*, 2013, 27(7): 778-792.

[2] Pérez-Sayáns M, Pilar GD, Barros-Angueira F, et al. Current trends in miRNAs and their relationship with oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2012, 41(6): 433-443.

[3] Endo H, Muramatsu T, Furuta M, et al. Potential of tumor-suppressive miR-596 targeting LGALS3BP as a therapeutic agent in oral cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(3): 560-569.

[4] Jurmeister S, Baumann M, Balwierz A, et al. MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F[J]. *Mol Cell Bio*, 2012, 32(3): 633-651.

[5] Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, et al. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2012, 31(16): 2062-2074.

[6] Zhang Z, Liu ZB, Ren WM, et al. The miR-200 family regulates the epithelial-mesenchymal transition induced by EGF/EGFR in anaplastic thyroid cancer cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(4): 856-862.

[7] 李莎莎, 周旋, 张强, 等. STAT3 与 miRNA-21 在舌鳞状细胞癌中异常表达的相关性研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(6): 323-327.

[8] Jia LF, Wei SB, Gong K, et al. Prognostic implications of microRNA miR-195 expression in human tongue squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56634.

[9] Feng X, Wang Z, Fillmore R, et al. MiR-200, a new star miRNA in human cancer[J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(2): 166-173.

[10] 朱名毅, 姚金光, 刘津, 等. miR-200c 在肿瘤发生发展中的研究进展[J]. *右江民族医学院学报*, 2014, 36(1): 80-82.

[11] 王晟. miRNA-200c 在乳腺癌中的表达及其调控基因网络的筛选[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.

[12] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(1): 49-63.

[13] Hudson SG, Halleran DR, Nevaldine B, et al. Microarray determination of Bcl-2 family protein inhibition sensitivity in breast cancer cells[J]. *Exp Bio Med*, 2013, 238(2): 248-256.

[14] Dhandayuthapani S, Marimuthu P, Hörmann V, et al. Induction of apoptosis in HeLa cells via caspase activation by resveratrol and genistein[J]. *J Med Food*, 2013, 16(2): 139-146.

[15] Cali U, Cavkaytar S, Sirvan L, et al. Placental apoptosis in preeclampsia, intrauterine growth retardation, and HELLP syndrome: An immunohistochemical study with caspase-3 and bcl-2[J]. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2013, 40(1): 45-48.