

长链非编码RNA肌动蛋白纤维相关蛋白1-反义RNA1 在口腔鳞状细胞癌中的表达及其相关功能

耿玉东 王树斌 卢泰青 滕薇

郑州大学第一附属医院口腔颌面外科, 郑州 450000

[摘要] 目的 分析长链非编码RNA (lncRNA) 肌动蛋白纤维相关蛋白1-反义RNA1 (AFAP1-AS1) 在口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 中的表达及其对OSCC细胞生物行为学的影响, 初步探讨其可能的作用机制。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测OSCC患者 (55例) 癌组织、癌旁正常黏膜组织及人口腔鳞状细胞癌SCC25、人正常口腔角质细胞株 (NOK) 细胞中lncRNA AFAP1-AS1的表达, 分析AFAP1-AS1与OSCC患者病理特征的相关性, 通过Kaplan-Meier生存曲线分析AFAP1-AS1与患者预后的关系。AFAP1-AS1 siRNA转染SCC25细胞, 细胞计数 (CCK-8) 及Transwell实验分别检测细胞增殖、迁移和侵袭的变化, 蛋白质印迹 (Western blot) 检测侵袭相关蛋白、肌动蛋白纤维相关蛋白1 (AFAP1) 及Rho GTP酶家族成员蛋白的表达情况, 免疫荧光染色检测细胞骨架肌动蛋白微丝结构的变化。结果 OSCC组织中AFAP1-AS1的表达高于癌旁正常黏膜组织, SCC25细胞中AFAP1-AS1的表达高于NOK细胞 ($P<0.001$)。AFAP1-AS1的表达与OSCC的分化程度、TNM分期及淋巴结转移密切相关 ($P<0.05$), AFAP1-AS1高表达患者的生存率低于AFAP1-AS1低表达者 ($P<0.05$)。AFAP1-AS1 siRNA转染后AFAP1-AS1的表达水平下调, SCC25细胞的增殖、迁移和侵袭能力降低, AFAP1、RhoA、Rac2、Rab10、RhoGDI和Pfn1的表达上调, RhoC的表达下调, 细胞骨架中应力纤维减少, 肌动蛋白完整性丢失。结论 lncRNA AFAP1-AS1在OSCC组织及SCC25细胞中高表达, 与OSCC的发生进展及预后相关。下调AFAP1-AS1能够抑制OSCC的增殖、迁移和侵袭能力, 其可能是通过调控肌动蛋白纤维丝的完整性实现的。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 长链非编码RNA; 肌动蛋白纤维相关蛋白1-反义RNA1; 预后; 增殖; 侵袭

[中图分类号] R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2019.06.005



开放科学 (资源服务)
标识码 (OSID)

Expression and functions of long non-coding RNA actin filament-associated protein 1-antisense RNA1 in oral squamous cell carcinoma Geng Yudong, Wang Shubin, Lu Taiqing, Teng Wei. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

Correspondence: Geng Yudong, E-mail: doctorzdy1981@163.com.

[Abstract] **Objective** To analyze the expression and clinical significance of long non-coding RNA (lncRNA) actin filament-associated protein 1-antisense RNA1 (AFAP1-AS1) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its effect on the biobehavior of OSCC cells. **Methods** Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of lncRNA AFAP1-AS1 in the tumor tissue and matching adjacent normal tissue of OSCC patients ($n=55$), SCC25 cells, and normal oral keratinocyte lines (NOK) cells. The correlation between AFAP1-AS1 expression and the clinicopathological characteristics of OSCC patients was analyzed. The relationship between AFAP1-AS1 and prognosis was also studied with the Kaplan-Meier method. AFAP1-AS1 siRNA was transfected into the SCC25 cells. Cell counting kit-8 (CCK-8) and Transwell were used to detect cell proliferation, invasion, and migration. The expression of the invasion-associated protein, AFAP1,

and Rho GTPase family members, was detected by Western blot. In addition, the immunofluorescence of the cytoskeletal actin filament was observed. **Results** The expression of AFAP1-AS1 was higher in the OSCC tissues than in the NOK cells, and the relative expression of AFAP1-AS1 was

[收稿日期] 2019-03-11; **[修回日期]** 2019-06-15

[作者简介] 耿玉东, 主治医师, 学士, E-mail: doctorzdy1981@163.com

[通信作者] 耿玉东, 主治医师, 学士, E-mail: doctorzdy1981@163.com

higher in the SCC25 cells than in the NOK cells ($P<0.001$). AFAP1-AS1 expression was associated with the degree of differentiation, TNM stage, lymphatic metastasis, and poor prognosis of OSCC ($P<0.05$). Patients with a high expression of AFAP1-AS1 had lower survival rates than those with a low expression of AFAP1-AS1 ($P<0.05$). After transfected by AFAP1-AS1 siRNA, the expression of AFAP1-AS1 was downregulated. The inhibition of AFAP1-AS1 expression consequently suppressed the proliferation, invasion, and migration of SCC25. Moreover, AFAP1-AS1 siRNA upregulated the expression levels of AFAP1, RhoA, Rac2, Rab10, RhoGDI, and Pfn1 but downregulated the expression of RhoC. Immunofluorescence showed that AFAP1-AS1 also reduced the formation of stress filaments in the cytoskeleton and affected the integrity of the actin filament. **Conclusion** The expression of AFAP1-AS1 was high in the OSCC tissues and SCC25 cells and is associated with the development and prognosis of OSCC. The knockdown of AFAP1-AS1 might inhibit the proliferation and invasion of OSCC cells by regulating the integrity of the actin filament.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; long non-coding RNA; actin filament-associated protein 1-antisense RNA1; prognosis; proliferation; invasion

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一, 约占口腔癌的90%^[1], 具有局部浸润性强、易发生颈部淋巴结转移等特点, 就诊时多数已处于中晚期阶段, 且术后易复发, 预后较差, 5年生存率约为50%^[2-3]。较强的浸润性和局部转移是OSCC预后不良的主要原因^[4], 探讨其迁移和侵袭的分子机制对于治疗OSCC具有重要的意义。

长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是长度大于200 bp、无编码功能的RNA分子。研究^[5-6]证实, lncRNA的生物学功能较为复杂, 与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移和复发等密切相关。肌动蛋白纤维相关蛋白1-反义RNA1 (actin filament-associated protein1-antisense RNA1, AFAP1-AS1) 是肌动蛋白纤维相关蛋白1 (actin filament associated protein 1, AFAP1) 编码基因的反义lncRNA, 在非小细胞肺癌^[7]、食管癌^[8]等多种恶性肿瘤中异常高表达, 与其发生发展及预后密切相关。目前关于AFAP1-AS1在OSCC中的表达及意义的研究较少, 本研究通过检测OSCC组织中AFAP-AS1的表达, 探讨其与OSCC临床病理及预后的关系, 同时采用siRNA抑制OSCC细胞中AFAP1-AS1的表达, 分析下调AFAP1-AS1对OSCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 初步探讨其在OSCC中的生物学功能及机制。

1 材料和方法

1.1 病理组织及临床病理资料的获取

选取2015年6月—2017年1月郑州大学第一附属医院口腔颌面外科收治的55例OSCC患者, 其中男30例, 女25例, 年龄28~75岁, 中位年龄54岁。OSCC患者术前均未接受放、化疗治疗, 未合并其他系统肿瘤及感染性疾病等。手术获取OSCC组织及相应

的距肿瘤3 cm以上的癌旁正常黏膜组织 (经组织病理检测确诊), 离体后于液氮中保存。同时收集患者的临床病理资料, 包括肿瘤部位、大小、病理分化程度、TNM分期及淋巴结转移等。对所有OSCC患者定期复查, 随访时间截至2018年6月。本研究经郑州大学第一附属医院医学伦理学委员会批准, 患者或其家属均签署知情同意书。

1.2 细胞和试剂

人正常口腔角质细胞株 (normal oral keratinocyte lines, NOK) 和人口腔鳞状细胞癌SCC25细胞株均购自北京北纳创联生物技术研究院。

RPMI-1640培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶 (Gibco公司, 美国), Trizol试剂、脂质体lipofectamine 2000 (Invitrogen公司, 美国), 逆转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)、SYBR Green荧光定量试剂盒 (Takara公司, 日本), CCK-8试剂盒 (Sigma公司, 美国)。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) -C、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) -2、MMP-9、AFAP1、RhoA、RhoC、Rac2、Rab10、RhoGDI、Pfn1抗体 (Abcam公司, 英国)。AFAP1-AS1引物及干扰序列由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.3 细胞培养

NOK和SCC25细胞用含10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和100 mg·mL⁻¹链霉素的PRMI-1640培养基培养, 培养瓶置于37 °C、5%CO₂的培养箱中。取对数期生长良好的细胞用于实验。

1.4 细胞转染

将生长状态良好的SCC25细胞, 用不含抗生素的PRMI-1640培养基按照每孔1×10⁴个接种到96孔板中, 待细胞融合度达到60%左右进行siRNA转染。按照lipofectamine 2000转染试剂说明书进行, 分别将

siRNA阴性对照序列 (si-NC) 和AFAP1-AS1 siRNA序列 (表1) 转染至SCC25细胞中, 每组设6个复孔。转染24 h后, 进行后续实验。

表 1 引物序列
Tab 1 Primer sequence

基因名称	序列 (5'-3')
GAPDH	上游: AGGCAACTAGGATGGTGTGG
	下游: TTGATTTTGGAGGGATCTCG
AFAP1-AS1	上游: ATCTTCGTTAGCACTGAGACTGG
	下游: AGAAAGAAGGTGGGAGTTAGGTG
si-AFAP1-AS1-1	CAUUAUUUUGCUAAUUAACA
si-AFAP1-AS1-2	CGUUAUAUCUGAAAAAAUUCU
si-AFAP1-AS1-3	GAAGUUAGUACAUAUAAACAAA
si-NC	CUGAAACAUCAGCAAUAAG

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

用Trizol试剂裂解提取OSCC组织、癌旁正常黏膜组织及SCC25、NOK细胞中总RNA, 采用紫外分光光度计对定量及纯度进行分析。取2 μg总RNA, 按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录合成cDNA。采用qRT-PCR仪 (Applied Biosystems 7600型, ABI公司, 美国) 进行qRT-PCR检测AFAP1-AS1的相对表达量。相关引物设计见表1。反应体系为20 μL: 1×SYBR Green master mix, 0.5 μmol·L⁻¹上游引物, 0.5 μmol·L⁻¹下游引物, 1 μL cDNA。反应条件: 预变性95 °C 10 min, 95 °C 10 s, 60 °C 45 s, 72 °C 30 s, 40个循环。每孔设3个复孔, 取平均值。以GAPDH为内参, 采用2^{-ΔΔCt}法计算AFAP1-AS1的相对表达量。从si-AFAP1-AS1-1、si-AFAP1-AS1-2、si-AFAP1-AS1-3中选用AFAP1-AS1表达最低者进行后续实验。

1.6 细胞计数 (cell counting kit-8, CCK-8) 实验检测细胞增殖

将转染后的SCC25细胞接种至96孔板中, 每孔设5个复孔。分别培养24、48、72、96 h后, 更换新鲜培养基100 μL, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 在培养箱中继续培养2 h。在多功能酶标仪上检测各孔样品450 nm处的吸光度值 (A值)。

1.7 Transwell实验检测细胞迁移和侵袭

分别用Transwell小室和Transwell预涂覆基质胶小室进行迁移和侵袭实验。严格按照说明书操作进行, 将转染后细胞悬浮液100 μL加入上室, 设3个复孔。将600 μL含有10%FBS的PRMI-1640培养基或100 μL稀释后的Matrigel基质胶均匀加到Transwell下室中。37 °C、5%CO₂培养箱孵育24 h后, 用棉签擦

去上室细胞, 4%多聚甲醛固定, 0.1%结晶紫染色, 洗净干燥后, 倒置显微镜下观察并随机选取5个视野计数穿膜细胞数。

1.8 蛋白质印迹 (Western blot) 实验检测侵袭相关蛋白、AFAP1及Rho GTP酶家族成员蛋白的表达

采用细胞总蛋白提取试剂盒提取各组细胞中的总蛋白, BCA法检测蛋白浓度。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 转膜后用含有5%脱脂奶粉的磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 室温封闭1 h。孵育一抗: 抗VEGF-C (1:2 000)、抗MMP-2 (1:2 000)、抗MMP-9 (1:2 000)、抗AFAP1 (1:1 000)、抗RhoA (1:5 000)、抗RhoC (1:1 000)、抗Rac2 (1:2 000)、抗Rab10 (1:1 000)、抗RhoGDI (1:1 000)、抗Pfn1 (1:2 000), 4 °C过夜。洗膜后, 采用辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔或鼠的IgG (1:2 000) 室温孵育1 h; 电化学发光 (electrochemical luminescence, ECL) 液显影。采用软件Image J进行图像分析, 以β-肌动蛋白 (β-actin) 为内参, 根据条带灰度值计算蛋白的相对表达量。

1.9 免疫荧光染色检测细胞骨架肌动蛋白微丝结构

转染24 h后的细胞进行涂片, PBS洗涤后, 采用4%多聚甲醛室温固定20 min, 0.5%Triton-X 100室温处理5 min。PBS洗涤10 min×3次, 滴加200 μL预先配制的罗丹明标记的鬼笔环肽工作液, 室温避光孵育30 min。PBS洗涤5 min×3次, 滴加200 μL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 溶液复染细胞核, 室温避光孵育5 min。封片后, 采用共聚焦荧光显微镜进行观察并拍照, 观察细胞骨架肌动蛋白微丝结构。

1.10 统计学分析

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。数据经K-S检验证实符合正态分布, 用均数±标准差表示。多组间的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用t检验。AFAP1-AS1表达与OSCC患者病理特征的相关性采用卡方检验, AFAP1-AS1与患者预后的关系采用Kaplan-Meier生存曲线。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AFAP1-AS1在不同组织及细胞中的表达

AFAP1-AS1在OSCC组织、癌旁正常黏膜组织中的表达分别为3.51±0.61、1.21±0.39, 二者之间有

统计学差异 ($t=23.508, P<0.001$), OSCC组织中的表达高于癌旁正常黏膜组织。

AFAP1-AS1在SCC25、NOK细胞的表达分别为 3.17 ± 0.65 、 1.05 ± 0.32 , 二者之间有统计学差异 ($t=11.130, P<0.001$), SCC25细胞中的表达高于NOK细胞。

2.2 AFAP1-AS1表达与OSCC患者临床病理特征及预后的关系

将55例OSCC患者按照AFAP1-AS1表达的中位值 (3.54) 分为高表达组 (≥ 3.54) 和低表达组 (< 3.54)。

3.54)。统计分析表明, AFAP1-AS1的表达与OSCC患者的年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位无关, 而与分化程度、TNM分期及淋巴结转移密切相关 ($P<0.05$) (表2)。

生存曲线评估结果表明, AFAP1-AS1低表达组、高表达组OSCC患者的总生存率分别为77.8%、60.7%, 二者之间具有统计学差异 ($\chi^2=6.817, P<0.05$) (图1)。AFAP1-AS1高表达患者的生存率低于AFAP1-AS1低表达者。

表 2 OSCC患者AFAP1-AS1的表达与临床病理特征的关系

Tab 2 Correlation between AFAP1-AS1 expression and clinicopathological characteristics of OSCC patients

临床病理特征		n	AFAP1-AS1低表达组	AFAP1-AS1高表达组	χ^2 值	P值
年龄/岁	≤ 60	31	18	13	2.289	0.130
	>60	24	9	15		
性别	男	36	16	20	0.900	0.343
	女	19	11	8		
肿瘤大小/cm	≤ 3	41	22	19	1.345	0.246
	>3	14	5	9		
肿瘤部位	舌	24	14	10	1.582	0.663
	牙龈	15	6	9		
	腭	4	2	2		
	颊黏膜	12	5	7		
分化程度	低分化	44	25	19	5.256	0.022
	中、高分化	11	2	9		
TNM分期	I、II期	35	21	14	4.583	0.032
	III、IV期	20	6	14		
淋巴结转移	无	42	24	18	4.610	0.032
	有	13	3	10		

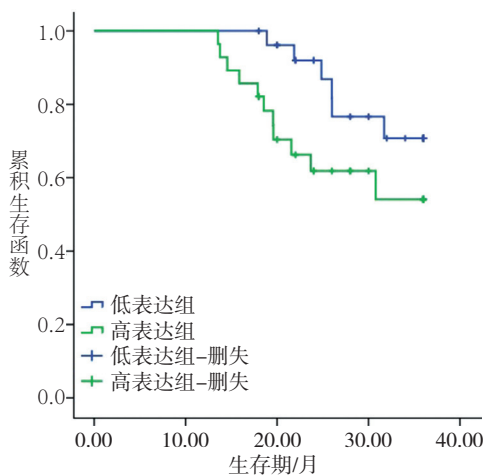


图 1 AFAP1-AS1表达与总生存率的相关性

Fig 1 The correlation between AFAP1-AS1 and overall survival rate

2.3 AFAP1-AS1 siRNA转染对AFAP1-AS1表达的影响

qRT-PCR检测结果表明, si-NC组和空白对照组中

AFAP1-AS1的表达水平无差异, 而AFAP1-AS1 siRNA转染组AFAP1-AS1的表达水平低于空白对照组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 这表明, AFAP1-AS1 siRNA转染后AFAP1-AS1的表达下调。AFAP1-AS1 siRNA转染组中, si-AFAP1-AS1-2组AFAP1-AS1的表达最低, 提示si-AFAP1-AS1-2的干扰效率最佳, 选用si-AFAP1-AS1-2进行后续实验 (表3)。

2.4 AFAP1-AS1 siRNA转染对SCC25细胞增殖的影响

CCK-8实验结果表明: 转染48、72、96 h后, si-AFAP1-AS1组中SCC25细胞的吸光度值低于si-NC组和空白对照组, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$) (图2), 表明si-AFAP1-AS1组SCC25细胞增殖能力降低。

2.5 AFAP1-AS1 siRNA转染对SCC25细胞迁移和侵袭的影响

Transwell检测结果 (图3) 显示, si-AFAP1-AS1

组中细胞迁移和侵袭数量明显低于si-NC组和空白对照组，差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 3 AFAP1-AS1 siRNA转染对AFAP1-AS1表达的影响
Tab 3 Effect of AFAP1-AS1 siRNA transfection on the expression of AFAP1-AS1

组别	AFAP1-AS1的表达量	P值
空白对照组	1	-
si-NC	0.98±0.09	>0.05
si-AFAP1-AS1-1	0.58±0.06	<0.05
si-AFAP1-AS1-2	0.39±0.05	<0.05
si-AFAP1-AS1-3	0.72±0.06	<0.05

注：P值为该组与空白对照组之间的比较。

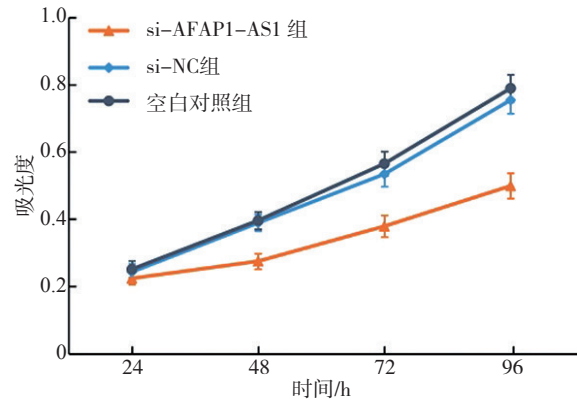
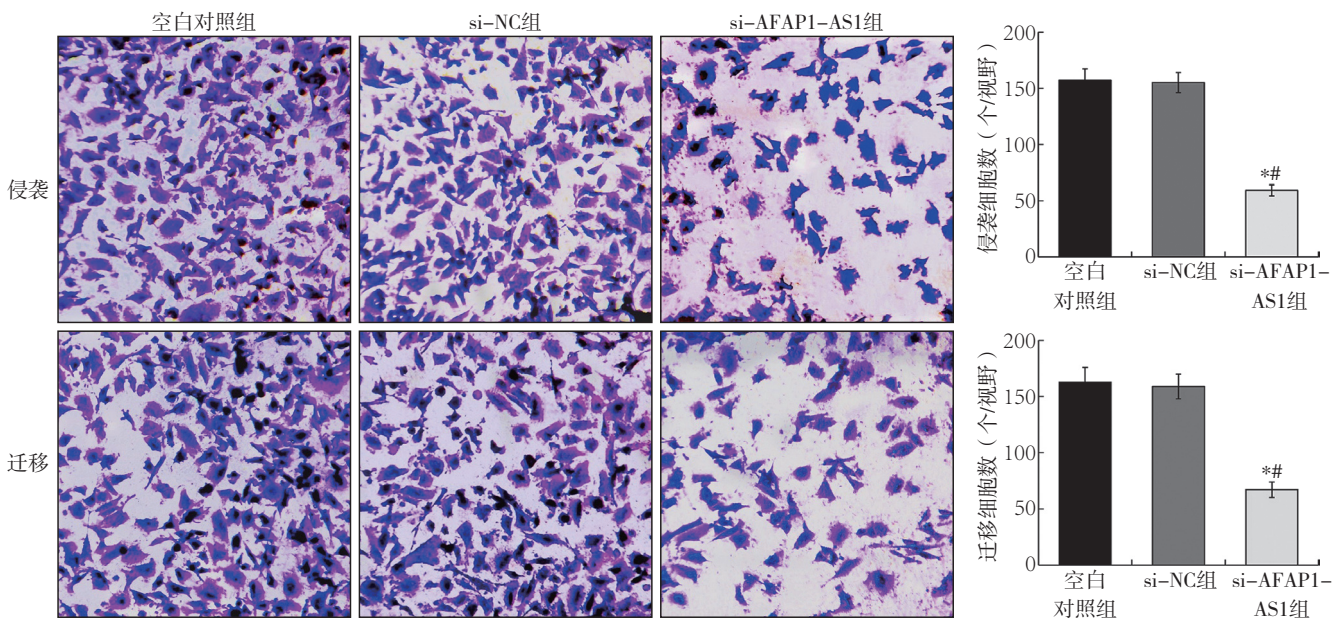


图 2 AFAP1-AS1 siRNA转染对SCC25细胞增殖的影响
Fig 2 Effect of AFAP1-AS1 siRNA transfection on the proliferation activity of SCC25



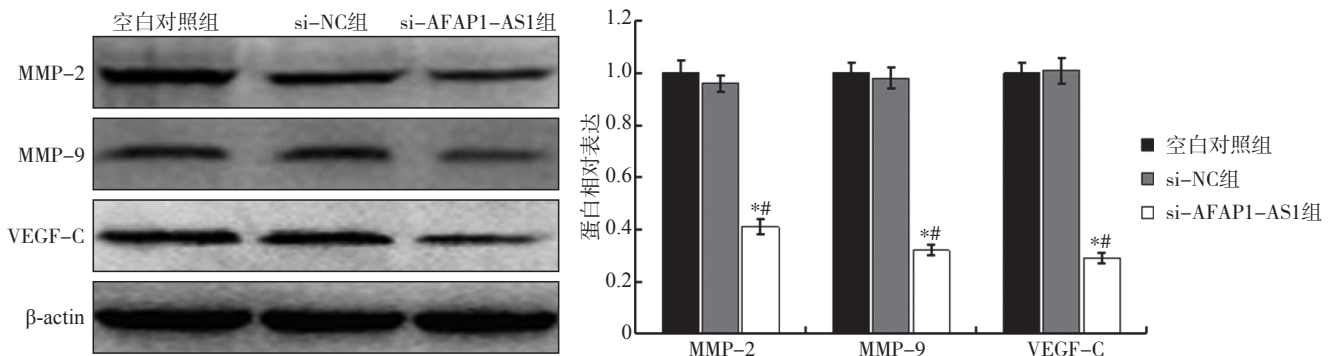
左：倒置显微镜，×200。右：*与空白对照组相比， $P<0.05$ ；#与si-NC组相比， $P<0.05$ 。

图 3 Transwell检测细胞的侵袭和迁移

Fig 3 Invasion and migration of cells detected by Transwell

Western blot检测结果 (图4) 表明，与空白对照组和si-NC组相比，si-AFAP1-AS1组VEGF-C、MMP-2和MMP-9表达水平下调，差异具有统计学意义

($P<0.05$)。表明，si-AFAP1-AS1组SCC25细胞迁移和侵袭能力降低。



*与空白对照组相比， $P<0.05$ ；#与si-NC组相比， $P<0.05$ 。

图 4 Western blot检测侵袭和迁移相关蛋白表达

Fig 4 The expression of invasion and migration related proteins detected by Western blot

2.6 AFAP1-AS1 siRNA转染对Rho GTP酶家族相关蛋白表达的影响

Western blot检测结果表明, si-AFAP1-AS1组AFAP1、RhoA、Rac2、Rab10、RhoGDI和Pfn1的表达上调, RhoC的表达下调, 与si-NC组和空白对照组有统计学差异(图5)。

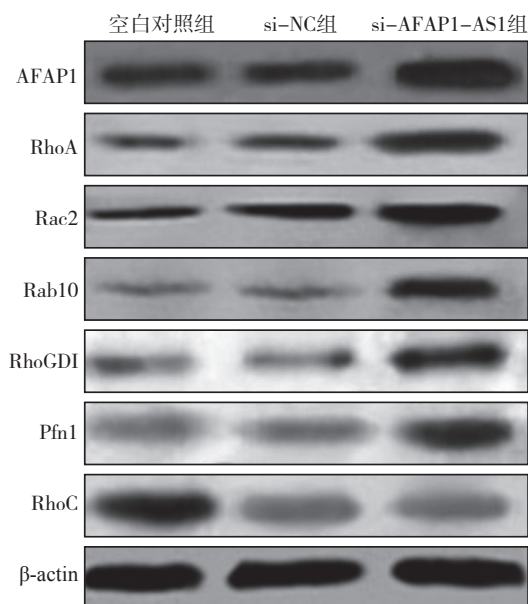


图5 Western blot检测Rho GTP酶家族相关蛋白的表达

Fig 5 The expression of Rho GTPase family related proteins detected by Western blot

2.7 AFAP1-AS1 siRNA转染对细胞骨架应力纤维的影响

免疫荧光染色结果显示, si-NC组和空白对照组细胞骨架中有大量应力纤维丝, 肌动蛋白微丝结构较为完整, 而si-AFAP1-AS1组细胞骨架中应力纤维丝减少, 肌动蛋白完整性丢失(图6)。

3 讨论

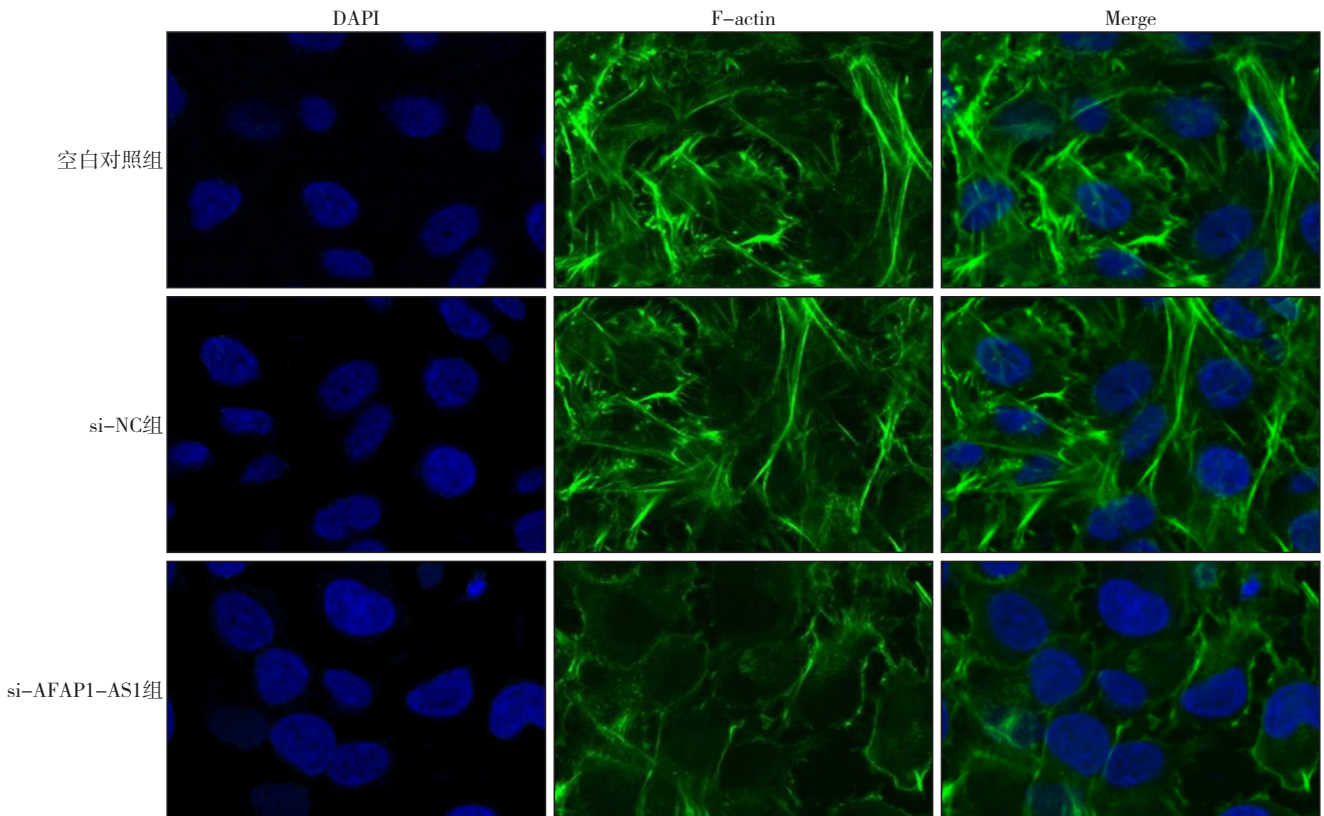
lncRNA的异常表达, 从转录、转录后等多个水平影响肿瘤的发生发展, 同时也影响肿瘤的转移、浸润等, 有望成为肿瘤早期诊断和抗肿瘤治疗的靶标^[9-10]。AFAP1-AS1是首次在Barrett食管和食管腺癌中被发现的lncRNA, 敲除AFAP1-AS1能够抑制食管腺癌细胞的增殖及侵袭能力^[11]。近年来研究^[12-13]发现, AFAP1-AS1在多种癌症中异常高表达, 影响癌细胞的增殖、侵袭和浸润等。Ye等^[14]研究发现, AFAP1-AS1在胰腺导管腺癌中高表达, 敲除AFAP1-AS1后, 胰腺导管腺癌的增殖、侵袭和浸润能力下调。Yin等^[15]研究发现AFAP1在非小细胞肺癌中表达上调, 且其高表达与不良预后有关, 提示AFAP1-AS1可能是预测肺癌进展及预后的生物学标记物,

同时AFAP1-AS1下调能够显著抑制肺癌细胞的增殖和侵袭。周立生等^[16]研究发现AFAP1-AS1在胃癌中高表达, 与胃癌组织的分化程度、淋巴结转移以及TNM分期相关, 同时抑制AFAP1-AS1能够减少胃癌细胞的增殖、侵袭, 促进凋亡。Wang等^[17]研究发现, lncRNA AFAP1-AS1在舌鳞状细胞癌中表达上调, 与其预后密切相关, 沉默AFAP1-AS1能够降低Wnt/ β -actin通路的活性和上皮间充质转化相关基因的表达, 抑制舌鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭。目前关于AFAP1-AS1与OSCC关系及相关机制的研究较少。本研究通过检测AFAP1-AS1在OSCC组织中的表达情况同样发现, AFAP1-AS1在OSCC组织中异常高表达, 与肿瘤的分化程度、临床TNM分期、淋巴结转移密切相关, 同时发现AFAP1-AS1高表达与OSCC患者的不良预后有关, 与其在多种癌症中的研究结果类似^[18-19]。同时本研究也发现, AFAP1-AS1在SCC25细胞株中表达上调, 采用siRNA干扰AFAP1-AS1的表达能抑制SCC25细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 即AFAP1-AS1促进了口腔鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 在口腔鳞状细胞癌中具有癌基因的活性, 与现有研究^[17]结果较为一致。

目前国内外关于AFAP1-AS1致癌作用的分子机制的研究较少。研究^[11]发现AFAP1-AS1在食管腺癌中能够通过调节肌动蛋白纤维结构的完整性促进肿瘤的发生发展。Bo等^[20]研究表明, AFAP1-AS1在鼻咽癌中的表达增高, AFAP1-AS1下调抑制了鼻咽癌细胞的侵袭和转移能力, 且AFAP1-AS1能通过调控肌动蛋白丝的完整性增加鼻咽癌的侵袭能力。Zeng等^[21]研究也证实AFAP1-AS1通过调控肌动蛋白丝的完整性促进肺癌细胞的转移。Zhang等^[22]研究发现AFAP1-AS1能过上调RhoA/Rac2信号通路促进肝细胞肝癌的发展, 可能是肝细胞肝癌潜在的治疗靶点。本研究进一步探究AFAP1-AS1促进口腔鳞状细胞癌细胞的增殖、侵袭的作用机制是否是通过调节肌动蛋白纤维结构的完整性实现的。研究结果发现下调AFAP1-AS1后, AFAP1蛋白表达水平升高, 且Rho GTP酶家族成员RhoA、Rac2、Rab10、RhoGDI和微丝结合蛋白Pfn1的表达水平上调, RhoC的表达水平下调。AFAP1是肌动纤维相关蛋白, 能调节肌动蛋白微丝结构的完整性, 从而影响细胞的运动及肿瘤的侵袭和转移。而Rho GTP酶主要功能是调节肌动蛋白和细胞骨架的充足, 从而调节细胞的形态变化及运动, 与肿瘤的发生、侵袭和转移密切相关^[23]。进一步采用罗丹明标记的鬼笔环肽特异性染色F-actin, 结果发现下调AFAP1-AS1能够抑制细胞骨架肌动蛋白纤维丝的形成, 肌动蛋白微丝的完整性被破坏。

因此推测AFAP1-AS1能够调节AFAP1和Rho GTP酶家族成员蛋白的表达,影响细胞骨架肌动蛋白应力

纤维的形成,调节肌动蛋白微丝完整性,从而影响口腔鳞状细胞癌细胞的侵袭和迁移。



F-actin为纤维肌动蛋白, Merge为合并。

图6 免疫荧光染色观察细胞骨架应力纤维 荧光显微镜 ×400

Fig 6 Immunofluorescence staining to observe the cytoskeleton stress filaments fluorescence microscope ×400

综上所述,AFAP1-AS1在OSCC中高表达,与其分化程度、临床TNM分期、淋巴结转移及不良预后密切相关,能预测OSCC早期发生发展及预后情况;下调AFAP1-AS1能抑制OSCC细胞的增殖、侵袭和迁移能力,其机制可能是通过调节肌动蛋白微丝完整性实现的。同时本研究还存在不足之处:1)病例收集时间较短,病例数量少,随访时间短,后续研究应增加病例数量及随访时间,进行大样本、多中心的研究进一步证实该结论;2)本研究涉及到的多种OSCC类型,可能在生物学行为及预后存在一定差异,在后续关于AFAP1-AS1对OSCC的临床预后及细胞生物学行为的影响,尤其是相关机制的研究,应针对不同亚单位癌进行单一研究,更准确的探讨AFAP1-AS1在不同类型OSCC发生发展及预后中的作用机制。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

[1] 王倩,侯大为. 口腔鳞状细胞癌发病及转移机制研究进展[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(11): 1164-1167.
Wang Q, Hou DW. Research progress in pathogenesis of

oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Sci Res, 2018, 34 (11): 1164-1167.
[2] Keshavarzi M, Darijani M, Momeni F, et al. Molecular imaging and oral cancer diagnosis and therapy[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(10): 3055-3060.
[3] 苏文,王宇帆,王锋,等. 肝细胞癌上调的长链非编码RNA对口腔鳞状细胞癌细胞生物学行为的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2018, 53(11): 760-765.
Su W, Wang YF, Wang F, et al. Effect of long non-coding RNA highly upregulated in liver cancer on the biological behavior of oral squamous cell carcinoma[J]. Chin J Stomatol, 2018, 53(11): 760-765.
[4] 邹忠涛,胡温庭,曹巍,等. 性别决定基因盒9的表达水平与口腔鳞状细胞癌转移相关性的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2018, 53(10): 688-693.
Zou ZT, Hu WT, Cao W, et al. Relationship between expression level of sex-determining region Y box 9 and metastasis of oral squamous cell carcinoma[J]. Chin J Stomatol, 2018, 53(10): 688-693.
[5] Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer[J]. Nat Med, 2015, 21(11): 1253-1261.

- [6] Li Y, Wang X. Role of long noncoding RNAs in malignant disease[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1463-1469.
- [7] Deng J, Liang YJ, Liu CF, et al. The up-regulation of long non-coding RNA AFAP1-AS1 is associated with the poor prognosis of NSCLC patients[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 75: 8-11.
- [8] Zhou XL, Wang WW, Zhu WG, et al. High expression of long non-coding RNA AFAP1-AS1 predicts chemoradioresistance and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma treated with definitive chemoradiotherapy[J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(12): 2095-2105.
- [9] 邵苗苗, 许诺, 刘钟西, 等. LncRNAs在口腔鳞癌中的作用及机制研究进展[J]. *大连医科大学学报*, 2018, 40(4): 358-363.
Shao MM, Xu N, Liu ZX, et al. Function and mechanism of lncRNAs in oral squamous cell carcinomas[J]. *J Dalian Med Univ*, 2018, 40(4): 358-363.
- [10] Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer[J]. *RNA Biol*, 2012, 9(6): 703-719.
- [11] Wu WJ, Bhagat TD, Yang X, et al. Hypomethylation of noncoding DNA regions and overexpression of the long noncoding RNA, AFAP1-AS1, in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(5): 956-966.e4.
- [12] Wang F, Ni HB, Sun F, et al. Overexpression of lncRNA AFAP1-AS1 correlates with poor prognosis and promotes tumorigenesis in colorectal cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81: 152-159.
- [13] Deng J, Liang YJ, Liu CF, et al. The up-regulation of long non-coding RNA AFAP1-AS1 is associated with the poor prognosis of NSCLC patients[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 75: 8-11.
- [14] Ye YB, Chen J, Zhou Y, et al. High expression of AFAP1-AS1 is associated with poor survival and short-term recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 137.
- [15] Yin DD, Lu XY, Su J, et al. Long noncoding RNA AFAP1-AS1 predicts a poor prognosis and regulates non-small cell lung cancer cell proliferation by epigenetically repressing p21 expression[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 1-12.
- [16] 周立生, 邓标, 裘正军, 等. 肌动蛋白纤维相关蛋白1-反义RNA1在胃癌中异常表达的意义及相关功能[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(9): 2206-2209.
Zhou LS, Deng B, Qiu ZJ, et al. The expression and function of actin filament-associated protein 1-antisense RNA 1 in gastric cancer[J]. *Chin J Exp Surg*, 2016, 33(9): 2206-2209.
- [17] Wang ZY, Hu M, Dai MH, et al. Upregulation of the long non-coding RNA AFAP1-AS1 affects the proliferation, invasion and survival of tongue squamous cell carcinoma via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 3.
- [18] 付丛, 张行炜. 长链非编码RNA AFAP1-AS1在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. *口腔医学研究*, 2016, 32(9): 983-986.
Fu C, Zhang XW. Expression of long non-coding RNA AFAP1-AS1 and its clinicopathologic significance in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Sci Res*, 2016, 32(9): 983-986.
- [19] Luo HL, Huang MD, Guo JN, et al. AFAP1-AS1 is upregulated and promotes esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation and inhibits cell apoptosis[J]. *Cancer Med*, 2016, 5(10): 2879-2885.
- [20] Bo H, Gong ZJ, Zhang WL, et al. Upregulated long non-coding RNA AFAP1-AS1 expression is associated with progression and poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(24): 20404-20418.
- [21] Zeng ZY, Bo H, Gong ZJ, et al. AFAP1-AS1, a long non-coding RNA upregulated in lung cancer and promotes invasion and metastasis[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(1): 729-737.
- [22] Zhang JY, Weng MZ, Song FB, et al. Long noncoding RNA AFAP1-AS1 indicates a poor prognosis of hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation and invasion via upregulation of the RhoA/Rac2 signaling[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(4): 1590-1598.
- [23] 李凤茹, 江华. Rho蛋白与恶性肿瘤相关性的研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2014, 34(1): 52-55.
Li FR, Jiang H. Research progress on the correlation between Rho protein and malignant tumor[J]. *Int J Dig Dis*, 2014, 34(1): 52-55.

(本文采编 李彩)