

本文引用:唐乃高,李鹏程,翁海勇,董 慧,郑根建. 甘草素抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(11): 1863-1869.

## 甘草素抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖的机制研究

唐乃高,李鹏程,翁海勇,董 慧,郑根建\*

(海南医学院第一附属医院口腔科,海南 海口 570100)

**[摘要]** 目的 研究甘草素通过微RNA-486-3p(miRNA-486-3p, miR-486-3p)靶向盘蛋白结构域受体-1(discoidin domain receptor 1, DDR1)抑制口腔鳞状细胞癌及其作用机制。方法 采用不同浓度甘草素处理人口腔鳞状细胞癌 SCC-15 细胞 48 h, MTT 法检测甘草素对细胞生存率的影响。将细胞分为对照组、甘草素组、miR 抑制剂组、病毒对照组、抑制慢病毒组和过表达慢病毒组, RT-PCR 检测 miR-486-3p 和 DDR1 表达; 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 染色检测细胞增殖情况; Western blot 检测 cleaved Caspase-3 和 Caspase-3 表达。将细胞分为转染对照组和转染组, 使用包含野生型或突变型 DDR1 3'-UTR 的双荧光素酶报告基因检测系统检测 miR-486-3p 和 DDR1 的结合情况。结果 与 0  $\mu\text{mol/L}$  甘草素比较, 100、120、150  $\mu\text{mol/L}$  甘草素能明显抑制 SCC-15 细胞的生存率( $P<0.05$ )。与对照组比较, 甘草素组 miR-486-3p 的相对表达量、cleaved Caspase-3/Caspase-3 相对比率均明显升高( $P<0.05$ ), DDR1 的相对表达量、EdU 阳性细胞相对比值均明显降低( $P<0.05$ )。与甘草素组比较, miR 抑制剂组 miR-486-3p 的相对表达量、cleaved Caspase-3/Caspase-3 相对比率均明显降低( $P<0.05$ ), DDR1 的相对表达量、EdU 阳性细胞相对比值均明显升高( $P<0.05$ )。与病毒对照组比较, 抑制慢病毒组 EdU 阳性细胞相对比率明显降低( $P<0.05$ ), cleaved Caspase-3/Caspase-3 相对比率明显升高( $P<0.05$ ); 过表达慢病毒组 EdU 阳性细胞相对比率明显升高( $P<0.05$ ), cleaved Caspase-3/Caspase-3 相对比率明显降低( $P<0.05$ )。miR-486-3p 与 DDR1 存在结合位点。与转染对照组比较, 转染组相对荧光素酶活力明显降低( $P<0.05$ ), 野生型 DDR1 3'-UTR 相对荧光素酶活力明显降低( $P<0.05$ )。结论 甘草素通过 miR-486-3p 靶向 DDR1 抑制 SCC-15 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 进而发挥抗肿瘤作用。

**[关键词]** 口腔癌; 鳞状细胞癌; 甘草素; microRNA-486-3p; 盘蛋白结构域受体-1; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R273

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.11.015

### Mechanism of liquiritigenin inhibiting proliferation of oral squamous cell carcinoma

TANG Naigao, LI Pengcheng, WENG Haiyong, DONG Hui, ZHENG Genjian\*

(Department of Stomatology, The First Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570100, China)

**[Abstract]** **Objective** To study mechanism of liquiritigenin inhibiting oral squamous cell carcinoma based on targeting discoidin domain receptor 1 (DDR1) through microRNA-486-3p (miR-486-3p). **Methods** We adopted different concentrations of liquiritigenin to treat human oral squamous cell carcinoma (SCC-15) cells for 48 h, detected the effects of liquiritigenin on cell survival rates by MTT assay. Cells were divided into control group, liquiritigenin group, miR-486-3p inhibitor group, virus control group, inhibiting slow virus group and over-expression lentivirus group. The expression of miR-486-3p and DDR1 was detected by RT-PCR. Cell proliferation was detected by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining. The expression of cleaved Caspase-3 and Caspase-3 was detected by Western blot. Cells were divided into transfection control group and transfection group. The combined condition of miR-486-3p and DDR1 was detected by double luciferase reporter gene detection system containing wildtype or

**[收稿日期]** 2022-08-19

**[基金项目]** 国家自然科学基金地区科学基金项目(81760196)。

**[第一作者]** 唐乃高,男,本科,主治医师,研究方向:口腔颌面部肿瘤。

**[通信作者]**\* 郑根建,男,博士,主任医师, E-mail: airforcezhgj@163.com。

mutant DDR1 3'-UTR. **Results** Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  liquiritigenin, MTT assay showed that 100, 120, 150  $\mu\text{mol/L}$  liquiritigenin could significantly inhibit the survival rates of SCC-15 cells ( $P<0.05$ ). Compared with control group, RT-PCR results showed that liquiritigenin significantly increased the relative expression of miR-486-3p in SCC-15 cells. The relative rates of cleaved Caspase-3/Caspase-3 ( $P<0.05$ ), the relative expression of DDR1 and the relative ratio of EdU positive neurons all significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with liquiritigenin group, the assay results showed that the relative expression of miR-486-3p in SCC-15 cells and the relative rates of cleaved Caspase-3/Caspase-3 significantly decreased, and the relative expression of DDR1 and the relative ratio of EdU positive neurons significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with virus control group, the relative rates of EdU positive neurons of the inhibiting slow virus group significantly decreased ( $P<0.05$ ), and the relative rates of cleaved Caspase-3/Caspase-3 significantly increased ( $P<0.05$ ). The relative rates of EdU positive cells in the over-expression lentivirus group significantly increased ( $P<0.05$ ), and the relative rates of cleaved Caspase-3/Caspase-3 significantly decreased ( $P<0.05$ ). There existed combination points sitting between miR-486-3p and DDR1. Compared with transfection control group, the relative luciferase activity of transfection group significantly decreased ( $P<0.05$ ), and the relative luciferase activity of wildtype DDR1 3'-UTR significantly decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Liquiritigenin can inhibit the proliferation of SCC-15 cells and promote the apoptosis process of SCC-15 by targeting DDR1 through miR-486-3p, which plays a role to suppress cancer.

[**Keywords**] oral carcinoma; squamous cell carcinoma; liquiritigenin; microRNA-486-3p; discoidin domain receptor 1; proliferation; apoptosis

口腔癌主要是指口腔鳞状细胞癌,是世界上高度流行和致命的癌症之一,在过去10年中其发病率和死亡率显著上升<sup>[1]</sup>。尽管外科手术、放射治疗、化学治疗和靶向治疗等治疗方式取得了很大的进展,但口腔癌患者的5年总生存率在过去20年里并没有明显改善<sup>[2]</sup>。甘草素是甘草中重要黄酮类化合物之一,而甘草是我国一种宝贵的中药资源<sup>[3]</sup>。据报道,甘草具有调节血管病变、抗肿瘤、改善纤维化、抗炎等多种药理作用,且其不良反应较少<sup>[4]</sup>。SCC-15细胞为人舌鳞癌细胞,被广泛应用于研究口腔鳞状细胞癌,甘草素能提高人口腔鳞状细胞癌 SCC-15细胞放射治疗敏感性,其作用机制与细胞自噬有关<sup>[5]</sup>。因此,探索了解甘草素对口腔鳞状细胞癌的相关作用功能,寻找新的治疗靶点,对判断预后和改善口腔癌具有潜在的治疗意义。

在多种癌症的发展过程中,微RNA-486-3p (microRNA-486-3p, miR-486-3p)可以通过抑制多种癌细胞的迁移和侵袭,发挥抗肿瘤作用<sup>[6-7]</sup>。盘蛋白结构域受体-1(discoidin domain receptor 1, DDR1)是盘蛋白结构域受体亚家族的成员。DDR1激活后,在胞质结构域的多个酪氨酸残基上自磷酸化,并将信号传递到细胞<sup>[8]</sup>。DDR1的异常表达和激活已在多种人类癌症中被报道,如肺癌、乳腺癌、口腔癌和肝癌<sup>[9]</sup>。与许多其他受体酪氨酸激酶一样,失调的DDR1在肿瘤的发生和发展中发挥重要作用,如生存、增殖、

黏附、迁移、转移、上皮-间叶细胞转化和耐药等<sup>[10]</sup>。

本研究拟通过实验阐明甘草素对口腔鳞状细胞癌 SCC-15 细胞的作用及对相关机制进行初步探讨,明确 miR-486-3p 与 DDR1 的相互作用关系,对 miR-486-3p 在口腔癌中的作用及为临床口腔鳞状细胞癌选择用药提供参考和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞

SCC-15 细胞购自上海酶研生物科技有限公司(批号:CC-Y1639),使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。

### 1.2 主要试剂和仪器

5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)溶液(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:KGA331);甘氨酸、Hoechst 染色液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司(批号分别为 ST085、C0003、23225);逆转录酶、TaqMan microRNA 反转录试剂盒、Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂、逆转录试剂盒均购自美国 Thermo Fisher 公司(批号分别为 18080-044、4366579、13778150、1622);Quantifect SYBR Green PCR 试剂盒、Trizol 均购自美国 Takara 公司(批号分别为 74131、7231);pmirGLO 双荧光素酶报告基因载体质粒(美国 Promega 公司,批号:E133A);定点诱变试剂盒

(美国 Stratagene 公司,批号:210518);胎牛血清和 DMEM 均购自美国 Gibco 公司(批号分别为10099141、2375446);Caspase-3(美国 Proteintech 公司,批号:19677-1-AP);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体、GAPDH 抗体均购自美国 Abcam 公司(批号分别为 ab125938、AF5009)。所有 PCR 引物由上海生工和锐博生物合成。

离心机(型号:ST16R)、细胞培养箱(型号:42590923)均购自美国 Thermo Fisher 公司;RT-PCR 仪(型号:CFX96)、免疫印迹电泳设备(型号:1645050)、Chemidoc XRS Plus 发光图像分析仪(型号:1708265)均购自美国 Bio-Rad 公司;酶标仪(型号:Tecan Infinite M200,日本 ECA 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞分组及处理

(1)随机取 SCC-15 细胞,分别用 0、20、50、80、100、120、150  $\mu\text{mol/L}$  甘草素培养。结合文献[5]的报道,使用 100  $\mu\text{mol/L}$  甘草素处理 SCC-15 细胞 48 h 后,进行后续实验。

(2)取生长融合至 80%的 SCC-15 细胞,并随机分为 3 组:对照组、甘草素组和 miR 抑制剂组。对照组采用 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂转染 micro RNA 阴性对照(micro RNA negative control, miR-NC);甘草素组给予 100  $\mu\text{mol/L}$  甘草素,并转染 miR-NC;miR 抑制剂组给予 100  $\mu\text{mol/L}$  甘草素<sup>[9]</sup>,并转染 100 nmol/L 的 miR-486-3p 抑制剂。

(3)取生长融合至 60%的 SCC-15 细胞,使用包含野生型或突变型 DDR1 3'-UTR 的 pmirGLO 双荧光素酶构建物进行检测,并随机分为转染对照组和转染组。转染对照组使用 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂转染 miR-NC;转染组使用 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂转染 miR-486-3p 模拟物。

(4)取生长融合至 80%的 SCC-15 细胞,并随机分为 3 组:分别为病毒对照组、抑制慢病毒组和过表达慢病毒组。病毒对照组给予 108 TU 的对照病毒;抑制慢病毒组给予 108 TU 的 DDR1 抑制慢病毒;过表达慢病毒组给予 108 TU 的 DDR1 过表达慢病毒。

### 2.2 甲基偶氮唑蓝(methyl thiazoly tetrazolium, MTT)法检测细胞生存率

取 0、20、50、80、100、120、150  $\mu\text{mol/L}$  甘草素培养的对数生长期 SCC-15 细胞进行实验,将细胞置于 96 孔板中,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。细胞经处理后,加入终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 继续培养 4 h,弃去培养基,加入 DMSO 于摇床低速震荡 10 min,待结晶全部溶解后,用酶标仪读取各孔吸光度,计算细胞生存率。

### 2.3 EdU 染色检测细胞增殖情况

取对照组、甘草素组、miR 抑制剂组、病毒对照组、抑制慢病毒组和过表达慢病毒组对数生长期细胞进行实验,用细胞培养基按 1000:1 的比例稀释 EdU 溶液,制备适量 50 mol/L EdU 培养基,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  50 mol/L EdU 培养基孵育 2 h,弃培养基,PBS 清洗 3 次,5 min/次。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞固定液(即含 4%多聚甲醛的 PBS)室温孵育 30 min,弃固定液,PBS 清洗 3 次,5 min/次。采用 0.5% Triton X-100 室温破膜 20 min,PBS 清洗 3 次,5 min/次。每孔加入 2 mg/mL 甘氨酸,脱色摇床孵育 5 min 后,弃甘氨酸溶液,PBS 清洗 3 次,5 min/次。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的 Appollo 染色反应液,避光,室温,脱色摇床孵育 30 min,弃染色反应液。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  甲醇清洗 2 次,5 min/次。用去离子水按 100:1 的比例稀释 Hoechst 染色液,避光孵育 20 min,PBS 清洗 3 次,5 min/次。使用荧光显微镜进行拍摄。

### 2.4 RT-PCR 检测 miR-486-3p 和 DDR1 表达

按照 Trizol 法,提取对照组、甘草素组、miR 抑制剂组细胞总 RNA,经酶标仪检测纯度后,根据逆转录试剂盒说明书,取 300 ng 总 RNA 逆转录合成互补 DNA,进行 RT-PCR 反应。采用特异的茎环逆转录引物和 TaqMan microRNA 反转录试剂盒合成互补 DNA miRNA,在按照 RT-PCR 配制体系加样后,再加入 miRNA 的前引物和后引物,70  $^{\circ}\text{C}$  反应 10 min 后,按照 4:1 的比例加入 RT 反应缓冲液和逆转录酶。根据试剂说明书设定的反应温度与时间进行实时定量。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 6 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火,延伸 40 s,40 个循环。DDR1 正向序列为 GTTCCTGGCGGATGATG,反向序列为

GGGAATGGGCAAGTATGG;miR-486-3p 正向序列为GCCGGGGCAGCTCAGTACAG,反向序列为GGGG-CTGGGGCCGGGGCC; $\beta$ -Actin 正向序列为GTCCAC-CTTCCAGCAGATGT,反向序列为AAGGGTGTAACGCGAGCTC;U6 正向序列为GCTTCGGCAGCACAT-ATACTAAAAT,反向序列为CGCTTCACGAATTTGCG-TGTCAT。DDR1 以  $\beta$ -Actin 为内参,miR-486-3p 以 U6 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行分析。

### 2.5 TargetScan 分析

TargetScan Human 7.0 软件搜索框中输入 DDR1,检索预测该基因的所有 miRNA 位点、目标区域和 miRNA 的配对情况、类型、得分及其百分比。

### 2.6 双荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活力

对转染对照组和转染组细胞进行荧光素酶检测。将包含 miR-486-3p 靶序列的 DDR1 片段的整个 3' 进行 PCR 扩增,并按说明书克隆到 pmirGLO 双荧光素酶报告基因载体质粒中。使用定点诱变试剂盒构建 miR-486-3p 结合位点突变载体,并通过 DNA 测序验证。使用 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂将荧光素酶报告载体与 20 nmol/L miR-486-3p 模拟物或 miR-NC 转染至 SCC-15 细胞。48 h 后,采用双荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活力。

### 2.7 Western blot 检测 cleaved Caspase-3 和 Caspase-3 表达

使用蛋白裂解液提取对照组、甘草素组、miR 抑制剂组、病毒对照组、抑制慢病毒组和过表达慢病毒组细胞中的总蛋白,4 °C 12 000 r/min( $r=10$  cm) 离心 10 min,弃沉淀,保留上清液,BCA 法进行蛋白定量并归一各组分蛋白浓度,各组取等量的蛋白上清液,加入蛋白上样缓冲液并于加热变性 5 min。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺分离胶及浓缩胶配制完成后,加入离胶的蛋白样品进行电泳以分离蛋白条带。待电泳结束后,300 mA 恒流进行湿转膜,5%脱脂牛奶于室温下封闭 2 h 后,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。加入稀释后的一抗:Caspase-3(1:1000)、GAPDH(1:1000),于 4 °C 摇床孵育过夜。TBST 溶液清洗 3 次,5 min/次,置于 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:5000)

室温振荡 1 h,再次用 TBST 溶液清洗 3 次,5 min/次。最后均匀滴加 ECL 发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照。Image J 软件测定条带灰度值,以目标蛋白与内参 GAPDH 的比值作为其相对含量。

### 2.8 统计学分析

所有数据采用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析,服从正态分布的计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组间比较采用独立样本  $t$  检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

3.1 甘草素促进 SCC-15 细胞中 miR-486-3p 的表达与 0  $\mu\text{mol/L}$  甘草素比较,100、120、150  $\mu\text{mol/L}$  甘草素能显著抑制细胞的生存率( $P<0.05$ ),但 100、120、150  $\mu\text{mol/L}$  甘草素之间细胞的生存率比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。详见图 1。

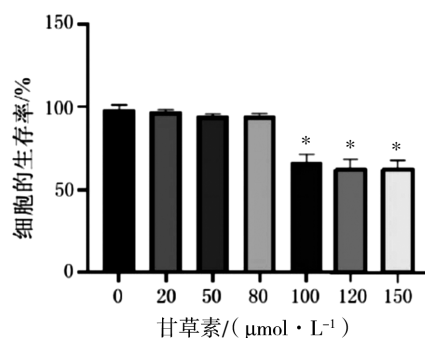


图1 甘草素对细胞的生存率和 miR-486-3p 的相对表达量的影响

注:与 0  $\mu\text{mol/L}$  甘草素比较,\* $P<0.05$ 。

3.2 甘草素通过 miR-486-3p 调控 DDR1 抑制口腔鳞状细胞癌

与对照组比较,甘草素组 miR-486-3p 的相对表达量、cleaved Caspase-3/Caspase-3 相对比率均明显升高( $P<0.05$ ),DDR1 的相对表达量、EdU 阳性细胞相对比值均明显降低( $P<0.05$ )。与甘草素组比较,miR 抑制剂组 miR-486-3p 的相对表达量、cleaved Caspase-3/Caspase-3 相对比率均明显降低( $P<0.05$ ),DDR1 的相对表达量、EdU 阳性细胞相对比值均明显升高( $P<0.05$ )。详见图 2。

3.3 miR-486-3p 在 SCC-15 细胞中调控 DDR1 表达 miR-486-3p 与 DDR1 存在结合位点。与转染对

对照组比较,转染组相对荧光素酶活力明显降低( $P < 0.05$ ),野生型 DDR1 3'-UTR相对荧光素酶活力明显降低( $P < 0.05$ )。转染组突变型 DDR1 3'-UTR 相对荧光素酶活力与转染对照组比较,差异无统计学意义

( $P > 0.05$ )。详见图 3。

### 3.4 DDR1 调控 SCC-15 细胞增殖和凋亡过程

与病毒对照组比较,抑制慢病毒组 EdU 阳性细胞相对比率明显降低( $P < 0.05$ ),cleaved Caspase-3/

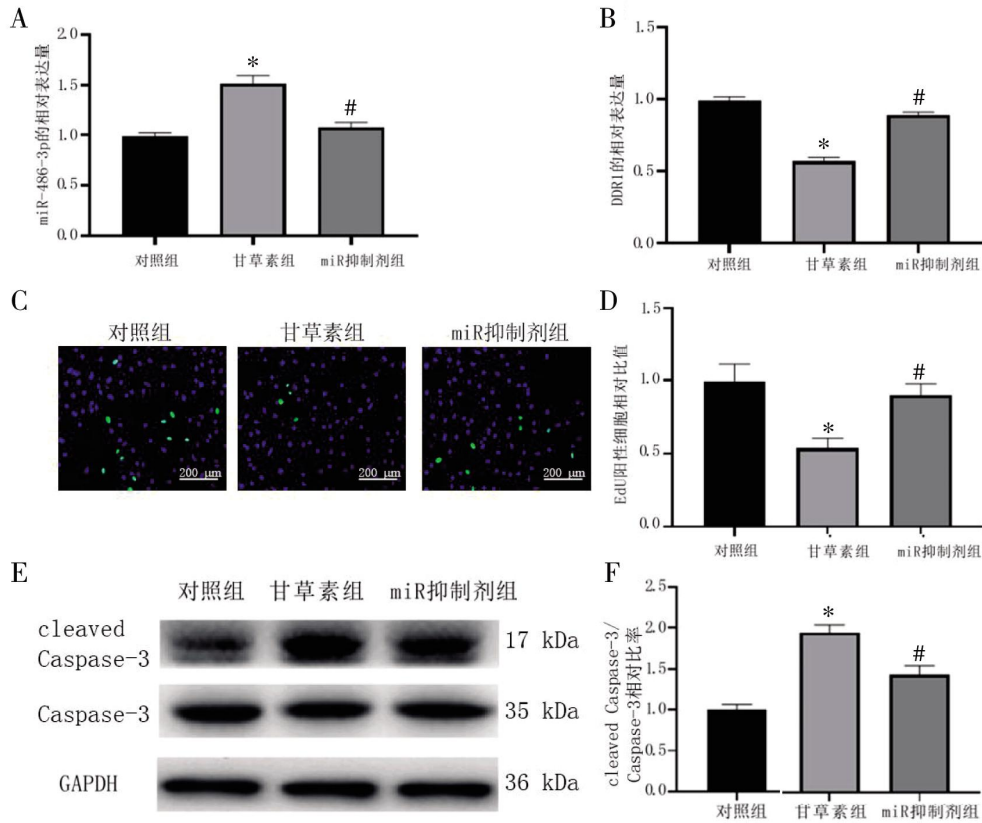


图 2 甘草素通过 miR-486-3p 调控 DDR1 表达水平

注:A.各组 miR-486-3p 的相对表达量比较;B.各组 DDR1 的相对表达量比较;C.各组细胞 EdU 染色结果;D.各组 EdU 阳性细胞相对比值比较;E.各组 cleaved Caspase-3、Caspase-3 蛋白表达电泳图;F.各组 cleaved Caspase-3/Caspase-3 相对比率比较;与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与甘草素组比较,# $P < 0.05$ 。

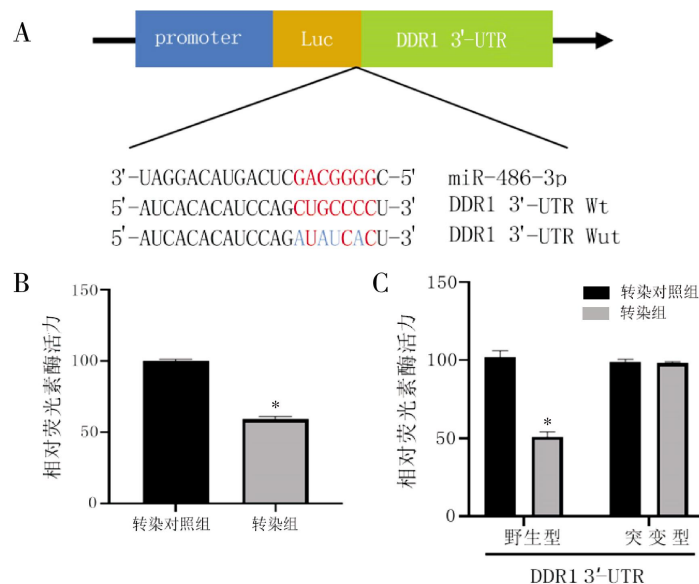


图 3 miR-486-3p 在 SCC-15 细胞结合并调控 DDR1 表达

注:A. TargetScan 分析 miR-486-3p 与 DDR1 存在的结合位点;B.各组细胞中 miR-486-3p 与 DDR1 的结合情况;C.各组细胞中 miR-486-3p 与 DDR1 36-3p3 区域的结合情况;与转染对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

Caspase-3 相对比率明显升高 ( $P < 0.05$ ); 过表达慢病毒组 EdU 阳性细胞相对比率明显升高 ( $P < 0.05$ ), cleaved Caspase-3/Caspase-3 相对比率明显降低 ( $P < 0.05$ )。详见图 4。

#### 4 讨论

据报道,甘草具有平阳秘、旺血气、宽经脉等作用,其有效成分甘草素还具有抗肿瘤的药理作用<sup>[11]</sup>。以往研究发现,甘草素通过下调基质金属蛋白酶-2 表达,同时抑制磷酸肌苷 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路,抑制人肺癌 A549 细胞的迁移<sup>[12]</sup>。此外,有研究发现,甘草素通过下调血管内皮生长因子表达,在小鼠 HeLa 细胞模型中降低肿瘤生长和血管生成,上述研究均提示甘草素对多种癌症侵袭和转移具有抑制作用<sup>[12]</sup>。本研究发现,甘草素可促进 miR-486-3p 的表达,进而下调口腔癌中 DDR1 的表达,由此可见,传统中药成分甘草素诱导 miR-486-3p 和 DDR1 的表达可能在口腔癌的发展中发挥重要作用。

miRNA 参与人类多种疾病,可通过与 mRNA 3'-非翻译区结合,转录后调控基因表达<sup>[13]</sup>。此前的研究表明,微 RNA-486 在恶性肿瘤中经常被下调,由此被认为是一种肿瘤抑制 miRNA,也是癌症诊断和预后的有效生物标志物<sup>[14]</sup>。miR-486-3p 作为肿瘤抑制因子,通过抑制多种致癌基因表达在增殖和转移中发挥关键作用。但是,有关 miR-486-3p 对口腔

鳞状细胞癌的影响及其机制尚不完全清楚。

DDR1 在多种肿瘤患者体内表达升高,并在多种癌症中作为肿瘤蛋白发挥作用<sup>[13]</sup>。DDR1 的致癌作用包括生存、增殖、耐药、侵袭性和细胞迁移等。高表达 DDR1 可通过激活 Bcl-xl、Notch1 和 Ras/Raf/MAPK 通路促进生存信号通路<sup>[15]</sup>。本研究发现,DDR1 在 SCC-15 细胞系中表达上调。抑制 DDR1 可显著降低 SCC-15 细胞的增殖,促进细胞凋亡。这些发现为未来研究评估 DDR1 在 SCC-15 细胞生存中的详细机制提供了框架,并暗示 DDR1 在 SCC-15 细胞生存中发挥了必要的作用。

本研究证明,miR-486-3p 通过直接结合 DDR1 3'-UTR 下调 DDR1。此外,miR-486-3p 在 SCC-15 细胞中的表达水平均显著降低。miR-486-3p 的上调抑制了 DDR1 的表达,从而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡过程。此外,miR-486-3p 的表达与 DDR1 的表达水平呈负相关。因此,考虑到 miR-486-3p 与 DDR1 的反向关系,miR-486-3p 很有可能通过抑制 DDR1 在 SCC-15 细胞中的表达而发挥抗肿瘤作用。在口腔舌鳞状细胞癌(oral tongue squamous cell carcinoma, TSCC)中,miR-486-3p 也显著下调,并作为检测 TSCC 的 miRNA 生物标志物<sup>[16]</sup>。本研究提供了 miR-486-3p 上调后可通过抑制 DDR1 从而进一步抑制 TSCC 发生的新机制,为临床上治疗 TSCC 提供了新方向。本研究发现,miR-486-3p/DDR1 靶

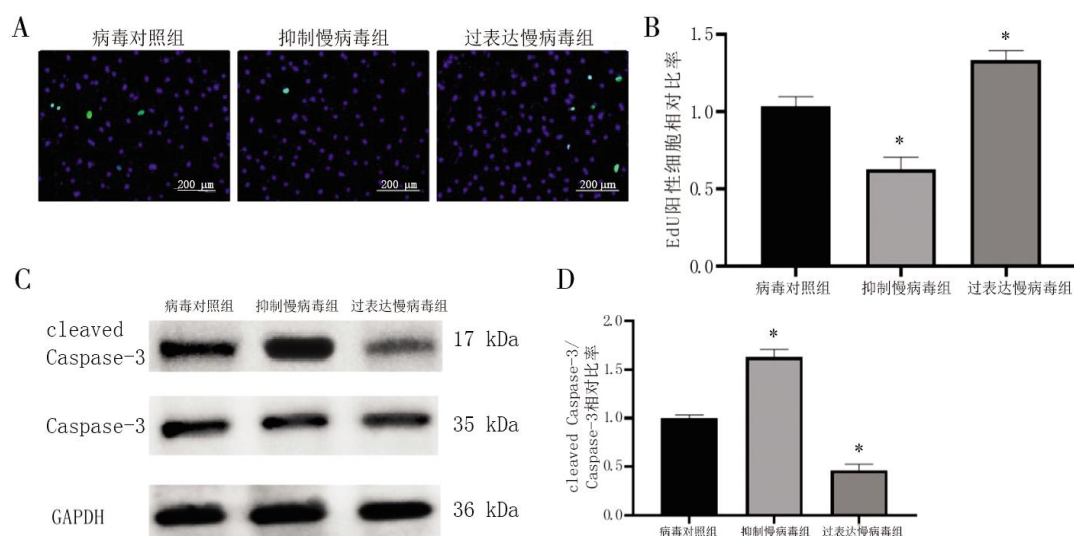


图4 DDR1对SCC-15细胞增殖和细胞凋亡的影响

注:A.各组细胞EdU染色结果;B.各组EdU阳性细胞相对比值比较;C.各组cleaved Caspase-3、Caspase-3蛋白表达电泳图;D.各组cleaved Caspase-3/Caspase-3相对比率比较;与病毒对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

向通路的存在,并参与抑制SCC-15细胞增殖和促细胞凋亡过程。因此,miR-486-3p在口腔癌中的异常抑制可增强DDR1的促肿瘤活性从而为SCC-15细胞提供了生长优势。

综上所述,本研究探索了甘草素抑制SCC-15细胞作用的机制,即通过miR-486-3p靶向DDR1的表达,促进SCC-15细胞凋亡,为甘草素治疗口腔鳞状细胞癌提供理论依据。但是,本研究仅在细胞水平进行了初步研究,仍需要结合体内实验和临床研究进行深入探索。

### 参考文献

- [1] LI H, WANG J, HE L, et al. Construction of a combined hypoxia and EMT index for head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 961858.
- [2] 刘族志,赵永兴,林建能,等.双氢青蒿素对人口腔鳞癌细胞KBV200多药耐药的影响[J].*上海口腔医学*,2019,28(6):586-590.
- [3] 杨立,沈凤嘉.甘草素与异甘草素的合成[J].*药学学报*,1994,29(11):877-880.
- [4] 吕金鹏,姜松周,李思淇,等.甘草素对B16F10细胞中黑色素合成作用研究[J].*常州大学学报(自然科学版)*,2022,34(4):68-74.
- [5] 张炜,耿玉东,王书斌,等.甘草素通过AMPK/mTOR通路对人口腔鳞癌细胞放疗敏感性的作用机制[J].*中华老年口腔医学杂志*, 2021,19(5):271-276.
- [6] 卢万里,金哲,段东奎,等. PVT1通过调节miR-486-3p/MAPK14轴降低食管癌细胞的化学敏感性[J].*中国免疫学杂志*,2021,37(24):2999-3004.
- [7] 甘霖,王亚冬,王婷,等. miR-486-3p对乳腺癌细胞MCF-7凋亡的调控作用研究[J].*中国细胞生物学学报*,2021,43(9):1776-1786.
- [8] MEHTA V, CHANDER H, MUNSHI A. Complex roles of discoidin domain receptor tyrosine kinases in cancer[J]. *Clinical and Translational Oncology*, 2021, 23(8): 1497-1510.
- [9] ELKAMHAWY A, LU Q L, NADA H, et al. The journey of DDR1 and DDR2 kinase inhibitors as rising stars in the fight against cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6535.
- [10] 王立侠,韩金芬,马明明,等. miR-150-5p通过调控DDR1表达对缺氧缺糖诱导的大鼠皮质神经细胞损伤的影响[J].*中国免疫学杂志*,2021,37(12):1428-1433.
- [11] 陈钰龙,王华启,张莉蓉.甘草素通过调控miR-216b-5p对肺腺癌细胞增殖凋亡及化疗敏感性的作用研究[J].*中国药理学通报*, 2021,37(11):1559-1564.
- [12] LEE H S, KIM E N, JEONG G S. Oral administration of liquiritigenin confers protection from atopic dermatitis through the inhibition of T cell activation[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(5): 786.
- [13] GOUDA E H, SAYED S L, MOHAMED K N, et al. Aberrant expression of immune-related microRNAs in pediatric patients with asthma[J]. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 2020, 9(4): 246-255.
- [14] 王岩,闵波,朱逸,等. miR-486在非小细胞肺癌患者外周血中表达水平及对预后的预测价值分析[J].*哈尔滨医科大学学报*,2021,55(3):282-285.
- [15] SUN X J, WU B G, CHIANG H C, et al. Tumour DDR1 promotes collagen fibre alignment to instigate immune exclusion[J]. *Nature*, 2021, 599(7886): 673-678.
- [16] CHEN Z J, YU T W, CABAY R J, et al. miR-486-3p, miR-139-5p, and miR-21 as biomarkers for the detection of oral tongue squamous cell carcinoma[J]. *Biomarkers in Cancer*, 2017, 9: 1-8.

(本文编辑 黎志清)