

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.09.004

· 基础研究 ·

miR-135a 通过下调 SOX2 抑制喉癌 Hep-2 细胞的恶性生物学行为和增强对奥沙利铂的敏感性

刘扬帆¹, 屈中玉¹, 王文廉¹, 孙星¹, 蔡政^{1,2} (1. 郑州大学附属南阳医院南阳市中心医院肿瘤一科, 河南南阳 473009; 2. 云南省中医医院肿瘤科, 云南昆明 650021)

[摘要] **目的:** 探讨敲降 miR-135a 对人喉癌上皮 Hep-2 细胞的恶性生物学行为和奥沙利铂敏感性的影响。**方法:** 收集 2018 年 1 月至 2018 年 6 月郑州大学附属南阳医院南阳市中心医院行喉癌切除术 10 例患者的喉癌组织和癌旁组织标本。采用 qPCR 检测喉癌组织和 Hep-2 细胞中 miR-135a 的表达水平。miR-135 inhibitor 转染喉癌 Hep-2 细胞后, 采用 CCK-8 检测 Hep-2 细胞活性, 集落形成实验检测 Hep-2 细胞集落形成能力, Transwell 实验检测 Hep-2 细胞的侵袭及迁移能力, WB 实验检测 Hep-2 细胞中 SOX2 蛋白的表达水平。0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的奥沙利铂处理已转染 miR-135 inhibitor 的 Hep-2 细胞, CCK-8 实验检测 Hep-2 细胞的增殖活性, Annexin-V-FITC/PI 染色流式细胞术检测 Hep-2 细胞的凋亡率。采用 miR-135a inhibitor 质粒、对照 pcDNA 空载体 (SOX2-Con) 质粒、pcDNA-SOX2 (SOX2-OE) 质粒共转染 Hep-2 细胞, 构建 miR-135a inhibitor+SOX2-Con 组和 miR-135a inhibitor+SOX2-OE 组, 检测此 2 组细胞的增殖活性、集落形成能力、侵袭及迁移能力。**结果:** 与癌旁组织比较, 喉癌组织中 miR-135a 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与正常 NHP 细胞比较, miR-135a 在 Hep-2 细胞中表达水平明显上调 ($P < 0.01$); 转染 miR-135a inhibitor 导致 Hep-2 细胞中 miR-135a 表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。敲降 miR-135a 明显降低 Hep-2 细胞的增殖活性、细胞集落数、迁移、侵袭和 SOX2 表达 (均 $P < 0.01$); 明显增强细胞对奥沙利铂敏感性 ($P < 0.01$); 与 miR-135a inhibitor+SOX2-Con 组比较, miR-135a inhibitor+SOX2-OE 组的 Hep-2 细胞的增殖活性、细胞集落数、迁移与侵袭能力均明显增加 (均 $P < 0.01$); 同时, 用不同浓度的奥沙利铂处理此 2 组细胞, 相对于 miR-135a inhibitor+SOX2-Con 组, miR-135a inhibitor+SOX2-OE 组的 Hep-2 细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$)。**结论:** 敲降 miR-135a 可能通过下调转录因子 SOX2 的表达抑制 Hep-2 细胞的恶性生物学行为, 并增强其对奥沙利铂的敏感性。

[关键词] 喉癌; Hep-2 细胞; miR-135a; SOX2; 奥沙利铂

[中图分类号] R392.12; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)09-0955-07

miR-135a knockdown inhibits the malignant biological behaviors and promotes oxaliplatin-sensitivity of human laryngeal carcinoma Hep-2 cells by down-regulation of SOX2

LIU Yangfan¹, QU Zhongyu¹, WANG Wenlian¹, SUN Xing¹, CAI Zheng^{1,2} (1. Department of Oncology, Central Hospital of Nanyang, Nanyang Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang 473009, Henan, China; 2. Department of Oncology, Hospital of Traditional Chinese Medicine of Yunnan Province, Kunming 650021, Yunnan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of miR-135a on the malignant biological behaviors of human laryngeal carcinoma epithelial Hep-2 cells and its sensitivity to oxaliplatin. **Methods:** Samples of laryngeal carcinoma tissues and para-cancerous tissues were collected from 10 patients who underwent laryngectomy in Nanyang Hospital Affiliated to Zhengzhou University-Nanyang City Center Hospital from January 2018 to June 2018. The expression of miR-135a in laryngeal carcinoma tissues and Hep-2 cells was detected by qPCR. After being transfected with miR-135 inhibitor, cell proliferation viability of Hep-2 cells was measured by CCK-8 assay, cell colony formation ability was detected by colony formation assay, and cell proliferation invasion and migration abilities were detected by Transwell analysis, and the expression of SOX2 protein in Hep-2 cells was detected by WB. Hep-2 cells transfected with miR-135 in-

[基金项目] 中国抗癌协会-齐鲁肿瘤研究基金资助项目(No. Y-Q201802-048)。Project supported by China Anti-Cancer Association - Qilu Cancer Research Foundation (No. Y-Q201802-048)

[作者简介] 刘扬帆(1978-), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事肿瘤基础与临床治疗的研究, E-mail: liuyangfanbbnn@aliyun.com

[通信作者] 蔡政(CAI Zheng, corresponding author), 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤抗血管生成和免疫治疗的研究, E-mail: caizheng999@126.com

hibitor were further treated with various concentrations (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 $\mu\text{mol/L}$) of oxaliplatin, and the cell proliferation viability was detected by CCK-8 while cell apoptosis was detected by Annexin-V-FITC/PI double staining flow cytometry. miR-135a inhibitor plasmid, control pcDNA empty vector (SOX2-Con) plasmid, and pcDNA-SOX2 (SOX2-OE) plasmid were transfected into Hep-2 cells to construct the miR-135a inhibitor+SOX2-Con group and miR-135a inhibitor+SOX2-OE group, and the cell viability, cell colony formation ability, cell invasion and migration ability in two groups were detected. **Results:** Compared with para-cancerous tissues, miR-135a expression in laryngeal cancer tissues was significantly increased ($P<0.01$). Compared with normal NHP cells, miR-135a expression in Hep-2 cells was significantly increased ($P<0.01$). miR-135a inhibitor significantly reduced the expression level of miR-135a in Hep-2 cells ($P<0.01$). miR-135a knockdown significantly reduced the cell proliferation viability, cell colony number, migration, invasion and SOX2 expression in Hep-2 cells (all $P<0.01$), but significantly enhanced the sensitivity of Hep-2 cells to oxaliplatin ($P<0.01$). Compared with miR-135a inhibitor+SOX2-Con group, the cell proliferation viability, cell colony number, migration and invasion of Hep-2 cells in miR-135a inhibitor+SOX2-OE group were significantly increased ($P<0.01$); Meanwhile, the cells of the 2 groups were treated with different concentrations of oxaliplatin, and the results of CCK-8 assay showed that, compared with the miR-135a inhibitor+SOX2-Con group, the cell proliferation viability of Hep-2 cells in miR-135a inhibitor+SOX2-OE group was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion:** miR-135a knockdown inhibits the malignant biological behaviors and promotes oxaliplatin-sensitivity of Hep-2 cells possibly by inhibiting the expression of the transcription factor SOX2.

[Key words] laryngeal carcinoma; Hep-2 cell, miR-135a; SOX2; oxaliplatin

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(9): 955-961. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.09.004]

头颈部鳞状细胞癌是全球第六大常见恶性肿瘤,其中喉鳞状细胞癌是第二种最常见的类型^[1-2]。近几十年来,晚期喉癌患者的治疗已从初级手术转向使用放射疗法或放化疗的非手术器官保留治疗^[3]。然而,尽管引入了多种联合方式,但发现局部复发率依然很高,结果依然令人堪忧。奥沙利铂(oxaliplatin)的使用显著延长了晚期喉癌患者的存活时间,但大剂量奥沙利铂容易造成患者毒副作用,降低患者生活质量。寻求提高奥沙利铂敏感性的标志物,能有效降低奥沙利铂剂量,能提高患者生活质量。因此,更好地研究喉癌的发病机制和寻找化疗敏感的靶点对治疗喉癌非常重要。微小RNA(miRNA)是内源性非编码RNA的亚类,在调节许多生物过程中起着关键作用,包括发育、分化、凋亡和癌症^[4-6]。研究^[7]表明,肿瘤细胞与正常细胞相比表现出异常的miR-135a表达谱,提示miR-135a在肿瘤形成和进展中可能发挥重要作用。miR-135a在不同的肿瘤细胞上表达和起的作用并不一致,如miR-135a在胃癌、乳腺癌细胞低表达,过表达的miR-135a促进肿瘤进展^[8-9];而miR-135a在肝细胞癌高表达,起抑制细胞增殖促进细胞凋亡的作用^[10]。miR-135a对喉癌细胞进展及其对奥沙利铂敏感性的研究偏少,因此本研究以miR-135a为目标展开研究,并研究其中潜在的机制。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞系及主要试剂

收集2018年1月至2018年6月郑州大学附属南阳医院南阳市中心医院行喉癌切除手术的癌组织和癌旁组织(距离浸润边缘1 cm)标本10例,患者为本院首次确

诊,且患者术前未进行过放、化疗。其中,男性6例、女性4例,中位年龄54.3岁(45~68岁)。按照肿瘤部位分型:声门上型2例,声门下型1例,声门型7例。按照TNM分期:T2期6例,T3期4例;N0期4例,N1期4例,N2期2例;M0期10例。关于本研究的目的与研究过程,所有患者均知情同意,且获得本单位伦理委员会通过。将获得的组织样品冷存在 -80°C 冰箱备用。

喉癌Hep-2细胞和正常人下咽细胞(NHP)均购自中国典型培养物保藏中心,两者均在 37°C 、5% CO_2 的条件下,在含有10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640完全培养基中培养。

FBS、RPMI 1640完全培养基均购自美国Gibco公司,CCK-8细胞计数试剂盒购自上海碧云天生物科技公司,LipofectamineTM 2000、TRIzol试剂盒均和SuperScript III逆转录试剂盒购自美国Invitrogen公司,SYBR Green Realtime PCR Master Mix Kit试剂盒购自日本TaKaRa公司,Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自美国BD公司,SOX2和Tublin抗体购自美国Affinity biosciences公司,辣根过氧化物酶(HRP)的二抗购自美国Bioworld Technology公司,miR-NC(阴性对照)、miR-135a inhibitor、pcDNA空载体和pcDNA-SOX2质粒由上海吉玛公司合成。

1.2 细胞转染

Hep-2细胞以 1×10^6 /孔接种到6孔板,待细胞贴壁后换无血清培养基饥饿同步化12 h,使用LipofectamineTM 2000分别辅助转染miR-NC或miR-135a inhibitor 48 h,终浓度为100 nmol/L,分为NC组和miR-135a inhibitor组;再使用LipofectamineTM 2000分别把pcDNA空载体或pcDNA-SOX2转入miR-135a inhibitor组48 h,终浓度为50 nmol/L,分为miR-135a

inhibitor+SOX2-Con组和miR-135a inhibitor+SOX2-OE组。

1.3 qPCR检测喉癌组织和Hep-2细胞中miR-135a表达水平

通过TRIzol试剂盒提取肿瘤组织、癌旁组织和Hep-2细胞、NHP细胞中的总RNA。各样本总RNA经定量后,分别取1 μg RNA按SuperScript III逆转录试剂盒说明书步骤逆转录合成cDNA。分别取各样本cDNA和引物按照SYBR Green Realtime PCR Master Mix Kit试剂盒说明书步骤在ABI ViiATM7Dx实时PCR系统中进行qPCR反应。引物序列:miR-135a F为5'-TATGGCTTTTATTCCTATGTGA-3',R为5'-GCTGTCAACGATACGCTACCTA-3'; U6 F为5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',R为5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。反应条件:95℃预变性5 min,95℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 50 s,共40个循环;最后72℃延伸5 min。miR-135a以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算miR-135a的相对表达量。

1.4 CCK-8实验检测喉癌Hep-2细胞的增殖活性

各组Hep-2细胞经胰酶消化后,以500×g离心5 min收集细胞。用无血清培养基调整细胞密度后,分别以 5×10^3 个/孔的细胞种植到96孔板中,继续常规培养1~4 d。待达到处理时间点时,参照CCK-8试剂盒说明书步骤操作,每样品孔添加10 μl CCK-8试剂,37℃下孵育2 h,在酶标仪下检测450 nm波长处光密度(D)值。细胞增殖率=(实验组D/对照组D值)×100%。实验重复3次。

1.5 集落形成实验检测Hep-2细胞集落形成能力

各组Hep-2细胞经胰酶消化后,以500×g离心5 min收集细胞。用无血清培养基培养,分别以 5×10^2 个/孔的细胞密度种植到6孔板中,常规培养10 d,PBS洗2遍后,用4%的多聚甲醛固定细胞15 min,风干。使用吉姆萨染液染色10 min,在显微镜下计数Hep-2细胞集落形成数(以大于50个细胞计为是一个集落),计算集落形成率。

1.6 Transwell实验检测Hep-2细胞的迁移和侵袭能力

各组Hep-2细胞经胰酶消化后,以500×g离心5 min收集细胞。用无血清培养基调整细胞密度后,制作 1×10^5 个/ml的细胞悬液。对于细胞迁移测定,取100 μl细胞悬液接种于Transwell小室上室(8 μm孔径)上侧面,下室加入650 μl含10%胎牛血清的培养基,37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h。对于细胞侵袭测定,取100 μl细胞悬液接种于铺有Matrigel胶的Transwell小室上室(8 μm孔径),下室加入650 μl含10%胎牛血清的培养基,37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h。待达到处理时间终点时,取出小室,棉签擦

去微孔膜上室的细胞,PBS小心冲洗小室上下面2遍,4%多聚甲醛固定小室微孔膜下侧面的细胞15 min,0.1%结晶紫染色20 min,PBS冲洗小室,干燥后置于倒置显微镜(×100或×200)下观察,计数穿膜细胞数。

1.7 Annexin-V-FITC/PI染色流式细胞术检测Hep-2细胞的凋亡水平

NC组或miR-135a inhibitor组的Hep-2细胞经胰酶消化后,以500×g离心5 min收集细胞。用无血清培养基调整细胞,以 1×10^5 个/孔的细胞密度接种于60 mm培养皿。待细胞贴壁后,采用2.0 μmo/L的奥沙利铂处理细胞48 h,用胰酶消化后,用PBS以2 000×g重悬细胞2次。然后,根据Annexin V/PI试剂盒说明书步骤,细胞悬液与500 μl预冷的1×结合缓冲液和5 μl Annexin-V-FITC液混合,室温避光孵育15 min,再加入2.5 μl的PI液染色避光孵育10 min,流式细胞仪检测Hep-2细胞凋亡情况。

1.8 CCK-8法检测奥沙利铂处理后Hep-2细胞存活率

各组Hep-2细胞经胰酶消化后,以500×g离心5 min收集细胞。用无血清培养基调整细胞密度后,以 5×10^3 个/孔的细胞接种在96孔板中,待细胞贴壁后,分别给予0.5、1.0、1.5、2.0 μmol/L奥沙利铂处理各组细胞48 h,采用CCK-8检测细胞存活率。实验方法同1.5。

1.9 WB实验检测Hep-2细胞中SOX2蛋白的表达水平

取NC组或miR-135a inhibitor组的Hep-2细胞通过冰冷的裂解缓冲液裂解萃取总蛋白质。通过8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜在5%脱脂乳中室温下条件下封闭1 h,用一抗SOX2(1:1 000)和Tublin(1:8 000)室温孵育2 h,洗膜后,用HRP标记的二抗(1:5 000)室温孵育1.5 h。洗膜后,使用增强的化学发光系统使反应条带曝光,使用Quantity One v4.62图像分析系统定量条带强度。

1.10 统计学处理

1.4~1.9实验均重复3次。采用SPSS 20.0软件进行统计学数据分析,用GraphPad Prism 7软件绘制图片。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-135a在喉癌组织及Hep-2细胞中呈高表达

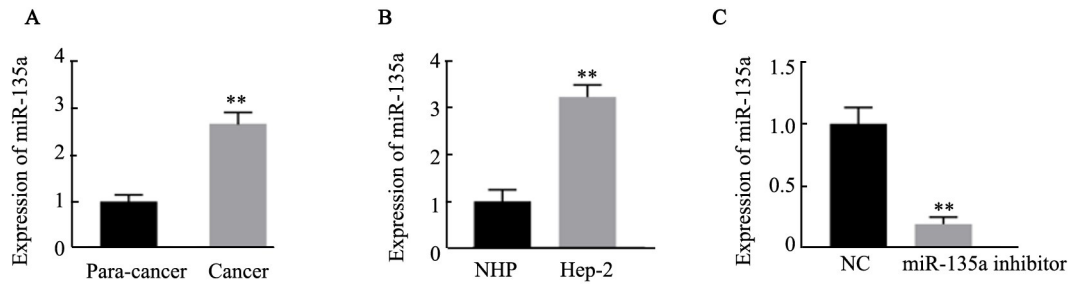
qPCR检测结果显示,与癌旁组织相比,喉癌组织中miR-135a呈高表达($P<0.01$,图1A);与正常

NHP 细胞比较, Hep-2 细胞中 miR-135a 亦呈高表达 ($P < 0.01$, 图 1B); 与 NC 组比较, miR-135a inhibitor 组 Hep-2 细胞中 miR-135a 呈低表达 ($P < 0.01$, 图 1C)。

2.2 敲降 miR-135a 抑制喉癌 Hep-2 细胞增殖活性及集落形成能力

CCK-8 法检测结果显示, 与 NC 组比较, miR-

135a inhibitor 组 Hep-2 细胞的增殖活性明显降低 ($P < 0.01$, 图 2A)。克隆集落形成实验检测结果显示, 与 NC 组比较, miR-135a inhibitor 组中 Hep-2 细胞集落形成能力显著降低 ($P < 0.01$, 图 2B)。上述结果表明, 下调 miR-135a 抑制 Hep-2 细胞的增殖活性及集落形成能力。

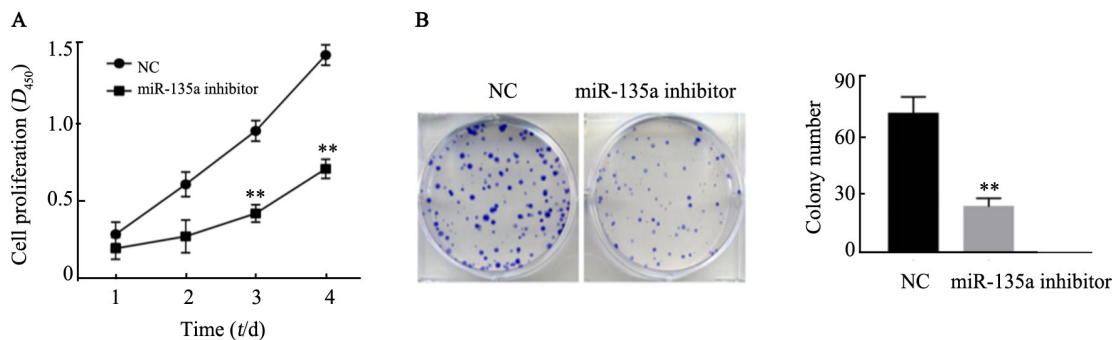


** $P < 0.01$ vs Para-cancer or NHP or NC group

A: The expression of miR-135a in para-cancerous tissues and cancer tissues; B: The expression of miR-135a in NHP cells and Hep-2 cells; C: The expression of miR-135a in Hep-2 cells transfected with miR-135a inhibitor for 48 h

图 1 miR-135a 在喉癌组织和 Hep-2 细胞的表达

Fig. 1 Expression of miRNA-135a in laryngeal cancer tissues and Hep-2 cells



** $P < 0.01$ vs NC group

图 2 敲降 miR-135a 对 Hep-2 细胞增殖活性(A)和集落形成能力(B)的影响

Fig. 2 Effect of miR-135a knockdown on cell viability (A) and colony formation (B) of Hep-2 cells

2.3 敲降 miR-135a 抑制 Hep-2 细胞的迁移及侵袭能力

Transwell 实验检测结果显示, 敲降 miR-135a, 与 NC 组比较, miR-135a inhibitor 组中 Hep-2 细胞侵袭 (图 3A) 和迁移 (图 3B) 能力显著下降 (均 $P < 0.01$); 上述结果表明, 敲降 miR-135a 抑制喉癌 Hep-2 细胞的迁移及侵袭能力。

2.4 敲降 miR-135a 提高 Hep-2 细胞对奥沙利铂敏感性

用 0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的奥沙利铂分别处理转染 miR-NC 和 miR-135a inhibitor 的 Hep-2 细胞 48 h 后, CCK-8 检测结果 (图 4A) 显示, 发现随着奥沙利铂浓度的增加, 2 组细胞的存活率均明显降低 ($P < 0.01$); 与 NC 组比较, miR-135a inhibitor 组细胞存活

率明显降低 ($P < 0.01$)。流式细胞术检测结果 (图 4B) 显示, 奥沙利铂为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 与 NC 组比较, miR-135a inhibitor 组的 Hep-2 细胞的凋亡率明显增加 ($P < 0.01$)。以上结果说明, 下调 miR-135a 促进 Hep-2 细胞对奥沙利铂的敏感性。

2.5 敲降 miR-135a 抑制 SOX2 表达调控奥沙利铂敏感性

WB 实验检测结果 (图 5A) 显示, 与 NC 组比较, miR-135a inhibitor 组 Hep-2 细胞中 SOX2 表达显著降低 ($P < 0.01$)。miR-135a inhibitor 质粒、对照 pcDNA 空载体 (SOX2-Con) 质粒、pcDNA-SOX2 (SOX2-OE) 质粒共转染 Hep-2 细胞, CCK-8、Transwell 及平板集落形成实验检测结果 (图

5B~D)显示,与miR-135a inhibitor+SOX2-Con组比较,miR-135a inhibitor+SOX2-OE组的Hep-2细胞增殖活性、克隆集落数、迁移与侵袭能力均明显增加($P<0.01$);同时,用不同摩尔浓度的奥沙利铂处理此2组细胞,CCK-8实验检测结果(图5E)显示,与miR-135a inhibitor+SOX2-Con组比较,

miR-135a inhibitor+SOX2-OE组的Hep-2细胞增殖率显著升高($P<0.01$)。上述结果表明,敲降miR-135a降低了SOX2在Hep-2细胞的表达;SOX2过表达抑制miR-135a敲低诱导的Hep-2细胞的低生长与转移状态,同时抑制了miR-135a敲降诱导的Hep-2细胞对奥沙利铂的敏感性。

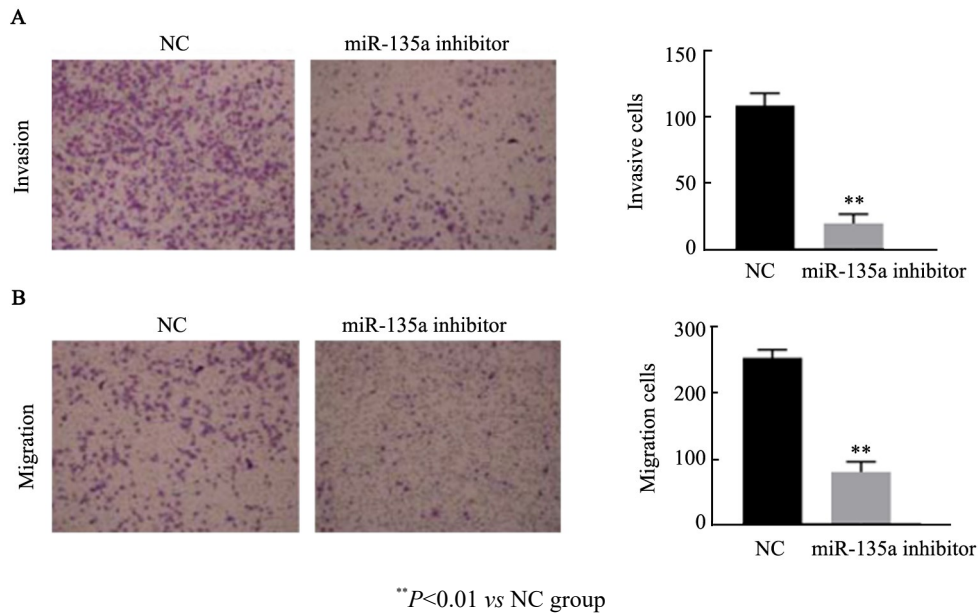


图3 敲降miR-135a对Hep-2细胞的侵袭(A)及迁移能力(B)的影响
Fig.3 Effect of miR-135a knockdown on invasion (A) and migration (B) of Hep-2 cells

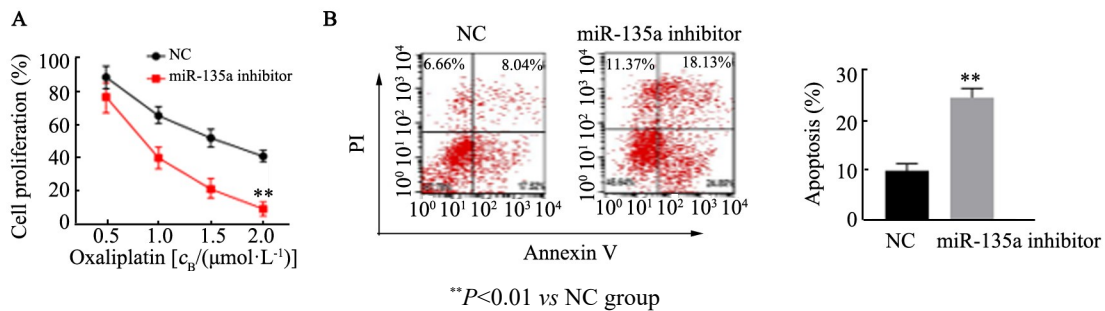


图4 敲降miR-135a促进Hep-2细胞对奥沙利铂的敏感性
Fig.4 Down-regulation of miR-135a promotes the sensitivity of Hep-2 cells to oxaliplatin

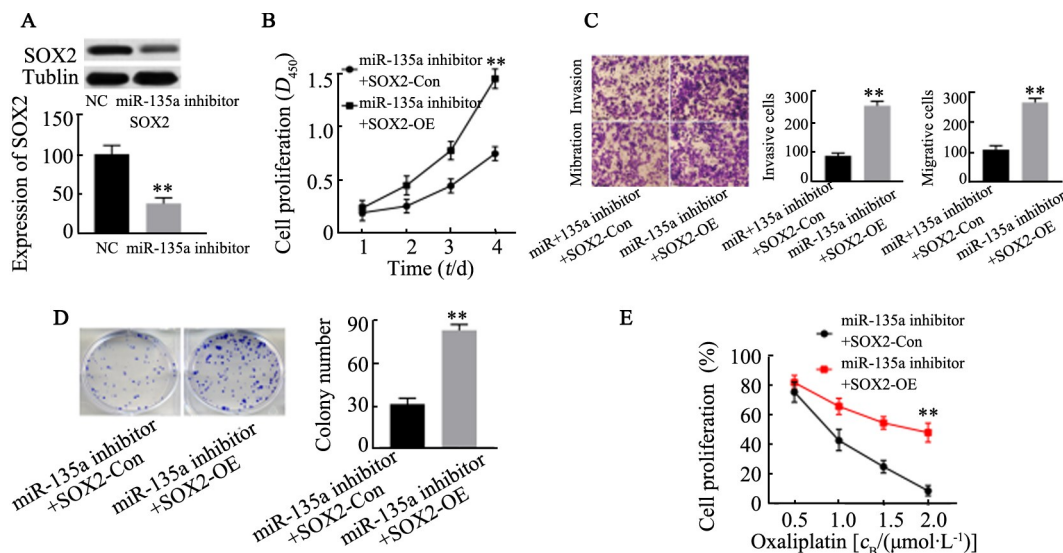
3 讨论

大量研究^[11-13]表明,miRNA在肿瘤初始化和进展中发挥重要作用。本研究证实了miR-135a在喉癌Hep-2细胞中呈高表达,敲降miR-135a后,Hep-2细胞增殖速率及细胞集落形成能力均显著下降,同时肿瘤细胞的侵袭能力及迁移能力也显著下降。

奥沙利铂是一种有效的治疗喉癌的化疗药物。

尽管喉癌在临床治疗中已经有较高的缓解率,但大多数患者仍对基于奥沙利铂的化疗方案敏感性不高^[14]。Hep-2细胞可以通过减少细胞对化疗药物的摄取、DNA复合物形成、DNA修复基因交替和转运蛋白修饰等降低细胞对奥沙利铂敏感性。有研究^[15]发现,miR-135a过表达可以使目前许多可用的化学治疗药物失效。本实验发现,在Hep-2细胞中,miR-135a inhibitor与奥沙利铂在抑制细胞活性和促进细胞凋亡方面具有协同作

用。以上结果证明, miR-135a 敲降能促进 Hep-2 细胞对奥沙利铂的敏感性。



**P<0.01 vs NC or miR-135a inhibitor+SOX2-Con group

A: After transfection with miR-NC or miR-135a inhibitor, the protein level of SOX2 was detected by WB; B: SOX2 over-expression reversed the effect of miR-135a inhibitor on Hep-2 cell proliferation viability; C: SOX2 over-expression reversed the effect of miR-135a inhibitor on Hep-2 invasion and migration (crystal violet staining,×200); D: SOX2 over-expression reversed the effect of miR-135a inhibitor on Hep-2 colony formation capacity; E: SOX2 over-expression reversed the effect of miR-135a inhibitor on the sensitivity of Hep-2 cells to oxaliplatin

图5 SOX2 参与 miR-135a 调节的 Hep-2 细胞增殖、迁移与奥沙利铂敏感性

Fig. 5 Sox 2 participates in the proliferation, metastasis and oxaliplatin-sensitivity of Hep-2 cells regulated by miRNA-135a

然而, miR-135a 敲降抑制 Hep-2 细胞增殖、迁移与促进对奥沙利铂敏感性的潜在机制尚未完全明白。有研究^[6]表明, SOX2 过表达与包括喉鳞状细胞癌在内的多种实体肿瘤相关。也有文献^[17-19]报道, SOX2 是肺癌和食管鳞癌中癌细胞增殖依赖性生长所必需的转录因子, 强调了 SOX2 作为癌基因的重要性。为此, 本研究观察了对 Hep-2 细胞 miR-135a 敲降是否能影响 SOX2 表达, 结果发现, miR-135a 敲降抑制了 SOX2 表达。为进一步证明 SOX2 参与 miR-135a 敲降对 Hep-2 细胞生物学的作用, 本实验在转染 miR-135a inhibitor 的 Hep-2 细胞上再次转染 pcDNA-SOX2, 使之过表达 SOX2, 发现转染 pcDNA-SOX2 能逆转 miR-135a inhibitor 对 Hep-2 细胞增殖、迁移与奥沙利铂的敏感性的调控作用。这一结果证实, SOX2 参与 miR-135a 敲降对 Hep-2 细胞增殖、迁移与奥沙利铂的敏感性的调控作用。

综上所述, miR-135a 敲降能抑制喉癌 Hep-2 细胞生长、转移及提高奥沙利铂的敏感性; 同时也证明了在这一调节作用中, 可能与 SOX2 低表达相关。

[参考文献]

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/

caac.21262.

[2] DUTTA R, HUSAIN Q, KAM D, et al. Laryngeal papillary squamous cell carcinoma: A population-based analysis of incidence and survival[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2015, 153(1): 54-59. DOI:10.1177/0194599815581613.

[3] MOSKOVITZ J M, MOY J, SEIWERT T Y, et al. Immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma: A review of current and emerging therapeutic options[J/OL]. Oncologist, 2017, 22(6): 680-693[2019-05-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5469583/>. DOI:10.1634/theoncologist.2016-0318.

[4] ZHANG Y, HU Y, FANG J Y, et al. Gain-of-function miRNA signature by mutant p53 associates with poor cancer outcome[J/OL]. Oncotarget, 2016, 7(10): 11056-11066[2019-05-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4905457/>. DOI: 10.18632/oncotarget.7090.

[5] TUTAR Y. MiRNA and cancer; computational and experimental approaches[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2014, 15(5): 429.

[6] TUTAR L, ÖZGÜR A, TUTAR Y. Involvement of miRNAs and pseudogenes in cancer[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1699: 45-66. DOI:10.1007/978-1-4939-7435-1_3.

[7] WANG Q J, ZHANG H C, SHEN X J, et al. Serum microRNA-135a-5p as an auxiliary diagnostic biomarker for colorectal cancer[J]. Ann Clin Biochem, 2017, 54(1): 76-85. DOI:10.1177/0004563216638108.

[8] ZHANG C L, CHEN X Q, CHEN X J, et al. MiR-135a Acts as a tumor suppressor in gastric cancer in part by targeting KIFC1[J/OL]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 3555-3563[2019-05-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4913988/>. DOI: 10.2147/OTT.

- S105736.
- [9] AHMAD A, ZHANG W J, WU M M, et al. Tumor-suppressive miRNA-135a inhibits breast cancer cell proliferation by targeting ELK1 and ELK3 oncogenes[J]. *Genes Genomics*, 2018, 40(3): 243-251. DOI:10.1007/s13258-017-0624-6.
- [10] ZENG Y B, LIANG X H, ZHANG G X, et al. MiRNA-135a promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion by targeting forkhead box O1[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2016, 16: 63[2019-05-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4970272/>. DOI:10.1186/s12935-016-0328-z.
- [11] SHI W, GERSTER K, ALAJEZ N M, et al. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(8): 2926-2937. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3369.
- [12] ALAJEZ N M, LENARDUZZI M, ITO E, et al. MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(6): 2381-2391. DOI:10.1158/0008-5472.can-10-2754.
- [13] 李国彬, 张占成, 王新颜. 上调 miR-200b 对人喉癌 Hep-2 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2018, 32(4): 53-57.
- [14] 高蕾, 张红军, 姜韬, 等. 多烯磷脂酰胆碱与奥沙利铂协同抗胃癌细胞增殖的研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2015, 20(12): 1074-1079.
- [15] HUI L, ZHANG J, DING X, et al. Serine/threonine kinase, Melk, regulates proliferation and glial differentiation of retinal progenitor cells [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(4): 1439-1447. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2017.02104.x.
- [16] 孙丹, 武洋, 辛彦. SOX2 和 Cdx2 基因编码蛋白在胃癌及其癌前病变中的表达及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(10): 1585-1591. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2016.10.024
- [17] BASS A J, WATANABE H, MERMEL C H, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(11): 1238-1242. DOI: 10.1038/ng.465
- [18] 赵璐, 宋永波, 张艳琴, 等. 血管内皮生长因子和 SOX2 在肺鳞状细胞癌中的表达及其与预后的关系[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(23): 3880-3885.
- [19] WUEBBEN E L, RIZZINO A. The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 44917-44943[2019-05-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5546531/>. DOI:10.18632/oncotarget.16570.

[收稿日期] 2019-06-11

[修回日期] 2019-07-18

[本文编辑] 王映红