

miR-153-3p/PGC-1 α 轴通过调控线粒体凋亡途径对口腔鳞状细胞癌细胞凋亡的影响

禹 洁, 王宗康, 刘 寻, 阳亚男, 谭 劲

(湖南中医药大学第一附属医院口腔科, 湖南 长沙 410000)

[摘 要] **目的:** 探讨微小RNA-153-3p (*miR-153-3p*) 对口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 细胞凋亡的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 收集确诊为 OSCC 的 84 例患者的癌组织和癌旁组织, 并培养 5 种 OSCC 细胞和正常人口腔黏膜 HOK-16A 细胞。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测 OSCC 患者癌组织和癌旁组织及 5 种 OSCC 细胞中 *miR-153-3p* 表达水平。将 Tca8113 细胞随机分为空白对照组、mimics NC 组、mimics 组、mimics+vector 组和 mimics+过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α) 组, 分别转染 mimics NC 质粒、*miR-153-3p* mimic 质粒、PGC-1 α 过表达质粒或共转染 2 种质粒。采用 RT-qPCR 法检测转染后各组细胞中 *miR-153-3p* 表达水平, MTT 法检测各组细胞增殖活性, 流式细胞术检测各组细胞凋亡率, 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酯 (DCFH-DA) 荧光染色法检测各组细胞中活性氧 (ROS) 水平, JC-1 探针染色法检测各组细胞线粒体膜电位, Western blotting 法检测各组细胞胞浆和线粒体中细胞色素 C (Cyt C) 蛋白表达水平及细胞中 Cleaved-Caspase-3、PGC-1 α 、核呼吸因子 1 (NRF-1) 及线粒体转录因子 A (TFAM) 蛋白表达水平, 双荧光素酶报告基因检测实验验证 *miR-153-3p* 与 PGC-1 α 的靶向关系。**结果:** 与癌旁组织和 HOK-16A 细胞比较, OSCC 癌组织及各种 OSCC 细胞中 *miR-153-3p* 表达水平均明显降低 ($P<0.05$), 其中 Tca8113 细胞中表达水平最低。转染后, 与空白对照组和 mimics NC 组比较, mimics 组 Tca8113 细胞中 *miR-153-3p* 表达水平明显升高 ($P<0.001$); 各时间点细胞增殖活性均明显降低 ($P<0.001$); 细胞凋亡率和 ROS 水平明显升高 ($P<0.001$), 细胞线粒体膜电位明显降低 ($P<0.001$); 细胞中 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平和细胞浆中 Cyt C 蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.001$), 线粒体中 Cyt C 蛋白和细胞中 PGC-1 α /TFAM 通路相关蛋白 PGC-1、NRF-1 及 TFAM 表达水平均明显降低 ($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验证明 *miR-153-3p* 能够特异性靶向调控 PGC-1 α 基因表达。共转染后, 与空白对照组比较, mimics 组细胞凋亡率和细胞中 ROS 水平明显升高 ($P<0.001$), 线粒体膜电位明显降低 ($P<0.001$); 与 mimics 组比较, mimics+vector 组细胞凋亡率、细胞中 ROS 水平和线粒体膜电位差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 mimics+vector 组比较, mimics+PGC-1 α 组细胞凋亡率和细胞中 ROS 水平均明显降低 ($P<0.01$), 细胞线粒体膜电位明显升高 ($P<0.001$)。与空白对照组比较, mimics 组细胞中 PGC-1、NRF-1 和 TFAM 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.001$); 与 mimics+vector 组比较, mimics+PGC-1 α 组细胞中 PGC-1、NRF-1 和 TFAM 蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.001$)。**结论:** *miR-153-3p* 过表达可通过靶向下调 PGC-1 α 表达, 阻断 PGC-1 α /TFAM 信号通路, 诱导线粒体功能障碍并激活细胞线粒体凋亡途径, 诱导 Tca8113 细胞凋亡。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 微小RNA-153-3p; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α ; 线粒体; 细胞凋亡

[收稿日期] 2025-04-14 [录用日期] 2025-07-06

[基金项目] 湖南省卫健委科研计划项目 (D202308037466)

[作者简介] 禹 洁 (1983—), 女, 湖南省长沙市人, 副主任医师, 医学硕士, 主要从事口腔肿瘤基础和临床等方面的研究。

[通信作者] 谭 劲, 主任医师, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: woshiyujie2025@163.com)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

[中图分类号] R739.8 [文献标志码] A

Effect of *miR-153-3p*/PGC-1 α axis on apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells by modulation of mitochondrial apoptosis pathway

YU Jie, WANG Zongkang, LIU Xun, YANG Yanan, TAN Jin

(Department of Stomatology, First Affiliated Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of microRNA-153-3p (*miR-153-3p*) on the apoptosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells, and to clarify its mechanism. **Methods:** The Cancer tissue and adjacent normal tissue were collected from 84 patients diagnosed with OSCC, and five kinds of OSCC cells and normal human oral mucosa HOK-16A cells were cultured. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of *miR-153-3p* in the OSCC cancer tissue and adjacent normal tissue, as well as in the five kinds of cells. The Tca8113 cells were randomly divided into blank control group, mimics NC group, mimics group, mimics+vector group, and mimics+peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) group, and were transfected with mimics NC plasmid, *miR-153-3p* mimic plasmid, PGC-1 α overexpression plasmid, or co-transfected with both plasmids. RT-qPCR method was used to detect the expression levels of *miR-153-3p* in the cells in various groups after transfection; MTT method was used to detect the proliferation activities of the cells in various groups; flow cytometry was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups; 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence staining was used to detect the levels of reactive oxygen species (ROS) in the cells in various groups; JC-1 probe staining was used to detect the mitochondrial membrane potential of the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of cytochrome C (Cyt C) protein in the cytoplasm and mitochondria, as well as the expression levels of Cleaved-Caspase-3, PGC-1 α , nuclear respiratory factor 1 (NRF-1), and mitochondrial transcription factor A (TFAM) proteins in the cells in various groups; dual-luciferase reporter assay was used to verify the targeting relationship between *miR-153-3p* and PGC-1 α . **Results:** Compared with adjacent normal tissue and HOK-16A cells, the expression levels of *miR-153-3p* in OSCC cancer tissue and OSCC cells were significantly decreased ($P < 0.05$), while the lowest expression level was observed in the Tca8113 cells. After transfection, compared with blank control group and mimics NC group, the expression level of *miR-153-3p* in the Tca8113 cells in mimics group was significantly increased ($P < 0.001$); the proliferation activity of the cells at each time point was significantly decreased ($P < 0.001$); the apoptotic rate and ROS level of the cells were significantly increased ($P < 0.001$), while the mitochondrial membrane potential of the cells was significantly decreased ($P < 0.001$); the expression level of Cleaved-Caspase-3 protein in the cells and the expression level of Cyt C protein in the cytoplasm were significantly increased ($P < 0.001$), while the expression level of Cyt C protein in the mitochondria and the expression levels of PGC-1 α /TFAM pathway-related proteins PGC-1 α , NRF-1, and TFAM in the cells were significantly decreased ($P < 0.05$). The dual-luciferase reporter assay results confirmed that *miR-153-3p* could specifically target and regulate the expression of the PGC-1 α gene. After co-transfection, compared with blank control group, the apoptotic rate and ROS level in the cells in mimics group were significantly increased ($P < 0.001$), while the mitochondrial membrane potential was significantly decreased ($P < 0.001$); compared with mimics group, there were no significant differences in apoptotic rate, ROS level, and mitochondrial

membrane potential in the cells in mimics+vector group ($P>0.05$); compared with mimics+vector group, the apoptotic rate and ROS level in the cells in mimics+PGC-1 α group were significantly decreased ($P<0.01$), while the mitochondrial membrane potential was significantly increased ($P<0.001$). Compared with blank control group, the expression levels of PGC-1 α , NRF-1, and TFAM proteins in the cells in mimics group were significantly decreased ($P<0.001$); compared with mimics+vector group, the expression levels of PGC-1 α , NRF-1, and TFAM proteins in the cells in mimics+PGC-1 α group were significantly increased ($P<0.001$). **Conclusion:** Overexpression of *miR-153-3p* can induce apoptosis in the Tca8113 cells by targeting and down-regulating the expression of PGC-1 α , thereby blocking the PGC-1 α /TFAM signaling pathway, inducing mitochondrial dysfunction, and activating the mitochondrial apoptotic pathway.

KEYWORDS Oral squamous cell carcinoma; MicroRNA-153-3p; Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ; Mitochondria; Apoptosis

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是多发生于头颈部的恶性肿瘤,全球发病率位列第六名,其术后复发率高、转移性强和治疗抵抗等问题严重降低了患者生存率^[1-4]。目前,针对OSCC分子机制的研究多聚焦于肿瘤微环境调控和信号通路异常激活,而能量代谢重编程这一肿瘤标志性特征在OSCC进展中的作用尚未明确。近年来,非编码RNA调控网络与代谢异常的交叉研究为肿瘤治疗提供了新视角,其中微小RNA(microRNA, miRNA)因其广泛参与转录后调控而备受关注^[5-7]。研究^[8]显示*miR-153*家族在多种实体瘤中呈现异常表达模式。现有研究^[8-9]证实:OSCC患者血清中*miR-153*水平明显降低,且*miR-153-3p*可参与调控Wnt诱导信号分泌蛋白1(Wnt induced secreted protein-1, WISP-1)介导的细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进程,但其在癌组织中的表达特征及其对线粒体能量代谢的调控作用尚未明确。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 α (peroxidase proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha, PPARGC1A或PGC-1 α)是一种转录共激活因子,可与参与能量代谢和线粒体生物发生的多种转录因子相互作用^[10]。研究^[11]表明:PGC-1 α 可通过激活线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)促进线粒体DNA复制,进而维持肿瘤细胞的能量代谢优势。但该分子在OSCC中的调控机制尚未明确,特别是其与miRNA的相互作用网络仍有待研究。

本研究通过系统解析*miR-153-3p*在OSCC组织中的表达特征,聚焦能量代谢调控新维度,从线粒体功能角度揭示*miR-153-3p*/PGC-1 α 轴对OSCC细胞凋亡的影响机制,并通过实验验证*miR-153-3p*

与PGC-1 α 的靶向调控关系,以期开发基于代谢干预的OSCC靶向治疗策略提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床样本 选取2017年6月—2020年6月就诊于本院经病理诊断确诊的84例OSCC患者作为研究对象,其中男性49例,女性35例,平均年龄(54.59 ± 0.61)岁。所有患者均于术中切取癌组织及其癌旁组织。根据第8版TNM分期标准^[7]对患者进行临床分期:I-II期50例,III-IV期34例。纳入标准:①初次诊断者;②病历资料信息完善;③入院时未接受任何抗肿瘤治疗者;④生存期大于6个月。排除标准:①患有其他恶性肿瘤;②患有自身免疫性疾病;③患有精神障碍类疾病。本研究已通过本院伦理委员会批准(伦理审批号:ZYFY20220732),所有患者知晓并签署知情同意书。

1.2 细胞、主要试剂和仪器 人口腔黏膜HOK-16A细胞和5种OSCC细胞SCC-9、SCC-15、SCC-25、SAS及Tca8113均来自中科院细胞库。DMEM培养基、RPMI-1640培养基、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)和胎牛血清购自美国Thermo Fisher Scientific公司,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液和MTT试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司,Annexin V-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)细胞凋亡检测试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测2',7'-二氯二氢荧光素二乙酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)试剂盒、线粒体膜电位检测JC-1试剂盒和细胞线粒体分离试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

司, TRIzol试剂购自北京雷根生物技术有限公司, SYBR Green Master Mix 购自上海翌圣生物科技股份有限公司, 增强型化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显影液、兔抗人 PGC-1 α 抗体、核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1, NRF-1) 抗体、TFAM 抗体、细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome C oxidase, COX) IV 抗体、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 抗体、Cleaved-Caspase-3 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔二抗均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司。*miR-153-3p* mimics 及其阴性对照 mimics NC 均由广州锐博生物科技有限公司合成, 双荧光素酶报告基因检测质粒和 PGC-1 α 过表达质粒均由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。DMIL LED 型倒置显微镜购自德国 Leica 公司, Accuri C6 型流式细胞仪购自美国 BD 公司, CFX-Connect 96 型实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪购自美国 Bio-Rad 公司, AMR-100 型酶标仪购自杭州奥盛仪器有限公司, Tanon-5200 型全自动化学发光分析仪购自上海天能科技有限公司。

1.3 细胞培养和分组 取冻存的人正常口腔黏膜细胞 HOK-16A 和 5 种 OSCC 细胞 SCC-9、SCC-15、SCC-25、SAS 及 Tca8113, 将细胞复苏后, HOK-16A 细胞置于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中进行培养, OSCC 细胞则在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中重新悬浮。随后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养, 每 2~3 d 进行一次传代。

取处于对数生长期的 Tca8113 细胞, 按每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 24 孔细胞培养板中。待细胞融合度达到 80% 时, 将细胞分为 4 组并使用 LipofectamineTM 2000 转染试剂进行转染: mimics NC 组, 将 mimics NC 质粒转入细胞; mimics 组, 将 *miR-153-3p* mimics 质粒转入细胞; mimics+vector 组, 将 *miR-153-3p* mimics 质粒和空载 vector 质粒一同转入细胞; mimics+PGC-1 α 组, 使用转染试剂将 *miR-153-3p* mimics 质粒和 PGC-1 α 过表达质粒一同转入细胞。另设置空白对照组, 不进行转染。48 h 后, 收集细胞沉淀, 采用 RT-qPCR 法检测各组 Tca8113 细胞中 *miR-153-3p* 表达水平, 评估转染效果。

1.4 RT-qPCR 法检测患者癌组织、癌旁组织及各细胞中 *miR-153-3p* 表达水平 使用 TRIzol 试剂从患者癌组织和癌旁组织及 5 种 OSCC 细胞和 HOK-16A 细胞中提取总 RNA。将 RNA 反转录为 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 利用荧光定量 PCR 仪进行基因扩增反应, 反应体系 (20 μ L): 10 μ L SYBR Green Master Mix, 上、下游引物各 1 μ L, 1 μ L cDNA 和 8 μ L 无酶水。PCR 反应程序设置为: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 5 s, 56℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 25 s, 共 40 个循环。引物序列: *miR-153-3p* F, 5'-ACACTCCAGCTGGGTTGCATAGTCACAAA-3'; *miR-153-3p* R, 5'-CAGTGCGTGTCGTGGAGT-3'; *U6* F, 5'-CCCTTCGGGGACATCCGATA-3'; *U6* R, 5'-TTTGTGCGTGT-CATCCTTGC-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组织和细胞中 *miR-153-3p* 表达水平。

1.5 MTT 法检测转染后各组细胞增殖活性 将转染后各组 Tca8113 细胞以 1×10^3 mL⁻¹ 的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 分别于培养 12、24、48 和 72 h 后, 移除培养基, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液并充分混匀, 于室温下孵育 4 h。每孔加入 100 μ L DMSO 混匀并孵育 15 min, 采用酶标仪于 490 nm 波长处测定各组细胞吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖活性。细胞增殖活性 = (实验组 A 值 - 空白对照组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白对照组 A 值) $\times$ 100%, 按照时间绘制细胞生长曲线。

1.6 流式细胞术检测转染后各组细胞凋亡率 将转染后各组 Tca8113 细胞以 1.5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种于 6 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后收集细胞, 500 g 离心 5 min, 弃去上清液。加入 1 mL 预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞, 500 g 离心 5 min, 弃上清。加入 500 μ L 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞, 避光条件下加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L 碘化丙啉 (propidium iodide, PI), 混匀后于室温避光孵育 15 min, 采用流式细胞术检测各组细胞凋亡情况, 计算细胞凋亡率。细胞凋亡率 = (凋亡细胞数 / 总细胞数) $\times$ 100%。

1.7 DCFH-DA 荧光染色法检测各组细胞中 ROS 水平 将转染后各组 Tca8113 细胞以 1.5×10^4 mL⁻¹ 的密度接种于 6 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后收集细胞, PBS 缓冲液冲洗 1 次。加入 1 mL 无血清培养液稀释的 DCFH-DA 溶液 (10μ mol $\cdot$ L⁻¹), 37℃ 避光孵育 20 min, PBS 缓冲液冲洗 1 次。加入

0.25%胰蛋白酶消化后收集细胞,加入500 μL 预冷PBS缓冲液重悬细胞。采用流式细胞仪检测各组细胞荧光强度值,以平均荧光强度表示细胞中ROS水平。

1.8 JC-1探针法检测各组细胞线粒体膜电位 将转染后各组 Tca8113 细胞以 $1.5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于6孔细胞培养板中,培养24 h后收集细胞,PBS缓冲液冲洗1次。加入1 mL JC-1染色工作液混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育20 min,PBS缓冲液洗涤2次,500 g离心5 min,弃上清,再重悬于500 μL PBS缓冲液中。采用流式细胞术检测各组细胞平均荧光强度,以平均荧光强度表示线粒体膜电位水平。

1.9 Western blotting法检测各组细胞胞浆和线粒体中Cyt C蛋白表达水平及细胞中Cleaved-Caspase-3、PGC-1 α 、NRF-1和TFAM蛋白表达水平 收集转染后各组 Tca8113 细胞。根据细胞线粒体分离试剂盒说明书进行细胞线粒体分离,提取细胞线粒体和胞浆蛋白。加入RIPA裂解液裂解细胞,释放细胞总蛋白和线粒体蛋白。采用二辛可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)法测定蛋白浓度后,加入上样缓冲液并煮沸使蛋白变性。随后,每孔上样25 μg 蛋白,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离蛋白。电泳结束后,采用湿转膜法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜上。将膜于室温下用5%脱脂奶粉封闭2 h,洗涤后分别加入一抗Cyt C (1:5 000稀释)、COX IV (1:2 000)、PGC-1 α (1:5 000)、NRF-1(1:2 000)、TFAM(1:1 000)和GAPDH (1:5 000)抗体,于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育12 h。洗涤后,室温下用HRP标记的羊抗兔二抗孵育1 h。再次洗涤后,将ECL试剂中的A液和B液等比例混合,在凝胶成像系统中显色并拍照。使用Image Plus软件分析各目的蛋白灰度值,以GAPDH为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.10 双荧光素酶报告基因实验 使用生物信息学网站TargetScan(http://www.targetscan.org/vert_72/)预测miR-153-3p与PGC-1 α 基因3'-UTR区域的结合位点。然后以pmirGLO质粒为载体,分别构建了野生型(wild type,WT)PGC-1 α (PGC-1 α -WT)3'-UTR和突变型(mutant type,MUT)PGC-1 α (PGC-1 α -MUT)3'-UTR质粒。使用

LipofectamineTM 2000转染试剂将PGC-1 α -WT和PGC-1 α -MUT质粒分别与miR-153-3p mimics及其阴性对照mimics NC共转染至Tca8113细胞中。转染48 h后,采用酶标仪检测各组细胞中萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的荧光强度,计算荧光素酶活性。荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶强度/海肾荧光素酶强度。

1.11 统计学分析 采用GraphPad Prism 6.01软件进行统计学分析。OSCC患者癌组织、癌旁组织及各种细胞中miR-153-3p表达水平,转染后各组细胞增殖活性、细胞凋亡率、线粒体膜电位、ROS水平及各蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

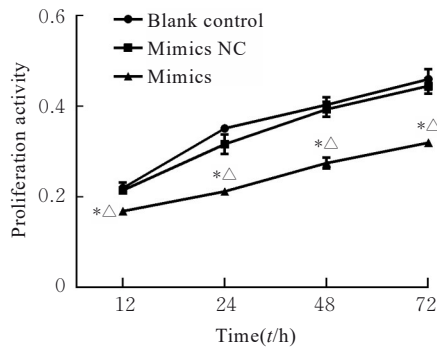
2 结果

2.1 OSCC患者癌组织、癌旁组织、OSCC细胞和HOK-16A细胞中miR-153-3p表达水平 与癌旁组织(4.13 ± 0.39)比较,OSCC患者癌组织中miR-153-3p表达水平(1.09 ± 0.13)明显降低($P < 0.001$)。与人正常口腔黏膜HOK-16A细胞(1.00 ± 0.33)比较,5种OSCC细胞(SCC-9: 0.60 ± 0.27 , SCC-15: 0.39 ± 0.13 , SCC-25: 0.21 ± 0.09 , SAS: 0.40 ± 0.19 , Tca8113: 0.10 ± 0.03)中miR-153-3p表达水平均明显降低($P < 0.05$),其中Tca8113细胞中miR-153-3p表达水平最低。

2.2 转染后各组Tca8113细胞增殖活性和凋亡率 与空白对照组(1.00 ± 0.08)和mimics NC组(0.94 ± 0.06)比较,mimics组(6.48 ± 0.11)Tca8113细胞中miR-153-3p表达水平明显升高($P < 0.001$)。MTT法结果显示:在各时间点,与空白对照组和mimics NC组比较,mimics组细胞增殖活性均明显降低($P < 0.001$)。见图1。

流式细胞术检测结果显示:与空白对照组和mimics NC组比较,mimics组Tca8113细胞凋亡率明显升高($P < 0.001$)。见图2。

2.3 转染后各组Tca8113细胞中线粒体膜电位和ROS水平 流式细胞术结果显示:与空白对照组和mimics NC组比较,mimics组细胞线粒体膜电位明显降低($P < 0.001$),ROS水平明显升高($P < 0.001$)。见图3和4。



* $P < 0.001$ compared with blank control group; $\Delta P < 0.001$ compared with mimics NC group.

图1 各组细胞增殖活性

Fig. 1 Proliferation activities of cells in various groups

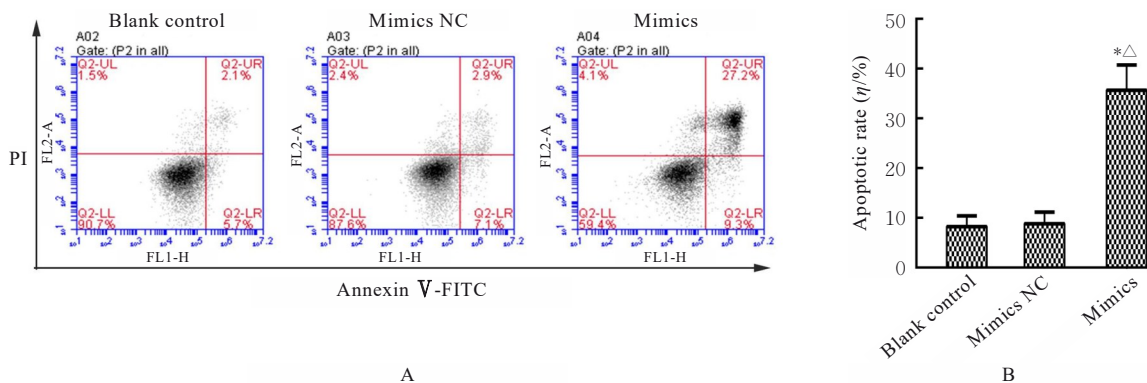
2.4 各组 Tca8113 细胞中 Cleaved-Caspase-3 蛋白、Cyt C 蛋白和 PGC-1/TFAM 通路相关蛋白表达水平 Western blotting 法结果显示:与空白对照组和 mimics-NC 组比较, mimics 组 Tca8113 细胞中 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ($P <$

0.001)。见图 5。

与空白对照组和 mimics NC 组比较, mimics 组 Tca8113 细胞胞浆中 Cyt C 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$), 细胞线粒体中 Cyt C 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.001$)。见图 6。

与空白对照组和 mimics NC 组比较, mimics 组 Tca8113 细胞中 PGC-1 α 、NRF-1 和 TFAM 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.001$)。见图 7。

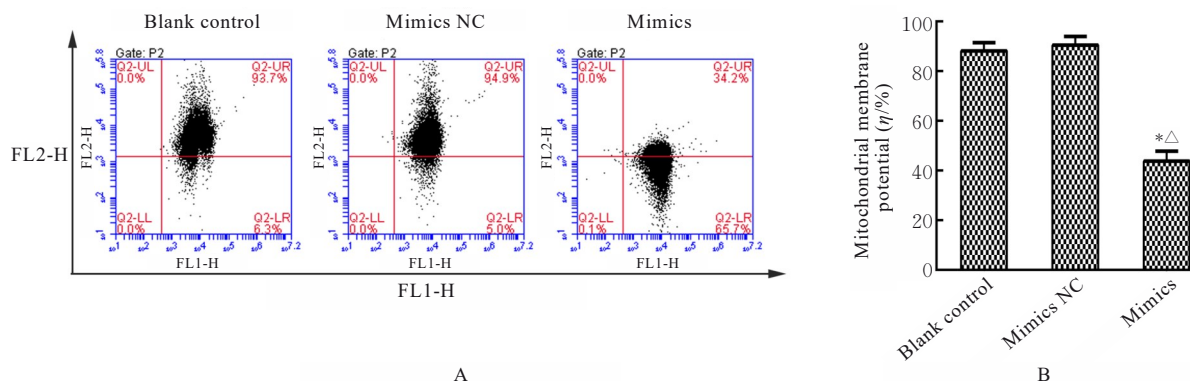
2.5 PGC-1 α 与 *miR-153-3p* 的靶向关系 根据生物信息学网站 TargetScan 的预测结果, *miR-153-3p* 与 PGC-1 α 基因的 3'-UTR 区域具有潜在的靶向结合位点。见图 8A。双荧光素酶报告基因实验结果显示:与 mimics NC 组比较, *miR-153-3p* mimics 组细胞中 PGC-1 α 3'-UTR-WT 的荧光素酶活性明显降低 ($P < 0.01$); 细胞中 PGC-1 α 3'-UTR-MUT 的荧光素酶活性未受到明显影响, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 8B。上述结果提示 *miR-153-3p*



A: Flow cytometry; B: Histogram (* $P < 0.001$ compared with blank control group; $\Delta P < 0.001$ compared with mimics NC group).

图2 各组细胞凋亡率

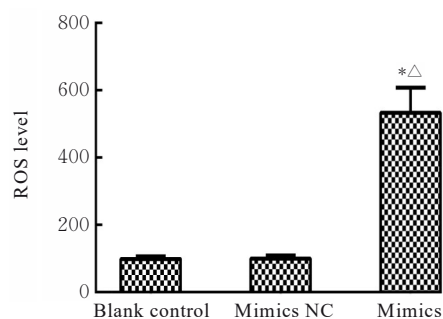
Fig. 2 Apoptotic rates of cells in various groups



A: Flow cytometry; B: Histogram (* $P < 0.001$ compared with blank control group; $\Delta P < 0.001$ compared with mimics NC group).

图3 各组细胞线粒体膜电位

Fig. 3 Mitochondrial membrane potentials of cells in various groups



^{*} $P < 0.001$ compared with blank control group; [△] $P < 0.001$ compared with mimics NC group.

图4 各组细胞中ROS水平

Fig. 4 Levels of ROS in cells in various groups

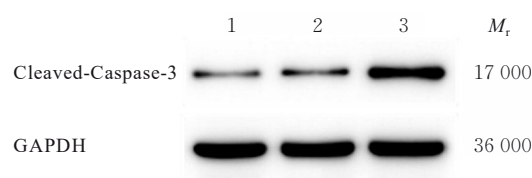
可特异性靶向调控 *PGC-1α* 基因表达。

2.6 共转染后各组细胞凋亡率、细胞中ROS水平和线粒体膜电位 与空白对照组比较, mimics组 Tca8113 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.001$); 与

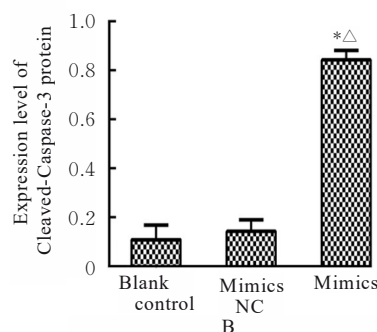
mimics组比较, mimics+vector组 Tca8113细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 mimics+vector组比较, mimics+PGC-1 α 组 Tca8113细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.001$)。见图9。

与空白对照组比较, mimics组 Tca8113细胞中 ROS水平明显升高 ($P < 0.001$); 与 mimics组比较, mimics+vector组 Tca8113细胞中 ROS水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 mimics+vector组比较, mimics+PGC-1 α 组 Tca8113细胞中 ROS水平明显降低 ($P < 0.001$)。见图10。

与空白对照组比较, mimics组 Tca8113细胞线粒体膜电位明显降低 ($P < 0.001$); 与 mimics组比较, mimics+vector组 Tca8113细胞线粒体膜电位差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 mimics+vector组比较, mimics+PGC-1 α 组 Tca8113细胞线粒体膜电位明显升高 ($P < 0.001$)。见图11。



A

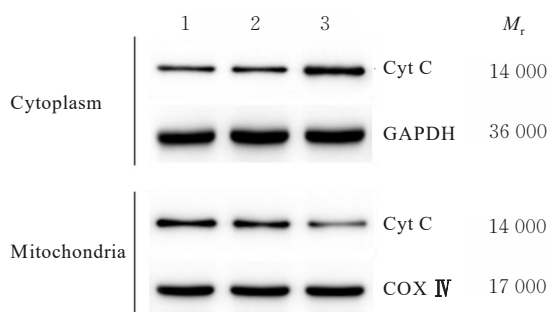


B

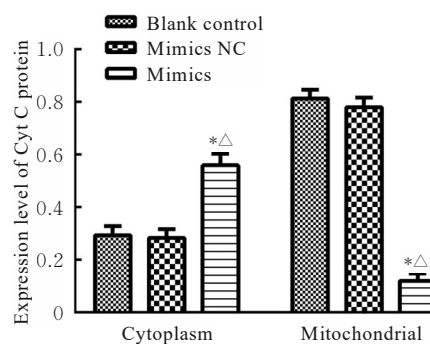
Lane 1: Blank control group; Lane 2: Mimics NC group; Lane 3: Mimics group. ^{*} $P < 0.001$ compared with blank control group; [△] $P < 0.001$ compared with mimics NC group.

图5 各组细胞中 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of Cleaved-Caspase-3 protein in cells in various groups



A

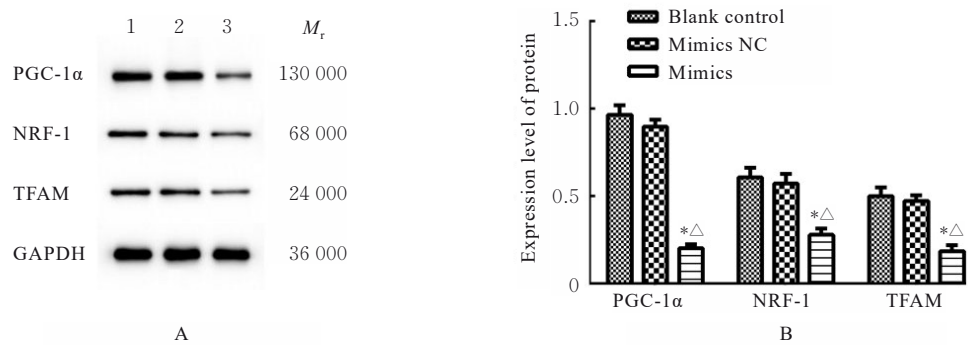


B

Lane 1: Blank control group; Lane 2: Mimics NC group; Lane 3: Mimics group. ^{*} $P < 0.001$ compared with blank control group; [△] $P < 0.001$ compared with mimics NC group.

图6 各组细胞胞浆和线粒体中 Cyt C 蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

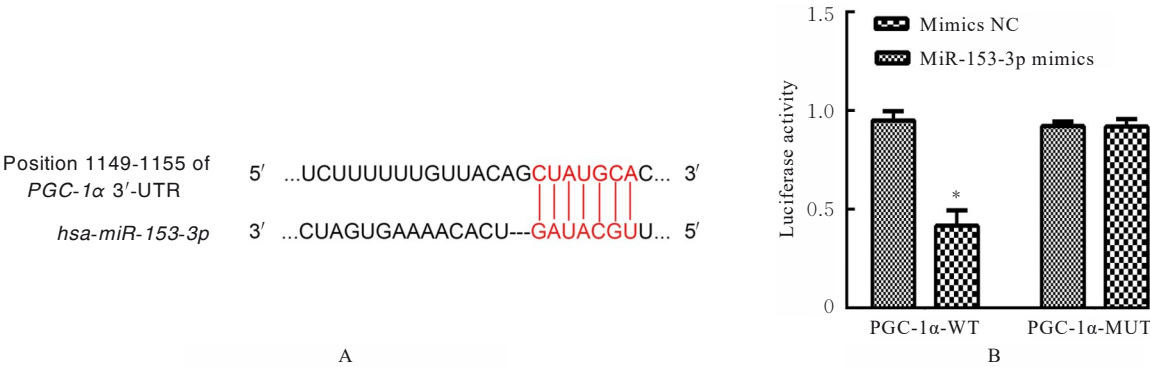
Fig. 6 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of Cyt C protein in cell cytoplasm and mitochondria in various groups



Lane 1: Blank control group; Lane 2: Mimics NC group; Lane 3: Mimics group. * $P<0.001$ compared with blank control group; $\Delta P<0.001$ compared with mimics NC group.

图7 各组细胞中PGC-1 α 、NRF-1和TFAM蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

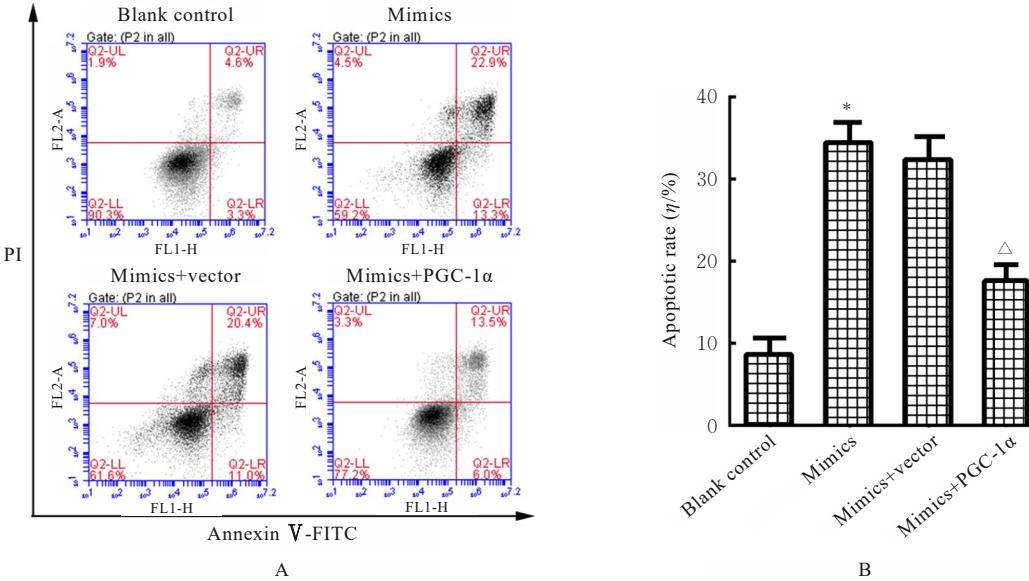
Fig. 7 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of PGC-1 α , NRF-1 and TFAM proteins in cells in various groups



A: Targeted binding sites; B: Luciferase activity (* $P<0.01$ compared with mimics NC group).

图8 *miR-153-3p*与PGC-1 α 的靶向调控关系

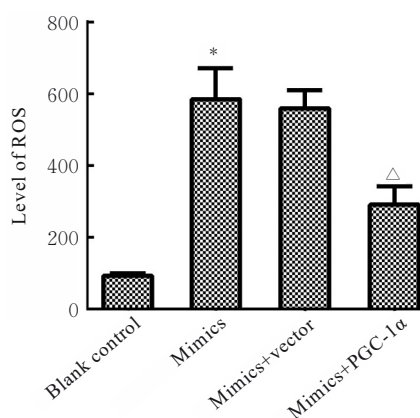
Fig. 8 Targeting regulation relationship between *miR-153-3p* and PGC-1 α



A: Flow cytometry; B: Histogram (* $P<0.001$ compared with blank control group; $\Delta P<0.01$ compared with mimics+vector group).

图9 共转染后各组细胞凋亡率

Fig. 9 Apoptotic rates of cells in various groups after co-transfection



* $P < 0.001$ compared with blank control group; $\Delta P < 0.001$ compared with mimics+vector group.

图10 共转染后各组Tca8113细胞中ROS水平

Fig. 10 Levels of ROS in Tca8113 cells in various groups after co-transfection

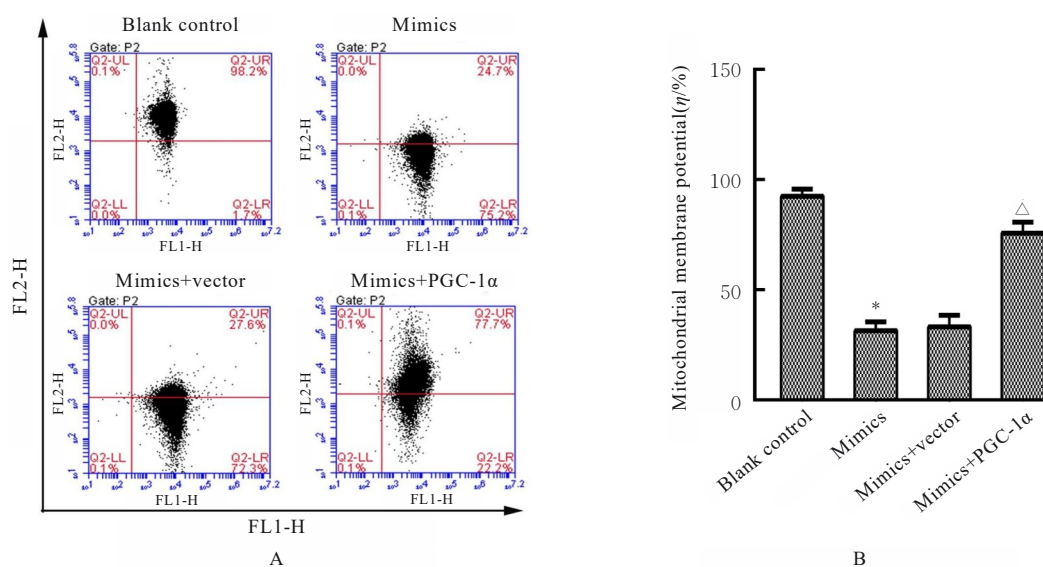
2.7 共转染后各组Tca8113细胞中PGC-1α/TFAM信号通路相关蛋白表达水平

与空白对照组比较, mimics组Tca8113细胞中PGC-1α、NRF-1和TFAM蛋白表达水平均明显降低($P < 0.001$); 与mimics组比较, mimics+vector组Tca8113细胞中PGC-1α、NRF-1和TFAM蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$); 与mimics+vector组比较, mimics+PGC-1α组Tca8113细胞中PGC-1α、NRF-1和TFAM蛋白表达水平明显升高($P < 0.001$)。见图12。

3 讨论

PGC-1α是线粒体能量代谢的关键调控因子,可介导线粒体的生物合成、裂变/融合和糖代谢过程,影响肿瘤细胞存活^[12-14]。由于肿瘤细胞异常增殖活动需要大量能量支撑,其线粒体生物合成及裂变/融合通常较为活跃,因此PGC-1α在多种类型肿瘤组织中异常高表达,如子宫内膜癌^[15]、卵巢癌^[16]和胃癌^[17]等。研究^[18-19]表明:PGC-1α可促进线粒体受体基因的表达,同时通过NRF1和TFAM调控线粒体呼吸作用。因此,PGC-1α/TFAM轴在调控线粒体生物合成及癌细胞凋亡过程中发挥重要作用。本研究结果显示:*miR-153-3p*过表达可通过靶向抑制PGC-1α表达,阻断PGC-1α/TFAM信号通路,导致线粒体功能障碍和ROS水平升高,进而损伤线粒体,Cyt C释放增加,激活Caspase级联反应,最终诱导Tca8113细胞凋亡。

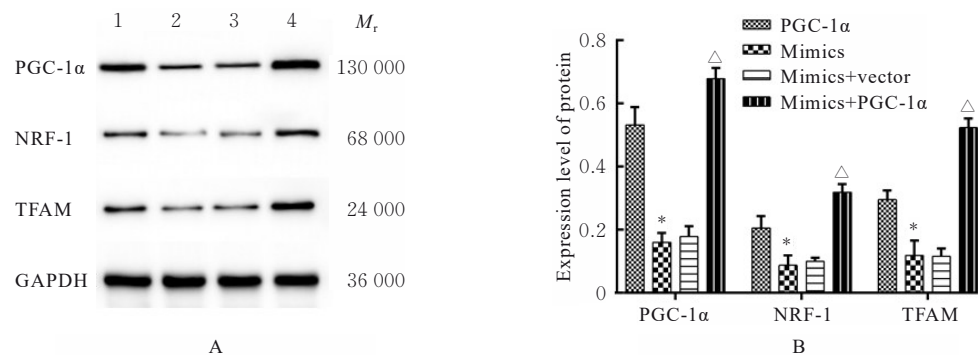
线粒体在数量和功能上的变化可影响其生物合成,进而调控细胞凋亡和自噬等多种细胞生物学过程,这是细胞应对外部环境刺激的正常反应。然而持续异常的应激反应可导致心血管和内分泌等相关系统疾病的发生^[20]。线粒体生物合成受到复杂的网络化体系调控,外界刺激信号与线粒体内部功能通过位于该网状系统上游的PGC-1α进行衔接,使其成为调节线粒体生成与功能的核心枢纽。此外,PGC-1α还可通过激活下游通道中NRF1和NRF2以促进TFAM表达上调^[21-22]。因此,调控



A: Flow cytometry; B: Histogram (* $P < 0.001$ compared with blank control group; $\Delta P < 0.001$ compared with mimics+vector group).

图11 共转染后各组细胞线粒体膜电位

Fig. 11 Mitochondrial membrane potential of cells in various groups after co-transfection



Lane 1: Blank control group; Lane 2: Mimics group; Lane 3: Mimics+vector group; Lane 4: Mimics+PGC-1 α group. * $P < 0.001$ compared with blank control group; $\Delta P < 0.001$ compared with mimics+vector group.

图 12 共转染后各组细胞中 PGC-1 α /TFAM 通路相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 12 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of PGC-1 α /TFAM pathway-related proteins in cells in various groups after co-transfection

PGC-1 α 以维持线粒体功能对于疾病预防和治疗具有重要意义。本研究结果显示：*miR-153-3p*在OSCC患者癌组织和OSCC细胞中异常低表达；过表达*miR-153-3p*可抑制PGC-1 α 表达，并促使Tca8113细胞中ROS水平升高和线粒体膜电位下降，进而引起细胞凋亡。为进一步研究*miR-153-3p*对PGC-1 α 的调控作用，本研究利用PGC-1 α 过表达质粒和*miR-153-3p* mimic共转染入Tca8113细胞中，结果发现：PGC-1 α 过表达可逆转*miR-153-3p*诱导的细胞凋亡和线粒体损伤，表明*miR-153-3p*的作用依赖于对PGC-1 α 的靶向调控。

Cyt C作为线粒体膜间腔内的一种水溶性蛋白质，是线粒体呼吸链（mitochondrial respiratory chain, MRC）的重要组成部分，在生物氧化过程中作为呼吸链复合物Ⅲ和复合物Ⅳ之间的电子传递体，参与三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）的合成^[23]。Cyt C缺乏会阻断电子传递链，导致ATP合成减少，能量供应不足，同时由于不完全氧化而产生大量的超氧阴离子^[24]可引发细胞凋亡^[25]。本研究结果显示：过表达*miR-153-3p*可促使Tca8113细胞线粒体中Cyt C释放至胞浆中，引起线粒体Cyt C缺乏和产能障碍，诱导癌细胞凋亡。

综上所述，本研究初步从细胞水平阐明了*miR-153-3p*可通过靶向PGC-1 α /TFAM轴调控线粒体凋亡途径诱导OSCC细胞凋亡。该发现为OSCC的治疗提供了新的有效靶点，也为其他癌症的治疗提供了理论依据。

利益冲突声明：
所有作者声明不存在利益冲突。
作者贡献声明：

禹洁参与实验设计、实验操作和论文撰写，王宗康参与临床样本收集和实验操作，刘寻参与统计学分析和论文审阅，阳亚男参与实验指导、实验操作和论文审阅，谭劲参与实验设计和论文修改。

[参考文献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

[2] BANKI M, MOOSAVI M S. Umbrella review on cancer stem cell in oral and head and neck squamous cell carcinoma[J]. J Stem Cells Regen Med, 2023, 19(2): 29-33.

[3] ARORA R, CAO C, KUMAR M, et al. Spatial transcriptomics unravels novel signaling patterns at the leading edge of oral squamous cell carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2022, 40(16): e18043.

[4] LAN W S, LU H J, CHIU Y W, et al. Clinical outcomes, prognosis, and predictors of salvage surgery in oral cavity squamous cell carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2021, 39(15): e18040.

[5] MASAOKA T, SHINOZUKA K, OHARA K, et al. Bioinformatics analysis of dysregulated exosomal microRNAs derived from oral squamous cell carcinoma cells[J]. J Oral Sci, 2021, 63(2): 174-178.

[6] HUA X, LI Y S, PENTAPARTHI S R, et al. Landscape of microRNA regulatory network architecture

- and functional rerouting in cancer[J]. *Cancer Res*, 2023, 83(1): 59-73.
- [7] 田少辉, 张学浩, 徐江龙, 等. miR-194靶向Bmi-1调控PI3K/Akt信号通路对脑胶质瘤细胞迁移和凋亡的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(16): 1943-1947.
- [8] BABER S, BAYAT M, MOHAMADNIA A, et al. Role of miR153 and miR455-5p expression in oral squamous cell carcinoma isolated from plasma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2021, 22(1): 157-161.
- [9] CHANG A C, LIEN M Y, TSAI M H, et al. WISP-1 promotes epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma cells *via* the miR-153-3p/Snail axis[J]. *Cancers*, 2019, 11(12): 1903.
- [10] ZHANG Y, ZHAO H K, LI Y S. Pleiotropic regulation of PGC-1 α in tumor initiation and progression [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2024, 41(7): 557-572.
- [11] BRUNO G, PIETRAFESA M, CRISPO F, et al. TRAP1 modulates mitochondrial biogenesis *via* PGC-1 α /TFAM signalling pathway in colorectal cancer cells[J]. *J Mol Med*, 2024, 102(10): 1285-1296.
- [12] 金 铭, 陈金亮, 张冬梅, 等. PGC-1 α 在肺癌中的研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2021, 41(17): 1355-1360.
- [13] 杨 浩, 王馨悦, 罗 瑛, 等. PGC-1 α 在肿瘤中的作用最新研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(10): 2019-2025.
- [14] LI Y, ZHANG H, JIANG X, et al. PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis promotes metastasis in oral squamous cell carcinoma through metabolic reprogramming[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 123.
- [15] CHEN L L, MAO X D, HUANG M M, et al. PGC-1 α and ERR α in patients with endometrial cancer: a translational study for predicting myometrial invasion[J]. *Aging*, 2020, 12(17): 16963-16980.
- [16] HUANG X Q, RUAN G Y, LIU G F, et al. Immunohistochemical analysis of PGC-1 α and ERR α expression reveals their clinical significance in human ovarian cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 13055-13062.
- [17] WANG P, GUO X Y, ZONG W, et al. PGC-1 α /SNAIL axis regulates tumor growth and metastasis by targeting miR-128b in gastric cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17232-17241.
- [18] ZHANG Q, LI J, WU S, et al. TFAM overexpression rescues mitochondrial dysfunction and apoptosis in PGC-1 α -deficient colorectal cancer cells[J]. *Cancer Letters*, 2023, 553: 215996.
- [19] LIU H, ZHANG Y, CHEN X, et al. TFAM-mediated mitochondrial DNA packaging promotes metabolic adaptation in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3660.
- [20] ZHANG K Z, PETR J. Mitochondrial dynamics: updates and perspectives[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 9936.
- [21] TAHERZADEH-FARD E, SAFT C, AKKAD D A, et al. PGC-1 α downstream transcription factors NRF-1 and TFAM are genetic modifiers of Huntington disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6(1): 32.
- [22] PARK S, LEE J, KIM H, et al. PGC-1 α inhibition sensitizes melanoma to ferroptosis *via* TFAM-dependent mitochondrial dysfunction[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(3): 112239.
- [23] KALPAGE H A, BAZYLIANSKA V, RECANATIM A, et al. Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis[J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 1540-1553.
- [24] SANTUCCI R, SINIBALDI F, COZZA P, et al. Cytochrome c: an extreme multifunctional protein with a key role in cell fate[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 136: 1237-1246.
- [25] XU W, LI X, ZHANG H, et al. Exosomal miR-153-3p derived from cancer-associated fibroblasts promotes oral squamous cell carcinoma metastasis by regulating mitochondrial quality control [J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11(5): e12217.