

c-Myc 通过 lnc-TBL1XR1-5 影响口腔鳞状细胞癌的发生发展

符妙婷^{1,2}, 朱友明^{1,2}⁽¹安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032;²口腔疾病研究安徽省重点实验室,合肥 230032)

摘要 目的 研究 c-Myc 调节的长链非编码 RNATBL1XR1-5 (lnc-TBL1XR1-5) 对口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 进展的影响。**方法**

根据 c-Myc 的表达对 TCGA 数据库中头颈鳞癌 (HNSCC) 样本进行生物信息学分析,筛选出 c-Myc 表达密切相关的 lnc-TBL1XR1-5。定量实时聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测 c-Myc 和 lnc-TBL1XR1-5 在 OSCC 癌组织和癌旁组织中的表达关系,分析其在 HOK、HN6、CAL27 细胞系中表达差异, c-Myc 过表达和敲低对 lnc-TBL1XR1-5 的影响。双荧光素酶报告基因测定用于验证 c-Myc 与 lnc-TBL1XR1-5 启动子区的结合。RNA 荧光原位杂交 (RNA FISH) 用于确定 lnc-TBL1XR1-5 在 OSCC 细胞系中的定位。通过 qRT-PCR、细胞计数、CCK-8、集落形成等实验观察 lnc-TBL1XR1-5 的过表达或敲低对 OSCC 细胞增殖的影响,并通过划痕实验、Transwell 等实验观察 lnc-TBL1XR1-5 的过表达或敲低对 OSCC 细胞迁移的影响,最后通过观察培养基颜色和 pH 变化观察 lnc-TBL1XR1-5 的过表达或敲低对 OSCC 细胞代谢的影响。**结果** 发现 c-Myc 对 lnc-TBL1XR1-5 在 OSCC 细胞系和组织中的表达具有正调控作用。通过双荧光素酶报告基因测定验证了 c-Myc 与 lnc-TBL1XR1-5 启动子区的结合。RNA FISH 显示 lnc-TBL1XR1-5 定位于 OSCC 细胞的细胞核。lnc-TBL1XR1-5 的过表达促进了 OSCC 细胞系的迁移、代谢和增殖,而敲低则具有相反的作用。**结论** c-Myc 在 OSCC 中正向调节 lnc-TBL1XR1-5, lnc-TBL1XR1-5 促进 OSCC 的迁移、增殖和代谢。

关键词 长链非编码 RNA; c-Myc; 口腔鳞状细胞癌; lnc-TBL1XR1-5; 细胞增殖; 细胞迁移

中图分类号 R 739.86

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1564-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.011

头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 是世界上第六大常见癌症,其五年生存率仅为 25% ~ 60%^[1]。口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是其主要分类之一,且 OSCC 发病率明显增加^[2]。随着长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 的研究热潮,发现 lncRNA 可调控细胞的多种生理和病理过程^[3]。对 lncRNAs 的大量分析表明,其在大量人类癌症中异常表达^[4-5]。c-Myc 属 MYC 原癌基因家族,可以作为转录因子参与基因转录,对细胞增殖、分化等多种基因的表达有直接调控作用^[6-8]。研究表明, c-Myc 在各种癌症的发展中承担重要的角色。如 c-Myc 通过影响肿瘤微环境促进非小细胞肺癌生长等^[9]。而 c-Myc 通过 lncRNA 影响 OSCC 的报道相对较少。本课题组根据 c-Myc 的表达对 TCGA 数

据库中 HNSCC 样本进行分析,筛选出密切相关 lncRNA。本研究涉及的 lnc-TBL1XR1-5 (ENSG00000236385) 受 c-Myc 正向调节,目前 lnc-TBL1XR1-5 在 OSCC 中的报道较少,因此,该研究探讨 c-Myc 调节 lnc-TBL1XR1-5 对 OSCC 进展的作用,挖掘其作为癌症治疗新靶点的潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 患者组织样本 实验所用的 5 对组织样本来源于安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科手术中切除的 OSCC 组织和癌旁组织,患者未做过放疗或化疗,已通过病理证实。手术切除的组织存放于冻存管内,立即放置在液氮罐中冻存。以上组织样本是在患者知情同意的情况下进行的收集,该研究获得安徽医科大学附属口腔医院伦理委员会批准 (No. 2022001),符合相关伦理法规。

1.1.2 主要材料 人胚肾细胞 (293T)、人舌鳞癌细胞系 (HN6)、人舌鳞癌细胞系 (CAL27)、人口腔角质细胞 (HOK)、慢病毒包装质粒 pGag、pRev、pVs-vg、过表达质粒 c-Myc (c-Myc-OE) 和 sh-c-Myc、pGL3-basic 质粒,以及 renilla 质粒均由安徽省口腔

2024-08-20 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:31970677);安徽省自然科学基金 (编号:2308085Y23)

作者简介:符妙婷,女,硕士研究生;

朱友明,男,副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: 95640021@qq.com

疾病研究重点实验室提供。过表达质粒 pcdh-lnc-OE (lnc-TBL1XR1-5 over-expression)、sh-lnc-1 (TBL1XR1-5 knock down) 由安徽通用生物股份有限公司合成。sh-lnc-2 (TBL1XR1-5 knock down)、WT (pGL3-lnc-TBL1XR1-5 野生型) 质粒和 Mut (pGL3-lnc-TBL1XR1-5 突变型) 质粒由吉满生物科技(上海)有限公司合成;DMEM 高糖培养基(维森特生物技术有限公司),胎牛血清(Lonsera 生物技术有限公司),0.25%胰酶(新赛美生物技术有限公司)和青霉素/链霉素(上海碧云天生物技术有限公司),转染试剂 lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司),qRT-PCR 相关试剂(AG 生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 DMEM 高糖培养液培养 293T、HN6、CAL27 细胞,置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养,每天更换新鲜培养基,当细胞汇合度达到 80% 时传代,使用 0.25% 胰蛋白酶进行消化。

1.2.2 生物信息学分析 从 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 下载并整理 TCGA-HNSC(头颈鳞状细胞癌)数据集的 RNAseq 数据并提取 Count 格式的数据进行分析,去除信息不完整样本,共得到 504 例样本进行分析,根据 c-Myc 表达中位数将所有样本分为 252 例高 c-Myc 表达样本和 252 例低 c-Myc 表达样本,使用 DESeq2 包进行差异分析,以低 c-Myc 表达组为对照组,得到差异基因列表(表 1)。

表 1 基因 lnc-TBL1XR1-5 相关参数

Tab. 1 Relevant parameters of gene lnc-TBL1XR1-5

Genetic parameters	Detection result
id	ENSG00000236385.1
baseMean	0.78806654
log2 FoldChange	3.12533891
lfcSE	0.19181462
stat	16.2935387
pvalue	1.10E-59
padj	4.25E-55
gene_name	AC026355.3
gene_type	lncRNA

1.2.3 sh-lnc-TBL1XR1-5-1 质粒的构建 从 ensembl 数据库中查找 lnc-TBL1XR1-5 序列,使用 DSIR 提供的 shRNA 设计网页设计 shRNA oligos,见表 2 引物设计,并由上海生工生物公司合成;将载体 pLKO.1-puro 用 EcoR I 和 Age I 进行双酶切,37 °C

水浴中酶切 2 h,回收酶切产物。1% 琼脂糖凝胶电泳,由 T4 连接酶将回收的酶切产物和基因片段连接。将上述连接产物转入感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂于 LB(含 Amp 抗性)平板上,37 °C 倒置培养过夜。第 2 天挑取菌落,筛选阳性克隆,送公司测序鉴定,成功构建 sh-lnc-1。

表 2 敲低引物序列

Tab. 2 Knockdown primer sequences

Gene name	Sequence(5'-3')
sh-lnc-1	F: CCGGGCTACTTAACCCAGATTAACCTCGAGTTAATC-TGGGTTAAGTAGCTTTTTG R: AATTCAAAAAGCTACTTAACCCAGATTAACCTCGAG-TTAATCTGGGTTAAGTAGC
sh-lnc-2	F: CCGCTCAGTGTCAAGAGCATCATACTCGAGTATGA-TGCTCTTGACACTGTTTTTTG R: AATTCAAAAACAGTGTCAAGAGCATCATACTCGA-GTATGATGCTCTTGACACTGA

1.2.4 慢病毒包装和转染 CAL27 细胞 目的质粒和慢病毒包装质粒 pGag、pRev、pVsvg 的比例为 2 : 2 : 2 : 1,共转染 293T 细胞,使用不含血清的 DMEM 培养 8 h 后更换为 10% 胎牛血清的正常培养基。36 h 后收集病毒上清液,0.45 μ m PVDF 滤器过滤并滴入汇合度达 60% ~ 70% CAL27 细胞中,同时加入 polybrene 并使其终浓度为 7.13×10^{-6} mol/L,37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 48 h,加入嘌呤霉素(终浓度为 9.54×10^{-6} mol/L)筛选,直至空白对照组细胞全部死亡。

1.2.5 qRT-PCR 检测 lnc-TBL1XR1-5 的表达水平 提取转染 48 h 后的 OSCC 细胞(转染 sh-c-Myc、c-Myc-OE、lnc-OE、sh-lnc-1、sh-lnc-2 及其各对照组)的总 RNA。取 500 ng RNA 逆转录合成 cDNA 模板后稀释 10 倍。将含有待扩增序列的 cDNA 模板进行 PCR 反应,总体积 20 μ l 包括:上游引物 0.4 μ l,下游引物 0.4 μ l,SYBR GREEN 10 μ l,ROX 0.4 μ l,cDNA 2 μ l,DEPC 水 6.8 μ l。在 PCR 扩增仪上完成 PCR 扩增,扩增反应程序为:95 °C,2 min;95 °C,5 s;60 °C,15 s;72 °C,20 s;重复 40 个循环。反应结束后读取各组结果,以 β -actin 作为分子内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析比较各组 lnc-TBL1XR1-5 的表达。引物序列见表 3。根据得到的 CT 值,用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 算法来计算目的基因的表达情况。

1.2.6 双荧光素酶报告系统检测启动子活性 将 293T 细胞传到 12 孔板中,使转染时密度在 70% 左右,用 Lipofectamine 2000 转染 pGL3 重组质粒/

表3 引物序列
Tab.3 Primer sequences

Gene name	Sequence(5'-3')
lnc-TBL1XR1-5	F: GTGACTTGCTCCTCCTTGCCCTTC R: TCGCTTCACCTCAGTACCTTCCTC
β -actin	F: CTCCATCCTGGCCTCGCTGT R: GCTGTACCTTCACCGTTCC
c-Myc	F: AGGAGCAGCAGAGAAAGGGAGAG R: AGAGAGCCGCATGAATTAACCTACGC

pGL3-basic 与 Renilla 质粒和 c-Myc-OE 质粒/空载, 12 孔板中每孔转染 20 ng 的 Renilla 质粒、600 ng 的 pGL3 重组质粒/pGL3-basic 和 600 ng 的 c-Myc-OE 质粒/空载。转染后 48 h 加入 200 μ l 1 \times 细胞裂解液, 冰上充分裂解 5 min。吸取细胞裂解液至新的 EP 管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 收集上清液备用。取干净的白底 96 孔板于 enspire 多功能酶标仪中检测本底荧光值, 记作 L0。吸取 40 μ l Luciferase Substrate 到 96 孔板内, 小心的吸取 40 μ l 细胞裂解液上清液, 吹打混匀 5 次后立即放入荧光检测仪中检测。该值是萤火虫荧光素酶的荧光值, 记作 L1。继续向管中加入 40 μ l Renilla Substrate 工作液, 迅速吹打混匀 5 次放入荧光检测仪中检测。该值为海参荧光素酶的荧光值, 记作 R1。整理得到的荧光值用 L1-L0/R1-L0 计算出每管样品的数值, 绘制柱状图。

1.2.7 荧光原位杂交实验检测 lnc-TBL1XR1-5 在细胞内的定位 将准备好的细胞置于 4% 的多聚甲醛, 室温下固定 15 min。根据试剂盒说明配制好所需溶液(Buffer A、Buffer C、Buffer E、Buffer F)。弃去固定液, 每孔加入 200 μ l 0.1% Buffer A, 室温静置 15 min; PBS 润洗细胞 2 次, 向孔中加入 200 μ l 2 \times Buffer C, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min; 继续加入 200 μ l 变性处理后的探针混合液, 避光孵育至杂交过夜。次日依次向每孔加入 200 μ l 42 $^{\circ}$ C 预热的 Buffer F, Buffer C 浸洗 5 min, 避光条件下 DAPI 染核 2 min。滴加 10 μ l 抗淬灭剂, 于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.8 细胞计数实验 将转染 sh-lnc-1、sh-lnc-2、lnc-OE 及其对照组后的 CAL27 细胞按 1 \times 10⁵ 个/孔铺至 6 孔板, 每组设置 3 个复孔。37 $^{\circ}$ C 分别培养 24、48、72 h 后收集细胞并计数, 绘制生长曲线。

1.2.9 CCK-8 法检测 CAL27 细胞生长 收取转染了 sh-lnc-1、sh-lnc-2、lnc-OE 及其对照组的 CAL27 细胞, 按照 1 \times 10⁴ 个/孔接种于 48 孔板, 设置 3 个平行复孔。待细胞贴壁, 37 $^{\circ}$ C 分别培养 24、48、72 h; 加入 10% CCK-8 溶液, 继续避光孵育 4 h, 在酶标

仪 450 nm 处测量各孔的吸光度(absorbance, A)。

1.2.10 细胞划痕实验 收取转染了 sh-lnc-1、sh-lnc-2、lnc-OE 及其对照组的 CAL27 细胞, 按照 1 \times 10⁶ 个/孔接种于 6 孔板, 每组设置 3 个复孔。待细胞贴壁后用 20 μ l 黄枪头划线后培养过夜。24 h 后在显微镜下观察拍照, 分析对比细胞划痕变化。

1.2.11 Transwell 实验 生长状态良好的细胞消化离心重悬, 以无血清培养基将细胞稀释至 4 \times 10⁵ 个/ml。Transwell 小室下室加 600 μ l 含 20% 血清的培养基, 上室加 200 μ l 细胞悬液, 37 $^{\circ}$ C 孵 24 h。取出小室, PBS 洗 2 次, 加 4% 多聚甲醛固定 15 min。加 0.1% 结晶紫溶液, 室温染色 20 min。PBS 轻柔漂洗后, 用棉签轻轻擦除上室表面细胞, 室温干燥, 至观察颜色适宜, 在倒置显微镜下观察结果并拍照。

1.2.12 集落形成实验 取 sh-lnc-1、sh-lnc-2、lnc-OE 和对照组 CAL27 细胞接种于 6 孔板, 1000 个/孔, 设置 3 个复孔。每孔加入 2 ml 培养液。培养 14 d, 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min, 0.1% 结晶紫染色 30 min, 清洗晾干并观察拍照。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.0 软件和 Image J 软件进行统计学分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。所有柱状图及折线图均采用 GraphPad Prism9.0 软件绘制。

2 结果

2.1 c-Myc 和 lnc-TBL1XR1-5 在 OSCC 中表达增加 首先, 本课题组根据 c-Myc 的表达对 TCGA 数据库中头颈鳞癌样本进行重新分组并进行差异分析, 发现 lnc-TBL1XR1-5 在 c-Myc 高表达组中也显著高表达(图 1A, *P* < 0.001)。进一步检测了 lnc-TBL1XR1-5 的二级结构(图 1B) 并且其位于人类的 3 号染色体(图 1C)。为了验证 TCGA 数据库生物信息学分析结果, 本课题组首先对比了配对的 5 组 OSCC 的癌组织与癌旁组织。相比于癌旁组织, 癌组织中 c-Myc 水平明显高表达(图 1D; *t* = 67.09, *P* < 0.001; *t* = 29.78, *P* < 0.01; *t* = 29.53, *P* < 0.01; *t* = 30.73, *P* < 0.01; *t* = 61.75, *P* < 0.001)。lnc-TBL1XR1-5 在 OSCC 组织中也高表达(图 1E; *t* = 69.84, *P* < 0.001; *t* = 8.517, *P* < 0.05; *t* = 38.94, *P* < 0.001; *t* = 19.11, *P* < 0.01; *t* = 35.44, *P* < 0.001)。进一步在细胞水平上探究了 c-Myc 与 lnc-TBL1XR1-5 的表达水平; 研究发现, c-Myc 在 HN6 和 CAL27 中的水平远高于在人正常口腔角质形成细胞中(图

1F; $F = 289.7, P < 0.001$)。Inc-TBL1XR1-5 表达水平亦然(图 1G; $F = 72.23, P < 0.01$)。

2.2 c-Myc 在 OSCC 细胞系中正向调节 Inc-TBL1XR1-5 的表达

qRT-PCR 结果显示 Inc-TBL1XR1-5

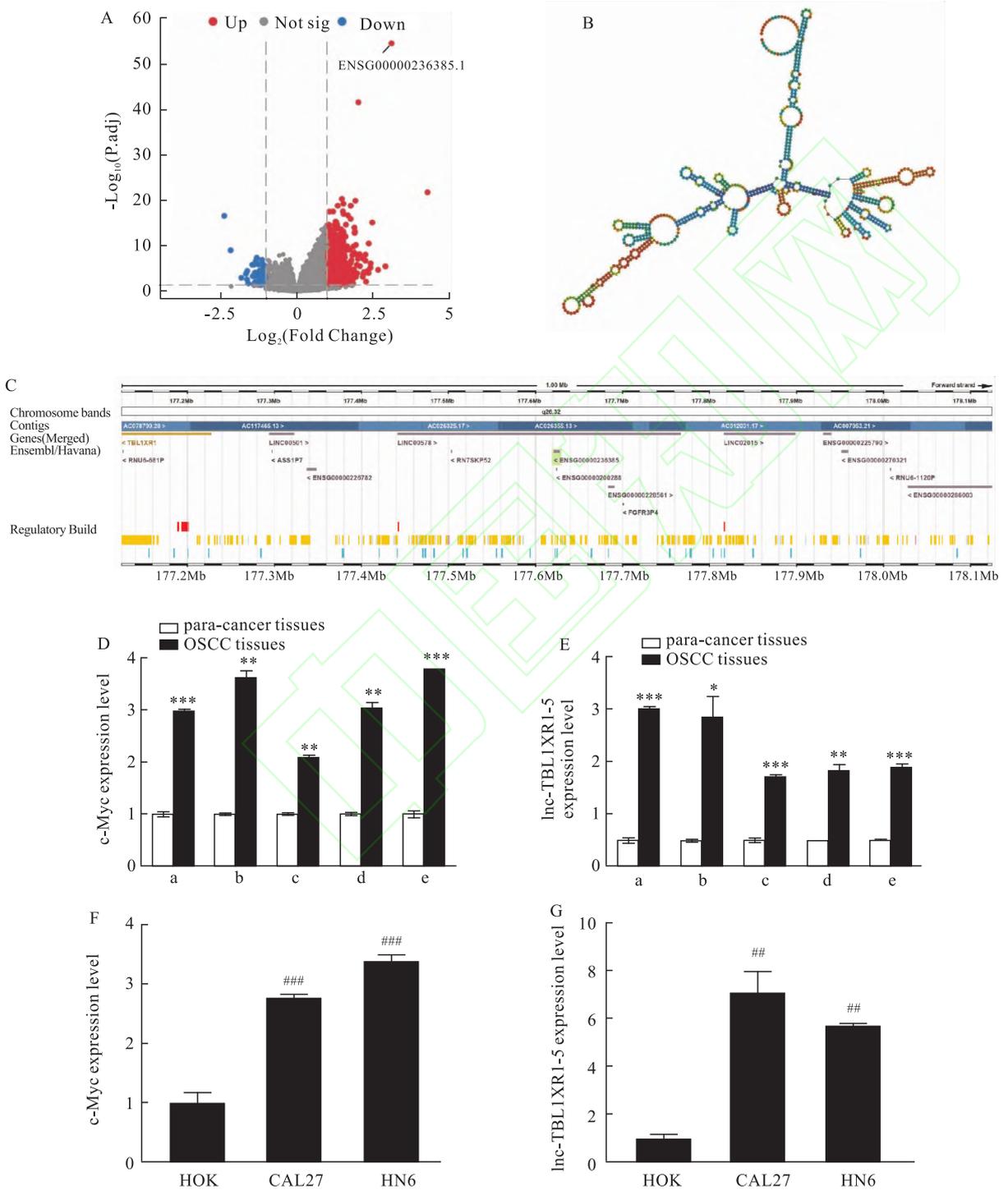


图 1 OSCC 组织和口腔癌细胞系中 lnc-TBL1XR1-5 的分析

Fig. 1 Analysis of lnc-TBL1XR1-5 in OSCC tissue and oral cancer cell lines

A: Bioinformatics detection of the expression level of lnc-TBL1XR1-5 in the c-Myc high expression group; B: The secondary structure of lnc-TBL1XR1-5; C: The position of lnc-TBL1XR1-5 in human chromosomes; D: qRT-PCR was used to detect the expression levels of c-Myc in 5 paired OSCC adjacent and cancerous tissues; a-e: 5 paired organizations; E: The expression levels of lnc-TBL1XR1-5 in 5 paired OSCC adjacent and cancerous tissues; a-e: 5 paired organizations; F: The expression levels of c-Myc in HOK, CAL27 and HN6; G: The expression levels of lnc-TBL1XR1-5 in HOK, CAL27 and HN6; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs para-cancer tissues; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs HOK.

的表达随着 c-Myc 过表达而升高 (图 2A; $t = 10.42, P < 0.001; t = 9.159, P < 0.001$)。敲低 c-Myc 后发现 lnc-TBL1XR1-5 随着 c-Myc 敲低而降低 (图 2B; $t = 12.74, P < 0.001; t = 8.374, P < 0.05$)。初步表明 c-Myc 在 OSCC 细胞系中正向调节 lnc-TBL1XR1-5 的表达。

2.3 双荧光素酶报告实验验证 c-Myc 与 lnc-TBL1XR1-5 基因启动子区域的结合 UCSC 数据库和 JASPAR 数据库生物信息学预测结果显示 c-Myc 在 lnc-TBL1XR1-5 基因启动子区域的可能结合位点 (图 3A)。且双荧光素酶报告基因实验的结果显示:野生型 lnc-TBL1XR1-5 基因启动子区重组质粒、Renilla 和 c-Myc-OE 共转染组的荧光值与突变型 lnc-TBL1XR1-5 基因启动子区重组质粒、Renilla

和 c-Myc 共转染组的荧光值相比,野生型共转染组荧光值显著增高,而突变型共转染组无明显变化 (图 3B; $t = 9.59, P < 0.001$)。在 293T 细胞中验证了 c-Myc 质粒的过表达效率 (图 3C; $t = 23.76, P < 0.05$)。由此证明了 c-Myc 和 lnc-TBL1XR1-5 基因启动子区域 (-146 ~ -135) 的相互作用。

2.4 lnc-TBL1XR1-5 在 OSCC 细胞系中的定位 RNA FISH 荧光结果显示 5'端带有 FAM 修饰的 lnc-TBL1XR1-5 探针所处的位置 (图 A) 与 DAPI 显示的细胞核的位置 (图 4B) 高度重合 (图 4C)。RNA FISH 结果表明在 CAL 27 细胞中 lnc-TBL1XR1-5 绝大多数都位于细胞核中。

2.5 过表达 lnc-TBL1XR1-5 可促进 OSCC 进展 在 CAL27 细胞中感染 lnc-TBL1XR1-5 过表达病毒

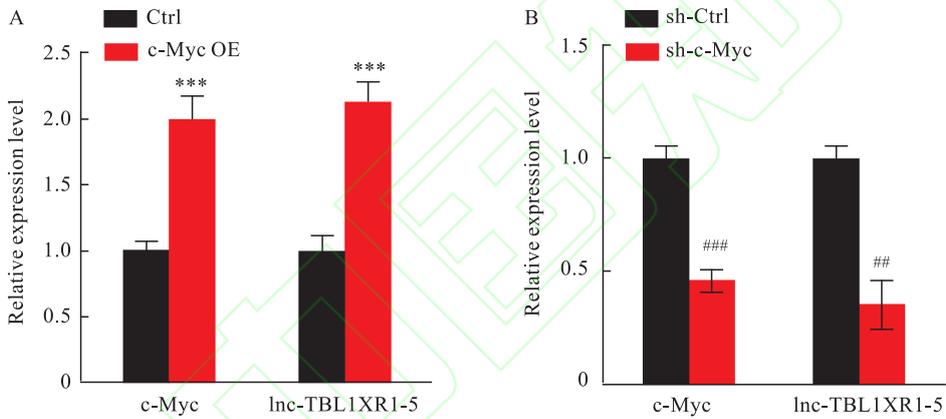


图 2 c-Myc 正向调控 lnc-TBL1XR1-5

Fig. 2 Positive regulation of lnc-TBL1XR1-5 by c-Myc

A: qRT-PCR was used to detect the overexpression efficiency of c-Myc and the relative expression level of lnc-TBL1XR1-5; B: qRT-PCR was used to detect the knockdown efficiency of c-Myc and the relative expression level of lnc-TBL1XR1-5; *** $P < 0.001$ vs Ctrl group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs sh-Ctrl group.

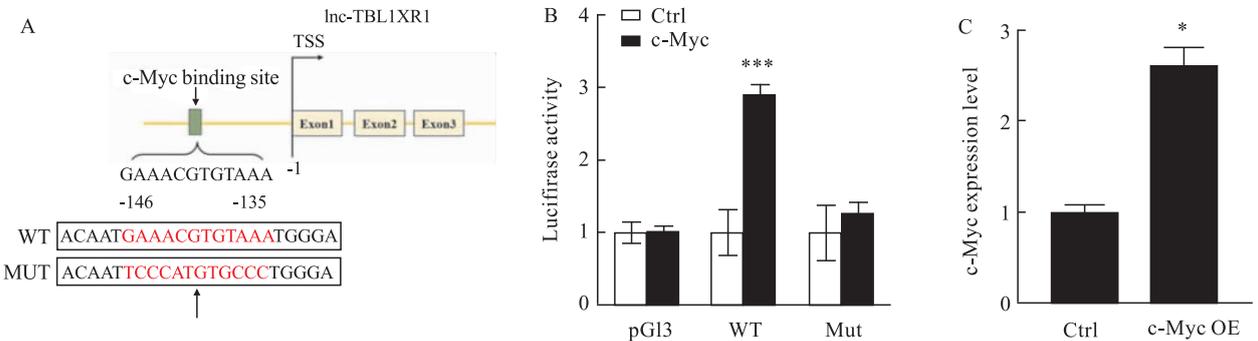


图 3 c-Myc 对 lnc-TBL1XR1-5 的转录调控作用

Fig. 3 Transcriptional regulation by c-Myc on lnc-TBL1XR1-5

A: Schematic diagram of the sequence of the lnc-TBL1XR1-5 promoter region, c-Myc binding site, and mutation site; B: The dual luciferase reporter gene experiment was used to detect the relative luciferase activity of wild-type and mutant plasmids carrying c-Myc binding sites; C: Overexpression of c-Myc in 293T cell after transfection with plasmid; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group.

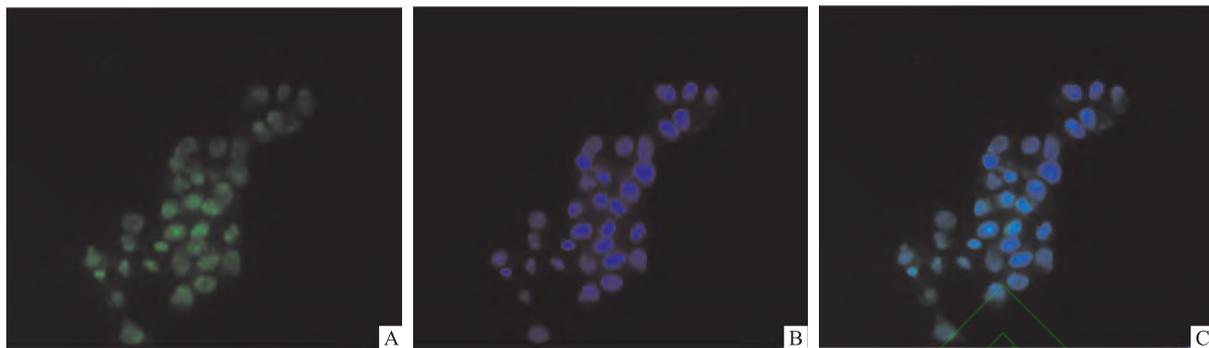


图4 lnc-TBL1XR1-5 在细胞内的定位

Fig.4 Localization of lnc-TBL1XR1-5 in cells

A:lnc-TBL1XR1-5 5' FAM;B:DAPI;C:Merge

后,qRT-PCR 检测 lnc-TBL1XR1-5 的过表达效率,结果显示在 CAL27 中 lnc-TBL1XR1-5 表达明显增加(图 5A; $t = 386.7, P < 0.0001$)。细胞计数实验结果(图 5B; $t = 47.87, P < 0.001$; $t = 251.8, P < 0.001$; $t = 51.39, P < 0.0001$)和 CCK-8 实验结果(图 5C; $t = 4.47, P < 0.05$; $t = 13.37, P < 0.001$; $t = 19.65, P < 0.0001$),显示:过表达 lnc-TBL1XR1-5 的 CAL27 细胞增殖明显变快。划痕愈合实验(图 5D、5E; $t = 182.7, P < 0.0001$)和 Transwell 实验结果(图 5F)显示:过表达 lnc-TBL1XR1-5 的 CAL27 细胞的迁移能力明显增强。集落形成实验结果说明过表达 lnc-TBL1XR1-5 的 CAL27 细胞增殖明显快于对照组(图 5G)。观察过表达 lnc-TBL1XR1-5 的 CAL27 细胞的培养基颜色变化并测量培养基的 pH 值,以此来反映细胞代谢的情况,结果显示过表达 lnc-TBL1XR1-5 的 CAL27 细胞代谢明显变快(图 5H)。以上实验结果表明在 OSCC 细胞系中过表达 lnc-TBL1XR1-5 可明显促进细胞的迁移、代谢和增殖。

2.6 敲低 lnc-TBL1XR1-5 可抑制 OSCC 进展 在 CAL27 细胞中感染 sh-lnc-TBL1XR1-5 敲低病毒后,qRT-PCR 检测 sh-lnc-1, sh-lnc-2 的敲低效率,发现在 CAL27 细胞系中 lnc-TBL1XR1-5 被敲低(图 6A; $t = 11.52, P < 0.001$; $t = 6.137, P < 0.01$)。细胞计数实验结果(图 6B; $t = 42.87, P < 0.001$; $t = 9.355, P < 0.01$; $t = 36.76, P < 0.001$; $t = 45.32, P < 0.001$; $t = 5.527, P < 0.001$; $t = 42.09, P < 0.0001$)和 CCK-8 实验结果(图 6C; $t = 16.87, P < 0.001$; $t = 26.37, P < 0.001$; $t = 18.75, P < 0.001$; $t = 13.44, P < 0.001$; $t = 15.14, P < 0.001$; $t = 7.693, P < 0.01$)显示:敲低了 lnc-TBL1XR1-5 的 OSCC 细胞增殖明显变慢。本

课题组划痕愈合实验(图 6D、6E; $t = 110.3, P < 0.001$; $t = 28.89, P < 0.001$)和 Transwell 实验(图 6F)来观察细胞迁移能力,在倒置荧光显微镜下观察并拍照,结果显示敲低了 lnc-TBL1XR1-5 的 OSCC 细胞的迁移能力明显下降。集落形成实验结果说明敲低了 lnc-TBL1XR1-5 的 OSCC 细胞增殖明显变慢(图 6G)。观察敲低了 lnc-TBL1XR1-5 的 CAL27 细胞的培养基颜色变化并测量培养基的 pH 值,以此来反映细胞代谢的情况,结果显示敲低了 lnc-TBL1XR1-5 的 OSCC 细胞代谢明显变慢(图 6H)。以上实验结果表明了在 OSCC 细胞系中敲低 lnc-TBL1XR1-5 可明显抑制细胞的迁移、代谢和增殖。

3 讨论

据报道,HNSCC 是世界第六大常见癌症,属于一类死亡率和发病率都较高的恶性肿瘤^[10]。OSCC 是 HNSCC 的主要分类之一,且其发病率仍属于上升趋势。目前 OSCC 的主流治疗手段为外科手术、放疗、EFG-R 抑制剂联合化疗等,但其五年生存率仅为 50%,其主要原因为约 2/3 的患者在诊断时已经有较大的病变^[11]。因此,探索 OSCC 的生物标志物和治疗靶点迫在眉睫。

有研究^[12]显示在多种患癌期,控制监测点机制的逃逸导致 c-Myc 的表达失调,在大多数癌症中呈高表达。然而 c-Myc 参与调控多种基因的表达,影响细胞增殖、凋亡、代谢等多个生物学过程,由于调控网络的复杂性,单一靶向 c-Myc 可能无法完全抑制其作用,且 c-Myc 在正常细胞中也具有重要作用,包括干细胞自我更新、细胞增殖等。因此,靶向 c-Myc 可能会对正常细胞产生不良影响,引发意想不到的副作用。另外,c-Myc 本身是一个难以靶向的

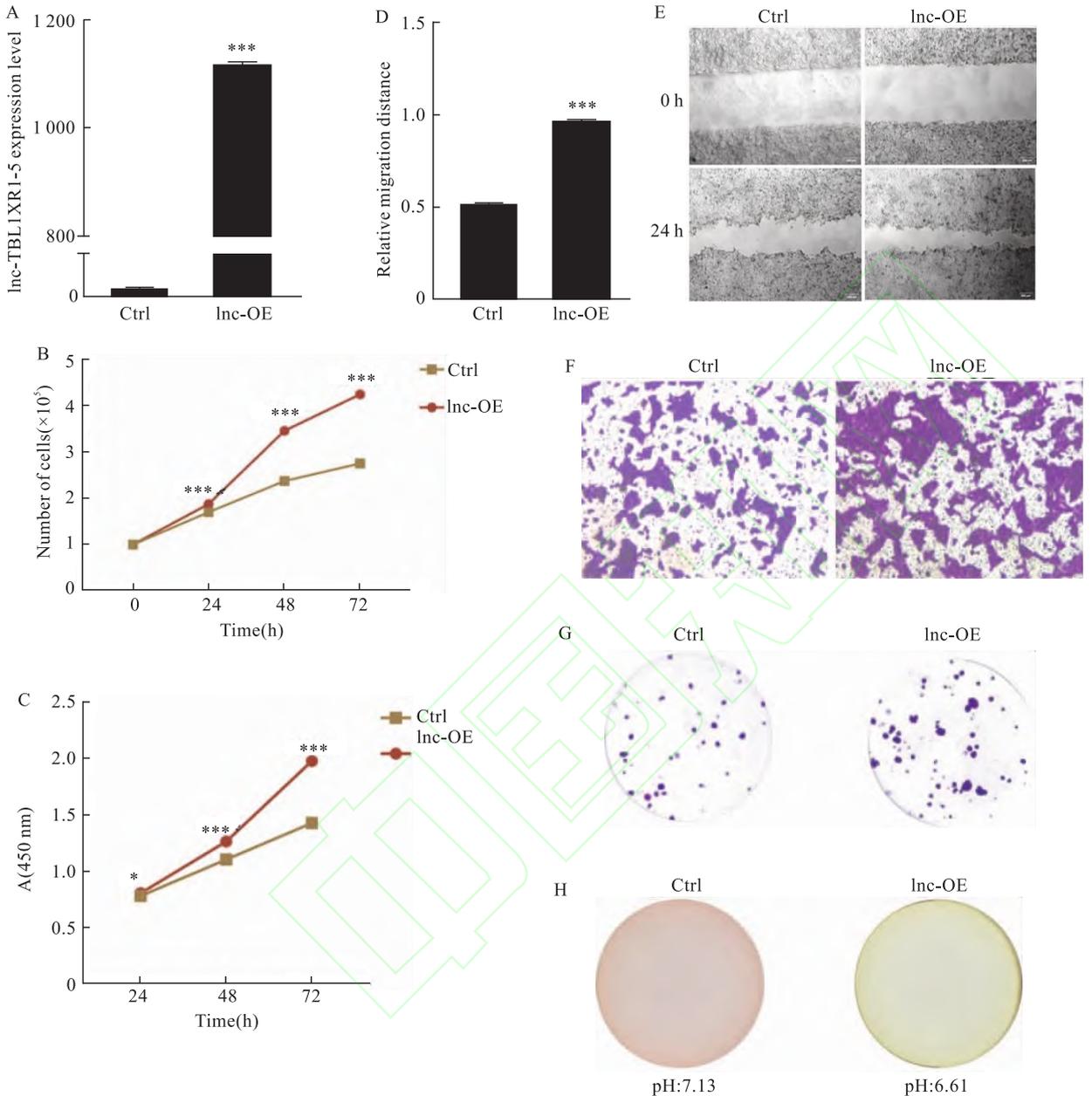


图5 过表达 lnc-TBL1XR1-5 可促进 OSCC 细胞系的生长、增殖、迁移和代谢

Fig. 5 Overexpression of lnc-TBL1XR1-5 can promote the growth, proliferation, migration, and metabolism of OSCC cell lines

A: qRT-PCR was used to detect the overexpression efficiency of lnc-TBL1XR1-5; B: Cell counting method is used to detect cell proliferation ability; C: CCK-8 assay was used to detect cell proliferation ability; D: Cell scratch assay was used to detect cell migration rate; E: Cell scratch assay was used to detect cell migration ability $\times 5$; F: Transwell experiment detects the migration ability of cells by 0.1% crystal violet staining $\times 5$; G: Colony formation experiment detects cell proliferation ability with 0.1% crystal violet staining multiplied by magnification; H: The color of the culture medium was observed and the pH value of the culture medium was detected to assess the metabolic capacity of cells; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group.

蛋白质,其结构特性和调控机制使得寻找特异性的靶点或抑制剂具有挑战性。

许多研究表明,人类癌症的发生发展与 lncRNA 的异常表达密切,如:TRPM2-AS 在各种类型癌症的起始和进展中发挥关键作用^[13]。lncRNA 具有非常复杂和精确的调控能力,因此,阐明其功能背后的机

制有助于更好分析复杂的基因表达和调控问题。自发现 lncRNA 以来,已经证实它们在多种恶性肿瘤中表达增加^[14]。近年来,lncRNA 已成为肿瘤的研究热点,lncRNA 在癌症检测预后和治疗方面具有相当大的潜力,目前已有多种 lncRNA 被定为肿瘤标志物,如lncRNAPCA3已被临床上批准用为前列腺

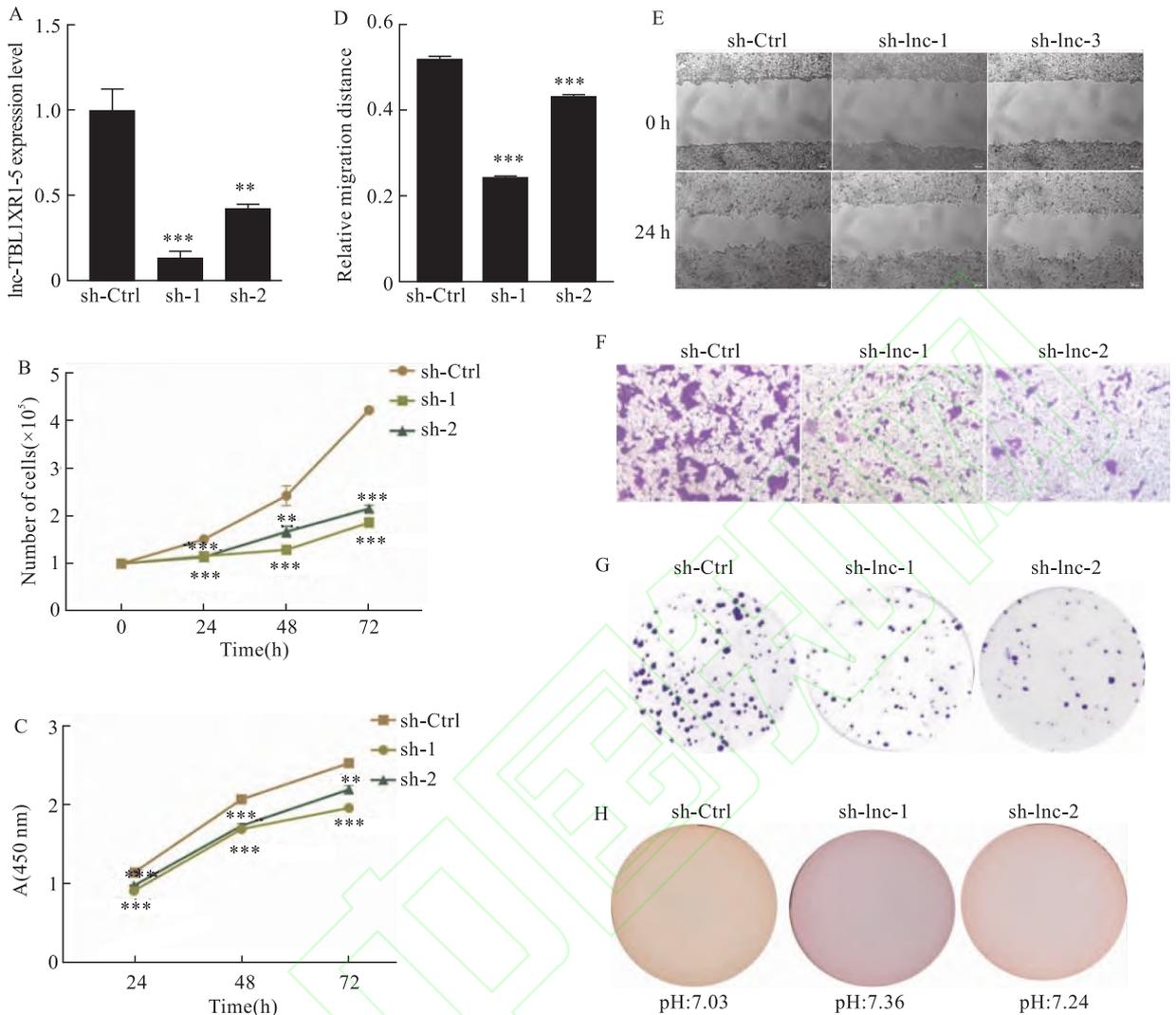


图6 敲低 lnc-TBL1XR1-5 可抑制 OSCC 细胞系的生长、增殖和迁移和代谢

Fig. 6 Knocking down lnc-TBL1XR1-5 can inhibit the growth, proliferation, migration, and metabolism of OSCC cell lines

A: qRT-PCR was used to detect the knockdown efficiency of lnc-TBL1XR1-5; B: Cell counting method was used to detect cell proliferation ability; C: CCK-8 assay was used to detect cell proliferation ability; D: Cell scratch assay cell migration rate; E: Cell scratch assay was used to detect cell migration ability $\times 5$; F: Transwell experiment detects the migration ability of cells by 0.1% crystal violet staining $\times 5$; G: Colony formation experiment detects the proliferation ability of cells by staining with 0.1% crystal violet; H: The color method of the culture medium was observed and the pH value of the culture medium was detected to test the metabolic ability of cells; * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs sh-Ctrl group.

癌标志物^[15]。

本研究通过 c-Myc 的表达对 TCGA 数据库中 HNSCC 样本进行重新分组并进行差异分析,发现在 c-Myc 上调组中, lnc-TBL1XR1-5 也高表达,表明 c-Myc 可能与 lnc-TBL1XR1-5 协同作用于 OSCC,且研究表明 lnc-TBL1XR1-5 在 OSCC 组织中及 OSCCs 细胞系中高表达,因此猜测该基因可能具有促癌作用。本研究进一步探索了该基因在细胞水平上的促癌作用,通过慢病毒敲低和过表达操纵 CAL27 细胞,发现上调 lnc-TBL1XR1-5 可诱导 CAL27 细胞增殖迁移和代谢。反之下调该基因时,则抑制了 CAL27 的

恶性行为,证实了 lnc-TBL1XR1-5 促进了 OSCC 的进展。

本研究表明 c-Myc 通过与 lnc-TBL1XR1-5 的启动子结合,调节 lnc-TBL1XR1-5 在 CAL27 中的转录活性, lnc-TBL1XR1-5 受 c-Myc 的正向调控;过表达 lnc-TBL1XR1-5,促进了口腔鳞癌细胞 CAL27 的增殖、迁移、代谢;敲低 lnc-TBL1XR1-5 时, CAL27 的增殖、迁移、代谢则受到抑制。

综上所述, lnc-TBL1XR1-5 作为一个全新的基因,在 OSCC 的发生发展过程中的作用至关重要,可视为口腔鳞状细胞癌一个潜在的治疗靶点。本研究

结果加深了对 lnc-TBL1XR1-5 功能的理解,揭示了 c-Myc 通过上调 lnc-TBL1XR1-5 表达水平参与 OSCC 发生发展的新机制。由于该研究还在初始阶段,尚停留在分子功能的层面,缺少临床相关直接证据。因此,本课题组下一步将通过 RNA pull down 实验等找出 lnc-TBL1XR1-5 结合的分子,研究 lnc-TBL1XR1-5 促进 OSCC 的具体分子机制,收集更多的临床组织进行大规模的临床队列验证,以提供更精准的分子靶标,确定 lnc-TBL1XR1-5 在 OSCC 诊疗中的临床价值。

参考文献

- [1] Budach V, Tinhofer I. Novel prognostic clinical factors and biomarkers for outcome prediction in head and neck cancer: a systematic review[J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(6): e313 - 26. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30177-9.
- [2] 涂晓敏, 任建君, 赵宇. 头颈鳞状细胞癌危险因素及遗传风险的研究进展[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2022, 36(5): 391 - 6. doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2022.05.015.
- [2] Tu X M, Ren J J, Zhao Y. Advances in risk factors and genetic risk of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2022, 36(5): 391 - 6. doi:10.13201/j.issn.2096-7993.2022.05.015.
- [3] Kopp F, Mendell J T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393 - 407. doi:10.1016/j.cell.2018.01.011.
- [4] Tang J, Yan T, Bao Y, et al. LncRNA GLCC1 promotes colorectal carcinogenesis and glucose metabolism by stabilizing c-Myc[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3499. doi:10.1038/s41467-019-11447-8.
- [5] Zhong Y, Yang L, Xiong F, et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1 accelerates lung cancer cells migration and invasion by interacting with SNIP1 to upregulate c-Myc[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 240. doi:10.1038/s41392-021-00562-y.
- [6] Mashanov V S, Zueva O R, García-Arrarás J E. Myc regulates programmed cell death and radial glia dedifferentiation after neural injury in an echinoderm[J]. *BMC Dev Biol*, 2015, 15: 24. doi: 10.1186/s12861-015-0071-z.
- [7] Wang G, Wang J, Zhao H, et al. The role of Myc and let-7a in glioblastoma, glucose metabolism and response to therapy[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 580: 84 - 92. doi:10.1016/j.abb.2015.07.005.
- [8] Wang Z, Yan J, Zou T, et al. MicroRNA-1294 inhibited oral squamous cell carcinoma growth by targeting c-Myc[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2): 2243 - 50. doi:10.3892/ol.2018.8967.
- [9] Tian L, Li H, Zhao P, et al. C-Myc-induced hypersialylation of small cell lung cancer facilitates pro-tumoral phenotypes of macrophages[J]. *iScience*, 2023, 26(10): 107771. doi:10.1016/j.isci.2023.107771.
- [10] Ruffin A T, Li H, Vujanovic L, et al. Improving head and neck cancer therapies by immunomodulation of the tumour microenvironment[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(3): 173 - 88. doi:10.1038/s41568-022-00531-9.
- [11] Feller L, Lemmer J. Oral squamous cell carcinoma: Epidemiology, clinical presentation and treatment[J]. *J Cancer Ther*, 2012, 3(4): 263 - 8. doi:10.4236/jct.2012.34037.
- [12] Papadimitropoulou A, Makri M, Zoidis G. MYC the oncogene from hell: Novel opportunities for cancer therapy[J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 267: 116194. doi: 10.1016/j.ejmech.2024.116194.
- [13] Li F, Chen X. Contribution and underlying mechanisms of lncRNA TRPM2-AS in the development and progression of human cancers[J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 251: 154887. doi:10.1016/j.prp.2023.154887.
- [14] Rastad H, Samimisedeh P, Alan M S, et al. The role of lncRNA CERS6-AS1 in cancer and its molecular mechanisms: A systematic review and meta-analysis[J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 241: 154245. doi:10.1016/j.prp.2022.154245.
- [15] Ghafouri-Fard S, Khoshbakht T, Hussen B M, et al. A review on the role of PCA3 lncRNA in carcinogenesis with an especial focus on prostate cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 231: 153800. doi:10.1016/j.prp.2022.153800.

C-Myc-regulated lnc-TBL1XR1-5 influences the progression of oral squamous cell carcinoma

Fu Miaoting^{1,2}, Zhu Youming^{1,2}

(¹*School of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Laboratory of Anhui Oral Disease Research Center, Hefei 230032)*

Abstract Objective This study examined the influence of c-Myc regulated long noncoding RNA TBL1XR1-5 (lnc-TBL1XR1-5) on the progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** Based on the expression of c-Myc, bioinformatics analysis was performed on head and neck squamous cell carcinoma samples in the

(下转第 1582 页)

domly divided into three groups: control (Con) group, DHEA group, DHEA + sh-NC group and DHEA + sh-NLRP3 group, with 8 mice in each group. Except the control group, all other groups treated mice with dehydroepiandrosterone (DHEA) to establish PCOS mouse model. DHEA + sh-NLRP3 group and DHEA + sh-NC group were administrated with sh-NLRP3 or sh-NC encapsulated in lentivirus at a concentration of 1×10^9 TU/ml via tail vein injection. The ultrastructure of mitochondria in ovarian tissue of mice in each group was observed by transmission electron microscope. **Results** Compared with DHT + sh-NC group, the level of NLRP3 of SVOG cells in DHT + sh-NLRP3 group decreased ($P < 0.05$). The co-location of GFP-LC3 and mitochondria in SVOG cells in DHT + sh-NLRP3 group was higher than that in DHT + sh-NC group ($P < 0.05$). Compared with DHT + sh-NC group, the number of TUNEL positive cells and Mito-SOX fluorescence density of SVOG cells in DHT + sh-NLRP3 group decreased, and the ratio of polymer JC-1 to monomer JC-1 increased ($P < 0.05$). Compared with Con + Ad-EV group, the level of NLRP3, the number of TUNEL-positive cells and the fluorescence density of mito-SVOG in Con + Ad-NLRP3 group increased ($P < 0.05$), and the co-location level of GFP-LC3 and mitochondria decreased; the ratio of polymer JC-1 to monomer JC-1 decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, TUNEL positive cells, relative ROS intensity and percentage of damaged mitochondria in the ovarian tissue of mice in DHEA group increased ($P < 0.05$). Compared with DHEA + sh-NC group, TUNEL positive cells, relative ROS intensity and percentage of damaged mitochondria in DHEA + SH-NLRP group decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of mitochondrial autophagy induced by activation of NLRP3 leads to mitochondrial dysfunction and promotes mitochondrial-related apoptosis in GCs. Knockdown of NLRP3 is beneficial to mitochondrial homeostasis and improves the resistance of GCs to oxidative stress injury, thus promoting the recovery of PCOS.

Key words NOD-like receptor thermoprotein domain related protein 3; mitochondrial autophagy; polycystic ovary syndrome; oxidative stress; mitochondrial homeostasis; granulosa cells; mice

Fund program Natural Science Foundation of Hunan Province (No. S2023JBMLH1343)

Corresponding author Nie Lan, E-mail: 1557073946@qq.com

(上接第 1572 页)

TCGA database, and lnc-TBL1XR1-5 with closely related c-Myc expression was screened. The effects of c-Myc overexpression and knockdown on lnc-TBL1XR1-5 were detected. Expression relationship of c-Myc and lnc-TBL1XR1-5 in OSCC and para-cancer tissues. Dual-luciferase reporter assays were used to verify the binding of c-Myc to the lnc-TBL1XR1-5 promoter region. RNA FISH were used to determine the localization of lnc-TBL1XR1-5 in OSCC cell lines. The effects of overexpression, knockdown of lnc-TBL1XR1-5 on migration, metabolism, and proliferation of OSCC cells were observed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), scratch tests, transwell assays, medium color and pH changes, cell counts, CCK-8 assay, and colony formation assays.

Results It was found that c-Myc positively regulated the expression of lnc-TBL1XR1-5 in OSCC cell lines and tissues. The binding of c-Myc to the lnc-TBL1XR1-5 promoter region was verified by dual-luciferase reporter assays. RNA FISH showed that lnc-TBL1XR1-5 was localized in the nuclei in OSCC cells. Overexpression of lnc-TBL1XR1-5 promoted migration, metabolism and proliferation in OSCC cell lines, while knockdown of it had the opposite effect. **Conclusion** c-Myc positively regulates lnc-TBL1XR1-5 in OSCC. Lnc-TBL1XR1-5 affect the migration, proliferation, and metabolism of OSCC by influencing the tumor microenvironment.

Key words long non-coding RNA; c-Myc; oral squamous cell carcinoma; lnc-TBL1XR1-5; cell proliferation; cell migration

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 31970677); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2308085Y23)

Corresponding author Zhu Youming, E-mail: 95640021@qq.com