

# miR-122 靶向调节 DUSP4 表达对口腔鳞癌细胞增殖的作用研究

陈吉俊, 石宇远, 马诞骅, 高红燕, 王梁

**【摘要】目的** 探究 miR-122 靶向调节双特异性磷酸酶 4(DUSP4)表达对口腔鳞癌(OSCC)细胞增殖的作用研究。**方法** 向 OSCC(CAL27)细胞分别转染 miR-122 mimic(miR-122 mimic 组)和 miR-NC(NC 组),另设空白对照组(Control 组)。MTT 法检测细胞活力;Western blot 检测 DUSP4 的蛋白含量;双荧光素酶活性检测实验检测 miR-122 对 DUSP4 基因表达水平的影响,并采用 MTT 法检测 DUSP4 对 CAL27 细胞活力的影响。**结果** 转染 72 h 后,miR-122 mimic 组细胞活力低于 NC 组( $P < 0.05$ ),NC 组与 Control 组细胞活力差异无统计学意义( $P > 0.05$ );miR-122 mimic 组细胞内 DUSP4 蛋白水平低于 NC 组( $P < 0.05$ ),Control 组与 NC 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );双荧光素酶活性实验检测表明,miR-122 能够抑制 DUSP4 基因表达( $P < 0.05$ )。MTT 显示转染 DUSP4 过表达质粒能够部分消除 miR-122 mimic 对 CAL27 细胞活力的抑制作用,且能提高 CAL27 细胞的活力水平。**结论** miR-122 靶向抑制 DUSP4 表达,进而抑制 CAL27 细胞活力。

**【关键词】** miR-122; 口腔鳞癌; 双特异性磷酸酶 4; 细胞活力

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.11.003

**【中图分类号】** R739.8 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)11-1409-04

## Effect of miR-122 targeting regulation of DUSP4 on proliferation of oral squamous cell carcinoma cells

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

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of miR-122 targeting regulation of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4) on proliferation of oral squamous cell carcinoma cells (OSCC). **Methods** OSCC (CAL27) cells were transfected with miR-122 mimic (miR-122 mimic group), miR-NC (miR-NC group), respectively, and a control group was set up. Cell viability was detected by MTT assay. The expression of DUSP4 protein was detected by Western blot. Dual luciferase activity assay was used to detect the effect of miR-122 on DUSP4 gene expression. MTT assay was used to detect the effect of DUSP4 on CAL27 cell viability. **Results** Seventy-two hours after transfected, the cell viability of miR-122 mimic group was lower than that of NC group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference between NC group and control group ( $P > 0.05$ ). The expression of DUSP4 protein in miR-122 mimic group was lower than that of NC group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference between NC group and control group ( $P > 0.05$ ). The dual luciferase activity assay showed that miR-122 could inhibit the expression of DUSP4 genes ( $P < 0.05$ ). MTT assay showed that transfection of DUSP4 overexpression plasmid could partially eliminate the inhibitory effect of miR-122 mimic on CAL27 cell viability, and improve the viability of CAL27 cells. **Conclusions** miR-122 inhibits the viability of CAL27 cells by targeted inhibition of DUSP4 expression.

**【Key words】** miR-122; Oral squamous cell carcinoma; Dual-specificity phosphatase 4; Cell viability

[Modern Practical Medicine, 2024, 36(11): 1409-1412]

口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC) 发病率占口腔恶性肿瘤的 90%, 占有新发癌症病

例的 4%~7%<sup>[1]</sup>。据统计晚期 OSCC 患者生存率仅 27%<sup>[2]</sup>。未能早诊治、局部淋巴结转移及原发灶复发是 OSCC 患者预后差及 5 年生存率低的主要原因<sup>[3-4]</sup>。积极探寻 OSCC 发生发展过程中的调节因子,对 OSCC 的早期诊断及治疗靶点的开发具有重要意义<sup>[5-6]</sup>。miR-122 是 miRNA 家族成员之一,其作为抑癌小分

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

**作者单位:** 315010 宁波,宁波市第二医院

**通信作者:** 王梁, Email: wl6610@126.com

子RNA,在多种组织来源的恶性肿瘤发生发展中发挥调节作用,包括肝癌、肺癌、乳腺癌及胰腺癌等<sup>[7]</sup>。研究发现OSCC组织中miR-122表达水平显著低于正常组织<sup>[8-9]</sup>。近年来研究报道miR-122通过调节双特异性磷酸酶4(dual-specificity phosphatase 4, DUSP4)水平,进而参与肿瘤、心肌缺血再灌注损伤等疾病的发生与发展<sup>[10-13]</sup>。目前关于DUSP4是否参与miR-122调控OSCC增殖水平的研究较少。本研究旨在探讨miR-122调控OSCC细胞增殖水平的作用机制,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 细胞与试剂 人舌鳞癌细胞(CAL27)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;DMEM培养基、青霉素-链霉素(双抗)购自美国Gibco公司;二抗购自碧云天生物科技有限公司;miR-122 mimic、pcDNA-DUSP4、miR-NC购自上海生工生物公司;Lipofectamine3000购自美国Invitrogen公司;RT-PCR试剂盒购自Takara公司; $\beta$ -actin抗体、DUSP4单抗购于德国Merck公司;BCA试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 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%双抗的DMEM培养基,按照 $5\times 10^5$ /孔的细胞密度接种于培养皿,于37℃、含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。

1.3 细胞转染 将处于对数生长期的CAL27细胞接种于培养皿,当细胞融合度为60%左右时进行转染操作,按照Lipofectamine 2000转染试剂说明书进行。将细胞随机分为miR-122 mimic组(转染miR-122 mimic)、NC组(转染miR-NC)及Control组(空白对照组,不添加转染试剂)。miR-122 mimic和miR-NC转染终浓度为50 nmol/L,pcDNA-DUSP4质粒转染浓度为40 nmol/L,转染6 h后,各组换为含10%胎牛血清的DMEM培养基继续培养。

1.4 提取细胞RNA和反转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 分别提取各组细胞总RNA,根据逆转录试剂盒,将RNA逆转录成cDNA;反应条件:42℃ 180 s,60℃ 900 s,85℃ 300 s。以反转录合成cDNA为模板进行PCR,反应体系中:cDNA 2  $\mu$ l,正反向引物各1  $\mu$ l,SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$ ) 10  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O补足

体系至20  $\mu$ l;反应条件:95℃ 120 s,60℃ 5 s,95℃ 10 s(40个循环)。将反应产物进行电泳显影,使用Image J进行灰度分析,引物见表1。

1.5 细胞活力检测 将 $2\times 10^3$ 个转染或未转染的CAL27细胞接种于96孔板中,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养。分别于接种后12、24、48、72 h加入MTT试剂孵育4 h,去除细胞培养液上清,每孔加入150  $\mu$ l二甲苯亚砷,混匀,酶标仪检测490 nm处的吸光度(OD)。每组设置3个平行孔,重复3次取平均值。

1.6 DUSP4检测 采用Western blot法检测DUSP4的含量。弃培养基,PBS润洗3次,加入RIPA裂解液,裂解细胞;离心后,通过BCA试剂盒进行蛋白含量测定;经蛋白变性、电泳、电转、洗膜。将膜置于4℃分别加DUSP4、 $\beta$ -actin一抗孵育12 h,二抗在室温孵育1 h,显影。以 $\beta$ -actin为内参,采用Image J进行灰度分析,计算目的蛋白的相对表达量。

1.7 双荧光素酶活性检测 构建DUSP4野生型荧光素酶报告基因质粒(DUSP4-WT)和DUSP4突变型荧光素酶报告基因质粒(DUSP4-MUT)。将DUSP4-WT和DUSP4-MUT分别与miR-NC或miR-122 mimic共转染于CAL27细胞,转染后继续培养48 h,多功能酶标仪检测各组荧光值。

1.8 统计方法 采用SPSS 22.0统计软件进行处理,计量数据以均数 $\pm$ 标准差表示,两组比较采用 $t$ 检验,多组比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞miR-122表达情况 miR-122 mimic组细胞内miR-122水平高于NC组( $t=8.54, P < 0.05$ ),而Control组与NC组miR-122水平差异无统计学意义( $t=0.97, P > 0.05$ ),见封三图1。

2.2 各组细胞活力情况 转染72 h后,miR-122 mimic组细胞活力低于NC组( $t=7.77, P < 0.05$ ),NC组与Control组细胞活力差异无统计学意义( $t=1.24,$

| 表1 RT-PCR 引物序列 |                                |
|----------------|--------------------------------|
| 引物名称           | 引物序列(5'→3')                    |
| miR-122        | 上游引物:ATGTTACAGCTTTGTGGACCTC    |
|                | 下游引物:TCCCTCGACTCCTACATC        |
| $\beta$ -actin | 上游引物:AGCTGAGCAAGATTCAAGACCCTCA |
|                | 下游引物:CTGCAGCTTGCCATCTTGGCTGAT  |

注:RT-PCR为实时定量聚合酶链式反应

$P > 0.05$ ), 见封三图 2。

**2.3 各组 DUSP4 蛋白水平情况** miR-122 mimic 组细胞内 DUSP4 蛋白水平显著低于 NC 组 ( $t=4.94$ ,  $P < 0.05$ ), Control 组与 NC 组差异无统计学意义 ( $t=0.33$ ,  $P > 0.05$ ), 见图 1。

**2.4 miR-122 对 DUSP4 的调控作用** DUSP4-WT+miR-122 mimic 组的荧光素酶活性显著低于 DUSP4-WT+NC 组 ( $t=3.89$ ,  $P < 0.05$ ), DUSP4-MUT+miR-122 mimic 组与 DUSP4-MUT+NC 组荧光素酶活性差异无统计学意义 ( $t=0.03$ ,  $P > 0.05$ ), 见图 2。

**2.5 DUSP4 对 CAL27 细胞活力的影响** 转染 72 h 后, pcDNA-DUSP4 组细胞活力高于 NC 组 ( $t=2.96$ ,  $P < 0.05$ ), miR-122 mimic+pcDNA-DUSP4 组细胞活力高于 miR-122 mimic 组 ( $t=3.09$ ,  $P < 0.05$ ), 见图 3。

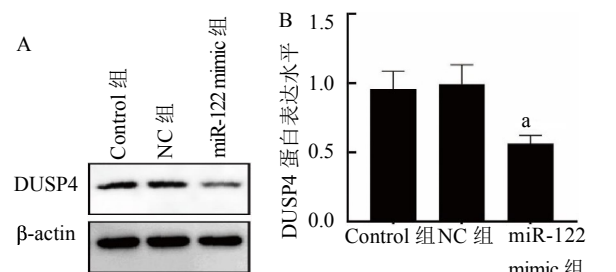
### 3 讨论

miR-122 基因定位于染色体 18q21.31<sup>[14]</sup>。近年来研究发现 miR-122 在乳腺癌、肺癌、膀胱癌、白血病、肝癌、结直肠癌、卵巢癌及食管癌等恶性癌组织中均出现异常表达<sup>[15-16]</sup>。部分研究发现 miR-122 作为肿瘤抑制因子, 可增加肿瘤细胞对化疗药物的敏

感性<sup>[17-18]</sup>。Kong 等<sup>[19]</sup>研究发现 lncRNA HULC 可通过海绵吸附 miR-122 促进骨肉瘤细胞的增殖、迁移、侵袭。Hu 等<sup>[11]</sup>研究发现 miR-122 可抑制甲状腺乳头状癌的发生。在胃癌的研究中发现 miR-122 可抑制 BCG-823 细胞的迁移和侵袭<sup>[10]</sup>。另一项肝癌动物实验发现, 使用病毒载体或脂质体纳米颗粒传递 miR-122 可有效抑制肝肿瘤<sup>[20]</sup>。然而 miR-122 在 OSCC 中的作用及调控机制尚未明确。

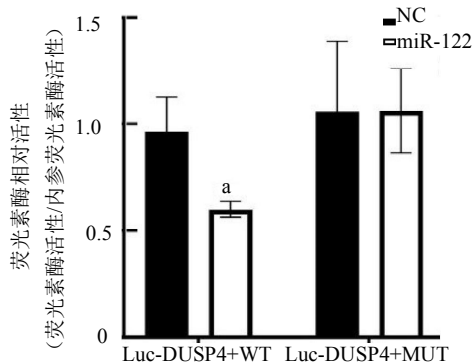
本研究通过在 CAL27 细胞中转染 miR-122 mimic, 提高细胞中 miR-122 水平, 检测 miR-122 对细胞活力的影响。MTT 实验结果显示转染 miR-122 mimic 后能够显著降低 CAL27 细胞活力, 这表明 miR-122 在 OSCC 中发挥抑制肿瘤细胞活力的作用。

部分研究发现 DUSP4 在不同肿瘤中发挥促肿瘤作用<sup>[21-23]</sup>。Xu 等<sup>[24]</sup>指出 DUSP4 可以直接去泛素化并稳定 Smad4 蛋白, 从而进一步促进结直肠癌细胞的增殖和转移。Ma 等<sup>[25]</sup>研究发现长链非编码 RNA AFAP1-AS1 通过海绵化 miR-204-3p 和上调 DUSP4 促进甲状腺癌进展。Gröschl 等<sup>[26]</sup>研究表明 DUSP4 的表达与结直肠癌不稳定性相关, 并可诱导癌细胞增殖。本研究发现转染 miR-122 mimic 后, CAL27 细胞中 DUSP4 蛋白水平显著降低, 荧光素酶活性检测实验显示过表达 miR-122 能够降低 DUSP4 基因表达水平。这表明在 CAL27 细胞中 miR-122 能够抑制 DUSP4 基因表达。本研究在转染 miR-122 mimic 的基础上同时转染 DUSP4 过表达质粒, MTT 结果显示转染 DUSP4 过表达质粒能够部分消除 miR-122 mimic 对 CAL27 细胞活力的抑制作用, 且单独转染 DUSP4 过表达质粒能够提高 CAL27 细胞活力水平。这表明 DUSP4 介导 miR-122 抑制 CAL27 细胞增殖作用。



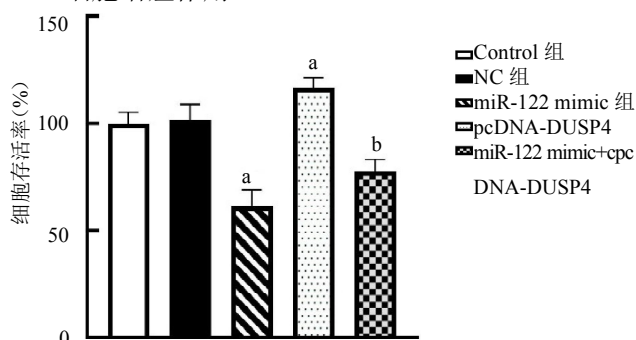
注: A 为 western blot 条带图, B 为 DUSP4 蛋白条带灰度分析统计图。与 NC 组比较,  $aP < 0.05$ 。DUSP4 为双特异性磷酸酶 4

图 1 各组 CAL27 细胞内 DUSP4 蛋白水平情况



注: 与 NC 组比较,  $aP < 0.05$

图 2 双荧光素酶活性检测 miR-122 对 DUSP4 基因表达水平的影响



注: 与 NC 组比较,  $aP < 0.05$ ; 与 miR-122 mimic 组比较,  $bP < 0.05$

图 3 DUSP4 对 CAL27 细胞活力的影响

综上所述,初步研究发现 DUSP4 介导 miR-122 抑制 CAL27 细胞增殖作用。在后续实验中,将通过干扰 miR-122 表达等手段进一步研究 miR-122 对 OSCC 细胞侵袭能力、细胞周期等方面的影响,为 miR-122 在 OSCC 诊疗中的应用提供理论基础。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明** 陈吉俊:实验操作、论文撰写;石宇远、马诞骅、高红燕: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] BUGSHAN A, FAROOQ I. Oral squamous cell carcinoma: Metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis[J]. F1000Res, 2020, 9: 229.
- [2] ALMANGUSH A, MAKITIE A A, TRIANTAFYLLOU A, et al. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update[J]. Oral Oncol, 2020, 107: 104799.
- [3] PANARESE I, AQUINO G, RONCHI A, et al. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: Prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2019, 19(2): 105-119.
- [4] MADHURA M G, RAO R S, PATIL S, et al. Advanced diagnostic aids for oral cancer[J]. Dis Mon, 2020, 66(12): 101034.
- [5] LI C C, SHEN Z, BAVARIAN R, et al. Oral cancer: Genetics and the role of precision medicine[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2020, 29(1): 127-144.
- [6] MENINI M, DE GIOVANNI E, BAGNASCO F, et al. Salivary micro-RNA and oral squamous cell carcinoma: A systematic review[J]. J Pers Med, 2021, 11(2): 101.
- [7] LASHKARIAN M F, HASHEMIPOUR N, NIARAKI N, et al. MicroRNA-122 in human cancers: From mechanistic to clinical perspectives[J]. Cancer Cell Int, 2023, 23(1): 29.
- [8] TIAN Y Y, ZHONG L, GAO S L, et al. LncRNA LINC00974 downregulates miR-122 to upregulate RhoA in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2021, 36(1): 18-22.
- [9] NAKAMURA K, HIYAKE N, HAMADA T, et al. Circulating microRNA panel as a potential novel biomarker for oral squamous cell carcinoma diagnosis[J]. Cancers, 2021, 13(3): 449.
- [10] XU X F, GAO F, WANG J J, et al. MiR-122-5p inhibits cell migration and invasion in gastric cancer by down-regulating DUSP4[J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(5): 427-435.
- [11] HU N, TIAN Y H, SONG Y M, et al. MiR-122-5p suppresses the oncogenesis of PTC by inhibiting DUSP4 expression[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 368.
- [12] LU Z L, FENG H J, SHEN X K, et al. MiR-122-5p protects against acute lung injury via regulation of DUSP4/ERK signaling in pulmonary microvascular endothelial cells[J]. Life Sci, 2020, 256: 117851.
- [13] WU H J, FU Q, LI Z, et al. Inhibition of microRNA-122 alleviates pyroptosis by targeting dual-specificity phosphatase 4 in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Heliyon, 2023, 9(7): e18238.
- [14] 黄丛改,刘清,郑树涛,等.食管鳞癌中 miR-122-5P 的表达及其临床病理学意义[J].四川医学,2023,44(2):113-117.
- [15] WU S J, WU Y W, DENG S J, et al. The impact of miR-122 on cancer[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2024, 25(12): 1489-1499.
- [16] YU N, TIAN W B, LIU C, et al. MiR-122-5p promotes peripheral and central nervous system inflammation in a mouse model of intracerebral hemorrhage via disruption of the MLLT1/PI3K/AKT signaling[J]. Neurochem Res, 2023, 48(12): 3665-3682.
- [17] REN P, WU N A, FU S C, et al. MiR-122-5p restrains pancreatic cancer cell growth and causes apoptosis by negatively regulating ASCT2[J]. Anticancer Res, 2023, 43(10): 4379-4388.
- [18] PARK S Y, KIM S J, TO P K, et al. MicroRNA-122 targets  $\delta$ -catenin to suppress the tumorigenic potential of prostate cancer cells[J]. Am J Cancer Res, 2022, 12(10): 4853-4864.
- [19] KONG D L, WANG Y. Knockdown of lncRNA HULC inhibits proliferation, migration, invasion, and promotes apoptosis by sponging miR-122 in osteosarcoma[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 1050-1061.
- [20] THAKRAL S, GHOSH K. MiR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir[J]. Curr Gene Ther, 2015, 15(2): 142-150.
- [21] LANG R, RAFFI F A M. Dual-specificity phosphatases in immunity and infection: An update[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 2710.
- [22] HU B B, ZHANG D Y, ZHAO K J, et al. Spotlight on USP4: Structure, function, and regulation[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 595159.
- [23] 张瑞,张靖,朱金水.双特异性磷酸酶 4 与肿瘤[J].国际消化病杂志,2015,35(1):65-67.
- [24] XU W F, CHEN B B, KE D S, et al. DUSP4 directly deubiquitinates and stabilizes Smad4 protein, promoting proliferation and metastasis of colorectal cancer cells[J]. Aging, 2020, 12(17): 17634-17646.
- [25] MA H Z, SHI Q, FANG J G, et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1 promotes thyroid cancer progression by sponging miR-204-3p and upregulating DUSP4[J]. J Biochem, 2022, 171(1): 131-140.
- [26] GRÖSCHL B, BETTSTETTER M, GIEDL C, et al. Expression of the MAP kinase phosphatase DUSP4 is associated with microsatellite instability in colorectal cancer (CRC) and causes increased cell proliferation[J]. Int J Cancer, 2013, 132(7): 1537-1546.

收稿日期:2024-08-07

(本文编辑:孙海儿)