

miR-142-5p 对口腔鳞状细胞癌及血管生成影响的实验研究

刘溢馨,李香玉,邵梦慈,王菁,徐文华,王元银

(安徽医科大学口腔医学院,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)

摘要 目的 探究 miR-142-5p 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)组织和细胞系中的表达及其对口腔鳞状细胞增殖、迁移、侵袭及血管生成的影响。方法 收集 16 组口腔肿瘤组织与瘤旁组织,应用 qRT-PCR 法检测组织中 miR-142-5p 的表达,通过 CCK-8 实验、克隆、细胞划痕、Transwell、侵袭实验观察 miR-142-5p 对 OSCC 细胞增殖、迁移、侵袭的影响,同时通过管腔形成实验检测 miR-142-5p 对血管生成的影响。通过 Western blot 检测过表达 miR-142-5p 后血管生成相关蛋白血管内皮生长因子(VEGFA)、血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、基质金属蛋白酶 2(MMP2)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)的表达。结果 miR-142-5p 在口腔肿瘤组织和细胞系中均为低表达。CCK-8 和克隆实验显示 miR-142-5p 的表达水平与 OSCC 细胞的增殖呈负相关,细胞划痕和 Transwell 实验显示 miR-142-5p 的表达水平与 OSCC 细胞的迁移呈负相关,细胞侵袭实验显示 miR-142-5p 的表达水平与 OSCC 细胞的侵袭呈负相关。管腔形成实验分析显示,过表达 miR-142-5p 后,HUVECs 的管长度和节点减少。Western blot 检测显示 miR-142-5p 的上调抑制了 VEGFA、VE-cadherin、MMP2、MMP9 的表达,促进 E-cadherin 蛋白的表达。结论 过表达 miR-142-5p 可抑制口腔鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭影响以及血管生成,表明 miR-142-5p 可能是抗肿瘤血管生成和抗 OSCC 的一个新靶点。

关键词 非编码 RNA;口腔鳞状细胞癌;miR-142-5p;血管生成;增殖;迁移

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1713-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.004

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是一种常见的头颈癌。它在世界某些地区的患病率和病死率很高,影响了患者的预后和生存^[1-2]。microRNA(miRNA)是长度为 18~25 个核苷酸的小 RNA,广泛分布在真核生物中,miRNA 参与许多生理过程,如细胞分化、细胞增殖和癌症发展^[3]。miR-142-5p 在各种生物学过程中起着关键作用,包括肿瘤发生、血管生成和炎症^[4]。然而 miR-142-5p 对 OSCC 的发生、发展及其血管生成具体作用机制尚未明确。该研究的目的是研究 miR-142-5p 对 OSCC 增殖、迁移和侵袭的影响,以及其对血管生成的作用机制,为 OSCC 的临床治疗提供新

的靶点和思路的理论及实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人口腔鳞癌细胞系 SCC6、SCC9、CAL27,人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)来自安徽医科大学口腔实验室保存。人正常口腔上皮细胞 HOK 购自上海通派生物科技有限公司。人 OSCC 组织及邻近正常组织取自安徽医科大学第一附属医院口腔科。胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自以色列 BI 公司;青-链霉素溶液、PBS、胰酶购自苏州新赛美公司;转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司(货号:11668019);逆转录试剂盒、qRT-PCR 相关试剂购自美国 Axygen 公司。miR-142-5p mimic、miR-142-5p mimic NC、miR-142-5p inhibitor、miR-142-5p inhibitor NC 购自安徽通用生物股份有限公司;PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;RNA 提取试剂盒购自上海奕杉生物科技有限公司;CCK-8 试剂购自美国 Sigma 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、DEPC 水、RIPA 裂解液、DMSO 试剂购自上海碧云天科技有限公司。VEGFA 抗体购自英国 Abcam 公司;MMP2、MMP9 抗体购自武汉三鹰生物

2024-07-06 接收

基金项目:安徽省卫生健康科研项目(编号:AHWJ2022b001);安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号:2022zhys-B03);安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划项目(编号:2020xkjT024);安徽医科大学口腔医学院(附属口腔医院)学科建设“峰原”提升项目(编号:2022xkfys 04)

作者简介:刘溢馨,女,硕士研究生;

徐文华,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: xuwenhua@ahmu.edu.cn;

王元银,男,教授,主任医师,博士生导师,通信作者, E-mail: wyy1970548@sohu.com

技术有限公司, E-cadherin、VE-cadherin 抗体购自美国 Immunoway 公司。Matrigel 胶、Transwell 小室购自美国 Corning 公司;

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 利用 GEO 数据库下载 3 个 OSCC 相关数据集: GSE45238, GSE113956 和 GSE31277 预测 OSCC 中显著差异表达的 miRNAs。|logFC| > 1; 校正后 $P < 0.05$ 为标准进行差异分析。

1.2.2 细胞转染 根据制造商的说明, 使用 Lipofectamine™ 2000 用 miR-142-5p mimic /inhibitor 组或阴性对照的 miR-142-5p mimic /inhibitor NC 组转染细胞, 转染 6 h 后, 更换完全培养基, 并继续培养 48 ~ 72 h。

1.2.3 qRT-PCR 实验 检测转染 miR-142-5p mimic/inhibitor 对 miR-142-5p 的表达影响, 提取组织细胞 RNA, 根据逆转录试剂盒说明书获得 cDNA, 按照荧光定量 PCR 试剂盒的方案进行扩增。U6 引物 F: 5'-GGAACGATACAGAGAAGATTAGC-3', R: 5'-TGGAACGCTTCACGAATTTGCG-3', miR-142-5p 引物 F: 5'-CGGCGCATAAAGTAGAAAGCACT-3', R: 5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'。PCR 按以下反应条件: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。待反应完毕, 2^{-ΔΔC_T}法分析各组结果。

1.2.4 CCK-8 法 将转染细胞按照 1 × 10⁴ 个/ml 密度均匀平铺于 96 孔板, 设置 3 个孔重复实验。每孔加 10 μl 的 CCK-8 溶液(分别在 24、48、72 h 后) 避光培养 2 h。用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值(optical density, OD)。

1.2.5 克隆形成实验 取转染细胞以 1 000 个/孔密度接种于 6 孔板, 设置 3 个孔重复实验。培养 14 d, 多聚甲醛固定 30 min, 结晶紫染色 4 h, 进行拍照记数。

1.2.6 细胞划痕实验 取转染细胞铺至 6 孔板, 待细胞贴壁后用 10 μl 枪头划线后培养过夜, 设置 3 个孔重复实验。24 h 后拍照分析细胞划痕情况。

1.2.7 Transwell 小室实验 取试剂盒将所需数目小室置于 24 孔板中, 转染后细胞制备 1 × 10⁵/ml 无血清细胞悬浮液, 在上室加 100 μl DMEM + 100 μl 转染细胞悬液, 下室内加入含 20% FBS 的 600 μl DMEM。培养 24 h 后, 去除上室中非转移细胞, 下室的细胞使用 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫染色 15 min, 显微镜下观察拍照。

1.2.8 侵袭实验 Matrigel 基质胶在 4 °C 下过夜, 取 40 μl 加入小室中, 在 37 °C 条件下孵育 2 h 凝固。

侵袭实验余下实验方法同 Transwell 实验。

1.2.9 成管实验 Matrigel 基质胶 4 °C 过夜溶解, Matrigel 基质胶在冰盒上 50 μl/孔加入 96 孔板, 37 °C 条件下培养 30 min 使其凝固; 将 HUVECs 细胞以 2 × 10⁴/孔密度接种在 Matrigel 层上, 培养 4 h 后观察, 并用显微镜捕获图片, 通过使用 Image J 软件的计算机辅助图像分析确定每孔的总管长度以及分支节点。

1.2.10 Western blot 实验 使用配置好的 RIPA 裂解液提取细胞的总蛋白质, 并使用 BCA 蛋白质试剂盒测蛋白的浓度。每次上样取 20 μg 蛋白样品, 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后将其转移到 PVDF 膜上。室温 5 % 的脱脂奶粉封闭 2 h, 并在 4 °C 冰箱一抗过夜孵育。TBST 清洗后, 用山羊抗兔 IgG 二抗孵育 2 h。最后进行 3 次 TBST 清洗后暴露显影。

1.3 统计学处理 进行统计学分析时, 使用了 GraphPad Prism 8.0 软件和 Image J 软件。对于两组间的比较, 采用 *t* 检验, 而对于多组间的比较, 则采用了单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制所有的柱状图和折线图。

2 结果

2.1 生物信息学预测 利用 GEO 数据库下载 3 个 OSCC 相关数据集: GSE45238, GSE113956, GSE31277, |logFC| > 1; 校正后 $P < 0.05$ 为标准进行差异分析。GSE45238 获得 85 个具有差异表达的 miRNA (32 个 miRNA 上调, 53 个 miRNA 下调), GSE113956 获得 1 077 个具有差异表达的 miRNA (437 个 miRNA 上调, 640 个 miRNA 下调), GSE31277 获得 35 个具有差异表达的 miRNA (16 个 miRNA 上调, 18 个 miRNA 下调)。3 个 GEO 数据库交集取得 3 个差异表达 miRNA 分别为 miR-375、miR-1 和 miR-142-5p。见图 1。

2.2 miR-142-5p 在人 OSCC 细胞中的表达情况 qRT-PCR 检测 miR-142-5p 在 OSCC 细胞系中的表达。结果显示与正常口腔上皮细胞 HOK 相比 miR-142-5p 低水平表达, 其表达水平分别在 CAL27 中下降 64%、SCC9 中下降 42%、SCC6 中下降 43%, 如图 2A 所示。

2.3 miR-142-5p 在人 OSCC 组织中的表达情况 qRT-PCR 检测临床收集的 OSCC 组织与邻近正常组织中 miR-142-5p 的表达情况。结果显示, 在 16 例患者中, 有 13 例的肿瘤组织中 miR-142-5p 的表达

水平下调,有 2 例上调,1 例则表达无明显差异。结果表明,在 OSCC 肿瘤组织中,miR-142-5p 低水平表达($t=5.373, P<0.01$),如图 2B 所示。

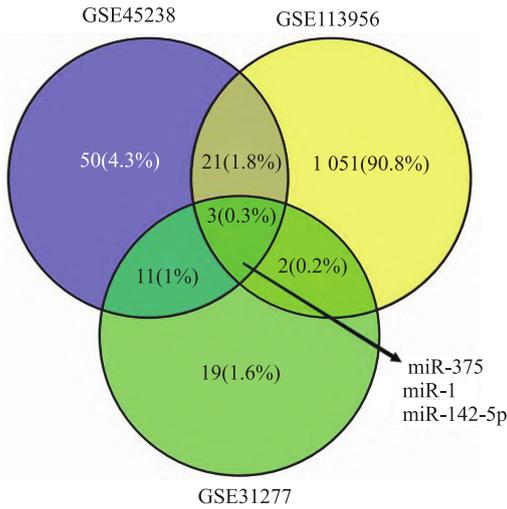


图 1 GSE45238、GSE113956、GSE31277 预测的重叠 DE miRNA 的示意图

Fig. 1 Schematic representation of overlapping DE miRNAs predicted by GSE45238, GSE113956, and GSE31277

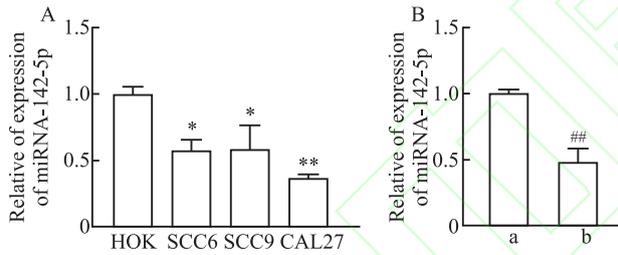


图 2 检测口腔鳞癌中 miR-142-5p 的表达水平的示意图

Fig. 2 Schematic diagram for detecting the expression level of miR-142-5p in oral squamous carcinoma

A: qRT-PCR to detect the expression of miR-142-5p in oral squamous carcinoma cell lines; B: qRT-PCR to detect the expression of miR-142-5p in oral squamous carcinoma tissues; a: Normal group; b: Tumor group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs HOK group; ## $P<0.01$ vs Normal group.

2.4 构建 miR-142-5p 转染 OSCC 细胞株 通过 qRT-PCR 检测 miR-142-5p mimic/inhibitor 转染对 miR-142-5p 表达的影响。结果显示,转染 miR-142-5p mimic 与 miR-142-5p mimic NC 对照组相比,miR-142-5p mimic 组 miR-142-5p 高表达,其中 CAL27 组 $t=3.758, P<0.01$, SCC9 组 $t=25.92, P<0.001$ 。而转染 miR-142-5p inhibitor 组与 miR-142-5p inhibitor NC 对照组相比,miR-142-5p inhibitor 组 miR-142-5p 低表达,其中 CAL27 组 $t=15.29, P<0.01$, SCC9 组 $t=6.133, P<0.05$,如图 3 所示。

2.5 过表达 miR-142-5p 后对 SCC9、CAL27 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

2.5.1 过表达 miR-142-5p 后对 SCC9、CAL27 细胞增殖的影响 CCK-8 细胞增殖实验分别在转染 24、48、72 h 后检测 SCC9、CAL27 细胞 OD₄₅₀ 值,CCK-8 实验测定结果显示,上调 miR-142-5p 表达水平后,SCC9、CAL27 细胞在 miR-142-5p mimic 组转染 24 h 后,处于 450 nm 波长的吸光度明显低于 miR-142-5p mimic NC 对照组 ($P<0.05$),见图 4A、4B。

转染 miR-142-5p mimic 和 miR-142-5p mimic NC 对照组到 SCC9、CAL27 细胞中进行克隆形成实验。结果显示,miR-142-5p mimic NC 对照组的 SCC9 和 CAL27 细胞克隆团数目分别为 816.66 ± 7.31 和 734.00 ± 13.86 ,而过表达 miR-142-5p 组 SCC9 和 CAL27 细胞克隆团数目分别为 378.33 ± 12.72 和 264.00 ± 19.34 ,miR-142-5p mimic 组在 OSCC 细胞的克隆团的数量均显著下降,其中 SCC9 组 $t=13.33, P<0.001$,CAL27 组 $t=15.45, P<0.001$ 。结果如图 4C 所示。根据 CCK-8 和克隆形成实验结果说明,过表达 miR-142-5p 后抑制 OSCC 细胞增殖。

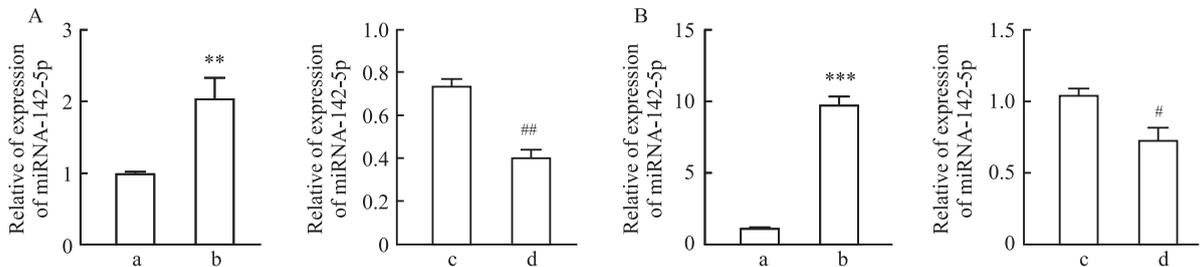


图 3 qRT-PCR 实验检测过表达和敲低后 miR-142-5p 的表达水平的示意图

Fig. 3 Schematic representation of qRT-PCR assay to detect the expression level of miR-142-5p after overexpression and knockdown

A: qRT-PCR to detect the expression level of CAL27 cell line after overexpression and knockdown of miR-142-5p; B: qRT-PCR to detect the expression level of SCC9 cell line after overexpression and knockdown of miR-142-5p; a: miR-142-5p mimics NC group; b: miR-142-5p mimics group; c: miR-142-5p inhibitor NC group; d: miR-142-5p inhibitor group; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs miR-142-5p mimics NC group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs miR-142-5p inhibitor NC group.

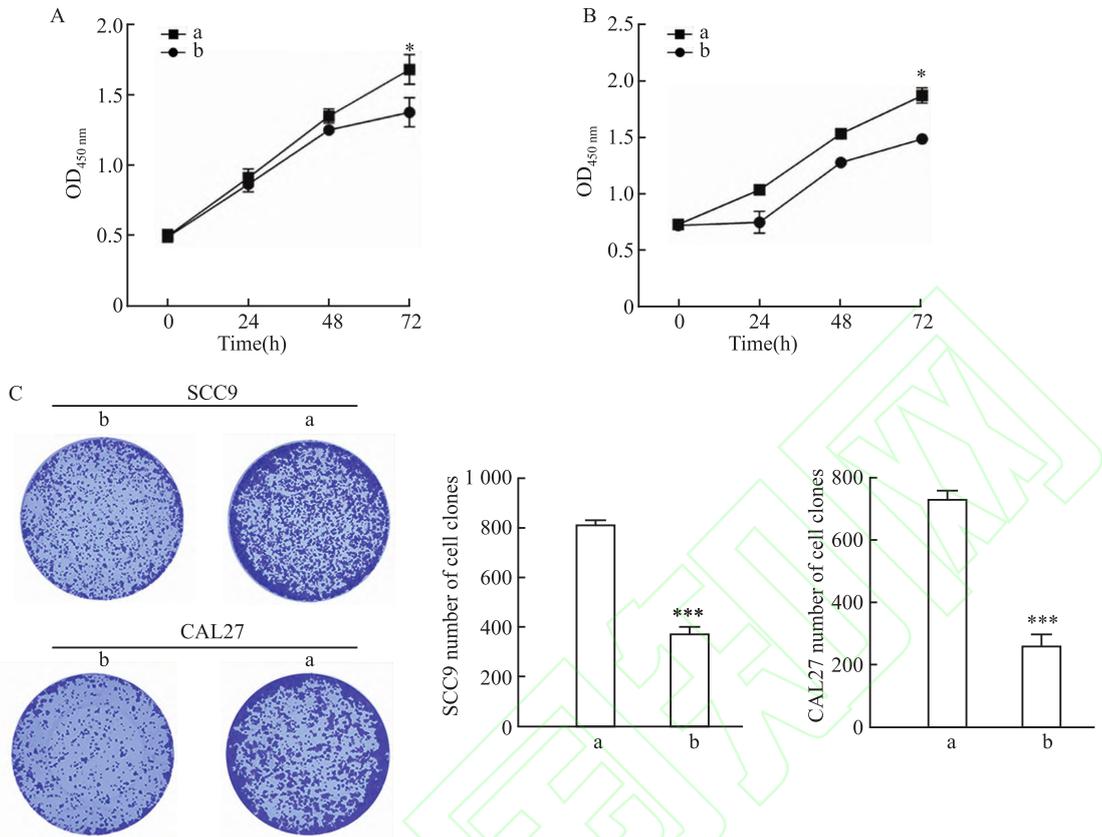


图4 检测 miR-142-5p 过表达水平对 OSCC 细胞增殖水平影响的示意图

Fig. 4 Schematic diagram for detecting the effect of miR-142-5p overexpression level on the proliferation level of OSCC cells

A: CCK-8 cell proliferation assay to detect the changes in cell viability of SCC9 cells transfected with miR-142-5p mimic and miR-142-5p mimic NC control groups; B: CCK-8 cell proliferation assay to detect the changes in cell viability of CAL27 cells transfected with miR-142-5p mimic and miR-142-5p mimic NC control groups; C: Cell cloning assay to detect changes in cell proliferation after transfection of SCC9 and CAL27 cells with miR-142-5p mimic group and miR-142-5p mimic NC control group $\times 200$; a: miR-142-5p mimics NC group ;b: miR-142-5p mimics group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs miR-142-5p mimic NC control.

2.5.2 过表达 miR-142-5p 后对 SCC9、CAL27 细胞迁移的影响 通过划痕实验结果显示,过表达 miR-142-5p 组的 SCC9、CAL27 细胞在划痕 24 h 后的迁移距离比 miR-142-5p mimic NC 对照组更大,划痕愈合能力下降,如图 5A、5B 所示,而 miR-142-5p mimic NC 对照组细胞迁移较快,划过的痕迹将逐步得到恢复,其中 SCC9 组 $t = 5.207, P < 0.01$, CAL27 组 $t = 16.48, P < 0.001$ 。经过 Transwell 实验 24 h 后,miR-142-5p mimic NC 对照组的 SCC9 和 CAL27 穿透膜的细胞数分别为 290.67 ± 11.70 和 257.33 ± 7.54 ,而过表达 miR-142-5p 组 SCC9 和 CAL27 穿透膜的细胞数分别为 112.00 ± 2.08 和 165.33 ± 5.90 ,miR-142-5p mimic 组穿透膜细胞数明显减少。其中 SCC9 组 $t = 15.04, P < 0.001$, CAL27 组 $t = 9.615, P < 0.001$ 。因此可以推断过表达 miR-142-5p 会抑制 OSCC 细胞的迁移能力,如图 5C、5D 所示。

2.5.3 过表达 miR-142-5p 后对 SCC9、CAL27 细胞

侵袭的影响 侵袭小室穿透实验结果表明,miR-142-5p mimic NC 对照组的 SCC9 和 CAL27 穿透膜的细胞数分别为 299.67 ± 7.54 和 207.00 ± 4.70 ,而过表达 miR-142-5p 组 SCC9 和 CAL27 穿透膜的细胞数分别为 108.00 ± 12.29 和 74.00 ± 7.23 ,miR-142-5p mimic 组穿透膜细胞数明显减少。其中 SCC9 组 $t = 13.30, P < 0.001$, CAL27 组 $t = 15.45, P < 0.001$ 。因此,可以推断过表达 miR-142-5p 会抑制 OSCC 细胞的侵袭能力,结果如图 6 所示。

2.6 miR-142-5p 对 OSCC 中血管生成的影响

2.6.1 过表达 miR-142-5p 后对 HUVECs 细胞管腔形成的影响 体外血管形成实验结果显示,在 HUVECs 细胞中,与 miR-142-5p mimic NC 组相比,miR-142-5p mimic 组 HUVECs 的管长度明显减少了 44.42%, $F = 21.64, P < 0.05$ 和节点减少 47.02%, $F = 42.87, P < 0.05$,见图 7。说明过表达 miR-142-5p 抑制了 HUVECs 细胞管腔形成。

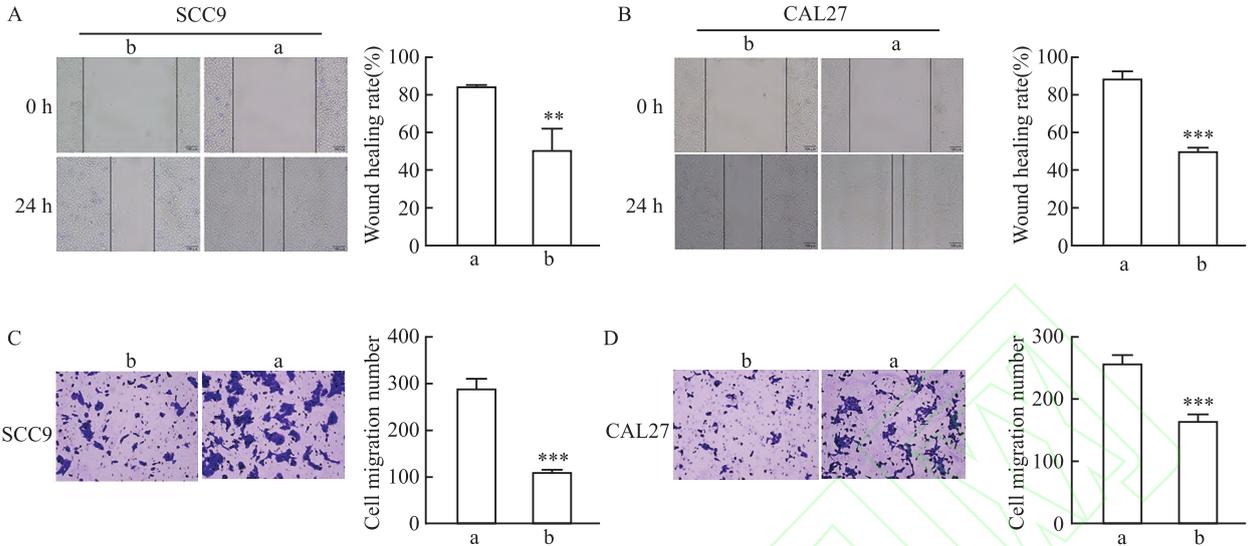


图5 检测 miR-142-5p 过表达水平对 OSCC 细胞迁移水平影响的示意图

Fig. 5 Schematic diagram for detecting the effect of miR-142-5p overexpression level on the migration level of OSCC cells

A: The effect of increasing miR-142-5p expression level on the migration ability of SCC9 was analyzed by scratch assay $\times 40$; B: The effect of increasing miR-142-5p expression level on the migration ability of CAL27 was analyzed by scratch assay $\times 40$; C: The effect of increasing miR-142-5p expression level on the migration ability of SCC9 was analyzed by Transwell assay $\times 200$; D: The effect of the increase in miR-142-5p expression level on the migration ability of CAL27 cells by Transwell assay $\times 200$; a: miR-142-5p mimics NC group; b: miR-142-5p mimics group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs miR-142-5p mimics NC group.

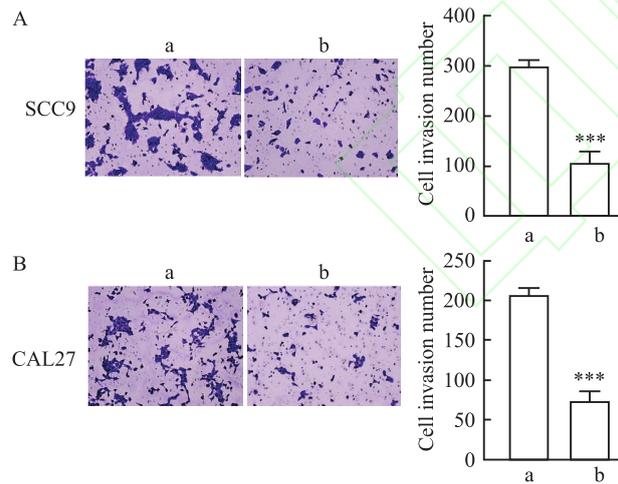


图6 检测 miR-142-5p 过表达水平对 OSCC 细胞侵袭水平影响的示意图

Fig. 6 Schematic diagram of detecting the effect of miR-142-5p overexpression level on the invasion level of OSCC cells

A: Matrigel invasion assay to detect the effect of increased miR-142-5p expression level on the invasion ability of SCC9 $\times 200$; B: Matrigel invasion assay to detect the effect of increased miR-142-5p expression level on the invasion ability of CAL27 $\times 200$; a: miR-142-5p mimics NC group; b: miR-142-5p mimics group; *** $P < 0.001$ vs miR-142-5p mimics NC group.

2.6.2 过表达 miR-142-5p 后对血管生成相关蛋白的影响 为了验证 miR-142-5p 对 OSCC 血管生成

相关蛋白的影响,Western blot 法检测显示,在 OSCC 细胞中,与 miR-142-5p mimic NC 组相比,miR-142-5p mimic 组 VEGFA、VE-cadherin、MMP2、MMP9 的蛋白表达量减少,E-cadherin 蛋白表达量增加见图 8 ($P < 0.05$)。实验结果显示,当 miR-142-5p 过表达时,抑制了 OSCC 中的血管生成。

3 讨论

miRNA 在各种生物学过程中起着关键的调节作用,如发育、DNA 修复、细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等^[5]。研究^[6]表明,miRNA 被广泛认为是癌症诊断和预后的潜在生物标志物,为癌症筛查提供了全新的视角。

有研究^[7]报道,miR-142-5p 在不同的病理条件下异常表达,包括癌症、炎症、免疫紊乱、肾纤维化、适应性肥大和脑缺血/再灌注损伤。miR-142-5p 在不同类型癌症中的表达和细胞意义是矛盾的。在肾细胞癌、视网膜母细胞瘤和胃癌等癌症中,miR-142-5p 显示出致癌特性^[7-9]。相反,在胰腺、肺、乳腺和肝脏(肝细胞癌)癌中,它表现为肿瘤抑制因子^[10-11]。miR-142-5p 在肿瘤的各种生物学过程中起着关键作用,包括肿瘤发生、血管生成和炎症^[4]。

该实验研究表明 miR-142-5p 在 OSCC 组织和

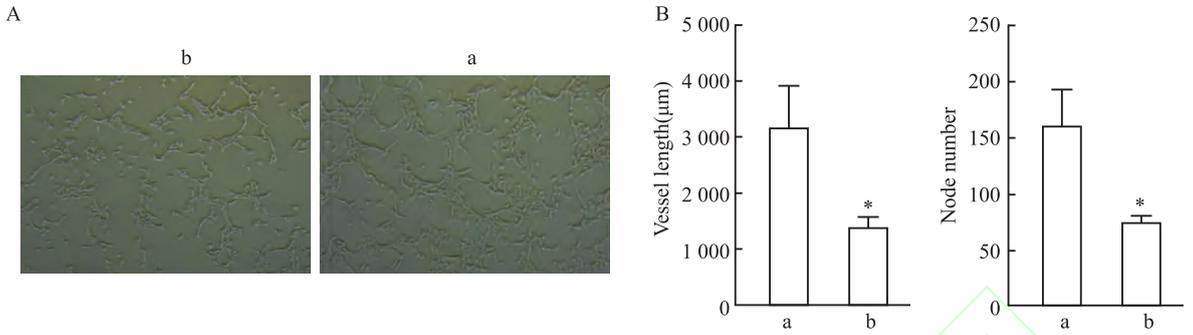


图7 检测 miR-142-5p 过表达水平对 HUVECs 成管能力影响的示意图

Fig. 7 Schematic diagram for detecting the effect of miR-142-5p overexpression level on the tube-forming ability of HUVECs

A: Angiogenesis assay to detect the effect of increasing miR-142-5p expression level on the tube-forming ability of HUVECs ×100; B: The effect of increasing miR-142-5p expression level on the length of blood vessels and the number of nodes after increasing miR-142-5p expression; a: miR-142-5p mimics NC group; b: miR-142-5p mimics group; * $P < 0.05$ vs miR-142-5p mimics NC group.

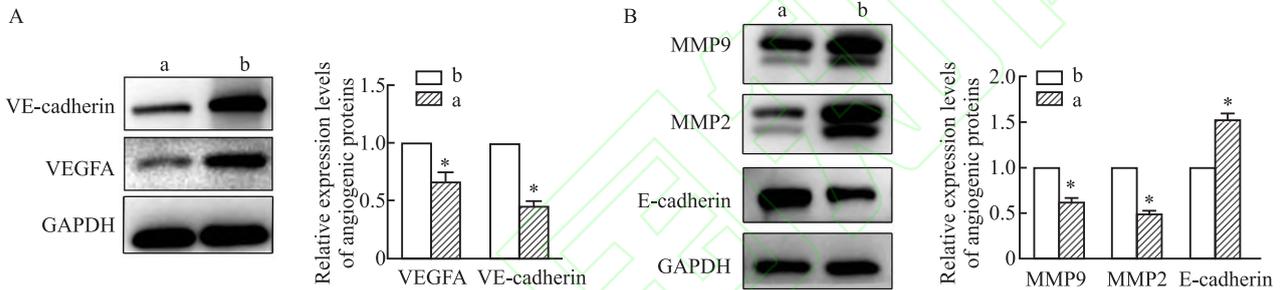


图8 检测 miR-142-5p 过表达水平对 OSCC 血管生成相关蛋白影响的示意图

Fig. 8 Schematic diagram of detecting the effect of miR-142-5p overexpression level on OSCC angiogenesis-related proteins

A: Western blot assay to detect the effect of increasing miR-142-5p expression level on VEGFA and VE-cadherin angiogenesis related proteins in SCC9 cells; B: Western blot assay to detect the effect of increasing miR-142-5p expression level on MMP2, MMP9, and E-cadherin angiogenesis related proteins in SCC9 cells; a: miR-142-5p mimics group; b: miR-142-5p mimics NC group; * $P < 0.05$ vs miR-142-5p mimics NC group.

细胞中的表达减少,表明 miR-142-5p 可能作为抑癌基因阻止 OSCC 进展。然而,miR-142-5p 在 OSCC 的确切作用在很大程度上仍然未知。在这里探索了 miR-142-5p 对 OSCC 细胞进展的影响,并揭示了 miR-142-5p 在 OSCC 中可能作为血管生成靶点。

在肿瘤进展过程中,血管生成成为肿瘤微环境提供氧气和其他必需的营养物质,在肿瘤细胞的生长、侵袭和转移中发挥重要作用,因此,扩大血管系统是癌细胞存活的关键^[12-13]。miR-142-5p 的失调对肿瘤的发生和转移以及对肿瘤血管生成密切相关。例如,miR-142 在不同谱系造血干细胞的形成中起着重要的作用。miR-142 缺失会引起造血异常,如低球蛋白血症和巨核细胞症,并导致小鼠免疫缺陷严重^[14]。在肝细胞癌中 miR-142 的缺失会导致 TH-BS4 的过表达,从而增强肝细胞癌的迁移和血管浸润,促进肝癌的血管生成和肿瘤的发展^[15]。然而 miR-142-5p 在 OSCC 中血管生成具体作用机制尚未完全明确。

因此,该实验首先在 OSCC 细胞中成功下调和上调 miR-142-5p 的表达,然后采用各种细胞体外实验检测 OSCC 细胞的增殖、迁移、侵袭。结果显示,过表达 miR-142-5p 组 OSCC 细胞的增殖能力、迁移能力、侵袭能力明显减弱。血管生成实验显示,与对照组比较过表达 miR-142-5p 组生成小管的长度和节点显著减少,Western blot 实验检测血管生成相关蛋白,与对照组比较过表达 miR-142-5p 组 VEGFA、VE-cadherin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达量都减少,而 E-cadherin 蛋白表达量增加,且差异有统计学意义($P < 0.05$),体外实验结果与上述观点一致,miR-142-5p 可抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭以及血管生成。因此,miR-142-5p 有可能用于未来 OSCC 的新型抗血管生成的治疗的靶点。

综上所述,该研究表明 miR-142-5p 在 OSCC 组织和细胞中低水平表达,并抑制 OSCC 的血管生成进程。过表达 miR-142-5p 抑制 SCC9、CAL27 细胞增殖、迁移、侵袭能力。同时,miR-142-5p 高表达可

以抑制 HUVECs 的体外成管能力以及血管生成相关蛋白,这一抑制 OSCC 肿瘤血管生成的作用将为临床治疗提供一个新的切入点。但该实验研究尚处于初始阶段,对于 miR-142-5p 如何通过具体分子机制影响 OSCC 发生发展仍是未知的,进一步深入探究 miR-142-5p 在 OSCC 细胞中对血管生成的调控机制,有望为口腔恶性肿瘤的靶向治疗和抗血管治疗提供新的理论依据和临床指导依据。

参考文献

- [1] Nagao T, Warnakulasuriya S. Screening for oral cancer: future prospects, research and policy development for Asia[J]. Oral Oncol, 2020, 105: 104632. doi:10.1016/j.oraloncology.2020.104632.
- [2] Busso-Lopes A F, Carnielli C M, Winck F V, et al. A reductionist approach using primary and metastatic cell-derived extracellular vesicles reveals hub proteins associated with oral cancer prognosis [J]. Mol Cell Proteomics, 2021, 20: 100118. doi:10.1016/j.mcpro.2021.100118.
- [3] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [J]. Dis Model Mech, 2021, 14(4): dmm047662. doi:10.1242/dmm.047662.
- [4] Wu W, Shang Y, Dai S, et al. Downregulation of miR-142-5p inhibits human aortic smooth muscle cell proliferation and migration by targeting MKL2 [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(1): 277-85. doi:10.3892/mmr.2020.11093.
- [5] Ali Syeda Z, Langden S S S, Munkhzul C, et al. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1723. doi:10.3390/ijms21051723.
- [6] He B, Zhao Z, Cai Q, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(14): 2628-47. doi:10.7150/ijbs.47203.
- [7] Danger R, Paul C, Giral M, et al. Expression of miR-142-5p in peripheral blood mononuclear cells from renal transplant patients with chronic antibody-mediated rejection [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60702. doi:10.1371/journal.pone.0060702.
- [8] Lu J, Ma Y, Zhao Z. MiR-142 suppresses progression of gastric

- carcinoma via directly targeting LRP8 [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2021, 45(4): 101520. doi:10.1016/j.clinre.2020.08.001.
- [9] Liu S, Xiao Z, Ai F, et al. miR-142-5p promotes development of colorectal cancer through targeting SDHB and facilitating generation of aerobic glycolysis [J]. Biomedicine Pharmacother, 2017, 92: 1119-27. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.134.
- [10] Ma Z, Liu T, Huang W, et al. MicroRNA regulatory pathway analysis identifies miR-142-5p as a negative regulator of TGF- β pathway via targeting SMAD3 [J]. Oncotarget, 2016, 7(44): 71504-13. doi:10.18632/oncotarget.12229.
- [11] Zareifar P, Ahmed H M, Ghaderi P, et al. miR-142-3p/5p role in cancer: from epigenetic regulation to immunomodulation [J]. Cell Biochem Funct, 2024, 42(2): e3931. doi:10.1002/cbf.3931.
- [12] Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities [J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(9): 1745-70. doi:10.1007/s00018-019-03351-7.
- [13] 李辉, 黄俊峰, 周静, 等. 促血管和血管拟态生成因子 VEGFA, MMP-14 在肺腺癌中的表达及临床意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(7): 1171-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.018.
- [13] Li H, Huang J F, Zhou J, et al. Expression and clinical significance of vascular and vasculogenic mimicry generation factors VEGFA and MMP-14 in lung adenocarcinoma [J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(7): 1171-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.018.
- [14] Kramer N J, Wang W L, Reyes E Y, et al. Altered lymphopoiesis and immunodeficiency in miR-142 null mice [J]. Blood, 2015, 125(24): 3720-30. doi:10.1182/blood-2014-10-603951.
- [15] Su F, Zhao J, Qin S, et al. Over-expression of Thrombospondin 4 correlates with loss of miR-142 and contributes to migration and vascular invasion of advanced hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23277-88. doi:10.18632/oncotarget.15054.

The effect of miR-142-5p on oral squamous carcinoma and in angiogenesis

Liu Yixin, Li Xiangyu, Shao Mengci, Wang Jing, Xu Wenhua, Wang Yuanyin

(College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University,

Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression of miR-142-5p in oral squamous cell carcinoma (OSCC) tissues and cell lines and its effects on oral squamous cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. **Methods** Sixteen groups of oral tumour tissues and paraneoplastic tissues were collected, and qRT-PCR was applied to detect the expression of miR-142-5p in the tissues. The effects of miR-142-5p on cell proliferation, migration, and

(下转第 1728 页)

in POLG-overexpressed MDA-MB-231 cells. **Results** POLG expression was higher in MDA-MB-231 cells than in normal mammary epithelial cells (MCF-10A) ($P < 0.01$). ddC inhibited cell viability in a dose-dependent manner. ddC inhibited the migration ($P < 0.01$) and invasion ($P < 0.01$) of MDA-MB-231 cells; however, it displayed no significant inhibitory effects on cell viability in normal mammary epithelial cells (MCF-10A) at the same concentration. ddC downregulated the protein ($P < 0.01$) and mRNA ($P < 0.01$) levels of POLG, reduced mtDNA copy number ($P < 0.01$) and downregulated mtDNA-coded NADH1, NADH2, ATPase6, COX-1 and COX-3 protein expression ($P < 0.01$) in MDA-MB-231 cells. Furthermore ddC inhibited mitochondrial content ($P < 0.01$) and ATP ($P < 0.01$) levels in MDA-MB-231 cells. POLG overexpression increased the migration ($P < 0.05$) and invasion ($P < 0.05$) abilities of MDA-MB-231 cells, while ddC did not significantly inhibit the migration and invasion abilities of MDA-MB-231 cells overexpressing POLG. **Conclusion** ddC downregulates POLG expression in MDA-MB-231 cells and inhibits mitochondrial biogenesis and ATP levels, thereby inhibiting the migration and invasion of MDA-MB-231 cells.

Key words triple-negative breast cancer; migration; invasion; POLG inhibitor; mitochondrial biogenesis; ATP synthesis

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82273957); Guizhou Province Science and Technology Plan Project (Nos. Qiankehe Platform Talent [2021]5632, Qiankehe Foundation-ZK [2023] Keynote 034); Research Project on Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Science and Technology in Guizhou Province (No. QZYY-2022-025); Science and Technology Fund Project of Guizhou Provincial Health Commission (No. gzwkj2021-519); Guizhou Medical University Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (No. S202210660139)

Corresponding author Chen Yan, E-mail: s0710189@sina.com

(上接第 1719 页)

invasion were observed by cell counting kit-8 (CCK-8), cloning, wound healing, Transwell, invasion assays, and the effect of miR-142-5p on angiogenesis was also detected by lumen formation assay. The expression of angiogenesis-related proteins vascular endothelial growth factor (VEGFA), vascular endothelial calreticulin (VE-cadherin), epithelial calreticulin (E-cadherin), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) was detected by Western blot after overexpression of miR-142-5p. **Results** miR-142-5p was lowly expressed in oral tumour tissues and cell lines. CCK-8 and clonogenic assays showed that miR-142-5p was inversely correlated with the proliferation of OSCC cells, wound healing and Transwell assays showed that miR-142-5p was inversely correlated with the migration of OSCC cells, and cell invasion assays showed that miR-142-5p was conversely correlated with the invasion of OSCC cells. Analysis of lumen formation assay showed that overexpression of miR-142-5p reduced the tube length and nodes of HUVECs. Western blot assay showed that up-regulation of miR-142-5p inhibited the VEGFA, VE-cadherin, MMP2, MMP9 expression and promoted E-cadherin expression. **Conclusion** Overexpression of miR-142-5p inhibites the proliferative, migratory and invasive effects of oral squamous carcinoma cells as well as angiogenesis, suggesting that miR-142-5p is a novel target for anti-tumour angiogenesis and against oral squamous carcinoma.

Key words non-coding RNA; oral squamous cell carcinoma; miR-142-5p; angiogenesis; proliferation; migration

Fund programs Health Research Project of Anhui Province (No. AHWJ2022b001); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2022zhyx-B03); Basic and Clinical Collaborative Research Enhancement Project of Anhui Medical University (No. 2020xkjT024); Discipline Construction "Fengyuan" Collaborative Projects of College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University (No. 2022xkfyts 04)

Corresponding authors Xu Wenhua, E-mail: xuwenhua@ahmu.edu.cn; Wang Yuanyin, E-mail: wyy19700548@sohu.com