网络出版时间:2024 - 11 - 20 09:30:08 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1543.018

TRPP2 通过 UPR/AFT6/EpCAM 信号通路调节口腔鳞状细胞癌的迁移和侵袭

梁珠珠[1],陈 澍[1],孙倩玉[1],沈 兵[2],薛浩伟[1]
([1] 安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科,合肥 230022;
[2] 澳门科技大学中药质量研究国家重点实验室,澳门特别行政区 999078)

摘要 目的 研究瞬时受体多囊蛋白 2(TRPP2)在口腔鳞状上皮细胞的表达及其对口腔鳞状细胞癌(OSCC)侵袭和迁移的影响,初步探讨 TRPP2 影响 OSCC 转移的潜在信号通路。**方法** 利用规律性成簇间隔短回文重复序列核酸酶 9(CRISPR-Cas9)慢病毒质粒转染技术,构建 TRPP2 敲低的 OSCC 模型。免疫蛋白印迹技术(Western blot)验证 TRPP2 蛋白敲低效果。CCK-8 实验和克隆形成实验检测 TRPP2 对 OSCC 增殖的影响。RT-qPCR 法检测 TRPP2 对 OSCC 转移相关的靶基因。Western blot 和 qRT-PCR 检测与靶基因 EpCAM 及其与未折叠蛋白反应(UPR)相关转录因子表达。利用侵袭实验和划痕实验检测 TRPP2 对 OSCC 侵袭和迁移能力的影响。**结果** 与口腔上皮细胞 HOK 相比,OSCC 中 TRPP2 显著高表达。敲低 TRPP2,OSCC 增殖和克隆形成能力显著增强。与对照组相比,TRPP2 敲低转录谱中共 494 个差异基因显著表达,其中 234 个基因表达上调,260 个基因下调。其中与细胞黏附相关的上皮细胞黏附分子(EpCAM)基因上调表达。此外,与 UPR 相关基因 PERK、ATF6、GRP78 表达上调,而与 HOK 细胞相比,OSCC 中 ATF6 与 EpCAM 表达下调。敲低 TRPP2,OSCC 中 ATF6 与 EpCAM 表达上调,并降低细胞迁移和侵袭能力。ATF6 抑制剂 ceapin-A7(5.0 μmol/L)可恢复 TRPP2 敲低的 OSCC 迁移和侵袭能力。**结论** TRPP2 在 OSCC 中显著高表达。敲低 TRPP2,OSCC 增殖能力增强,迁移和侵袭能力受抑制。TRPP2 通过激活 UPR 介导 EpCAM 的表达,进而影响 OSCC 的侵袭和迁移能力。

关键词 口腔鳞状细胞癌;瞬时受体多囊蛋白 2;未折叠蛋白反应;内质网应激;上皮细胞黏附分子;细胞迁移和侵袭
中图分类号 R 73-37
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2024)11 - 2024 - 10
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2024.11.018

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是头颈部鳞癌最常见的亚型,占头颈部恶性肿瘤的 90% ~95%[1]。OSCC 具有高复发性和转移性。肿瘤的发生、发展与细胞的增殖、分化、转移有重要关系,因而研究与口腔鳞癌细胞黏附和迁移相关的调控因子,对于揭示 OSCC 的发病机制,为临床治疗提供理论依据具有重要意义。

瞬时受体多囊蛋白 2(transient receptor potential polycystic 2, TRPP2)是由 PKD2 基因编码的非选择性阳离子通道,主要存在于内质网(endoplasmic reticulum, ER)中,作为 Ca^{2+} 激活的细胞内 Ca^{2+} 释放通道[2]。TRPP2 在多种恶性肿瘤中高表达[3],可能是检测恶性肿瘤预后的潜在生物标志物,与多种癌症的不同临床结局相关[4-5]。TRPP2 介导 OSCC 侵袭转移的影响尚未见报道。因此,该实验使用 CRISPR-Cas9 慢病毒质粒转染技术,构建 TRPP2 敲低的 OSCC 模型。利用 RNA-sequence 技术检测与转移相关的靶基因,研究 TRPP2 在 OSCC 中的表达变化,并进一步探究 TRPP2 与相关靶基因间的作用关系,为 OSCC 远处转移的治疗提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验所用细胞 该实验所用的细胞是人正常口腔角质细胞 HOK,人舌鳞癌细胞 SCC-25(CL-0569)和 CAL-27(CL-0265)细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 实验试剂 β-tubulin 抗体(AF7011,上海爱必信公司),TRPP2 抗体(bs-24450R)、E-cadherin 抗体(bs-10009R)(北京博奥森公司),EpCAM 抗体(14452,美国 CST 公司),N-cadherin(SY02-46,杭州

2024 - 07 - 07 接收
基金项目:国家自然科学基金联合基金安徽省卫生健康科研项目(编号:AHWJ2023A20133、U22A20272)
作者简介:梁珠珠,女,硕士研究生;
沈 兵,男,教授,博士生导师,通信作者,E-mail:bshen@must.edu.mo;
薛浩伟,男,主任医师,硕士生导师,通信作者,E-mail:xuehaowei@ahmu.edu.cn

中国知网 https://www.cnki.net

华安生物技术有限公司)。山羊抗鼠(AB13433)、山羊抗兔(AB16311)(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 *细胞培养* 使用人口腔黏膜角化上皮细胞系 HOK 细胞作为对照细胞系,以及两种人舌鳞癌细胞 SCC-25 和 CAL-27。将细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,加 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素,在 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。

1.2.2 *CRISPR-Cas9 慢病毒载体构建* 针对目的基因 TRPP2 靶基因序列设计 sgRNA,在 sgRNA 两端加入 BsmBI 位点切割后产生互补黏性末端。经退火处理后形成双链 DNA 并连接到 lenti-cas9-sgRNA 标签载体上。使用 TOP10 感受态(100 μl)进行转化。通过集落聚合酶链反应(PCR)获得阳性克隆,然后进行测序,获得序列正确的表达 sgRNA 的过表达慢病毒质粒。

1.2.3 *慢病毒转染* 用设计构建的 sgRNA 慢病毒感染 SCC-25 和 CAL-27 细胞,以感染滴度 MOI = 10 对目的细胞感染 72 h,用嘌呤霉素(6 μg/ml 和 2 μg/ml)药筛 7 d 筛选单克隆细胞。Western blot 验证单克隆细胞系中 TRPP2 的敲低效果。(sgRNA 序列 sgNC: GAATATATAACACAATTATGT 和 sgTRPP2:TCAGCAGATGAGAGACGACTT)。

1.2.4 *转录组测序和数据分析* 从 SCC-25 细胞中提取 3 个重复的 RNA 生物样本,分别转染慢病毒质粒 sgNC 和 sgTRPP2。采用 Fast QC(0.11.7)软件控制序列质量,剔除不合格数据。富集 mRNA,选择目标片段进行 PCR 扩增。使用 Illumina (Casava 1.8) 对 OSCC 转录本进行测序。采用 Htseq 软件(0.13.5)定量各样品基因表达水平。采用 DESeq2(1.30.0)分析基因表达差异的显著性。统计分析各比较组合中显著差异基因的下调表达量,绘制火山图和差异表达基因(differentially expressed genes, DEG)热图。该研究的 RNA-seq 数据可从序列读取储存数据库(sequence read archive repository, SRA)数据库(PRJNA1075669)下载。

1.2.5 *细胞活力测定* 细胞在 96 孔板中 37 ℃培养 24 h。使用细胞计数试剂盒 CCK-8 测定细胞活力。将 CCK-8 溶液(10 μl)加入到每孔 90 μl 的基础培养基中,在 37 ℃的培养箱中放置 2 h。使用平板仪在 450 nm 波长处测量吸光度。

1.2.6 *克隆形成试验* 细胞在 6 孔板中以 500 个/孔或 1 000 个/孔在 37 ℃培养箱中培养。培养 14 d 后,克隆细胞用 4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,拍照,进行克隆计数,计算细胞的克隆形成率。

1.2.7 *细胞侵袭试验* Transwell 板上室均匀平铺 60 μl 基质胶,37 ℃孵育过夜,用无血清培养基水化 30 min 后种板。细胞以 5×10^4 个/孔在上室培养,下室加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的培养基。细胞培养 24 h 后,取出上室,丢弃培养基,用棉签轻轻去除滤膜上未穿孔的细胞。小室背面的细胞用 4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,拍照,计数。

1.2.8 *细胞迁移实验* 将细胞接种于 12 孔板中,培养 24 h,形成融合的单层。用 200 μl 移液管尖端制造划痕。用磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗细胞碎片,加入无血清培养基。分别于 0、24、36 h 对同一部位的伤痕边缘进行观察并拍照记录,分析伤痕愈合面积,计算细胞伤痕愈合率。

1.2.9 *Western blot 实验* 用 RIPA 缓冲液从细胞中提取总蛋白。提取的蛋白质通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(10% 凝胶)分离,并转移到聚偏二氟乙烯上(polyvinylidene difluoride, PVDF)。转模后,将 PVDF 膜在 5% 脱脂牛奶溶液中室温封闭 2 h。将膜与一抗(1∶1 000 TRPP2/E-cadherin/N-cadherin/EpCAM 和 1∶50 000 β-tubulin)在 4 ℃下孵育过夜。次日用 PBS 和 0.05% 吐温 20 洗涤膜,与二抗(1∶5 000 山羊抗兔或山羊抗鼠)在室温下孵育 2 h。采用增强型化学发光检测系统检测蛋白信号。β-tubulin 作为内参。

1.2.10 *RT-qPCR 实验* 使用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA。采用分光光度计测定 RNA 浓度。实验使用 qPCR 混合试剂盒进行 cDNA 合成和荧光定量 PCR。使用以下引物序列检测 mRNA 表达水平:PERK,上游 CGGTTGCTGACTGGAAAGTTATG,下游 TGGCAGCTTCTACAATGTCTTCT;ATF6,上游 ACCATGAGAAATGTCGGTTCAGA,下游 TCTCGCCTCTAACCCTAGCATATA;GRP78,上游 TATTGGAGGTGGGCAAACAAAGA,下游 CAGCAATAGTTACAGCGTCTTTG。采用 β-actin,上游 CCTTCCTGGGCATGGAGTC,下游 TGATCTTCATTGTGCTGGGTG 作为内参进行归一化。按照说明书,设置以 95 ℃、1 min,95 ℃、20 s 和 60 ℃、1 min, 40 个循环上机。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行定量。

1.3 统计学处理 所有数据采用 GraphPad Prism 7 软件进行统计分析。数值表示为 $\bar{x} \pm s$,组间差异采用单因素方差分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

中国知网 https://www.cnki.net

2　结果

2.1　Western blot 分析 TRPP2 在 OSCC 中的表达

研究报道 TRPP2 在正常上皮中表达,而在细胞恶性转化过程中 TRPP2 的表达发生改变。本研究显示,与正常口腔角质形成细胞(hexagrammos otakii kidney,HOK)细胞相比,TRPP2 在 SCC-25 和 CAL-27 细胞中的表达明显更高,见图 1。研究表明,TRPP2 在 OSCC 中的表达可能增加。

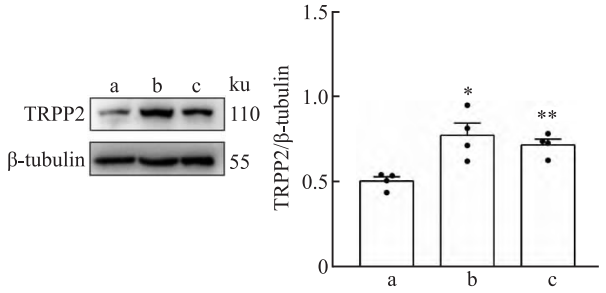

图 1　TRPP2 在 OSCC 中表达情况

Fig. 1　TRPP2 expression in OSCC

a:HOK group;b:SCC-25 group;c:CAL-27 group;* $P<0.05$,** $P<0.01$ *vs* HOK group.

2.2　TRPP2 基因靶向 GV708-sgRNA 载体的构建

针对 TRPP2 基因,使用 Alt-R® crispr - CAS9 引导 RNA 软件(https://sg.idtdna.com)制备了一个目标间隔区,利用 lentii-CAS9-puro (GV708)质粒进行转染,见图 2A。与核酸内切酶 Bbsl 在 37 ℃下反应 24 h 后,含 TRPP2 间隔的双链核苷酸通过 T4 连接酶在线性化质粒中重组。在 5′方向上加入 CACC 核苷酸和反义寡核苷酸。将 C 和 AAAC 碱基分别添加到反义寡核苷酸的 3′方向和 5′方向序列的末端,使 GV708 与 TRPP2 双链核苷酸结合,见图 2B。限制性内切酶反应结合后,利用 U6 启动子位点引物,将设计的 TRPP2 敲低区间序列 CGCTTCCGCGGCCCGTTCAA 替换为现有 GV708 中 Bbsl 剪切的插入序列 TCAGCAGATGAGAGACGACT,见图 2C。质粒构建效果通过 DNA Sanger 测序确定,见图 2D。将构建的慢病毒质粒转染到 SCC-25 和 CAL-27 细胞中。Western blot 分析检测了质粒蛋白敲低对 OSSC 细胞的影响,见图 2E、2F。数据显示,质粒转染成功并抑制了 TRPP2 的表达。

2.3　TRPP2 敲低影响 OSCC 的生物学行为　为了阐明 TRPP2 在 OSCC 细胞中的生物学功能,研究转染慢病毒敲低 TRPP2 的 SCC-25 和 CAL-27 细胞增殖能力的变化。该研究结果显示,敲低 TRPP2 后,OSCC 的集落形成能力和细胞活力均显著提高。见图 3。

2.4　TRPP2 敲低诱导 OSCC 转录谱变化　为了确定 TRPP2 影响口腔鳞状细胞侵袭和迁移的潜在分子机制,使用 RNA-sequence 技术评估了转录物表达水平的变化。如图 4A 火山图所示,在转染 sgNC 和 sgTRPP2 的 SCC-25 细胞中检测到 494 个 DEG,其中上调 234 个基因,下调 260 个基因,差异倍数在 2 倍以上。热图显示 SCC-25 细胞中基因表达谱发生了显著变化,见图 4B。在上调基因中,EpCAM 的折叠变化量为 1.013。由于细胞间和细胞与细胞外基质之间的相互依赖在细胞生物学功能中起着重要作用,EpCAM 作为一种特殊的细胞黏附分子,在调节细胞黏附中起着至关重要的作用。

2.5　TRPP2 敲低影响 OSCC 的 EMT　近年来,越来越多的证据表明多种类型的离子通道参与肿瘤 EMT,尤其是 Ca^{2+} 通道。本研究探讨了 TRPP2 在 OSCC 中 EMT 的作用。Western blot 检测两种与 EMT 相关的分子标记 N-cadherin 和 E-cadherin 的表达水平。结果显示,TRPP2 敲低组与对照组相比,OSCC 细胞中 E-cadherin 的表达无明显变化,见图 5A、5B、5D,而 N-cadherin 的表达明显降低,见图 5A、5C,提示 TRPP2 可能参与了 EMT 过程。此外,与细胞黏附密切相关的 EpCAM 的表达也显著增加,见图 5E,这与测序结果一致。

2.6　TRPP2 参与 OSCC 转移的潜在信号通路　为了探究 TRPP2 与 OSCC 转移相关的具体分子机制,采用实时荧光定量 PCR 检测了 ERS 相关标志物的 mRNA 表达水平。与 sgNC 对照组相比,TRPP2 敲低的 SSC-25 中 PERK、ATF6 和 GRP78 的表达水平显著升高,见图 6A-6C。然而,ATF6 在正常口腔上皮细胞中的表达水平明显高于 OSCC 细胞,见图 6D。这些数据提示,OSCC 细胞中 TRPP2 表达的变化可能通过引起 ERS 激活 UPR,从而改变细胞黏附相关蛋白的表达,从而影响细胞黏附和转移。此外,EpCAM 在正常上皮细胞中的表达高于 OSCC,见图 6E。

2.7　ATF6 对 EpCAM 表达的影响　该实验使用不同浓度的 ATF6 抑制剂 ceapin-A7 处理 SSC-25 和 CAL-27 细胞,结果显示,5 μmol/L ceapin-A7 处理能有效抑制 EpCAM 的表达,见图 7A - 7D。之后用 5.0 μmol/L ceapin-A7 处理 TRPP2 敲低细胞。结果显示,ceapin-A7 处理组 TRPP2 敲低引起的 EpCAM 表达水平升高恢复到正常水平。见图 7E - 7H。

中国知网　https://www.cnki.net

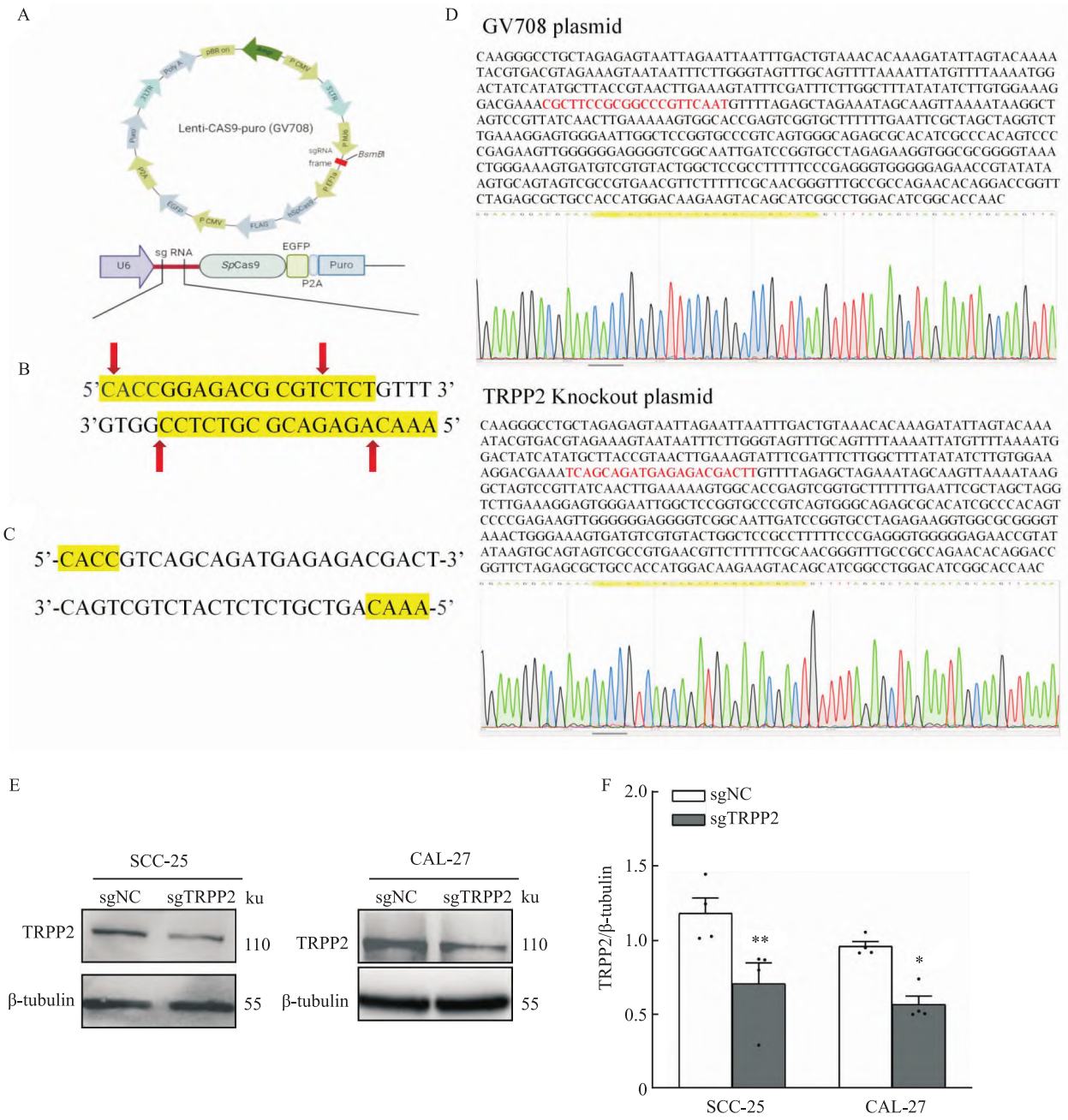

图 2 构建 TRPP2 基因靶向重组 GV708 质粒

Fig. 2 Build TRPP2 reorganization GV708 plasmid gene targeting

A: The vector contains coding sequences for resistance to sgRNA, Cas9, ampicillin and purinomycin; B: Plasmid sequence of GV708 digested by Bbsl enzyme; C: The nucleotide sequence containing the TRPP2 target spacer was designed to recombine with the linearized vector; D: After the restriction enzyme reaction and binding, DNA Sanger sequencing was performed using the U6 promoter site primer to confirm that the designed TRPP2 knockdown interval sequence was replaced by the existing Bbsl cut-in sequence in GV708; E: Western blot assay was used to detect TRPP2 protein knockdown levels in the above two types of cells; F: Statistical analysis of Western blot results; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* sgNC group.

2.8 TRPP2 在 OSCC 转移中的作用 为了研究 TRPP2 对细胞侵袭的影响,进行了 Transwell 细胞侵袭实验。如图 8A-8C 所示,与对照组相比,TRPP2 敲低显著降低了 SCC-25 和 CAL-27 细胞的侵袭性,ceapin-A7 处理后细胞侵袭性恢复。还通过迁移实验测量了 OSCC 的迁移率。TRPP2 敲低显著抑制 SCC-25 细胞迁移。然而,用 ceapin-A7 处理 OSCC 细胞显著恢复 TRPP2 敲低的 OSCC 细胞的迁移能力,见图 8D、8E。这些结果表明 TRPP2 本质上参与了 OSCC 细胞的生物学行为。

中国知网 https://www.cnki.net

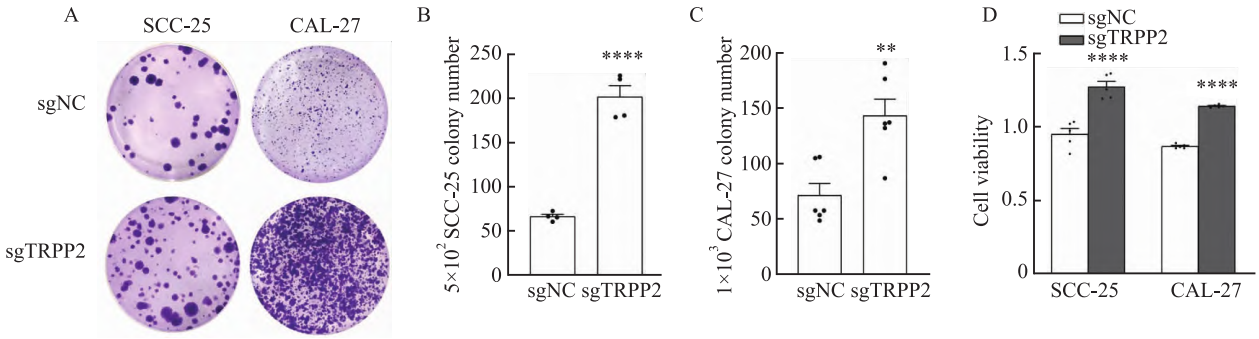

图 3 TRPP2 对 OSCC 增殖的影响

Fig. 3 Effect of TRPP2 on proliferation of OSCC

A: Clonogenesis assay was used to detect the colony formation ability of OSCC; B, C: Statistical analysis of clonal formation results; D: CCK-8 assay was used to detect cell viability for statistical analysis; $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.0001$ *vs* sgNC group.

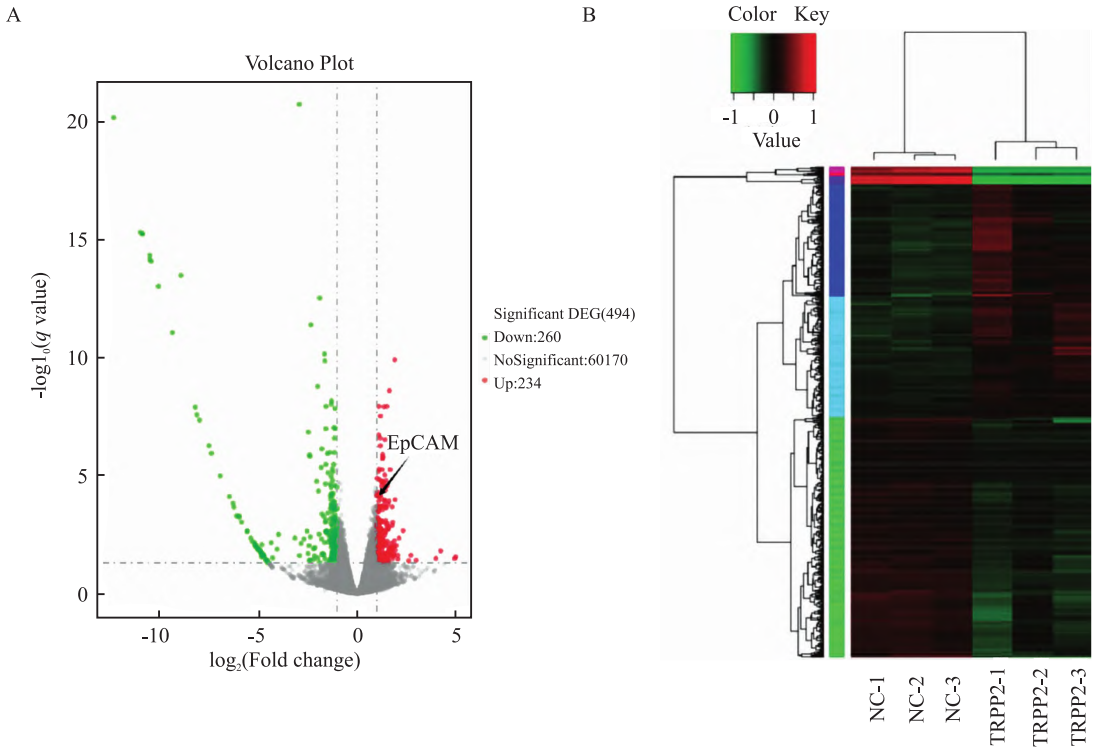

图 4 TRPP2 对 OSCC 转录谱的影响

Fig. 4 Effects of TRPP2 on transcription profiles of OSCC

A: Differentially expressed genes (DEGs) volcano map; B: Heat map of differentially expressed genes, red: highly expressed genes, green: low expressed genes, black arrow: EpCAM expression of differentially expressed genes; NC: 1-3 represented the control group transfected with SCC-25; TRPP2: 1-3 represents the knockdown group of SCC-25 cells transfected with sgTRPP2.

3 讨论

OSCC 是头颈部最常见的肿瘤类型,是一种具有局部侵袭性、高复发、转移性的特征性肿瘤,威胁着患者的健康和生命。因此,寻找与 OSCC 转移和生长相关的新调控因子,对明确 OSCC 的发病机制具有重要意义。TRPP2 是一种非选择性阳离子通道蛋白,参与多种生物功能,包括细胞增殖、机械感觉和基因表达[6]。近年来,许多研究[4,7-8]表明,TRPP2 在乳腺癌、鼻咽癌等多种恶性肿瘤中高表达,可能是一种潜在的生物标志物,可以预测恶性肿瘤的预后。在该研究中,首先检测了 SCC-25 和 CAL-27 两种细胞系与正常口腔上皮细胞(HOK)中 TRPP2 蛋白表达的变化。与 HOK 细胞相比,OSCC 中 TRPP2 蛋白的表达明显升高。为了研究 TRPP2 对 OSCC侵袭和转移的影响,课题组利用 CRISPR/Cas9

中国知网 https://www.cnki.net

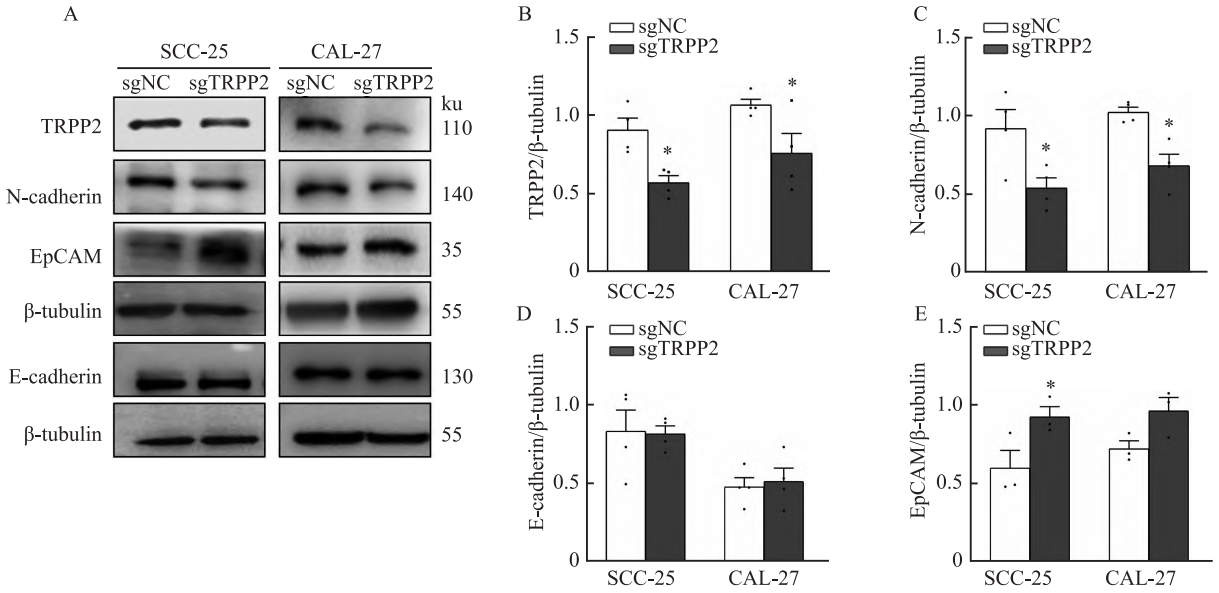

图 5 TRPP2 对 OSCC 中 E-cadherin、N-cadherin 和 EpCAM 表达水平的影响

Fig. 5 Effect of TRPP2 on expression levels of E-cadherin, N-cadherin and EpCAM in OSCC

A: The effect of TRPP2 protein expression on the expression of E-cadherin, N-cadherin and EpCAM in oral squamous cell carcinoma cells was detected by Western blot; B-E: Statistical analysis of Western blot results; * $P<0.05$ *vs* sgNC group.

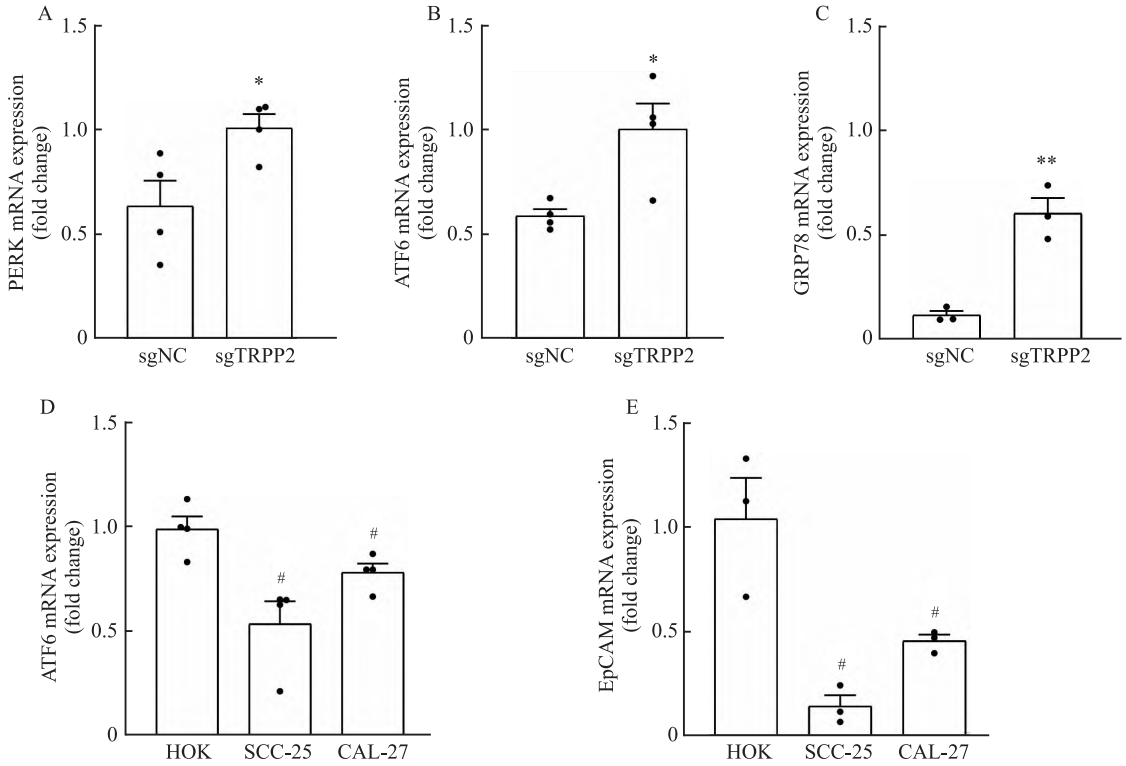

图 6 TRPP2 参与 OSCC 转移的潜在信号通路

Fig. 6 TRPP2 participate in OSCC transfer potential signaling pathways

A – C: The relative mRNA expression levels of PERK, ATF6 and GRP78 associated with UPR were quantified by RT-PCR; D-E: RT-PCR was used to quantify the relative mRNA expression levels of ATF6 and EpCAM in the above three types of cells; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ *vs* sgNC group; # $P<0.05$ *vs* HOK group.

中国知网 https://www.cnki.net

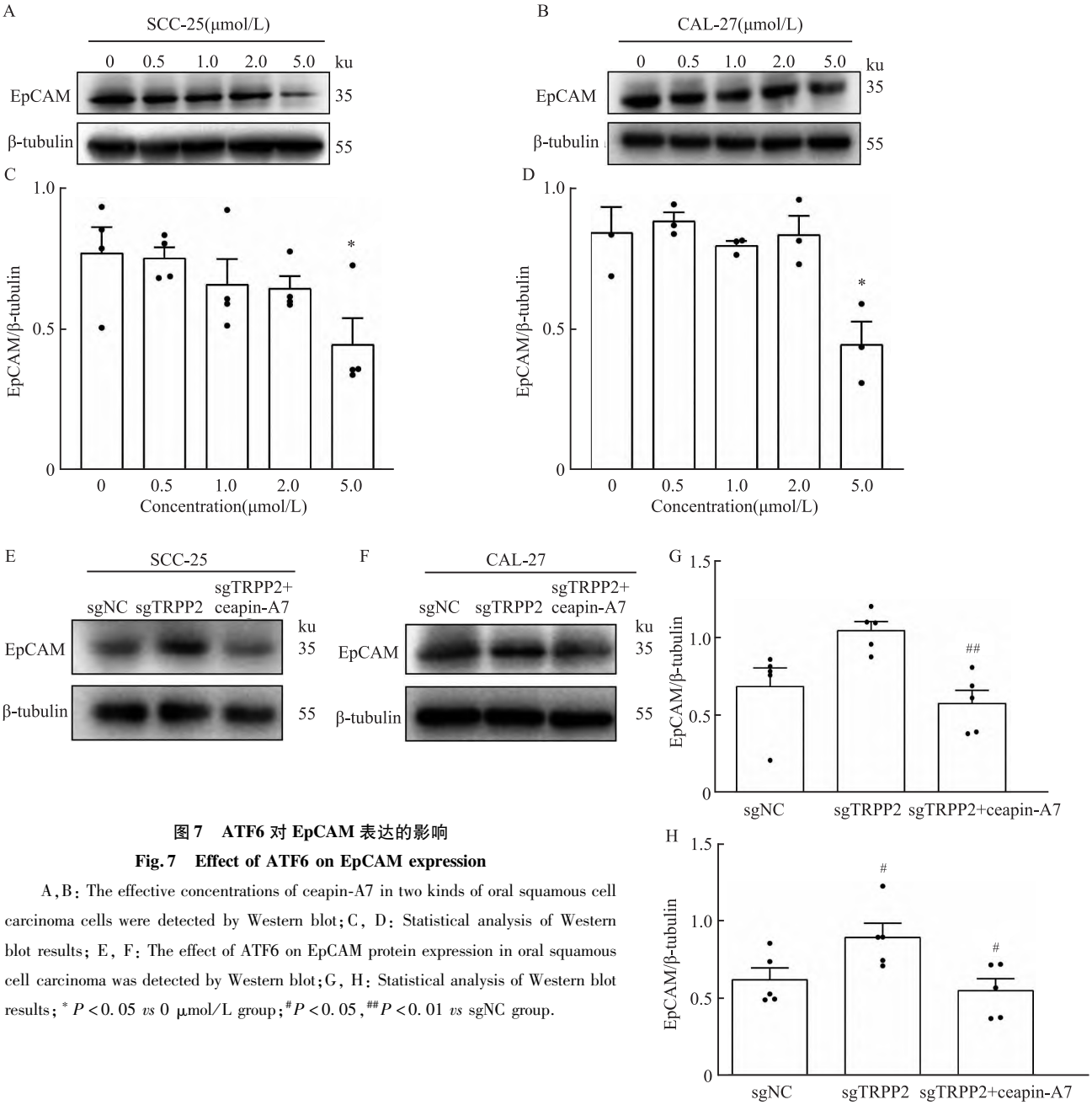

图 7 ATF6 对 EpCAM 表达的影响

Fig. 7 Effect of ATF6 on EpCAM expression

A, B: The effective concentrations of ceapin-A7 in two kinds of oral squamous cell carcinoma cells were detected by Western blot; C, D: Statistical analysis of Western blot results; E, F: The effect of ATF6 on EpCAM protein expression in oral squamous cell carcinoma was detected by Western blot; G, H: Statistical analysis of Western blot results; $^{*}P<0.05$ *vs* 0 μmol/L group; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ *vs* sgNC group.

技术敲低了 OSCC 中 TRPP2 基因。TRPP2 敲低后，OSCC 的增殖能力明显增强，但其迁移和侵袭能力明显受到抑制，抑制了 EMT。研究[9-10]报道 TRPP2 敲低或功能障碍可促进细胞增殖。然而，TRPP2 调控癌细胞迁移和侵袭能力的分子机制尚不清楚。

内质网作为蛋白质翻译和细胞内 Ca^{2+} 储存和分泌的主要位点，在维持细胞稳态中起着重要作用。ERS 可能由蛋白质折叠需求增加、葡萄糖消耗和 Ca^{2+} 稳态破坏引起。为了预防或响应 ERS，细胞通过激活 UPR 来重建稳态或触发细胞死亡程序[11]。该研究结果显示，TRPP2 敲低诱导了 OSCC 的 ERS，激活 UPR 中的 ATF6，上调 EpCAM 的表达，最终抑制细胞迁移。这些结果表明，在 OSCC 中，TRPP2 的表达增强可能诱导 ERS 通过 ATF6 转录信号轴激活 UPR 并改变 EpCAM 的表达，从而介导细胞迁移和侵袭。EpCAM 是一种非典型的细胞黏附分子，介导亲同性黏附相互作用，从而可能阻止癌细胞转移[12-13]。EpCAM 在各种肿瘤细胞中的潜在作用尚不完全清楚，阐明 EpCAM 介导的癌细胞转移将有助于探索转移的治疗方法。活化的 ATF6 是内质网膜上的关键应力传感器。当 UPR 被激活时，ATF6 被转移到高尔基体并被切割形成活化的 ATF6，调节下游基因的转录和表达，帮助细胞适应 ERS[14]。在该研究中，TRPP2 敲低显著增加了 AFT6 的表达。

中国知网 https://www.cnki.net

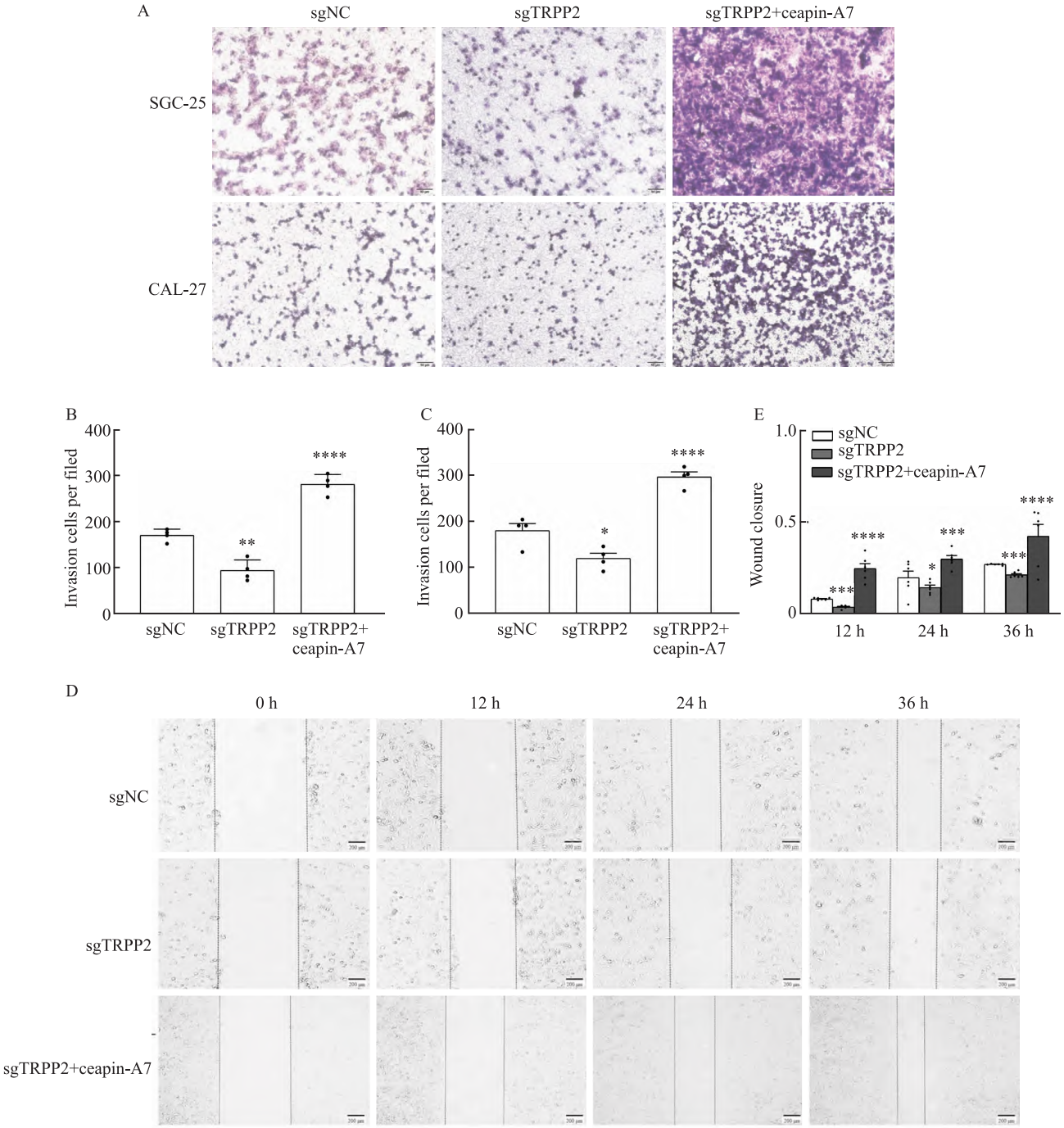

图 8 TRPP2 在 OSCC 转移中的作用

Fig. 8 Function of TRPP2 in OSCC migration

A: Transwell assay was used to detect the effect of TRPP2 on the invasion ability of OSCC ×40; B,C: Statistical analysis of Transwell results in SCC-25 and CAl-27 cells; D: The effect of TRPP2 on the migration ability of oral squamous cell was detected by scratch test ×10; E: Statistical analysis of the scratch results in SCC-25; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$ *vs* sgNC group.

然而,当使用 ATF6 抑制剂 ceapin-A7 抑制 ATF6 表达时,TRPP2 敲低诱导的 EpCAM 表达上调明显降低到正常水平,同时,对细胞迁移和侵袭的抑制也在 OSCC 中恢复。因此,该实验数据表明,UPR/ATF6/EpCAM 信号通路可能在 TRPP2 诱导的 OSCC 迁移和侵袭中起重要作用。该研究仅在细胞水平上研究了 TRPP2 介导的 UPR 激活对 EpCAM 表达和 OSCC 迁移和侵袭的影响。未来需要在动物实验中进一步验证,以评估该途径在 OSCC 临床治疗发展中的潜在价值。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] Qu Y, He Y, Yang Y, et al. ALDH3A1 acts as a prognostic biomarker and inhibits the epithelial mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma through IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. J Cancer, 2020, 11(9): 2621 - 31. doi:10.7150/jca.40171.

[2] Velázquez I F, Cantiello H F, Del Rocío Cantero M. High calcium transport by Polycystin-2 (TRPP2) induces channel clustering and oscillatory currents [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 660: 50 - 7. doi:10.1016/j.bbrc.2023.03.067.

[3] Brill A L, Ehrlich B E. Polycystin 2: A calcium channel, channel partner, and regulator of calcium homeostasis in ADPKD[J]. Cell Signal, 2020, 66: 109490. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109490.

[4] Pérez-Riesgo E, Hernando-Pérez E, Feijóo V, et al. Transcriptional basis of Ca^{2+} remodeling reversal induced by polyamine synthesis inhibition in colorectal cancer cells[J]. Cancers, 2023, 15(5): 1600. doi:10.3390/cancers15051600.

[5] Zhang T, Yu G D, Ye H P, et al. TRPP2 promotes the proliferation of nasopharyngeal carcinoma through upregulating Skp2/c-Myc [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(15): 8001 - 7. doi:10.26355/eurrev_202008_22483.

[6] Tian P F, Sun M M, Hu X Y, et al. TRPP2 ion channels: the roles in various subcellular locations[J]. Biochimie, 2022, 201: 116 - 27. doi:10.1016/j.biochi.2022.06.010.

[7] Brill A L, Fischer T T, Walters J M, et al. Polycystin 2 is increased in disease to protect against stress-induced cell death[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 386. doi:10.1038/s41598 - 019 - 57286 - x.

[8] Katsura C, Ogunmwonyi I, Kankam H K, et al. Breast cancer: presentation, investigation and management [J]. Br J Hosp Med (Lond), 2022, 83(2):1 - 7. doi:10.12968/hmed.2021.0459.

[9] Li K, Chen L, Lin Z, et al. Role of the AMPK/ACC signaling pathway in TRPP2-mediated head and neck cancer cell proliferation[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 4375075. doi:10.1155/2020/4375075.

[10] Li Z, Zhou J, Li Y, et al. Mitochondrial TRPC3 promotes cell proliferation by regulating the mitochondrial calcium and metabolism in renal polycystin-2 knockdown cells[J]. Int Urol Nephrol, 2019, 51(6): 1059 - 70. doi:10.1007/s11255 - 019 - 02149 - 7.

[11] Kumari N, Reabroi S, North B J. Unraveling the molecular nexus between GPCRs, ERS, and EMT[J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 6655417. doi:10.1155/2021/6655417.

[12] Chen G, Yang Y, Liu W, et al. EpCAM is essential for maintenance of the small intestinal epithelium architecture *via* regulation of the expression and localization of proteins that compose adherens junctions[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(2): 621 - 32. doi:10.3892/ijmm.2020.4815.

[13] Gaber A, Lenarčič B, Pavšič M. Current view on EpCAM structural biology [J]. Cells, 2020, 9(6): 1361. doi:10.3390/cells9061361.

[14] Herrema H, Guan D, Choi J W, et al. FKBP11 rewires UPR signaling to promote glucose homeostasis in type 2 diabetes and obesity[J]. Cell Metab, 2022, 34(7): 1004 - 22.e8. doi:10.1016/j.cmet.2022.06.007.

TRPP2 regulates the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma through the UPR/AFT6/EpCAM signaling pathway

Liang Zhuzhu[1], Chen Shu[1], Sun Qianyu[1], Shen Bing[2], Xue Haowei[1]

([1]*Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022; [2]*State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macao SAR* 999078)

Abstract ***Objective*** To investigate the expression of transient receptor polycystic protein 2 (TRPP2) in oral squamous epithelial cell and its effect on the invasion and migration of oral squamous cell carcinoma (OSCC), and to explore the potential signaling pathway of TRPP2 affecting OSCC metastasis. ***Methods*** The OSCC model with TRPP2 knockdown was constructed by CRISPR-Cas9 lentivirus plasmid transfection technique. The effect of TRPP2 protein knockdown was verified by Western blot. The effect of TRPP2 on OSCC proliferation was detected by CCK-8 assay and clone formation assay. RT-qPCR was used to detect the target genes associated with TRPP2 metastasis to OSCC. Western blot and RT-qPCR were used to detect the expression of EpCAM and its transcription factors associated with unfolded protein response (UPR). The effects of TRPP2 on the invasion and migration of OSCC were examined by invasion test and scratch test. ***Results*** Compared with HOK in oral epithelial cells, the expression of TRPP2 in OSCC was significantly higher. When TRPP2 was knocked down, OSCC proliferation and clonal

(下转第 2064 页)

中国知网 https://www.cnki.net

nocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(11): 2681 – 90. doi:10.1158/1078 – 0432. CCR – 16 – 1467.

[41] White M G, Lee A, Vicente D, et al. Measurement of portal vein blood circulating tumor cells is safe and may correlate with outcomes in resected pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2021, 28(8): 4615 – 22. doi:10.1245/s10434 – 020 – 09518 – y.

[42] Yu K H, Ricigliano M, Hidalgo M, et al. Pharmacogenomic modeling of circulating tumor and invasive cells for prediction of chemotherapy response and resistance in pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(20): 5281 – 9. doi:10.1158/1078 – 0432. CCR – 14 – 0531.

[43] Gemenetzis G, Groot V P, Yu J, et al. Circulating tumor cells dynamics in pancreatic adenocarcinoma correlate with disease status: Results of the prospective CLUSTER study[J]. Ann Surg, 2018, 268(3): 408 – 20. doi:10.1097/SLA.0000000000002925.

Research progress on circulating tumor cells for early diagnosis and prognosis of pancreatic cancer

Jiang Mengruo[1], Peng Lisi[1], Xia Chuanchao[1,2], Li Shiyu[1]

([1]*Dept of Gastroenterology, Changhai Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai* 200433; [2]*Dept of Gastroenterology, The First Hospital Affiliated to Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou* 310003)

Abstract Pancreatic cancer is a highly malignant gastrointestinal cancer with a poor prognosis, and early diagnosis remains challenging. The use of reliable biomarkers can significantly enhance the early evaluation and management of this disease. Circulating tumor cells (CTCs) are released into the bloodstream and can be obtained easily through minimally invasive liquid – based biopsy, making them promising candidates for early tumor diagnosis, prognosis assessment, and monitoring therapeutic responses. This paper reviews the advancements in CTCs detection technology and their clinical applications in pancreatic cancer over the past decade, both domestically and internationally, which offer a new perspective on the early diagnosis and prognosis of pancreatic cancer.

Key words circulating tumor cells; pancreatic cancer; liquid-based biopsy; biomarkers

Fund program Natural Science Foundation of China(No. 82300734)

Corresponding author Li Shiyu, E-mail: lizfish@126.com

(上接第 2032 页)

formation were significantly enhanced. Compared with the control group, a total of 494 differential genes were significantly expressed in TRPP2 knockdown transcription profile, among which 234 genes were up-regulated and 260 genes were down-regulated. The expression of EpCAM gene, which is related to cell adhesion, was up-regulated. In addition, UPR related genes PERK, ATF6, GRP78 were up-regulated, while ATF6 and EpCAM were down-regulated in OSCC compared to HOK cells. The expression of ATF6 and EpCAM in oral squamous cell carcinoma cells was up-regulated by TRPP2 knockdown, and the cell migration and invasion ability decreased. The ATF6 inhibitor ceapin-A7 (5 μmol/L) restored the OSCC migration and invasion ability of TRPP2 knockdown. ***Conclusion*** TRPP2 is highly expressed in OSCC. When TRPP2 is knocked down, OSCC proliferation ability is enhanced, migration and invasion ability are inhibited. TRPP2 mediates the expression of EpCAM through activation of UPR, thus affecting the invasion and migration of oral squamous cell carcinoma.

Key words oral squamous cell carcinoma; transient receptor potential polycystic 2; unfolded protein response; endoplasmic reticulumepithelial stress; cell adhesion molecule; cell migration and invasion

Fund programs Health Research Project of Anhui Province Supported by National Natural Science Foundation of China (Nos. AHWJ2023A20133, U22A20272)

Corresponding authors Shen Bing, E-mail: bshen@must.edu.mo; Xue Haowei, E-mail: xuehaowei@ahmu.edu.cn

中国知网 https://www.cnki.net