

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.18.003

miR-20a 靶向 CCND1 作用 PI3K/AKT 信号通路 抑制皮肤鳞状细胞癌的发展 *

胡新红¹ 曹天宇¹ 吕雅洁¹ 刘 涛¹ 周 芳^{2△}

(1 中国人民解放军空军军医大学第二附属医院皮肤科 陕西 西安 710038;

2 西安医学院第二附属医院皮肤科 陕西 西安 710005)

摘要目的:探究 miR-20a 与 CCND1 蛋白在皮肤鳞状细胞癌(CSCC)中的作用关系,以及其可能涉及的信号通路分子机制。**方法:**分别收集皮肤鳞状细胞癌患者的皮肤癌组织及其邻近正常皮肤组织,采用 qRT-PCR 分析组织中 miR-20a 和 CCND1 基因表达水平。为探究 miR-20a 对 CSCC 细胞的影响,将 SCL-1 细胞分为对照组(不转染)、miR-NC 组(转染 miR-NC)和 miR-20a mimics 组(转染 miR-20a mimics);为探究 CCND1 与 PI3K/AKT 信号通路的关系,将 SCL-1 细胞分为对照组(不转染)、si-NC 组(转染 si-NC)和 si-CCND1 组(转染 si-CCND1);为探究 miR-20a 与 CCND1 间的作用关系及对 CSCC 细胞的影响,将 SCL-1 细胞分为 miR-NC 组(转染 miR-NC)、miR-20a mimics 组(转染 miR-20a mimics)、mimics+pcDNA 组(共转染 miR-20a mimics 和 pcDNA)和 mimics+CCND1 组(共转染 miR-20a mimics 和 pcDNA-CCND1)。采用 Western blot 分析 p-AKT、AKT、p-PI3K、PI3K 和 GSK-3β 蛋白表达水平;采用 MTT 检测细胞增殖情况;采用流式细胞术检测细胞凋亡情况;采用 Transwell 分析细胞迁移和侵袭情况;采用双荧光素酶报告基因检测分析 miR-20a 与 CCND1 的靶向关系。**结果:**CSCC 癌组织和 SCL-1 中 miR-20a 均低表达,CCND1 高表达。与对照组和 miR-NC 组比较,miR-20a mimics 组 SCL-1 细胞增殖水平以及侵袭和迁移数量均降低($P<0.05$),SCL-1 细胞凋亡水平升高($P<0.05$),PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平降低($P<0.05$)。TargetScanHuman 数据库分析和双荧光素酶报告基因检测结果显示 miR-20a 与 CCND1 存在靶向作用关系。与对照组和 si-NC 组比较,si-CCND1 组 SCL-1 细胞中 CCND1 和 GSK-3β 蛋白表达水平以及 PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平均降低($P<0.01$)。与 miR-20a mimics 组或 mimics+pcDNA 组比较,mimics+CCND1 组 SCL-1 细胞增殖水平以及侵袭和迁移数量均升高($P<0.05$),SCL-1 细胞凋亡水平降低($P<0.05$),PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平均升高($P<0.05$)。**结论:**过表达 miR-20a 可能通过靶向抑制 CCND1 的表达而抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活,从而抑制 CSCC 细胞的增殖、侵袭和迁移,并促进癌细胞凋亡。

关键词:皮肤鳞状细胞癌;miR-20a;CCND1;PI3K/AKT 信号通路

中图分类号:R-33;R739.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)18-3416-09

miR-20a Inhibits the Development of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma through Targeted by CCND1 in the PI3K/AKT Signaling Pathway*

HU Xin-hong¹, CAO Tian-yu¹, LÜ Ya-jie¹, LIU Tao¹, ZHOU Fang^{2△}

(1 Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of Dermatology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi, 710005, China)

ABSTRACT Objective: To explore the relationship between miR-20a and CCND1 protein in cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC), as well as the possible signaling pathway molecular mechanism involved. **Methods:** Skin cancer tissues and adjacent normal skin tissues of the CSCC patients were collected, respectively. And the expression levels of miR-20a and CCND1 genes in tissues were analyzed by qRT-PCR. In order to investigate the effect of miR-20a on SCL-1 cells of CSCC cell line, SCL-1 cells were divided into control group (non-transfection), miR-NC group (transfection of miR-NC) and miR-20a mimics group (transfection of miR-20a mimics). In order to investigate the relationship between CCND1 and PI3K/AKT signaling pathway, SCL-1 cells were divided into control group (non-transfection), si-NC group (transfection of si-NC) and si-CCND1 group (transfection of si-CCND1). In order to explore the interaction between miR-20a and CCND1 and its effect on CSCC cells, SCL-1 cells were divided into miR-NC group (transfection of miR-NC), miR-20a mimics group (transfection of miR-20a mimics), and mimics+pcDNA group (co-transfected miR-20a mimics and pcDNA) and mimics+CCND1 group (co-transfected miR-20a mimics and pcDNA-CCND1). The protein expression levels of p-AKT, AKT, p-PI3K, PI3K and GSK-3β were analyzed by Western blot. Cell proliferation was detected by MTT. The apoptosis was detected by flow cytometry. Cell migration and invasion were analyzed by Transwell. Dual luciferase reporter assay was used to analyze the targeting

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81703119)

作者简介:胡新红(1980-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:皮肤病理,E-mail: huxinhongxiao@126.com

△ 通讯作者:周芳(1986-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:皮肤癌,E-mail: 1239656922@qq.com

(收稿日期:2023-03-21 接受日期:2023-04-16)

relationship between miR-20a and CCND1. **Results:** The expression level of miR-20a in CSCC cancer tissues and SCL-1 cell were low, and the expression level of CCND1 in CSCC cancer tissues and SCL-1 cell were high. Compared with control group and miR-NC group, the proliferation level and the number of invasion and migration of SCL-1 cells in the miR-20a mimics group were decreased ($P<0.05$), the apoptosis level of SCL-1 cells was increased ($P<0.01$), and the protein phosphorylation levels of PI3K and AKT were decreased ($P<0.01$). Target Scan Human database analysis result and dual luciferase reporter assay results showed that miR-20a had a targeting relationship with CCND1. Compared with control group and si-NC group, the protein expression levels of CCND1 and GSK-3 β and the protein phosphorylation levels of PI3K and AKT in SCL-1 cells in the si-CCND1 group were decreased ($P<0.01$). Compared with miR-20a mimics group or mimics+pcDNA group, the proliferation level and the number of invasion and migration of SCL-1 cells in mimics+CCND1 group were increased ($P<0.05$), while the apoptosis level of SCL-1 cells was decreased ($P<0.01$), and the protein phosphorylation levels of PI3K and AKT were increased ($P<0.01$). **Conclusion:** Overexpression of miR-20a may inhibit the activation of PI3K/AKT signaling pathway by targeting the expression level of CCND1, thereby inhibiting the proliferation, invasion and migration of CSCC cells, and promoting the apoptosis of cancer cells.

Key word: Cutaneous squamous cell carcinoma; miR-20a; CCND1; PI3K/AKT signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-3; R739.5 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2023)18-3416-09

前言

皮肤鳞状细胞癌 (Cutaneous squamous cell carcinoma, CSCC) 已成为最常见的第二大非黑色素瘤皮肤癌, 其发病基础与表皮角质形成细胞不受控制的增殖有关^[1,2]。为了降低 CSCC 的发展和转移风险, 确定潜在的新型分子靶点对 CSCC 患者的诊断和治疗非常重要, Xu 等发现了 E2F 转录因子 1 (E2F transcription factor 1, E2F1) 和细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1, CCND1) 等 3 个与 CSCC 相关的核心靶基因^[3]。MicroRNAs(miRNAs) 是一类非编码 RNA 分子, 长度大约为 22 个碱基, 参与基因表达的转录后控制, 影响着肿瘤细胞的增殖和侵袭, 以及其他复杂的过程, 如血管生成和转移等^[4]。miRNAs 已被证明参与了 CSCC 的起始、迁移、侵袭和耐药性, 多项研究结果显示 miR-21、miR-31 和 miR-221 等在 CSCC 癌组织中高表达^[5,6], 而 miR-20a、miR-125b 和 miR-497 等在 CSCC 癌组织中低表达^[7,8]。miR-20a 在不同肿瘤中作用差异较大, 如在结直肠癌、胃癌和胆囊癌等癌组织中处于高表达水平, 而在乳腺癌、口腔鳞状细胞癌和肝癌中低表达, 显示抗癌特性^[9]。CCND1 作为 G1/S 特异性周期蛋白, 参与细胞分裂, 与癌细胞的增殖活动密切相关, 也是潜在的 CSCC 治疗靶点。miR-20a 具有潜在的抗癌作用, 但该作用是否与 CCND1 蛋白相关, 尚未有文献报道。本研究从临床检测和细胞水平两个层面探究 CSCC 中 miR-20a 与 CCND1 蛋白的作用关系, 以及其可能涉及的信号通路分子机制, 旨在为 CSCC 的临床治疗探索新的道路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 RPMI 1640 培养基(货号 11875085)和酶标仪(货号 A51119500C) 均购自美国 ThermoFisher Scientific 公司。Lipofectamine™ 2000 试剂盒(货号 11668-091)美国 Invitrogen 公司。PrimeScript RT master Mix 试剂盒(货号 RR036Q)购自日本 Takara 公司。兔抗蛋白激酶 B (Protein kinase B, AKT, 货号 #9272)、p-AKT (货号 #4060T)、磷脂酰肌醇 3 激酶(Phosphoinositide-3 kinase, PI3K, 货号 #4292S)、p-PI3K (货号 #17366)、

糖原合成酶激酶 -3 β (Glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β 货号 #12456S)、p-GSK-3 β (货号 #5558T)、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (货号 #5174T) 和 HRP 标记的二抗 IgG(货号 #7074P2)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(货号 CA1020) 购自北京索莱宝科技有限公司。Lipofectamine 2000TM 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。双荧光素酶活性检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.1.2 实验细胞 CSCC 细胞系 SCL-1 细胞和人类永生化表皮细胞 HaCaT 均购自美国 ATCC 公司。

1.2 方法

1.2.1 CSCC 临床组织样本的收集 选取 40 例 2019 年 3 月~2021 年 12 月中国人民解放军空军军医大学第二附属医院皮肤科收治并确诊为皮肤鳞状细胞癌的患者, 纳入标准: ① 病理诊断确诊为 CSCC; ② 患者在手术前均未接受放化疗; ③ 同意接受手术切除皮肤病灶组织。排除标准: ① 合并有其他类肿瘤; ② 有自身免疫性疾病史; ③ 患有严重传染性疾病。入选的患者中男性 28 例, 女性 12 例, 平均年龄 (57.39 ± 6.13) 岁; 高分化有 17 例, 中低分化有 23 例; 表皮浸润 26 例, 真皮浸润 10 例, 皮下组织浸润 4 例; 发生淋巴结转移 9 例, 未发生淋巴结转移 31 例。分别收集患者的 CSCC 皮肤癌组织及其邻近正常皮肤组织, 并于 -80℃ 超低温冰箱保存。采用 qRT-PCR 分析皮肤癌组织和正常皮肤组织中 miR-20a 和 CCND1 基因的表达水平。本研究已获中国人民解放军空军军医大学第二附属医院医学伦理委员会审查批准(伦理审批号: 201801180023), 且所有患者均已知情同意,

1.2.2 CSCC 细胞系 SCL-1 细胞培养 CSCC 细胞系 SCL-1 细胞和人类永生化表皮细胞 HaCaT 待复苏培养结束后, 将细胞于 RPMI 1640 培养基(含 10% 的胎牛血清)中传代培养, 2-3 天更换 1 次培养基, 细胞培养箱环境: 温度 37℃, 5% CO₂。采用 qRT-PCR 分析 SCL-1 细胞和 HaCaT 细胞中 miR-20a 的表达水平。

1.2.3 细胞分组和转染 为了探究 miR-20a 对 CSCC 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移, 以及 PI3K/AKT 信号通路的影响, 将

SCL-1 细胞分为对照组、miR-NC 组和 miR-20a mimics 组。取对数生长期 SCL-1 细胞按照 1×10^5 个 / 孔的密度转移接种至 6 孔板中过夜培养, 然后更换为不含胚胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养。按照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒所述步骤将 miR-NC 和 miR-20a mimics 分别转染至 miR-NC 组和 miR-20a mimics 组的 SCL-1 细胞中, 对照组 SCL-1 细胞不做转染处理。

为了探究 CCND1 与 PI3K/AKT 信号通路的关系, 将 SCL-1 细胞分为对照组、si-NC 组和 si-CCND1 组。细胞培养如上所述, 按照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒所述步骤将 si-NC 和 si-CCND1 分别转染至 si-NC 组和 si-CCND1 组的 SCL-1 细胞中, 对照组 SCL-1 细胞不做转染处理。

为了探究 miR-20a 与 CCND1 间的作用关系, 及对 CSCC 细胞的影响, 将 SCL-1 细胞分为 miR-NC 组、miR-20a mimics 组、miR-20a mimics+pcDNA 组(简写为 mimics+pcDNA 组)和 miR-20a mimics+pcDNA-CCND1 组(简写为 mimics+CCND1 组)。细胞培养如上所述, 按照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒所述步骤将 miR-NC 和 miR-20a mimics 分别转染至 miR-NC 组和 miR-20a mimics 组 SCL-1 细胞中; 将 miR-20a mimics 和 pcDNA 以及 miR-20a mimics 和 pcDNA-CCND1 分别共转染至 mimics+pcDNA 组和 mimics+CCND1 组的 SCL-1 细胞中。

1.2.4 qRT-PCR 分析 miR-20a 和 CCND1 基因表达水平 各组细胞转染后培养 48 h, 分别收集各组 SCL-1 细胞并采用 Trizol 试剂提取总 RNA。采用 PrimeScript RT master Mix 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 在 ABI QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 系统进行 PCR 反应。PCR 程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 该步骤 35 个循环。miR-20a, F: 5'-AAGCGCCTTAAAG TGCTTATAGT-3', R: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGT-3'; U6, 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3', 5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3'; CCND1, F: 5'-GCCGAGAAGCTGTGCATCTAC-3', R: 5'-TCCACTTGAGCTTGTCAACCAG-3'; β -actin, 5'-CCACGGCT CTT CCAGCTCC-3', 5'-GGACTCCATGCCAGGAAGGAA-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行基因相对表达量分析, U6 作为 miR-20a 内参, β -actin 作为 CCND1 内参。

1.2.5 Western blot 分析相关蛋白表达水平 收集各组细胞, 采用 RIPA 蛋白裂解液处理后低温高速离心(12000 rpm), 收集上清液, BCA 法蛋白定量测定。各组取等量蛋白上样, 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 然后转移至 PVDF 膜, 置于 5% 的脱脂牛奶室温下孵育 2 h。TBST 溶液洗膜 3 次, 然后分别加入稀释后的一抗于 4℃ 孵育过夜。TBST 溶液洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的二抗 IgG(1:2000)于室温孵育 1 h。采用增强化学发光显影, 并在 Bio-Rad 化学发光成像系统下曝光, 利用 ImageJ 软件评估蛋白条带的光密度。一抗包括 p-AKT(1:1000)、AKT(1:1000)、p-PI3K(1:1000)、PI3K(1:1000)、GSK-3 β (1:1000) 和 GAPDH(1:1000)。

1.2.6 MTT 检测细胞增殖水平 转染完成 8 h 后收集各组细胞, 以 3×10^3 个细胞 / 孔的密度转接至 96 孔板, 分别在培养 0 h、24 h、48 h 和 72 h 后加入 MTT(5 mg/mL), 继续孵育 4 h 后, 加入 150 μ L 的 DMSO 充分混合溶解, 取 MTT 混合培养物

于酶标仪下检测 490 nm 处的 OD 值, 构建生长曲线评估细胞增殖情况。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡水平 取各组完成转染的细胞, 按照 1×10^4 个细胞 / 孔的密度接种于 12 孔板, 常规培养 48 h 后, 采用不含有 EDTA 的胰酶消化和收集细胞。预冷的 PBS 洗涤细胞后, 加入 300 μ L 的 1×结合缓冲液重悬细胞。按照试剂盒所述步骤, 加入 5 μ L 的 Annexin V/FITC 混匀后室温孵育(避光)5 min, 再加入 5 μ L 的 PI 溶液和 400 μ L 的 PBS 溶液, 随后流式细胞仪上机检测细胞凋亡情况。

1.2.8 Transwell 分析细胞迁移和侵袭水平 吸取适量 Matrigel 平铺于 Transwell 上室聚碳酸酯膜, 于 37℃ 培养箱中孵育 30 min 制作 Transwell 小室以作侵袭实验备用, 移动实验上室无需铺胶。取各组转染后的细胞采用胰酶消化后 PBS 洗涤, 加入适量含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞密度至 5×10^6 个细胞 / mL 左右。取 300 μ L 细胞悬液加入 Transwell 小室中, 另取 500 μ L 培养基加入下室, 确保上 / 下室间无气泡。将培养板放入细胞培养箱中培养 48 h。小室用 PBS 洗净后, 于 4% 多聚甲醛固定, 然后用 1% 的结晶紫染色液于室温下染色处理 10 min, 再 PBS 漂洗小室并晾干, 置于光学显微镜下随机选择 5 个区域拍照, 采用 Image J 软件进行细胞计数, 并计算平均值。

1.2.9 双荧光素酶报告基因检测 靶基因预测数据库 TargetScanHuman 分析结果显示 miR-20a 的 5' 端与 CCND1 的 3' 端存在特异性结合位点。构建野生型 WT-CCND1-3'-UTR 和突变体 MUT-CCND1-3'-UTR 荧光素酶报告基因载体, 按照 Lipofectamine 2000TM 转染试剂盒说明步骤将 WT-CCND1-3'-UTR 或 MUT-CCND1-3'-UTR 与 miR-20a mimics 或 miR-NC 分别共转染至 SCL-1 细胞, 继续培养孵育 48 h 后, 收集细胞, 采用双荧光素酶活性检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

本研究采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间采用 t 检验进行统计学差异比较; 多组间采用单向方差分析(ANOVA)或 LSD 检验进行统计学差异分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-20a 和 CCND1 在 CSCC 组织和细胞中的表达

与癌旁邻近正常皮肤组织比较, CSCC 患者肿瘤组织中 miR-20a 表达水平降低($P < 0.05$), CCND1 的 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$)。与 HaCaT 细胞比较, SCL-1 细胞中 miR-20a 表达水平降低($P < 0.05$), CCND1 的 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 过表达 miR-20a 抑制 CSCC 细胞增殖、侵袭和迁移并促进细胞凋亡

与对照组和 miR-NC 组比较, miR-20a mimics 组 SCL-1 细胞中 miR-20a 水平升高($P < 0.01$)。与对照组和 miR-NC 组比较, miR-20a mimics 组 SCL-1 细胞增殖水平以及侵袭和迁移数量均降低($P < 0.05$), SCL-1 细胞凋亡水平升高($P < 0.05$)。见图 2 和图 3。

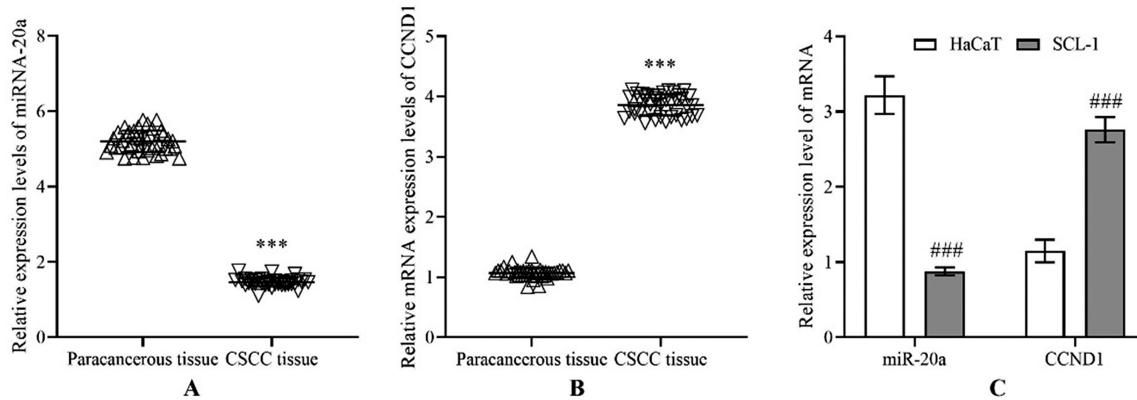


图 1 miR-20a 和 CCND1 在 CSCC 组织和细胞中的表达水平

Fig.1 Expression level of miR-20a and CCND1 in CSCC tissues and cells

Note: A and B: Expression levels of miR-20a and CCND1 in CSCC tissues; C: Expression levels of miR-20a and CCND1 in cells;

Compared with paracancerous tissue, ***P<0.001; Compared with HaCaT, ###P<0.001.

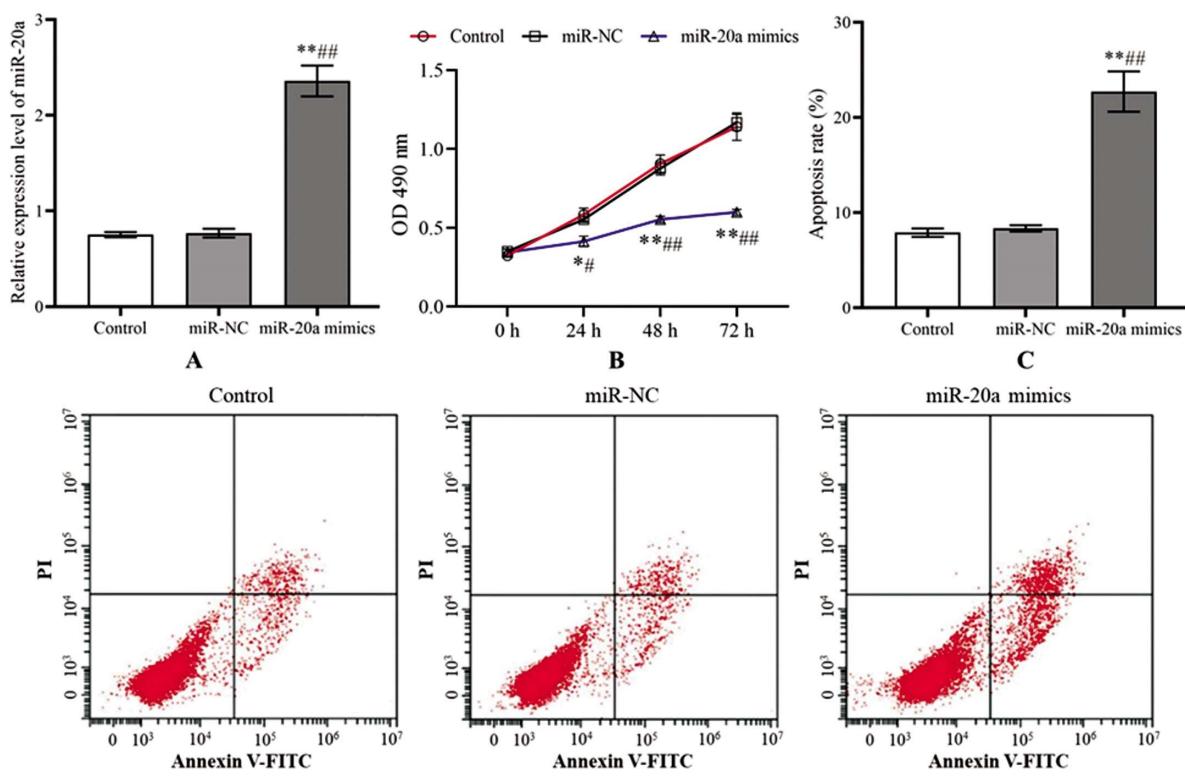


图 2 过表达 miR-20a 抑制 SCL-1 细胞增殖并促进凋亡

Fig.2 Overexpression of miR-20a inhibits proliferation and promotes apoptosis of SCL-1 cells

Note: A: Expression level of miR-20a in SCL-1 cells of each group; B: Effect of overexpression of miR-20a on SCL-1 cell proliferation;

C and D: Effects of overexpression of miR-20a on apoptosis of SCL-1 cells; Compared with control group, *P<0.05, **P<0.01;

Compared with miR-NC group, #P<0.05, ##P<0.01.

2.3 过表达 miR-20a 抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活

与 HaCaT 细胞比较, 对照组和 miR-NC 组 SCL-1 细胞中 PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平升高 ($P<0.05$)。与对照组和 miR-NC 组比较, miR-20a mimics 组 SCL-1 细胞中 PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平降低 ($P<0.05$)。见图 4。

2.4 miR-20a 靶向调控 CCND1

TargetScanHuman 数据在线分析结果显示 miR-20a 的 5' 端与 CCND1 的 3' 端存在特异性结合位点。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 与 miR-NC 组比较, miR-20a mimics 与

WT-CCND1-3'-UTR 共转染的 SCL-1 细胞中荧光素酶活性降低 ($P<0.05$)。见图 5。

2.5 CCND1 反馈调节 PI3K/AKT 信号通路

与 HaCaT 细胞比较, 对照组和 si-NC 组 SCL-1 细胞中 CCND1 和 GSK-3 β 蛋白表达水平以及 PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平均升高 ($P<0.01$)。与对照组和 si-NC 组比较, si-CCND1 组 SCL-1 细胞中 CCND1 和 GSK-3 β 蛋白表达水平以及 PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平均降低 ($P<0.01$)。见图 6。

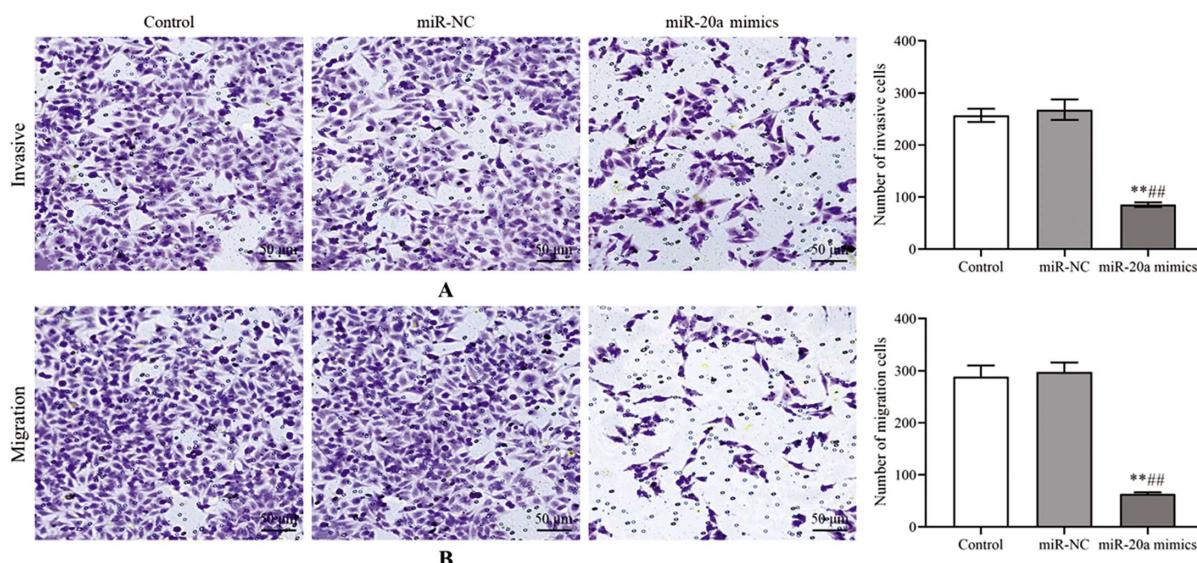


图 3 过表达 miR-20a 抑制 SCL-1 细胞侵袭和迁移

Fig.3 Overexpression of miR-20a inhibits SCL-1 cell invasion and migration

Note: A: Effect of overexpression of miR-20a on SCL-1 cell invasion; B: Effect of overexpression of miR-20a on SCL-1 cell migration;

Compared with control group, **P<0.01; Compared with miR-NC group, ##P<0.01.

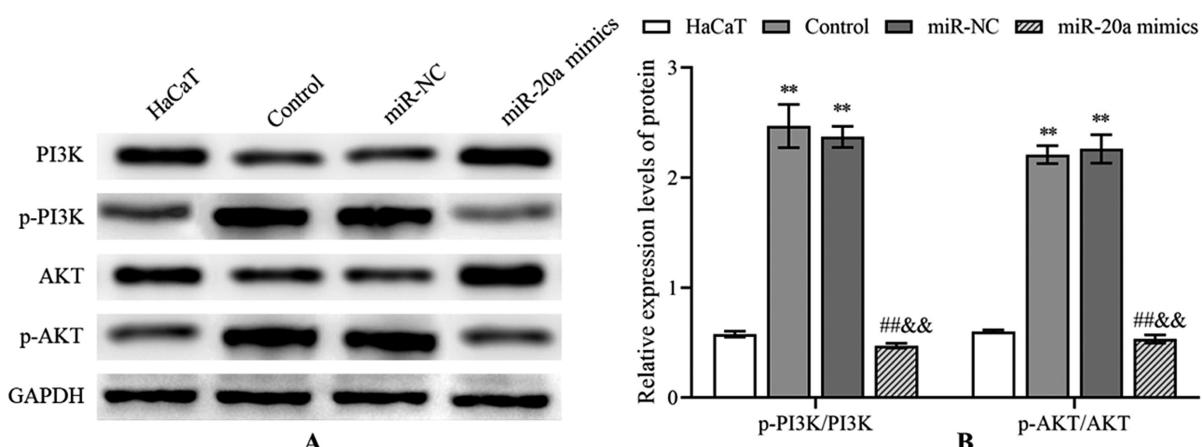


图 4 过表达 miR-20a 对 PI3K/AKT 信号通路的影响

Fig.4 Effect of overexpression of miR-20a on PI3K/AKT signaling pathway

Note: A: Western blot detection of protein expression level; B: Protein expression level statistics; Compared with HaCat, **P<0.01;

Compared with control group, ##P<0.01; Compared with miR-NC group, &&P<0.01.

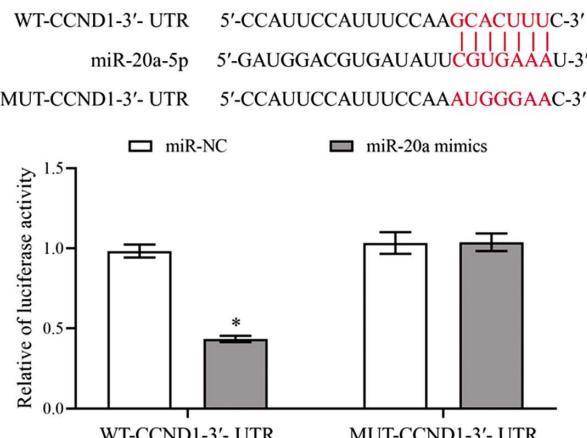


图 5 miR-20a 与 CCND1 靶向关系分析

Fig.5 Targeting relationship between miR-20a and CCND1

Note: Compared with miR-NC group, *P<0.05.

2.6 过表达 CCND1 抑制了 miR-20a 对 CSCC 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响

与 miR-NC 组比较, miR-20a mimics 组和 mimics+pcDNA 组 SCL-1 细胞增殖水平以及侵袭和迁移数量均降低($P<0.05$), SCL-1 细胞凋亡水平升高($P<0.05$)。与 miR-20a mimics 组或 mimics+pcDNA 组比较, mimics+CCND1 组 SCL-1 细胞增殖水平以及侵袭和迁移数量均升高($P<0.05$), SCL-1 细胞凋亡水平降低($P<0.05$)。见图 7 和图 8。

2.7 过表达 CCND1 逆转了 miR-20a 对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用

与 miR-NC 组比较, miR-20a mimics 组和 mimics+pcDNA 组 SCL-1 细胞中 PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平均降低($P<0.05$)。与 miR-20a mimics 组或 mimics+pcDNA 组比较, mimics+CCND1 组 SCL-1 细胞中 PI3K 和 AKT 蛋白磷酸化水平均升高($P<0.05$)。见图 9。

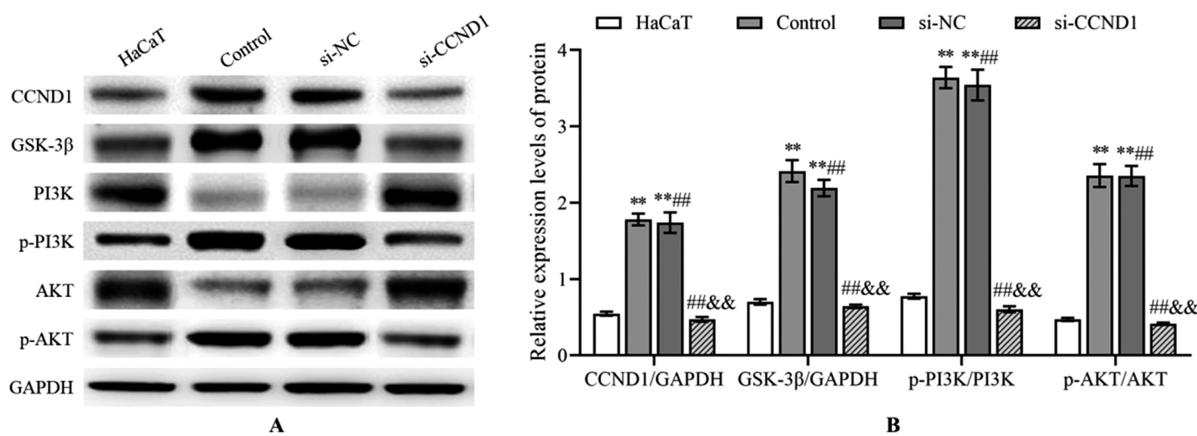


图 6 CCND1 对 PI3K/AKT 信号通路的调节作用

Fig.6 The regulatory effect of CCND1 on PI3K/AKT signaling pathway

Note: A: Western blot detection of protein expression level; B: Protein expression level statistics; Compared with HaCat, **P<0.01; Compared with control group, #P<0.01; Compared with si-NC group, &P<0.01.

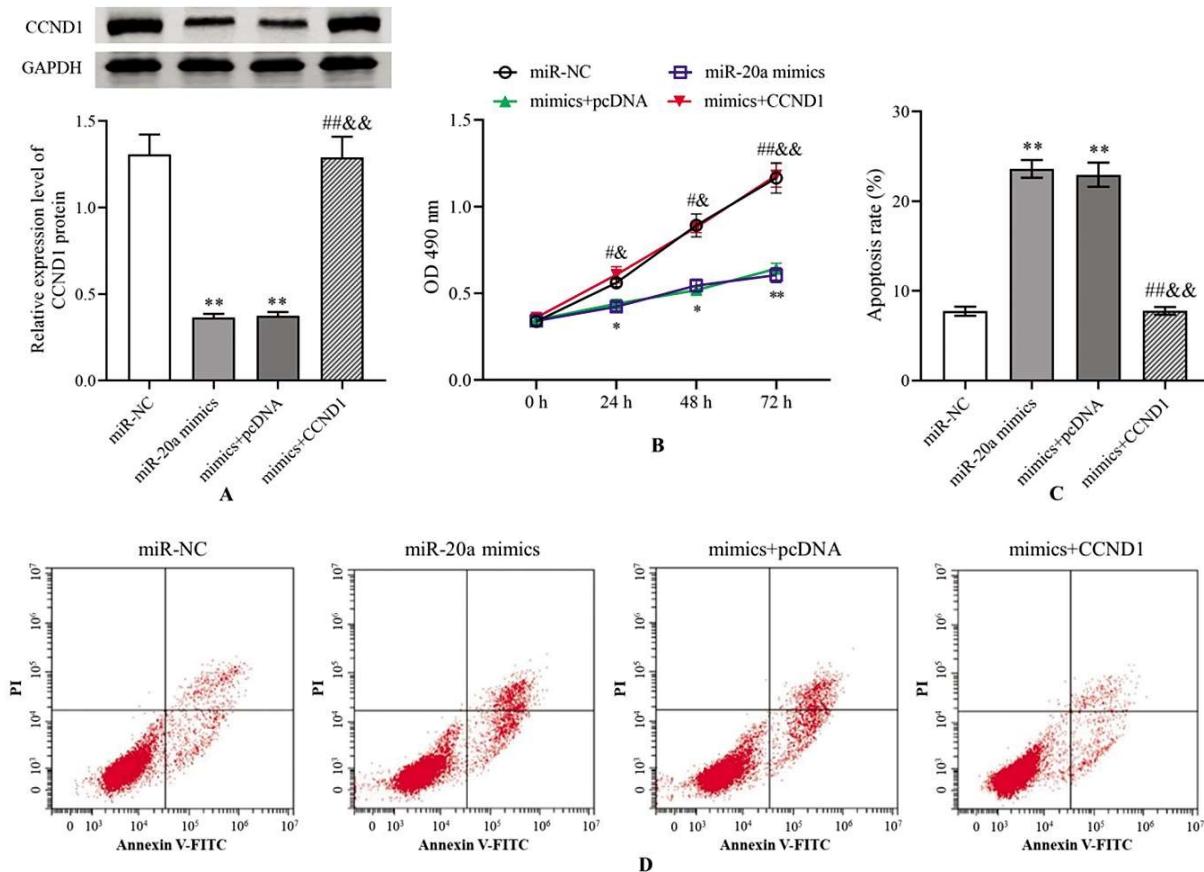


图 7 过表达 CCND1 抑制了 miR-20a 对 SCL-1 细胞增殖和凋亡的影响

Fig.7 Overexpression of CCND1 inhibited the effects of miR-20a on the proliferation and apoptosis of SCL-1 cells

Note: A: Expression level of CCND1 in SCL-1 cells of each group; B: Effect of overexpression of CCND1 on SCL-1 cell proliferation; C and D: Effects of overexpression of CCND1 on apoptosis of SCL-1 cells; Compared with miR-NC group, *P<0.05, **P<0.01; Compared with miR-20a mimics group, #P<0.05, ##P<0.01; Compared with mimics+pcDNA group, &P<0.05, &&P<0.01.

3 讨论

皮肤鳞状细胞癌 (CSCC) 是一种常见的非黑色素瘤皮肤癌，而角质形成细胞的恶性增殖和转移导致 CSCC 患者的病死率一直居高不下。放疗和化疗以及手术切除是目前临幊上针对

CSCC 最为主要的治疗方式，但从患者生存率和预后效果来看，均存在一定的局限性^[10]。而目前 CSCC 相关的研究热点也主要集中在其发病分子机制上，通过网络构建筛选治疗靶点，进而研发新的诊断和治疗生物标志物。Qiu 等通过筛选正常皮肤组织与 CSCC 组织之间重叠的差异表达基因谱，发现骨髓母

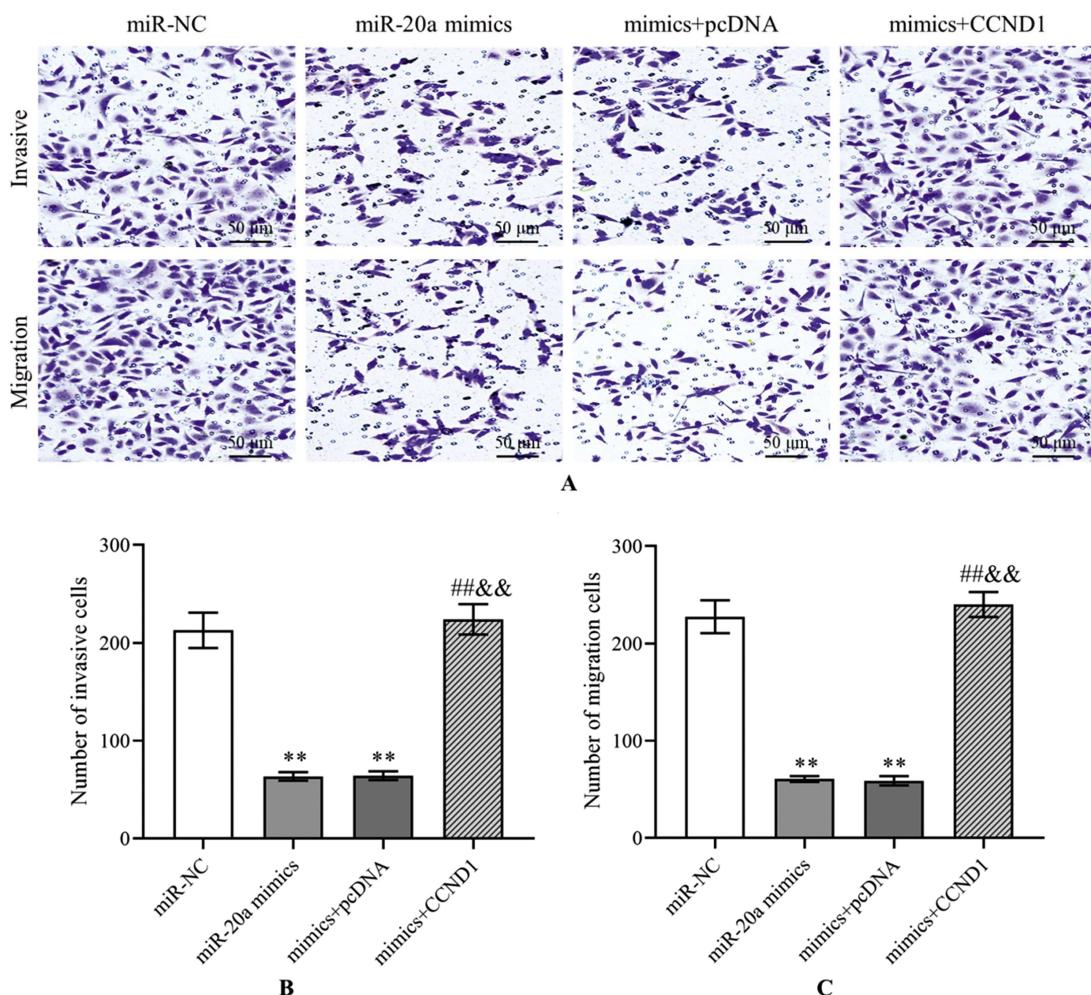


图 8 过表达 CCND1 抑制了 miR-20a 对 SCL-1 细胞侵袭和迁移的影响

Fig.8 Overexpression of CCND1 inhibited the effects of miR-20a on the invasion and migration of SCL-1 cells

Note: A: SCL-1 cell invasion and migration were analyzed by Transwell; B: Effect of overexpression of CCND1 on SCL-1 cell invasion; C: Effect of overexpression of CCND1 on SCL-1 cell migration; Compared with miR-NC group, **P<0.01;
Compared with miR-20a mimics group, #P<0.01; Compared with mimics+pcDNA group, ##P<0.01.

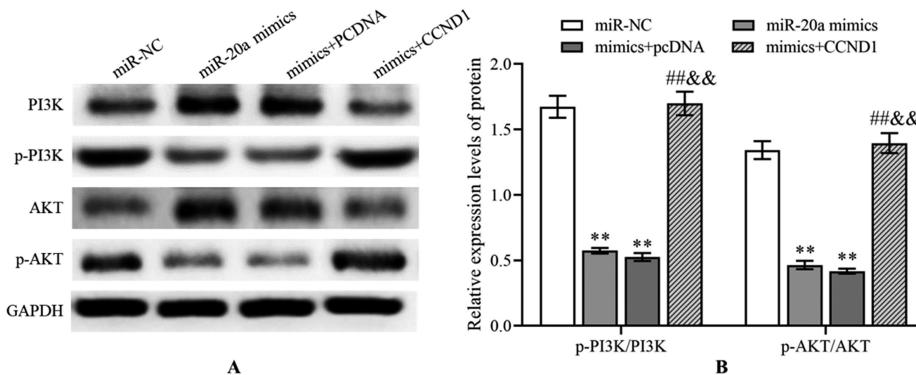


图 9 过表达 CCND1 对 PI3K/AKT 信号通路的影响

Fig.9 Effect of overexpression of CCND1 on PI3K/AKT signaling pathway

Note: A: Western blot detection of protein expression level; B: Protein expression level statistics; Compared with miR-NC group, **P<0.01;
Compared with miR-20a mimics group, #P<0.01; Compared with mimics+pcDNA group, ##P<0.01.

细胞增生症病毒癌基因同源物样 2 (MYB proto-oncogene like 2, MYBL2) 和胸苷激酶 1 (Thymidine kinase 1, TK1) 是 CSCC 起始和进展的重要标志物^[11]; Liu 等发现 TOP2A、RRM2、蛋白酶体亚基 β-8 (Proteasome subunit beta 8, PSMB8)、PSMB9、PDZ 结合激酶 (PDZ binding kinase, PBK) 和 ISG15 在 CSCC

组织中表达上调, 可能是潜在的靶点基因^[3]; Xu 等的研究也发现了 3 个与 CSCC 发展紧密相关的核心靶基因 AGO4、E2F1 和 CCND1^[4]。本研究旨在通过对 CCND1 这个潜在的靶点基因进行解析, 以探究 CCND1 在 CSCC 发展中的分子作用机制。

miRNA 作为近 30 年来临床和基础医学研究热点,已经被证实与肿瘤的起始、发生和发展密切相关。miRNA 的异常表达调控着肿瘤的各种生物行为,如增殖、凋亡、迁移和侵袭等^[12]。在 CSCC 的发病机制方面,miRNA 已被进行了广泛的研究,结果显示 miRNA 在调控 CSCC 中显示出双重角色,一部分 miRNA 展示出良好的抑癌作用,如 miR-20a、miR-125b 和 miR-497 等^[8,9];另有一部分 miRNA 显示出促癌作用,如 miR-21、miR-31 和 miR-221 等^[6,7]。miR-20a 作为 miR-17-92 簇中的一员,其在不同肿瘤中也发挥着不同的作用。Gao 等发现 miR-20a 通过 PI3K/AKT 通路调节 PTEN 促进乳腺癌进展^[13];Xiao 等认为 miR-20a 促进了结直肠癌的发展,可以作为结直肠癌患者的潜在新型诊断生物标志物和治疗靶标^[14]。而 Fahim 等发现肝癌患者肿瘤组织中 miR-20a 低表达,预测 miR-20a 可以作为肝癌诊断血清标志物^[15];Zhou 等研究发现 miR-20a 通过直接靶向 LIMK1 基因参与 CSCC 的肿瘤抑制过程^[16];且 Zhang 等也发现 miR-20a 低表达可以促进 CSCC 的发展,且患者预后较差^[17]。本研究中,我们发现 CSCC 患者其癌组织和 SCL-1 细胞中的 miR-20a 均处于低表达水平。我们以 SCL-1 细胞作为研究对象,通过分子技术使 SCL-1 细胞中的 miR-20a 过表达,结果显示 SCL-1 细胞的增殖、侵袭和迁移水平均受到抑制,同时细胞凋亡水平升高,这表明 miR-20a 在 CSCC 的发生和发展中发挥着抑癌作用,这与 Zhou^[16] 和 Zhang^[17] 的研究结论一致。

细胞周期蛋白 D1(CCND1)主要是在细胞核中发挥作用,作为细胞周期进程的调节因子。CCND1 通过其作为周期蛋白依赖性激酶 4(Cyclin-dependent kinase, CDK)和 CDK6 的变构调节因子,调节从 G1 期到 S 期的转变。在正常细胞中,CCND1 的表达水平受到严格的调控;而在癌症中,CCND1 的活性以各种方式增强表达,进而促进细胞增殖,促进肿瘤生长,因此,CCND1 在癌症的发病机制中起着核心作用。De Amicis 等发现雄激素受体蛋白 1 通过抑制 CCND1 的表达而抑制乳腺癌的细胞周期进程^[18]。在肝癌中,CCND1 与 Smad2/3 和 Smad4 相互作用并激活,进而促进肝癌的形成^[19]。Kuzmano 等研究发现 FBXO25 通过 CCND1 促进皮肤鳞状细胞癌的生长和转移^[20]。本研究中,在 CSCC 患者的癌组织和 SCL-1 细胞中的 CCND1 均处于高表达水平,表明在 CSCC 中 CCND1 可能是一个潜在的致癌因子。通过 TargetScanHuman 数据库分析发现 miR-20a 与 CCND1 存在靶向作用关系,我们通过在 SCL-1 细胞中构建 CCND1 过表达体系,结果显示过表达 CCND1 可以逆转 miR-20a 对 SCL-1 细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用,恢复 SCL-1 细胞的肿瘤生物学特性。这也间接表明,miR-20a 对 CSCC 发生和发展的抑癌作用可能是通过抑制 CCND1 的高表达来实现的,但具体是通过何种信号通路实现调控作用仍需要作进一步研究。

PI3K/AKT 信号通路是细胞内重要的调节通路之一,通过影响其信号通路上相关基因的异常表达来参与调节恶性肿瘤中细胞的增殖、凋亡和侵袭等多种生物学行为。在皮肤癌的相关研究中,PI3K/AKT 信号通路已被证实参与了 CSCC 的发病机制^[21];也有研究认为犬尿氨酸酶可以通过调节 PI3K/AKT 通路而抑制 CSCC 细胞的生长^[22];邹颖的研究显示高迁移率族蛋

白 1 (High mobility group box 1, HMGB1) 能通过活化 MAPK 及 PI3K/AKT 信号通路,从而促进人皮肤鳞癌细胞系 SCC13 细胞的迁移^[23]。本研究结果显示,CCND1 反馈调节 PI3K/AKT 信号通路,通过干扰 SCL-1 细胞中 CCND1 的表达后,PI3K/AKT 信号通路激活被抑制,PI3K 和 AKT 蛋白的磷酸化水平均降低,该结果也表明 CCND1 与 PI3K/AKT 信号通路之间存在正向调节作用。多项研究结果显示,miRNA 通过对 PI3K/AKT 信号通路相关基因表达水平的调控而影响多种癌症的进展。miR-489 通过靶向 SPIN1 介导的 PI3K/AKT 通路而抑制胶质瘤细胞增殖、细胞周期进程并诱导细胞凋亡^[24];姜黄素通过 miR-152-3p 抑制 PI3K/AKT 信号通路,进而抑制黑色素瘤的增殖和转移^[25];miR-21 抑制 PI3K/AKT 信号通路激活来阻碍 CSCC 细胞的侵袭和转移^[26];miR-17-5p 通过下调 PIK3R1 基因表达,激活 PI3K/AKT 信号通路,促进皮肤鳞状细胞癌的发生发展^[27]。本研究中,SCL-1 细胞中过表达 miR-20a 后,PI3K 和 AKT 蛋白的磷酸化水平均降低,表明 PI3K/AKT 信号通路的激活受到抑制;而过表达 CCND1 后则逆转了 miR-20a 对 PI3K/AKT 信号通路激活的抑制作用,该结果表明 miR-20a 极有可能是通过靶向 CCND1 的表达,进而抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活,从而影响 CSCC 的进展。

综上所述,皮肤鳞状细胞癌的组织和细胞中 miR-20a 低表达,CCND1 高表达;过表达 miR-20a 可能通过靶向抑制 CCND1 的表达而抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活,从而抑制 CSCC 细胞的增殖、侵袭和迁移,并促进癌细胞凋亡。但本研究仅在体外细胞水平探究了 miR-20a 和 CCND1 以及与 PI3K/AKT 信号通路在 CSCC 中的分子作用关系,仍需在实验动物水平做进一步的验证性研究,以期更为准确的解析 miR-20a/CCND1/PI3K/AKT 信号通路在 CSCC 中的作用机制,为临床的未来应用提供思路。

参考文献(References)

- Korhonen N, Ylitalo L, Luukkaala T, et al. Characteristics and trends of cutaneous squamous cell carcinoma in a patient cohort in finland 2006-2015[J]. Acta Dermato Venereologica, 2019, 99(4): 412-416
- Petit A, Hourbeigt K, Servagi-Vernat S, et al. Factors associated with inoperable cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Eur J Dermatol, 2021, 31(3): 396-402
- Xu Y, Dong Y, Deng Y, et al. Identifying an lncRNA-related ceRNA network to reveal novel targets for a cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Biology, 2021, 10(5): 432
- García-Sancho N, Corchado-Cobos R, Pérez-Losada J, et al. MicroRNA dysregulation in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2181
- Wang A, Landén NX, Meisgen F, et al. MicroRNA-31 is overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma and regulates cell motility and colony formation ability of tumor cells [J]. PLoS One, 2014, 9 (7): e103206
- Gong ZH, Zhou F, Shi C, et al. miRNA-221 promotes cutaneous squamous cell carcinoma progression by targeting PTEN[J]. Cell Mol Biol Lett, 2019, 24: 9
- Xu N, Zhang L, Meisgen F, et al. MicroRNA-125b down-regulates matrix metallopeptidase 13 and inhibits cutaneous squamous cell

- carcinoma cell proliferation, migration, and invasion[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(35): 29899-29908
- [8] Wei XH, Gu XL, Zhou XT, et al. MiR-497 promotes the progression of cutaneous squamous cell carcinoma through FAM114A2 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21): 7348-7355
- [9] Zhang Q, Wang Q, Sun W, et al. Change of Circulating and Tissue-Based miR-20a in human cancers and associated prognostic implication: a systematic review and meta-analysis [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 6124927
- [10] 王鑫, 范志霞, 王朋敏, 等. 皮肤鳞状细胞癌的研究进展 [J]. 中国临床研究, 2018, 31(6): 850-852
- [11] Qiu CG, Shen B, Sun XQ. Significant biomarkers identification associated with cutaneous squamous cell carcinoma progression [J]. *Int J Gen Med*, 2022, 15: 2347-2360
- [12] Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(1): 155-162
- [13] Gao X, Qin T, Mao J, et al. PTENP1/miR-20a/PTEN axis contributes to breast cancer progression by regulating PTEN via PI3K/AKT pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 256
- [14] Xiao Z, Chen S, Feng S, et al. Function and mechanisms of microRNA20a in colorectal cancer (Review)[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1605-1616
- [15] Fahim A, Qureshi A, Kazi S, et al. Expression of miR-20a: A serum biomarker in the diagnostic approach for hepatocellular carcinoma [J]. *J Pak Med Assoc*, 2019, 69(1): 29-33
- [16] Zhou J, Liu R, Luo C, et al. MiR-20a inhibits cutaneous squamous cell carcinoma metastasis and proliferation by directly targeting LIMIK1[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(10): 1340-1349
- [17] Zhang L, Xiang P, Han X, et al. Decreased expression of microRNA-20a promotes tumor progression and predicts poor prognosis of cutaneous squamous cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (9): 11446-11451
- [18] De Amicis F, Chiodo C, Morelli C, et al. AIB1 sequestration by androgen receptor inhibits estrogen-dependent cyclin D1 expression in breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1038
- [19] Xia W, Lo CM, Poon RYC, et al. Smad inhibitor induces CSC differentiation for effective chemosensitization in cyclin D1- and TGF- β /Smad-regulated liver cancer stem cell-like cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 38811-38824
- [20] Kuzmanov A, Johansen P, Hofbauer G. FBXO25 promotes cutaneous squamous cell carcinoma growth and metastasis through Cyclin D1 [J]. *J Invest Dermatol*, 2020, 140(12): 2496-2504
- [21] Nardo LD, Pellegrini C, Stefani AD, et al. Molecular genetics of cutaneous squamous cell carcinoma: perspective for treatment strategies[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2020, 34(5): 932-941
- [22] Ci C, Wu C, Lyu D, et al. Down-regulation of kynureninase restrains cutaneous squamous cell carcinoma proliferation and represses PI3K/AKT pathway[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2020, 45(2): 194-201
- [23] 邹颖. 高迁移率族蛋白 1 通过 MAPK 及 PI3K/AKT 通路诱导皮肤鳞状细胞癌转移[D]. 福州: 福建医科大学, 2016
- [24] Li Y, Ma X, Wang Y, et al. miR-489 inhibits proliferation, cell cycle progression and induces apoptosis of glioma cells via targeting SPIN1-mediated PI3K/AKT pathway [J]. *Biomed Phar macother*, 2017, 93: 435-443
- [25] Ning N, Liu S, Liu X, et al. Curcumol inhibits the proliferation and metastasis of melanoma via the miR-152-3p/PI3K/AKT and ERK/NF- κ B signaling pathways[J]. *J Cancer*, 2020, 11(7): 1679-1692
- [26] Yin S, Lin X. MicroRNA-21 contributes to cutaneous squamous cell carcinoma progression via mediating TIMP3/PI3K/AKT signaling axis[J]. *Int J Gen Med*, 2021, 14: 27-39
- [27] 郭金兰, 甘才斌, 张洁, 等. miR-17-5p 驱向 PI3K/AKT 信号通路调控皮肤鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡的机制 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(12): 2599-2603