

microRNA-107 通过靶向调节 *CACNA2D1* 抑制喉癌细胞的增殖和侵袭能力*

黄朝平¹ 王轶¹ 黄石¹ 王振晓² 刘良发²

[摘要] 目的:检测 microRNA-107(miR-107)和钙通道蛋白基因 *CACNA2D1* 在喉癌组织中的表达,探讨 miR-107 与 *CACNA2D1* 的靶向关系,分析 miR-107 对喉癌细胞的增殖、侵袭及克隆形成能力的影响。**方法:**收集 40 例喉癌及癌旁正常组织标本,运用 qRT-PCR 检测 miR-107 和 *CACNA2D1* 的表达,使用免疫印迹实验检测 2 种组织中钙通道蛋白 $\alpha 2\delta 1$ 的表达;使用双荧光素酶报告基因检测 miR-107 对 *CACNA2D1* 的调节作用;在人喉癌细胞 TU212 及 TU686 中过表达或敲减 miR-107,检测喉癌细胞增殖、克隆形成及侵袭能力的变化。**结果:**miR-107 在喉癌组织中的表达显著低于癌旁正常组织,而 *CACNA2D1* 的表达则正好相反,差异有统计学意义($P < 0.05$);喉癌组织中的 $\alpha 2\delta 1$ 表达明显高于癌旁正常组织($P < 0.05$);双荧光素酶报告基因实验证实,miR-107 通过与 *CACNA2D1* 基因 mRNA 的 3'-UTR 端 2 个位点(202-209,902-908)靶向结合,从而抑制 *CACNA2D1* 的表达及其生物学作用;细胞实验显示,过表达 miR-107 后喉癌细胞增殖、克隆形成及侵袭能力明显下降($P < 0.05$),而敲减 miR-107 后细胞增殖、克隆形成和侵袭能力明显增强($P < 0.05$)。**结论:**miR-107 通过靶向调节 *CACNA2D1* 从而抑制喉癌细胞的增殖、克隆形成及侵袭能力。

[关键词] microRNA-107; *CACNA2D1*; 喉肿瘤; 增殖; 侵袭

doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2020.10.011

[中图分类号] R739.65 **[文献标志码]** A

MicroRNA-107 inhibits the proliferation and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma cells by targeting *CACNA2D1*

HUANG Chaoping¹ WANG Yi¹ HUANG Shi¹ WANG Zhenxiao² LIU Liangfa²

(¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, 610500, China; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University)

Corresponding author: LIU Liangfa, E-mail: liuliangfa301@263.net

Abstract Objective: To detect the expression of microRNA-107 (miR-107) and the calcium channel protein gene *CACNA2D1* in laryngeal cancer tissues, to investigate the targeting relationship between miR-107 and *CACNA2D1*, and to analyze the effects of miR-107 on the proliferation, invasion and colony forming ability of laryngeal cancer cells. **Method:** Laryngeal cancer tissues and normal adjacent tissue samples from 40 patients with laryngeal cancer were collected, and qRT-PCR was used to detect the expression of miR-107 and *CACNA2D1*; Western Blot assay to detect the expression of $\alpha 2\delta 1$ in the above two tissues; the dual-luciferase reporter gene was used to detect the regulatory effect of miR-107 on *CACNA2D1*; after overexpression or knockdown of miR-107 in human laryngeal cancer cells TU212 and TU686, changes in the proliferation, clone formation, and invasion ability of laryngeal cancer cells were detected. **Result:** The expression of miR-107 in laryngeal cancer tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues, while the expression of *CACNA2D1* was just the opposite, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the expression of $\alpha 2\delta 1$ in laryngeal cancer tissues is significantly higher than in normal tissues ($P < 0.05$); dual-luciferase reporter experiments confirmed that miR-107 binds to the 3'-UTR (202-209, 902-908) of the *CACNA2D1* mRNA, thereby inhibiting the expression of *CACNA2D1* and its biological effects; cell experiments showed that the proliferation, invasion, and clone formation of laryngeal cancer cells were significantly reduced after miR-107 overexpression ($P < 0.05$), and the cell proliferation, clone formation, and invasion were significantly enhanced after miR-107 was knocked down ($P < 0.05$). **Conclusion:** miR-107 inhibits the proliferation, clone formation, and invasion of laryngeal cancer cells by targeting *CACNA2D1*.

Key words microRNA-107; *CACNA2D1*; laryngeal neoplasms; proliferation; invasiveness

*基金项目:成都医学院科研课题(No:CYZ17-33)

¹成都医学院第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科(成都,610500)

²首都医科大学附属北京友谊医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:刘良发, E-mail:liuliangfa301@263.net

在我国头颈恶性肿瘤中,喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)的发病率仅次于鼻咽癌^[1],其主要治疗方式包括手术和放疗。虽然随着新技术的应用,患者的生存率有所提高,但手术和放疗的并发症严重影响了患者的生存质量。精准的分子靶向治疗是挽救恶性肿瘤患者生命并提高生存质量最有效的方式之一^[2],因此,我们希望找到能够在 LSCC 治疗中发挥关键作用的分子。研究证实,微小 RNA(microRNA)通过与靶基因 mRNA 的 3'端非翻译区(3'-UTR)结合,对 mRNA 进行切断或者抑制靶基因的转录后翻译,从而发挥生物学作用。microRNA(miRNA)在恶性肿瘤的起病、进展、转移等过程中发挥着重要作用,并且有望成为肿瘤诊断和治疗的潜在靶点。我们之前的研究发现^[3],电压门控式钙通道蛋白 $\alpha 2\delta 1$ 具有成为喉癌肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)标志物的潜质, $\alpha 2\delta 1$ 具有促进喉癌细胞成球、侵袭、体内成瘤等作用。而通过生物信息学分析发现, miRNA-107(miR-107)具有与 $\alpha 2\delta 1$ 编码基因 *CACNA2D1* 的 mRNA 3'-UTR 潜在结合的位点,并且 miR-107 在多数恶性肿瘤中发挥着抑癌作用,但 miR-107 与 *CACNA2D1* 在 LSCC 中的相互作用关系目前研究甚少。因此,我们希望通过实验,检测 miR-107 和 *CACNA2D1* 在 LSCC 组织中的表达情况,同时通过细胞实验分析它们之间是否存在靶向调节作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2014-01—2017-08 在北京友谊医院行喉癌手术的 40 例患者的组织标本,每位患者均同时

取喉癌组织和癌旁正常组织(距肿瘤边缘至少 2 cm)。所有标本均在离体后 2 min 内放入液氮保存,所有癌组织经病理学检查证实为 LSCC,癌旁正常组织未见癌细胞。患者均为男性,年龄 48~74 岁,平均 61.1 岁。均为第 1 次手术,术前未行放疗、化疗等辅助治疗。病理证实颈淋巴结转移者 14 例,无淋巴结转移 26 例;低分化 6 例,中高分化 34 例;I~II 期 10 例,III~IV 期 30 例;声门型 27 例,声门上型+声门下型 13 例。本研究通过了北京友谊医院伦理委员会的批准。

1.2 材料

人喉癌细胞株 TU212 和 TU686 购自上海慧颖生物科技有限公司;胎牛血清、DMEM 培养液、Opti-MEM 培养液、双抗、0.25%胰蛋白酶、OPTI-MEM 购自 Gibco;Lipofectamine™2000、Trizol 购自美国 Invitrogen;MTT 购自美国 Sigma 公司;SYBR Green Master Mix、HiScript Reverse Transcriptase(RNase H)购自南京诺唯赞公司;miR-107 模拟物(agomiR-107)、miR-107 抑制剂(antagomiR-107)以及相应阴性对照(agomiR-107 NC, antagomiR-107 NC)由上海吉玛公司合成;Transwell 购自 BD Biosciences; *CACNA2D1* 单克隆抗体和微量移液器购自 ThermoFisher 公司;倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;Taq Plus DNA Polymerase、DL2000 DNA Marker、dNTP 购自天根公司;双荧光素酶检测试剂盒(#RG027)购自碧云天生物技术有限公司;miR-107 和 *CACNA2D1* 特异性引物、内参 U6 和 *GAPDH* 引物由北京天一辉远公司合成,引物序列见表 1。

表 1 各基因引物

基因	正向	反向
Has-miR-107	5'-TGCGCAGCAGCATTGTACAGGGC-3'	5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'
U6	5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'	5'-AAATATGGAACGCTTCACGA-3'
<i>CACNA2D1</i>	5'-GCATTGGAAGCGGAGAAAGT-3'	5'-GGAATATGGACTGCTGCGTG-3'
<i>GAPDH</i>	5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3'	5'-CAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3'

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将 TU212 和 TU686 细胞从液氮中取出,快速放入 37℃ 水浴锅中,把解冻后的细胞转移到含有 5 mL 培养液的离心管中,离心收集细胞,室温 1200 r/min 离心 3 min,弃上清;用完全培养液(DMEM+10%FBS+1%双抗)悬浮细胞,接种到培养皿中,吹打混匀,37℃ 5%CO₂ 饱和湿度条件下培养。取对数期生长良好的细胞用于实验。

1.3.2 实时荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR) 使用 Trizol 法分别提取收集喉癌组织及癌旁正常组织

中的总 RNA,对 A260/A280 在 1.8~2.0 之间的 RNA 标本进行逆转录,利用 HiScript 逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录出 miR-107/*CACNA2D1* 和 U6/*GAPDH*(作内参)的 cDNA,反应条件:25℃ 5 min,50℃ 15 min,85℃ 5 min,4℃ 10 min。然后使用 SYBR Green Master Mix 试剂盒按照说明书进行 qRT-PCR,反应系统(共 20 μ L)包括以下物质:SYBR Green Master Mix(10 μ L),正向引物(0.4 μ L,10 μ mol/L),反向引物(0.4 μ L,10 μ mol/L),cDNA(4 μ L,稀释比例 1:10),50x ROX 参考

染料 2(0.4 μL)和蒸馏去离子水(4.8 μL)。反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 cycles。所有实验重复 3 次。运用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析相应基因的相对表达水平,重复 3 次。

1.3.3 蛋白免疫印迹 用放射免疫沉淀缓冲液提取喉癌及正常组织中的总蛋白。以 GADPH 为内参,按说明书使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度,根据 OD 值利用回归方程计算出样品蛋白浓度。在变性条件下,通过 12% 十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质样品(40 μg /孔),并使用湿转移法转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。转膜条件为:GAPDH-200 mA 90 min,CACNA2D1-200 mA,120 min 后 300 mA 30 min。将 PVDF 膜浸入含有 5% 脱脂奶的 TBST 中,在室温下封闭 2 h,然后与 CACNA2D1 单克隆抗体(1:500)一起孵育,兔抗 GAPDH(1:1000)抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用 TBST 将 PVDF 膜清洗 5~6 次,每次 5 min。然后清洗印迹,并与 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(1:50 000)孵育 2 h。用 TBST 洗涤后,将 ECL 底物溶液与稳定的过氧化物酶溶液以 1:1 的比例混合,然后将其添加到 PVDF 膜中。使用 UVP 图像分析系统检测免疫反应带,使用 BandScan 5.0 软件估计目标蛋白 $\alpha 2\delta 1$ 的表达水平。

1.3.4 细胞转染 将处于对数生长期的 TU212 和 TU686 细胞按每孔 5×10^5 个细胞均匀地接种到 6 孔板中,培养至 70% 密度。转染前 2 h 换成无血清培养液。转染分组分为 agomiR NC 组,agomiR-107 组,antagomiR NC 组,antagomiR-107 组,同时设置空白对照组。转染组均按下面的方法准备:用 100 μL 无血清 opti-MEM 稀释 10 μL 小片段,取 5 μL 的 LipofectamineTM2000 稀释在 100 μL opti-MEM 中,混合 LipofectamineTM2000 和小片段混合物稀释液(总体积为 200 μL),混匀静置 20 min;每个培养孔加转染复合物混合液 200 μL ,混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱中培养,4 h 后吸出混合液换入正常培养液,继续培养 24 h。

1.3.5 预测靶点及双荧光素酶报告基因实验 使用 TargetScan, PicTar 和 miRDB 在线软件预测,发现 miR-107 与 CACNA2D1 的 3'-UTR 保守区域具有 2 个潜在的结合位点(202-209,902-908)。为了构建萤光素酶报道载体,扩增了覆盖目标基因 CACNA2D1 上假定的 hsa-miR-107 结合位点的 3'-UTR 片段。引物序列如下:正向:5'-GGT-TCTTTTCCAACGCTATT-3';反向:5'-GACT-CATTTAGATCCTCACAC-3'。通过 DNA 测序验证所有构建体。萤光素酶报告基因实验在 TU686 细胞系中进行。转染前 1 天,将细胞以 2×10^5 个细胞/孔的密度接种到 12 孔板中,然后接种

pYr-MirTarget-homo CACNA2D13'-UTR(202-209,2 μg)和 pYr-MirTarget-homo CACNA2D1 3'-UTR(902-908,2 μg)与 agomiR-107(0.1 nmol/L), agomiR NC(0.1 nmol/L), antagomiR-107(0.1 nmol/L)或 antagomiR NC(0.1 nmol/L)共转染。转染 48 h 后,使用双荧光素酶检测试剂盒测量相对萤光素酶活性。还同时构建了 2 个与 CACNA2D1 3'-UTR 中的 2 个种子区域有关的突变载体,第 1 个载体是 pYr-MirTarget-homo CACNA2D1 3'-UTR 202-209mut,第 2 个载体是 pYr-MirTarget-homo CACNA2D1 3'-UTR 902-908mut。转染和萤光素酶测定程序与上述类似,重复 3 次。

1.3.6 细胞增殖实验(MTT) 转染后,将细胞分为空白对照组,agomiR NC 组,agomiR-107 组,antagomiR NC 组和 antagomiR-107 组。将转染的细胞以 5×10^3 个细胞接种到 96 孔板中,每组有 3 个重复孔。向每个孔中加入 10 μL MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐],37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h,吸出培养液,并将细胞与 150 μL DMSO 孵育 10 min。使用酶标仪在 490 nm 处测量吸光度,重复 3 次。

1.3.7 细胞克隆形成实验 稀释经转染后的细胞悬液,并将每组以 250 个细胞/孔的细胞密度接种在 6 孔板中,每组 3 个重复孔,孵育 2 周。当观察到有宏观克隆形成时,进行结晶紫染色 30 min。用显微镜拍摄并计数菌落数。

1.3.8 细胞侵袭实验 取上述转染后的 TU212 及 TU686 细胞,稀释细胞浓度至 2×10^5 /ml。在 24 孔板中加入 800 μL 10% FBS DMEM 培养液(含双抗),在 transwell 小室上室底部中央垂直加入 100 μL 终浓度为 1 mg/mL 的 Matrigel,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4~5 h 使其干成胶状,待 Matrigel 干成胶状后,在 transwell 上室分别接入 200 μL 各组细胞悬液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱培养 48 h;取出 transwell 用 PBS 清洗,用 70% 冰乙醇溶液固定细胞 1 h;用 0.5% 结晶紫染液染色,室温中放置 20 min,PBS 清洗,用干净的棉球将上室一侧的未侵袭的细胞擦干净,显微镜下观察拍照计数。

1.4 统计学处理

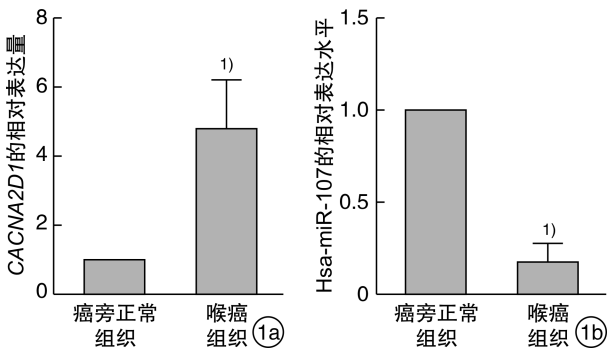
采用 GraphPad Prism 6 和 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。使用 Image J 软件对蛋白免疫印迹(Western Blot, WB)条带、增殖及侵袭能力的结果进行分析。所有计量资料数据均进行正态分布检验和方差齐性检验,符合正态分布的数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间样本均数的比较采用 Student's *t* 检验,多组间计量资料的比较采用 One-Way ANOVA 检验,符合非正态分布的变量表示为中位数 \pm 四分位数。正态分布采用 Kolmogorov-

Smirnov(KS)方法检测。对于符合正态分布且方差齐的数据,不满足方差齐性的数据采用 Welch's ANOVA 检验。通过独立 *t* 检验分析两组间数据的统计学差异,采用析因分析多组间差异及组内差异的比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测结果

通过图 1 可以看出,与癌旁正常组织相比,喉癌组织中的 *CACNA2D1* 相对表达水平明显升高,而 miR-107 相对表达水平明显降低,两者相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。



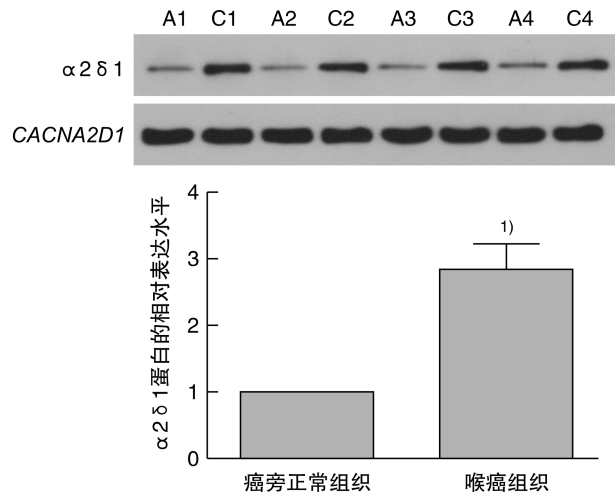
1a:同癌旁正常组织相比,*CACNA2D1* 在喉癌组织中的表达明显升高;1b:同癌旁正常组织相比,miR-107 在喉癌组织中的表达明显降低;与癌旁正常组织比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 1 *CACNA2D1* 和 miR-107 在 2 种组织中的相对表达水平比较

2.2 WB 检测结果

通过 WB 相对定量检测可以看出,在喉癌组织中 $\alpha 2\delta 1$ 蛋白的相对表达水平较癌旁正常组织明显

增高(图 2),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

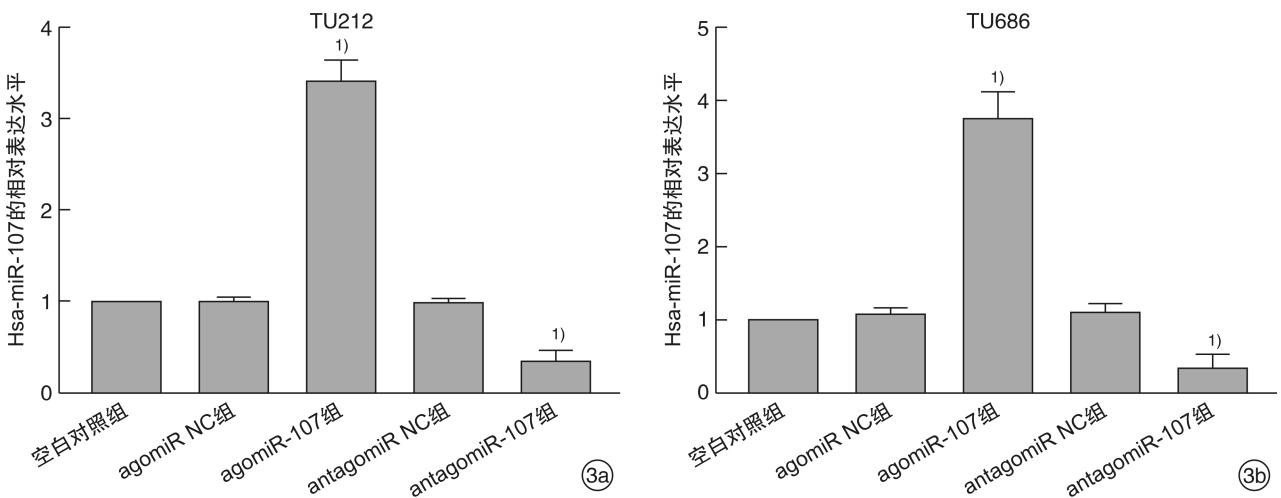


A1、A2、A3、A4: 分别代表 1、2、3、4 号患者的癌旁正常组织;C1、C2、C3、C4: 分别代表 1、2、3、4 号患者的喉癌组织;与癌旁正常组织比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 2 WB 检测 LSCC 患者喉癌组织与癌旁正常组织中 $\alpha 2\delta 1$ 蛋白相对表达情况

2.3 miR-107 的转染率

使用 agomiR NC, agomiR-107, antagomiR NC 或 antagomiR-107 分别转染 TU212 和 TU686 细胞后, qRT-PCR 检测显示, agomiR-107 组中的 miR-107 显著增加,而 antagomiR-107 组中的 miR-107 相对表达水平则显著下降(图 3),与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。证实细胞转染是成功的,这为下一步细胞学实验奠定了良好的基础。



经过转染后, TU212(3a)和 TU686(3b)细胞系的 agomiR-107 组中的 miR-107 相对表达水平显著增加,而 antagomiR-107 组中的 miR-107 相对表达水平则显著下降;与空白对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

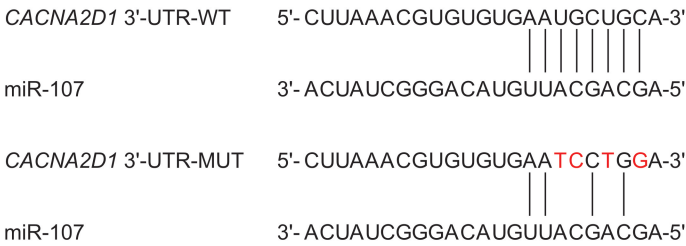
图 3 qRT-PCR 检测结果

2.4 双荧光素酶报告基因检测结果

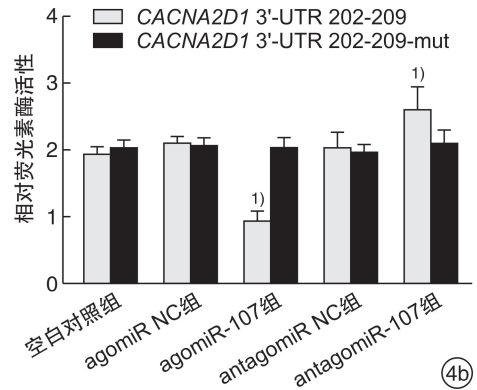
通过软件预测在 *CACNA2D1* 的 3'-UTR 保守区域中有 2 个潜在的 miR-107 结合位点(位点 A: 202-209, 位点 B: 902-908), 将包含 *CACNA2D1* 野生型或突变型 3'-UTR 的报告基因表达载体克隆到荧光素酶基因的下流(图 4a, c), 进行双荧光素酶报告基因检测。在位点 A(图 4b), agomiR-107 使

荧光素酶活性降低了 55.6% ($P < 0.05$), 在位点 B(图 4d), agomiR-107 使荧光素酶活性降低了 80.6% ($P < 0.05$), agomiR-107 在 A 点的抑制作用弱于在 B 点; 此外, antagomiR-107 在 2 个结合位点均增强了荧光素酶活性(均 $P < 0.05$)。结果表明, miR-107 可以直接靶向抑制 *CACNA2D1*。

Position 202-209 of *CACNA2D1* 3'-UTR

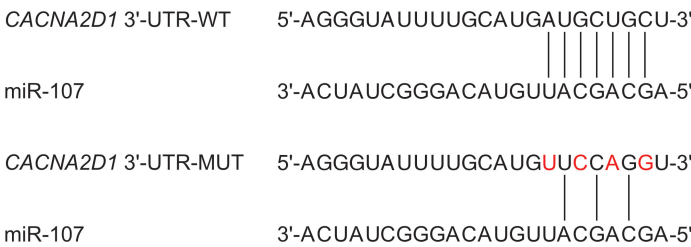


④a

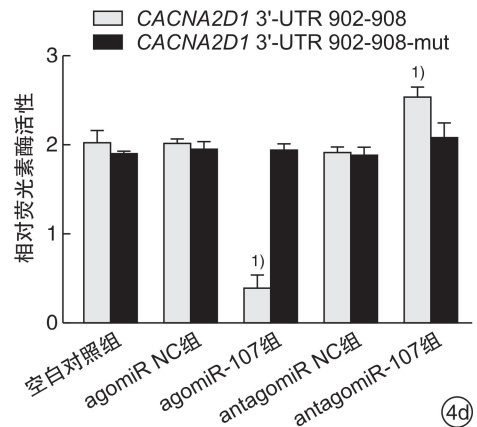


④b

Position 902-908 of *CACNA2D1* 3'-UTR



④c



④d

4a, 4c: *CACNA2D1* mRNA 3'-UTR 的野生型和突变型与 miR-107 的结合位点(位点 A: 202-209, 位点 B: 902-908); 4b, 4d: miR-107 在位点 A 和位点 B 的异位表达抑制了 *CACNA2D1* 3'-UTR 控制的荧光素酶活性; 与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 双荧光素酶报告基因检测

2.5 miR-107 抑制了喉癌细胞的增殖率

MTT 实验证实, 将 agomiR-107, antagomiR-107 和相应的阴性对照转染到 2 个细胞系后, 2 个细胞系的增殖率受到显著影响。与空白对照组相比, agomiR-107 组的 TU212 细胞增殖率降低了 30.1% ($P < 0.05$), 而 antagomiR-107 组的 TU212 细胞增殖率提高了 130.3% ($P < 0.05$), 见图 5a。TU686 细胞实验结果类似, agomiR-107 组的增殖率降低了 38.4% ($P < 0.05$), 而 antagomiR-107 组的增殖率提高了 138.9% ($P < 0.05$), 见图 5b。结果表明, miR-107 显著抑制了 LSCC 细胞的增殖。

2.6 miR-107 抑制喉癌细胞克隆形成能力

TU212 和 TU686 细胞克隆形成实验结果表明, 2 个 LSCC 细胞系中 agomiR-107 组的克隆数

显著低于空白对照组 ($P < 0.05$), 并且在 antagomiR-107 组中形成的克隆数高于空白对照组 ($P < 0.05$), 见图 6。说明 miR-107 可以抑制 LSCC 细胞中克隆的形成。

2.7 miR-107 抑制喉癌细胞的侵袭

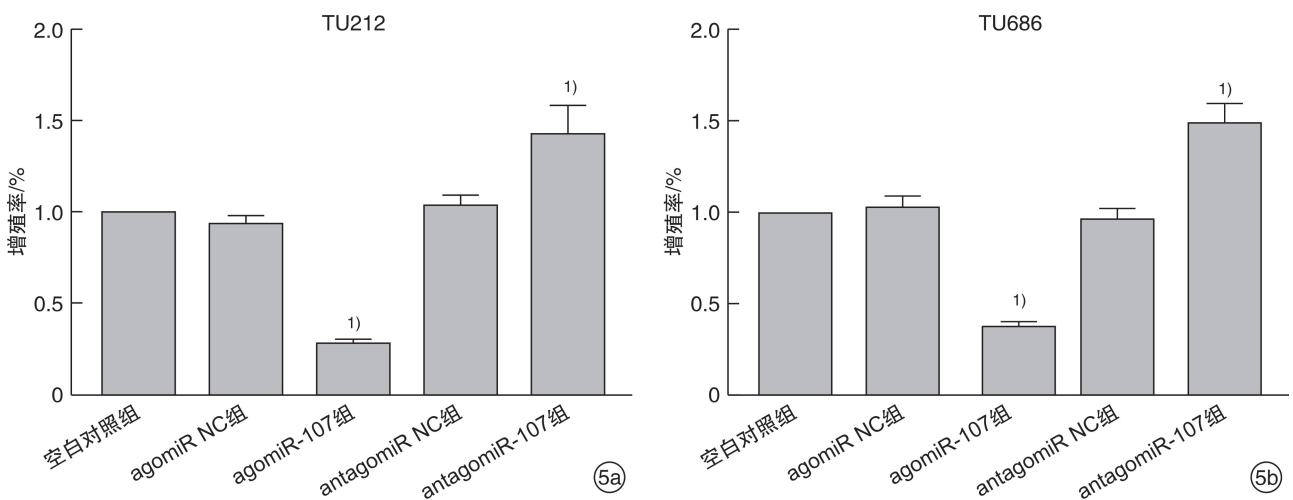
细胞侵袭实验结果证实, 转染 agomiR-107, antagomiR-107 和相应的阴性对照后, 与对应的空白对照组比较, agomiR-107 组 TU212 和 TU686 细胞的侵袭细胞数明显减少 ($P < 0.05$), 而 antagomiR-107 组的侵袭细胞数明显增加 ($P < 0.05$), 见图 7。结果表明 miR-107 能够显著抑制 LSCC 细胞的侵袭。

3 讨论

在恶性肿瘤的治疗探索中, 除了常规的手术和

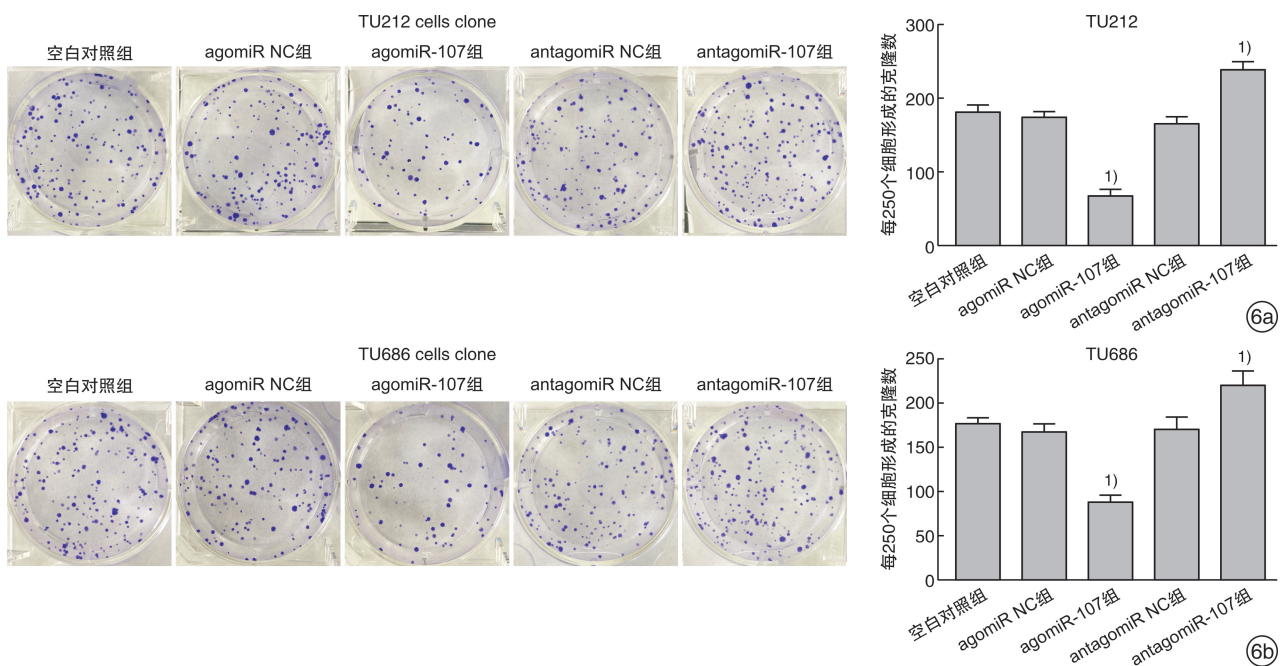
放化疗之外,目前已有多种分子靶向治疗的药物面世并且取得了良好的效果,但这些靶向药物针对 LSCC 的治疗效果尚不理想,问题的关键在于尚未找到一个确切的靶点。CSC 学说已经被学者所公认^[4],它是指肿瘤中的一小群特殊的细胞,通过自我更新和无限增殖维持肿瘤细胞群的生命力,因此,精确找到 CSC 并且对其进行有针对性的攻击是肿瘤精准治疗的核心内容。有学者证实电压门控钙通道亚基 $\alpha 2\delta 1$ 蛋白具有成为肝癌^[5]、胃癌^[6]、肺癌^[7]等肿瘤的 CSC 标志物的潜质, $\alpha 2\delta 1$ + 细胞

在肿瘤的分化、自我更新、药物抵抗、放射耐受、成瘤等方面明显强于 $\alpha 2\delta 1$ -细胞,我们之前的研究也证实了 $\alpha 2\delta 1$ 在 LSCC 中具有类似的作用^[3]。本课题我们首先进行了组织学实验,WB 证实了 $\alpha 2\delta 1$ 在喉癌组织中明显高表达($P < 0.05$),提示 $\alpha 2\delta 1$ 很可能在喉癌的发生、进展等方面发挥相关作用。 $\alpha 2\delta 1$ 通过控制肿瘤细胞的自发性钙震荡,从而实现自我更新、致瘤性以及存活^[8]。从理论上推测,找到抑制或消灭 $\alpha 2\delta 1$ + 细胞的分子,即有可能更彻底地清除肿瘤,从而对肿瘤治疗提供极大的帮助。



5a、5b: 2 种细胞经转染后,培养 48 h, agomiR-107 组与空白对照组比较,增殖率显著降低; antagomiR-107 组与空白对照组比较,增殖率显著增加;与空白对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 5 miR-107 抑制 LSCC 细胞的增殖率

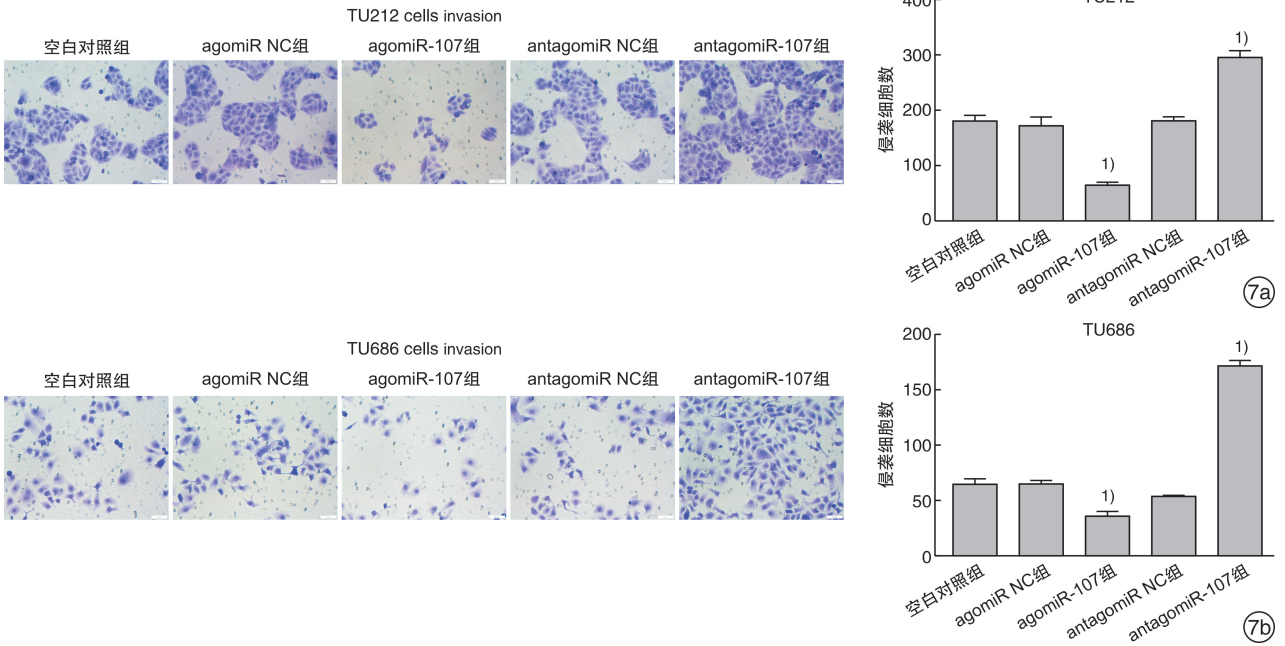


TU212(6a)和 TU686(6b)细胞集落形成的照片以及各组细胞克隆数量比较的直方图,miR-107 能抑制 LSCC 细胞克隆形成;与空白对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 6 2 种 LSCC 细胞的克隆形成实验结果

miRNAs 是一类内源性的短链非编码 RNA 家族,是由 19~24 个核苷酸组成的内源非编码单链小 RNA,miRNA 通过与靶基因 mRNA 的 3'-UTRs 的不完全碱基配对形成 RNA 诱导沉默复合体对 mRNA 稳定性或者翻译起负调节作用,调节体内约 1/3 的基因。miRNAs 表达水平与原发肿

瘤的侵袭范围、病理分型、分化程度、淋巴结转移、外科治疗和放疗的治疗效果及术后生存时间均密切相关^[9]。miRNA 也被证明是充满前景的生物标志物和合适的治疗靶点。本研究想证实 miRNA 家族是否能够抑制 $\alpha 2\delta 1$ 的编码基因 *CACNA2D1* 从而发挥抑制肿瘤细胞恶性特质的作用。



TU212(7a)和 TU686(7b)细胞的 agomiR-107 组侵袭细胞数较空白对照组明显降低,而 antagomiR-107 组的侵袭细胞数显著增加;与空白对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 7 5 组喉癌细胞间侵袭能力比较

我们首先通过多个在线数据库 (TargetScan, PicTar 和 miRDB) 进行预测,发现 *CACNA2D1* 的 mRNA 3'-UTR 有 2 个位点可能与 miR-107 结合,故初步决定将 miR-107 确定为我们的研究对象。在神经胶质瘤^[10]、肺癌^[11]、肝癌^[12] 等恶性肿瘤的研究中发现,miR-107 扮演着“抑癌者”的角色,其在肿瘤组织中低表达,过表达 miR-107 可使肿瘤细胞的迁移、侵袭、增殖、耐药等特性受到抑制;但在胃癌^[13]、胰腺癌^[14] 等恶性肿瘤中,miR-107 却是作为一种“促癌基因”而存在。因此 miR-107 是通过调控不同的基因从而发挥“促癌”或者“抑癌”的作用。我们通过喉癌组织 qPCR 发现,miR-107 与 *CACNA2D1* 表达呈负相关,提示 miR-107 有可能直接抑制 *CACNA2D1* 基因从而发挥作用。

我们紧接着进行了双荧光素酶报告基因实验,试图证实 miR-107 与 *CACNA2D1* 存在结合位点,结果也证实了我们的预测,并且,miR-107 与 *CACNA2D1* 的 3'-UTR 的 2 个潜在结合点 (202-209, 902-908) 均能够结合,并抑制了 *CACNA2D1* 的转录后翻译。本研究结果显示,在 902-908 这个结合位点结合后荧光素酶活性降低了 80.6%,较 202-

209 这个位点的抑制作用更强。由此我们推测,既然在我们前期的研究中已经证实了 $\alpha 2\delta 1$ 具有促进肿瘤细胞恶性特质的作用^[3],那么 miR-107 与 $\alpha 2\delta 1$ 蛋白的编码基因 *CACNA2D1* 结合后,是否能够起到抑制肿瘤细胞增殖、克隆形成或者侵袭能力的作用?

为了证实 miR-107 在 LSCC 中发挥抑癌作用,我们进行了几项典型的细胞学实验。使用了 2 种 LSCC 细胞系,其中 TU212 的恶性程度较 TU686 高。在 MTT 细胞增殖实验中发现,antagomiR-107 组的细胞增殖率明显高于空白对照组,而 agomiR-107 组则明显低于空白对照组,说明 miR-107 确实能够明显抑制 LSCC 的增殖。与之类似的是,在进一步实验中也显示,miR-107 能显著抑制 LSCC 细胞的克隆形成和侵袭,表明 miR-107 在 LSCC 细胞中发挥抑癌的作用,这与其他恶性肿瘤的结果是一致的^[10-12]。结合双荧光素酶报告基因的结果可以看出,miR-107 通过直接靶向调节 *CACNA2D1* 基因从而抑制 LSCC 细胞的增殖、克隆形成及侵袭能力。

本研究证实了在喉癌组织中 miR-107 与 *CAC-*

NA2D1 基因的表达存在负相关性,并且,miR-107 作为上游基因,能直接靶向调控 *CACNA2D1*,同时抑制 LSCC 细胞的恶性特质。但我们尚未进行裸鼠体内成瘤实验,还没有在动物模型体内证实 miR-107 能在体内抑制 LSCC 的发生和进展,故需继续设计更多的实验去进一步验证以上结果。总之,miR-107 具有成为抑制 LSCC 的分子之一,*CACNA2D1* 有可能成为未来研究 LSCC 发病及治疗的一个靶点。

参考文献

- [1] Liu Y, Zhao Q, Ding G, et al. Incidence and mortality of laryngeal cancer in China, 2008—2012[J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(3): 299—306.
- [2] Karachaliou GS, Ayvali F, Collichio FA, et al. Chemotherapy Following PD-1 Inhibitor Blockade in Patients with Unresectable Stage III/Stage IV Metastatic Melanoma: A Single Academic Institution Experience[J]. *Oncology*, 2020, 98(3): 174—178.
- [3] Huang C, Li Y, Zhao W, et al. $\alpha 2\delta 1$ may be a potential marker for cancer stem cell in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Biomarkers*, 2019, 24(1): 97—107.
- [4] Harvey NL. Lymphatic vessels as a stem cell niche [J]. *Science*, 2019, 366(6470): 1193—1194.
- [5] Zhao W, Wang L, Han H, et al. 1B50-1, a mAb raised against recurrent tumor cells, targets liver tumor-initiating cells by binding to the calcium channel $\alpha 2\delta 1$ subunit[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(4): 541—556.
- [6] Zhang Z, Zhao W, Lin X, et al. Voltage-dependent calcium channel $\alpha 2\delta 1$ subunit is a specific candidate marker for identifying gastric cancer stem cells[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 23(11): 4707—4718.
- [7] Sui X, Geng JH, Li YH, et al. Calcium channel $\alpha 2\delta 1$ subunit (*CACNA2D1*) enhances radioresistance in cancer stem-like cells in non-small cell lung cancer cell lines[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 26(10): 5009—5018.
- [8] Sun C, Shui B, Zhao W, et al. Central role of IP₃R2-mediated Ca²⁺ oscillation in self-renewal of liver cancer stem cells elucidated by high-signal ER sensor[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 396.
- [9] Khan AQ, Ahmed EI, Elareer NR, et al. Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 840.
- [10] Bahreyni-Toossi MT, Dolat E, Khanbabaei H, et al. microRNAs: Potential glioblastoma radiosensitizer by targeting radiation-related molecular pathways [J]. *Mutat Res*, 2019, 816—818: 111679.
- [11] Qu L, Li L, Zheng X, et al. Circulating plasma microRNAs as potential markers to identify EGFR mutation status and to monitor epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 45807—45824.
- [12] Wang Y, Chen F, Zhao M, et al. MiR-107 suppresses proliferation of hepatoma cells through targeting HMGGA2 mRNA 3'UTR[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(3): 455—460.
- [13] Parvae P, Sarmadian H, Khansarinejad B, et al. Plasma Level of MicroRNAs, MiR-107, MiR-194 and MiR-210 as Potential Biomarkers for Diagnosis Intestinal-Type Gastric Cancer in Human [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(5): 1421—1426.
- [14] Xiong J, Wang D, Wei A, et al. Deregulated expression of miR-107 inhibits metastasis of PDAC through inhibition PI3K/Akt signaling via caveolin-1 and PTEN [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 361(2): 316—323.

(收稿日期: 2019-12-31)

读者 · 作者 · 编者

本刊关键词著录规范

关键词是科技论文的文献检索标志,是表达文献主题概念的词或词组。关键词应准确并充分揭示论文主题内容,重要的可检索内容不应遗漏。根据学术论文研究的深度和广度,宜选择 3~8 个关键词,和研究主题没有必然的联系,不宜标引。按照反映主题的重要性排序,表达核心主题因素的关键词排在前面,表达非核心主题因素的关键词排在后面,各词之间用分号“;”隔开。关键词应尽量从美国国立医学图书馆编印的“Medical Subject Headings (MeSH)”中选取,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译《医学主题词注释字顺表》。不得使用缩略语作关键词。中、英文关键词应在数目、概念、排序上保持一致。