

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2020.04.002

· 基础研究 ·

长非编码 RNA lncRNA ADAMTS9-AS2 促进唾液腺腺样囊性癌侵袭转移的研究

武东辉¹, 朱韵莹¹, 梁坚强¹, 林钊宇², 李劲松²

1. 广州市海珠区口腔医院口腔外科, 广东 广州(510120); 2. 中山大学孙逸仙纪念医院口腔颌面外科, 广东 广州(510220)

【摘要】 目的 检测不同转移能力的唾液腺腺样囊性癌(salivary gland adenoid cystic carcinoma, SACC)细胞中差异表达的长非编码 RNA(lncRNA), 探讨 lncRNA 在唾液腺腺样囊性癌侵袭转移中的作用。方法 以腺样囊性癌高转移细胞株 SACC-LM 为实验组, 低转移细胞株 SACC83 为对照组, 采用 lncRNA 芯片初步筛选差异表达的 lncRNA, 通过 qRT-PCR 进一步验证差异表达的 lncRNA。通过侵袭迁移实验检测转染差异表达的 lncRNA siRNAs 前后腺样囊性癌细胞株侵袭迁移能力的变化。并对差异表达的 lncRNA 与 SACC 患者的临床病理特征和预后进行分析。结果 芯片筛选出 ADAMTS9-AS2 在高转移细胞系(SACC-LM)中高表达, 实时定量 RT-PCR 进一步验证了其在高转移细胞系(SACC-LM)显著上调, 通过侵袭迁移实验发现在转染后下调 ADAMTS9-AS2 的表达水平后侵袭迁移能力明显降低($P < 0.001$)。临床病理资料分析表明, ADAMTS9-AS2 在 SACC 组织中高度表达。高表达的 ADAMTS9-AS2 与 SACC 患者预后不良和肿瘤转移率高有关。结论 高表达 ADAMTS9-AS2 促进 SACC 细胞迁移和侵袭, ADAMTS9-AS2 在 SACC 组织中上调, 并且与高转移率和不良预后相关。

【关键词】 长非编码 RNA; lncRNA ADAMTS9-AS2; 唾液腺腺样囊性癌; 腺样囊性癌高转移细胞系; lncRNA 表达谱芯片; 侵袭; 转移; RNA 干扰; 表观遗传学

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2020)04-0214-05



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 武东辉, 朱韵莹, 梁坚强, 等. 长非编码 RNA lncRNA ADAMTS9-AS2 促进唾液腺腺样囊性癌侵袭转移的研究[J]. 口腔疾病防治, 2020, 28(4): 214-218.

Study on lncRNA ADAMTS9-AS2 promoting invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma

WU Donghui¹, ZHU Yunying¹, LIANG Jianqiang¹, LIN Zhaoyu², LI Jinsong². 1. Department of Oral Surgery, Stomatology hospital of Haizhu district, Guangzhou 510220, China; 2. Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510220, China

Corresponding author: LI Jinsong, Email: lijinsong1967@163.com, Tel: 86-20-84230200

【Abstract】 Objective To investigate the role of lncRNAs in the invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma (SACC) cells. **Methods** With SACC-LM as the experimental group and SACC83 as the control group, lncRNA chips were used to screen the differentially expressed lncRNAs. The differentially expressed lncRNAs were further verified by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The invasion and migration abilities of the adenoid cystic carcinoma cell lines before and after transfection with lncRNA siRNAs were detected by invasion and migration experiments. The clinicopathological features and prognosis of patients with different expression of lncRNAs and SACC were analyzed. **Results** The microarray showed that ADAMTS9-AS2 was highly expressed in the SACC-LM cells. Real-time quantitative RT-PCR further confirmed that ADAMTS9-AS2 was significantly upregulated in the SACC-LM cells. Inva-

【收稿日期】 2019-07-17; **【修回日期】** 2019-11-07

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81872194)

【作者简介】 武东辉, 副主任医师, 硕士, Email: 89619545@qq.com

【通信作者】 李劲松, 教授, 博士, Email: lijinsong1967@163.com, Tel: 86-20-84230200

sion and migration experiments showed that the invasion and migration were significantly reduced after the expression level of ADAMTS9-AS2 was downregulated ($P < 0.001$). Analysis of the clinicopathological data showed that ADAMTS9-AS2 was highly expressed in SACC. High expression of ADAMTS9-AS2 was associated with poor prognosis and a high tumor metastasis rate in SACC patients. **Conclusion** High expression of ADAMTS9-AS2 promotes the migration and invasion of SACC cells. ADAMTS9-AS2 is upregulated in the SACC tissues and is related to a high metastasis rate and poor prognosis.

【Key words】 long noncoding RNA; lncRNA ADAMTS9-AS2; salivary adenoid cystic carcinoma; adenoid cystic carcinoma cell line with high metastasis; lncRNA expression microarray; invasion; metastasis; RNA interference; epigenetics

J Prev Treat Stomatol Dis, 2020, 28(4): 214-218.

腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)是唾液腺最常见的恶性肿瘤,主要来自唾液导管上皮,占恶性唾液腺肿瘤的四分之一。唾液腺腺样囊性癌具有神经浸润性生长和远处肺转移等特征^[1-3],远处转移是影响唾液腺腺样囊性癌患者的重要预后因素^[4,5]。因此,探究SACC的神经侵袭和远处转移的机制对提高SACC患者的存活率有重要意义。目前发现,长非编码RNA(long-noncoding RNA, lncRNA)在多种肿瘤的发生发展起重要作用,本研究主要研究lncRNA在SACC侵袭、转移过程中是否起到重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SACC-83和SACC-LM细胞购自北京大学;SACC-LM为源自SACC-83肺转移的高转移细胞系。10%FBS(Invitrogen,美国);RPMI-1640培养基(Gibco,美国);人类lncRNA微阵列V3.0芯片(上海博豪生物公司,中国);TRIzol试剂(Invitrogen,美国);Prime Script™ RT试剂盒(Takara Biotechnology,日本);LightCycler 480系统(Roche,瑞士);Lipofectamine 3000脂质体(Invitrogen,美国);Transwell小室(BD Biosciences,美国)。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养 将SACC-83和SACC-LM细胞分别在含有10%FBS的RPMI-1640培养基中进行培养,37℃,5%CO₂。

1.2.2 lncRNA微阵列分析 使用人类lncRNA微阵列V3.0进行分析对SACC-83和SACC-LM细胞进行比较分析(该部分由上海博豪生物公司负责完成)。

1.2.3 RNA提取和实时荧光定量PCR 使用

TRIzol试剂从组织或细胞中提取总RNA,并使用Prime Script™ RT试剂盒同时根据制造商的说明书进行逆转录。使用LightCycler 480系统进行定量实时PCR检测,并将ADAMTS9-AS2的相对表达标准化为GAPDH的相对表达量。引物序列如下:ADAMTS9-AS2: forward 5'-TTTACCATGCGCTGAGTGAG-3', reverse 5'-AAAGTTGCCGTCATGCTTCGG-3'; GAPDH: forward 5'-ACCCAGAAGACTGTGATGG-3', reverse 5'-GAGGCAGGGATGATGTTCTG-3'。

1.2.4 细胞转染 芯片结果显示长非编码RNA ADAMTS9-AS2的表达在SACC-LM中表达最高,靶向lncRNA的siRNA ADAMTS9-AS2以及对照siRNA由广州锐博公司合成提供。使用Lipofectamine 3000脂质体介导转染,siRNA最终浓度为50 nM,根据说明书进行转染。通过qRT-PCR检测沉默效率。

1.2.5 侵袭迁移实验 ①迁移实验:消化并收集 1×10^5 个肿瘤细胞加入到无血清培养基中,将200 μl该细胞加到Transwell小室的上室内,而下室中加入500 μl含10%FBS的完全培养基。37℃培养24 h后,将小室放入4%多聚甲醛中固定10 min,随后浸入0.05%结晶紫溶液中染色2 min,擦去小室上层的细胞,PBS冲洗后使用正置显微镜下观察计数。每个小室选取5个视野拍照,所计细胞数取均值。②细胞侵袭实验:将Matrigel(无血清培养基稀释)溶解后,向Transwell小室上室中加入50 μl,室温孵育1 h。随后消化重悬舌鳞癌细胞,将 1×10^5 个细胞接种于小室上层,下层加入500 μl含10%FBS的完全培养基,37℃培养30个小时,其余步骤同迁移实验。

1.2.6 差异表达的lncRNA与SACC患者的临床病

理特征和预后分析 SACC患者为2003年6月至2017年10月在中山大学孙逸仙纪念医院口腔颌面外科就诊治疗的唾液腺腺样囊性癌患者共102例,其中男女各51例,年龄35~82岁。所有患者术前均未接受任何化疗或放疗,病理确诊为腺样囊性癌。其肿瘤标本及肿瘤边界外约2 cm的癌旁组织标本存放于液氮保存。所有患者采用电话及复诊的方式进行随访。

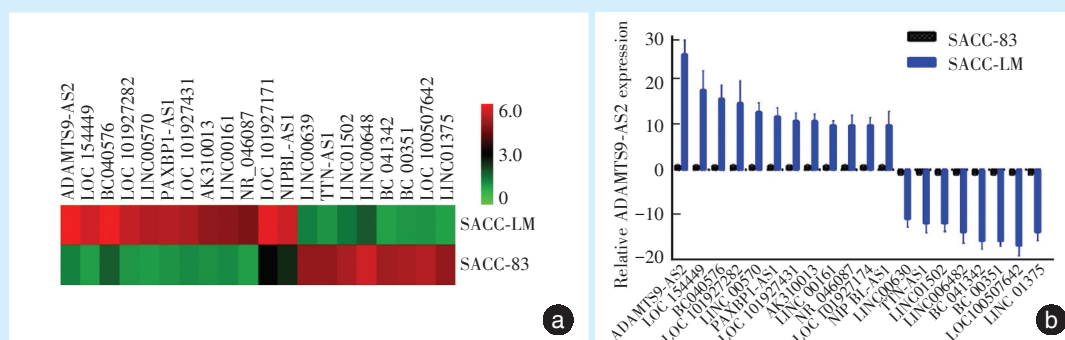
1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0软件对数据进行分析,计量、正态分布数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用LSD法。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 芯片筛选SACC细胞系内差异表达的lncRNA及qRT-PCR验证

为了揭示lncRNA对SACC转移的调控作用,本实验使用lncRNA芯片筛选SACC-LM和SACC-83细胞中差异表达的lncRNAs(差异倍数>2)并绘制热图(图1a)。为了验证芯片结果,本实验通过qRT-PCR进行验证差异表达的候选lncRNA在SACC-LM和SACC-83细胞中的表达水平(图1b)。芯片结果显示lncRNA ADAMTS9-AS2的表达在SACC-LM中表达最高,qRT-PCR进一步验证了其在SACC-LM中的高表达。



a: heat map depicting lncRNAs for which a two fold change in expression was found in the SACC-LM and SACC-83 cells; b: the expression levels of several significantly differentially expressed lncRNAs were validated by qRT-PCR

Figure 1 Microarray screening of lncRNA differentially expressed in SACC cell lines and validation of qRT-PCR

图1 芯片筛选SACC细胞系内差异表达的lncRNA及qRT-PCR验证

2.2 敲低ADAMTS9-AS2抑制SACC细胞迁移和侵袭

为了验证ADAMTS9-AS2对SACC细胞迁移和侵袭功能的调控作用,设计了两条靶向ADAMTS9-AS2的siRNAs并将该siRNAs转入SACC-LM细胞内,通过qRT-PCR检测沉默效率(图2)。此外,Transwell结果显示敲低ADAMTS9-AS2的表达后,侵袭和迁移的SACC-LM细胞数目显著降低(图3)。

2.3 ADAMTS9-AS2与SACC患者的临床病理特征和预后分析

检测lncRNA ADAMTS9-AS2在SACC及癌旁样本的表达,结果发现ADAMTS9-AS2在SACC组织内显著高表达,此外ADAMTS9-AS2在发生远处转移的SACC患者中的表达较未发生转移的患者显著上调(图4)。

ADAMTS9-AS2表达与SACC患者的临床病理

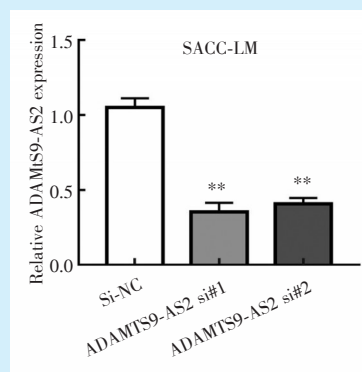


Figure 2 The ADAMTS9-AS2 levels were examined in the SACC-LM cells transfected with siRNAs targeting ADAMTS9-AS2 or siRNA controls

图2 qRT-PCR检测ADAMTS9-AS2 siRNAs在SACC-LM细胞内的沉默效率

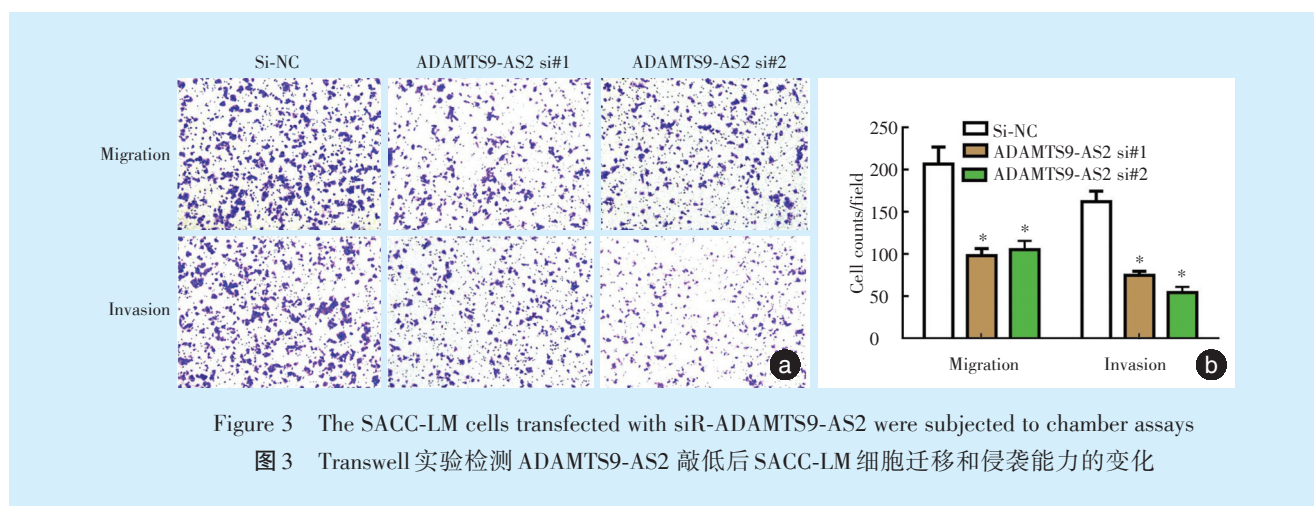
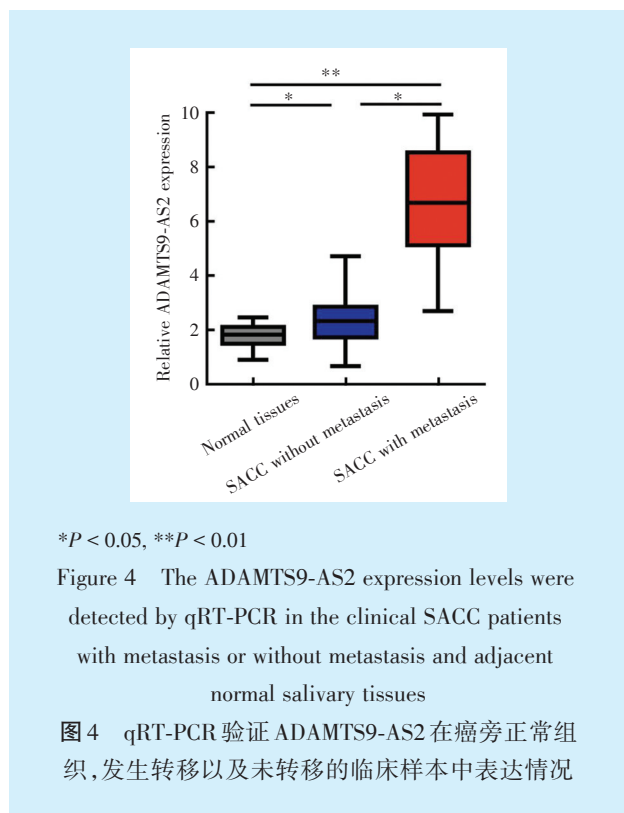


Figure 3 The SACC-LM cells transfected with si-R-ADAMTS9-AS2 were subjected to chamber assays

图3 Transwell 实验检测 ADAMTS9-AS2 敲低后 SACC-LM 细胞迁移和侵袭能力的变化



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 4 The ADAMTS9-AS2 expression levels were detected by qRT-PCR in the clinical SACC patients with metastasis or without metastasis and adjacent normal salivary tissues

图4 qRT-PCR 验证 ADAMTS9-AS2 在癌旁正常组织,发生转移以及未转移的临床样本中表达情况

特征之间的关系见表1。ADAMTS9-AS2 表达与 SACC 患者的肿瘤大小 ($P = 0.017$), 临床分期 ($P = 0.033$) 和是否发生远处转移 ($P = 0.035$) 及预后 ($P < 0.001$) 密切相关。而 ADAMTS9-AS2 表达与 SACC 患者的性别或年龄未发现统计学意义。

3 讨论

目前发现多种 lncRNA 参与多种肿瘤生物功能的调控,包括增殖、凋亡、自噬、迁移和侵袭,是后基因组时代的重要发现^[6-7],lncRNA 的异常表达通过顺式或者反式作用参与肿瘤的发生发展,可能

表1 ADAMTS9-AS2 表达与 102 例 SACC 患者的临床病理特征之间的关系

Table 1 Correlation of clinicopathologic status and the expression of lncRNA ADAMTS9-AS2 in the SACC patients

Clinical Features	ADAMTS9-AS2 (%)		Chi-Square Value	P
	Overexpression	Low Expression		
Gender				
Male	24 (47.1)	27 (52.9)	1.417	0.234
Female	30 (58.8)	21 (41.2)		
Age				
< 50	22 (52.4)	20 (47.6)	0.009	0.924
≥ 50	32 (53.3)	28 (46.7)		
Tumor size				
T ₁₋₂	21 (41.2)	30 (58.8)	5.667	0.017
T ₃₋₄	33 (64.7)	18 (35.3)		
Clinical stages				
I - II	19 (41.3)	27 (58.7)	4.554	0.033
III - IV	35 (62.5)	21 (37.5)		
Distant Metastasis				
No	17 (40.5)	25 (59.5)	4.453	0.035
Yes	37 (61.7)	23 (38.3)		
Survival status				
Survival	15 (30.6)	34 (69.4)	18.872	0.000
Death	39 (73.6)	14 (26.4)		

成为肿瘤辅助诊断或治疗的新靶点^[8-11]。

由于目前对 lncRNA 在 SACC 侵袭、转移中的作用研究甚少,本研究初步探讨 lncRNA 是否参与调控 SACC 发生发展,筛选出促进 SACC 侵袭、转移的关键 lncRNA,为进一步的机制研究提供基础。本研究使用 lncRNA 表达谱芯片来筛选 SACC 肺转移株 SACC-LM 细胞和原发灶 SACC-83 细胞中的 lncRNA 表达谱。lncRNA 表达谱芯片及 qRT-PCR 结果显示,lncRNA ADAMTS9-AS2 是 SACC-LM 细胞内

上调最明显的 lncRNA, ADAMTS9-AS2 是蛋白质编码基因 ADAMTS9 的反义转录物^[12], 在高转移细胞系 SACC-LM 细胞内上调表明其在 SACC 的发生、发展和侵袭、转移中可能发挥重要作用, 它的表达水平可能与 SACC 侵袭、转移能力相关。通过敲低 ADAMTS9-AS2, SACC-LM 细胞的迁移和侵袭能力显著下降, 提示在 SACC 的侵袭转移过程中, ADAMTS9-AS2 可能扮演了重要角色, 它的高表达提高了 SACC-LM 迁移和侵袭能力。SACC 患者临床病理特征显示, lncRNA ADAMTS9-AS2 是 SACC 组织上调明显的 lncRNA, 肿瘤体积大、临床分期晚, 则 ADAMTS9-AS2 表达水平高, 提示 ADAMTS9-AS2 的高表达参与促进了 SACC 的发生发展过程。在远处转移病例中, ADAMTS9-AS2 呈高表达, 且差异有统计学意义, 说明 ADAMTS9-AS2 在 SACC 侵袭转移过程中起重要作用。一般情况下, 肿瘤的侵袭性、转移性越强, 则肿瘤患者的预后就越差, ADAMTS9-AS2 高表达, 相应患者的预后就越差, 差异有统计学意义, ADAMTS9-AS2 可能可以成为 SACC 预后不佳的标志物之一。但也有研究表明, ADAMTS9-AS2 在某些种类的肿瘤中却起到了不同的作用, 例如 ADAMTS9-AS2 在肺癌低表达, 它通过 PI3K/Akt 途径抑制肺癌细胞增殖, 迁移和侵袭^[13]。高表达的 ADAMTS9-AS2 通过 miR-223-3p/TGF β 3 轴抑制卵巢癌发生发展^[14], 与本研究的结论不一致, 可能 ADAMTS9-AS2 在不同肿瘤中其生物学功能不同。有研究发现 ADAMTS9-AS2 发挥竞争性内源性 RNA 作用, 直接靶向 miRNA 及其靶基因以促进头颈癌进展^[15], 比如 miR-600/EZH2 可以抑制肿瘤进展, 在舌鳞癌中, ADAMTS9-AS2 与 miR-600 内源性竞争 EZH2, 而起到促进肿瘤侵袭转移的作用^[16]。

本研究证实了 lncRNA ADAMTS9-AS2 在发生转移的 SACC 样本和高转移潜力的 SACC-LM 细胞内特异性高表达, ADAMTS9-AS2 的表达与 SACC 的预后及临床病理特征密切相关。下一步将重点研究 ADAMTS9-AS2 内源性竞争 RNA 比如 miR-600/EZH2 等的具体机制, 来进一步阐明 ADAMTS9-AS2 促进 SACC 肿瘤发生发展侵袭转移的作用机制。

参考文献

- [1] Dodd RL, Slevin NJ. Salivary gland adenoid cystic carcinoma: a review of chemotherapy and molecular therapies[J]. *Oral Oncol*, 2006, 42(8): 759-769.
- [2] Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Bradley PJ, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--an update[J]. *Oral Oncol*, 2015, 51(7): 652-61.

- [3] Megwalu UC, Sirjani D. Risk of nodal metastasis in major salivary gland adenoid cystic carcinoma[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2017, 156(4): 660-664.
- [4] Li Q, Huang P, Zheng C, et al. Prognostic significance of p53 immunohistochemical expression in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17): 29458-29473.
- [5] Bussari S, Jeergal PA, Sarode M, et al. Evaluation of proliferative marker Ki-67 in adenoid cystic carcinoma: a retrospective study [J]. *J Contem P Dent Pract*, 2019, 20(2): 211-215.
- [6] Yang QQ, Deng YF. Long non-coding RNAs as novel biomarkers and therapeutic targets in head and neck cancers[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(4): 1286-92.
- [7] Jiang C, Li X, Zhao H, et al. Long non-coding RNAs. potential new biomarkers for predicting tumor invasion and metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 62.
- [8] Li J, Zhu Y, Wang H, et al. Targeting long noncoding RNA in glioma: a pathway perspective[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 13: 431-441.
- [9] Peng F, Shi X, Meng Y, et al. Long non-coding RNA HOTTIP is upregulated in renal cell carcinoma and regulates cell growth and apoptosis by epigenetically silencing of LATS2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 1133-1140.
- [10] Osielska MA, Jagodzinski PP. Long non-coding RNA as potential biomarkers in non-small-cell lung cancer: what do we know so far? [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 322-333.
- [11] Li CH, Chen, Y. Targeting long non-coding RNAs in cancers. progress and prospects[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(8): 1895-1910.
- [12] Cao B, Liu C, Yang G. Down-regulation of lncRNA ADAMTS9-AS2 contributes to gastric cancer development via activation of PI3K/Akt pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 185-193.
- [13] Liu C, Yang Z, Deng Z, et al. Upregulated lncRNA ADAMTS9-AS2 suppresses progression of lung cancer through inhibition of miR-223-3p and promotion of TGFBR3[J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(6): 536-546.
- [14] Wang A, Jin C, Li H, et al. LncRNA ADAMTS9-AS2 regulates ovarian cancer progression by targeting miR-182-5p/FOXF2 signaling pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt B): 1705-1713.
- [15] Demircan K, Gunduz E, Gunduz M, et al. Increased mRNA expression of ADAMTS metalloproteinases in metastatic foci of head and neck cancer[J]. *Head Neck*, 2009, 31(6): 793-801.
- [16] Li Y, Wan Q, Wang W, et al. LncRNA ADAMTS9-AS2 promotes tongue squamous cell carcinoma proliferation, migration and EMT via the miR-600/EZH2 axis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108719.

(编辑 周春华, 曾曙光)



官网



公众号