

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.002

lncRNA DN3OS 在喉鳞状细胞癌组织和细胞中的表达及其临床和生物学意义

王晶田^a, 赵岩^a, 刘胜辉^a, 石健^a, 吴干勋^a, 沈素朋^b (河北医科大学第四医院 a. 耳鼻喉头颈外科, b. 生物标本库 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 检测 lncRNA DN3OS 在喉鳞状细胞癌 (laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC) 组织和 LSCC 细胞株中的表达及其临床意义, 探讨其对 LSCC TU177 细胞体外增殖、迁移及侵袭的影响, 并分析 DN3OS 与 EMT 的关系。**方法:** 从河北医科大学第四医院生物标本库选取 2014 年 3 月至 2018 年 12 月收治的 68 例 LSCC 患者手术切除的癌及癌旁组织标本, 应用 qPCR 法检测 DN3OS 在 LSCC 组织和细胞株中的表达水平。采用 siRNA 敲低 TU177 细胞中 DN3OS 的表达, 应用 MTS、克隆形成及 Transwell 小室等方法分别检测敲低 DN3OS 表达对 TU177 细胞增殖、迁移和侵袭等生物学行为的影响。应用 qPCR 和 WB 法检测转染 si-DN3OS 后对 EMT 标志物上皮钙黏素 (E-cadherin)、神经钙黏素 (N-cadherin)、波形蛋白 (vimentin)、扭曲蛋白 (twist)、锌指转录因子 2 (SNAI2) mRNA 和蛋白的变化。**结果:** LSCC 组织中 DN3OS 表达水平明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$), 并与患者的 TNM 分期、淋巴结转移及生存期有关联 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。DN3OS 在 LSCC 细胞株 (Hep-2、AMC-HN-8、TU177、TU212 及 TU686) 中均呈现不同程度的高表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 转染 si-DN3OS 后 TU177 细胞中 DN3OS 的表达显著降低 ($P < 0.01$)。与对照组相比, DN3OS 表达敲低可抑制 TU177 细胞的体外增殖、迁移和侵袭能力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 可上调 TU177 细胞中 E-cadherin 的表达而下调 N-cadherin、vimentin、twist 和 SNAI2 的表达 (均 $P < 0.01$)。**结论:** DN3OS 高表达与 LSCC 的恶性进展有关, 其可能为预测 LSCC 患者预后的潜在指标; DN3OS 可能通过影响 EMT 进程促进 LSCC 细胞的侵袭和转移。

[关键词] lncRNA DN3OS; 喉鳞状细胞癌; TU177 细胞; 预后; 侵袭; 迁移; 上皮-间质转化

[中图分类号] R739.65; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)12-1160-08

Expression of lncRNA DN3OS in laryngeal squamous cell carcinoma tissues and cells and its clinical and biological significance

WANG Jingtian^a, ZHAO Yan^a, LIU Shenghui^a, SHI Jian^a, WU Ganxun^a, SHEN Supeng^b (a. Ent Head and Neck Surgery, b. Biological Specimen Library, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression and clinical significance of lncRNA DN3OS (dynamamin 3 opposite strand/antisense RNA) in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) tissues and cell lines, and to investigate its effects on *in vitro* proliferation, migration and invasion of LSCC TU177 cells, as well as to discuss the relationship between DN3OS and epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods:** Sixty-eight pairs of cancer and corresponding para-cancerous tissues from LSCC patients that admitted for surgery from March 2014 to December 2018 were collected from the biological specimen bank of the Fourth hospital of Hebei Medical University. The level of DN3OS expression in LSCC tissues and cell lines was detected by qPCR. siRNA was used to knockdown DN3OS expression in TU177 cell. MTS, colony formation and Transwell chamber assays were performed to detect the effect of DN3OS knockdown on proliferation, migration and invasion of TU177 cells. qPCR and WB methods were used to detect the mRNA and protein expression of EMT-related markers, such as E-cadherin, N-cadherin, vimentin, twist, and SNAI2 after DN3OS knockdown. **Results:** The expression level of DN3OS in LSCC tissues was markedly higher than that in para-cancerous tissues ($P < 0.01$). Upregulated DN3OS expression was related to TNM stage, lymph node metastasis, and survival of patients with LSCC ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Furthermore, DN3OS was highly expressed in five LSCC cell lines (Hep-2, AMC-HN-8, TU177, TU212, and TU686) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of DN3OS was significantly decreased in TU177 cells after transfection of si-

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题资助项目 (No. 20180588, No. 20201511)。Project supported by the Key Project of Medical Science Research of Hebei Province (No. 20180588, No. 20201511)

[作者简介] 王晶田 (1985—), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事头颈部肿瘤相关的基础与临床研究, E-mail: wangjingtian9985@sina.com

[通信作者] 沈素朋 (SHEN Supeng, corresponding author), 博士, 助理研究员, E-mail: shsyssp2012@163.com

DNM3OS ($P<0.01$). Compared with the control group, DNM3OS knockdown could suppress the *in vitro* proliferation, migration and invasion of TU177 cells (all $P<0.01$), upregulate the expression level of E-cadherin, while down-regulate the expression of N-cadherin, vimentin, twist and SNAI2 in TU177 cells (all $P<0.01$). **Conclusion:** DNM3OS overexpression is related to the malignant progression of LSCC, which may be a potential prognostic marker for LSCC patients. DNM3OS may promote the invasion and metastasis of LSCC cells by mediating EMT.

[Key words] lncRNA dynamin 3 opposite strand/antisense RNA(lncRNA DNM3OS); laryngeal squamous cell carcinoma(LSCC); TU177 cells; prognosis; invasion; migration; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[Chin J Cancer Biother, 2021, 27(12): 1160-1167. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.002]

喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)是一种起源于喉黏膜上皮的常见的头颈部恶性肿瘤,LSCC每年新发病例约占全球系统性恶性肿瘤的2.4%,2018年约有95 000人死于喉癌^[1-2]。由于LSCC发病比较隐匿,多数患者就诊时已处于晚期^[3]。术后LSCC患者的声音、呼吸和吞咽功能可能严重受损,预后较差,严重影响患者的生活质量^[4]。目前关于LSCC发生发展的确切分子机制和预后因素仍不清楚。因此,寻找LSCC有效的分子标志物对改善LSCC的诊断、治疗和预后具有重大意义。DNM3OS是动力蛋白3(dynamin 3, DNM3)基因的反义链RNA,也称为DNM3-AS1或MIR199A2HG,位于人DNM3基因的内含子内。由于该RNA仅包含短且保守性很差的开放阅读框,并且其长度超过200个核苷酸,故被归类为lncRNA^[5-6]。越来越多的证据表明, DNM3OS参与了肿瘤的进展,其在食管鳞状细胞癌中高表达并可以增加肿瘤细胞对放疗的抵抗能力^[7];其在肝癌中高表达,可能与肝癌患者的不良预后有关^[8]。EMT参与多种肿瘤的恶性进展,其中包括肿瘤发生、恶性进展、肿瘤细胞干性、肿瘤细胞迁移、肿瘤血管形成、肿瘤转移及增加细胞对化疗药物抵抗,使细胞具有更强的迁移和侵袭能力^[9-10]。DNM3OS表达上调可以促进卵巢癌和胃癌的EMT进程,进一步促进肿瘤的迁移和侵袭^[11-12]。然而,关于DNM3OS在LSCC中扮演的角色及发挥的作用尚未见报道。本研究检测DNM3OS在LSCC组织中的表达情况并分析其临床意义,同时在体外水平探讨DNM3OS对LSCC细胞生物学行为的影响及潜在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 组织标本与临床资料

从河北医科大学第四医院生物标本库选取2014年3月至2018年12月收治的68例LSCC手术患者的肿瘤组织及对应的癌旁黏膜组织标本,且所有组织均经病理证实为LSCC,癌旁组织为喉正常或炎性病变黏膜。所有患者术前均未接受放疗和化疗。病例结构:男性52例、女性16例;中位年龄60岁(45~77岁),<60岁31例、≥60岁37例;吸烟量<400支/年的病

例共19例,≥400支/年的病例共49例。临床分型:声门上型27例、声门型31例、声门下型10例;按照WHO肿瘤病理学分级标准:高分化(G1)组6例、中分化(G2)组41例、低分化(G3)组21例;TNM分期按照国际抗癌协会TNM分类及分期标准(2002)判断:I+II期33例、III+IV期35例、无淋巴结转移组(N0)42例、有淋巴结转移组(N+)6例。手术切除标本一部分常规制作蜡块行H-E染色,用于病理诊断;一部分新鲜标本放入-80℃低温冰箱保存,用于提取总RNA。68例LSCC患者均有完整的随访资料,均采用电话随访方式。随访截止日期为2020年4月,共有5例患者失访。研究方案经医院伦理委员会批准同意,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 细胞及主要试剂

5株LSCC细胞(Hep-2、AMC-HN-8、TU177、TU212及TU686)均购自美国ATCC细胞库。AMC-HN-8细胞用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM培养液培养,Hep-2、TU177、TU212及TU686细胞均用含10%FBS的RPMI 1640培养液培养,置于37℃、5%CO₂的培养箱中常规培养;每日更换培养液,待细胞汇合至80%以上时,用0.25%胰酶消化传代。

逆转录试剂盒购自瑞士Roche公司,胎牛血清购自美国BI公司,RPMI 1640及DMEM培养液均购自美国Gibco公司,Lipofectamine™2000(Lip2000)转染试剂、MTS试剂均购自美国Promega公司,Transwell小室和人工基膜(matrigel)均购自美国Corning公司,si-DNM3OS及对照si-NC由上海吉玛基因公司合成,实验所用引物均由上海生工公司合成,WB所用一抗(兔抗人E-cadherin、N-cadherin、vimentin、twist、SNAI2及β-actin单克隆抗体)购自武汉Elabscience有限公司,二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG)购自美国KPL公司,ECL发光剂购自北京索莱宝生物科技有限公司,人重组TGF-β1购自美国R&D公司。si-DNM3OS RNA1序列Forward(F): 5'-GCAUGGCCCUAUAGUAAUUTT-3',Reverse(R): 5'-AUUAAACUAUAGGGCCAUGCTT-3'; si-DNM3OS RNA2序列F: 5'-GCUGCUGUUUCC-AUGUAAATT-3', R: 5'-UUUACAUGGAAACAGCAG-

CTT-3'; si-NC F: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', R: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'.

1.3 qPCR 法检测 DN3OS 在 LSCC 组织和不同 LSCC 细胞中的表达

总 RNA 的提取及逆转录: 取适量组织置于 EP 管中, 加入匀浆珠及 1 ml TRIzol 裂解液, 使用匀浆器充分研磨组织; 细胞标本用冷 PBS 冲洗 3 次, 加入 1 ml TRIzol 完全混匀, 将细胞悬液移入 EP 管, 然后在低温下提取组织及细胞中的总 RNA。将提取的总 RNA 逆转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 qPCR 检测, 以 β -actin 作为组织表达的内参照, 对照组 (Pool) 为随机取 10 例癌旁组织的 cDNA 混合。qPCR 引物序列分别为 DN3OS F: 5'-GTCAGCGCAGCAGAATTCAG-3', R: 5'-CGGCAGTCTTTTCTCAGCAG-3'; β -actin F: 5'-ACCGAGCGCGCTACAG-3', R: 5'-CTTAATGTCACLSCCGATTCC-3'。反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s、56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。扩增产物 4 °C 保存。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.4 细胞转染

选择生长状态良好的 TU177 细胞接种于 6 孔板 (2×10^5 个/孔), 于光学显微镜下观察, 待每孔细胞汇合度达到 80% 时进行转染。配制转染试剂: 每孔中加入 5 μ l siDN3OS 或 si-NC, 以转染试剂 Lip2000 介导进行转染, 室温孵育 5 min; 将 siRNA 和 Lip2000 混合后, 室温孵育 20 min; 实验组和 NC 组加入转染试剂量分别是 250 μ l, 常规培养 48 h 后, 收集细胞提取总 RNA, qPCR 检测干扰效率。

1.5 克隆形成实验检测 si-DNM3OS 对 LSCC 细胞克隆形成能力的影响

将转染 si-DNM3OS/si-NC 的 TU177 细胞培养 24 h 后常规消化, 悬浮于含 10% FBS 的培养基中调整细胞密度, 以每孔 5 000 个细胞分别接种于 6 孔板, 体系为 2 ml 培养基, 常规培养 6~7 d, PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定

20 min 后用 0.1% 结晶紫染色 20 min, 将 6 孔板倒置晾干, 倒置显微镜下计算克隆 (以大于 50 个细胞计为 1 个克隆) 形成率。克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数 \times 100%。

1.6 MTS 实验检测转染 si-DNM3OS 对 LSCC 细胞增殖能力的影响

将转染 si-DNM3OS/si-NC 的 TU177 细胞培养 24 h 后常规消化, 悬浮于含 10% FBS 的培养基中调整细胞密度, 以每孔 100 μ l 含有 1 000 个细胞接种于 96 孔板, 每组设置 6 个复孔。分别在细胞贴壁后 0、24、48、72 和 96 h 分别在每孔加入 MTS 试剂 20 μ l (终质量浓度为 500 μ g/ml), 培养箱培养 2~4 h 后, 酶标仪测定 492 nm 处的光密度 (D) 值, 绘制增殖曲线来描述细胞的增殖水平。

1.7 Transwell 实验检测 si-DNM3OS 对 LSCC 细胞迁移和侵袭能力的影响

迁移实验: 将转染 si-DNM3OS/si-NC 的 TU177 细胞培养 24 h 后用无血清培养基饥饿培养 4 h, 然后收集细胞使其悬浮于无血清的培养基中, 调整细胞密度并以每室 1×10^5 个细胞接种于上室中, 加入无血清培养基补齐 200 μ l, 下室加 600 μ l 含 10% FBS 的完全培养基。常规培养 24 h 后取出小室, 用棉签轻轻擦拭上室内的细胞, PBS 洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min, 显微镜下观察进行穿膜细胞计数。

侵袭实验: 用无血清培养基按照按 1:7 的比例稀释基质胶, 向上层小室中加入 20 μ l, 迅速晃动使基质胶均匀铺满小室底面, 注意不要产生气泡, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待基质胶凝固后使用。其余实验步骤同细胞 Transwell 小室迁移实验。

1.8 qPCR 法检测 si-DNM3OS 在转录水平对 LSCC 细胞中 EMT 相关基因表达的影响

应用 qPCR 法检测转染 si-DNM3OS 对 TU177 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、twist 及 SNAI2 的 mRNA 的表达情况。步骤及表示方法同 1.3, 所用引物、退火温度及目的基因产物大小见表 1。

表 1 qPCR 引物序列及反应条件

Tab.1 Primer sequences and reaction conditions of qPCR

| Gene | Primer sequence | Annealing temperature (°C) | Product size (bp) |
|------------|--|----------------------------|-------------------|
| E-cadherin | F: 5'-CGAGAGCTACACGTTTCACGG-3' R: 5'-GGCCTTTTGACTGTAATCACACC-3' | 60 | 162 |
| N-cadherin | F: 5'-CAACTTGCCAGAAAAGTCCAGG-3' R: 5'-ATGAAACCGGGCTATCTGCTC-3' | 59 | 205 |
| Vimentin | F: 5'-CGCCTLSCCGATGAGATTCAG-3' R: 5'-TCAGGGAGGAAAAGTTTGGAAA-3' | 58 | 175 |
| Twist | F: 5'-ACCATCCTCACACCTCTG-3' R: 5'-GATTGLSCCGACCTCTTG-3' | 60 | 132 |
| SNAI2 | F: 5'-GCCAACTACAGCGAACTGG-3' R: 5'-GATGGGGCTGTATGCTCCTG-3' | 56 | 121 |

1.9 WB 法检测 si-DNM3OS 对 LSCC 细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响

收集将转染 si-DNM3OS/si-NC 的 TU177 细胞培养 48 h 后, 收集细胞并加入含 1%PMSF 的 RIPA 裂解液, 提取细胞总蛋白。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。取适量蛋白样品 (40 μg/孔) 进行 12% SDS-PAGE。电泳结束后, 将分离后的蛋白转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入稀释后的一抗 (兔抗人 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、twist、SNAI2 及 β-actin 单克隆抗体, 抗体稀释比例均为 1:1 000), 在摇床上 4 °C 过夜, 用 TBST 清洗膜 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的上样抗兔 IgG (稀释比例为 1:10 000), 室温结合 1 h 后用 TBST 清洗, 进行 ECL 发光、凝胶成像显影。采用 ImageJ 软件对蛋白条带进行分析, 以目的蛋白和内参条带的灰度比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。所有实验均独立重复 3 次, 符合正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。DNM3OS 在 LSCC 组织及相应癌旁正常组织中的表达差异采用配对 *t* 检验, 其与 LSCC 患者临床病理参数间的关系采用卡方检验进行分析; 两独立样本比较采用 *t* 检验或近似 *t* 检验。以上均为双侧检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DN3OS 在 LSCC 组织中表达并与 TNM 分期等临床病理特征有关联

qPCR 检测结果显示, 与对照组 (1.12±0.55) 相比, DN3OS 在 LSCC 组织中的相对表达量 (6.19±2.47) 显著升高 ($P < 0.01$, 图 1)。DNM3OS 的中位表达量为 5.959, 因此, 将 DN3OS 表达量大于 5.959 定义为高表达 ($n=34$), DN3OS 表达量小于等于 5.959 定义为低表达 ($n=34$)。分析结果显示, DN3OS 表达水平与患者 TNM 分期、病理分级、淋巴结转移及患者病死率有关联 (均 $P < 0.05$), 而与年龄、性别、吸烟及临床分型无关 ($P > 0.05$, 表 2)。

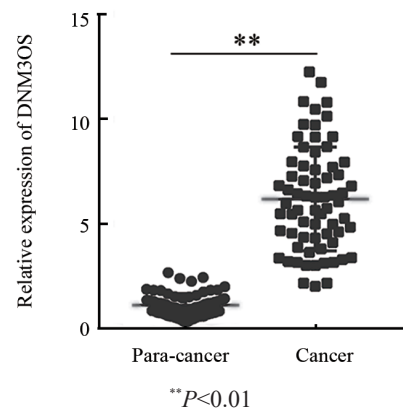


图1 DN3OS 在 LSCC 组织中高表达

Fig. 1 DN3OS expression was high in LSCC tissues

表 2 LSCC 组织中 DN3OS 表达与患者临床病理特征的关系

Tab.2 Relationship between DN3OS expression and clinicopathological features in LSCC patients

| Characteristic | N | DN3OS expression [n (%)] | | P |
|------------------------------|----|--------------------------|-----------|--------|
| | | High | Low | |
| Age (t/a) | | | | |
| <60 | 31 | 14(45.16) | 17(54.84) | 0.464 |
| ≥60 | 37 | 20(54.05) | 17(45.95) | |
| Gender | | | | |
| Male | 52 | 27(51.92) | 25(48.08) | 0.567 |
| Female | 16 | 7(43.75) | 9(56.25) | |
| Smoking history | | | | |
| <400 | 19 | 9(47.37) | 10(52.63) | 0.787 |
| ≥400 | 49 | 25(51.02) | 24(48.98) | |
| Clinical classification | | | | |
| Supraglottic | 27 | 11(40.74) | 16(59.26) | 0.446 |
| Glottic | 31 | 17(54.84) | 14(45.16) | |
| Subglottic | 10 | 6(60.0) | 4(40.0) | |
| Pathological differentiation | | | | |
| Well/moderate | 47 | 18(38.30) | 29(61.70) | 0.004 |
| Poor | 21 | 16(76.19) | 5(23.81) | |
| TNM stage | | | | |
| I+II | 33 | 11(33.33) | 22(66.67) | 0.080 |
| III+IV | 35 | 23(65.71) | 12(34.29) | |
| Lymph node metastasis | | | | |
| Negative(N0) | 42 | 13(30.95) | 29(69.05) | <0.001 |
| Positive(N+) | 26 | 21(80.77) | 5(19.23) | |
| Mortality | | | | |
| Survive | 37 | 13(35.14) | 24(64.86) | 0.007 |
| Die | 31 | 21(67.74) | 10(32.26) | |

2.2 DNM3OS 表达与 LSCC 患者的生存期呈负相关

对 68 例 LSCC 患者进行随访, 随访时间为 4-68 个月, 截止 2020 年 4 月, 共 5 人失访, 失访率为 7.35%。利用 Kaplan-Meier 方法和 Log-Rank 检验分析 DNM3OS 表达与 LSCC 患者 OS 的关系, 结果(图 2)显示, DNM3OS 高表达患者的 OS 显著低于 DNM3OS 低表达患者($P < 0.01$)。

进一步采用 COX 回归模型分析患者年龄、性别、吸烟史、临床分型、TNM 分期、病理分级、淋巴结转移及 DNM3OS 表达与患者生存的相关性, 结果显示, 淋巴结转移($P = 0.032$)及 DNM3OS 表达水平($P = 0.021$)可作为影响 LSCC 患者预后的独立危险因素(表 3)。

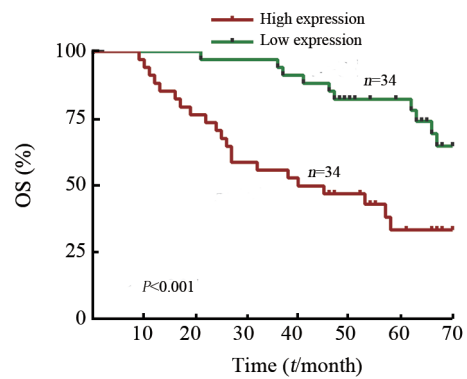


图 2 应用 Kaplan-Meier 方法对 LSCC 患者进行生存分析
Fig.2 Survival analysis of LSCC patients with Kaplan-Meier method

表 3 影响 LSCC 患者预后的单因素和多因素回归分析

Tab.3 Univariate and multivariate analysis of prognostic factors for LSCC patients

| Variable | Univariate analysis | | Multivariate analysis | |
|---|---------------------|-------|-----------------------|-------|
| | HR (95% CI) | P | HR (95% CI) | P |
| Age (<58 vs ≥58) | 1.452(0.717-2.940) | 0.300 | 0.565(0.260-1.228) | 0.149 |
| Gender (male vs female) | 1.093(0.471-2.538) | 0.836 | 1.122(0.406-3.099) | 0.824 |
| Smoking history (<400 vs ≥400) | 0.939(0.432-2.039) | 0.873 | 0.857(0.358-2.050) | 0.728 |
| Clinical classification (supraglottic/glottic/subglottic) | 1.413(0.850-2.384) | 0.182 | 1.579(0.902-2.765) | 0.110 |
| Pathological differentiation (well/moderate vs poor) | 2.487(1.208-5.120) | 0.013 | 1.902(0.898-4.029) | 0.093 |
| TNM stage (I + II vs III+IV) | 2.330(1.095-4.955) | 0.028 | 2.432(0.928-6.375) | 0.071 |
| Lymph node metastasis (negative vs positive) | 3.427(1.669-7.038) | 0.001 | 2.345(1.076-5.111) | 0.032 |
| DNM3OS (high vs low) | 3.738(1.728-8.088) | 0.001 | 2.659(1.158-6.106) | 0.021 |

2.3 DNM3OS 在 LSCC 细胞株中呈高表达

qPCR 检测结果(图 3A)显示, 与对照组相比, DNM3OS 在 5 株 LSCC 细胞中的表达呈不同程度的升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中 TU177 细胞的表达最高, 故选用 TU177 细胞进行后续转染实验

进一步在 TU177 细胞中转染 si-DNM3OS, qPCR 检测转染效率, 结果(图 3B)显示, 与 si-NC 组相比, 转染 si-DNM3OS 后 TU177 细胞中 DNM3OS 的表达水平显著降低($P < 0.01$), 提示转染成功, 可进行后续功能实验。

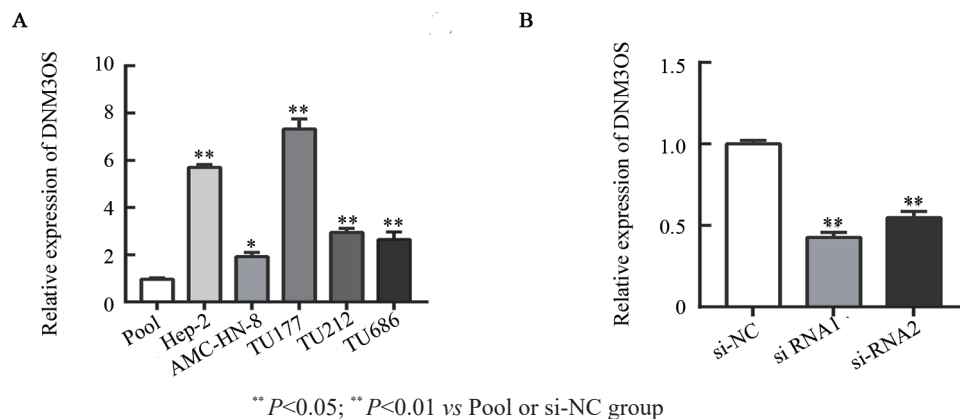


图 3 qPCR 法检测 DNM3OS (A) 在 LSCC 细胞株中的表达水平及转染效率(B)

Fig.3 The expression of DNM3OS (A) in LSCC cell lines detected by qPCR and the transfection efficiency of siRNA (B)

2.4 敲低 DNM3OS 表达可抑制 TU177 细胞的克隆形成及增殖能力

克隆形成实验结果(图 4)显示, DNM3OS 敲低组 TU177 细胞克隆形成数显著低于对照组[(129.00±

19.67) vs (226.33±25.32)个, $P<0.01$ 。MTS 实验结果(图5)显示, 转染 si-DNM3OS 48 h 和 72 h 后, DN3OS 敲低组 TU177 细胞的增殖能力显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

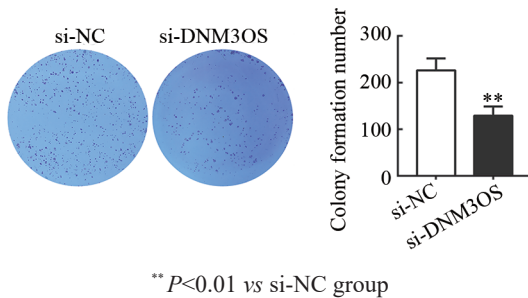
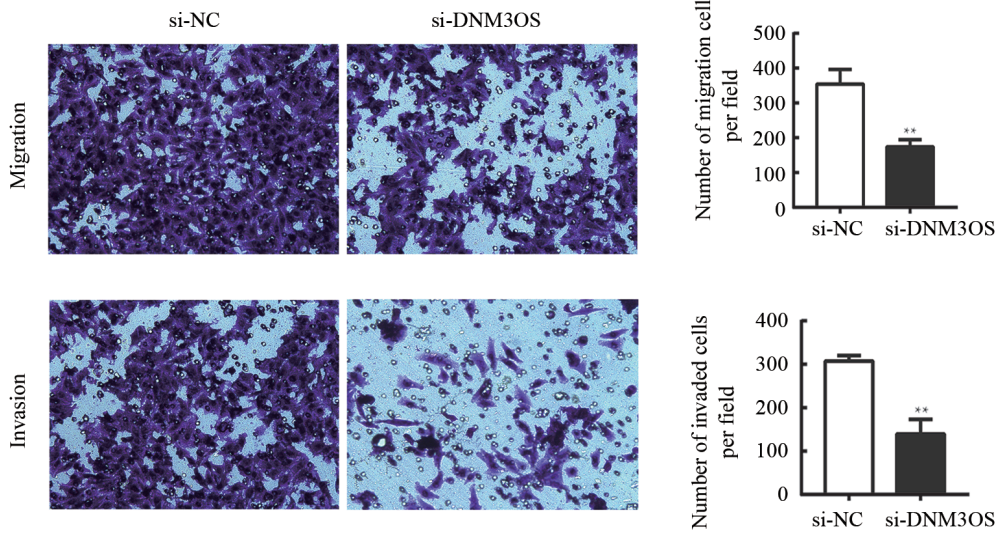


图4 克隆形成实验检测敲低DNM3OS后TU177细胞的克隆形成能力

Fig.4 The colony formation ability of TU177 cells after DN3OS knock-down was detected by colony formation assay

2.5 敲低DNM3OS表达可抑制TU177细胞的迁移和侵袭能力

Transwell 小室迁移实验结果(图6)显示,



** $P<0.01$ vs si-NC group

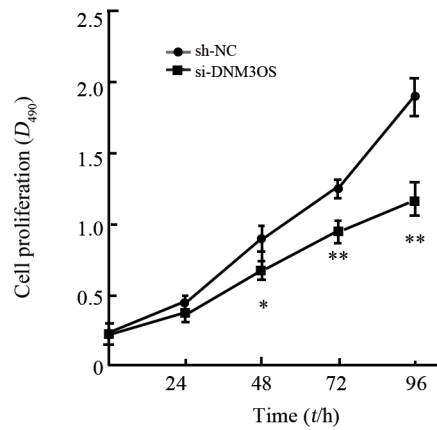
图6 Transwell小室实验检测敲低DNM3OS后TU177细胞的迁移和侵袭能力减弱(×200)

Fig.6 DN3OS knock-down decreased the migration and invasion ability of TU177 cells (Transwell chamber assay, ×200)

2.6 敲低DNM3OS表达对LSCC细胞中EMT相关分子mRNA和蛋白水平的影响

qPCR(图7A)和WB法(图7B)检测结果显示, 在TU177细胞中敲低DNM3OS表达, 可以使E-cadherin mRNA和蛋白表达升高($P<0.01$), 而N-cadherin、vimentin、twist及SNAI2的mRNA及蛋白表达水平均显著降低(均 $P<0.01$)。

DNM3OS敲低组TU177细胞穿过小室底膜细胞数为(174.00±20.30)个, 较对照组的(354.33±42.00)个明显减少($P<0.01$); 侵袭实验(图6)显示, 实验组穿膜细胞数为(139.33±33.84)个, 较对照组的(307.33±13.05)个明显减少($P<0.01$)。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs si-NC group

图5 MTS实验检测敲低DNM3OS后TU177细胞的增殖能力 Fig.5 The proliferation ability of TU177 cells after DN3OS knock-down was detected by MTS assay

3 讨论

lncRNA广泛参与细胞的生物学过程, 并可能成为多种肿瘤的预后标志物及治疗靶点^[13]。目前已经发现多个lncRNA在LSCC中表达失调, MIR31HG高表达可能成为LSCC患者不良预后因素^[14]; H19在LSCC中高表达与患者的生存期呈反比, H19可以促

进LSCC细胞的迁移和侵袭;DGCR5在LSCC中表达上调可以激活Wnt信号通路进而诱导癌细胞的干性特征^[15];NEAT1在已经出现颈部淋巴结转移的LSCC患者中表达升高,干扰NEAT1表达可以阻滞LSCC细胞周期、促进凋亡^[16];血清UCA1高表达对LSCC的诊断具有重要意义^[17]。lncRNA DNM3OS在口腔鳞

状细胞癌^[18]、食管鳞状细胞癌^[7]、胃癌^[11]及卵巢癌^[12]等肿瘤中表达升高,且在肿瘤的进展中发挥重要作用,但其在LSCC中的作用及机制尚不清楚,所以本研究围绕DNM3OS与LSCC的关系探讨了其在LSCC进展中的作用。

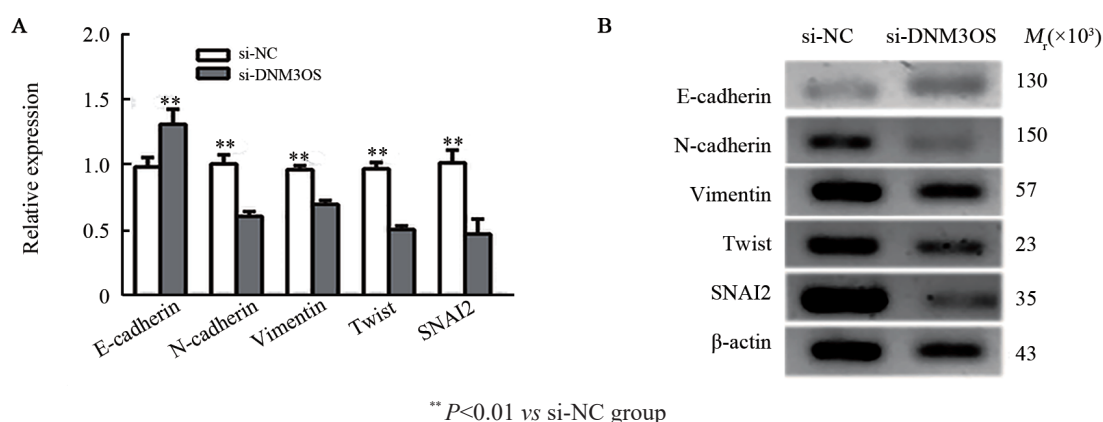


图7 qPCR和WB法检测DNM3OS表达敲低对EMT相关分子mRNA(A)和蛋白(B)表达水平的影响
 Fig.7 The mRNA (A) and protein (B) expression of EMT-related molecules in TU177 cells transfected with si-DNM3OS was detected by qPCR and WB method

本研究首先检测DNM3OS在LSCC组织及细胞中的表达情况,证实了DNM3OS在LSCC组织及LSCC细胞中均呈高表达,且与肿瘤的恶性进展和转移密切相关。进一步生存分析发现,DNM3OS可能可以预测LSCC患者的预后。研究^[7]显示,DNM3OS与食管鳞状细胞癌的进展密切相关,DNM3OS表达上调可以在体内外降低食管癌细胞对放射治疗的敏感性。在胃癌中,DNM3OS是其独立的预后影响因素。本研究中Kaplan-Meier生存曲线分析结果显示,DNM3OS高表达的LSCC患者生存率低于其低表达的患者。单因素和多因素COX回归模型分析进一步提示,DNM3OS是LSCC患者总体生存的独立预后因素。

进一步通过siRNA转染法敲低TU177细胞中DNM3OS基因的表达,结果发现,敲低DNM3OS表达可以抑制LSCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力。这些结果均提示DNM3OS参与LSCC的恶性进展。

EMT是使细胞间黏附复合物松散、细胞失去其上皮特征并获得间质特征的生物学过程,发生EMT时其相关的标志物水平也发生了相应变化,例如上皮分子E-cadherin、紧密连接蛋白1(zonula occludens-1,ZO-1)的表达降低,而间充质基因N-cadherin、vimentin、fibronectin蛋白及EMT相关转录因子twist、snail和SNAI2等的表达升高^[10]。并且在大多数情况下E-cadherin蛋白的丢失标

志着EMT的发生,基因的改变导致许多表型发生变化,例如细胞形态的变化^[19]。最初的研究^[20]表明twist1可以促进DNM3OS的转录活性。在多种疾病中DNM3OS作为TGF-β途径的关键效应分子发挥重要作用,在卵巢癌中TGF-β诱导SKOV3细胞发生EMT,检测发现,DNM3OS表达显著升高,DNM3OS可以调节EMT相关标志物如E-cadherin、N-cadherin及相关转录因子的表达,影响卵巢癌细胞EMT,进而促进卵巢癌的侵袭和转移^[12]。WANG等^[11]研究表明,DNM3OS表达下调可以抑制snail介导的EMT,进而抑制了胃癌细胞的迁移和侵袭^[20]。为了研究DNM3OS通过何种机制发挥作用,本研究又进一步在敲低DNM3OS基因的细胞中检测发现EMT相关分子E-cadherin表达上调,而N-cadherin、vimentin、twist、SNAI2表达下调。因此推测DNM3OS可能通过调控EMT进程而促进LSCC侵袭和转移。

综上所述,DNM3OS在LSCC的发生发展中发挥致癌基因的作用,其可以用作患者的预后指标,也可能成为LSCC免疫治疗的潜在靶点。

[参考文献]

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin,

- 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [2] LU C, SHI X, WANG A Y, et al. RNA-Seq profiling of circular RNAs in human laryngeal squamous cell carcinomas[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 86[2021-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5930968/>. DOI:10.1186/s12943-018-0833-x.
- [3] GAO W, ZHANG C, LI W, et al. Promoter methylation-regulated miR-145-5p inhibits laryngeal squamous cell carcinoma progression by targeting FSCN1[J/OL]. *Mol Ther*, 2019, 27(2): 365-379[2021-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6369713/>. DOI:10.1016/j.ymthe.2018.09.018.
- [4] WU Y Y, ZHANG Y L, ZHENG X W, et al. Circular RNA circCORO1C promotes laryngeal squamous cell carcinoma progression by modulating the let-7c-5p/PBX3 axis[J/OL]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 99[2021-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7265647/>. DOI:10.1186/s12943-020-01215-4.
- [5] MORRIS K V, MATTICK J S. The rise of regulatory RNA[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(6): 423-437. DOI:10.1038/nrg3722.
- [6] SAVARY G, DEWAELES E, DIAZZI S, et al. The long non-coding RNA DN3OS is a reservoir of FibromiRs with major functions in lung fibroblast response to TGF- β and pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(2): 184-198. DOI: 10.1164/rccm.201807-1237oc.
- [7] ZHANG H, HUA Y, JIANG Z, et al. Cancer-associated fibroblast-promoted lncRNA DN3OS confers radioresistance by regulating DNA damage response in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(6): 1989-2000. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-18-0773.
- [8] WANG W, WANG Q, HUANG D B, et al. Tumor-associated mesenchymal stem cells promote hepatocellular carcinoma metastasis via a DN3OS/KDM6B/TIAM1 axis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 503: 19-31. DOI:10.1016/j.canlet.2021.01.011.
- [9] WEI C, YANG C G, WANG S Y, et al. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis[J/OL]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 64[2021-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6441214/>. DOI: 10.1186/s12943-019-0976-4.
- [10] SANTAMARIA P G, MORENO-BUENO G, PORTILLO F, et al. EMT: Present and future in clinical oncology[J/OL]. *Mol Oncol*, 2017, 11(7): 718-738[2021-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5496494/>. DOI:10.1002/1878-0261.12091.
- [11] WANG S, NI B, ZHANG Z, et al. Long non-coding RNA DN3OS promotes tumor progression and EMT in gastric cancer by associating with Snail[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(1): 57-62. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.02.030.
- [12] MITRA R, CHEN X, GREENAWALT E J, et al. Decoding critical long non-coding RNA in ovarian cancer epithelial-to-mesenchymal transition[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1604[2021-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5693921/>. DOI:10.1038/s41467-017-01781-0.
- [13] TAN Y T, LIN J F, LI T, et al. lncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer[J/OL]. *Cancer Commun (Lond)*, 2021, 41(2): 109-120[2021-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7896749/>. DOI: 10.1002/cac2.12108.
- [14] WANG R, MA Z, FENG L, et al. lncRNA MIR31HG targets HIF1A and P21 to facilitate head and neck cancer cell proliferation and tumorigenesis by promoting cell-cycle progression[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 162[2021-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6247607/>. DOI:10.1186/s12943-018-0916-8.
- [15] TANG T, SHAN G. DGCR5 promotes cancer stem cell-like properties of radioresistant laryngeal carcinoma cells by sponging miR-506 via Wnt pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18423-18431. DOI:10.1002/jcp.28478.
- [16] TIAN S Y, WANG C, ZHANG J, et al. The cox-filter method identifies respective subtype-specific lncRNA prognostic signatures for two human cancers[J/OL]. *BMC Med Genomics*, 2020, 13(1): 18[2021-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7003323/>. DOI:10.1186/s12920-020-0691-4.
- [17] COSSU A M, MOSCA L, ZAPPAVIGNA S, et al. Long non-coding rnas as important biomarkers in laryngeal cancer and other head and neck tumours[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3444[2021-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6678449/>. DOI: 10.3390/ijms20143444.
- [18] FANG X, TANG Z, ZHANG H, et al. Long non-coding RNA DN3OS/miR-204-5p/HIP₁ axis modulates oral cancer cell viability and migration[J]. *J Oral Pathol Med*, 2020, 49(9): 865-875. DOI:10.1111/jop.13047.
- [19] DU B W, SHIM J S. Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer [J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 965 [2021-08-10]. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsRW5nTmV3UzIwMjEwMzAyEhBNRFBjMDAwMDAwMTg4MDAwGghjOXJ0M2V1dQ%3D%3D>. DOI: 10.3390/molecules21070965.
- [20] WANG H, JI X. SMAD6, positively regulated by the DN3OS-miR-134-5p axis, confers promoting effects to cell proliferation, migration and EMT process in retinoblastoma[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 23[2021-08-10]. https://www.zhangqiaokeyan.com/academic-journal-foreign-pmc_cancer-cell-international_thesis/040006155369.html. DOI: 10.1186/s12935-020-1103-8.

[收稿日期] 2021-08-27

[修回日期] 2021-11-26

[本文编辑] 王润蓓, 沈志超