

miR-362-3p 调控垂体肿瘤转化基因 1 抑制 口腔鳞状细胞癌侵袭及增殖的研究

丁啸^{1,2} 陈嘉雯² 曲鹏宇¹ 孙晨雨¹ 李洪利³ 胡温庭¹ 范欣¹

1. 潍坊医学院附属医院口腔科, 潍坊 261000; 2. 潍坊医学院口腔医学院, 潍坊 261053;
3. 潍坊医学院医学研究实验中心, 潍坊 261053

[摘要] **目的** 探讨垂体肿瘤转化基因 1 (PTTG1) 在 miR-362-3p 作用下对口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 细胞 Cal-27、HN-30 侵袭以及增殖能力的影响。**方法** 生物信息学在线数据库查询 PTTG1 在头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 中的表达。蛋白质印迹法 (Western blot) 实验检测 PTTG1 在 Cal-27、HN-30 以及 HOK 细胞系中的表达。划痕愈合实验、Transwell 侵袭实验及 5-乙炔基-2' 脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 细胞增殖实验检测 PTTG1 对 Cal-27、HN-30 细胞迁移、侵袭、增殖的影响。生物信息学在线数据库预测 PTTG1 的上游 miRNA, 双荧光素酶实验检测结合情况, 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测该 miRNA 在组织中的表达。**结果** ENCORI 数据库结果显示 PTTG1 在 OSCC 组织中表达上调; Western blot 实验显示 Cal-27、HN-30 细胞中 PTTG1 表达量较 HOK 细胞中高。转染 Si-PTTG1 质粒的 Cal-27、HN-30 细胞的迁移能力、侵袭能力和细胞增殖能力均较对照组降低 ($P < 0.05$)。通过网站预测出 PTTG1 的上游 miRNA 为 miR-362-3p, 双荧光素酶实验检测出 PTTG1 与 miR-362-3p 存在结合位点; qRT-PCR 检测结果显示 miR-362-3p 在 OSCC 肿瘤组织中相对于正常组织表达下调 ($P < 0.05$); 并且敲低 miR-362-3p 的表达后能够促进敲低 PTTG1 后的 Cal-27、HN-30 侵袭和增殖。**结论** miR-362-3p 可通过靶向 PTTG1 抑制 Cal-27、HN-30 细胞侵袭、增殖。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 垂体肿瘤转化基因 1; 微小 RNA; 侵袭; 增殖

[中图分类号] Q78 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2023237



本文链接 开放科学标识码

miR-362-3p inhibited the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells by targeting the regulation of pituitary tumor-transforming gene 1

Ding Xiao^{1,2}, Chen Jiawen², Qu Pengyu¹, Sun Chenyu¹, Li Hongli³, Hu Wenting¹, Fan Xin¹

1. Dept. of Stomatology, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261000, China; 2. School of Stomatology, Weifang Medical University, Weifang 261053, China; 3. Medical Research Center, Weifang Medical University, Weifang 261053, China

Supported by: Natural Science Foundation Project of Shandong Province (ZR202110190030); Fundamental Research Program Funding of Affiliated Hospital of Weifang Medical University (2021wffyzzj06); Weifang Science and Technology Development Plan Project (2022YX029)

Correspondence: Fan Xin, E-mail: fanxinsunny@aliyun.com

[收稿日期] 2023-07-26; **[修回日期]** 2023-12-12

[基金项目] 山东省自然科学基金项目 (ZR202110190030); 潍坊医学院附属医院种子基金项目 (2021wffyzzj06); 潍坊市科技发展计划项目 (2022YX029)

[作者简介] 丁啸, 住院医师, 硕士, E-mail: dx6666yy@126.com

[通信作者] 范欣, 副主任医师, 硕士, E-mail: fanxinsunny@aliyun.com

[Abstract] **Objective** This study aimed to explore the effect of pituitary tumor-transforming gene 1 (PTTG1) on the invasion and proliferation of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines under the action of miR-362-3p. **Methods** The bioinformatics online database was used to query the expression of PTTG1 in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). The expression

of PTTG1 in the Cal-27, HN-30, and HOK cell lines was detected by Western blot. A wound-healing assay was used to determine the effect of PTTG1 on the migration ability of the OSCC cells. The Transwell assay was used to examine the changes in cell-invasion ability. 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) cell-proliferation assay was used to detect changes in cell-proliferation ability. Bioinformatics approach predicted the upstream miRNA of PTTG1. The targeting relationship between miR-362-3p and PTTG1 was examined by the dual luciferase assay, and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to determine the expression of miRNA in OSCC tissues. **Results** The ENCORI database showed that PTTG1 expression was up-regulated in OSCC tissues. Western blot confirmed that PTTG1 expression was up-regulated in Cal-27 and HN-30 cells than HOK cells. PTTG1 knockout can inhibit the migration, invasion, and proliferation of Cal-27 and HN-30 cells ($P<0.05$). Bioinformatics prediction websites predicted that the upstream miRNA of PTTG1 was miR-362-3p, and PTTG1 can bind to miR-362-3p. Results of qRT-PCR showed that miR-362-3p expression was downregulated in OSCC tissues compared with normal tissue ($P<0.05$). Transwell and EdU experiments confirmed that miR-362-3p knockdown can promote the invasion and proliferation of Cal-27 and HN-30 after PTTG1 knockdown.

Conclusion miR-362-3p can inhibit the invasion and proliferation of Cal-27 and HN-30 cells by targeting PTTG1.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; pituitary tumor-transforming gene 1; microRNA; invasion; proliferation

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 中最常见的一个亚型, 占比达 90% 以上^[1-3]。OSCC 的治疗手段主要包括手术切除联合化疗、放疗以及靶向表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 的西妥昔单抗靶向治疗等方法, 但 OSCC 患者的 5 年生存率仍低于 50%^[4-8]。由于颌面部丰富的血运及复杂的淋巴网结构, OSCC 更易发生淋巴结转移, 多数伴发淋巴结转移的患者生存期不超过 1 年^[9]。因此, 探索 OSCC 的发生机制, 寻找新的治疗靶点仍然很有必要性。

垂体肿瘤转化基因 1 (pituitary tumor-transforming gene 1, PTTG1) 是表达紧固蛋白的一种基因, 可参与多种细胞的增殖、DNA 修复、血管形成和侵袭等通路的调控^[10-11]。PTTG1 过表达可以改变细胞分裂过程中姐妹染色单体的分离而发挥致癌作用, 且有报道^[12-13]称 PTTG1 为细胞周期相关基因之一。已有研究^[10,14-16]证明它可以激活基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2) 促进精原细胞瘤的增殖和侵袭; 在长链非编码 RNA PTTG3P 调控下促进前列腺癌、宫颈癌的进展; 敲低 PTTG1 能够抑制乳腺癌细胞增殖并维持细胞周期进程。但目前 PTTG1 在 OSCC 发展中的作用尚无研究, 它对于 OSCC 细胞的侵袭、增殖能力的影响亟待进一步探索。

本研究利用生物信息学在线分析网站, 预测 PTTG1 在 HNSCC 中的表达, 敲低 PTTG1 检测其对于 OSCC 细胞系 Cal-27、HN-30 细胞迁移、侵袭

以及增殖能力的影响, 并进一步利用生信在线网站预测出与 PTTG1 存在靶向结合位点的上游 miR-362-3p, 探讨 miR-362-3p 能否通过靶向 PTTG1 影响 OSCC 的侵袭以及增殖, 为 OSCC 的临床诊断和治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 组织样本

组织样本来源于 2022 年 3 月—2023 年 3 月在潍坊医学院附属医院口腔颌面外科就诊治疗的 16 例 OSCC 患者, 纳入标准: 患者病变组织行手术切除, 术前均未进行放疗, 且病理诊断为 OSCC。患者年龄在 31~89 岁, 中位数 56 岁。术中切取的癌组织标本及癌旁组织标本立即放于液氮中, 随后转移至 -150 °C 冰箱保存。所有患者或家属已签署知情同意书。本研究经潍坊医学院附属医院伦理委员会批准 (伦理编号: KY-2021-M31)。

1.1.2 细胞株

OSCC 细胞株 Cal-27、HN-30 由上海市口腔颌面部肿瘤组织样本及生物信息数据库专业技术服务平台赠予, 人正常口腔角化上皮细胞 (HOK) 为潍坊医学院医学研究实验中心保存, 人胚胎肾细胞 293 (HEK293T) 购自美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC)。

1.1.3 其他材料

Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂 (Invitrogen 公司, 美国); Beyo-Click™ EdU 细胞增殖检测

试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；组织RNA提取试剂盒（Axygen生物技术有限公司，美国）；Transwell小室（Corning公司，美国）；RPMI 1640培养基、蛋白上样缓冲液和吉姆萨染色液（北京索莱宝科技有限公司）；兔抗人PTTG1单克隆抗体、兔抗人 β -肌动蛋白单克隆抗体（ β -actin）（Abcam公司，英国）；PTTG1敲低及对照质粒、miR-362-3p敲低及对照质粒、双荧光素酶报告基因载体均由上海吉凯基因医学科技股份有限公司构建。

1.2 生物信息学预测

从加州大学圣克鲁兹分校（University of California, Santa Cruz, USSC）公共癌症基因组资源（<http://xena.ucsc.edu/public/>）下载HNSCC患者基因表达数据^[17]，以 $P < 0.05$ 、 $|\log_{2}FC| > 1$ 为阈值利用R Studio绘制出HNSCC基因表达火山分析图。通过RNA相互作用数据库（the encyclopedia of RNA interactomes, ENCORI, Starbase）（<http://starbase.sysu.edu.cn>）查询PTTG1在HNSCC中的表达情况^[18]。阿拉巴马大学伯明翰分校癌症数据分析网站（the University of Alabama at Birmingham cancer data analysis portal, UALCAN）（<https://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>）查询PTTG1在其他肿瘤组织及正常组织中的表达，以及PTTG1在HNSCC淋巴结转移不同分期下的表达^[19]。

通过miRNA靶向预测综合分析网站（miR-map）（<https://mirmap.ezlab.org>）^[20]和ENCORI网站查询与PTTG1存在靶向关系的miRNA，与OSCC miRNA表达数据库（GSE28100）取交集找出PTTG1的潜在调控miRNA，并使用Draw Venn Diagram（<http://bioinformatics.psb.ugent>）绘制Venn图。使用DIANA TOOLS-mirPath v.3在线网站，查询并下载miR-362-3p相关信号通路数据，R Studio绘制京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）富集分析柱形图。

1.3 细胞培养及转染

Cal-27、HN-30及HOK细胞使用10%胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）的RPMI 1640培养基，培养条件为：5%CO₂、恒定温度37℃以及97%湿度。转染操作按Lipo-fectamine2000说明书进行。为检测PTTG1对Cal-27、HN-30迁移、侵袭和增殖能力的影响，将细胞转染不同质粒后分组：1) Scr/Cal-27组：转入空载质粒；2) Si-PTTG1/Cal-27组：转入PTTG1敲低质粒；3) Scr/HN-

30组：转入空载质粒；4) Si-PTTG1/HN-30组：转入PTTG1敲低质粒。

为检测PTTG1与miR-362-3p的靶向关系，以及miR-362-3p与PTTG1在OSCC细胞侵袭及增殖过程中的相互作用，将细胞转染不同质粒后重新分组。Cal-27组：1) Si-PTTG1+in-miR-362-3p组：转入PTTG1敲低质粒以及miR-362-3p敲低质粒；2) in-miR-362-3p+Scr组：转入PTTG1对照质粒以及miR-362-3p敲低质粒；3) in-miR-362-3p组：转入miR-362-3p敲低质粒；4) Con组：转入miR-362-3p对照质粒。HN-30组：1) Si-PTTG1+in-miR-362-3p组：转入PTTG1敲低质粒以及miR-362-3p敲低质粒；2) in-miR-362-3p+Scr组：转入PTTG1对照质粒以及miR-362-3p敲低质粒；3) in-miR-362-3p组：转入miR-362-3p敲低质粒；4) Con组：转入miR-362-3p对照质粒。

1.4 双荧光素酶实验

miR-362-3p过表达质粒及其对照质粒分别与PTTG1的3'UTR野生型（pGL3-PTTG1 3'UTR-WT）报告载体和突变型（pGL3-PTTG1 3'UTR-MUT）报告载体共转染入HEK293T细胞中，48 h后弃培养基，PBS洗涤；加入PLB裂解液裂解15 min；收集裂解液，测定荧光素酶活性。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR）

组织RNA提取以及逆转录具体过程参考本课题组已发表文献^[21]。以得到的cDNA为模板进行qRT-PCR。以U6为内参，使用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法分析miR-362-3p在组织中的表达。miR-362-3p上游引物序列5'-AACACACCTATTCAAGGATTCA-3'；下游引物序列5'-ACGTGACACGTTTCGGAGAATT-3'。

1.6 蛋白质印迹法（Western blot）实验

使用RIPA蛋白裂解液提取转染过后的细胞总蛋白，并通过BCA法检测蛋白质浓度后，上样，凝胶电泳，转膜，脱脂奶粉封闭，一抗4℃孵育一晚，TBST洗膜3次，二抗常温孵育1 h，TBST洗膜3次后曝光，分析灰度值。内参使用 β -actin。其中抗体配制浓度分别为： β -actin（1：1 000）、PTTG1（1：500）。

1.7 划痕愈合实验

将细胞悬液接种至6孔板后，待细胞密度约80%，使用10 μ L移液器吸头于6孔板中央沿直尺划一条直线，PBS洗涤3次后加入含1%FBS的RPMI 1640培养基，利用光学显微镜记录此时的划痕照片，并于培养箱中继续培养，待24 h时继续于

光镜下记录划痕处细胞生长情况。

1.8 Transwell细胞侵袭实验

使用200 μL 无血清1640培养基将总量约 4×10^4 个细胞重悬,悬液加入至无基质胶Transwell小室的上室,下室中加入500 μL FBS,于培养箱培养24 h后,无水甲醇固定,PBS洗净无水甲醇,吉姆萨染液染色45 min,棉签清除上室中未能穿过小孔的细胞,随后PBS清洗并自然风干,于光学显微镜下随机选取3个视野拍照,计数穿过小室细胞数量,取均值。

1.9 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)细胞增殖检测

EdU工作液使用EdU原液与细胞培养基按1:1 000配制,向均匀生长在24孔板中的细胞,每孔中加入1 mL后培养2 h。去除培养液后用PBS洗涤3次,无水甲醇固定30 min,PBS清洗后,每孔加入0.2% Triton X-100 通透液300 μL 孵育30 min,PBS洗涤3次,每孔加入250 μL Click反应液,室温避光条件下孵育40 min。去除反应液后,用PBS清洗数次。并使用DAPI染色10 min,PBS清洗,封片后于镜下观察拍照。

1.10 统计学分析

采用SPSS 23.0对实验结果进行统计学处理,实验数据使用均数 \pm 标准差表示,2组定量资料分析采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,所有实验在同一条件下重复3次, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTTG1在HNSCC中高表达且与淋巴结转移相关

TCGA数据库中下载的HNSCC患者mRNA表达数据绘制出HNSCC基因表达火山图,并标记出PTTG1为差异表达基因(图1A)。ENCORI(Starbase)数据库中显示,PTTG1在502例HNSCC组织以及44例正常组织中均有表达,且在HNSCC组织中的表达较正常组织中明显升高($P < 0.05$,图1B)。在UALCAN数据库查询得出PTTG1在大部分其他肿瘤组织中的表达较正常组织高(图1C);并通过UALCAN数据库分析得出PTTG1在有淋巴结转移的组织中的表达较无淋巴结转移的组织中高($P < 0.05$,图1D)。以上结果表明,PTTG1在HNSCC组织中表达升高,并可能与淋巴结转移相关。

2.2 PTTG1在OSCC细胞Cal-27、HN-30中高表达

Western blot检测PTTG1在Cal-27、HN-30中的表达高于HOK,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图2A、B)。

2.3 敲低PTTG1抑制Cal-27、HN-30的迁移、侵袭和增殖能力

Si-PTTG1质粒和对照质粒转染Cal-27、HN-30细胞后,Western blot检测结果显示Si-PTTG1/Cal-27中PTTG1蛋白表达相较于Scr/Cal-27中降低($P < 0.05$,图2C、D),Si-PTTG1/HN-30中PTTG1蛋白表达相较于Scr/HN-30中降低($P < 0.05$,图2C、D)。提示PTTG1敲低质粒以及其对照质粒转染成功。

划痕愈合实验结果表明,Si-PTTG1/Cal-27组细胞的迁移率($28.84\% \pm 1.42\%$)相比较于Scr/Cal-27组($40.93\% \pm 1.25\%$)明显降低,且差异具有统计学意义($P < 0.05$,图3A、B);Si-PTTG1/HN-30组细胞的迁移率($33.40\% \pm 1.17\%$)相比较于Scr/HN-30组($49.53\% \pm 3.08\%$)显著降低($P < 0.05$,图3A、B)。

Transwell侵袭实验结果显示,与Scr/Cal-27(226.11 ± 18.74)相比,Si-PTTG1/Cal-27(139.44 ± 10.77)细胞穿过基底膜的数量显著减少($P < 0.05$,图3C、D);与Scr/HN-30(268.22 ± 15.81)相比,Si-PTTG1/HN-30(163.89 ± 11.34)细胞穿过基底膜的数量显著减少($P < 0.05$,图3C、D)。

EdU实验结果表明,与Scr/Cal-27组($39.47\% \pm 1.86\%$)相比,Si-PTTG1/Cal-27组($30.63\% \pm 0.94\%$)阳性染色细胞比例低($P < 0.05$,图3E、F);与Scr/HN-30组($44.36\% \pm 2.68\%$)相比,Si-PTTG1/HN-30组($26.56\% \pm 0.98\%$)阳性染色细胞比例低($P < 0.05$,图3E、F)。

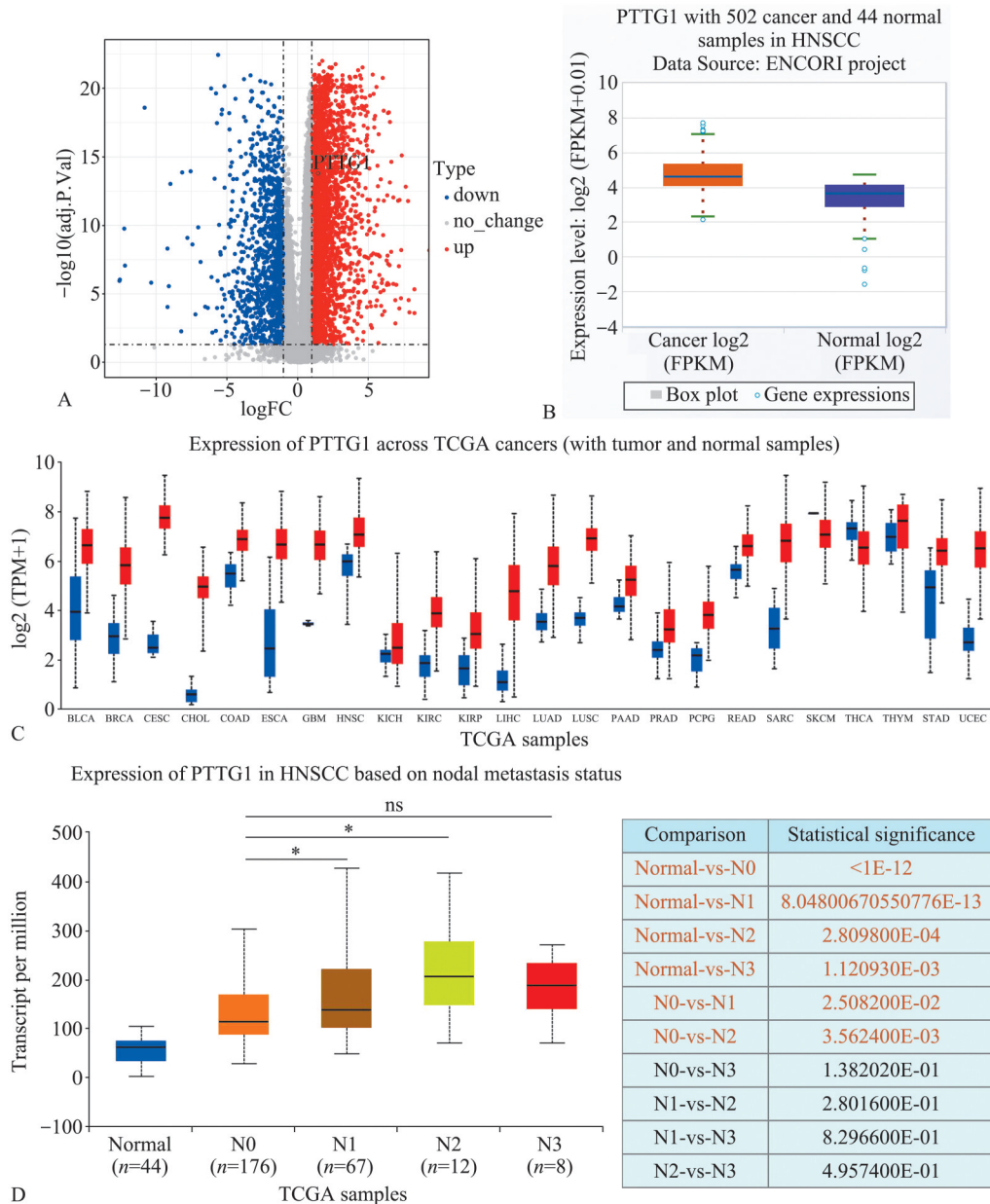
以上结果表明,敲低PTTG1可抑制Cal-27、HN-30细胞的迁移、侵袭和增殖能力,PTTG1在OSCC进展中可能发挥促癌作用。

2.4 PTTG1可与miR-362-3p靶向结合且miR-362-3p在多种癌相关信号通路富集

利用ENCORI(Starbase)、miRmap数据库反向预测可与PTTG1靶向结合的miRNA,并与OSCC miRNA表达数据集GSE28100取交集(图4A),选择其中miRmap score较高的miR-362-3p(miRmap score=77.47)作为研究对象。ENCORI数据库查询出miR-362-3p在HNSCC肿瘤组织中较其在正常组织中的表达量下调($P < 0.05$,图4B)。DIANA TOOLS-mirPath v.3在线网站查询miR-362-3p

相关信号通路数据，KEGG 信号通路富集分析表明 miR-362-3p 主要富集于 Hippo 信号通路、p53 信号通路等多种癌症相关通路（图 4C）。在 ENCORI 网站下载 PTTG1 与 miR-362-3p 的结合位点（图 4D）。

将 miR-362-3p 过表达质粒，与 PTTG1 野生型报告载体共转染后，细胞的荧光素酶活性显著降低，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ ，图 4E)，miR-362-3p 与 PTTG1 存在靶向结合位点。



A: HNSCC 基因表达火山图; B: PTTG1 在 HNSCC 组织及正常组织中的表达; C: PTTG1 在人体 24 类高发肿瘤及正常组织中的表达情况; D: PTTG1 在有或无淋巴结转移的组织中的表达。

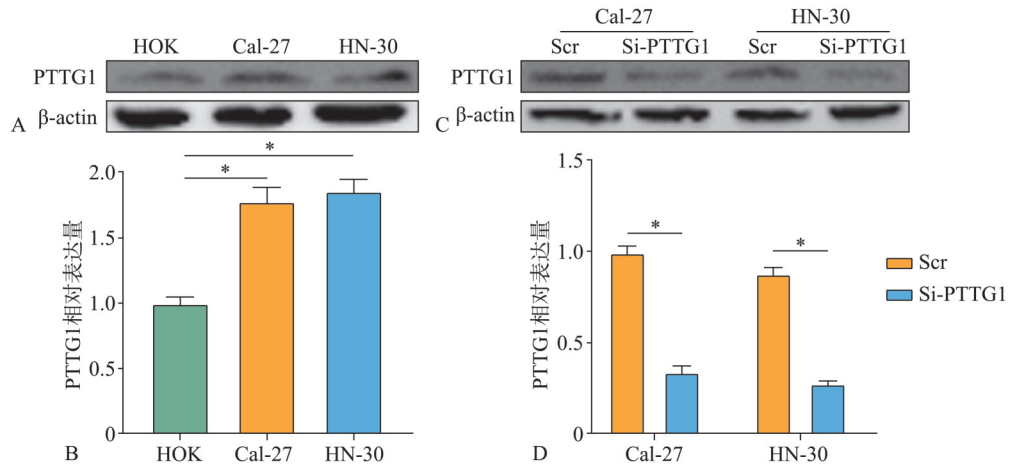
图 1 PTTG1 的表达情况

Fig 1 The expression of PTTG1

Western blot 实验表明，PTTG1 在 in-miR-362-3p/Cal-27 组蛋白表达水平高于在 Con/Cal-27 组的蛋白表达水平 ($P < 0.05$ ，图 4F)；与 Con/HN-30 组相比，PTTG1 在 in-miR-362-3p/HN-30 组蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$ ，图 4F)，这表明 miR-362-3p 能影响 PTTG1 的表达。

通过 qRT-PCR 检测，miR-362-3p 在正常组织中的相对表达量较其在 OSCC 组织中的表达量升高 ($P < 0.05$ ，图 4G)。

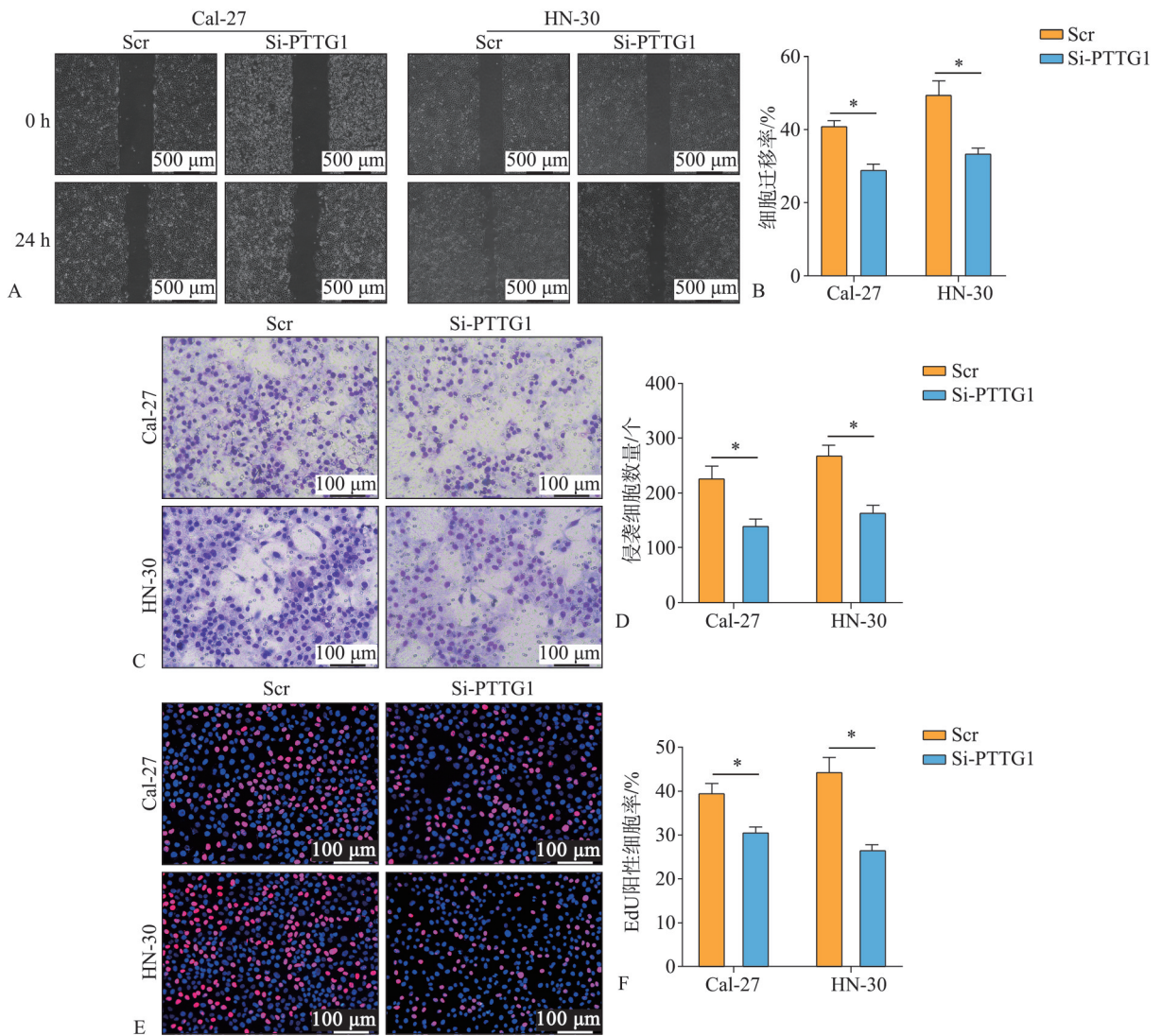
综上所述，PTTG1 与 miR-362-3p 之间存在靶向结合位点，并且 miR-362-3p 可影响 PTTG1 在 OSCC 细胞中的表达。



A、B: PTTG1 在 Cal-27、HN-30 中的蛋白表达量; C、D: Si-PTTG1 和对照质粒在 Cal-27、HN-30 中成功转染。

图 2 PTTG1 蛋白的相对表达量

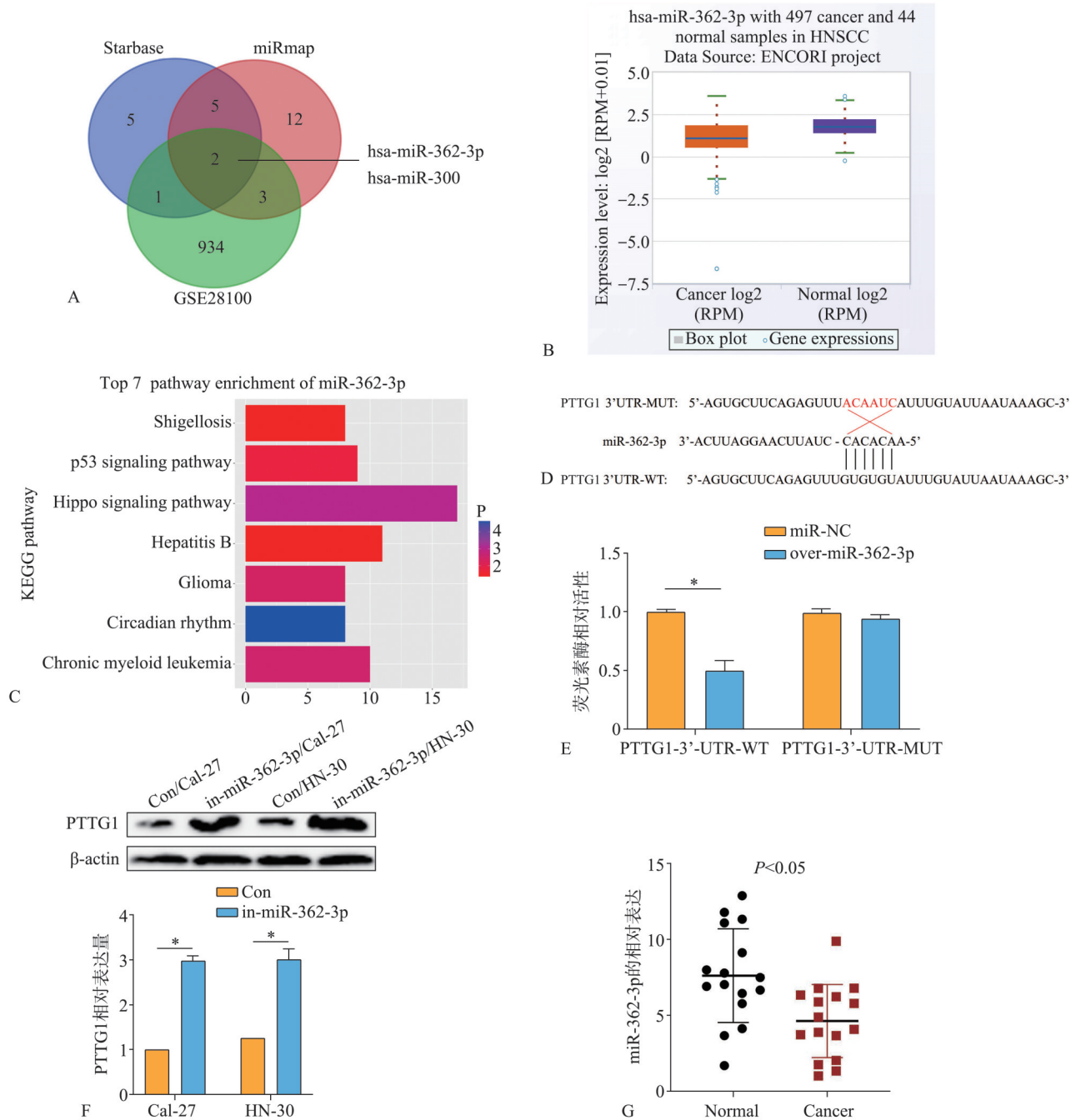
Fig 2 The relative expression level of PTTG1



A、B: 划痕愈合实验检测 Cal-27、HN-30 细胞迁移; C、D: Transwell 检测 Cal-27、HN-30 细胞侵袭; E、F: EdU 实验检测 Cal-27、HN-30 细胞增殖。

图 3 敲低 PTTG1 对于 Cal-27、HN-30 细胞迁移、侵袭、增殖能力的影响

Fig 3 The effect of knockdown PTTG1 on the migration, invasion, and proliferation ability of Cal-27 and HN-30 cell lines



A: Starbase、miRmap 在线数据库与 OSCC miRNA 表达数据集 GSE28100 取交集得到预测 miRNA; B: miR-362-3p 在肿瘤组织和正常组织中表达量 ($P<0.05$); C: miR-362-3p 癌症相关信号通路富集分析图; D: PTTG1 与 miR-362-3p 结合位点图示; E: miR-362-3p 过表达质粒与 PTTG1 野生型报告载体共转染后, 细胞的荧光素酶活性; F: PTTG1 的蛋白表达水平; G: qRT-PCR 检测 miR-362-3p 在组织中的相对表达量。

图 4 PTTG1 为 miR-362-3p 的靶点

Fig 4 PTTG1 is the target of miR-362-3p

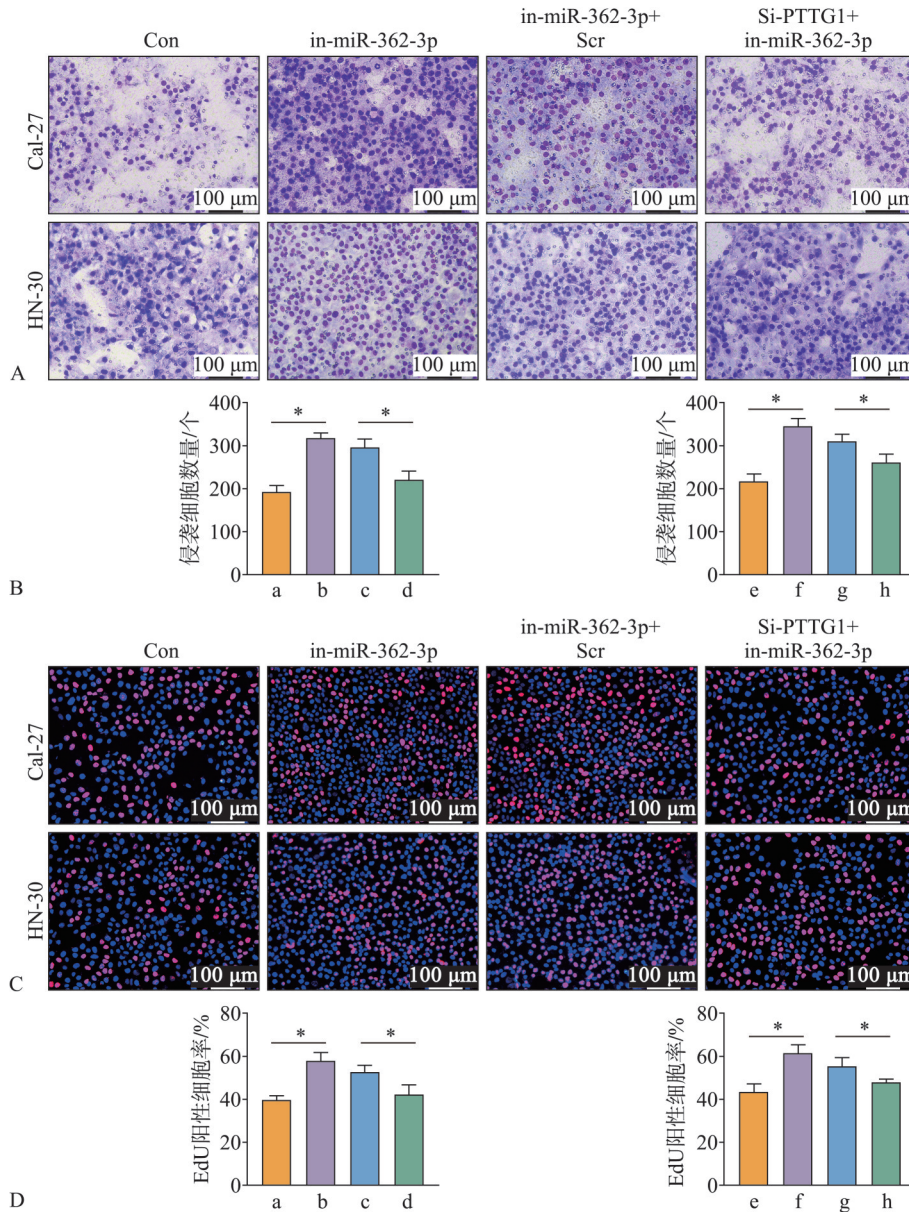
2.5 miR-362-3p 负向调控 PTTG1, 抑制 Cal-27、HN-30 的侵袭和增殖

通过 Transwell 实验检测 miR-362-3p 靶向 PTTG1 对 Cal-27、HN-30 侵袭能力的影响。与 Con/Cal-27 组 (189.33 ± 16.97) 相比, in-miR-362-3p/Cal-27 组 (317.33 ± 11.42) 中穿过小室基底膜的细

胞数量显著增加 ($P<0.05$); 而与 in-miR-362-3p+Scr/Cal-27 (295.22 ± 19.30) 组相比, Si-PTTG1+in-miR-362-3p/Cal-27 (220.56 ± 16.51) 穿过小室基底膜的细胞数量显著减少 ($P<0.05$, 图 5A、B)。与 Con/HN-30 组 (207.11 ± 16.72) 相比, in-miR-362-3p/HN-30 组 (335.89 ± 17.54) 中穿过小室基底膜的

细胞数量显著增加 ($P<0.05$); 而与 in-miR-362-3p+Scr/HN-30 组 (303.78 ± 14.24) 相比, Si-PTTG1+in-miR-362-3p/HN-30 组 (261.22 ± 9.12) 穿过小室基底膜的细胞数量显著减少 ($P<0.05$, 图 5A、

B)。结果表明敲低 PTTG1 能抑制 OSCC 细胞的侵袭能力, 敲低 miR-362-3p 可以起到一定的逆转作用。



A、B: Transwell 检测 Cal-27 和 HN-30 细胞侵袭能力, $*P<0.05$; C、D: EdU 实验检测 Cal-27 和 HN-30 细胞增殖能力, $*P<0.05$ 。a: Con/Cal-27 组; b: in-miR-362-3p/Cal-27 组; c: in-miR-362-3p+Scr/Cal-27 组; d: Si-PTTG1+in-miR-362-3p/Cal-27 组; e: Con/HN-30 组; f: in-miR-362-3p/HN-30 组; g: in-miR-362-3p+Scr/HN-30 组; h: Si-PTTG1+in-miR-362-3p/HN-30 组。

图 5 敲低 miR-362-3p 的表达后能够促进敲低 PTTG1 后的 Cal-27、HN-30 侵袭及增殖

Fig 5 miR-362-3p knockdown could promote the invasion and proliferation of Cal-27 and HN-30 after PTTG1 knockdown

EdU 增殖实验检测 miR-362-3p 靶向 PTTG1 对于 Cal-27、HN-30 增殖能力的影响。与 Con/Cal-27 组 ($39.73\%\pm1.55\%$) 相比, in-miR-362-3p/Cal-27 组 ($57.87\%\pm3.16\%$) 阳性率升高 ($P<0.05$); 而与 in-miR-362-3p+Scr/Cal-27 ($52.70\%\pm2.60\%$) 组相比, Si-PTTG1+in-miR-362-3p/Cal-27 ($42.23\%\pm$

3.66%) 阳性率降低 ($P<0.05$, 图 5C、D)。与 Con/HN-30 组 ($43.53\%\pm3.02\%$) 相比, in-miR-362-3p/HN-30 组 ($61.43\%\pm3.19\%$) 阳性率升高 ($P<0.05$, 图 5C、D); 而与 in-miR-362-3p+Scr/HN-30 ($55.30\%\pm3.44\%$) 组相比, Si-PTTG1+in-miR-362-3p/HN-30 ($47.87\%\pm1.25\%$) 阳性率降低 ($P<0.05$,

图5C、D)。这表明敲低PTTG1后抑制OSCC细胞增殖的能力，敲低miR-362-3p能起到一定的逆转作用。

3 讨论

OSCC的高转移率和高复发率是近年来人们所关注的重点，由于发生转移后的OSCC死亡率较高，并且缺乏强有力的治疗策略，这种癌症对于人类的健康也构成了重大威胁^[1,22]。本文通过差异表达分析等生物信息学方法展开研究，并进一步将生信方法与基础实验结合，通过实验验证以增加预测靶点的可信度。

Tian等^[23]认为PTTG1对于部分恶性肿瘤具有促癌调控作用，且PTTG1可能作为乳头状肾细胞癌免疫治疗的一种生物标志物。本课题组前期研究证实PTTG1可抑制肺腺癌的迁移、侵袭以及间充质转化，并且有研究^[24,25]表明PTTG1可直接参与肺癌细胞的侵袭。本研究中，通过生信在线网站查询，PTTG1在OSCC组织中的表达量较正常组织高，Western blot显示PTTG1在OSCC细胞中表达升高，并且转染敲低PTTG1质粒后进行划痕愈合实验、Transwell侵袭实验以及EdU细胞增殖实验，分别证实了PTTG1在OSCC细胞Cal-27、HN-30中起到促进迁移、侵袭、增殖的作用，这也说明了PTTG1在OSCC进展中可能作为促癌基因发挥作用。

miRNA是由内源基因编码的长度为19~25个核苷酸的短链非编码RNA，PTTG1作为一种mRNA，miRNA与mRNA之间的靶向关系也是mRNA发挥其生物学功能的重要机制，一个单一miRNA可以靶向多个mRNA，进而影响多个基因的表达^[26-27]。miRNA已被证实在恶性肿瘤的发展中发挥调控作用，且与OSCC的异常表达密切相关^[28]。Li等^[29]研究表明miR-362-3p可抑制LRP8的表达从而减弱卵巢癌细胞的迁移、侵袭和增殖。Meng等^[30]研究表明miR-362-3p可直接靶向PTTG1来抑制鼻窦鳞癌进展。本研究发现，PTTG1在OSCC细胞Cal-27、HN-30进展过程中起到促癌基因作用可能受到miR-362-3p的调控。通过在线数据库预测出miR-362-3p能与PTTG1进行靶向结合，且PTTG1的表达受到miR-362-3p调控，双荧光素酶实验证实miR-362-3p与PTTG1存在靶向结合关系，Western blot证明敲低miR-362-3p后OSCC细胞Cal-27、HN-30中PTTG1表达升高。通过Cal-

27、HN-30转染PTTG1敲低质粒及miR-362-3p敲低质粒检测其对于2种细胞侵袭以及增殖能力的影响，最终得出结论：miR-362-3p通过抑制PTTG1的促癌作用来影响OSCC的进展。本研究为继续完善miR-362-3p与OSCC的关系提供了理论参考，也可作为miR-362-3p在肿瘤中作用中的一个重要补充。

综上所述，PTTG1在OSCC细胞中高表达，并且促进Cal-27、HN-30细胞的迁移、侵袭以及增殖。敲低miR-362-3p能够促进敲低PTTG1后的OSCC细胞增殖以及侵袭的能力，说明miR-362-3p通过抑制PTTG1的促癌作用来影响OSCC的进展。PTTG1可能作为一个OSCC新的治疗靶点，在今后OSCC的预防以及治疗中起到关键作用。然而，miR-362-3p调控PTTG1的分子机制仍需要进一步研究，PTTG1在OSCC进展中的作用机制是否与细胞周期相关这也将是本课题组下一步研究的方向与重心。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Huang SH, O'sullivan B. Overview of the 8th edition TNM classification for head and neck cancer[J]. Curr Treat Options Oncol, 2017, 18(7): 40.
- [3] Peng QS, Cheng YN, Zhang WB, et al. circRNA_0000-140 suppresses oral squamous cell carcinoma growth and metastasis by targeting miR-31 to inhibit Hippo signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 112.
- [4] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [5] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer[J]. Oral Oncol, 2009, 45(4/5): 309-316.
- [6] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J (Engl), 2022, 135(5): 584-590.
- [7] Mohan SP, Bhaskaran MK, George AL, et al. Immunotherapy in oral cancer[J]. J Pharm Bioallied Sci, 2019, 11 (Suppl 2): S107-S111.
- [8] Fan T, Wang X, Zhang S, et al. NUPR1 promotes the

- proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells by activating TFE3-dependent autophagy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 130.
- [9] SHahinas J, Hysi D. Methods and risk of bias in molecular marker prognosis studies in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Dis*, 2018, 24(1/2): 115-119.
- [10] Teveroni E, Di Nicuolo F, Bianchetti G, et al. Nuclear localization of PTTG1 promotes migration and invasion of Seminoma tumor through activation of MMP-2[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(2): 212.
- [11] Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, et al. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2008, 15(3): 721-743.
- [12] Horning AM, Wang Y, Lin CK, et al. Single-cell RNA-seq reveals a subpopulation of prostate cancer cells with enhanced cell-cycle-related transcription and attenuated androgen response[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(4): 853-864.
- [13] Long L, Gao J, Zhang R. PTTG1 enhances oncolytic adenovirus 5 entry into pancreatic adenocarcinoma cells by increasing CXADR expression[J]. *Viruses*, 2023, 15(5): 1153.
- [14] Huang S, Liao Q, Li W, et al. The lncRNA PTTG3P promotes the progression of CRPC via upregulating PTTG1[J]. *Bull Cancer*, 2021, 108(4): 359-368.
- [15] Deng P, Tan M, Zhou W, et al. Bisphenol A promotes breast cancer cell proliferation by driving miR-381-3p-PTTG1-dependent cell cycle progression[J]. *Chemosphere*, 2021, 268: 129221.
- [16] Guo XC, Li L, Gao ZH, et al. The long non-coding RNA PTTG3P promotes growth and metastasis of cervical cancer through PTTG1[J]. *Aging*, 2019, 11(5): 1333-1341.
- [17] Goldman MJ, Craft B, Hastie M, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(6): 675-678.
- [18] Li JH, Liu S, Zhou H, et al. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D92-D97.
- [19] Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, et al. UALCAN: an update to the integrated cancer data analysis platform[J]. *Neoplasia*, 2022, 25: 18-27.
- [20] Vejnar CE, Zdobnov EM. MiRmap: comprehensive prediction of microRNA target repression strength[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(22): 11673-11683.
- [21] Zhang G, Li H, Sun R, et al. Long non-coding RNA ZEB2-AS1 promotes the proliferation, metastasis and epithelial mesenchymal transition in triple-negative breast cancer by epigenetically activating ZEB2[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3271-3279.
- [22] Sasahira T, Kirita T. Hallmarks of cancer-related newly prognostic factors of oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2413.
- [23] Tian X, Xu WH, Xu FJ, et al. Identification of prognostic biomarkers in papillary renal cell carcinoma and PTTG1 may serve as a biomarker for predicting immunotherapy response[J]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 211-226.
- [24] 张国新, 徐新伟, 孟斌, 等. miR-186-5p 通过靶向调控 PTTG1 抑制肺腺癌细胞的上皮-间质转化[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(4): 380-385.
- Zhang GX, Xu XW, Meng B, et al. miR-186-5p inhibits epithelial mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells through modulating PTTG1[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2017, 33(4): 380-385.
- [25] Malik MT, Kakar SS. Regulation of angiogenesis and invasion by human Pituitary tumor transforming gene (PTTG) through increased expression and secretion of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)[J]. *Mol Cancer*, 2006, 5: 61.
- [26] Gebert LFR, Macrae IJ. Regulation of microRNA function in animals[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1): 21-37.
- [27] Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [28] Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1): 5-20.
- [29] Li C, Yang Y, Wang H, et al. miR-362-3p suppresses ovarian cancer by inhibiting LRP8[J]. *Transl Oncol*, 2022, 15(1): 101284.
- [30] Meng Z, Zhu S, Liu N, et al. miR-362-3p suppresses sinonasal squamous cell carcinoma progression via directly targeting pituitary tumor-transforming gene 1[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2022, 42(1): 43-51.

(本文编辑 杜冰)