·论著·

*let-7*靶向调控Wnt/β-catenin通路抑制口腔鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭

刘小莹[1],王妍心[2],苏春波[2],刘昕[2],段艳浩[2],赵佳红[2],仇永乐[2]
(1.石家庄市第三医院口腔科,石家庄 050000;2.河北医科大学第四医院口腔科,石家庄 050017)

摘要 目的 阐明*let-7*在口腔鳞状细胞癌(OSCC)发病中的作用及其潜在的分子机制。**方法** 采用实时定量PCR检测人口腔角质细胞系(HOK)、OSCC组织以及OSCC细胞系(CAL-27、SCC-25、SCC-9)中*let-7*的表达。分别采用克隆形成实验、划痕实验、Transwell实验和流式细胞术检测*let-7*对SCC-25细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响,采用Western blotting检测Wnt、β-catenin蛋白的表达。分析*let-7*的表达与患者临床病理特征及预后的关系。**结果** *let-7*在OSCC组织和OSCC细胞中低表达。过表达*let-7*可通过抑制Wnt/β-catenin通路的激活,有效抑制SCC-25细胞增殖、迁移和侵袭,促进凋亡。*let-7*表达水平与患者肿瘤分期、淋巴转移和生存状态密切相关,*let-7*低表达的患者总生存率较低。**结论** *let-7*靶向调控Wnt/β-catenin通路,实现抑制OSCC细胞增殖、迁移和侵袭,促进凋亡。

关键词 口腔鳞状细胞癌;*let-7*;Wnt/β-catenin;增殖;侵袭
中图分类号 R739.8 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)06-0547-06
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250606.1518.008
DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2025.06.012

let-7 inhibits proliferation, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma cells by targeting and regulating Wnt/β-catenin pathway

LIU Xiaoying[1], WANG Yanxin[2], SU Chunbo[2], LIU Xin[2], DUAN Yanhao[2], ZHAO Jiahong[2], QIU Yongle[2]
(1. Department of Stomatology, The Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, China; 2. Department of Stomatology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract Objective To elucidate the role of *let-7* in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its underlying molecular mechanism. **Methods** The expression of *let-7* in human oral keratinocyte (HOK), OSCC tissues, and OSCC cells (CAL-27, SCC-25, and SCC-9) was detected by quantitative real-time PCR. Colony formation, scratch, Transwell, and flow cytometry assays were used to examine the effects of *let-7* on the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of SCC-25 cells. Western blotting was used to detect the expression of Wnt and β-catenin proteins. The correlation between *let-7* expression and the clinicopathological characteristics and prognosis of OSCC patients was analyzed. **Results** *let-7* was downregulated in OSCC tissues and cells. *let-7* overexpression effectively inhibited the proliferation, migration, and invasion of SCC-25 cells while promoting apoptosis by suppressing activation of the Wnt/β-catenin pathway. *let-7* expression was closely associated with tumor stage, lymph node metastasis, and patient survival status. Patients with low *let-7* expression exhibited lower overall survival rate. **Conclusion** *let-7* targets and regulates the Wnt/β-catenin pathway, thereby inhibiting proliferation, migration, and invasion of OSCC cells while promoting apoptosis.

Keywords oral squamous cell carcinoma; *let-7*; Wnt/β-catenin; proliferation; invasion

口腔癌是外界物理和化学因素、病原体侵入、颌骨发育异常或其他全身性疾病导致的口腔内发生的恶性肿瘤,严重影响患者的咀嚼和语言能力,同时还影响患者的总体生存质量[1]。口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma,OSCC)是口腔癌中最常见的类型,占所有口腔颌面恶性肿瘤的90%以上,其发病率和死亡率较高,已成为全球性公共卫生问题[2]。尽管目前有手术、放化疗等治疗方法,但全球范围内OSCC的复发率仍在持续上升。因此,寻找治疗OSCC的有效靶点,对于改善患者的预后具有重要意义。

微RNA(microRNA,miRNA)是一类长度约为

基金项目:河北省自然科学基金(H2024206476);河北省医学科学研究课题(20250693)
作者简介:刘小莹(1984-),女,主治医师,硕士.
通信作者:仇永乐,E-mail:qqqyl@hebmu.edu.cn
收稿日期:2024-09-06
网络出版时间:2025-06-09 14:21:15

22个核苷酸的非编码RNA，通过靶向mRNA的3’非翻译区发挥转录后调节的作用，从而抑制mRNA翻译或诱导其降解[3]。既往研究[3-4]显示了miRNA在口腔癌和其他癌症的发生、发展中的作用。let-7是miRNA家族中高度保守的成员，广泛存在于包括人类在内的各种生物体中[5]。在所有miRNA家族中，let-7家族被公认为是一种生长抑制因子，在膀胱癌、结直肠癌等恶性肿瘤的发病中发挥关键作用[6]。研究[7]发现，let-7c在OSCC肿瘤干细胞中表达下调，而let-7c过表达可有效抑制肿瘤干细胞的干性特征并增强放化疗敏感性。

本研究通过分析*let-7*在OSCC组织和细胞中的表达，探讨*let-7*过表达或敲低对OSCC细胞恶性行为的影响，进一步阐明*let-7*对OSCC调控的分子机制，从而为寻找OSCC新的靶向诊断和治疗方法奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要材料和试剂：人口腔角质细胞系（HOK）和OSCC细胞系（CAL-27、SCC-25、SCC-9），购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库；DMEM培养基、胰蛋白酶、胎牛血清，购自浙江天杭生物科技股份有限公司；*let-7*模拟物（mimic）和拮抗剂（antagomir），lipofectamin 2000，购自上海吉玛制药技术有限公司；TRIzol试剂、Matrigel胶、逆转录试剂盒、实时定量PCR试剂盒，购自美国Invitrogen公司。

1.1.2　组织样本采集：采集2018年7月至2019年12月于河北医科大学第四医院口腔科接受手术的70例OSCC患者的癌组织和距离癌组织3 cm以上的正常组织。纳入标准：患者年龄≥18岁；经病理检查确诊为OSCC。排除标准：既往确诊OSCC并接受肿瘤相关治疗的患者；其他部位恶性肿瘤患者；资料不全的患者；血液和免疫系统受损的患者；精神疾病患者。患者出院后随访，随访时间截至2024年3月31日，47例患者存活，23例患者死亡，无失访病例。总生存时间指确诊至患者死亡或随访截止时间。本研究获得河北医科大学第四医院伦理委员会批准，患者或其家属签署知情同意书。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养和分组：在37 ℃、5% CO_2培养箱中，用含10%胎牛血清的DMEM培养基进行细胞培养和传代，取对数生长期的细胞用于后续实验。将细胞分为空白对照组（NC组）、模拟物阴性对照组（mimic NC组）、*let-7*模拟物组（*let-7* mimic组）、拮抗剂阴性对照组（antagomir NC组）和*let-7*拮抗剂组（*let-7* antagomir组）。NC组不做转染处理，mimic NC组、*let-7* mimic组、antagomir NC组、*let-7* antagomir组采用lipofectamine 2000试剂，分别将mimic NC、*let-7* mimic、antagomir NC、*let-7* antagomir转染至SCC-25细胞。孵育48 h后，采用实时定量PCR评估转染效率。

1.2.2　克隆形成实验：将各组细胞以1×10^3/孔的密度均匀铺于6孔板中。继续培养14 d后弃去培养基，PBS洗去残余培养基。加入4%多聚甲醛室温固定15 min，PBS洗涤3次。加入0.1%结晶紫染色液，室温染色1 h。洗去多余染色液，晾干并拍照。

1.2.3　划痕实验：将各组细胞以5×10^5/mL的密度接种于6孔板中，待细胞融合后，用200 μL移液器枪头在孔底中央划一条直线，用PBS洗去刮下的细胞，拍照、记录划痕宽度。将6孔板放入细胞培养箱中培养24 h，弃去培养基后加入PBS，洗去残存细胞，光学显微镜下观察0 h和24 h细胞的迁移距离。

1.2.4　Transwell实验：将配备8 μm孔径膜的Transwell小室插入24孔板中，用稀释的Matrigel胶包被膜，培养箱中凝固。每组样品细胞制备成单细胞悬浮液，将200 μL细胞悬浮液加入上室，500 μL含10%胎牛血清的培养基加入下室，恒温培养箱中培养24 h后取出，对下室细胞进行洗涤、固定、结晶紫染色、漂洗处理，倒置显微镜下观察和计数细胞。迁移实验不在膜表面涂Matrigel胶，其余操作与侵袭实验相同。

1.2.5　流式细胞术：处理72 h后收集各组细胞，离心，重悬于缓冲液中，依次用异硫氰酸荧光素溶液10 μL和碘化丙啶溶液10 μL染色，室温避光孵育30 min后，采用FACSCalibur流式细胞仪进行分析。

1.2.6　实时定量PCR：使用TRIzol试剂盒从组织或细胞中提取总RNA，按逆转录试剂盒操作步骤将提取的mRNA反转录成cDNA。PCR反应条件：95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 34 s，设置35个循环；其中*GAPDH*为内参。PCR引物序列：*let-7*，正向5’-AGCAAGCTTTGGCACCCACCCGTAGAAC-3’，反向5’-AAGGATCCGATGCAGGGACAAGGACAGAA-3’；*GAPDH*，正向5’-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3’，反向5’-GCCATCACGCCACAGTTTC-3’。

1.2.7　Western blotting：将各组细胞裂解，提取总蛋白，BCA法测定蛋白浓度。在10% SDS-PAGE中加入20~30 μg蛋白样品进行电泳分析，然后转移至PDVF膜。随后用5%脱脂奶粉封闭，加入一抗，4 ℃孵育过夜。次日加入辣根过氧化物酶偶联二抗孵育膜。采用ECL试剂盒检测蛋白条带。

1.3　统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。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，2组间比较采用t检验。计数资料用率（%）表示，组间比较采用χ^2检验。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

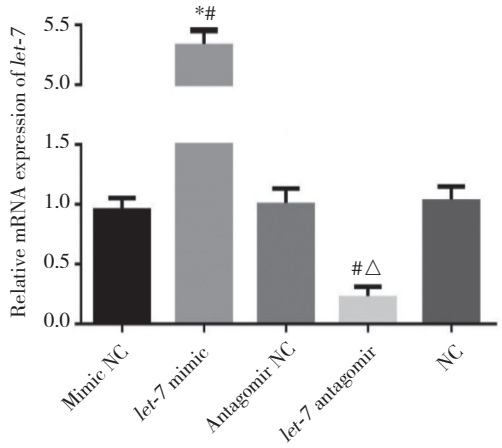
2　结果

2.1　*let*-7在OSCC组织和细胞中的表达水平

与正常组织（1.35 ± 0.35）和HOK细胞（2.50 ± 0.05）相比，OSCC组织（0.45 ± 0.08）和OSCC细胞[SCC-9细胞（1.20 ± 0.10）、SCC-25细胞（0.95 ± 0.15）、CAL-27细胞（1.60 ± 0.25）]中*let*-7的表达水平显著降低（$P < 0.05$）。

2.2　构建*let*-7过表达和敲低细胞系

选择*let*-7表达水平较低的SCC-25细胞进行后续实验。分别使用*let*-7 mimic、antagomir进行细胞转染。结果显示，与mimic NC组、NC组相比，*let*-7 mimic组SCC-25细胞中*let*-7表达水平显著升高（$P < 0.05$）；与antagomir NC组、NC组相比，*let*-7 antagomir组SCC-25细胞中*let*-7表达水平显著降低（$P < 0.05$），见图1。



* $P < 0.05$ vs. minic NC group; # $P < 0.05$ vs. NC group; △$P < 0.05$ vs. antagomir NC group.

图1　各组SCC-25细胞中*let*-7的表达水平

Fig.1　*let*-7 expression levels of SCC-25 cells in each group

2.3　*let*-7对SCC-25细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

克隆形成实验结果（图2A）显示，*let*-7过表达后细胞增殖能力被抑制，而*let*-7敲除后细胞增殖能力增强。划痕实验和Transwell实验结果（图2B~2D）显示，*let*-7过表达后细胞迁移和侵袭能力降低，而*let*-7敲除后细胞迁袭能力增强。流式细胞术结果（图2E）显示，*let*-7过表达后细胞凋亡增多，而*let*-7敲除后细胞凋亡减少。

2.4　*let*-7对Wnt/β-catenin通路相关蛋白表达的影响

let-7过表达后，SCC-25细胞中Wnt、β-catenin蛋白表达减少，而*let*-7敲除后Wnt、β-catenin蛋白表达增加。见图3。

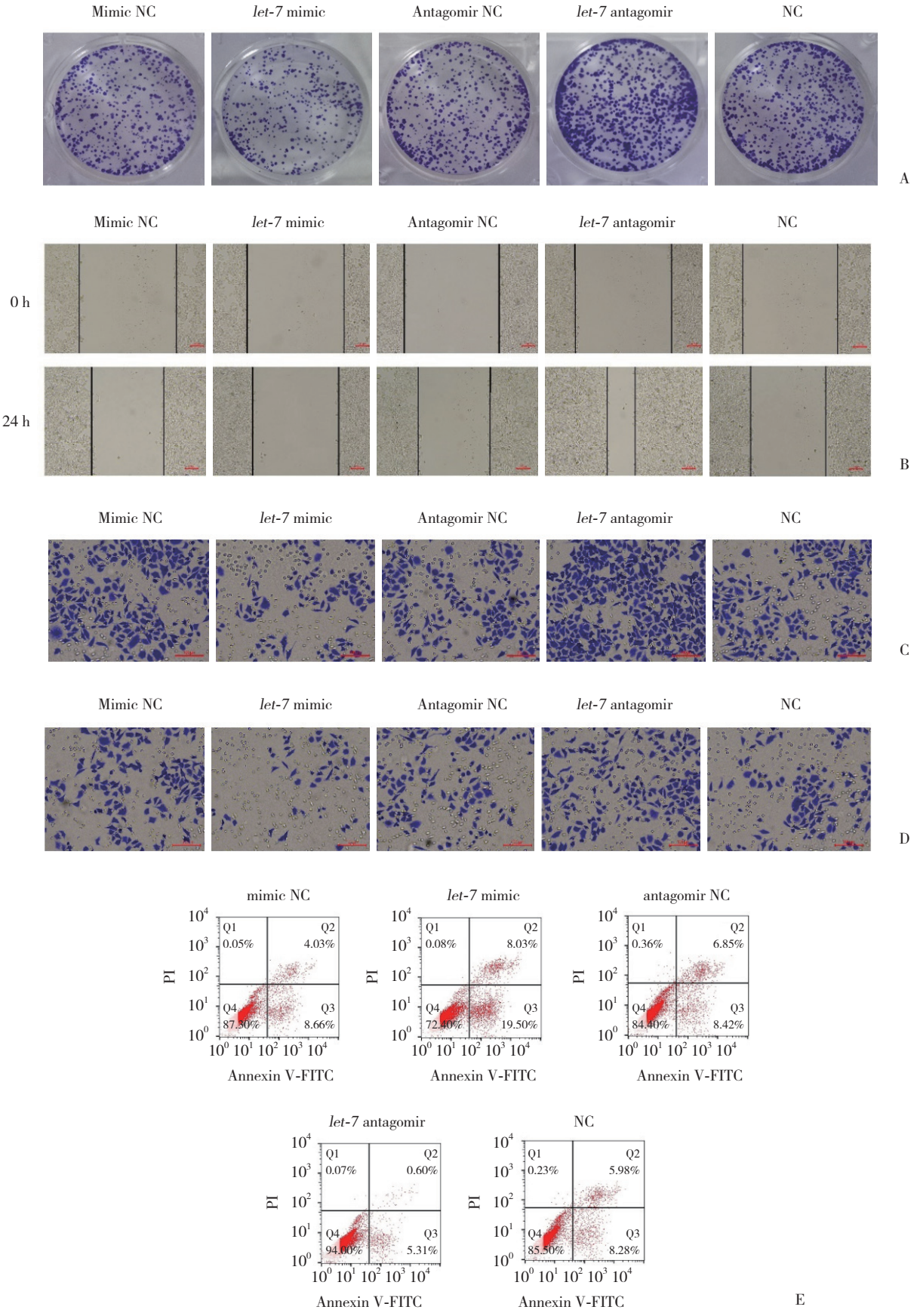
2.5　*let*-7表达与患者临床病理特征及预后的关系

根据*let*-7表达水平的中位数，将患者分为*let*-7高表达组（25例）和*let*-7低表达组（45例）。临床病理特征分析结果（表1）显示，*let*-7表达水平与肿瘤分期、淋巴转移和生存状态密切相关（$P < 0.05$）。Kaplan-Meier生存分析结果（图4）显示，*let*-7低表达患者的中位生存时间显著低于高表达患者（分别为28和35个月，$P < 0.05$），总生存率显著低于高表达患者（分别为58%和84%，$P < 0.05$）。结果表明，*let*-7高表达对OSCC患者预后产生积极影响。

3　讨论

目前OSCC患者的平均生存率仍较低，且OSCC的潜在机制仍然未知。因此，迫切需要新的诊断生物标志物和治疗策略来改善OSCC患者的预后。研究[8-9]发现，许多miRNA可以充当“开关”并发挥关键的调控作用。大量研究证明了*let*-7在各种癌症中的关键调控作用，如let-7c、let-7d表达增加，预示乳头状甲状腺癌的患病风险增加[10]；*let*-7促进PD-L1降解，抑制头颈部鳞状细胞癌的免疫逃逸[11]。

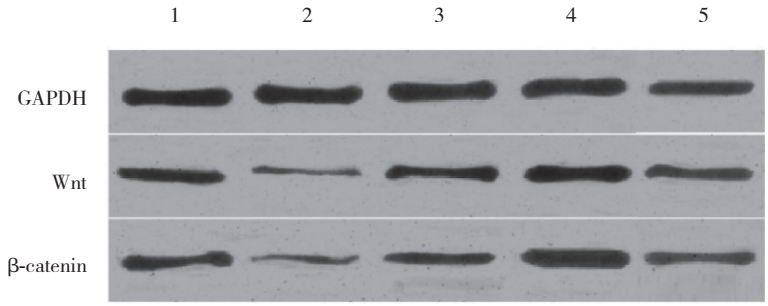
本研究发现，*let*-7在OSCC组织和细胞中表达下调，表明其可能参与了OSCC的发病和进展。为解析*let*-7在OSCC发病中的确切机制，本研究在SCC-25细胞中过表达或敲低*let*-7表达，并进行体外实验。结果表明，*let*-7过表达显著抑制SCC-25细胞增殖、迁移和侵袭能力，促进细胞凋亡；相反，敲低*let*-7表达则促进这些恶性表型。以上结果表明，*let*-7在OSCC发病过程中发挥负调控作用。



A, cell proliferation detected by clone formation assay (×200); B, cell migration detected by scratch assay (×200); C, cell migration detected by Transwell assay (×200); D, cell invasion detected by Transwell assay (×200); E, cell apoptosis detected by flow cytometry.

图2　*let-7*对SCC-25细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

Fig.2　Effect of *let-7* on proliferation, invasion, migration, and apoptosis of SCC-25 cells



1, mimic NC group; 2, *let*-7 mimic group; 3, antagomir NC group; 4, *let*-7 antagomir group; 5, NC group.

图3　Western blotting检测各组SCC-25细胞中Wnt/β-catenin通路相关蛋白的表达

Fig.3　Expression of Wnt/β-catenin pathway-related proteins in SCC-25 cells detected by Western blotting in each group

表1　*let*-7表达水平与OSCC患者临床病理特征的关系

Tab.1　Relationship between *let*-7 expression and clinicopathological characteristics of OSCC patients

Clinicopathological characteristic	*n*	*let*-7 expression level		χ^2	*P*
		High (*n* = 25)	Low (*n* = 45)		
Age				1.791	0.181
<60 years	29	13 (18.57)	16 (22.86)		
⩾60 years	41	12 (17.14)	29 (41.43)		
Sex				0.796	0.372
Male	37	15 (21.42)	22 (31.43)		
Female	33	10 (14.29)	23 (32.86)		
Smoking				0.420	0.517
Yes	40	13 (18.57)	27 (38.58)		
No	30	12 (17.14)	18 (25.71)		
Tumor location				0.239	0.971
Tongue cancer	30	11 (15.71)	19 (27.15)		
Gingival cancer	20	7 (10.00)	13 (18.57)		
Buccal mucosa cancer	10	3 (4.29)	7 (10.00)		
Others	10	4 (5.71)	6 (8.57)		
Clinical stage				12.054	0.007
T_1	26	16 (22.86)	10 (14.29)		
T_2	25	5 (7.14)	20 (28.57)		
T_3	15	3 (4.29)	12 (17.14)		
T_4	4	1 (1.42)	3 (4.29)		
Lymphatic metastasis				7.529	0.006
Yes	35	7 (10.00)	28 (40.00)		
No	35	18 (25.71)	17 (24.29)		
Distant metastasis				3.192	0.074
Yes	17	3 (4.29)	14 (20.00)		
No	53	22 (31.43)	31 (44.28)		
Survival state				5.009	0.025
Alive	47	21 (30.00)	26 (37.14)		
Dead	23	4 (5.71)	19 (27.15)		

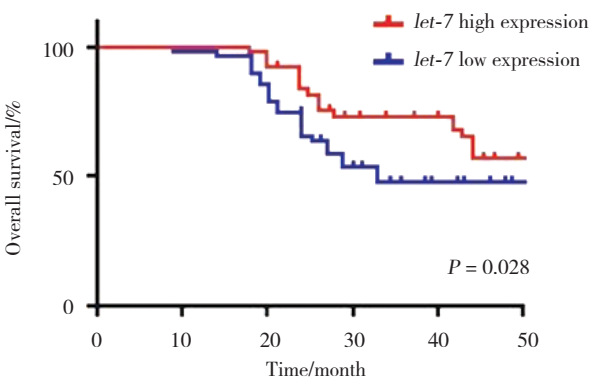


图4　OSCC患者的总生存率分析

Fig.4　Overall survival rate analysis of OSCC patients

Wnt/β-catenin通路是调控细胞发育、分化以及组织稳态的重要功能通路[12]，其异常激活可能调节重要的生物过程，并与肿瘤的发病、转移和耐药密切相关。大量研究[13-14]强烈支持其在癌细胞增殖中发挥关键作用。越来越多的证据表明，miRNA通过与肿瘤中Wnt/β-catenin通路的某些靶mRNA相互作用来调节OSCC的发病和进展[15]。本研究发现，*let-7*过表达显著降低Wnt/β-catenin通路相关蛋白的表达水平，说明*let-7*靶向调控Wnt/β-catenin通路，发挥其对SCC-25细胞的抑制作用，但其潜在机制需要进一步研究。此外，*let-7*表达只与患者临床分期、淋巴转移和生存状态相关。Kaplan-Meier生存分析结果显示，*let-7*低表达患者的中位生存时间和总生存率较低，可能因为低表达患者容易发生淋巴转移，导致总体预后较差。

综上所述，*let-7*抑制OSCC细胞增殖、迁移和侵袭，促进凋亡，这些影响可能归因于靶向调控Wnt/β-catenin通路的激活。因此，*let-7*及其相互作用通路为OSCC的诊断和治疗提供了新的见解，同时也是一种有价值的预后新指标。

参考文献：

[1] HU Y，LV F，LI N，et al. Long noncoding RNA MEG3 inhibits oral squamous cell carcinoma progression via GATA3 [J]. FEBS Open Bio，2023，13（1）：195-208. DOI：10.1002/2211-5463.13532.

[2] TAN Y，WANG Z，XU M，et al. Oral squamous cell carcinomas：state of the field and emerging directions [J]. Int J Oral Sci，2023，15（1）：44. DOI：10.1038/s41368-023-00249-w.

[3] 鄢晓媛，张泽颖，喻施文，等. miR-138-5p在微炎症环境中对人牙髓干细胞成牙本质向分化作用研究 [J]. 中国实用口腔科杂志，2023，16（4）：444-451. DOI：10.19538/j.kq.2023.04.012.

[4] 谭冰，方凌燕，陈明华，等. 长链非编码RNA FGD5-AS1调节miR-195-5p/PIM1轴对高糖诱导的心肌细胞损伤的影响 [J]. 中国医科大学学报，2024，53（6）：487-494. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2024.06.002.

[5] YAZARLOU F，KADKHODA S，GHAFOURI-FARD S. Emerging role of *let-7* family in the pathogenesis of hematological malignancies [J]. Biomed Pharmacother，2021，144：112334. DOI：10.1016/j.biopha.2021.112334.

[6] SHEE K，SEIGNE JD，KARAGAS MR，et al. Identification of Let-7f-5p as a novel biomarker of recurrence in non-muscle invasive bladder cancer [J]. Cancer Biomark，2020，29（1）：101-110. DOI：10.3233/CBM-191322.

[7] PENG CY，WANG TY，LEE SS，et al. Let-7c restores radiosensitivity and chemosensitivity and impairs stemness in oral cancer cells through inhibiting interleukin-8 [J]. J Oral Pathol Med，2018，47（6）：590-597. DOI：10.1111/jop.12711.

[8] CURTALE G，RUBINO M，LOCATI M. microRNAs as molecular switches in macrophage activation [J]. Front Immunol，2019，10：799. DOI：10.3389/fimmu.2019.00799.

[9] MENON A，ABD-AZIZ N，KHALID K，et al. miRNA：a promising therapeutic target in cancer [J]. Int J Mol Sci，2022，23（19）：11502. DOI：10.3390/ijms231911502.

[10] PERDAS E，STAWSKI R，KACZKA K，et al. Analysis of *let-7* family miRNA in plasma as potential predictive biomarkers of diagnosis for papillary thyroid cancer [J]. Diagnostics（Basel），2020，10（3）：130. DOI：10.3390/diagnostics10030130.

[11] YU D，LIU X，HAN G，et al. The *let-7* family of microRNAs suppresses immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma by promoting PD-L1 degradation [J]. Cell Commun Signal，2019，17（1）：173. DOI：10.1186/s12964-019-0490-8.

[12] 尹策，刘畅，冯革. KRT6A介导Wnt/β-catenin信号通路调节上皮-间质转化促进非小细胞肺癌A549细胞抗辐射 [J]. 中国医科大学学报，2024，53（7）：628-634. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2024.07.009.

[13] RIM EY，CLEVERS H，NUSSE R. The Wnt pathway：from signaling mechanisms to synthetic modulators [J]. Annu Rev Biochem，2022，91：571-598. DOI：10.1146/annurev-biochem-040320-103615.

[14] O'BRIEN S，CHIDIAC R，ANGERS S. Modulation of Wnt-β-catenin signaling with antibodies：therapeutic opportunities and challenges [J]. Trends Pharmacol Sci，2023，44（6）：354-365. DOI：10.1016/j.tips.2023.03.008.

[15] WANG Y，LIU S，LV F，et al. hsa-miR-216a-3p regulates cell proliferation in oral cancer via the Wnt3a/β-catenin pathway [J]. Mol Med Rep，2023，27（6）：128. DOI：10.3892/mmr.2023.13015.

（编辑　陈　姜）