

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01314

## miR-141 抑制头颈部鳞癌细胞增殖

王国栋<sup>1△</sup>, 黄建涛<sup>1△</sup>, 赵云富<sup>1</sup>, 刘 渊<sup>1</sup>, 陈潇卿<sup>1</sup>, 吴 洋<sup>1\*</sup>, 汪大林<sup>2\*</sup>

1. 第二军医大学长征医院口腔科, 上海 200003
2. 第二军医大学长海医院口腔科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 考察 microRNA-141 (miR-141) 对头颈部鳞癌细胞增殖的影响。**方法** 通过 qRT-PCR 分析 19 例头颈部鳞状细胞癌患者的肿瘤组织与癌旁正常组织标本中 miR-141 的表达。通过 miR-141 mimics 或 miR-141 反义寡核苷酸 (ASO) 上调或抑制人喉癌细胞株 (Hep-2) 和人舌鳞状细胞癌细胞株 (SCC-9) 细胞中 miR-141 的表达水平。采用 MTT 实验分析上调或抑制 miR-141 的表达水平对 Hep-2 和 SCC-9 细胞增殖的影响。利用生物信息学方法预测 miR-141 的靶基因。**结果** qRT-PCR 的结果表明, 头颈部鳞状细胞癌组织的 miR-141 的表达水平低于癌旁正常组织 ( $P < 0.05$ ); 上调 miR-141 的表达能够抑制 Hep-2 和 SCC-9 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ), 而抑制 miR-141 表达可以促进 Hep-2 和 SCC-9 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ )。生物信息学方法预测 miR-141 的靶基因可能为 ZEB1 基因。**结论** miR-141 可能通过 ZEB1 基因抑制头颈部鳞状细胞癌的增殖。

**[关键词]** microRNA-141; 头颈部肿瘤; 鳞状细胞癌; ZEB1; 细胞增殖

**[中图分类号]** R 739.91 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)12-1314-05

## miR-141 inhibits the proliferation of head and neck squamous cell carcinoma

WANG Guo-dong<sup>1△</sup>, HUANG Jian-tao<sup>1△</sup>, ZHAO Yun-fu<sup>1</sup>, LIU Yuan<sup>1</sup>, CHEN Xiao-qing<sup>1</sup>, WU Yang<sup>1\*</sup>, WANG Da-lin<sup>2\*</sup>

1. Department of Stomatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Department of Stomatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of miR-141 on the proliferation of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells. **Methods** The expressions of miR-141 in 19 HNSCC tissues and the matched adjacent normal tissues were analyzed by qRT-PCR. The miR-141 in Hep-2 or SCC-9 cells was overexpressed or down-regulated by miR-141 mimics or miR-141 ASO transfection. Then the effects of overexpression or down-regulation of miR-141 on cellular proliferation were analyzed by MTT experiment. The targeted genes of miR-141 were predicted by bioinformatics algorithms. **Results** The expression of miR-141 in HNSCC tissues was found significantly lower than that in matched normal tissue ( $P < 0.05$ ). Overexpression of miR-141 significantly inhibited the proliferation of Hep-2 and SCC-9 cells, and down-regulation of miR-141 significantly promoted the proliferation of Hep-2 and SCC-9 cells ( $P < 0.05$ ). Bioinformatics algorithms showed that ZEB1 was likely to be a targeted gene of miR-141 in HNSCC. **Conclusion** miR-141 may inhibit HNSCC cell proliferation via ZEB1.

**[Key words]** microRNA-141; head and neck neoplasms; squamous cell carcinoma; ZEB1; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(12):1314-1318]

头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 是一种非均质癌瘤, 好发于口腔、咽部和喉部, 其发病率和病死率都较高, 5 年总体生存率仍维持在 50%~60%<sup>[1]</sup>。目前的研

究表明, HNSCC 的发生与感染人乳头状瘤病毒、吸烟和饮酒等因素有明显相关性<sup>[2]</sup>, 但其发生、发展的分子机制尚不明确。

MicroRNAs (miRNAs) 是一组广泛存在于真核

**[收稿日期]** 2015-03-12 **[接受日期]** 2015-10-02

**[基金项目]** 全军医学科技“十二五”科研项目 (CWS11J300), 上海市科委产学研医合作项目 (12DZ1940503, 13DZ1942704), 军队卫生训练课题 (2011XL015), Supported by Research Project of the “12<sup>th</sup> Five-Year Plan” for Medical Science and Technology of PLA (CWS11J300), Key Project on the Integration of Industry, Education, Research and Medicine of Shanghai Science and Technology Committee (12DZ1940503, 13DZ1942704), and PLA Health Training Project (2011XL015).

**[作者简介]** 王国栋, 博士生. E-mail: louis\_w@126.com; 黄建涛, 硕士. E-mail: 496349641@qq.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

\* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81885944, E-mail: oralwu@163.com; Tel: 021-81873221, E-mail: wang\_dento@163.com

生物中非编码的 19 到 24 个核苷酸长度的 RNA, 在翻译水平调控基因的表达<sup>[3]</sup>。miRNAs 在个体发育、病毒感染及肿瘤的发病机制中均具有重要作用<sup>[4-5]</sup>。研究表明, miRNAs 在肿瘤的发病机制中扮演了重要角色, 大量的 miRNAs 起着促癌或抑癌作用<sup>[6]</sup>。

目前, 已有多个 miRNAs 被证明在 HNSCC 的发生、发展中起着重要作用。如 miR-99a 在 HNSCC 中呈低表达, 而过表达 miR-99a 则能抑制细胞增殖和诱导凋亡<sup>[7]</sup>; miR-375 的表达下调与 HNSCC 的不良预后有相关性<sup>[8]</sup>; miR-133a 则参与了 HNSCC 的侵袭和迁移等<sup>[9]</sup>。

miR-141 在胰腺癌、卵巢癌和胃癌中能抑制肿瘤的生长和迁移<sup>[10-12]</sup>, 但 miR-141 在 HNSCC 的作用目前却未见报道。本研究希望通过上调或抑制 miR-141 的表达水平来探究其在 HNSCC 发病机制中的作用, 以期为抗肿瘤药物的研发提供可能的靶点。

## 1 材料和方法

**1.1 标本收集** 2010 年 1 月至 2013 年 12 月于第二军医大学长征医院手术切除并经病理确诊的 HNSCC 19 例, 其中喉癌 11 例、口腔鳞状细胞癌 8 例; 男性 15 例、女性 4 例, 平均年龄 (42±8) 岁; 所有患者术前均未接受放化疗。每例均取癌及癌旁正常组织 (距癌组织边缘 > 2 cm, 病理证实无癌细胞) 各 1 块 (约 1.0 cm×0.5 cm), -80℃ 保存。本研究经第二军医大学长征医院伦理委员会审批通过并备案, 所有患者均签署知情同意书。

**1.2 细胞培养** HEK293、人喉癌细胞株 (Hep-2) 和人舌鳞状细胞癌细胞株 (SCC-9) 均购自中国科学院上海细胞库。细胞株置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养, 并加入 2 mmol/L 左旋谷酰胺以及 100 μg/mL 青霉素 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。具体培养方法参照 Wu 等<sup>[13-14]</sup> 的方法。

**1.3 荧光实时定量 PCR 检测 miR-141 的表达** miR-141 的表达使用 mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit (Ambion, 美国), 该引物由上海生物工程技术服务有限公司设计并验证。miR-141 正义链: 5'-CGC CAG GAT AAA TTG ACG CAC CAT CTT TAC-3'; 反义链: 5'-CCG CCT TAA CAC TGT CTG GTA ATC GCC AGG ATA AAT TGA CGC A-3'; 阴性对照正义链: 5'-UUC UCC GAA

CGU GUC ACG UTT-3'; 反义链: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'; 内参 miR-U6: 5'-AUA UGG AAC GCU UCA CGA AUU-3'。在定量过程中以同一例患者的癌旁正常组织作为对照, 并计算癌组织标本 miR-141 的相对表达水平。

**1.4 MTT 检测 Hep-2 和 SCC-9 细胞增殖** 细胞以 5×10<sup>3</sup> 个/孔的密度接种于 96 孔板, 经 5 d 培养后, 用 MTT 法检测细胞增殖情况, 光密度 (D) 值均由酶标仪读出。

**1.5 miRNA mimics、miRNA 反义寡核苷酸 (ASO) 转染** miR-141 mimics 以及 miR-141 ASO 购于 GenePharma (中国), miRNAs mimics、miRNA ASO 以及阴性对照使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 加拿大) 进行转染, 转染后 48 h 的细胞用于实验<sup>[15]</sup>。

**1.6 生物信息学方法预测 miR-141 的靶基因** 采用 TargetScanHuman ([http://www.targetscan.org/vert\\_61/](http://www.targetscan.org/vert_61/)) 预测 miR-141 的靶基因。

**1.7 统计学处理** 统计分析使用 SPSS 17.0 软件。数据以  $\bar{x} \pm s$  形式表示, 当两组的平均值比较时使用双尾 Student's *t* 检验, 配对标本中 miR-141 水平的比较用秩和检验。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

**2.1 HNSCC 组织和细胞中 miR-141 的表达水平** 通过 qRT-PCR 分析 19 例 HNSCC 组织标本 miR-141 的表达水平, 结果显示, 19 例 HNSCC 肿瘤组织中的 miR-141 水平均低于相应的癌旁正常组织 (图 1A)。统计结果表明: 19 例 HNSCC 组织标本中 miR-141 的平均值低于癌旁正常组织中的 miR-141 的平均值, HNSCC 组织中的 miR-141 的平均表达量约为正常组织中的 37.4% (图 1B,  $P < 0.05$ )。相对于 HEK293 细胞, miR-141 在 Hep-2 和 SCC-9 细胞中均呈低水平表达 (图 1C,  $P < 0.05$ )。

**2.2 上调 miR-141 的表达能够抑制 Hep-2 和 SCC-9 细胞的增殖** 用 miR-141 mimics 转染 Hep-2 和 SCC-9 细胞 48 h 后, Hep-2 和 SCC-9 细胞中 miR-141 的表达水平上调 (图 2A、2B)。MTT 检测细胞增殖实验结果显示, 上调 miR-141 表达 3 d 时能抑制 Hep-2 和 SCC-9 的细胞增殖 ( $P < 0.05$ , 图 2C、2D)。

**2.3 抑制 miR-141 的表达可以促进 Hep-2 和 SCC-9 细胞的增殖** 通过转染 miR-141 ASO 抑制 miR-141 的表达, 结果表明转染 miR-141 ASO 48 h 后,

在 Hep-2 和 SCC-9 细胞中, miR-141 的表达水平下调(图 3A、3B)。MTT 检测细胞增殖实验结果表

明, 抑制 miR-141 的表达 3 d 能促进 Hep-2 和 SCC-9 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ , 图 3C、3D)。

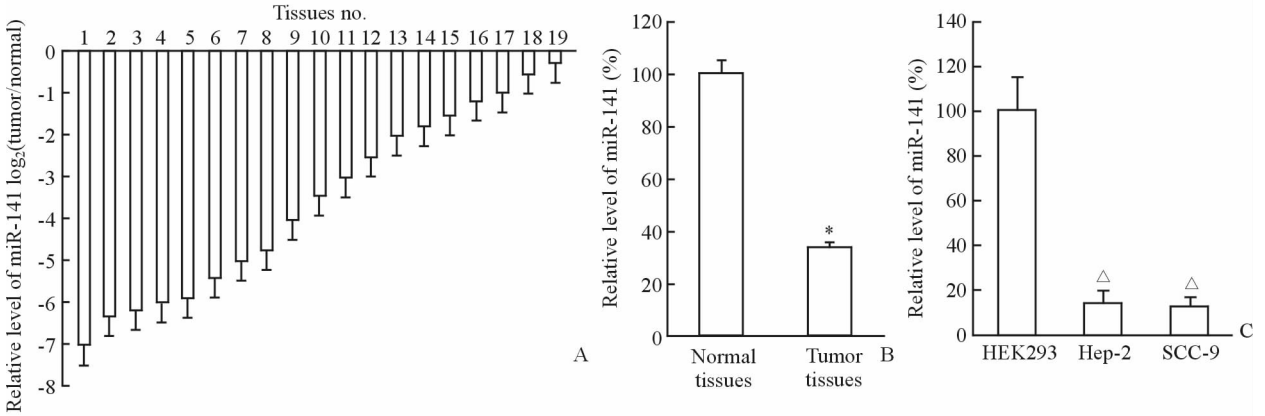


图 1 miR-141 在头颈鳞状细胞癌(HNSCC)组织和细胞中的表达水平

Fig 1 Expression of miR-141 in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) tissues and cells

A: The relative expression of miR-141 in 19 HNSCC tissues and the matched tumor-adjacent normal tissues; B: The mean level of miR-141 in HNSCC tissues and the matched tumor-adjacent normal tissues; C: The miR-141 expressions in Hep-2, SCC-9 and HEK293 cells were assayed by qRT-PCR analysis. \*  $P < 0.05$  vs normal tissues;  $\Delta P < 0.05$  vs HEK293 cells group.  $n = 3$  in A,  $n = 19$  in B,  $n = 3$  in C;  $\bar{x} \pm s$

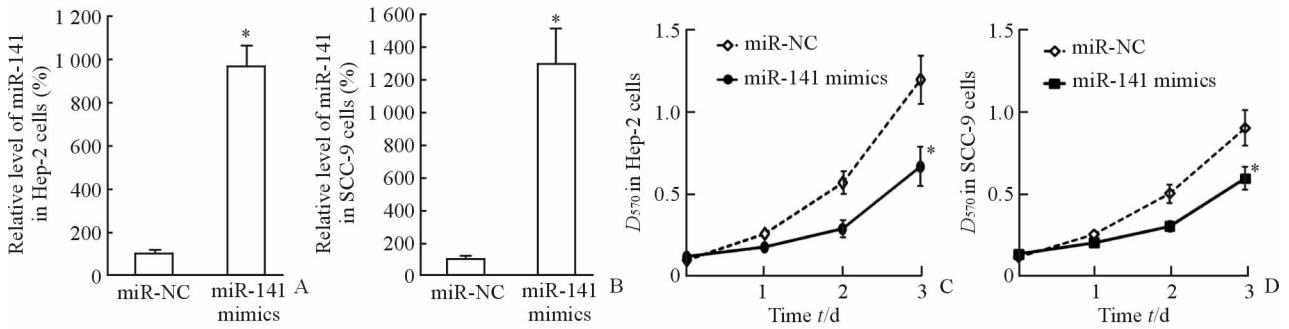


图 2 转染 miR-141 mimics 后促进 Hep-2 和 SCC-9 细胞中 miR-141 表达及抑制 Hep-2 和 SCC-9 细胞增殖

Fig 2 Transfection of miR-141 mimics enhanced the miR-141 expression in Hep-2 and SCC-9 cells and inhibited the proliferation of Hep-2 and SCC-9 cells

A, B: 48 h after miR-141 mimics transfection, the miR-141 expressions in Hep-2 and SCC-9 cells were assayed by qRT-PCR analysis; C, D: The cell proliferation was assayed by MTT analysis at the indicated time points. miR-NC: Negative control miRNA. \*  $P < 0.05$  vs miR-NC group.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

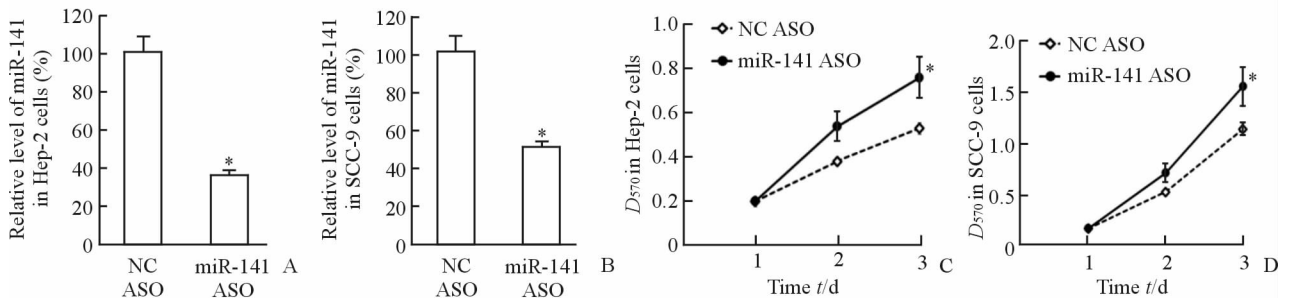


图 3 转染 miR-141 ASO 后抑制 Hep-2 和 SCC-9 细胞中 miR-141 表达及促进 Hep-2 和 SCC-9 细胞增殖

Fig 3 Transfection of miR-141 ASO down-regulated the miR-141 expressions in Hep-2 and SCC-9 cells and promoted the proliferation of Hep-2 and SCC-9 cells

A, B: 48 h after miR-141 ASO transfection, the miR-141 expressions in Hep-2 and SCC-9 cells were assayed by qRT-PCR analysis, the miR-141 expression in normal tissue was arbitrarily defined as 100%; C, D: The cell proliferation was assayed by MTT analysis at the indicated time points. ASO: Antisense oligonucleotide; NC ASO: Negative control miRNA ASO. \*  $P < 0.05$  vs NC ASO group.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2. 4 Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (*ZEB1*) 基因可能是 miR-141 的靶基因 通过生物信息学算法发现, miR-141 能够与 *ZEB1* 3' UTR 的

3 个位点结合(图 4)。据此, 我们推测 miR-141 可能通过 *ZEB1* 抑制 HNSCC 的生长。

Position 782-788 of <i>ZEB1</i> 3' UTR	5' ...CAAAAUCAUCAGAAUCAGUGUUU...
hsa-miR-141	3' GGUAGAAAUGGUCUGUCACAAU
Position 1533-1540 of <i>ZEB1</i> 3' UTR	5' ...UGAGAUUUGAUUU AACAGUGUUA...
hsa-miR-141	3' GGUAGAAAUGGUCUGUCACAAU
Position 1773-1779 of <i>ZEB1</i> 3' UTR	5' ...AUUAACUUCUAUAAACAGUGUUG...
hsa-miR-141	3' GGUAGAAAUGGUCUGUCACAAU

图 4 *ZEB1* 基因与 miR-141 的 3 个结合位点

Fig 4 Putative targeted genes of miR-141 were predicted by Target Scan Human and the three binding sites

### 3 讨论

肿瘤是一类复杂的基因突变疾病。在肿瘤中, 由于主要信号通路的缺失或改变, 失控的细胞失去自然有序的稳态。绝大多数的 HNSCC 发生于口腔、口咽、喉咽以及喉部。尽管目前在手术、放化疗方面取得了进展, 但 HNSCC 晚期患者的 5 年生存率只有 50%~60%<sup>[1]</sup>。目前, 已有越来越多证据表明 miRNAs 在多种人类肿瘤细胞中异常表达, 并且参与肿瘤细胞的增殖、分化及凋亡等, 其在人类肿瘤中的基因突变、缺失或异常表达已成为研究的热点之一<sup>[6-9]</sup>。

近期的研究发现 miR-141 在多种肿瘤的发生、发展中起到重要作用, 如 miR-141 在胰腺癌中通过 MAP4K4 抑制细胞增殖和侵袭<sup>[16]</sup>; miR-141 可作为判断卵巢癌预后的重要指标<sup>[17]</sup>; miR-141 能抑制胃癌的生长和迁移<sup>[18]</sup>。但 miR-141 在 HNSCC 发生、发展中的作用一直未见报道。本研究表明, HNSCC 组织的 miR-141 表达水平低于癌旁正常组织; 上调 miR-141 的表达能够抑制 Hep-2 和 SCC-9 细胞的增殖, 而抑制 miR-141 的表达可以促进 Hep-2 和 SCC-9 细胞的增殖。

通过生物信息学算法发现, miR-141 能够与 *ZEB1* 3' UTR 的 3 个位点结合。而有研究表明, *ZEB1* 基因能促进肿瘤发生发展<sup>[19]</sup>。因此, 我们认为 miR-141 可能通过 *ZEB1* 基因, 抑制 HNSCC 的生长。要证实这一点, 我们计划在下一步的研究中, 首先分析 *ZEB1* mRNA 或蛋白在 HNSCC 的表达水平, 并考察 *ZEB1* 的表达水平与 miR-141 的表达水

平是否具有相关性, 然后通过双荧光报告基因的方法证实 miR-141 是否能靶向抑制 *ZEB1*。

此外, 生物信息学算法还显示, 除了 *ZEB1* 还有其他基因, 如 *TGF-β2*、*cyclin D2* 等。TGF-β2<sup>[20]</sup> 和 *cyclin D2*<sup>[21]</sup> 在肿瘤的发生、发展过程中发挥了重要作用。但是 TGF-β2 和 *cyclin D2* 在 HNSCC 中的作用还不清楚。我们计划在下一步的研究中, 首先分析 TGF-β2 和 *cyclin D2* mRNA 或蛋白在 HNSCC 的表达水平, 并试图寻找 TGF-β2 和 *cyclin D2* 的表达水平与 miR-141 的表达水平是否具有相关性, 然后通过双荧光报告基因的方法证实 miR-141 是否能靶向抑制 TGF-β2 和 *cyclin D2*。

在本次研究中, 我们仅证明了 miR-141 在 HNSCC 中能够抑制细胞增殖, miR-141 是否还参与细胞凋亡及调控细胞周期仍需要进一步证明。

### [参考文献]

- [1] Pignon J P, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy on head and neck cancer[J]. *Lancet*, 2000, 355: 949-955.
- [2] Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1018.
- [3] Kim V N, Han J, Siomi M C. Biogenesis of small RNAs in animals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 126-139.
- [4] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and

- regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136: 215-233.
- [5] Valencia-Sanchez M A, Liu J, Hannon G J, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs[J]. *Genes Dev*, 2006, 20: 515-524.
- [6] Iorio M V, Croce C M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 5848-5856.
- [7] Yan B, Fu Q, Lai L, Tao X, Fei Y, Shen J, et al. Downregulation of microRNA 99a in oral squamous cell carcinomas contributes to the growth and survival of oral cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6: 675-681.
- [8] Harris T, Jimenez L, Kawachi N, Fan J B, Chen J, Belbin T, et al. Low-level expression of miR-375 correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180: 917-928.
- [9] Kinoshita T, Nohata N, Fuse M, Hanazawa T, Kikkawa N, Fujimura L, et al. Tumor suppressive microRNA-133a regulates novel targets; moesin contributes to cancer cell proliferation and invasion in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418: 378-383.
- [10] Zhu Z M, Xu Y F, Su Q J, Du J D, Tan X L, Tu Y L, et al. Prognostic significance of microRNA-141 expression and its tumor suppressor function in human pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 388: 39-49.
- [11] Mateescu B, Batista L, Cardon M, Gruosso T, de Feraudy, Mariani O, et al. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response [J]. *Nat Med*, 2011, 17: 1627-1635.
- [12] Zhou X, Xia Y, Su J, Zhang G. Down-regulation of miR-141 induced by *Helicobacter pylori* promotes the invasion of gastric cancer by targeting STAT4[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33:1003-1012.
- [13] Wu N, Liu C, Bai C, Han Y P, Cho W C, Li Q. Over-expression of deubiquitinating enzyme USP 14 in lung adenocarcinoma promotes proliferation through the accumulation of  $\beta$ -catenin [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 10749-10760.
- [14] Wu N, Zhang C, Bai C, Han Y P, Cho W C, Li Q. MiR-4782-3p inhibited non-small cell lung cancer growth via USP14[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33: 457-467.
- [15] Song B, Zhang C, Li G, Jin G, Liu C. MiR-940 inhibited pancreatic ductal adenocarcinoma growth by targeting MyD88[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35: 1167-1177.
- [16] Zhao G, Wang B, Liu Y, Zhang J G, Deng S C, Qin Q, et al. MiRNA-141, downregulated in pancreatic cancer, inhibits cell proliferation and invasion by directly targeting MAP4K4 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12: 2569-2580.
- [17] Gao Y C, Wu J. MicroRNA-200c and microRNA-141 as potential diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36: 4843-4850.
- [18] Zuo Q F, Zhang R, Li B S, Zhao Y L, Zhuang Y, Yu T, et al. MicroRNA-141 inhibits tumor growth and metastasis in gastric cancer by directly targeting transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1623.
- [19] Wellner U, Schubert J, Burk U C, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 1487-1495.
- [20] Bragado P, Estrada Y, Parikh F, Krause S, Capobianco C, Farina H G, et al. TGF- $\beta$ 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- $\beta$ -RIII and p38 $\alpha$ / $\beta$  signalling [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 1351-1361.
- [21] Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, et al. The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells [J]. *Oncogene*, 2013, 32: 3840-3845.