

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.008

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.008>

沉默 MYB 基因调控 NF- κ B 信号通路对 舌鳞癌细胞生长的抑制作用

许炜, 陶华, 张琪

(仙桃市第一人民医院口腔科, 湖北 仙桃 433000)

[摘要] 目的: 探究成髓细胞瘤癌基因(myeloblastoma oncogene, MYB)在舌鳞癌发生、发展中的作用以及相关作用机制。方法: 通过荧光定量PCR(real-time PCR, qPCR)检测MYB在舌鳞癌细胞系(UM1, CAL-27, SCC-9)以及正常人口腔黏膜成纤维细胞(oral mucosal fibroblasts, OMFbs)中的表达情况。转染siRNA-MYB至SCC-9细胞中, 采用四甲基偶氮唑(MTT)和Transwell法检测其对细胞活性、侵袭、迁移的影响。Western印迹观察核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路的变化。结果: MYB在舌鳞癌细胞系(UM1, CAL-27, SCC-9)细胞中的表达量明显高于正常人OMFbs($P < 0.05$)。沉默MYB可显著抑制SCC-9细胞的活性、侵袭、迁移($P < 0.05$)。Western印迹显示沉默MYB表达可显著抑制NF- κ B磷酸化, 降低基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的表达量。结论: 沉默MYB表达可通过NF- κ B信号抑制舌鳞癌细胞细胞活性、侵袭、迁移能力。

[关键词] 舌鳞癌; 侵袭; 成髓细胞瘤癌基因; 核因子- κ B

Silencing MYB gene regulating the inhibitory effect of NF- κ B signaling pathway on tongue squamous cell growth

XU Wei, TAO Hua, ZHANG Qi

(Department of Stomatology, Xiantao First People's Hospital, Xiantao Hubei 433000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role and molecular mechanism of myeloblastoma oncogene (MYB) in the development of tongue squamous cell carcinoma. **Methods:** The expression of MYB in tongue squamous cell carcinoma cell lines (UM1, CAL-27, SCC-9) and normal human oral mucosal fibroblasts (OMFbs) were detected by real-time PCR (qPCR). The cell activity and invasion and migration were analyzed by MTT and Transwell after being transfected with siRNA-MYB. Western blot was used to observe the changes of nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Results:** The expression of MYB in tongue squamous cell carcinoma cell lines (UM1, CAL-27, SCC-9) were significantly higher compared with normal human oral mucosa fibroblasts ($P < 0.05$). Silencing MYB significantly inhibited the activity, invasion and migration of SCC-9 cells ($P < 0.05$). Western blot analysis showed that silencing MYB expression significantly inhibited NF- κ B phosphorylation

收稿日期 (Date of reception): 2018-08-06

通信作者 (Corresponding author): 许炜, Email: xuwei0338@163.com

and decreased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression. **Conclusion:** Silencing MYB expression can inhibit the activity, invasion and migration of tongue squamous cell carcinoma cells by inhibiting NF- κ B signaling.

Keywords tongue squamous cell carcinoma; invasion; myeloblastoma oncogene; nuclear factor- κ B

舌鳞癌是常发生于口腔的恶性肿瘤, 其发病率位于恶性肿瘤的第8位^[1-2]。近年来有研究^[3-4]指出: 随着手术治疗技术的改善, 舌鳞癌患者的5年生存率得以提高。在舌鳞癌的发生、发展过程中, 多种癌基因或抑癌基因发挥重要作用^[5-6]。但目前对于舌鳞癌的发生、发展的分子机制尚不明确。因此, 研究舌鳞癌发病的分子作用机制意义重大。成髓细胞瘤癌基因(myeloblastosis oncogene, MYB)编码转录因子, 近年来研究^[7]表明激活或过表达MYB对肿瘤的发生、发展具有重要作用。本研究以MYB为研究对象, 旨在分析MYB在舌鳞癌细胞系中的表达量, 探究MYB对舌鳞癌细胞系增殖、侵袭和迁移的影响, 为舌鳞癌的临床治疗提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及实验试剂

舌鳞癌细胞系(UM1, CAL-27, SCC-9)以及正常人口腔黏膜成纤维细胞(oral mucosal fibroblasts, OMFbs)购自中国科学院上海细胞库, DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司, Lipofectamine 2000试剂、TRIzol试剂、荧光定量PCR(real-time PCR, qPCR)试剂盒购自美国Invitrogen公司, siRNA购自上海吉玛生物有限公司, 四甲基偶氮唑(MTT)试剂盒购自美国Sigma公司, Transwell购自日本Costar公司, Matrigel胶购自美国BD公司, 细胞裂解液、 β -actin抗体购自上海碧云天生物技术有限公司, MYB抗体、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65抗体、磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)抗体、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)抗体购自美国Abcam公司, 二抗购自美国Cell Signaling公司。qPCR仪购自德国Roche公司, 酶标仪购自美国BIO-RAD公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

舌鳞癌细胞系(UM1, CAL-27, SCC-9)以及

OMFbs培养于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基, 放入37℃, 5%CO₂、饱和湿度细胞培养箱中, 在显微镜下观察细胞生长状态, 加入胰酶消化、传代。

1.2.2 qPCR

收集细胞, 根据TRIzol试剂说明书冰上裂解5 min, 提取总RNA, 经反转录酶的作用, 合成cDNA。以cDNA为模板进行扩增反应, 由上海Invitrogen公司合成MYB基因引物, MYB引物上游: 5'-CATTCTGGCGGGATCCATGG-3', 下游: 5'-GAGAAAGCTTGATCCATCA-3'。扩增条件为95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共40个循环, 采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算MYB基因的相对表达量。

1.2.3 细胞转染

SCC-9细胞稳定传代后进行转染。将舌鳞癌SCC-9细胞分为对照组、siRNA-NC组和siRNA-MYB组。转染前24 h, 胰酶消化将细胞个数调为5 \times 10⁵个接种于6孔板中, 加入2 mL完全培养基培养至细胞达60%~70%溶和开始转染。根据Lipofectamine 2000试剂说明书进行操作。

1.2.4 检测细胞的活性

将各组细胞以3 \times 10³个/孔接种至96孔板, 培养箱中培养24 h, 根据上述方法转染48 h后, 每孔加入20 μ L 5 mg/mL MTT溶液, 37℃孵育4 h, 每孔加入150 μ L二甲基亚砷, 置于酶标仪中测定细胞在570 nm的吸光度值(A_{570 nm})。

1.2.5 检测细胞的侵袭、迁移

将Matrigel胶置于4℃冰箱过夜, 按1:6的比例进行稀释, 吸取100 μ L加入Transwell上室, 37℃静置4 h, 测定细胞的侵袭数目; 迁移数目的测定过程中上室不加入Matrigel胶。收集细胞, 上室上孔中加入1 \times 10⁴个细胞, 下室加入500 μ L含10%胎牛血清的培养基, 37℃培养24 h, 每组设置5个复孔; 湿棉签擦去上室内细胞和Matrigel胶, 100%甲醛固定30 min, 0.1%结晶紫染色5 min, 显微镜随机选取下5个区域拍照、计数, 取平均值。

1.2.6 Western 印迹

收集转染后细胞, 加入100 μ L细胞裂解液裂

解30 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min离心10 min, 收集上清, BCA试剂盒测定其浓度。吸取30 μ g总蛋白加入每泳道中, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上, 在5%脱脂奶粉中封闭; 与一抗稀释液在4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST漂洗3次 \times 10 min, 加入二抗稀释液, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h, TBST漂洗3次 \times 10 min, 曝光、拍照, Quantity One分析蛋白质灰度值。

1.3 统计学处理

实验重复3次, 采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析, 以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间数据的比较采用 t 检验, 多组数据间的比较采用单因素方差分析, 组间多重比较使用SNK- q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MYB 基因在舌鳞癌细胞系中的表达量

与正常人OMFbs相比, MYB在舌鳞癌细胞系(UM1, CAL-27, SCC-9)的表达量增加, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图1), 其中在SCC-9细胞中的表达量最高, 因此后续实验需用SCC-9细胞作为研究对象。

2.2 转染后 SCC-9 细胞中 MYB 的表达量

与对照组相比, siRNA-MYB降低SCC-9细胞中MYB mRNA的表达量, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图2)。

2.3 沉默 MYB 基因对 SCC-9 细胞活性的影响

与对照组相比, 沉默MYB基因降低SCC-9细胞活性, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图3), siRNA-NC组与对照组差异不显著。

2.4 沉默 MYB 基因对 SCC-9 细胞侵袭、迁移的影响

与对照组相比, 沉默MYB基因降低SCC-9细胞侵袭、迁移能力, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图4), siRNA-NC组与对照组差异不显著。

2.5 沉默 MYB 基因对 NF- κ B 信号通路的影响

与对照组相比, 沉默MYB基因降低SCC-9细胞NF- κ B p65的磷酸化和MMP-9蛋白水平, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图5), 但对NF- κ B p65蛋白总水平无显著影响。

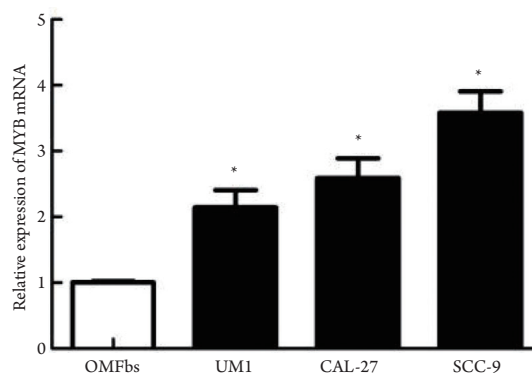


图1 MYB基因在舌鳞癌细胞系中的表达

Figure 1 Expression of MYB gene in tongue squamous cell line with OMFbs细胞相比, $*P<0.05$ 。

Compared with the control group, $*P<0.05$.

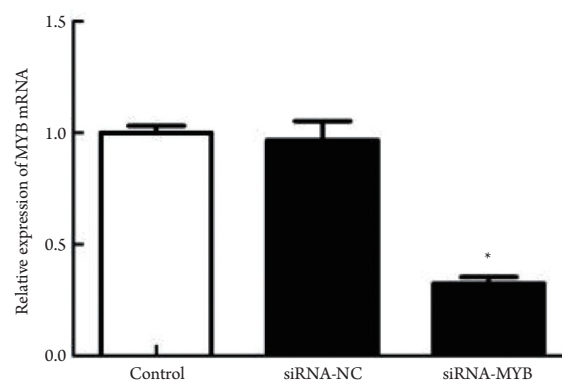


图2 转染后SCC-9细胞中MYB的表达

Figure 2 Expression of MYB in SCC-9 cells after transfected with the control group, $*P<0.05$ 。

Compared with the control group, $*P<0.05$.

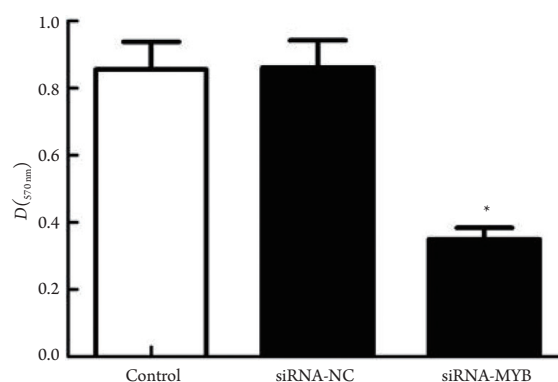


图3 沉默MYB基因对SCC-9细胞活性的影响

Figure 3 Effect of silencing MYB gene on SCC-9 cell activity with the control group, $*P<0.05$ 。

Compared with the control group, $*P<0.05$.

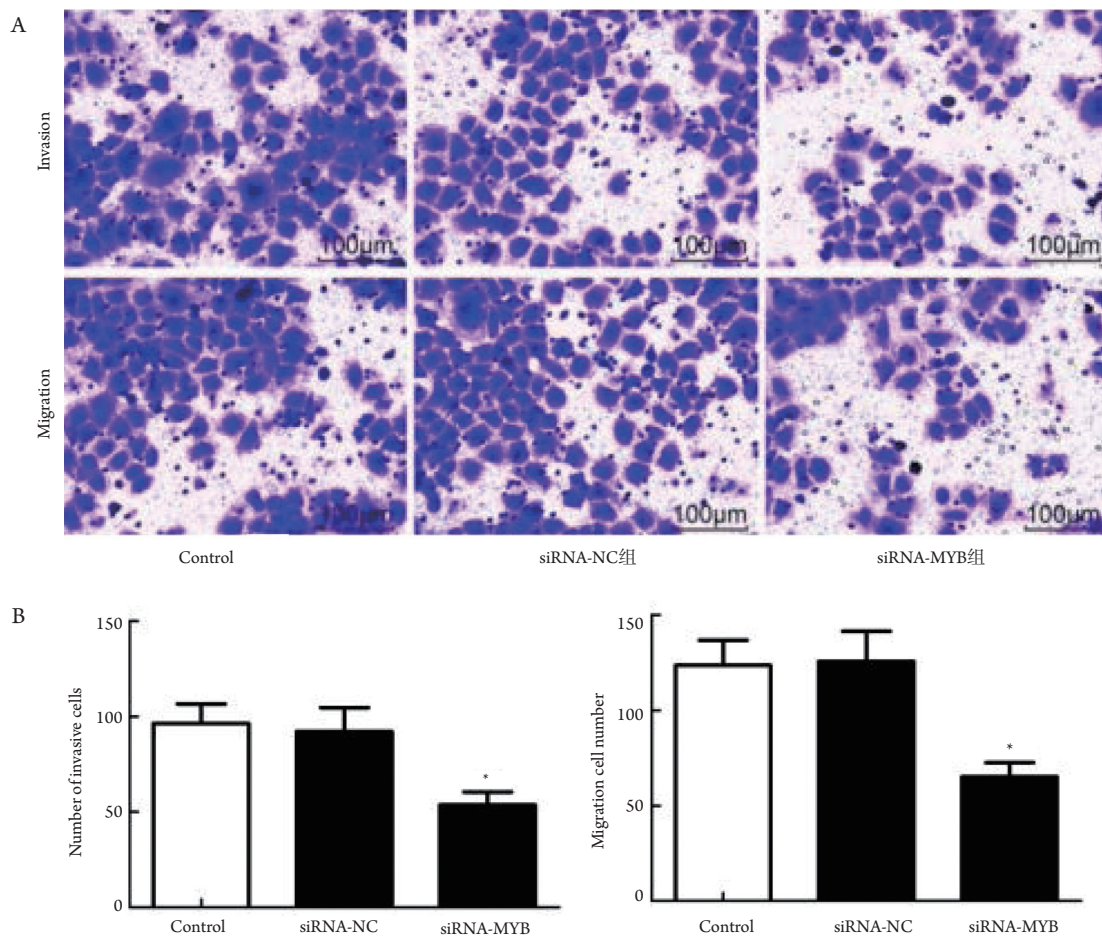


图4 沉默MYB基因对SCC-9细胞侵袭、迁移的影响

Figure 4 Effect of silencing MYB gene on invasion and migration of SCC-9 cells

(A)显微镜下观察各组细胞迁移、侵袭的变化(结晶紫染色); (B)统计分析各组细胞侵袭、迁移数目。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

(A) Cell migration and invasion were observed under microscope (crystal violet staining); (B) The number of cell invasion and migration in each group was analyzed statistically. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

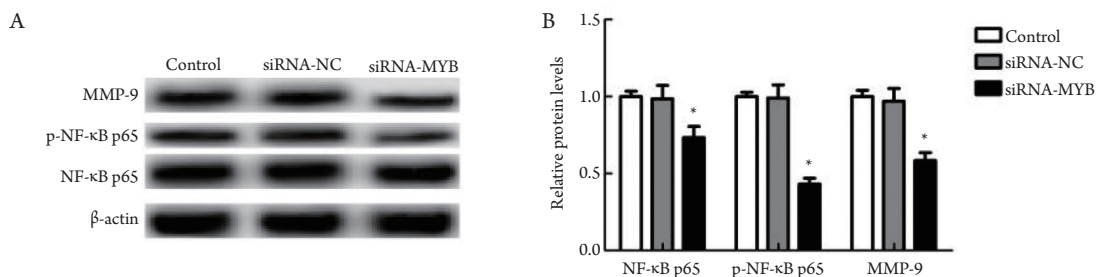


图5 Western印迹检测沉默MYB基因对NF-κB信号通路的影响

Figure 5 Effect of silencing MYB gene on NF-κB signaling pathway detected by Western blot

(A)Western印迹分析各组细胞中NF-κB信号通路蛋白水平; (B)计量分析NF-κB信号通路蛋白水平。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

(A) Western blot assay was used to analyze the NF-κB signaling protein level in each group; (B) Quantitative analysis of NF-κB signaling protein level. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

3 讨论

细胞的增殖、侵袭、迁移等生物学特性是恶性肿瘤产生的重要进程, 涉及多种基因和信号通路的共同作用。MYB基因与多种恶性肿瘤的产生密切相关, 被认为是阻碍肿瘤发生、发展以及恶性转移的重要基因之一。一项研究^[8]收集头颈部肿瘤患者的组织进行研究, 其原位杂交结果显示MYB的表达量显著上调, 且与预后无显著相关性。研究^[9]显示: 在乳腺癌ER受体阳性细胞中, 沉默MYB的表达量可显著抑制细胞的增殖, 但对ER阴性细胞无显著影响。在胃癌^[10]、胰腺癌^[11]、结肠癌^[12]等肿瘤组织中, MYB的表达量显著增加, 并与细胞的恶性增殖、侵袭、迁移密切相关。但其在舌鳞癌中的相关研究较少。本研究采用qPCR对舌鳞癌细胞系(UM1, CAL-27, SCC-9)和正常人OMFbs中MYB的表达量分析比较, 发现MYB在UM1, CAL-27, SCC-9细胞中的表达量明显高于OMFbs, 其中在SCC-9细胞中表达量相对较高; 通过转染siRNA-MYB到SCC-9细胞来模拟沉默MYB状态, 发现沉默MYB可显著抑制舌鳞癌SCC-9细胞的活性、侵袭、迁移。

细胞外基质在抑制肿瘤细胞迁移、侵袭能力方面发挥重要作用^[13-15]。研究^[16-18]发现: MMP-9是细胞外基质降解过程中的重要蛋白水解酶, 其表达量异常能破坏细胞外基质的平衡, 促进肿瘤细胞发生浸润、迁移。NF- κ B p65受到相关基因的调控, 其表达量降低, 从而降低NF- κ B p65与MMP-9基因的结合效率, 抑制MMP-9基因的转录从而下调MMP-9基因的表达量^[19]。NF- κ B是一种核转录因子, 其相关信号转导通路在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用, 可调节细胞的增殖、侵袭、迁移过程^[20-21]。NF- κ B及其上下游网络在舌鳞癌的治疗过程中可提供潜在的治疗靶点。本研究通过Western印迹检测发现: 沉默MYB可显著抑制NF- κ B p65的磷酸化过程, 进而阻碍NF- κ B信号通路的活化, 提示舌鳞癌中MYB可能参与NF- κ B信号通路的持续激活过程。

综上所述, 本研究观察到MYB在舌鳞癌细胞系中高表达, 沉默MYB抑制舌鳞癌SCC-9细胞的活性、侵袭、迁移能力, 并初步揭示了MYB可能通过调控NF- κ B信号通路发挥抑癌作用。MYB也可能作为舌鳞癌临床治疗的一个新靶点, MYB在舌鳞癌中的具体作用机制仍有待进一步研究。

参考文献

1. Simple M, Suresh A, Das D, et al. Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2015, 51(7): 643-651.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
3. Huber MA, Tantiwongkosi B. Oral and oropharyngeal cancer[J]. *Med Clin N Am*, 2014, 98(6): 1299-1321.
4. Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Clin Oncol*, 2014, 19(3): 423-430.
5. Liu Y, Chen H, Sun Z, et al. Molecular mechanisms of ethanol-associated oro-esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2015, 361(2): 164-173.
6. 李琦, 耿亚军, 郭菁, 等. has-miR-16在舌鳞癌中的生物学功能及分子机制研究[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2017, 10(6): 373-377.
7. Li Qi, Geng Yajun, Guo Jing, et al. Study on the biological function and molecular mechanism of has-microRNA-16 in tongue squamous cell carcinoma[J]. *Chinese Journal of Applied Stomatology*, 2017, 10(6): 373-377.
8. Bhardwaj A, Srivastava SK, Tyagi N, et al. MYB promotes pancreatic tumor associated-desmoplasia by up-regulating Sonic hedgehog and adrenomedullin[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14): abstr 722.
9. Rettig EM, Tan M, Ling S, et al. MYB rearrangement and clinicopathologic characteristics in head and neck adenoid cystic carcinoma[J]. *Laryngoscope*, 2015, 125(9): E292-E299.
10. Drabsch Y, Hugo H, Zhang R, et al. Mechanism of and requirement for estrogen-regulated MYB expression in estrogen-receptor-positive breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(34): 13762-13767.
11. Liang J, Liu X, Xue H, et al. MicroRNA-103a inhibits gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting c-Myb[J]. *Cell Prolif*, 2015, 48(1): 78-85.
12. Yang K, He M, Cai Z, et al. A decrease in miR-150 regulates the malignancy of pancreatic cancer by targeting c-Myb and MUC4[J]. *Pancreas*, 2015, 44(3): 370-379.
13. Millen R, Malatterre J, Cross RS, et al. Immunomodulation by MYB is associated with tumor relapse in patients with early stage colorectal cancer[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(7): e1149667.
14. Baek SH, Ko JH, Lee JH, et al. Ginkgolic acid inhibits invasion and migration and TGF- β -induced EMT of lung cancer cells through PI3K/Akt/mTOR inactivation[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(2): 346-354.
15. Dhamija S, Diederichs S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis[J]. *Int J Cancer*,

- 2016, 139(2): 269-280.
15. 胡梅艳, 孙晓红. 细胞外基质, 基质金属蛋白酶与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 肿瘤药学, 2016, 6(1): 26-30.
HU Meiyan, SUN Xiaohong. Advances in the relationship between extracellular matrix, matrix metalloproteinases and malignant tumors[J]. Anti-Tumor Pharmacy, 2016, 6(1): 26-30.
 16. Smith BN, Bhowmick NA. Role of EMT in metastasis and therapy resistance[J]. J Clin Med, 2016, 5(2).
 17. Chou J, Wang B, Zheng T, et al. MALAT1 induced migration and invasion of human breast cancer cells by competitively binding miR-1 with cdc42[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 472(1): 262-269.
 18. Jung O, Lee J, Lee Y J, et al. Timosaponin AIII inhibits migration and invasion of A549 human non-small-cell lung cancer cells via attenuations of MMP-2 and MMP-9 by inhibitions of ERK1/2, Src/FAK and β -catenin signaling pathways[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(16): 3963-3967.
 19. Amin H, Wani NA, Farooq S, et al. Inhibition of invasion in pancreatic cancer cells by conjugation of EPA with β ,3-Pip-OH via PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. ACS Med Chem Lett, 2015, 6(10): 1071-1074.
 20. Zhu G, Huang Q, Huang Y, et al. Lipopolysaccharide increases the release of VEGF-C that enhances cell motility and promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis through the TLR4-NF- κ B/JNK pathways in colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(45): 73711-73724.
 21. Zhang JF, Wang P, Yan YJ, et al. IL-33 enhances glioma cell migration and invasion by upregulation of MMP2 and MMP9 via the ST2-NF- κ B pathway[J]. Oncol Rep, 2017, 38(4): 2033-2042.

本文引用: 许炜, 陶华, 张琪. 沉默MYB基因调控NF- κ B信号通路对舌鳞癌细胞生长的抑制作用[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(11): 2337-2342. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.008

Cite this article as: XU Wei, TAO Hua, ZHANG Qi. Silencing MYB gene regulating the inhibitory effect of NF- κ B signaling pathway on tongue squamous cell growth[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(11): 2337-2342. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.008