

lncRNA HOTAIR 靶向 miR-122 促进口腔鳞癌细胞的增殖及迁移

石宇远, 陈吉俊, 高红燕, 马诞骅, 王梁

【摘要】目的 探究长链 RNA (lncRNA) 同源盒基因转录反义 (HOTAIR) 对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、迁移的影响及潜在的分子机制。**方法** 人舌癌细胞 (CAL27) 分为正常对照组、NC 组 (转染 pcDNA 空白质粒)、HOTAIR 组 (转染 pcDNA-HOTAIR 质粒) 及 HOTAIR+miR-122 组 (转染 pcDNA-HOTAIR 质粒+miR-122 mimic)。采用 RT-PCR 法检测细胞中 HOTAIR 和 miR-122 表达水平, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, 通过划痕实验检测细胞迁移水平, 采用双荧光素酶报告基因实验检测 HOTAIR 对 miR-122 基因表达的调控作用。**结果** CAL27 细胞转染 pcDNA-HOTAIR 质粒后, miR-122 水平降低 ($P < 0.05$)。与 NC 组比较, HOTAIR 组细胞活力及细胞划痕愈合率显著提高 ($P < 0.05$)。与 HOTAIR 组相比, HOTAIR+miR-122 组细胞活力和细胞划痕愈合率明显降低 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因结果表明 HOTAIR 能够抑制 miR-122 基因表达。**结论** 过表达 HOTAIR 能够促进 CAL27 细胞增殖和迁移, 其机制可能与 HOTAIR 靶向抑制 miR-122 基因表达有关。

【关键词】 miR-122; 口腔鳞癌; HOTAIR; 细胞增殖; 细胞迁移

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.09.004

【中图分类号】 R739.65 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)09-1132-03

lncRNA HOTAIR targeted regulation of miR-122 to promote proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma cells

SHI Yuyuan, CHEN Jijun, GAO Hongyan, MA Danhua, WANG Liang (Ningbo NO.2 Hospital, Ningbo 315010, Zhejiang, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of lncRNA HOTAIR on the proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma cells and its potential molecular mechanism. **Methods** CAL27 cells were cultured in vitro and divided into control group, NC group (transfected with pcDNA plasmide), HOTAIR group (transfected with pcDNA-HOTAIR), HOTAIR+miR-122 group (transfected with pcDNA-HOTAIR and miR-122 mimic). RT-PCR was used to analyze the expression levels of HOTAIR and miR-122 in CAL27 cells. Cell count kit (CCK-8) was used to detect cell viability. Cell migration was detected by scratch test. Dual luciferase reporter gene assay was used to detect the regulatory effect of HOTAIR on miR-122 gene expression. **Results** Compared to the NC group, the expression of HOTAIR was increased in the HOTAIR group ($P < 0.05$), while the expression of miR-122 was decreased ($P < 0.05$). Compared to the NC group, cell viability and migration were increased in HOTAIR group (all $P < 0.05$). Compared to the HOTAIR group, cell viability and migration were decreased in HOTAIR+miR-122 group (all $P < 0.05$). Dual luciferase reporter gene results showed that HOTAIR targets miR-122 and negatively regulated its expression. **Conclusions**

HOTAIR can promote the proliferation and migration of CAL27 cells, and the mechanism may be related to the targeted inhibition of miR-122 gene expression.

【Key words】 miR-122; Oral squamous cell carcinoma; HOTAIR; Cell proliferation; Cell migration

[Modern Practical Medicine, 2024, 36(9): 1132-1134]

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是头颈癌 (HNC) 中最常见的恶性肿瘤之一,

约占口腔和口咽部恶性肿瘤的 90%。OSCC 的诊断和治疗较为复杂, 整体预后不佳, 5 年总生存率在 50% 左右^[1-4], 不可手术切除的肿瘤患者预后更差, 复发和转移的 OSCC 患者中位生存时间不足 1 年^[5]。因此, 积极探究与 OSCC 发生、发展相关的分子机制, 对 OSCC 的检测、诊断及治疗具有重要意义。近

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2023KY1094); 宁波市医学重点扶植学科 (2022-F20)

作者单位: 315010 宁波, 宁波市第二人民医院

通信作者: 王梁, Email: wl6610@126.com

年来研究发现长链 RNA (lncRNA) 同源盒基因转录反义 (HOTAIR) 在多种癌症的发生和发展中起着至关重要的作用, 成为癌症相关领域的研究热点^[6-8]。在 OSCC 相关研究中发现 HOTAIR 可能与 OSCC 的转移侵袭及不良预后密切相关^[5], 本研究旨在探究 HOTAIR 对 OSCC 细胞增殖、迁移的影响及潜在的分子机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 人舌鳞癌细胞 (CAL27) 购自美国 ATCC 公司; DMEM 培养基、青霉素-链霉素购自美国 Gibco 公司; pcDNA-HOTAIR 和 pcDNA 空载质粒、miR-122 mimic、miR-122 NC 序列购自上海吉玛制药公司; Lipofectamine3000 购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司; CCK-8 试剂盒购自上海经科化学科技有限公司。本次实验在浙江省消化系统肿瘤诊治及研究重点实验室完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将处于对数生长期的 CAL27 细胞用胰酶消化, 加入含 10% 胎牛血清、1% 链霉素、青霉素的 DMEM 高糖培养基, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 当细胞覆盖率达到 60%~70% 时, 进行转染。对细胞进行分组: 对照组 (Control 组, 未转染)、阴性对照组 (NC 组, 转染 pcDNA 空质粒)、HOTAIR 组 (转染 pcDNA-HOTAIR)、HOTAIR+miR-122 mimic 组 (转染 pcDNA-HOTAIR, 同时转染 miR-122 mimic)。

1.2.3 细胞 RNA 提取和 RT-PCR 使用 Trizol 试剂提取各自细胞的总 RNA, 逆转录为互补 DNA, 反应条件: 42 °C 3 min, 60 °C 15 min, 85 °C 5 min。以 cDNA 为模板进行 PCR 实验, PCR 反应体系: cDNA 2 μl, 正反向引物各 1 μl, SYBR Premix Ex Taq II (2×) 10 μl, ddH₂O 补足体系至 20 μl; 反应条件: 95 °C 2 min, 40 个循环的 60 °C 5 s、95 °C 10 s。以 GAPDH 为内参, 进行电泳显影, 通过 Image J 对条带的灰度值进行分析统计, 引物见表 1。

1.2.4 细胞活性检测 将对数生长期细胞按照 8×10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后进行转染。转染后分别在 12、24、48、72 h 时间点

在细胞培养孔中加入 20 μl 的 CCK-8 试剂 (5 g/L), 放置于 CO₂ 培养箱中继续培养 2 h。采用多功能酶标仪检测各个检测孔在 450 nm 波长的吸光度值 (A 值)。

1.2.5 细胞迁移检测 按照 1.0×10⁵ 个/孔的密度将细胞接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后进行转染。转染 6 h 后, 使用移液管尖刮擦细胞层, 用 37 °C PBS 去除未贴壁细胞, 更换新鲜的不含血清培养基继续培养。0、48 h 观察并拍摄细胞照片。

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测 构建荧光素酶报告载体 (HOTAIR-WT 和 HOTAIR-MUT)。将 CAL27 以 2×10⁴ /ml 密度接种于 24 孔板。细胞培养 24 h 后, 进行转染, 将 HOTAIR-WT 或 HOTAIR-MUT 报告基因质粒分别与 miR-122 mimic 或 miR-NC 共转染细胞。转染 48 h 后, 检测荧光活性。

1.3 统计方法 采用 SPSS 29.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数±标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 两组比较采用 *t* 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 HOTAIR、miR-122 表达水平比较 与 NC 组比较, HOTAIR 组细胞内 HOTAIR 水平升高, miR-122 水平下降 (均 P < 0.05), 见封三图 1~3。

2.2 HOTAIR 对 miR-122 基因表达的影响 通过 LncBase Predicted v.2 预测与 HOTAIR 存在碱基互补序列基因, 结果显示 HOTAIR 与 miR-122 之间存在特异互补的核苷酸序列, 见封三图 4。双荧光素酶报告基因显示与 miR-NC+HOTAIR-WT 组相比, miR-122+HOTAIR-WT 组荧光素酶活性降低 (P < 0.05); 与 miR-122+HOTAIR-MUT 组比较, miR-NC+HOTAIR-MUT 组荧光素酶活性无明显变化 (P > 0.05), 见封三图 5。

2.3 miR-122 介导 HOTAIR 对 CAL27 细胞增殖能力的影响 转染后 72 h, 与 NC 组比较, HOTAIR

表 1 聚合酶链式反应引物序列

基因	引物序列	miR-122
HOTAIR	上游引物:	5'-ATGTTTCAGCTTTGTGGACCTC-3'
	下游引物:	5'-TCCCTCGACTCCTACATC-3'
GAPDH	上游引物:	5'-GAGTGGGGAAGCTCTGACTCG-3'
	下游引物:	5'-GTGCCTGGTCTCTCTTACC-3'
GAPDH	上游引物:	5'-GACCTGACCTGCCGTCTAG-3'
	上游引物:	5'-AGGAGTGGGTGTCGCTGT-3'

组细胞活力上调($P < 0.05$);与 HOTAIR 组比较, HOTAIR+miR-122 组细胞活力降低($P < 0.05$),见封三图 6。

2.4 miR-122 介导 HOTAIR 对 CAL27 细胞迁移能力的影响 与 NC 组相比, HOTAIR 组划痕愈合率升高($P < 0.05$);与 HOTAIR 组相比, HOTAIR+miR-122 组细胞划痕愈合率下降($P < 0.05$),见封三图 7。

3 讨论

HOTAIR 是被发现的第一个以反式转录方式调控靶基因表达的 lncRNA。研究发现 HOTAIR 通过靶向调控 miRNA 表达参与多种癌症的发生和发展^[9-11]。目前研究发现 HOTAIR 可能与 OSCC 的转移、侵袭及不良预后密切相关^[5]。Wang 等^[12]研究显示 RNA 干扰 HOTAIR 可显著抑制 OSCC 自噬,增加癌细胞对顺铂的敏感性。本研究通过构建过表达 HOTAIR CAL27 细胞,探究 HOTAIR 对 CAL27 细胞增殖、迁移能力的影响。实验结果表明过表达 HOTAIR 能够促进 CAL27 细胞增殖、迁移。

为了进一步探究 HOTAIR 在促进 CAL27 细胞增殖、迁移的作用机制,本研究前期通过 LncBase Predicted v. 2 在线预测 HOTAIR 靶基因,结果显示 HOTAIR 与 miR-122 存在互补核苷酸序列。为了进一步明确 HOTAIR 对 miR-122 的靶向调控作用,本研究通过 RT-PCR 实验和双荧光素酶报告基因实验进一步验证。结果表明转染 HOTAIR 后 miR-122 水平显著降低;双荧光素酶报告基因检测结果显示 HOTAIR 能够抑制 miR-122 基因表达水平。因此本研究证明在 CAL27 细胞中 HOTAIR 能够靶向抑制 miR-122 基因表达。

为了进一步探究 miR-122 是否参与 HOTAIR 对 CAL27 细胞增殖、迁移能力的调控作用,本研究在过表达 HOTAIR 的同时转染了 miR-122 mimic,结果显示过表达 HOTAIR 的同时增加细胞内 miR-122 水平,可对细胞增殖、迁移能力产生影响。这表明在 CAL27 细胞中提高 miR-122 水平能够反转 HOTAIR 促进细胞增殖和迁移作用,这一结果提示 HOTAIR 对 CAL27 细胞的作用可能与 miR-122 有关。

综上所述,过表达 HOTAIR 能够促进 CAL27 细胞增殖、迁移,其机制可能与靶向抑制 miR-122 水平有关。后续实验将积极探索 HOTAIR/miR-122 机制介导的下游细胞增殖、迁移通路,为 HOTAIR 在 OSCC 的预防和诊治提供重要的实验数据及理论基础。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 石宇远:实验操作、论文撰写;陈吉俊、高红燕、马诞驿:数据整理、统计学分析;王梁:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] 陈新,徐文华,周健,等.口腔鳞状细胞癌现状[J].口腔医学,2017,37(5):462-465.
- [2] SAGHEER S H, WHITAKER-MENEZES D, HAN J Y S, et al. 4NQO induced carcinogenesis: A mouse model for oral squamous cell carcinoma[J]. Methods Cell Biol, 2021, 163: 93-111.
- [3] AREBRO J, TOWLER, LEE C M, et al. Extracellular vesicles promote activation of pro-inflammatory cancer-associated fibroblasts in oral cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1240159.
- [4] 荆燕蕾,刘红刚.头颈部鳞状细胞癌病理及分子生物学相关预后指标研究现状与进展[J].临床与实验病理学杂志,2023,39(10): 1248-1252.
- [5] TAO D, ZHANG Z, LIU X, et al. LncRNA HOTAIR promotes the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma through metastasis-associated gene 2[J]. Mol Carcinog, 2020, 59(4): 353-364.
- [6] LOEWEN G, JAYAWICKRAMARAJAH J, ZHUO Y, et al. Functions of lncRNA HOTAIR in lung cancer[J]. J Hematol Oncol, 2014, 7: 90.
- [7] XU H W, CHEN Y R, OUYANG S S, et al. HOTAIR plays an oncogenic role in gastric cancer through microRNA and SNP[J]. Neoplasia, 2021, 68(3): 465-471.
- [8] RAJAGOPAL T, TALLURI S, AKSHAYA R L, et al. HOTAIR LncRNA: A novel oncogenic propellant in human cancer[J]. Clin Chim Acta, 2020, 503: 1-18.
- [9] RAJU G SR, PAVITRA E, BANDARU S S, et al. HOTAIR: A potential metastatic, drug-resistant and prognostic regulator of breast cancer[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 65.
- [10] LUO Y, LU X, MA W, et al. Dampening HOTAIR sensitizes the gastric cancer cells to oxaliplatin through miR-195-5p and ABCG2 pathway[J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(22): 3591-3600.
- [11] GUPTA R A, SHAH N, WANG K C, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis[J]. Nature, 2010, 464(7291): 1071-1076.
- [12] WANG X, LIU W, WANG P, et al. RNA interference of long noncoding RNA HOTAIR suppresses autophagy and promotes apoptosis and sensitivity to cisplatin in oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2018, 47(10): 930-937.

收稿日期:2024-03-12

(本文编辑:陈志翔)