

FasL 的特异性 miRNA 阻断舌鳞癌细胞免疫逃逸的研究

吴 棣^{1,2}, 徐艳雪^{1,2}, 韩瞳瞳^{1,2}, 陈乔尔^{1,2}, 朱友明^{1,2}

摘要 目的 研究特异性微小 RNA(miR)-590 对舌鳞癌细胞 SCC-3 Fas 配体(FasL) 的表达的影响。方法 将合成的 miR-590 mimics 或 miR-590 抑制剂转染至 SCC-3 细胞。通过 RT-PCR 和 Western blot 法检测 SCC-3 中 FasL 信使 RNA(mRNA) 和蛋白的表达; 将转染后的 SCC-3 细胞在顺铂(DDP) 5 mg/L 处理下, 在不同时间段通过 MTT 法绘制细胞生长曲线, 并通过针对 FasL 的 miR-590 的抑制剂从反面验证 miR-590 的作用。结果 miR-590 可以在 mRNA 和蛋白水平上降低 SCC-3 细胞 FasL 的表达; 转染 miR-590 后 SCC-3 细胞对于 DDP 的耐药性降低。结论 miR-590 可以有效抑制 SCC-3 细胞 FasL 的表达, 降低 SCC-3 的 DDP 的耐药性, 从而可能降低和减少其对免疫活性细胞的凋亡诱导和杀伤作用, 从而阻断肿瘤细胞的免疫逃逸, 为舌鳞癌的生物治疗提供了新的靶点。

关键词 FasL; miR-590; 舌鳞癌细胞

中图分类号 R 739.8; R 730.51

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)08-1115-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.004

口腔鳞状细胞癌是常见的口腔恶性肿瘤之一, 约占口腔癌患者的 45.9%。研究^[1]表明, 口腔癌的发病率在全球范围内呈上升趋势。Fas/FasL 系统是介导细胞凋亡的重要系统, Fas 是肿瘤坏死因子家族成员, 其与天然配体 FasL 特异性结合并传导凋亡信号, 从而成功诱导 Fas 表达阳性的细胞凋亡^[2]。miRNA 分子能够与多个功能不同的靶基因相结合, 通过对不同基因的调控从而发挥其调节功能^[3]。该研究显示 miR-590 可以有效抑制 SCC-3 细胞 FasL 的表达, 降低 SCC-3 的顺铂(cisplatin, DDP) 的耐药性, 从而可能降低和减少其对免疫活性细胞的凋亡诱导和杀伤作用, 从而阻断肿瘤细胞的免疫逃逸, 为舌鳞癌的生物治疗提供了新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料 SCC3 细胞由本实验室保存并提供; DMEM 培养基、改良型 RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶、10% 胎牛血清(美国 Hyclone 公司); PBS(北京百奥莱博科技有限公司); 质粒 control 乱序 RNA(scrambled RNA)、miR-590 mimics 和 miR-590 抑制剂(上海吉玛制药技术有限公司); DMSO、RNA 抽提试剂盒 TRIzol、细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司); 逆转录反应试剂盒、RT-PCR 反应试剂盒(日本 TaKaRa 公司); 蛋白浓度测定试剂盒、二氧化碳孵箱(美国 Thermo 公司); MTT(美国 Sigma 公司); 高压蒸汽灭菌锅(日本 HIRAYAMA 公司); 数显三用水浴箱、恒温干燥箱(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); 高速常温离心机、微型高速离心机、高速低温离心机、低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); pH 计(上海虹益仪器仪表有限公司); 自动细胞计数分析仪(北京京百卓显科技有限公司); 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); 电冰箱(青岛海尔集团公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SCC-3 细胞 应用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 的条件下进行培养, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 qRT-PCR 检测 FasL mRNA 的表达水平 收取细胞通过 TRIzol 法(日本 TaKaRa 公司) 获取组织总 RNA。取总 RNA 进行逆转录获得 cDNA, -20 °C 保存备用。qRT-PCR 检测 FasL mRNA 的相对表达水平, SBP1 及内参 β -actin 的引物经 GenBank 检索引物序列并设计合成。扩增条件: 94 °C 预变性 1 min, 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环。待反应结束后, 取反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳后紫外灯下观察电泳条带并进行拍照。

1.2.3 Western blot 检测转染后 SCC-3 细胞 FasL 的蛋白质表达水平 收集细胞 RIPA 冰上裂解细胞 30 min, 加入 SDS 蛋白上样缓冲液, 煮沸 15 min, 离心后吸取上清液, 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳得

2017-05-18 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH155)

作者单位: ¹安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

²安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究中心
实验室, 合肥 230032

作者简介: 吴 棣, 女, 硕士研究生;

陈乔尔, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: chq0111@163.com

到的胶电转移至 NC 膜上(350 mA 恒流 1.5 h)。电泳结束后取出 NC 膜,并按照蛋白 Marker,以及所需检测蛋白大小剪出自己所需蛋白膜,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 或者 4 ℃ 过夜。用 TBST 清洗干净膜表面残存的牛奶,加入一抗(TBST 配制),室温孵育 1h 或 4 ℃ 过夜。一抗孵育结束后,TBST 清洗 3 次,每次 5 ~ 10 min。加入相对应的二抗,室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次,每次 5 ~ 10 min。暗房中膜上加入适量的碱性磷酸酶底物加胶片压膜显影,或者加入适量的显色底物直接显影。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖能力 取对数生长期的 SCC-3 细胞,分为对照组、miR-590 mimics 组和 miR-590 抑制剂组,2 000 个/每孔均匀接种于 96 孔板,每孔加入体积 200 μl DMEM 培养基培养,每组设 3 个复孔,待细胞贴壁后,按时间梯度加入药物,加入 20 μl MTT 溶液(终浓度为 5 g/L),37 ℃ 孵育 4 h 后吸走上清液,每孔加入 DMSO 150 μl,震荡 10 min,用酶联免疫检测仪上测定各孔吸收值,绘制细胞生长曲线。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析及 *q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SCC-3 细胞的形态学观察 SCC-3 细胞传代后第 2 天需更换培养液,去除未贴壁的细胞以及部分死细胞。此时可见,细胞散在分布于培养皿底部,细胞呈长梭形生长,且为单细胞核。此后 2 ~ 3 d 换一次液,5 d 左右可见皿底细胞聚集成片,皿底多处成纤维样的集落形成。一般 5 ~ 6 d 细胞生长融合约达皿底的 80% ~ 90% 时,SCC-3 细胞即可传代。传代后的细胞仍具有较高的增殖能力,且传代后细胞活力没有明显下降趋势(图 1)。

2.2 miR-590 mimics/miR-590 抑制剂对 FasL mRNA 表达的影响 将 miR-590 mimics 在脂质体介导下转染至舌鳞癌细胞 SCC-3,并选择表达 scrambled RNA 的 SCC-3 细胞系作为对照组。转染 48 h 后提取细胞总 RNA,用 RT-PCR 检测 miR-590 mimics 组及对照组 SCC-3 细胞中 FasL mRNA 的表达情况。结果表明,与对照组相比,表达 miR-590 mimics 的 SCC-3 细胞中 FasL mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

用 miR-590 抑制剂反向验证 miR-590 的作用,

将 miR-590 抑制剂在脂质体介导下转染至 SCC-3,选择表达 scrambled RNA 的 SCC-3 细胞系作为对照组。用 RT-PCR 检测 miR-590 抑制剂组及对照组 SCC-3 细胞中 FasL mRNA 的表达情况。结果表明,与对照组相比,表达 miR-590 抑制剂的 SCC-3 细胞中 FasL mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$),增强了 FasL 的转录(图 2)。

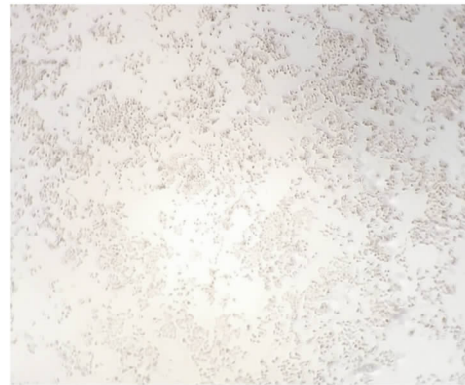


图 1 SCC-3 细胞显微镜下所见 ×40

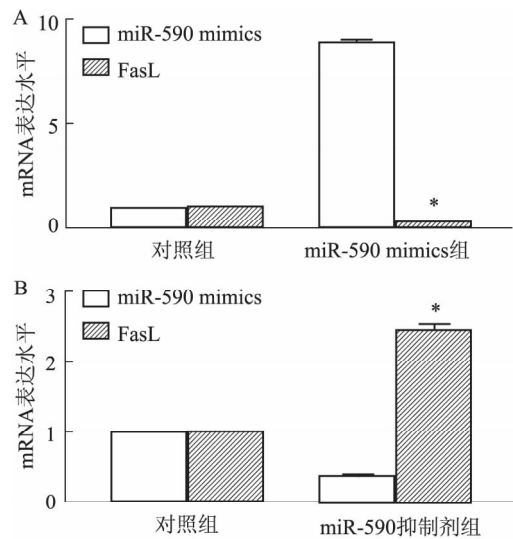


图 2 转染后 3 组 FasL 和 miR-590 的 mRNA 表达情况

A: miR-590 mimics 组和对照组的 mRNA 表达情况; B: miR-590 抑制剂组和对照组的 mRNA 表达情况; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 miR-590 mimics/miR-590 抑制剂对 FasL 蛋白表达水平的影响 利用转染成功 miR-590 mimics 的 SCC-3 细胞系,转染 48 h 后收集蛋白通过 Western blot 检测 FasL 蛋白表达情况。结果表明,与对照组相比,miR-590 mimics 组 FasL 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$)。

同样,加入 miR-590 抑制剂反向验证 miR-590 的作用,利用转染成功 miR-590 抑制剂的 SCC-3 细

胞系,通过 Western blot 检测 FasL 蛋白表达情况。结果表明(图3),与对照组相比,miR-590 抑制剂的表达显著上调了 FasL 蛋白的表达($P < 0.05$)。

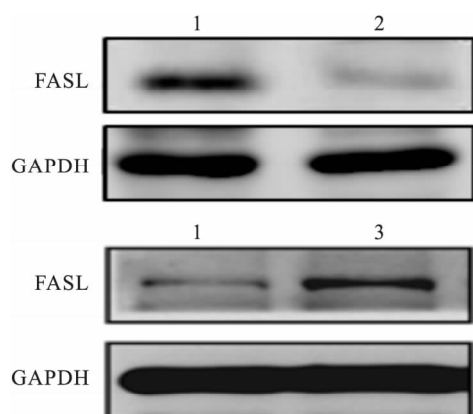


图3 转染后3组 FasL 蛋白表达情况

1: 对照组; 2: miR-590mimics 组; 3: miR-590 抑制剂组

2.4 miR-590 mimics/miR-590 抑制剂转染 SCC-3 后对 DDP 耐药性的影响 将转染成功 miR-590 mimics 的 SCC-3 细胞按时间梯度加入药物 DDP (0、12、24、48 h),分别检测 SCC-3 细胞的相对活性。结果表明,转染 miR-590mimics 组的 SCC-3 细胞的存活率均明显低于对照组($P < 0.05$)。

将转染成功 miR-590 抑制剂的 SCC-3 细胞按时间梯度加入药物 DDP (0、12、24、48 h),分别检测 SCC-3 细胞的相对活性。结果表明,转染 miR-590 抑制剂组的 SCC-3 细胞的存活率较对照组增加($P < 0.05$)。见图4。

3 讨论

肿瘤细胞的生物学特性比较复杂,其可以在各个水平抑制或逃避机体免疫系统的杀伤作用如对自身抗原进行修饰、改变肿瘤微环境等^[2,4-6]。肿瘤的发生、发展与机体的免疫功能息息相关,当肿瘤细胞在机体内出现时,部分可以躲避机体免疫系统的攻击,这一过程又叫肿瘤免疫逃逸^[7]。

最近的研究^[8]表明,肿瘤的成因不仅与细胞增殖有关,和细胞凋亡也密切相关。抵抗凋亡的能力是包括口腔鳞状细胞癌在内的恶性肿瘤的标志之一,其通常由凋亡基因如 Fas、FasL、TNF 等的遗传改变引起^[9-10]。肿瘤细胞存在多种免疫逃逸机制,而 Fas/FasL 系统在肿瘤免疫逃逸中发挥了极其重要的作用。Fas/FasL 系统的主要作用是通过清除过多的活化淋巴细胞以维持免疫系统的内稳定^[11]。但是,

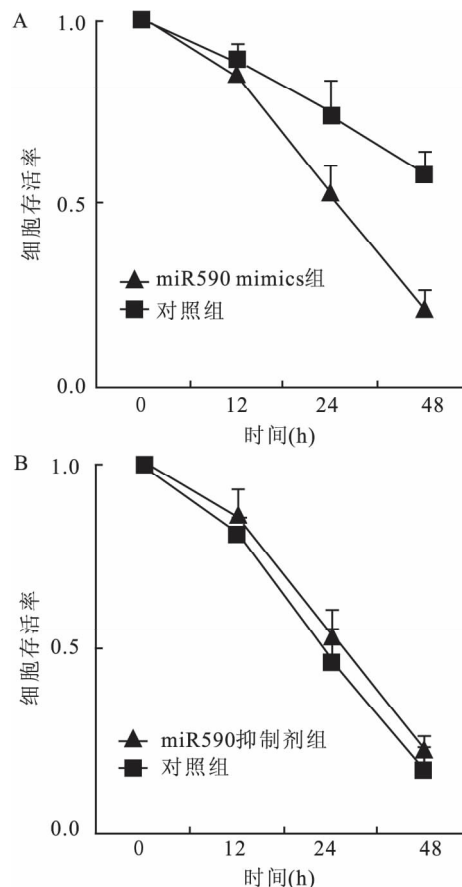


图4 miR-590 mimics/miR-590 抑制剂转染 SCC-3 后细胞存活率的变化

A: 转染 miR-590 mimics 后随时间增加 SCC-3 细胞存活率变化情况; B: 转染 miR-590 抑制剂后随时间增加 SCC-3 细胞存活率的变化情况

在目前的研究^[12]中可显示,肿瘤细胞对 FasL 介导的细胞凋亡产生抵抗,而表达 Fas 的淋巴细胞对 FasL 介导的凋亡很敏感,这有利于肿瘤的发生、发展。当 Fas/FasL 系统表达、功能发生丧失或异常时,导致 Fas 信号系统的破坏或无活性,不能进行正常的凋亡作用,使异常细胞得以逃避机体的免疫监视作用,导致异常细胞的存活和发展,从而促进恶性肿瘤的产生和发展。很多恶性肿瘤中都存在 FasL 表达升高的现象,如结肠癌、胃癌、胰腺癌等。有研究者设计了针对 FasL 的反义寡核苷酸并将其转染人舌鳞癌细胞系 Tca8113,发现反义链组中 Tca8113 的凋亡数量明显更多^[13]。

近年来,人们对 miRNA 作为原癌基因和抑癌基因的关注逐渐增加。miRNA 是一种大小为 20 ~ 25 个核苷酸的内源性非编码小 RNA,能够与多个功能不同的靶基因相结合,通过对不同基因的调控从而发挥其调节功能^[14]。研究^[4]表明,miRNA 与肿瘤

的发生、发展有着重要的关联,并参与了肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移等生物学特性的调控过程,发挥着类似癌基因或抑癌基因的作用。因此,各种各样的 miRNA 可能参与人类所有的生理病理活动,促进了疾病的发生、发展,并可以作为标志物在肿瘤的发展、治疗和预后的预测中起某些作用,在肿瘤的个体化诊疗及耐药干预策略中具有重要的价值^[15]。本研究显示 miR-590 可以有效抑制 SCC-3 细胞 FasL 的表达,降低 SCC-3 的 DDP 的耐药性,从而可能降低和减少其对免疫活性细胞的凋亡诱导和杀伤作用,从而阻断肿瘤细胞的免疫逃逸,为舌鳞癌的生物治疗提供了新的靶点。

Hu et al^[16]通过对脊髓损伤的成年雄性小鼠的微阵列分析可发现,miR-12 的表达下调可以增加体内其靶点 FasL 的表达,并能促进细胞凋亡。MiR-21 通过靶向促凋亡基因 FasL 发挥其抗凋亡作用。

miRNA 在肿瘤的治疗中前景光明,但靶点的寻找、验证及导入仍存在许多问题,且一个 miRNA 调控多个靶基因的表达,因此可能会产生脱靶效应,这也是个亟需解决的问题^[17]。

舌癌是最常见的口腔癌,本实验选择舌癌细胞,利用针对 FasL 的 miR-590 mimics 在脂质体介导下转入舌鳞癌细胞 SCC-3 中。RT-PCR 和 Western blot 检测结果表明,miR-590 转染后 SCC-3 中 FasL 在基因和蛋白水平上的表达显著降低,说明 miR-590 对 FasL 的表达产生了抑制作用。而 miR-590 抑制剂组在敲除了 SCC-3 中特定 miRNA 后,FasL 表达增强,反向证实了 miR-590 的作用。转染 miR-590 mimics 后的 SCC-3 对于 DDP 的敏感性减弱,转染 miR-590mimics 组的 SCC3 细胞的存活率明显低于对照组。同时,在转染 miR-590 抑制剂组的 SCC-3 存活率高于对照组。以上试验证明 miR-590 可以通过下调 FasL 表达增强 SCC-3 的耐药性。由此证实了本研究的假说,用针对 FasL 的特异性 miRNA 处理舌鳞癌细胞,确实可以下调其 FasL 的表达,后期研究中,有助于研究 miR-590 减少 SCC-3 对免疫活性细胞凋亡的诱导,增加免疫效应细胞的生存率,进而阻断舌癌的免疫逃逸减少对免疫活性细胞凋亡,增加了抗肿瘤免疫细胞的生存率,这将会成为攻克舌癌的极有前景的基因疗法,值得深入探究。

参考文献

[1] Wade J, Simth H, Hankins M, et al. Conducting and examinations

for cancer in general practice: what are the barriers [J]. *Fam Pract*, 2010, 27(1): 77-84.

[2] 吴 棣,陈乔尔. 肿瘤免疫逃逸的相关分子及其作用机制研究 [J]. *安徽医药*, 2016, 20(4): 621-5.

[3] Liu G, Ma H, Qiu L, et al. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells in mice [J]. *Immunol Cell Biol*, 2011, 89(1): 130-42.

[4] 潘 桃,刘 杞,孙 航,等. 调节性 T 细胞在肝再生增强因子免疫抑制机制中的作用研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(11): 1194-8.

[5] 阎永贞,那 可,魏晓东,等. 肿瘤免疫逃逸机制的研究进展 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2013, 40(5): 619-24.

[6] 梁 雪,陈祥彬,李广平. 肿瘤免疫逃逸机制研究进展 [J]. *生命的化学*, 2015, 35(4): 504-8.

[7] Yang F, Wei Y, Cai Z, et al. Activated cytotoxic lymphocytes promote tumor progression by increasing the ability of 3LL tumor cells to mediate MDSC chemoattraction via Fas signaling [J]. *Cell Mol Immunol*, 2015, 12(1): 66-76.

[8] 刘贤奎,孔垂泽,王 平,等. 膀胱癌肿瘤血管生成与肿瘤细胞增殖与凋亡的关系 [J]. *中国医科大学学报*, 2004, 33(5): 438-9.

[9] Zhao H, Chen W, Du P, et al. FasL-844T/C and Fas -1377G/A: mutations of pulmonary adenocarcinoma in South China and their clinical significances [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6): 4319-26.

[10] Yu X, Li Y, Yu Y, et al. Associations between FAS rs2234767 and FASLrs763110 polymorphisms and the risk of lung cancer: a meta analysis of 39,736 subjects [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 2049-56.

[11] Lin Y, Liu L, Zhang T, et al. Functional investigation of fas ligand expressions in human non-small cell lung cancer cells and its clinical implications [J]. *Ann Thorac Surg*, 2013, 95(2): 412-8.

[12] 翟 凌,李哲田,汪永胜,等. 绒癌中 Fas/FasL 的表达及其介导的细胞凋亡的意义 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2010, 44(5): 420-3.

[13] 方 丽,陈乔尔,任翠平,等. FasL 反义寡核苷酸对舌鳞癌细胞 Tca8113 增殖和凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(11): 1300-3.

[14] Liu G, Ma H, Qiu L, et al. Phenotypic and functional switch of macrophages induced by regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells in mice [J]. *Immunol Cell Biol*, 2011, 89(1): 130-42.

[15] deLeeuw R J, Kost S E, Kakal J A, et al. The prognostic value of FoxP3⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(11): 3022-9.

[16] Hu J Z, Huang J H, Zeng L, et al. Anti-apoptotic effect of microRNA-21 after contusion spinal cord injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2013, 30(15): 1349-60.

[17] 何昌玉. miRNA 在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. *外科理论与实践*, 2014, 19(4): 365-8.

网络出版时间: 2017-6-16 11:46:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170616.1146.005.html>

全反式维甲酸对人胃腺癌细胞株 SGC-7901 凋亡的影响

魏翔¹, 陈绍龙¹, 贾宁¹, 周青¹, 李静静², 张素梅¹, 汪渊¹

摘要 目的 研究全反式维甲酸(ATRA)对胃腺癌细胞系 SGC-7901 凋亡的影响,并初步探讨其可能的分子机制。方法 ATRA 处理 SGC-7901 细胞, Hoechst 染色检测 ATRA 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响, Western blot 法检测 ATRA 对凋亡相关蛋白表达情况的影响。结果 ATRA 可诱导 SGC-7901 细胞的凋亡,且下调凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达,对促凋亡蛋白 Bax 的表达和酶原形式的 Caspase-3 的表达没有影响。结论 ATRA 促进 SGC-7901 细胞的凋亡,其分子机制可能是下调 Bcl-2 的表达,使 Bcl-2/Bax 的值降低进而促进细胞凋亡。

关键词 全反式维甲酸; 胃癌; SGC-7901; 凋亡

中图分类号 R 453.3; R 977.3; R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1119-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.005

胃癌的死亡率在我国恶性肿瘤中居首位,严重影响人们的身体健康,具有地域性的差异,且胃癌早期难以发现,晚期难以治疗,术后 5 年生存率并不乐观^[1-2]。现如今临床治疗肿瘤的方法除了手术治疗外,化疗也是治疗肿瘤的一种重要方式。全反式维甲酸(all-transretinoic acid, ATRA)近年来被广泛用于临床治疗肿瘤,如急性早幼粒细胞性白血病等^[3],但其具体作用机制尚不清楚。该研究旨在初步探讨药物 ATRA 对胃癌的影响及其可能的分子机制,用药物 ATRA 处理胃癌细胞 SGC-7901,检测药物处理后细胞生物学行为改变,并检测 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白的表达来探讨其潜在的分子机制,为 ATRA 应用于临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 胃腺癌细胞株 SGC-7901 购自美国 ATCC 公司,于含 10% 胎牛血清、1% 双抗(链霉素、

2017-04-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81201907); 高校省级优秀青年人才基金项目(编号: 2012SQRL067); 安徽医科大学博士研究生科研基金(编号: XJ201229)

作者单位: ¹ 安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学与分子生物学教研室、安徽省省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

² 安徽公安职业学院,合肥 230031

作者简介: 魏翔,女,硕士研究生;

张素梅,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: 379236778@qq.com

FasL-specific microRNA in blocking immune escape of tongue squamous cell carcinoma

Wu Yan^{1,2}, Xu Yanxue^{1,2}, Han Tongtong^{1,2}, et al

(¹ Stomatologic College of Anhui Medical University, Hefei 230032; ² The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-590 on the expression of FasL in SCC-3 cells. **Methods** The synthetic miR-590 mimics or miR-590 inhibitor was transfected into SCC-3 cells. The mRNA and protein expression of FasL mRNA and protein in SCC-3 were detected by RT-PCR and Western blot respectively. The transfected SCC-3 cells were treated with Cisplatin(DDP) 5 mg/L and the cell growth curves were drawn at different time points by MTT assay, and the effect of miR-590 was verified from the negative side by the inhibitor of miR-590 against FasL. **Results** MiR-590 decreased the expression of FasL on SCC-3 cells at mRNA and protein levels; Resistance to DDP was decreased in SCC-3 cells after miR-590 transfection. **Conclusion** MiR-590 can effectively inhibit the expression of FasL in SCC-3 cells and decrease the resistance of SCC-3 to DDP, which may reduce the apoptosis-inducing and killing effect of immunocompetent cells, blocking tumor immune escape, providing a new target for the treatment of tongue squamous cell carcinoma.

Key words FasL; miR-590; squamous cell carcinoma of tongue