

miR-133b对喉癌细胞增殖、凋亡、侵袭的影响及机制研究

郭有新¹ 陈宝刚¹ 刘建伟² 李立² 张红³ 马志红¹

摘要 目的 探究 miR-133b 通过 GSTP1 对喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡、侵袭行为的影响及机制。方法 基于基因表达综合数据库(GEO)获取喉癌组织 miRNA 芯片高通量数据集 GSE47610,采用 QOE 3.2 软件进行生物信息学分析,获得差异表达 miRNA。通过实时定量 PCR 技术检测 46 例喉癌组织 miR-133b 相对表达量并分析其临床特征关系,转染 hsa-miR-133b 至 Hep-2 细胞并通过荧光显微镜检测转染效率。针对过表达 miR-133b 组及 NC 组 Hep-2 细胞,MTT 法检测细胞增殖,流式检测细胞周期及凋亡,Tanswell 法检测细胞侵袭,生物信息学预测并通过双荧光素酶载体法验证 miR-133b 靶基因并通过 Western blot 检测靶基因 GSTP1 蛋白表达。结果 获得 5 个喉癌表达上调 miRNA 8 个喉癌表达下调 miRNAs,选择 miR-133b 进行功能研究。喉癌中 miR-133b 表达显著下调约 4.1 倍,且 miR-133b 的表达水平与肿瘤局部浸润深度、是否存在区域淋巴结转移、患者临床分期以及组织学分级呈负相关。转染 hsa-miR-133b mimic 至喉癌 Hep-2 细胞,转染效率超过 80%,实现细胞水平过表达 miR-133b。过表达 miR-133b 可以显著抑制喉癌细胞的增殖、影响喉癌细胞周期、促进喉癌细胞凋亡以及抑制喉癌细胞迁移。miR-133b 与 GSTP1 存在靶向调控关系,过表达 miR-133b 可以明显下调 GSTP1 蛋白表达量。结论 miR-133b 通过 GSTP1 调控喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡、侵袭行为且具有一定的临床意义,为将来基于 miR-133b 进行喉癌临床诊断、预后判断及分子靶向治疗提供新的思路和理论依据。

关键词 miR-133b; GSTP1; 喉癌 Hep-2 细胞; 增殖; 凋亡; 侵袭

中图分类号 R 739.65

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2019)01 - 0090 - 07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2019.01.018

喉癌(laryngeal carcinoma, LC)作为常见的头颈部恶性肿瘤,其主要病理类型为鳞状细胞癌,目前认为其发病与吸烟、饮酒、环境因素、放射线、病毒感染

及微量元素的缺乏相关^[1-2]。根据我国 2015 年全国肿瘤登记中心(NCCR)最新公布的中国癌症统计数据显示:2015 年新发恶性肿瘤约 429 万例,死亡人数约 281 万;其中喉癌新发病例约 2.64 万,死亡人数约 1.45 万例^[3],严重威胁人类的生命与健康。miRNA 作为一类高度保守的非编码单链小 RNA,已证实其通过转录后调控参与影响几乎所有的生理、病理进程,在多个物种中发挥重要作用^[4-5]。不少 miRNA 被发现在喉癌发生过程中发挥着促进或者抑制的调节功能^[6-7],但大部分 miRNA 在喉癌转移过程中的调控机制目前尚不明确。该研究探讨 miR-133b 对喉癌细胞增殖、凋亡、侵袭的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 总 RNA 抽提试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; hsa-miR-133b mimics/NC、转染试剂 riboFECTTM CP Reagent、hsa-miR-133b real-time PCR 引物购自广州市锐博生物科技有限公司; 逆转录试剂盒 Reverse Transcription System、SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒、mRNA SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂购自日本 TaKaRa 公司; Propidium Iodide/碘化丙啶、RNase A、MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 喉癌 Hep-2 细胞购自北京协和基础研究所细胞中心。

1.2 方法

1.2.1 胃癌差异表达 miRNA 筛选 本研究基于 GEO 数据库下载并获取喉癌组织 miRNA 芯片高通量数据集 GSE47610(GSM1153144-GSM1153148),其中包括 3 例喉癌组织样本与 2 例正常喉组织。本研究主要采用的生物信息学分析工具为 Qluore Omics Explorer (QOE) 3.2,由瑞典隆德大学研制,一种新型的生物信息学分析软件,可用于分析基因芯片、基因表达、实时 PCR 以及 DNA 甲基化等多种生物学数据。

1.2.2 实时定量 PCR 检测喉癌组织 miR-133b 表达量 选取河北省承德市医学院第二附属医院

2018 - 09 - 12 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81502493)

作者单位: 河北省承德市医学院第二附属医院¹ 耳鼻喉科、² 心胸外科,承德 067000

³ 首都医科大学附属北京同仁医院,北京 100069

作者简介: 郭有新,男,主治医师,硕士研究生;

马志红,女,博士,主任医师,责任作者, E-mail: mazhihong_lc@sina.com

2015年6月~2017年6月收治的46例喉癌患者为研究对象,手术切除的喉癌组织标本为喉癌组,远离肿瘤的正常喉组织标本为对照组。TRIzol法提取组织总RNA,取10 μ l RNA进行逆转录,采用U6作为内参进行相对定量分析,定量反应体系按照12.5 μ l SYBR Premix Ex Taq, 1 μ l PCR Forward Primer, 1 μ l Uni-miR qPCR Primer, 2 μ l cDNA模板, 8.5 μ l ddH₂O, 总体积为25 μ l,每个样品设置3个平行孔。扩增程序为:预变性95 $^{\circ}$ C、30 s; 95 $^{\circ}$ C、5 s 60 $^{\circ}$ C、20 s 40个循环;采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-133b的相对表达量。

1.2.3 转染 hsa-miR-133b 至 Hep-2 细胞及转染效率检测 培养并接种 1×10^5 个 Hep-2 细胞至含有适量完全培养基的24孔培养板中,使转染时的细胞密度达到30%~50%。用30 μ l $1 \times$ riboFECTTM CP Buffer 稀释1.25 μ l 20 μ mol/L hsa-miR-133b mimic,轻轻混匀。加入3 μ l riboFECTTM 转染试剂,轻轻吹打混匀,室温孵育15 min。将培养板置于37 $^{\circ}$ C的CO₂培养箱中培养24 h。荧光显微镜检测转染效率。其中转染 hsa-miR-133b NC 设为对照组。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖 将过表达 miR-133b 组及 NC 组 Hep-2 细胞稳定培养后传代于96孔板,完全培养基培养,分别于24、36、48、72 h进行MTT检测。每组4个重复。96孔板每孔加入20 μ l MTT (5 mg/ml PBS 溶解),孵育4 h然后弃除上清液。每孔里面再加入150 μ l Formazan 溶解液,振荡10 min,充分溶解结晶物。酶标仪(490 nm)测定光吸收值。

1.2.5 流式检测细胞周期 将过表达 miR-133b 组及 NC 组 Hep-2 细胞稳定培养后传代,完全培养基培养至24 h,用胰酶消化收集细胞,加入1 ml 75% 预冷乙醇中,吹打均匀,4 $^{\circ}$ C固定12 h以上,再加入PBS洗涤,离心1 000 r/min 5 min,清洗两次。重悬细胞用0.5 ml PBS,每孔加入PI和RNaseA至终浓度50 μ g/ml,37 $^{\circ}$ C温浴30 min。流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.6 流式检测细胞凋亡 悬浮两组细胞离心(2 000 r/min离心5 min)收集,贴壁细胞用不含EDTA的胰酶消化收集,用PBS洗涤细胞两次(2 000 r/min离心5 min)收集 5×10^5 细胞,加入500 μ l的缓冲液悬浮细胞,加入5 μ l Annexin V-EGFP混匀后,加入5 μ l 碘化丙啶,混匀,室温避光反应15 min,用流式细胞仪进行检测。

1.2.7 细胞侵袭实验 将冻存于-80 $^{\circ}$ C冰箱的

BD matrigel 4 $^{\circ}$ C过夜(24 h),变成液态,取300 μ l无血清培养基,加入60 μ l Matrigel,混匀,加入上室各100 μ l,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中,孵育4~5 h,此间经常观察,当出现“白色层”时,说明已经变为固态。用无血清培养基洗Matrigel 1次,每孔加入100 μ l两组细胞悬液,下腔室中加入500 μ l含有20% FBS条件培养基,37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育24 h,取出Transwell用PBS洗2遍,5%戊二醛固定(4 $^{\circ}$ C),加入结晶紫(0.1%)染色10 min,室温0.5 h, PBS洗2次,用棉球擦去上表面细胞,显微镜下观察。

1.2.8 双荧光素酶载体法验证 miR-133b 靶基因 通过双荧光素酶报告基因检测系统,分别构建带有野生型和突变型 GSTP1-3' UTR 的报告载体 pLUC; 将 hsa-miR-133b mimic、NC 分别与 pLUC-GSTP1-Mut、pLUC-GSTP1-WT 共转染到293T细胞中,测定萤火虫荧光素酶相对活性。

1.2.9 Western blot 检测 GSTP1 蛋白 将过表达 miR-133b 组及 NC 组 Hep-2 细胞稳定培养后传代,完全培养基培养至24 h,提取两组细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,沸水变性,配制10%的分离胶及5%的浓缩胶,SDS-PAGE电泳;转膜后,加入用封闭液稀释的相应一抗,室温摇床孵育2 h,并用TBS洗膜3次,每次15 min;再加入用封闭液稀释的相应二抗,室温摇床孵育1 h,并用TBS洗膜3次,每次15 min;ECL显色检测。

1.3 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行数据分析,miR-133b在喉癌组织和正常组织中差异表达比较,过表达组 miR-133b 表达组和 NC 组 miR-133b 表达量的比较,过表达 miR-133b 组和 NC 组细胞侵袭数目的比较,过表达 miR-133b 组和 NC 组靶基因 GSTP1 的比较,均进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料之间的比较采用 *t* 检验;多组资料之间的比较采用单因素方差分析;方差不齐采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 喉癌表达 miRNAs 的筛选 基于 GEO 获取的喉癌组织 miRNA 芯片高通量数据,根据设定的数值过滤标准和中位值标准化处理,对表达差异 miRNAs 进行分层聚类分析,获得5个表达上调 miRNA,8个表达下调 miRNA,见图1。通过数据分析及前期实验室研究成果,选择 miR-133b 进行功能研究。

2.2 miR-133b 在喉癌中差异表达及临床特征关系

采用 Real-time PCR 法检测 miR-133b 在 23 例喉癌组织和对应 23 例癌旁正常喉黏膜组织的表达, 结果表明喉癌组织标本中 miR-133b 表达显著下调约 4.1 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.0001$), 见图 2。此外, 针对 23 例喉癌组织临床特征分析, 表明 miR-133b 的表达水平与肿瘤局部浸润深度、是否存在区域淋巴结转移、患者临床分期以及组织学分级呈负相关, 不同期别之间的差异有统计学意义, 见表 1。以上结果提示 miR-133 在喉癌的发生发展中可能具有关键的生物学作用。

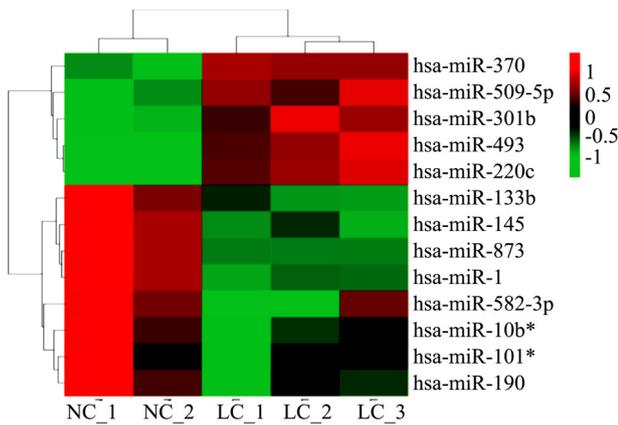


图1 喉癌表达 miRNAs 的筛选

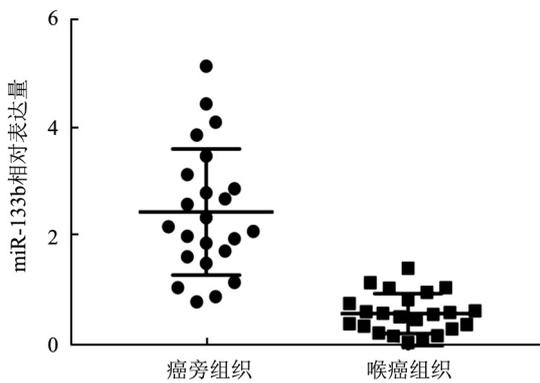


图2 hsa-miR-133b 在喉癌组织中差异表达

2.3 过表达 miR-133b 抑制喉癌细胞的增殖

采用带有 Cy3 荧光蛋白的 hsa-miR-133b mimic 转染喉癌 Hep-2 细胞 24 h 后, 荧光显微镜观察大致转染效率超过 80%, 见图 3A。同时, Real-time PCR 法检测 miR-133b 表达情况, 结果表明相对于对照组, 转染组 miR-133b 表达升高至 30 倍 ($P < 0.0001$), 见图 3B, 表明转染成功。MTT 法检测过表达 miR-133b 喉癌 Hep-2 细胞增殖情况, 结果显示随着培养时间

增加至 72 h, miR-133b 表现出显著性抑制喉癌增殖效果, 尤其在 48 h 和 72 h, 抑制率达到 $(29.32 \pm 2.04)\%$ 和 $(34.81 \pm 2.76)\%$, 见图 3C。

表1 miR-133b 表达与喉癌患者临床特征的关系

分组	例数	miR-133b 表达		χ^2 值	P 值
		-	+ ~ ++		
性别					
男	19	13	6	0.068	0.795
女	4	3	1		
年龄(岁)					
≤60	10	7	4	0.023	0.879
>60	13	8	4		
肿瘤部位					
声门上型	9	6	3	0.565	0.754
声门型	12	9	3		
声门下型	2	1	1		
肿瘤局部浸润深度					
T1 + T2	5	2	3	5.497	0.019
T3 + T4	18	16	2		
淋巴结转移					
N0	7	4	3	4.542	0.033
N+	16	15	1		
临床分期					
I ~ II	6	2	4	5.033	0.025
III ~ IV	17	14	3		
组织学分级					
I	11	6	5	4.102	0.043
II ~ III	12	11	1		

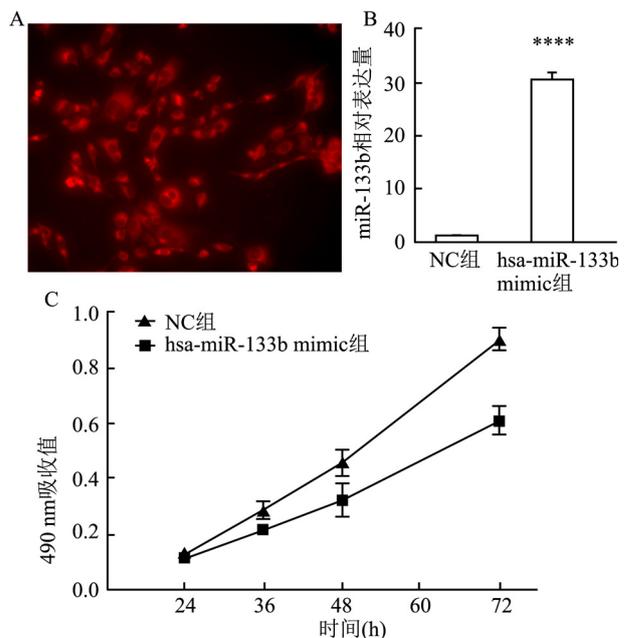


图3 过表达 miR-133b 抑制喉癌细胞的增殖

A: 荧光显微镜观察采用带有 Cy3 荧光蛋白的 hsa-miR-133b mimic 转染效率; B: Real-time PCR 法检测转染 hsa-miR-133b 24 h 后 miR-133b 表达情况; C: MTT 法检测过表达 miR-133b、NC 喉癌 Hep-2 细胞增殖; 与 NC 组比较: **** $P < 0.0001$

2.4 过表达 miR-133b 影响喉癌细胞周期 通过流式技术 PI 单染法检测过表达 miR-133b 组及 NC 组细胞周期,结果显示相对于对照组,miR-133b 过表达组 S 期细胞数量明显增多,说明细胞发生 S 阻滞,DNA 合成受阻,细胞生长停滞,数量减少,见图 4。

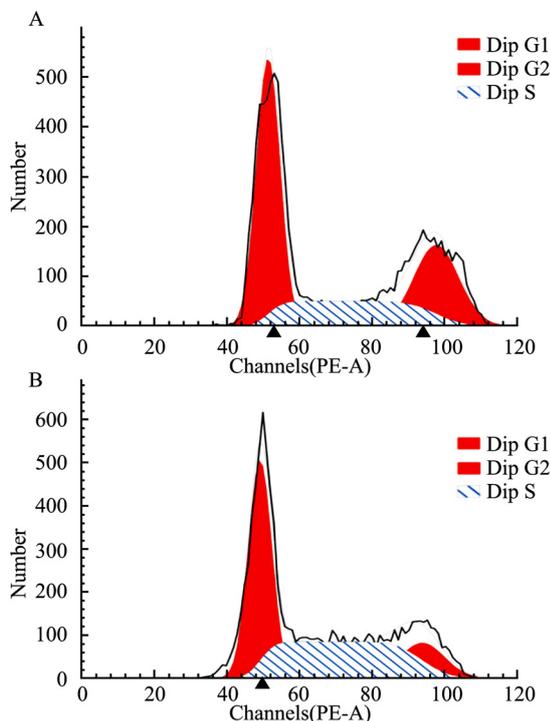


图 4 过表达 miR-133b 影响喉癌细胞周期
A: NC 组; B: hsa-miR-133b mimic 组

2.5 过表达 miR-133b 促进喉癌细胞凋亡 通过流式技术检测过表达 miR-133b 组及 NC 组细胞凋亡,结果显示对照组细胞凋亡率为 (6.82 ± 0.65)%,miR-133b 过表达组凋亡率为 (16.47 ± 1.92)%,表明过表达 miR-133b 促进喉癌 Hep-2 细胞凋亡,差异有统计学意义 ($P = 0.0012$),见图 5。

2.6 过表达 miR-133b 抑制喉癌细胞侵袭 通过 Transwell 小室侵袭实验来检测细胞的侵袭转移能力,结果显示对照组细胞侵袭数目为 (452 ± 36),miR-133b 过表达组细胞侵袭数目为 (116 ± 13),表明过表达 miR-133b 显著抑制喉癌 Hep-2 细胞侵袭,差异有统计学意义 ($P = 0.0001$),见图 6。

2.7 miR-133b 靶基因 GSTP1 的预测与验证使用 TargetScan 数据库对 miR-32 进行靶基因预测,从预测结果中挑选 GSTP1 等候选基因进行实验。通过双荧光素酶报告基因检测系统,分别构建带有野生型和突变型 GSTP1-3' UTR 的报告载体 pLUC;将 hsa-miR-133b mimic 及 NC 分别与 pLUC-GSTP1-Mut、

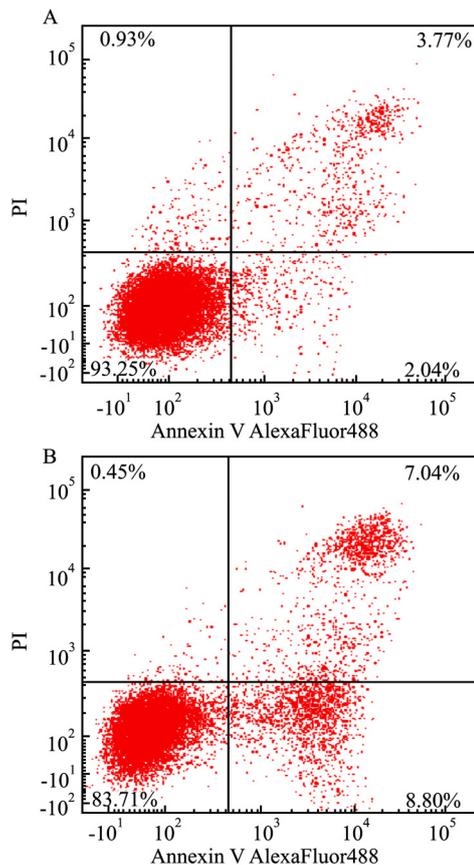


图 5 过表达 miR-133b 促进喉癌细胞凋亡
A: NC 组; B: hsa-miR-133b mimic 组

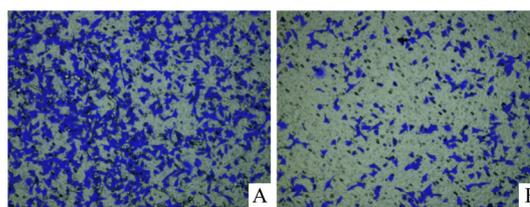


图 6 过表达 miR-133b 抑制喉癌细胞迁移 ×200
A: NC 组; B: hsa-miR-133b mimic 组

pLUC-GSTP1-WT 共转染到 293T 细胞中,通过测定萤火虫荧光素酶相对活性,结果表明 hsa-miR-133b 可以显著降低 pLUC-GSTP1-WT 中 hRluc 表达 ($P = 0.043$),并且针对 pLUC-GSTP1-Mut 没有作用,见图 7。说明 miR-133b 可以通过 GSTP1-3' UTR 结合位点调控 hRluc 的表达,进而表明其存在靶向调控的关系。

2.8 过表达 miR-133b 降低靶基因 GSTP1 表达 Western blot 检测过表达 miR-133b 组及 NC 组 GSTP1 蛋白表达,结果显示过表达 hsa-miR-133b 可以明显下调 GSTP1 蛋白表达量 ($P = 0.013$),见图 8。

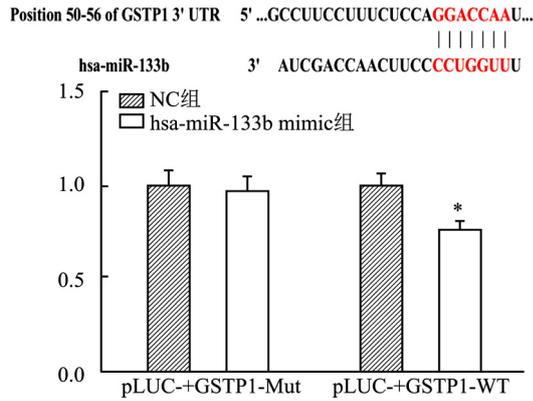


图7 miR-133b 靶基因 GSTP1 的预测与双荧光素酶报告基因验证与 NC 组比较: * P < 0.05

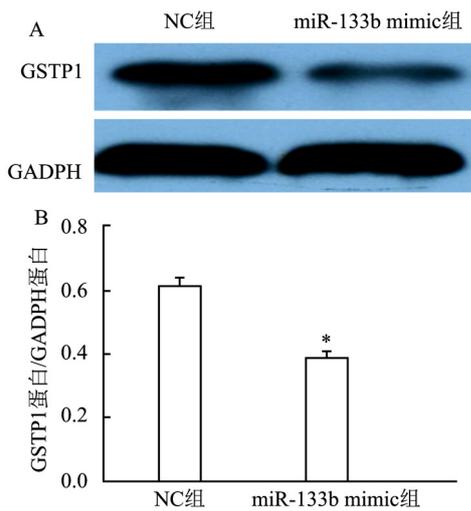


图8 过表达 miR-133b 降低靶基因 GSTP1 表达与 NC 组比较: * P < 0.05

3 讨论

随着以 miRNA 为代表非编码 RNA 在肿瘤领域研究的不断深入,越来越多的喉癌相关 miRNA 被发现深度参与其发生发展治疗过程中。Shen et al^[8] 用亚硫酸氢盐测序技术针对 104 个喉癌组织及对应癌旁组织进行 miR-34a 启动子区域 CpG6 位点 DNA 甲基化水平测序,结果表明喉癌组织中 miR-34a 启动子甲基化程度显著高于对照组,此外,通过 Kaplan-Meier 存活曲线分析表明 miR-34a 启动子高甲基化与总生存率差相关(Log-Rank 检验, P < 0.05)。Liu et al^[9] 研究发现 miRNA-125a 在喉癌组织和喉癌干细胞 Hep-2-CSCs 中低表达,且 miRNA-125a 可以通过靶向调控造血细胞特异性相关 X-1 逆转喉癌干细胞的顺铂抗性,过表达 miRNA-125a 后,发现细胞对多柔比星、依托泊苷、长春新碱的耐药性大大提

升。Zhou et al^[10] 研究表明 miR-632 在喉癌组织和喉癌细胞系中均表现为明显上调表达,且其促进细胞增殖和克隆形成,促进细胞迁移和侵袭,增强细胞增殖相关蛋白、cyclinD1 和 c-myc 表达,且 Pearson 相关分析显示 miR-632 表达与喉癌组织中 GSK3 mRNA 表达呈负相关。这些异常表达 miRNA 发挥喉癌癌基因或抑癌基因作用,有望作为喉癌的早期诊断的新标志物,某些 miRNA 更有可能作为喉癌的新治疗靶点。

本研究前期基于 GEO 获取的喉癌组织 miRNA 芯片高通量数据,分析差异表达 miRNA 并选择 miR-133b 进行功能研究。首先,收集喉癌组织样本,检测表明喉癌中 miR-133b 表达显著下调约 4.1 倍,且 miR-133b 的表达水平与肿瘤局部浸润深度、是否存在区域淋巴结转移、患者临床分期以及组织学分级呈负相关,提示 miR-133b 在喉癌的发生发展中可能具有关键的生物学作用。其次,转染 hsa-miR-133b mimic 转染喉癌 Hep-2 细胞,实现细胞水平过表达 miR-133b。本研究通过细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡、细胞侵袭等实验表明过表达 miR-133b 可以显著抑制喉癌细胞的增殖、影响喉癌细胞周期、促进喉癌细胞凋亡以及抑制喉癌细胞迁移,提示 miR-133b 在喉癌发展中扮演了抑癌基因的角色。最后,考虑到 miRNA 作为一种内源性非编码 RNA,其发挥功能方式主要通过完全或者部分互补结合靶基因 3' 非翻译区影响靶 mRNA 稳定性,甚至降解 mRNA,从而实现转录后水平调节靶基因的表达。通过生物信息学预测,笔者发现 GSTP1 是 miR-133b 潜在靶基因之一,通过双荧光素酶报告基因实验明确其之间确实存在关系,且过表达 hsa-miR-133b 可以明显下调 GSTP1 蛋白表达量,意味着 miR-133b 可能是通过调控 GSTP1 来发挥其在喉癌中的作用。

谷胱甘肽转移酶 PI(glutathione S-transferase pi, GSTP1) 基因定位于染色体的 11q13,该基因全长约 3 kb,包括 6 个内含子和 7 个外显子,编码 210 个氨基酸,属于谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)。GSTs 能催化谷胱甘肽与亲电子物质发生反应,对芳香族化合物具有较高降解性^[11]。诸多研究^[12] 表明 GSTP1 在预防肿瘤发生的过程中起重要作用,但同时也是肿瘤细胞对化疗药物耐受的原因,并与许多耐药相关基因在肿瘤中共表达。在膀胱癌研究中,唐荣金等^[13] 通过慢病毒表达系统,建立稳定低表达 GSTP1 基因的膀胱癌细胞 T24 细胞株,发现 GSTP1 表达下调抑制 T24 细胞增殖,并其机

制可能与促进 T24 细胞凋亡相关。在喉癌研究中, 周建荣^[14]通过建立人喉鳞癌组织及其癌旁正常黏膜组织的双向凝胶电泳图谱, 识别鉴定其差异表达的蛋白质, 结果表明 GSTP1 在喉癌中表达上调, 这与本研究中 miR-133b 在喉癌中表达下调, 且通过靶向结合 GSTP1 发挥作用一致。近年来发现 GSTP1 多态性与肿瘤的易感性关系密切, 有研究通过 meta 分析 GSTP1 基因启动子区甲基化检测在前列腺癌临床诊断中的意义, 发现前列腺癌 GSTP1 基因启动子区相比正常对照组呈现显著高甲基化, 差异有统计学意义 ($OR = 17.98$, $95\% CI: 12.16 \sim 26.58$, $P < 0.0001$), 不同亚组间差异无统计学意义^[15]。Matthias et al^[16]发现 GSTP1 基因型频率在喉癌与对照中的分布情况差异有统计学意义, 该基因多态性可能与喉癌的遗传易感性存在关联。

综上所述, 本研究表明 miR-133b 通过 GSTP1 对喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡、侵袭行为的影响及其对肿瘤局部浸润深度、是否存在区域淋巴结转移、患者临床分期以及组织学分级呈负相关等临床意义, 为将来基于 miR-133b 进行喉癌临床诊断、预后判断及分子靶向治疗提供新的思路和理论依据。

参考文献

- [1] Pantel M, Guntinas-Lichius O. Laryngeal carcinoma: epidemiology, risk factors and survival [J]. *HNO* 2012, 60(1): 32-40.
- [2] Bień S. The epidemiology and classification of laryngeal carcinoma [J]. *Pol Merkur Lekarski* 2005, 19(111): 464-6.
- [3] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin* 2016, 66(2): 115-32.
- [4] Dufresne S, Rébillard A, Muti P, et al. A Review of physical activity and circulating miRNA expression: implications in cancer risk and progression [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018, 27(1): 11-24.
- [5] Tutar Y. miRNA and cancer: computational and experimental ap-

- proaches [J]. *Curr Pharm Biotechnol* 2014, 15(5): 429.
- [6] Huang G J, Luo M S, Chen G P, et al. miRNA-mRNA crosstalk in laryngeal squamous cell carcinoma based on the TCGA database [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2018, 275(3): 751-9.
- [7] Fei Y, Guo P, Wang F, et al. Identification of miRNA-mRNA crosstalk in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 4179-86.
- [8] Shen Z, Zhou C, Li J, et al. Promoter hypermethylation of miR-34a contributes to the risk, progression, metastasis and poor survival of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Gene* 2016, 593(2): 272-6.
- [9] Liu J, Tang Q, Li S, et al. Inhibition of HAX-1 by miR-125a reverses cisplatin resistance in laryngeal cancer stem cells [J]. *Oncotarget* 2016, 7(52): 86446-56.
- [10] Zhou Z X, Zhang Z P, Tao Z Z, et al. MiR-632 promotes laryngeal carcinoma cell proliferation, migration and invasion through negative regulation of GSK3 β [J]. *Oncol Res* 2018, DOI: <https://doi.org/10.3727/096504018X15213142076069>.
- [11] Phuthong S, Settheetham-Ishida W, Natphopsuk S, et al. Genetic polymorphism of the glutathione s-transferase Pi 1 (GSTP1) and susceptibility to cervical cancer in human papilloma virus infected northeastern Thai women [J]. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018, 19(2): 381-5.
- [12] Gurioli G, Martignano F, Salvi S, et al. GSTP1 methylation in cancer: a liquid biopsy biomarker? [J] *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(5): 702-17.
- [13] 唐荣金, 何小龙, 朱海琴, 等. GSTP1 表达下调促进膀胱癌细胞 T24 凋亡 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(10): 1463-7.
- [14] 周建荣. 喉癌的蛋白质组分析及 MRP8 的临床意义 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2007.
- [15] 张雪, 胡婧怡, 张骏. GSTP1 基因甲基化检测在前列腺癌临床诊断中的 Meta 分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(6): 2157-69.
- [16] Matthias C, Bockmühl U, Jahnke V, et al. Effect of gene polymorphism on detoxifying glutathione-S-transferase enzymes on chromosomal stability of squamous epithelial carcinomas in the area of the head-neck [J]. *Laryngorhinotologie*, 1998, 77(4): 201-6.

Effects of miR-133b on proliferation, apoptosis and invasion of laryngeal carcinoma cells and its mechanism

Guo Youxin¹, Chen Baogang¹, Liu Jianwei², et al

(¹Dept of Otolaryngology, ²Dept of Cardiothoracic Surgery, Chengde Central Hospital, Chengde 067000)

Abstract Objective To explore the effects and mechanism on proliferation, apoptosis and invasion behavior of laryngeal carcinoma Hep-2 cells by miR-133b through GSTP1. **Methods** Based on high throughput data set GSE47610 of miRNA chip of laryngeal carcinoma from Gene Expression Omnibus (GEO), differentially expressed miRNAs were obtained by bioinformatics analysis using Qluore Omics Explorer (QOE) 3.2. Real-time quantitative PCR technique was used to detect the relative expression of miR-133b in 46 patients with laryngeal carcinoma. The

两种移植管下 D5、D6 囊胚行冻融移植后妊娠结局的比较

王 喆 邹微微 章志国 纪冬梅 曹云霞

摘要 目的 比较两种胚胎移植管对第 5 日(D5)囊胚及第 6 日(D6)囊胚冷冻后首次冻融周期胚胎移植患者妊娠结局的影响。方法 回顾性分析 1 032 例首次行冻融周期囊胚移植患者的临床资料,依据使用的移植管分成两组,Cook 组采用 COOK-K-JETS-551910-S 移植管(627 个周期),Wallace 组采用 Wallace-1816 移植管(405 个周期),按照移植胚胎的发育天数分为 Cook-D5 组(472 个周期)、Cook-D6 组(155 个周期)、Wallace-D5 组(304 个周期)、Wallace-D6 组(101 个周期),分析比较各组患者的一般情况、获卵数、受精数、2PN 数、囊胚形成率、生化妊娠率、临床妊娠率、胚胎种植率、异位妊娠率、单卵双胎率等。结果 Cook-D5 组与 Wallace-D5 组相比,Cook-D5 组的生化妊娠率、临床妊娠率、胚胎种植率均高于 Wallace-D5 组($P < 0.05$),Cook-D6 组与 Wallace-D6 组相比,两组间的生化妊娠率、临床妊娠率、胚胎种植率差异均

无统计学意义;Cook-D5 组与 Cook-D6 组相比,Wallace-D5 组与 Wallace-D6 组相比,D5 组受精数、2PN 数、囊胚形成率、生化妊娠率、临床妊娠率均高于 D6 组($P < 0.05$)。结论 在同样首次移植 D5 优质冻融囊胚下,Cook 移植管的临床妊娠结局相比 Wallace 移植管更好。在同样首次移植优质冻融囊胚下,D5 囊胚相比 D6 囊胚可获得更好的妊娠结局。

关键词 冻融囊胚移植; 胚胎移植术; 第 5 日囊胚; 第 6 日囊胚; 妊娠结局

中图分类号 R711.6

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2019)01 - 0096 - 06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2019.01.019

在辅助生殖过程中,影响妊娠结局的一个重要步骤是胚胎移植技术。随着囊胚培养以及囊胚玻璃化冻融技术在生殖医学领域中的广泛应用,目前新鲜周期移植取消率增加,全胚胎冷冻后的冻融胚胎移植比例明显增长^[1]。已有研究^[2]表明,全胚胎冷冻可以使卵巢过度刺激综合征高风险、内膜异常、孕激素过高及患有全身性疾病等不适合新鲜移植的患者将胚胎冷冻以后再移植。有研究^[3]表明冻融胚

2018 - 08 - 31 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1608085QH201)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖医学中心,合肥 230022

作者简介: 王 喆,女,硕士研究生;

曹云霞,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: caoyunxia6@126.com

clinical characteristics of miR-133b relative expression were analyzed. hsa-miR-133b was transfected to Hep-2 cells and the transfection efficiency was detected through fluorescence microscopy. For overexpression of miR-133b group and NC group Hep-2 cells, cell proliferation, cell cycle and apoptosis, cell invasion were measured by MTT method, flow cell technology and Tanswell respectively. miR-133b target gene was verified by bioinformatics prediction and luciferase reporter gene experiment, and target gene GSTP1 gene protein expression was detected by Western blot. **Results** 5 up-regulated expression miRNAs and 8 down-regulated expression miRNAs in laryngeal carcinoma were obtained and miR-133b was selected for functional study. miR-133b expression significantly lowered about 4.1 times in laryngeal carcinoma tissue sample, and the expression of miR-133b levels negatively correlated with local tumor infiltration depth, lymph node metastasis, clinical stage and histological grade. Transfected hsa-miR-133b mimic to laryngeal carcinoma Hep-2 cells and the transfection efficiency was over 80%, overexpression miR-133b in Hep-2 cells was achieved. Overexpression of miR-133b can significantly inhibit the laryngeal carcinoma cell proliferation, affect cell cycle, promote cell apoptosis and inhibit cell migration. It was clear that miR-133b targeted with GSTP1, and overexpression of miR-133b can significantly reduce the expression of GSTP1 protein. **Conclusion** miR-133b can regulate laryngeal carcinoma Hep-2 cell proliferation, apoptosis, invasion behavior by targeted GSTP1, and hsa a certain clinical significance, which provide new ideas and theoretical basis of clinical diagnosis, prognosis and molecular targeted therapy of laryngeal carcinoma in the future.

Key words miR-133b; GSTP1; laryngeal cancer Hep-2 cells; proliferation; apoptosis; migration