

长链非编码RNA PCGEM1通过转化生长因子 β2/Smad2信号通路调控口腔鳞状细胞癌 侵袭和转移的机制研究

翁旭¹ 李劲松² 范松²

1.汕头市中心医院口腔科, 汕头 515031; 2.中山大学孙逸仙纪念医院口腔科, 广州 510120

[摘要] 目的 探讨长链非编码RNA (lncRNA) PCGEM1通过转化生长因子β2 (TGF β2) /Smad2信号通路调控口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 侵袭和转移的机制。方法 将60例OSCC患者癌组织及距离癌组织超过2 cm处的正常组织纳入研究, 实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测miR-148a、lncRNA PCGEM1在OSCC组织及正常组织、人正常口腔黏膜上皮细胞 (OMEC) 及人源OSCC细胞株KB、BcaCD885、SCC-4、CAL27、SCC-15中的表达情况; 分析lncRNA PCGEM1和miR-148a表达与患者临床病理信息之间的关系。构建lncRNA PCGEM1沉默细胞系KB-siPCGEM1及阴性对照 (KB-NC), 并以KB作为空白对照组, 采用MTT、Transwell和划痕实验检测lncRNA PCGEM1对KB细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响; 使用生物信息学网站starBase预测lncRNA PCGEM1可以互补结合的微小RNA (miRNA), 再根据www.microRNA.org网站预测相应miRNA可靶向结合的基因; 免疫印迹 (Western blotting) 检测TGF β2/Smad2信号通路蛋白表达情况。结果 qRT-PCR结果显示, OSCC组织中lncRNA PCGEM1、miR-148a的表达水平高于正常组织 ($P<0.05$); lncRNA PCGEM1和miR-148a在不同TNM分期、淋巴结转移和组织分化程度的患者癌组织中表达差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与空白对照组和KB-NC组相比, KB-siPCGEM1组细胞OD_{492 nm}值下降, 细胞侵袭数量及迁移率降低, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$); 生物信息学预测结果显示, lncRNA PCGEM1可与miR-148a互补结合, miR-148a与TGFβ2存在靶向结合位点; qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, KB-siPCGEM1组中miR148a、TGFβ2及p-Smad 2的表达明显低于空白对照组与KB-NC组 ($P<0.05$), 空白对照组和KB-NC组的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 lncRNA PCGEM1在OSCC中高表达, 高表达lncRNA PCGEM1可能通过上调miR-148a水平, 强化TGF β2/Smad2信号通路, 从而促进OSCC的进展。

[关键词] 长链非编码RNA PCGEM1; 口腔鳞状细胞癌; 转化生长因子β2/Smad2信号通路

[中图分类号] R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2020.05.014



开放科学 (资源服务)
标识码 (OSID)

Mechanism of long-chain noncoding RNA PCGEM1 in the regulation of the invasion and metastasis of oral squamous carcinoma cells via transforming growth factor β2/Smad2 signaling pathway Weng Xu¹, Li Jinsong², Fan Song². (1. Dept. of Stomatology, Shantou Central Hospital, Shantou 515031, China; 2. Dept. of Stomatology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Correspondence: Li Jinsong, E-mail: syong02@163.com.

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism underlying the regulation of the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) by long-chain noncoding RNA (lncRNA) PCGEM1 through the transforming growth factor (TGF) β2/Smad2 signaling pathways. **Methods** A total of 60 OSCC cases were collected. Cancer tissues and normal tissues more than 2 cm away from cancer tissues were also collected. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-148a and lncRNA PCGEM1 in OSCC, adjacent normal tissues, oral mucosa epithelial cells, KB,

BcaCD885, SCC-4, CAL27, and SCC-15. The relationship between the expression of lncRNA PCGEM1 and miR-148a and the clinicopathological information of patients

[收稿日期] 2019-12-11; **[修回日期]** 2020-06-20

[作者简介] 翁旭, 副主任医师, 硕士, E-mail: wengxu2014@163.com

[通信作者] 李劲松, 教授, 学士, E-mail: syong02@163.com

was analyzed. The lncRNA PCGEM1-silenced cell line KB-siPCGEM1 and negative control (KB-NC) group were constructed, and KB was used as the blank control group. The effects of lncRNA PCGEM1 on the proliferation, invasion, and migration of KB cells were determined via MTT, Transwell, and scratch assays. The bioinformatics website starBase was used to predict the complementary binding microRNA (miRNA) of lncRNA PCGEM1. Furthermore, the genes that the miRNA could target and bind were predicted in accordance with the website www.microRNA.org. Western blotting analysis was used to detect the expression of TGF β 2/Smad2 signaling pathway proteins. **Results** qRT-PCR results showed that the expression level of lncRNA PCGEM1 and miR-148a in OSCC tissues was higher than that in normal tissues ($P<0.05$). The expression of lncRNA PCGEM1 and miR-148a in the cancer tissues of patients with different TNM grades, lymph node metastasis, and tissue differentiation was statistically significant ($P<0.05$). Compared with those in the blank control group and the KB-NC group, OD_{492 nm} value was significantly decreased and cell mobility was significantly reduced in the KB-siPCGEM1 group ($P<0.05$). Bioinformatics predictions showed that lncRNA PCGEM1 could bind to miR-148a in a complementary manner and that miR-148a had a targeted binding site with TGF β 2. qRT-PCR and Western blotting analysis results showed that the expression levels of miR-148a, TGF β 2, and p-Smad2 in the KB-siPCGEM1 group were significantly lower than those in the blank control and KB-NC groups ($P<0.05$), and no statistically significant difference between the blank control group and the KB-NC group was observed ($P>0.05$). **Conclusion** lncRNA PCGEM1 is highly expressed in OSCC. The high expression of lncRNA PCGEM1 may enhance the TGF β 2/Smad2 signaling pathway by upregulating miR-148a, thus promoting the development of OSCC.

[Key words] long-chain noncoding RNA PCGEM1; oral squamous cell carcinomas; transforming growth factor β 2/Smad2 signaling pathway

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是口腔癌的一种高发类型, 发病率约占口腔癌的85%^[1], 具有发病迅速、转移率高等特点^[2], 但发病机制目前尚未完全明确。癌细胞的侵袭、转移是一个复杂过程, 也是导致治疗失败和死亡的主要原因之一, 因此寻找新的治疗靶点尤为迫切。长链非编码RNA (long-chain noncoding RNA, lncRNA) 是一类不编码蛋白的RNA分子, 长度介于200~100 000 nt^[3]。研究^[4]表明, lncRNA在肿瘤细胞周期、侵袭转移及化疗耐药等相关的信号通路方面均发挥调节作用, 其作用类似于癌基因或抑癌基因。lncRNA PCGEM1是一种在前列腺癌细胞中特异性高表达的lncRNA, 可促进前列腺癌细胞的增殖和迁移^[5]。目前关于lncRNA PCGEM1在OSCC中的作用研究报道甚少, 本研究探讨lncRNA PCGEM1对OSCC细胞增殖侵袭及迁移的影响。

1 材料和方法

1.1 组织标本

收集2016年6月—2018年3月于汕头市中心医院接受手术治疗的80例OSCC患者的癌组织及距离癌组织超过2 cm处的正常组织, 用以上组织构建组织芯片免疫组织化学染色, 80例患者的组织标本中有20例出现了不同程度缺失, 剩余60例经组织病理学检测证实为原发性OSCC, 纳入本研究。60例患者年龄36~75岁, 中位年龄53岁。所有患者均同意本

研究并签署知情同意书, 且经汕头市中心医院伦理委员会审核批准后收集标本。

1.2 细胞及主要试剂和仪器

人正常口腔黏膜上皮细胞 (oral mucosa epithelial cell, OMEC) 及人源OSCC细胞株KB、BcaCD885、SCC-4、CAL27、SCC-15均购自美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection, ATCC)。

DMEM培养基、SYBR Green I 实时定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测试剂盒 (TOYOBO公司, 日本), Trizol 试剂盒 (TaKaRa公司, 日本), Transwell小室 (BD公司, 美国), MTT试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), Airtech超净工作台 (江苏苏净集团有限公司), MCO-15AC细胞培养箱 (SANYO公司, 日本), Ti-U/Ti-S倒置荧光显微镜 (Nikon公司, 日本), 5810R型高速离心机 (Eppendorf公司, 美国), R480 qRT-PCR仪 (Roche公司, 瑞士)。siPCGEM1及阴性对照 (negative control, NC, 相对于siPCGEM1的siRNA随机序列) 片段、PCGEM1、miR-148a及U6引物均由上海吉玛制药技术有限公司设计完成。

1.3 qRT-PCR检测lncRNA PCGEM1的表达

依据TRIzol法提取癌组织、正常组织及OMEC、KB、BcaCD885、SCC-4、CAL27、SCC-15细胞株样本的总RNA, 并进行反转录, 按照PrimeScrip反转录试剂盒进行反转录成cDNA, 所有操作严格按照试剂盒要求执行。采用SYBR Premix Ex Taq说明

书配置qRT-PCR反应体系,反应条件为:1)预变性,75℃,120 s;2)变性,90℃,5 min;3)退火,60℃,60 s;4)延伸,72℃,30 s;5)qRT-PCR仪采集荧光信号40个循环。U6作为内参,上游引物为5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3',下游引物为5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';lncRNA PCGEM1的上游引物为5'-GCGGCGGTTAATGCTA-ATTGTG-3',下游引物为5'-ATCCAGTGCAGGG-TCCGAGG-3';miR-148a的上游引物为5'-ATGCA-GTCTCCACAGCAGCAGAG-3',下游引物为5'-CG-AACGGAATGTGCGGAAGTG-3'。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。每个样本独立重复实验3次。

1.4 分析lncRNA PCGEM1和miR-148a的表达与患者临床病理特征间的关系

以lncRNA PCGEM1和miR-148a在OSCC组织中相对表达量中位数作为节点,将患者分为lncRNA PCGEM1高表达组、lncRNA PCGEM1低表达组及miR-148a高表达组、miR-148a低表达组,分析不同表达组间患者临床病理特征(性别、年龄、TNM分期、组织分化、淋巴结转移、肿瘤直径)的差异。

1.5 细胞系构建

调整KB细胞株密度至 1×10^6 个 $\cdot mL^{-1}$,取2 mL接种于6孔板中,培养过夜,采用Lipofectamine 2000将浓度均为 $100 \text{ nmol} \cdot L^{-1}$ 的siPCGEM1和阴性对照转染至细胞,将细胞分为KB-siPCGEM1组及KB-NC组,并以未处理的KB细胞作为空白对照组。

1.6 MTT实验检测细胞增殖

将KB、KB-NC及KB-siPCGEM1按照每孔 1×10^3 个细胞密度铺至96孔板,设24、48、72、96 h 4个时间点,每个时间点设5个复孔,轻轻混匀后,置入37℃培养箱培养。于设定时间点取出96孔板,每孔加MTT溶液20 μL ,37℃避光4 h后弃掉孔内液体,再加二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)各100 μL ,置于37℃摇床上快速振荡15 min,以充分溶解结晶物,最后将96孔板置于酶标仪上检测492 nm处的OD值。

1.7 Transwell实验检测细胞侵袭

实验前12 h更换为无血清培养基,将40 μL 基质胶(matrigel)铺于Transwell小室(规格24孔,孔径8 μm)中,消化细胞并用 $1 \times PBS$ 清洗2遍,将500 μL 完全培养基加入24孔板,细胞计数,取 5×10^5 个细胞重悬,向Transwell小室中加200~250 μL 细胞悬液,保证下层完全培养基与Transwell小室间无气泡。置于培养箱内正常培养24 h,加用甲醇配制、PBS稀释的0.1%结晶紫染液500 μL 进行染色,室温避光15 min, PBS漂洗以后用棉棒擦Transwell小室内部分

倒置晾干,置于倒置显微镜下观察穿过膜的细胞并拍照计数。

1.8 划痕实验检测细胞迁移

将KB、KB-NC及KB-siPCGEM1按 5×10^5 个/孔均匀铺至6孔板,用10 μL 白枪头划线并以尺子辅助,加PBS将细胞碎片冲洗掉,然后加1%血清的培养基,置于显微镜下拍照并做好标记,此时记为0 h,继续于37℃、5%CO₂温箱培养,24 h后在倒置显微镜下观察细胞运动情况并拍照。

1.9 生物信息学预测

用生物信息学网站starBase预测lncRNA PCGEM1可互补结合的微小RNA(microRNA, miRNA),再根据www.microRNA.org网站预测相应miRNA可靶向结合的基因。

1.10 双荧光素酶报告基因检测

通过miRBase数据库获得人的PCGEM1和转化生长因子 $\beta 2$ (transforming growth factor $\beta 2$, TGF $\beta 2$)基因序列,以HNEC细胞基因组DNA为模板,采用qRT-PCR扩增PCGEM1和TGF $\beta 2$ 的3'-非翻译区序列,构建至荧光素酶报告基因载体psi-CHECK中,记为野生型lncRNA PCGEM1-wild和TGF $\beta 2$ -wild,同时构建突变型重组质粒lncRNA PCGEM1-mutant和TGF $\beta 2$ -mutant。将HEK293T细胞按30%左右密度铺于24孔板,将miRNA-148a模拟物(miRNA-148a mimic)以及miRNA-148a模拟物的对照物(mimic control)分别与野生型lncRNA PCGEM1-wild及突变型重组质粒lncRNA PCGEM1-mutant、TGF $\beta 2$ -mutant共转染至HEK293T细胞,以空载质粒作为对照。转染后24 h,根据双荧光素酶测定试剂盒说明书检测荧光素酶活性。

1.11 免疫印迹(Western blotting)检测

将转染48 h的KB细胞,加入适量的RIPA裂解液裂解30 min,12 000 $r \cdot min^{-1}$ 4℃离心10 min,收集上清,用总蛋白提取试剂盒分别提取组织及细胞中总蛋白,BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。制备蛋白样品并进行十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE),然后转至PVDF膜,加含有5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的封闭液室温下封闭2 h。分别加适量用封闭液稀释的TGF $\beta 2$ 、p-Smad2一抗,之后置于4℃冰箱过夜。次日用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBST)将膜冲洗干净,再分别加稀释好的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗,室温孵育2 h, PBST洗膜,增强化学发光法(polymerase chain reaction-enhanced chemilu-

minecence, ECL)对结合的抗体进行观察,暗室曝光拍照,同时以GAPDH作为内参蛋白。

1.12 统计学分析

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析,计数资料采用百分比表示,组间对比采用卡方检验,计量资料以平均值±标准差表示,采用*t*检验进行分析。

2 结果

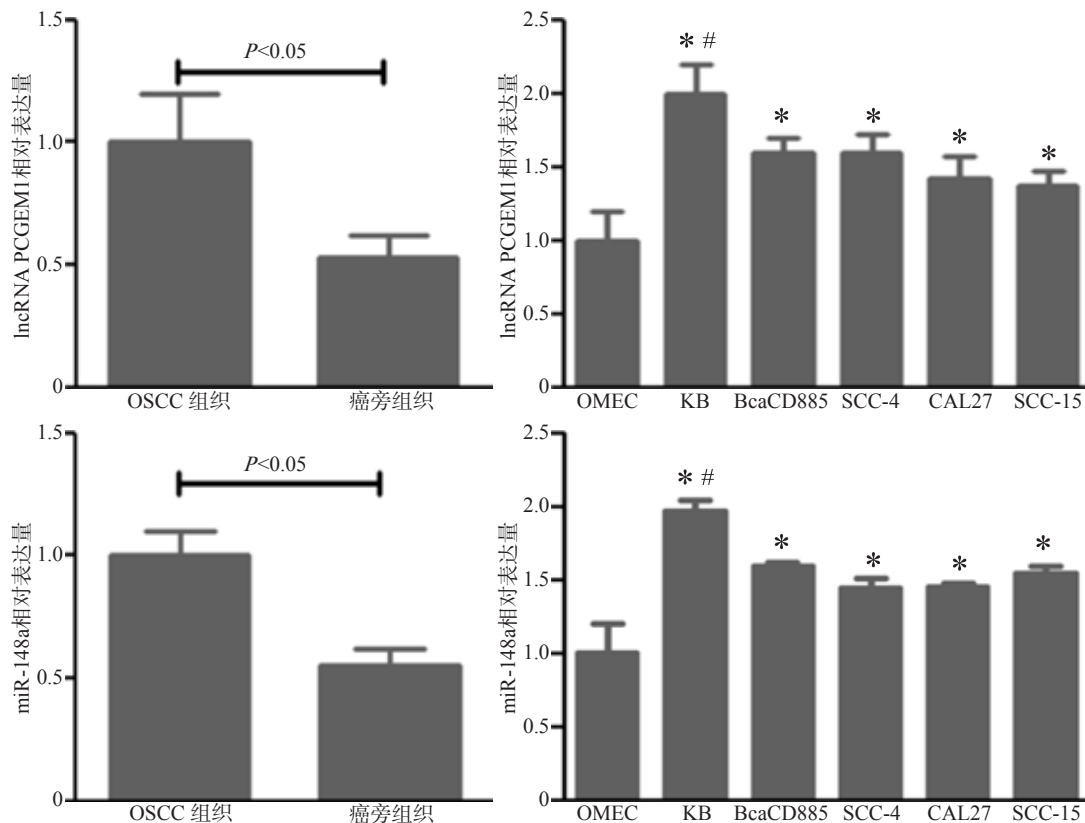
2.1 lncRNA PCGEM1、miR-148a在不同组织及细胞中的表达

qRT-PCR结果显示,1)OSCC组织中miR-148a、lncRNA PCGEM1的表达水平高于正常组织,差异有统计学意义($P<0.05$);2)与OMEK相比,lncRNA PCGEM1、miR-148a在KB、BcaCD885、SCC-4、CAL27、SCC-15中的表达明显升高($P<0.05$),其

中KB的lncRNA PCGEM1和miR-148a表达最高,与其他OSCC细胞相比差异均具有统计学意义($P<0.05$) (图1)。

2.2 lncRNA PCGEM1和miR-148a在OSCC不同临床病理中表达的差异

60例患者lncRNA PCGEM1的相对表达量在0.56~1.43范围内,以中位数0.96为分组界值, <0.96 记为lncRNA PCGEM1低表达(22例), ≥ 0.96 记为lncRNA PCGEM1高表达(38例);miR-148a的相对表达量在0.52~1.22范围内,以中位数为0.86为分组界值, <0.86 记为miR-148a低表达(32例), ≥ 0.86 记为lncRNA PCGEM1高表达(28例)。统计分析表明,lncRNA PCGEM1和miR148a低表达者的性别、年龄和肿瘤直径的比例与高表达者差异无统计学意义($P>0.05$),而TNM分期、淋巴结转移和组织分化程度的比例与高表达者差异有统计学意义($P<0.05$) (表1)。



*与OMEK相比, $P<0.05$; #与其他OSCC细胞相比, $P<0.05$ 。

图1 lncRNA PCGEM1、miR-148a在不同组织及细胞中的表达

Fig 1 Expression of lncRNA PCGEM1 and miR-148a in different tissues and different cell lines

2.3 细胞系构建

qRT-PCR结果显示,与空白对照组和KB-NC组相比,KB-siPCGEM1组中lncRNA PCGEM1的表达降低,差异具有统计学意义($P<0.001$);空白对照组和KB-NC组中lncRNA PCGEM1的表达差异无统计学意义($P>0.05$),提示成功构建lncRNA PCGEM1沉默细胞系(图2)。

2.4 lncRNA PCGEM1对OSCC细胞株KB增殖能力的影响

MTT实验结果显示,与空白对照组和KB-NC组相比,KB-siPCGEM1组 $OD_{492\text{nm}}$ 值明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。说明lncRNA PCGEM1被沉默后,细胞增殖能力显著降低(图3)。

表 1 lncRNA PCGEM1和miR-148a在OSCC不同临床病理中表达的差异

Tab 1 Differences in expression of lncRNA PCGEM1 and miR-148a in different clinicopathologic OSCC

临床病理参数	n	lncRNA PCGEM1		χ^2 值	P值	miR-148a		χ^2 值	P值
		低表达	高表达			低表达	高表达		
性别				1.482	0.224			0.234	0.628
男	32	14 (63.64%)	18 (47.37%)			18 (56.25%)	14 (50.00%)		
女	28	8 (36.36%)	20 (52.63%)			14 (43.75%)	14 (50.00%)		
年龄/岁				0.861	0.353			0.357	0.550
<45	45	15 (68.18%)	30 (78.95%)			25 (78.13%)	20 (71.43%)		
≥45	15	7 (31.82%)	8 (21.05%)			7 (21.88%)	8 (28.57%)		
TNM分期				8.086	0.004			14.464	0.000
I、II	24	14 (63.64%)	10 (26.32%)			20 (62.50%)	4 (14.29%)		
III、IV	36	8 (36.36%)	28 (73.68%)			12 (37.50%)	24 (85.71%)		
组织分化				10.757	0.005			24.501	0.000
高	12	8 (36.36%)	4 (10.53%)			10 (31.25%)	2 (7.14%)		
中	25	11 (50.00%)	14 (36.84%)			19 (59.38%)	6 (21.43%)		
低	23	3 (13.64%)	20 (52.63%)			3 (9.38%)	20 (71.43%)		
淋巴结转移				4.781	0.029			5.249	0.022
是	38	10 (45.45%)	28 (73.68%)			16 (50.00%)	22 (78.57%)		
否	22	12 (54.55%)	10 (26.32%)			16 (50.00%)	6 (21.43%)		
肿瘤直径/cm				0.064	0.801			0.005	0.944
≥2	34	12 (54.55%)	22 (57.89%)			18 (56.25%)	16 (57.14%)		
<2	26	10 (45.45%)	16 (42.11%)			14 (43.75%)	12 (42.86%)		

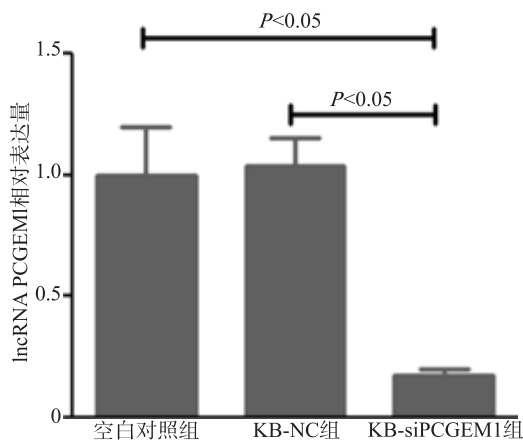
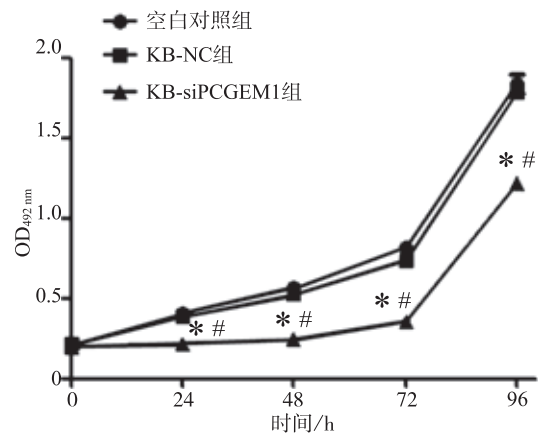


图 2 lncRNA PCGEM1在各组KB中的表达

Fig 2 Expression of lncRNA PCGEM1 in KB of each group

2.5 lncRNA PCGEM1对OSCC细胞株KB侵袭能力的影响

Transwell实验结果显示, 空白对照组、KB-NC组和KB-siPCGEM1组的侵袭细胞数分别为(412±53)、(396±48)、(182±25)个。与空白对照组和KB-NC组相比, KB-siPCGEM1组细胞侵袭数量明显减少, 差异具有统计学意义(P<0.05)。该结果表明沉默lncRNA ANCR后, 细胞侵袭能力明显降低(图4)。



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

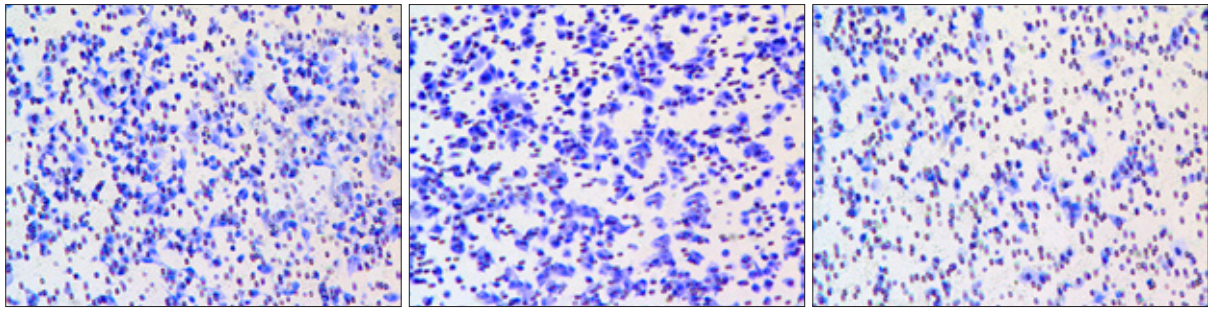
图 3 lncRNA PCGEM1对OSCC细胞株KB增殖能力的影响

Fig 3 Effect of lncRNA PCGEM1 on KB proliferation of OSCC cell line

2.6 lncRNA PCGEM1对OSCC细胞株KB迁移能力的影响

划痕实验的结果显示, 空白对照组、KB-NC组和KB-siPCGEM1组的细胞迁移率分别为78.21%±3.43%、80.23%±3.09%、43.64%±2.51%。与空白对照组和KB-NC组相比, KB-siPCGEM1组细胞迁移率下降, 差异具有统计学意义(P<0.05), 说明沉默

lncRNA PCGEM1后, 细胞迁移能力下降(图5)。



从左到右依次为空白对照组、KB-NC组和KB-siPCGEM1组。

图4 lncRNA PCGEM1对OSCC细胞株KB侵袭能力的影响 倒置显微镜 ×200

Fig 4 Effect of lncRNA PCGEM1 on KB invasion ability of OSCC cell line inverted microscope ×200

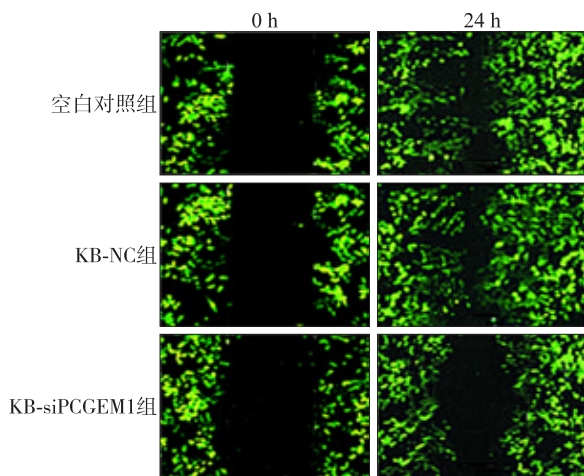
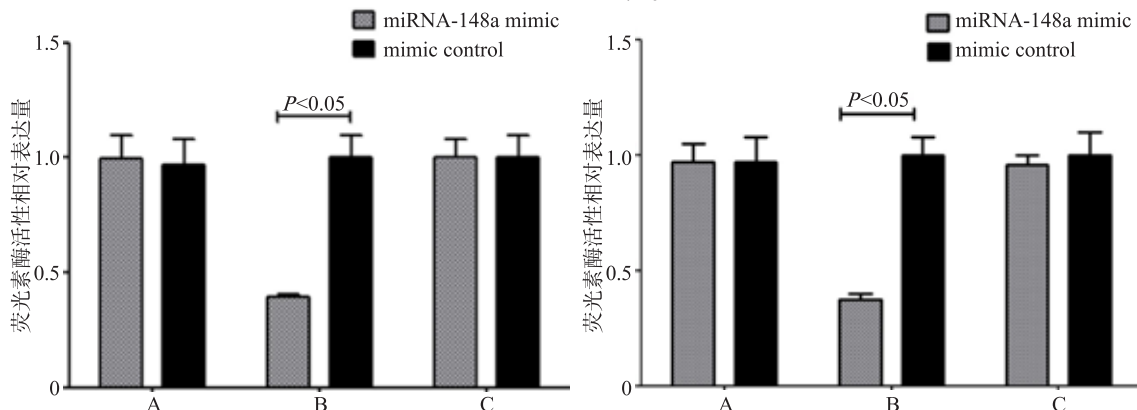


图5 lncRNA PCGEM1对OSCC细胞株KB迁移能力的影响 倒置显微镜 ×200

Fig 5 Effect of lncRNA PCGEM1 on KB migration of OSCC cell line inverted microscope ×200



左: lncRNA PCGEM1与miR-148a双荧光素酶报告基因检测, A为对照组, B为lncRNA PCGEM1-wild组, C为lncRNA PCGEM1-mutant组; 右: TGF β2与miR-148a双荧光素酶报告基因检测, A为对照组, B为TGF β2-wild组, C为TGF β2-mutant组。

图6 双荧光素酶报告基因检测

Fig 6 Double luciferase reporter gene detection

3 讨论

OSCC是口腔恶性肿瘤中最为常见的类型, 研

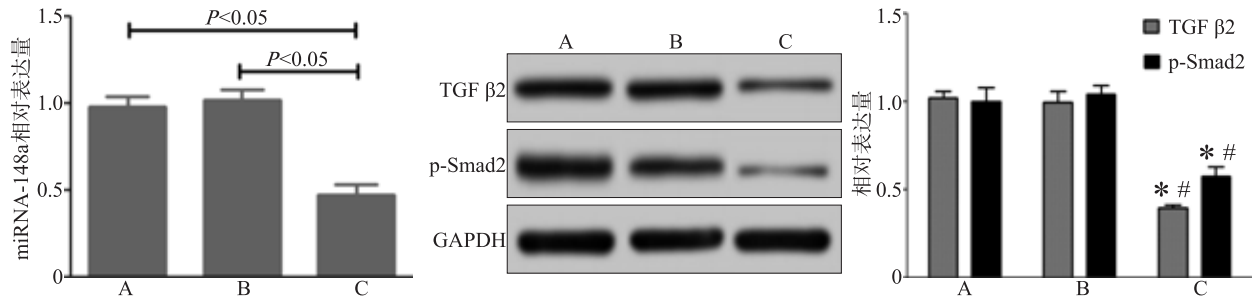
2.7 生物信息学预测和双荧光素酶报告基因检测

starBase网站预测结果显示, lncRNA PCGEM1可与miR-148a互补结合, 再经www.microRNA.org网站预测分析显示, miR-148a与TGF β2存在靶向结合位点。双荧光素酶报告基因结果显示, 转染miR-148a mimic后, lnc RNA PCGEM1-wild和TGFβ2-wild的荧光素酶活性被抑制 ($P < 0.05$), 而lnc RNA PCGEM1-mutant和TGFβ2-mutant的荧光素酶活性无明显变化 ($P > 0.05$), 说明miR-148a与lncRNA PCGEM1和TGF β2具有靶向调控关系(图6)。

2.8 lncRNA PCGEM1与TGF β2/Smad2的关系

qRT-PCR和Western blotting检测结果显示, KB-siPCGEM1组中miR148a、TGF β2及p-Smad2的表达均低于空白对照组和KB-NC组 ($P < 0.05$), 空白对照组和KB-NC组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图7)。

究^[6]表明, 有多个癌基因及抑癌基因参与了OSCC的发生发展, 从分子生物学角度出发寻找其进展和转移的标志物, 对于临床上治疗方法的选择和患者预后的判断有着重要的意义。



左: miR-148a在KB细胞中的相对表达; 中: Western blotting检测TGF beta2和p-Smad2在KB细胞中的表达; 右: TGF beta2和p-Smad2在KB细胞中的相对表达, *与空白对照组相比, $P<0.05$; #与KB-NC组相比, $P<0.05$ 。A、B、C分别为空白对照组、KB-NC组、KB-siPCGEM1组。

图 7 lncRNA PCGEM1与TGF beta2/Smad2的关系

Fig 7 Relationship between lncRNA PCGEM1 and TGF beta2/Smad2

目前关于lncRNA在肿瘤中的作用仅有一小部分被透彻研究,有些lncRNA在肿瘤中的表达异常,功能类似于癌基因或抑癌基因,可以通过参与调控细胞周期影响癌症的发生发展^[7]。目前,尚无标志性lncRNA可直接预测OSCC,但lncRNA PCGEM1在前列腺癌中特异性表达已被证实,该基因位于染色体2q32位点上^[8]。Zhang等^[9]采用qRT-PCR检测发现lncRNA PCGEM1在胃癌组织中的表达高于癌旁组织。Chen等^[10]研究表明,在胰腺癌患者癌组织、血清及胰腺癌细胞分化过程中,lncRNA PCGEM1的表达量异常升高,而被沉默后,胰腺癌细胞的增殖能力减弱,并且增殖相关的基因表达量下降^[11],由此推测lncRNA PCGEM1对胰腺癌细胞的增殖起到促进作用。本研究采用qRT-PCR检测lncRNA PCGEM1在OSCC组织和癌旁组织中的表达,发现其在OSCC组织中的表达水平明显高于癌旁组织,分析lncRNA PCGEM1表达与OSCC患者的临床病理参数之间的关系发现,lncRNA PCGEM1的表达在不同TNM分期、组织分化及淋巴结转移上存在明显差异($P<0.05$)。此外,本研究构建了lncRNA PCGEM1沉默细胞系,探讨lncRNA PCGEM1在OSCC中的作用,结果显示lncRNA PCGEM1下调后,OSCC癌细胞KB的增殖、侵袭和迁移能力明显下降,说明lncRNA PCGEM1在OSCC的发生发展中可能起着重要作用。

研究^[12]表明,miRNA是通过碱基不完全互补的方式与靶基因结合,从而影响肿瘤细胞的凋亡、侵袭及迁移,并引发周围细胞的坏死与凋亡。同时,miRNA也是lncRNA发挥作用的重要环节。本研究通过starBase数据库预测lncRNA PCGEM1可与miR-148a互补结合。Li等^[13]研究发现,miR-148a在食管癌组织中的表达低于正常癌旁组织,上调miR-148a表达可促进食管癌细胞的增殖和迁移,miR-148a作为癌基因对食管癌的进展具有促进作用。本研究结果显示,miR-148a的表达在不同TNM分期、组织分

化及淋巴结转移上存在明显差异($P<0.05$)。本研究中,OSCC组织miR-148a的表达明显高于正常组织,KB细胞lncRNA PCGEM1沉默后,miR-148a表达下调。提示lncRNA PCGEM1促进OSCC细胞株KB的增殖作用可能与上调miR-148a有关。研究^[14]表明,TGF beta2也是miR-148a下游的作用靶点之一,miR-148a可与TGF beta2的3'非翻译区(3' untranslated regions, 3'UTR)互补结合,启动转录后调控机制,调控TGF beta2下游信号通路。www.microRNA.org网站预测分析显示,miR-148a可互补结合TGF beta2。本研究通过荧光素酶基因报告分析也证实二者存在调控关系。TGF beta2/Smad2信号通路在肿瘤的发生发展中扮演了重要角色,该通路通过磷酸化转录因子Smad蛋白实现细胞内通路信号的传导^[15]。Smad蛋白包括Smad1~Smad9,其中当Smad2磷酸化水平受到抑制时,TGF beta2/Smad2信号通路的生物学功能发生转变,对肿瘤细胞增殖和侵袭起到抑制作用^[16]。Yu等^[17]研究也发现,下调lncRNA PCGEM1表达后,TGF beta2蛋白表达水平降低,结直肠癌的侵袭及迁移受到抑制。本研究中,KB-siPCGEM1组miR-148a表达下调后,TGF beta2、p-Smad2蛋白的表达量降低。因此推断,lncRNA PCGEM1可能通过调节TGF beta2/smad2信号通路影响癌症的进展。

综上,lncRNA PCGEM1在OSCC中高表达,高表达lncRNA PCGEM1可能通过上调miR-148a水平,强化TGF beta2/Smad2信号通路,从而促进OSCC的进展。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

[1] 粟芑芑,叶健斌,邱晓媚,等.人DLL1真核表达质粒的构建及过表达DLL1抑制人口腔鳞癌细胞SCC15的增殖[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2017,38(3): 185-191.

- Su PP, Ye JB, Qiu XM, et al. Construction of eukaryotic expression vector of human Delta-like 1 and the overexpression of DLL1 inhibites proliferation of human oral squamous cell carcinoma SCC15 cells[J]. J Jinan Univ (Nat Sci Med Edit), 2017, 38(3): 185-191.
- [2] Yamashita K, Iwatake M, Okamoto K, et al. Cathepsin K modulates invasion, migration and adhesion of oral squamous cell carcinomas *in vitro*[J]. Oral Dis, 2017, 23(4): 518-525.
- [3] Fox MD, Xiao L, Zhang M, et al. Plasmacytoid urothelial carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 49 cases[J]. Am J Clin Pathol, 2017, 147(5): 500-506.
- [4] 张小路, 杜梅红. lncRNA MALAT1调控miR-204表达影响胰腺癌细胞的生物学行为[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(1): 79-84.
Zhang XL, Du MH. Long chain non-coding MALAT1 affects biological behavior of pancreatic cancer cells by regulating miR-204 expression[J]. Chin J Cancer Biother, 2018, 25(1): 79-84.
- [5] Xue Y, Wang M, Kang M, et al. Association between lncrna PCGEM1 polymorphisms and prostate cancer risk[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2013, 16(2): 139-144.
- [6] 施文斌, 甄超, 王旭, 等. 口腔鳞癌中PTEN、Bcl-2和CyclinD1蛋白表达及其相关性研究[J]. 现代口腔医学杂志, 2017, 31(4): 210-213.
Shi WB, Zhen C, Wang X, et al. Correlation among expression of PTEN, Bcl-2, CyclinD1 protein of oral squamous cell cancer[J]. J Modern Stomatol, 2017, 31(4): 210-213.
- [7] Wang W, Dong J, Wang MX, et al. MiR-148a-3p suppresses epithelial ovarian cancer progression primarily by targeting c-Met[J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 6131-6136.
- [8] Kim CR, Kim YM, Lee MK, et al. Pyropia yezoensis peptide promotes collagen synthesis by activating the TGF- β /Smad signaling pathway in the human dermal fibroblast cell line Hs27[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(1): 31-38.
- [9] Zhang J, Jin HY, Wu Y, et al. Hypoxia-induced lncRNA PCGEM1 promotes invasion and metastasis of gastric cancer through regulating SNAI1[J]. Clin Transl Oncol, 2019, 21(9): 1142-1151.
- [10] Chen S, Wang LL, Sun KX, et al. lncRNA PCGEM1 induces ovarian carcinoma tumorigenesis and progression through RhoA pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(4): 1578-1588.
- [11] 车明文, 龚翔, 张小金, 等. lncRNA-ATB在高糖诱导的人腹膜间皮细胞表型转换及增殖中的作用[J]. 解放军医学杂志, 2017, 42(11): 985-991.
Che MW, Gong X, Zhang XJ, et al. Effects of lncRNA-ATB on human peritoneal mesothelial cells phenotypic transition and proliferation induced by high glucose[J]. Med J Chin PLA, 2017, 42(11): 985-991.
- [12] Kou B, Liu W, Tang XS, et al. HMGA2 facilitates epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma by regulating the TGF- β /Smad2 signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2018, 39(1): 101-108.
- [13] Li BW, Wang WZ, Li Z, et al. MicroRNA-148a-3p enhances cisplatin cytotoxicity in gastric cancer through mitochondrial fission induction and cyto-protective autophagy suppression [J]. Cancer Lett, 2017, 410: 212-227.
- [14] Jiang F, Mu J, Wang XX, et al. The repressive effect of miR-148a on TGF beta-SMADs signal pathway is involved in the glabridin-induced inhibition of the cancer stem cells-like properties in hepatocellular carcinoma cells[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96698.
- [15] Deng GQ, Chen L, Zhang YQ, et al. Fucosyltransferase 2 induced epithelial-mesenchymal transition via TGF- β /Smad signaling pathway in lung adenocarcinoma[J]. Exp Cell Res, 2018, 370(2): 613-622.
- [16] 孙雪, 梅峰. TGF- β /Smad信号通路诱导肾上皮细胞间充质转化机制的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(30): 108-110.
Sun X, Mei F. Research progress of TGF- β /Smad signaling pathway in inducing mesenchymal transformation in renal epithelial cells[J]. Shandong Med J, 2017, 57(30): 108-110.
- [17] Yu CP, Liu ZW, Chen QH, et al. Nkx2.8 inhibits epithelial-mesenchymal transition in bladder urothelial carcinoma via transcriptional repression of Twist1[J]. Cancer Res, 2018, 78(5): 1241-1252.

(本文编辑 李彩)