

miR-96-5p靶向调节FBXW7表达对舌鳞状细胞癌 细胞增殖、凋亡的影响

魏卿^{1*} 孙洋¹ 付爽² 邢硕³ 竺庆晓²

(¹沧州市中心医院口腔科, 沧州 061000; ²河北省沧州中西医结合医院口腔科, 沧州 061000;

³沧州市中心医院河间分院口腔科, 沧州 061000)

摘要 该研究旨在探讨miR-96-5p靶向调节F-box和WD重复结构域7(FBXW7)表达对舌鳞状细胞癌(TSCC)细胞增殖、凋亡的影响。以RT-qPCR检测人TSCC中miR-96-5p及FBXW7的异常表达情况,探究其与患者临床病理特征的相关性。体外培养人TSCC细胞系SCC15、CAL-27,将其随机分为空白对照组、NC-miR-96-5p组、anti-miR-96-5p组、miR-96-5p组、anti-miR-96-5p+si-NC组、anti-miR-96-5p+si-FBXW7组,分组转染后用RT-qPCR与Western blot检测细胞miR-96-5p及FBXW7表达情况;CCK-8与平板克隆形成实验检测细胞增殖情况;流式细胞实验与Hoechst 33342/PI双染检测细胞凋亡情况;免疫荧光染色检测细胞增殖与凋亡相关蛋白表达水平;裸鼠实验检测miR-96-5p靶向FBXW7表达对TSCC实体瘤生长的影响。采用双荧光素酶报告基因与RNA免疫共沉淀(RIP)实验验证miR-96-5p对FBXW7的靶向调控作用。结果显示,与配对癌旁组织相比,人TSCC组织中miR-96-5p明显升高,而FBXW7表达水平明显降低($P<0.05$),并与TSCC患者肿瘤大小、淋巴结转移和临床分期相关。与空白对照组相比,anti-miR-96-5p组miR-96-5p表达水平、细胞活力、克隆形成率、Ki67阳性表达量、Bcl-2/Bax值降低,而FBXW7蛋白与mRNA表达水平、凋亡指数、凋亡率升高($P<0.05$);miR-96-5p组各指标变化趋势与anti-miR-96-5p组相反;裸鼠实验结果显示,下调miR-96-5p可通过上调FBXW7表达水平而抑制TSCC实体瘤生长。敲低FBXW7可逆转下调miR-96-5p对TSCC细胞的抗增殖及促凋亡作用。结果表明,下调miR-96-5p可通过上调FBXW7表达水平而抑制TSCC细胞增殖并促进其凋亡。

关键词 miR-96-5p; FBXW7; 鳞状细胞癌; 增殖; 凋亡

The Effects of miR-96-5p Targeting and Regulating FBXW7 Expression on the Proliferation and Apoptosis of Tongue Squamous Cell Carcinoma Cells

WEI Qing^{1*}, SUN Yang¹, FU Shuang², XING Shuo³, ZHU Qingxiao²

(¹Department of Dentistry, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, China; ²Department of Dentistry,

Cangzhou Hospital of Integrated Tcm-Wh Hebei, Cangzhou 061000, China; ³Department of Dentistry,

Cangzhou Central Hospital Hejian Branch, Cangzhou 061000, China)

Abstract This study investigated the effects of miR-96-5p targeting and regulating the expression of FBXW7 (F-box and WD repeat domain containing 7) on the proliferation and apoptosis of TSCC (tongue squamous cell carcinoma) cells. The abnormal expression of miR-96-5p and FBXW7 in human TSCC was detected by RT-

收稿日期: 2025-12-30 接受日期: 2026-03-05

2026年度河北省医学科学研究课题计划(批准号: 20261327)资助的课题

*通信作者。Tel: 18833778099, E-mail: pfjr8@sina.com

Received: December 30, 2025 Accepted: March 5, 2026

This work was supported by the 2026 Annual Medical Scientific Research Project Plan of Hebei Province (Grant No.20261327)

*Corresponding author. Tel: +86-18833778099, E-mail: pfjr8@sina.com

qPCR. *In vitro* culture of human TSCC cell lines SCC15 and CAL-27, and explore their correlation with the clinicopathological characteristics of patients. Cells were randomly divided into the Blank control group, the NC-miR-96-5p group, the anti-miR-96-5p group, the miR-96-5p group, the anti-miR-96-5p+si-NC group, and the anti-miR-96-5p+si-FBXW7 group. After grouping and transfection, the expression of miR-96-5p and FBXW7 in the cells was detected by RT-qPCR and Western blot. Cell proliferation was detected by CCK-8 and colony formation assays. Cell apoptosis was detected by flow cytometry and Hoechst 33342/PI double staining. The expression of proteins related to cell proliferation and apoptosis was detected by immunofluorescence staining. The effect of miR-96-5p targeting FBXW7 expression on the growth of TSCC solid tumors was detected through nude mouse experiments. The targeted regulatory effect of miR-96-5p on *FBXW7* was verified by the dual-luciferase reporter gene and RIP (RNA immunoprecipitation) assay. The results showed that compared with the paired adjacent tissues, miR-96-5p was clearly higher in human TSCC tissues, while the expression of FBXW7 was clearly lower ($P<0.05$), and these changes were correlated with tumor size, lymph node metastasis, and clinical stage in TSCC patients. Compared with the Blank control group, the expression of miR-96-5p, cell viability, clone formation rate, positive expression of Ki67, and the value of Bcl-2/Bax in the anti-miR-96-5p group were lower, while the expression of FBXW7 protein and mRNA, apoptosis index, and apoptosis rate were higher ($P<0.05$); the changing trends of each index in the miR-96-5p group were opposite to those in the anti-miR-96-5p group; the results of nude mouse experiments showed that downregulation of miR-96-5p could inhibit the growth of TSCC solid tumors by upregulating FBXW7 expression. Knockdown of FBXW7 could reverse the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of downregulation on TSCC cells. The results indicated that down-regulation of miR-96-5p can inhibit the proliferation of TSCC cells and promote their apoptosis by up-regulating the expression of FBXW7.

Keywords miR-96-5p; FBXW7; squamous cell carcinoma; proliferation; apoptosis

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是一种非常普遍的口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)^[1], 在所有OSCC病例中占比为17.8%, 长期预后较差, 5年生存率约为50%, 如今仍是人类健康的重大威胁^[2-3]。miR-96-5p是一种具有致癌作用的RNA分子^[4], 可促进乳腺癌细胞增殖、黏附、侵袭和迁移^[5], 下调miR-96-5p可抑制肺癌细胞增殖、侵袭和转移^[6]; miR-96-5p还可介导口腔鳞状细胞癌的发生发展, miR-96-5p抑制剂可通过抑制细胞迁移、侵袭和糖酵解而阻碍口腔鳞状细胞癌进展^[7]。F-box和WD重复结构域7(F-box and WD repeat domain containing 7, *FBXW7*)是一种调节细胞新陈代谢、增殖与凋亡等生物学行为的肿瘤抑制基因, 受到miRNA的调控, 在结直肠癌中发挥抗癌作用, 过表达*FBXW7*可抑制结直肠癌细胞生长、集落形成、迁移和侵袭^[8-9]; *FBXW7*还可影响OSCC进展, 增强*FBXW7*表达能力可改善OSCC患者预后^[10]; *FBXW7*功能丧失可导致食管鳞状细胞癌细胞增殖、侵袭和迁移增强, 并与食管鳞状细胞癌患者肿瘤分期和生存期缩短有关^[11]。基于以上研究背景可知, miR-96-

5p与*FBXW7*均可作为TSCC的潜在治疗靶点, 且通过查询starBase数据库可知miR-96-5p与*FBXW7*间存在结合位点, 因此推测miR-96-5p可能通过靶向调节*FBXW7*表达影响TSCC进展。本研究旨在探究miR-96-5p靶向调节*FBXW7*表达对TSCC细胞增殖、凋亡的影响, 为TSCC临床诊治提供新型靶点。

1 材料与方法

1.1 临床样本、实验动物与细胞

采集在沧州市中心医院就诊的TSCC患者癌组织与配对癌旁组织, 并将其存在液氮内, 采集50例患者样本, 收集其临床病理资料(肿瘤侵袭深度、淋巴结转移和临床分期), 均获得患者本人或家属知情同意。鼠龄6~7周、体质量19~23 g的SPF级BALB/c(nu)雄性裸鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2020-0004], 在(22~25) °C屏障环境内饲养, 湿度保持在55%~65%, 不限食水, 进行12 h/12 h昼夜交替照明。本实验获得沧州市中心医院医院伦理委员会审批通过[批件号为2025-165-01(z)]。

人TSCC细胞系SCC15(货号: AXB6643, STR鉴

定)、CAL-27(货号:A01X675,STR鉴定)、293T细胞(货号:A01X743,STR鉴定)均购自上海抚生实业有限公司。

1.2 实验试剂与仪器

miR-96-5p inhibitor、miR-96-5p mimics、miR-96-5p阴性对照、*FBXW7* siRNA、*FBXW7*、*FBXW7*野生型3'-UTR报告质粒、*FBXW7*突变型3'-UTR报告质粒和引物(β -actin、U6、*FBXW7*、miR-96-5p),均由上海钦诚生物科技有限公司构建合成;SYBR Green qPCR预混液(货号:HY-K0501)、CCK-8试剂盒(货号:HY-K0301)、反转录即用型预混液(货号:HY-K0511)、蛋白A/G磁珠(货号:HY-K0202)、结晶紫染料(货号:HY-B0324A)、双荧光素酶试剂盒(货号:HY-K1013)、细胞凋亡与坏死检测试剂盒(Hoechst 33342/PI)(货号:HY-K1070)、RIPA试剂(主要成分为50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、1%脱氧胆酸钠、0.1% SDS、正钒酸钠、EDTA等,货号:HY-K1001)、基于鲁米诺底物的ECL发光液(货号:HY-K1005)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号:HY-K1073),均购自美国MCE公司;羊抗兔HRP二抗(货号:ab6721)、羊抗兔Alexa Fluor[®] 488二抗(货号:ab150077)、羊抗小鼠Alexa Fluor[®] 594二抗(货号:ab150113)、小鼠抗人Bax一抗(货号:ab216494)、人IgG抗体(货号:ab172730)以及兔抗人Bcl-2、*FBXW7*、Ki67、 β -actin一抗(货号:ab32124、ab192328、ab16667、ab8227),均购自英国Abcam公司。

实时荧光定量PCR仪(型号:TH-H320)购自山东安帕尔环境科技有限公司;蛋白电泳印迹套装以及电源(型号:PowerEase[™] Touch 350W)购自美国ThermoFisher Scientific公司;酶标仪(型号:Spectra-

Max ID5)购自美国Molecular公司;生物显微镜(型号:XSP-37XBF)、荧光显微镜(型号:XSP-GX14C)购自上海光学仪器六厂;流式细胞检测仪(型号:LSRFortessa[™])购自美国BD公司;Amersham ImageQuant[™] 800蛋白印迹成像系统购自格来赛生命科技(上海)有限公司等。

1.3 细胞实验

1.3.1 以RT-qPCR实验检测人TSCC组织中miR-96-5p、*FBXW7*的异常表达情况 自液氮内取除TSCC组织与配对癌旁组织,放入研钵内添加预冷TRIzol试剂,充分研磨后提取总RNA,取反转录即用型预混液加入引物、无核酸酶水和样品RNA进行逆转录,获得DNA模板,置于SYBR Green qPCR预混液内并添加引物、无核酸酶水,行RT-qPCR反应检测miR-96-5p、*FBXW7* mRNA相对表达量,选用 β -actin、U6分别作为*FBXW7*、miR-96-5p的内参对照,公式:相对表达量= $2^{-(\text{癌组织目的基因Ct}-\text{癌组织内参基因Ct})-(\text{癌旁组织目的基因Ct}-\text{癌旁组织内参基因Ct})}$,相对表达量>1表示目的基因在癌组织中高表达,当相对表达量<1表示目的基因在癌组织中低表达,基因引物序列见表1。

1.3.2 分组转染SCC15、CAL-27细胞 细胞培养:快速取出冻存在液氮内的SCC15、CAL-27、293T细胞,于温水浴(37 °C)内解冻复苏,接种在T25培养瓶内后平放在37 °C、5% CO₂恒温培养箱内培养。SCC15细胞用EMEM培养基培养而CAL-27、293T细胞均用DMEM培养基培养,培养基内均含10%胎牛血清及1%双抗,均取传代2次后的细胞进行后续实验,传代比例为1:2。

取SCC15、CAL-27细胞接种在24孔板,随机分为空白对照组、NC-miR-96-5p组、anti-miR-96-5p组、miR-96-5p组、anti-miR-96-5p+si-NC组、anti-

表1 基因引物序列

Table 1 Gene primer sequences

引物名称 Primer name	方向 Direction	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
FBXW7	F	AAA GAG TTG TTA GCG GTT CTC G
	R	CCA CAT GGA TAC CAT CAA ACT G
β -actin	F	TGG ATC AGC AAG CAG GAG TA
	R	TCG GCC ACA TTG TGA ACT TT
miR-96-5p	F	ATG CTT TCT CAA CTT GTT GG
	R	TCA CCG CTC TTG GCC GTC ACA
U6	F	CTC GCT TCG GCA GCA CA
	R	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT

miR-96-5p+si-FBXW7组。培养至指数期时分组转染: NC-miR-96-5p组转染miR-96-5p阴性对照, anti-miR-96-5p组转染miR-96-5p inhibitor, miR-96-5p组转染miR-96-5p mimics, anti-miR-96-5p+si-NC组联合转染miR-96-5p inhibitor和FBXW7 siRNA阴性对照, anti-miR-96-5p+si-FBXW7组联合转染miR-96-5p inhibitor和FBXW7 siRNA, 均转染48 h。

1.3.3 以RT-qPCR与Western blot检测细胞miR-96-5p及FBXW7表达情况 取“1.3.2”中分组转染后的各组SCC15、CAL-27细胞, 均进行RT-qPCR反应(方法见“1.3.1”), 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法分析各组miR-96-5p及FBXW7 mRNA相对表达情况。

取“1.3.2”中分组转染后的各组SCC15、CAL-27细胞, 均采用预冷RIPA试剂(含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂)分组裂解, 提取总蛋白于沸水浴内变性, 蛋白样品以20 μg /孔的量上样(可保证目标蛋白丰度), 经电泳分离后通过湿转印至PVDF膜, 根据蛋白分子量截下检测蛋白(FBXW7)和内参蛋白(β -actin)条带放入湿盒内, 加入5%脱脂牛奶封闭(37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h), 弃去封闭液, 添加兔抗人FBXW7(1:2 000)和 β -actin(1:1 000)一抗, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 洗膜3次, 添加羊抗兔HRP-二抗(1:2 000), 于37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育2 h, 洗膜3次后采用ECL发光液显色蛋白, 拍照, 采用ImageJ软件进行灰度分析并量化检测蛋白相对表达情况。

1.3.4 以CCK-8与平板克隆形成实验检测细胞增殖情况 CCK-8: 取SCC15、CAL-27细胞接种在24孔板, 培养至指数期时按“1.3.2”中方法分组并进行细胞转染, 48 h后孵育CCK-8工作液(10 μL /孔、37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 h), 采用酶标仪测定各组细胞吸光度(D)值, 以 D 值表示细胞活力。

平板克隆形成实验: 取“1.3.2”中分组转染后的各组SCC15、CAL-27细胞, 洗涤、重悬、计数, 以 1.1×10^2 /孔的密度分组接种在24孔板, 连续培养3周进行细胞克隆, 然后进行弃培养基、洗涤、固定(室温、2 h)、结晶紫染色(室温、10 min)处理, 镜下拍照后定量集落数, 以相对于空白对照组的集落数百分比表示各组克隆形成率。

1.3.5 以流式细胞实验与Hoechst 33342/PI双染检测细胞凋亡 流式细胞实验。取“1.3.2”中分组转染后的各组SCC15、CAL-27细胞, 洗涤、重悬、计数, 每组取 5×10^5 个细胞重悬在500 μL PBS, 加入5 μL

Annexin V-FITC、2.5 μL PI进行Annexin V-FITC/PI双染(室温、10 min)。洗涤后流式上机检测, 均避光操作, 以FlowJo软件分析各组细胞凋亡率, 流式设门策略是先通过前向散射光(forward scattered light, FSC)和侧向散射光(side scatter, SSC)圈单细胞群来初步圈门, 再用Annexin V-FITC/PI双参数散点图区分活细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡或坏死细胞和细胞碎片四群细胞来精确设门, 最后调整电压与补偿来确保活细胞群位于左下象限中心并保证凋亡群水平位置一致。

各组Hoechst 33342/PI双染: 取“1.3.2”中分组转染后的各组SCC15、CAL-27细胞, 弃培养基后洗涤、固定(室温、2 h), 加入5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342覆没细胞孵育(室温、10 min), 洗涤, 加入15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI覆没细胞孵育(室温、10 min), 再次洗涤, 荧光显微镜下拍照, 均避光操作, 定量细胞凋亡(呈红色荧光)数与总数, 量化各组细胞凋亡指数(细胞凋亡数/细胞总数 $\times 100\%$)。

1.3.6 以免疫荧光染色检测细胞增殖与凋亡相关蛋白表达 取“1.3.2”中分组转染后的各组SCC15、CAL-27细胞, 弃培养基后洗涤, 采用4%多聚甲醛固定(室温、2 h), 灭活内源过氧化物酶。采用0.01 mmol/L枸橼酸钠缓冲液进行抗原修复(沸水浴内煮沸15 min), 然后加入5%山羊血清覆没细胞, 室温孵育2 h进行封闭, 然后加入兔抗人Ki67(1:100)、Bcl-2(1:100)以及小鼠抗人Bax(1:50)一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 清洗后分别加入羊抗兔Alexa Fluor[®] 488二抗(1:1 000)与羊抗小鼠Alexa Fluor[®] 594二抗(1:1 000), 室温孵育2 h后清洗。荧光显微镜下拍照, 均避光操作, 定量各组平均荧光强度, 以Ki67免疫荧光强度表示其阳性表达, 以绿/红荧光强度之比表示Bcl-2/Bax值。

1.4 裸鼠实验

取“1.3.2”中分组转染后的各组SCC15、CAL-27细胞, 采用含2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养基筛选建立稳转细胞系, 分组接种在裸鼠右腋皮下(分别设为对照组、阴性对照组、miR-96-5p下调组、miR-96-5p上调组、miR-96-5p下调+si-NC组、miR-96-5p下调+敲低FBXW7组), 每只接种 2.5×10^7 个细胞, 成瘤率为100%, 每组构建6只裸鼠。饲养3周后进行安乐死, 取出皮下肿瘤拍照, 测定其质量以及最长径(L)、最短径(W), 算出肿瘤体积(V), $V=L \times W^2/2$ 。

1.5 以双荧光素酶报告基因与RIP实验验证miR-96-5p对FBXW7的靶向调控作用

双荧光素酶报告基因实验。取293T细胞接种在24孔板,培养至指数期时将FBXW7野生型3'-UTR报告质粒、FBXW7突变型3'-UTR报告质粒分别和miR-96-5p mimics、NC-miR-96-5p两两联合共转染至细胞内。24 h后采用双荧光素酶试剂盒测定各共转染细胞相对荧光素酶活性,具体参照试剂盒说明书中指导步骤进行。

RNA免疫共沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)实验。取指数期293T细胞用1%甲醛交联(室温、10 min),用预冷RIPA试剂裂解,将裂解液一分为二,分别加入人IgG与FBXW7抗体,4 °C孵育过夜,分别设为IgG对照组与FBXW7实验组,均加入蛋白A/G磁珠。4 °C孵育2 h进行免疫沉淀,离心(4 °C、1 000 r/min,离心半径12 cm)取免疫共沉淀物,孵育蛋白酶K(65 °C, 4.5 h),然后进行RT-qPCR反应(方法见“1.3.1”)来检测免疫共沉淀物中miR-96-5p相对表达。

1.6 统计分析

本研究运用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,实验数据均为计量资料,符合正态分布且方差齐,以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较以及事后两两进一步比较分别进行单因素方差分析、SNK-*q*检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人TSCC组织中miR-96-5p及FBXW7 mRNA的异常表达及其与TSCC患者临床病理特征的相关性

与配对癌旁组织相比,TSCC组织中miR-96-5p表达水平升高,而FBXW7 mRNA表达水平降低($P<0.05$),并与TSCC患者肿瘤大小、淋巴结转移和临床分期相关。见表2~表4。

2.2 各组SCC15、CAL-27细胞miR-96-5p及FBXW7表达的检测结果

与空白对照组相比,anti-miR-96-5p组miR-96-5p表达水平降低,而FBXW7蛋白与mRNA表达水平升高($P<0.05$);miR-96-5p组miR-96-5p表达水平升高,而FBXW7蛋白与mRNA表达水平降低($P<0.05$);NC-miR-96-5p组miR-96-5p、FBXW7表达水平无显著差异($P>0.05$)。与anti-miR-96-5p组相比,anti-miR-96-5p+si-FBXW7组miR-96-5p表达水平无显著差异($P>0.05$),FBXW7蛋白与mRNA水平降低($P<0.05$)。见图1和表5。

2.3 各组SCC15、CAL-27细胞增殖检测结果

与空白对照组相比,anti-miR-96-5p组细胞活力、克隆形成率降低($P<0.05$),miR-96-5p组细胞活力、克隆形成率升高($P<0.05$),NC-miR-96-5p组细胞活力、克隆形成率无显著差异($P>0.05$);与anti-miR-96-5p组相比,anti-miR-96-5p+si-FBXW7

表2 TSCC组织及其配对癌旁组织中miR-96-5p、FBXW7 mRNA相对表达情况

Table 2 Relative expression of miR-96-5p and FBXW7 mRNA in TSCC tissues and paired adjacent tissues

组别 Group	miR-96-5p	FBXW7 mRNA
Paired adjacent tissue	1.00±0.12	1.00±0.08
TSCC tissues	2.07±0.15*	0.37±0.05*

$\bar{x}\pm s$, $n=50$; * $P<0.05$, 与配对癌旁组织相比。

$\bar{x}\pm s$, $n=50$; * $P<0.05$ compared with paired adjacent tissues.

表3 miR-96-5p表达与TSCC患者临床病理特征的相关性

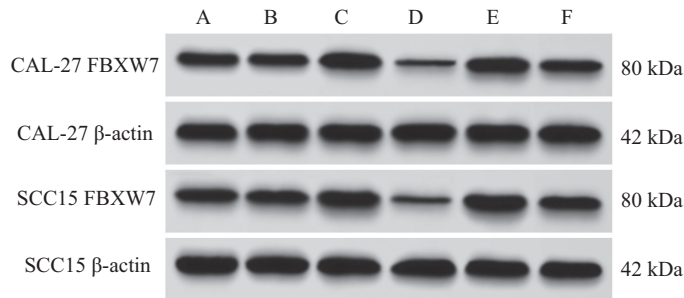
Table 3 Correlation between miR-96-5p expression and clinicopathological features of TSCC patients

类别 Category	总病例数 Total number of cases	miR-96-5p高表达病例数 Number of cases with high expression of miR-96-5p	miR-96-5p低表达病例数 Number of cases with low expression of miR-96-5p	<i>P</i>	
Lymph node metastasis	N0 N1-3	11 39	6 31	5 8	0.028
Tumor size	T1 or T2 T3 or T4	9 41	5 32	4 9	0.017
Clinical stage	Stage I or II Stage III or IV	13 37	6 29	7 8	0.018

表4 FBXW7表达与TSCC患者临床病理特征的相关性

Table 4 Correlation between FBXW7 expression and clinicopathological features of TSCC patients

类别 Category		总病例数 Total number of cases	FBXW7高表达病例数 Number of cases with high expression of FBXW7	FBXW7低表达病例数 Number of cases with low expression of FBXW7	<i>P</i>
Lymph node metastasis	N0	11	6	5	0.023
	N1-3	39	10	29	
Tumor size	T1 or T2	9	4	5	0.028
	T3 or T4	41	13	28	
Clinical stage	Stage I or II	13	8	5	0.023
	Stage III or IV	37	11	26	



A: 空白对照组; B: NC-miR-96-5p组; C: anti-miR-96-5p组; D: miR-96-5p组; E: anti-miR-96-5p+si-NC组; F: anti-miR-96-5p+si-FBXW7组。

A: Blank control group; B: NC-miR-96-5p group; C: anti-miR-96-5p group; D: miR-96-5p group; E: anti-miR-96-5p+si NC group; F: anti-miR-96-5p+si-FBXW7 group.

图1 Western blot检测各组SCC15、CAL-27细胞FBXW7蛋白表达情况

Fig.1 The expression of FBXW7 protein in SCC15 and CAL-27 cells in each group was detected by Western blot

表5 各组SCC15、CAL-27细胞miR-96-5p及FBXW7相对表达比较

Table 5 Comparison of relative expression of miR-96-5p and FBXW7 in SCC15 and CAL-27 cells of each group

组别 Group	SCC15			CAL-27		
	miR-96-5p	FBXW7 mRNA	FBXW7蛋白 FBXW7 protein	miR-96-5p	FBXW7 mRNA	FBXW7蛋白 FBXW7 protein
Blank control group	1.00±0.08	1.00±0.09	0.64±0.05	1.00±0.09	1.00±0.12	0.57±0.04
NC-miR-96-5p group	0.99±0.10	0.98±0.08	0.65±0.04	1.01±0.10	1.02±0.11	0.56±0.06
anti-miR-96-5p group	0.34±0.06*	1.97±0.10*	1.04±0.07*	0.32±0.05*	2.01±0.13*	0.96±0.05*
miR-96-5p group	2.05±0.11*	0.36±0.05*	0.25±0.03*	2.04±0.12*	0.35±0.06*	0.20±0.03*
anti-miR-96-5p+si-NC group	0.33±0.07*	1.98±0.11	1.03±0.08	0.31±0.06*	2.03±0.09	0.97±0.08
anti-miR-96-5p+si-FBXW7 group	0.35±0.05*	1.03±0.12 [#]	0.66±0.05 [#]	0.33±0.07*	1.02±0.10 [#]	0.58±0.07 [#]

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与空白对照组相比; [#] $P<0.05$, 与anti-miR-96-5p组相比。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with Blank control group; [#] $P<0.05$ compared with anti-miR-96-5p group.

组细胞活力、克隆形成率升高($P<0.05$)。见图2和表6。

2.4 各组SCC15、CAL-27细胞凋亡检测结果

与空白对照组相比, anti-miR-96-5p组细胞凋亡指数、凋亡率升高($P<0.05$), miR-96-5p组细胞凋亡指数、凋亡率降低($P<0.05$), NC-miR-96-5p组细胞凋亡指数、凋亡率无显著差异($P>0.05$); 与 anti-

miR-96-5p组相比, anti-miR-96-5p+si-FBXW7组细胞凋亡指数、凋亡率降低($P<0.05$)。见图3、图4和表7。

2.5 各组SCC15、CAL-27细胞增殖与凋亡相关蛋白表达检测结果

与空白对照组相比, anti-miR-96-5p组Ki67阳性表达、Bcl-2/Bax值降低($P<0.05$), miR-96-5p组

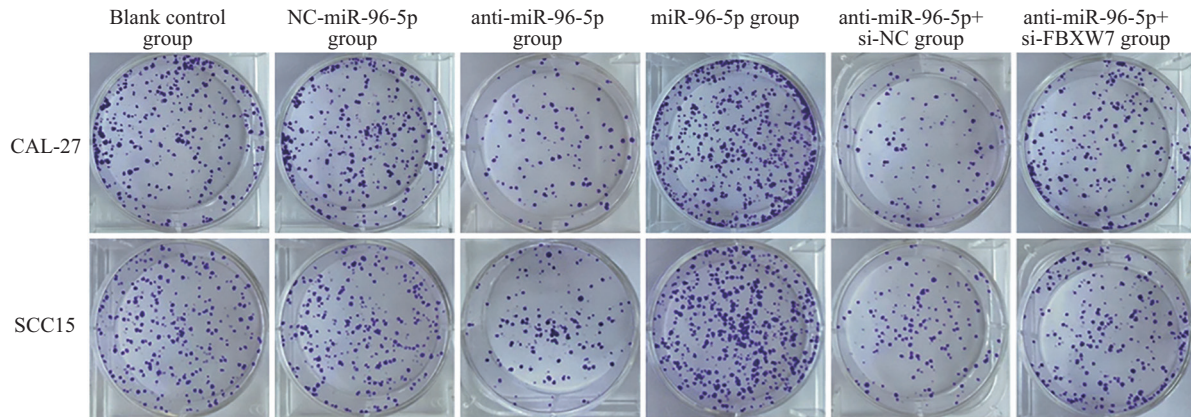


图2 平板克隆形成实验检测各组SCC15、CAL-27细胞增殖(结晶紫染色)

Fig.2 Proliferation of SCC15 and CAL-27 cells in each group was detected by plate clone formation assay (crystal violet staining)

表6 各组SCC15、CAL-27细胞活力、克隆形成率比较

Table 6 Comparison of cell viability and clone formation rate of SCC15 and CAL-27 in each group

组别 Group	SCC15		CAL-27	
	细胞活力(D值) Cell viability (D value)	克隆形成率/% Clone formation rate /%	细胞活力(D值) Cell viability (D value)	克隆形成率/% Clone formation rate /%
Blank control group	0.41±0.03	100.00±0.00	0.38±0.02	100.00±0.00
NC-miR-96-5p group	0.40±0.05	104.32±11.25	0.39±0.03	103.61±10.84
anti-miR-96-5p group	0.23±0.02*	52.54±9.93*	0.21±0.01*	51.37±8.39*
miR-96-5p group	0.79±0.06*	209.15±15.20*	0.74±0.06*	206.73±14.28*
anti-miR-96-5p+si-NC group	0.22±0.01	54.01±10.34	0.22±0.04	53.12±9.45
anti-miR-96-5p+si-FBXW7 group	0.39±0.04 [#]	96.42±14.16 [#]	0.36±0.05 [#]	95.94±15.07 [#]

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与空白对照组相比; [#] $P<0.05$, 与anti-miR-96-5p组相比。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with Blank control group, [#] $P<0.05$ compared with anti-miR-96-5p group.

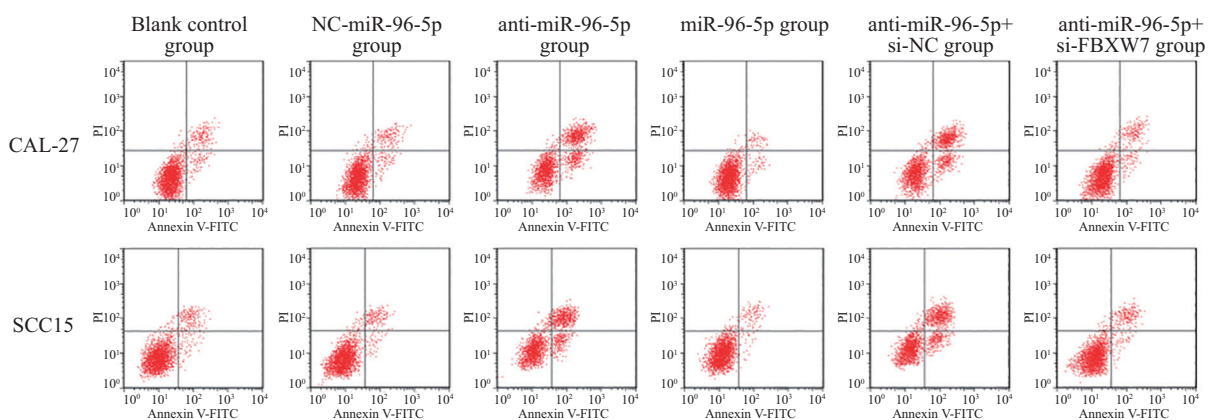


图3 流式细胞实验检测各组SCC15、CAL-27细胞凋亡率

Fig.3 Apoptosis rate of SCC15 and CAL-27 cells in each group detected by flow cytometry

Ki67阳性表达、Bcl-2/Bax值升高($P<0.05$), NC-miR-96-5p组Ki67阳性表达、Bcl-2/Bax值无显著差异($P>0.05$); 与anti-miR-96-5p组相比, anti-miR-96-5p+si-FBXW7组Ki67阳性表达、Bcl-2/Bax值升

高($P<0.05$)。见图5、图6和表8。

2.6 各组裸鼠肿瘤生长检测结果

与对照组相比, miR-96-5p下调组肿瘤质量与体积降低($P<0.05$), miR-96-5p组肿瘤质量与体积

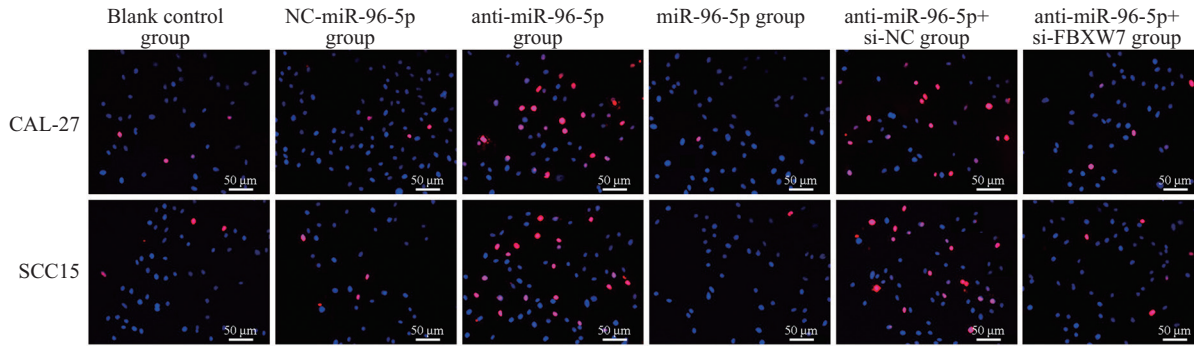


图4 Hoechst 33342/PI双染检测各组SCC15、CAL-27细胞凋亡比例

Fig.4 Hoechst 33342/PI double staining was used to detect the apoptotic ratio of SCC15 and CAL-27 cells in each group

表7 各组SCC15、CAL-27细胞凋亡指数、凋亡率比较

Table 7 Comparison of apoptosis index and apoptosis rate of SCC15 and CAL-27 cells in each group

组别 Group	SCC15		CAL-27	
	凋亡指数/% Apoptosis index /%	凋亡率/% Apoptosis rate /%	凋亡指数/% Apoptosis index /%	凋亡率/% Apoptosis rate /%
Blank control group	6.73±1.51	4.06±1.06	6.89±1.17	4.18±1.02
NC-miR-96-5p group	6.29±1.63	3.85±0.92	6.33±1.38	4.02±0.98
anti-miR-96-5p group	50.63±3.41*	48.76±2.58*	51.25±2.96*	49.14±2.60*
miR-96-5p group	1.20±0.35*	0.97±0.30*	1.41±0.43*	1.01±0.32*
anti-miR-96-5p+si-NC group	49.14±2.82	47.62±1.85	50.73±2.19	48.56±1.87
anti-miR-96-5p+si-FBXW7 group	7.62±1.23 [#]	5.48±0.97 [#]	7.74±1.36 [#]	5.67±1.05 [#]

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与空白对照组相比; [#] $P<0.05$, 与anti-miR-96-5p组相比。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with Blank control group; [#] $P<0.05$ compared with anti-miR-96-5p group.

上调升高 ($P<0.05$), 阴性对照组肿瘤质量与体积无显著差异 ($P>0.05$); 与miR-96-5p下调组相比, miR-96-5p下调+FBXW7敲低组肿瘤质量与体积升高 ($P<0.05$)。见图7和表9。

2.7 miR-96-5p对FBXW7的靶向调节验证结果

miR-96-5p与FBXW7间结合位点通过查询star-Base数据库获得。见图8。

双荧光素酶报告基因实验结果显示: FBXW7野生型3'-UTR报告质粒联合miR-96-5p mimics共转染细胞相对荧光素酶活性 (0.30 ± 0.04) 相较联合NC-miR-96-5p共转染细胞 (1.00 ± 0.06) 降低 ($P<0.05$); FBXW7突变型3'-UTR报告质粒联合miR-96-5p mimics共转染细胞相对荧光素酶活性 (1.02 ± 0.08) 相较联合NC-miR-96-5p共转染细胞 (1.00 ± 0.07) 无显著差异 ($P>0.05$), 表明miR-96-5p与FBXW7间存在靶向关系。

RIP实验结果显示: FBXW7实验组免疫共沉淀物中miR-96-5p表达 (2.08 ± 0.14) 相较IgG对照组 (1.00 ± 0.12) 升高 ($P<0.05$), 表明miR-96-5p可特异性结合FBXW7。

3 讨论

近年来, TSCC的发病率持续上升且发病年龄呈年轻化趋势^[12], 大多数患者在诊断时病情处于晚期, 手术辅助化疗和化疗等是TSCC的常用治疗方法, 但疗效不佳并缺乏特异性, 且复发率很高, 因此探寻新型靶点进行靶向治疗具有重要临床意义^[13-14]。miR-96-5p作为一种致癌因子, 在人类癌症进展中起到肿瘤促进作用, 可促进前列腺癌细胞迁移和侵袭^[15], 敲低miR-96-5p可抑制肝癌细胞恶性行为^[16]。miR-96-5p在OSCC及喉癌中表达水平均异常升高, 并在头颈部鳞状细胞癌致癌过程中发挥积极作用^[17]。但miR-96-5p在TSCC中的调控作用及机制目前尚不明确。本文结果显示, 相比配对癌旁组织, miR-96-5p在TSCC组织中表达水平明显升高, 并与TSCC患者淋巴结转移、肿瘤大小和临床分期相关, 表明miR-96-5p介导TSCC发病及病情进展过程。采用miR-96-5p mimics以及miR-96-5p inhibitor来调控TSCC细胞系中miR-96-5p表达, 通过细胞功能性实验对此进行了探讨。结果显示, miR-96-5p inhibitor降低TSCC

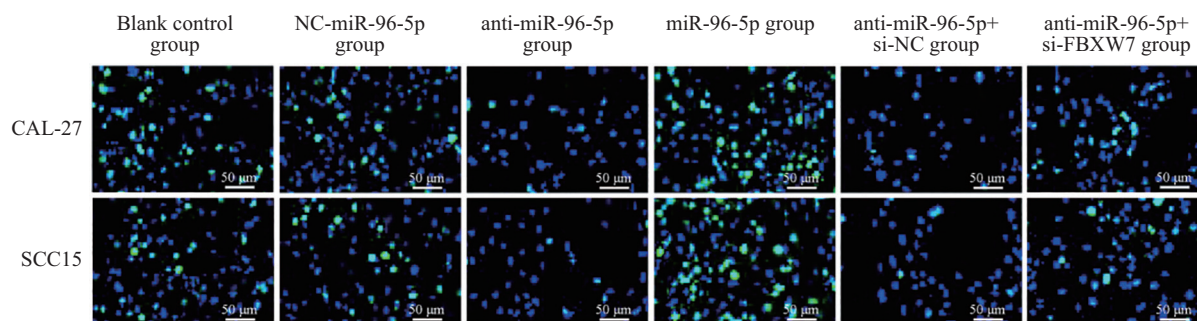


图5 免疫荧光染色检测各组SCC15、CAL-27细胞Ki67阳性表达

Fig.5 Immunofluorescence staining was used to detect the positive expression of Ki67 in SCC15 and CAL-27 cells in each group

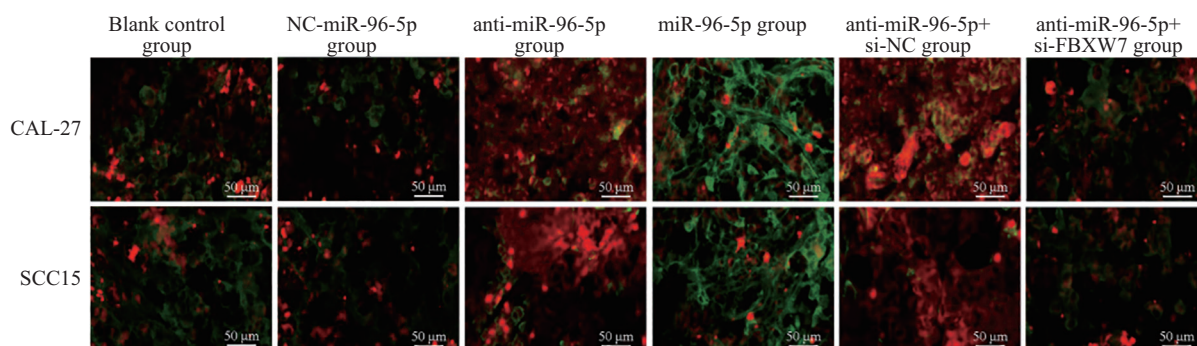


图6 免疫荧光染色检测各组SCC15、CAL-27细胞Bcl-2/Bax值

Fig.6 Immunofluorescence staining was used to detect the value of Bcl-2/Bax of SCC15 and CAL-27 cells in each group

表8 各组SCC15、CAL-27细胞Ki67阳性表达、Bcl-2/Bax值比较

Table 8 Comparison of Ki67 positive expression and Bcl-2/Bax value of SCC15 and CAL-27 cells in each group

组别 Group	SCC15		CAL-27	
	Ki67阳性表达 Ki67 positive expression	Bcl-2/Bax值 Bcl-2/Bax value	Ki67阳性表达 Ki67 positive expression	Bcl-2/Bax值 Bcl-2/Bax value
Blank control group	23.17±1.62	0.46±0.03	21.84±3.23	0.42±0.03
NC-miR-96-5p group	23.93±2.35	0.45±0.05	21.25±2.59	0.43±0.06
anti-miR-96-5p group	7.26±0.97*	0.23±0.02*	6.92±1.01*	0.21±0.04*
miR-96-5p group	38.75±2.58*	0.65±0.04*	36.03±1.52*	0.63±0.05*
anti-miR-96-5p+si-NC group	7.12±1.16	0.24±0.03	7.20±1.14	0.20±0.02
anti-miR-96-5p+si-FBXW7 group	21.85±2.27 [#]	0.44±0.05 [#]	19.86±2.76 [#]	0.40±0.05 [#]

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$, 与空白对照组相比; [#] $P<0.05$, 与anti-miR-96-5p组相比。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; * $P<0.05$ compared with Blank control group; [#] $P<0.05$ compared with anti-miR-96-5p group.

细胞系 SCC15、CAL-27 中 miR-96-5p 表达水平, 可导致两者细胞活力、克隆形成率、Ki67 阳性表达比例、Bcl-2/Bax 值降低, 而细胞凋亡指数、凋亡率升高, 表明下调 miR-96-5p 可抑制增殖与抗凋亡蛋白表达, 提高促凋亡蛋白表达水平, 进而抑制 TSCC 细胞增殖、克隆形成并促进其凋亡; 而 miR-96-5p mimics 上调 SCC15、CAL-27 细胞 miR-96-5p 表达, 可对 TSCC 细胞起到相反的促癌作用; 裸鼠实验结果显示, 下调

miR-96-5p 可降低裸鼠肿瘤质量与体积, 表明下调 miR-96-5p 可抑制 TSCC 实体瘤生长, 而上调 miR-96-5p 则起到相反的促肿瘤生长作用。相比前人研究, 本研究首次探究了 miR-96-5p 在 TSCC 中的调控作用, 证实了下调 miR-96-5p 可对 TSCC 细胞起到明显抗癌作用, 揭示了 miR-96-5p 作为 TSCC 诊治靶点在临床中具有广阔应用前景。

FBXW7 通过抑制癌干细胞形成和调节肿瘤

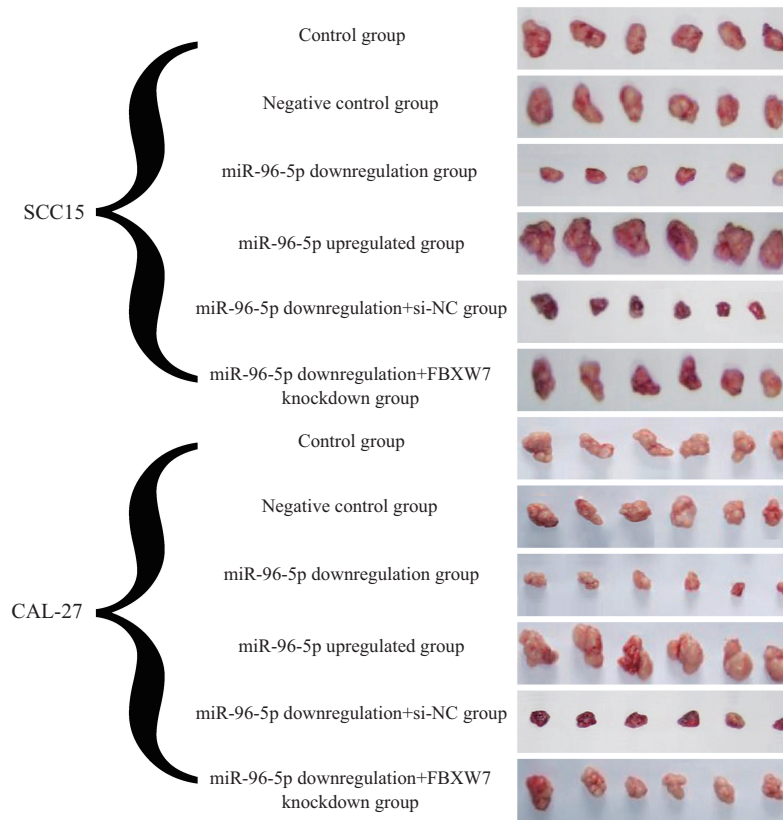


图7 各组裸鼠肿瘤图片

Fig.7 Tumor pictures of nude mice in each group

表9 各组裸鼠肿瘤质量与体积比较

Table 9 Comparison of tumor mass and volume of nude mice in each group

组别 Group	SCC15		CAL-27	
	质量/g Mass /g	体积/mm ³ Volume /mm ³	质量/g Mass /g	体积/mm ³ Volume /mm ³
Control group	1.03±0.07	967.53±52.41	0.98±0.11	943.12±48.30
Negative control group	1.02±0.09	974.36±61.25	0.99±0.13	951.64±50.46
miR-96-5p downregulation group	0.49±0.04*	451.68±39.14*	0.47±0.08*	430.29±37.95*
miR-96-5p upregulated group	1.47±0.11*	1 403.21±75.26*	1.41±0.12*	1 386.37±64.12*
miR-96-5p downregulation+si-NC group	0.50±0.05	460.17±41.32	0.46±0.07	423.86±39.51
miR-96-5p downregulation+FBXW7 knockdown group	0.97±0.10 [#]	934.20±53.63 [#]	0.93±0.09 [#]	920.76±45.28 [#]

$\bar{x} \pm s, n=6; *P<0.05$, 与对照组相比; [#] $P<0.05$, 与miR-96-5p下调组相比。

$\bar{x} \pm s, n=6; *P<0.05$ compared with Control group; [#] $P<0.05$ compared with miR-96-5p down-regulation group.

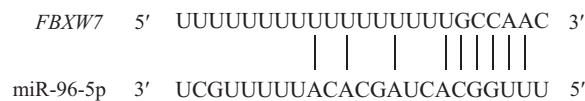


图8 miR-96-5p与FBXW7间结合位点

Fig.8 Binding site between miR-96-5p and FBXW7

血管生成、细胞衰老、DNA损伤和修复来充当一种肿瘤抑制因子^[8-9,18],能靶向各种癌蛋白进行降解,FBXW7耗竭可促进肺癌细胞的迁移、侵袭、球

体形成以及体内肿瘤生长^[19]。FBXW7在OSCC组织中表达水平明显降低,并可影响患者预后,增强FBXW7表达能力可抑制TSCC细胞系CAL27的增殖

与异种移植瘤的生长^[10,20]。本研究结果显示,相比配对癌旁组织,miR-96-5p水平在人TSCC组织中明显升高,而FBXW7表达水平明显降低,并与TSCC患者淋巴结转移、肿瘤大小和临床分期相关,表明FBXW7介导TSCC发病及病情进展过程,且RT-qPCR、双荧光素酶报告基因与RIP实验证实了miR-96-5p可靶向结合*FBXW7*并下调其表达,表明miR-96-5p可靶向下调FBXW7介导TSCC发病过程。拯救实验结果显示,在下调miR-96-5p的同时敲低FBXW7表达,可减弱下调miR-96-5p对SCC15、CAL-27细胞增殖、克隆形成与裸鼠体内肿瘤生长的抑制作用,削弱下调miR-96-5p对SCC15、CAL-27细胞凋亡的促进作用,最终逆转下调miR-96-5p对TSCC细胞的抗癌作用。相比前人研究,本研究首次在TSCC中阐释了miR-96-5p的促癌作用及机制,揭示了下调miR-96-5p促进TSCC细胞凋亡并抑制其增殖是通过靶向上调FBXW7表达实现的,且本研究证实了下调miR-96-5p可通过靶向上调FBXW7而抑制增殖与抗凋亡蛋白表达,增强促凋亡蛋白表达,揭示Ki67、Bcl-2、Bax可能是其下游作用靶点,但具体分子机制本研究尚未深入探究,存在一定局限性,还需后续免疫共沉淀、酵母双杂交等进行深入探讨

综上所述,miR-96-5p可通过靶向下调FBXW7表达而促进TSCC细胞增殖,抑制其凋亡,下调miR-96-5p可起到相反作用,对TSCC细胞发挥明显抗癌作用。本文为TSCC临床诊治提供了新型靶点,为临床靶向治疗提供了新思路,有助于改善TSCC患者预后。

参考文献 (References)

- [1] ZHU R, ZHANG Y, ZHANG J, et al. Development and validation of an explainable machine learning model for predicting occult lymph node metastasis in early-stage oral tongue squamous cell carcinoma: a multi-center study [J]. *Int J Surg*, 2025, 111(8): 5022-35.
- [2] GHAZI N, SAGHRAVANI N, ANVARI K, et al. Evaluation of survival rate in patients with tongue squamous cell carcinoma: a retrospective single-center study [J]. *BMC Oral Health*, 2025, 25(1): 658-66.
- [3] LIU L, WANG P, GUO C, et al. TRAIIP enhances progression of tongue squamous cell carcinoma through EMT and Wnt/ β -catenin signaling by interacting with DDX39A [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 1481-94.
- [4] YING Q, XU H, WU X, et al. Clinical significance of lncRNA PAX8-AS1 and miR-96-5p in non-small cell lung cancer [J]. *J Cardiothorac Surg*, 2025, 20(1): 299-307.
- [5] ZHANG X, CONG L, YU R, et al. MicroRNA-96 promotes the proliferation and migration of breast cancer cells by inhibiting Smad7 expression [J]. *Oncol Lett*, 2025, 29(3): 151-61.
- [6] CHU F, XU X, ZHANG Y, et al. LIM-domain binding protein 2 was down-regulated by miRNA-96-5p inhibited the proliferation, invasion and metastasis of lung cancer H1299 cells [J]. *Clinics*, 2022, 78: 100145-51.
- [7] DONG W, ZHAO L, ZHANG S, et al. Circ-KIAA0907 inhibits the progression of oral squamous cell carcinoma by regulating the miR-96-5p/UNC13C axis [J]. *World J Surg Oncol*, 2021, 19(1): 75-87.
- [8] LI Q, LI Y, ZHOU T, et al. FBXW7 metabolic reprogramming inhibits the development of colon cancer by down-regulating the activity of arginine/mTOR pathways [J]. *PLoS One*, 2025, 20(1): e0317294-311.
- [9] CHEN Y, CHEN B, TU S, et al. miR-25-3p serves as an oncogenic in colorectal cancer cells by regulating the ubiquitin ligase FBXW7 function [J]. *Oncol Rep*, 2024, 52(5): 153-64.
- [10] SUN Y, NIE W, QIU B, et al. FBXW7 affects autophagy through MCL1 in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Dis*, 2023, 29(8): 3259-67.
- [11] PAN Y, LIU J, GAO Y, et al. FBXW7 loss of function promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via elevating MAP4 and ERK phosphorylation [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 75-91.
- [12] LIU S, GUAN T, YANG F, et al. Targeting CD276: a promising strategy for CAR-NK cell immunotherapy in human oral tongue squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2025, 25(1): 593-602.
- [13] HU S, LI X, YANG B, et al. Innovations in radiotherapy for tongue squamous cell carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 1082-97.
- [14] HAO M, LI X, ZHANG X, et al. Tongue squamous cell carcinoma-targeting Au-HN-1 nanosystem for CT imaging and photothermal therapy [J]. *Int J Oral Sci*, 2025, 17(1): 9-18.
- [15] SOROR A A, ESHAGH R, FAHIM M R, et al. Prostate cancer invasion is promoted by the miR-96-5p-induced NDRG1 deficiency through NF- κ B regulation [J]. *Klin Onkol*, 2024, 38(2): 95-101.
- [16] YUAN Q, ZHANG Y, LI J, et al. Circ_TEX2 functions as a tumor suppressor in hepatoma via miR-96-5p/SPRED1 axis [J]. *Mol Biotechnol*, 2023, 65(10): 1679-92.
- [17] PIOTROWSKI I, ZHU X, SACCON T D, et al. miRNAs as biomarkers for diagnosing and predicting survival of head and neck squamous cell carcinoma patients [J]. *Cancers*, 2021, 13(16): 3980-96.
- [18] BI Y, YANG Y, ZHANG Y, et al. FBXW7 inhibits the progression of ESCC by directly inhibiting the stemness of tumor cells [J]. *Neoplasma*, 2023, 70(6): 733-46.
- [19] YIN L, ZHANG J, ZHU Z, et al. The FBXW7-KMT2 axis in cancer-associated fibroblasts controls tumor growth via an epigenetic-paracrine mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, 122(13): e2423130122-33.
- [20] QIU B, SUN Y, NIE W, et al. FBXW7 promotes autophagy and inhibits proliferation of oral squamous cell carcinoma [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11(5): e845-53.