

网络出版时间:2024-12-05 13:50:36 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.008

BMI1 经 NOTCH 信号通路诱导人口腔鳞癌细胞恶性生物学行为

黄 炆^{1,2}, 马 洪^{1,2}, 向 航^{1,2}(¹ 贵州医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 贵阳 550004; ² 贵州医科大学口腔医学院, 贵阳 550004)

摘要 **目的** 探讨 B 细胞特异莫洛尼鼠白血病病毒整合位点 1 (*BMI1*) 经 NOTCH 信号通路对人口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 细胞活力、迁移、侵袭、凋亡和顺铂敏感性的调控。**方法** 使用人 OSCC 细胞系 CAL27 通过慢病毒构建敲低及过表达 *BMI1* 基因的 CAL27 细胞株, 分别为敲低组及其阴性对照组: sh*BMI1*-1 组、sh*BMI1*-2 组、sh*BMI1*-3 组、shNC 组, 过表达组及其阴性对照组: *BMI1* 组、NC 组。随后使用 RT-qPCR 及 Western blot 方法验证转染效果并筛选出最佳敲低效果的细胞株。Western blot 检测感染后的 CAL27 细胞中 NOTCH 信号通路的分裂素同源基因 1 (*NOTCH1*)、Delta 样配体 1 基因 (*DLL1*)、Jagged1 基因 (*JAG1*)、毛发增强因子 1 基因 (*HES1*) 蛋白的表达情况。随后将各组细胞分别予药物溶剂二甲亚砜 (DMSO)、顺铂 (CDDP)、NOTCH 通路抑制剂 γ 分泌酶抑制剂 (DAPT) 及 CDDP + DAPT 进行培养, 使用 CCK-8、划痕实验、Transwell、平板克隆、流式细胞术检测各组细胞表型。**结果** *BMI1* 过表达后, NOTCH 信号通路中的 *NOTCH1*、*DLL1*、*JAG1* 以及 *HES1* 基因和蛋白的表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。在 CDDP 干预下的 *BMI1* 组细胞较 sh*BMI1* 组细胞活力、细胞侵袭、迁移及集落形成能力提高, 且细胞凋亡减少 ($P < 0.05$)。相对 CDDP 组, 可见联合用药后 CDDP + DAPT 组细胞凋亡率上升, 癌细胞对 CDDP 敏感性提高 ($P < 0.05$)。**结论** *BMI1* 可能通过激活 NOTCH 信号通路, 提升口腔鳞癌细胞 CAL27 的细胞恶性程度, 促进细胞活力、迁移与侵袭, 降低细胞对 CDDP 的药物敏感性。抑制 NOTCH 通路可提高 CAL27 的顺铂敏感性, CDDP 和 DAPT 具有协同的细胞毒性作用, 促进 OSCC 细胞凋亡。

关键词 *BMI1*; 口腔鳞状细胞癌; NOTCH; 顺铂耐药; 增殖; 侵袭

中图分类号 R 782

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)12-2117-11

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.008

头颈癌 (head and neck cancers, HNC) 是全球第七大常见的恶性肿瘤, 占有所有癌症的 3%, 其中头颈部鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 占有头颈部肿瘤的 90%^[1-2]。针对 HNSCC 中常见的口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC), 目前多西紫杉醇联合顺铂 (cisplatin, CDDP) 和 5-氟尿嘧啶的化疗方案 (TPF), 已被证实为有效的诱导化疗方法, 但由于 OSCC 细胞的耐药性, 常引起疾病的不良预后^[3-4]。因此进一步研究逆转 OSCC 耐药性的基因靶点或药物是当下肿瘤基础研究的重点之一。

B 细胞特异莫洛尼鼠白血病病毒整合位点 1 (B cell-specific moloney murine leukemia virus insertion

site 1, *BMI1*) 是一种表观遗传调控因子, 影响着细胞及胚胎的生物学行为^[5-6]。近年来研究^[7-8]显示, *BMI1* 在 HNSCC 肿瘤形成和恶化中发挥了重要作用, 且参与调控了 HNSCC 的化疗耐药过程。在 HNSCC 细胞中抑制或敲除 *BMI1* 基因, 配合 CDDP 处理时, 可募集和激活 CD8⁺ T 细胞, 激活肿瘤细胞的内源性免疫反应, 增强 CDDP 对细胞的杀伤作用^[8]。与此同时, NOTCH 信号作为肿瘤细胞耐药中重要的信号级联途径之一, CDDP 与 NOTCH 通路抑制剂联用时, 在 NOTCH 通路依赖性肿瘤细胞中具有协同的细胞毒性作用^[9]。然而, 在 OSCC 中 *BMI1* 与 NOTCH 通路间的关系和作用机制尚未明确, 因此该研究通过细胞表型实验, 初步探讨 *BMI1*-NOTCH 通路轴对 OSCC 细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人 OSCC 细胞系 CAL27 (CRL-2095) 购自美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC)。

1.2 主要试剂和仪器 *BMI1* 敲低/过表达慢病毒及相应的空载体 (上海吉凯基因公司, 货号:

2024-10-28 接收

基金项目: 贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (编号: gzwkj2023-442)

作者简介: 黄 炆, 女, 硕士研究生;

马 洪, 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: mahong1966@126.com;

向 航, 女, 硕士, 讲师, 通信作者, E-mail: 393005823@qq.com

GXDL024427)4;DMEM 基础培养基、PBS 平衡液、胰酶、青-链霉素(美国 Gibco 公司,货号:11965092、10010023、25200072、15140122);胎牛血清(以色列 BI 公司,货号:04-001-1ACS);Transwell 小室、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo 公司,货号:3422、23227);10% PAGE 凝胶制备试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司,货号:PG112);Matrigel 基质胶(美国 CORNING 公司,货号:356234);RIPA 细胞裂解液、TritonX-100、荧光封片剂、DEPC、0.1% 结晶紫染色液(中国 Solarbio 公司,货号:R0010、T8200、S2100-100、R1600、G1063);TRIzol(北京爱必信公司,货号:abs60154)。Annexin V-APC/7-AAD 凋亡检测试剂盒(中国联科生物公司,货号:AP105);NOTCH1、DLL1 单克隆抗体(沈阳万类生物科技有限公司,货号:WL03097、WL00968);BMI1 单克隆抗体(美国 NOVUS 公司,货号:NB110-40823);HES1(美国 R&D Systems 公司,货号:AF3317)。JAG1 单克隆抗体和 HRP Anti-Goat IgG(上海艾比玛特科技公司,货号:T55726、M212123); β -actin、HRP Anti-Rabbit IgG、HRP Anti-Mouse IgG(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:8457、7074、7076);Cell Counting Kit-8、DAPI(美国 MCE 公司,货号:HY-K0301、HY-13027);顺铂(中国齐鲁制药公司,货号:H20023461);QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit、PrimeScriptTM RT reagent Kit(日本 TAKARA 公司,货号:208154、RR037A)。倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号:BX51);荧光显微镜(德国 Leica 公司,型号:DMI8);流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司,型号:BD FACSCalibur);荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司,型号:CFX96);超微量分光光度计(美国 Thermo 公司,型号:NanoDrop 2000c);多功能酶标仪(美国 Beckman 公司,货号:DTX880)。

1.3 方法

1.3.1 *BMII* 基因的泛癌分析 使用 TIMER 2.0 数据库(<http://timer.cistrome.org/>)对 *BMII* 基因在全癌症和正常组织中的表达情况进行泛癌差异分析。

1.3.2 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清的 DMEM

培养基培养 CAL27 细胞株,在 5% CO₂、37 °C 条件的培养箱中培养,待细胞增殖密度达 80% ~ 90% 时进行传代。

1.3.3 细胞分组及慢病毒感染细胞 将各组细胞命名为 shBMI1 组、shNC 组、BMI1 组、NC 组和 Blank 组。其中 Blank 组为未经处理的空白对照组。委托吉凯基因公司设计具有嘌呤霉素抗性的 *BMII* 敲低及过表达慢病毒载体。shBMI1、shBMI2、shBMI3 具有不同的 shRNA 靶序列,均为 *BMII* 敲低的慢病毒载体,shRNA 靶序列如表 1 所示。将 3 者分别对细胞进行感染后,筛选出最佳敲低效果的载体(shBMI1-2)作为后续实验的基因敲低组(shBMI1 组)。在 Polybrene 的诱导下,使用过表达慢病毒载体 *BMII*,3 组慢病毒载体 shBMI1-1、shBMI1-2、shBMI1-3 以及空载的阴性对照组 NC 与 shNC 分别感染 CAL27 细胞株,使用 2 μ g/ml 浓度的嘌呤霉素筛去未感染成功的细胞。荧光显微镜下观察,当发出 GFP 荧光的细胞占 90% 以上,即可进行后续实验。

1.3.4 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 酚/氯仿法提取细胞总 RNA 之后使用超微量分光光度计测量其纯度及浓度。反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,使用 QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit 试剂盒,将所需试剂、引物(由上海生工生物工程设计合成)及 cDNA 混匀后,加至 PCR 板中,上机反应,三步法进行 Real-Time PCR,并制作溶解曲线,目的基因的变化以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算统计。引物序列见表 2。

1.3.5 Western blot 实验 使用 RIPA 细胞裂解液提取各组细胞样品,超声裂解细胞,使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液进行浓度调平后加热变性,在 10% 的 PAGE 凝胶中上样,电泳(恒定电压 90 V 30 min,120 V 60 min)和转膜(恒定电流 200 mA 90 min)。5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 2 h,孵育于一抗 β -actin(1 : 1 000)、BMI1 (1 : 1 000)、HES1 (1 : 1 000)、NOTCH1 (1 : 1 000)、JAG1 (1 : 500)、DLL1 (1 : 1 000)中置于 4 °C 冰箱孵育过夜,室温下分别于对应的二抗 HRP Anti-Rabbit IgG (1 : 5 000)、HRP Anti-Mouse

表 1 shRNA 靶序列

Tab. 1 shRNA Target Sequences

Group	5'	STEM	Loop	STEM	3'
shBMI1-1	Ccgg	AAGTATTGTCCTATTTGTGAT	CTCGAG	ATCACAAATAGGACAATACTT	TTTTTg
shBMI1-2	Ccgg	CGGAAAGTAAACAAAGACAAA	CTCGAG	TTTGCTTTGTTTACTTTCCG	TTTTTg
shBMI1-3	Ccgg	ccAGAACAGATTGGATCGGAA	CTCGAG	TTCCGATCCAATCTGTTCTGG	TTTTTg

表2 引物序列
Tab.2 Primer Sequences

Gene name		Sequence
GAPDH	F	5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3'
	R	5'-CACCTGTGCTGTAGCCAA-3'
BMI1	F	5'-CTCCACCTCTTGTG-3'
	R	5'-GACCCATTACTGATGATT-3'

IgG(1:5 000)和HRP Anti-Goat IgG(1:10 000)孵育1 h,1×TBST冲洗PVDF膜后,涂上ECL化学发光液,放入凝胶成像仪显影,用ImageJ分析蛋白条带灰度值,以 β -actin作为内参进行半定量比较。

1.3.6 细胞免疫荧光染色 使用4%多聚甲醛室温下固定6孔板中的细胞20 min。加入0.25%的Triton X-100透化15 min,清洗后加入10%山羊血清,室温下封闭30 min,加入NOTCH1一抗(1:100)置于湿盒内4℃孵育过夜。用PBS清洗3次。加入HRP Anti-Rabbit IgG二抗(1:1 000),置于37℃恒温箱孵育60 min后,用PBS清洗,使用DAPI染液复染细胞核,在室温下避光孵育10 min。随后将玻片置于PBS液中,在脱色摇床上清洗。待切片稍干时,滴加抗荧光淬灭剂封片,使用荧光显微镜观测,采集细胞图像。

1.3.7 CCK-8实验 将细胞接种于96孔板培养,每孔接种约含 5×10^3 个细胞。shBMI1组、shNC组、BMI1组和NC组细胞设置两个不同的药物处理组(CDDP组和CDDP+DAPT组),CDDP组所有细胞分别加入含0、1.5、2.5、5、10和15 $\mu\text{mol/L}$ 浓度CDDP的完全培养基,CDDP+DAPT组加入与CDDP组相同浓度梯度的CDDP联合DAPT(8 $\mu\text{mol/L}$)的完全培养基。分别于48、72 h时间点,加入90 μl DMEM培养基及10 μl CCK-8试剂,于37℃、5% CO_2 细胞培养箱孵育2 h,避光放入酶标仪,选择波长为450 nm处的吸光度值,检测细胞活力。

1.3.8 平板克隆实验 将对数生长期的细胞接种于12孔板中,密度为 1×10^3 个/孔。待细胞贴壁后,在培养基中加入干预药物:DMSO(终浓度<0.1%)、CDDP(5 $\mu\text{mol/L}$)、DAPT(8 $\mu\text{mol/L}$)、CDDP+DAPT(5 $\mu\text{mol/L}$ +8 $\mu\text{mol/L}$),分别培养shBMI1组、shNC组、BMI1组和NC组细胞,48 h后更换新鲜完全培养基。37℃、5% CO_2 恒温培养2周,每4 d更换1次培养基。培养结束后,去除旧培养基。4%多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色20~30 min,PBS轻柔冲洗,晾干。随后对细胞平板克隆个数进行统计,分析实验处理对集落形成能力的影响。

1.3.9 细胞划痕实验 取对数生长期的细胞接种于6孔板,经细胞计数,调整细胞密度约 1×10^6 个/ml,待单层细胞汇合度达90%时,使用100 μl 枪头尖端与孔板垂直进行划线,各组细胞加入干预药物:DMSO(终浓度<0.1%)、CDDP(5 $\mu\text{mol/L}$)、DAPT(8 $\mu\text{mol/L}$)、CDDP+DAPT(5 $\mu\text{mol/L}$ +8 $\mu\text{mol/L}$),在无血清培养基中培养,于0、48 h观察划痕处细胞生长的情况,在同一位置采集图像。

1.3.10 Transwell侵袭实验 用无血清的基础培养液按8:1稀释基质凝胶,在8 μm 微孔的Transwell小室上室加入调配后的基质凝胶100 μl ,待基质胶凝固,使用5% FBS培养基调配干预药物,重悬对数生长期的细胞,每个上室加入密度为 5×10^5 个/ml的细胞悬液200 μl ,在Transwell小室的下室中加入含有20% FBS的培养基600 μl 。恒温培养24 h后取出上室清洗,用4%多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色20~30 min,PBS冲洗及室温干燥后,倒置显微镜下拍照并统计小室聚碳酸酯膜下表面的细胞数。

1.3.11 流式细胞术 使用Annexin V-APC/7-AAD双染凋亡试剂盒检测带绿色荧光(GFP)细胞的凋亡情况,取各组细胞,以 1×10^5 个/孔的密度均匀种于6孔板中,待细胞生长至单层汇合度达40%时,每组分别加入含有干预药物及溶剂DMSO的完全培养基。37℃、5% CO_2 恒温培养24 h。收集每孔的培养基,使用不含EDTA的胰蛋白酶消化液收集细胞,PBS缓冲液轻柔清洗细胞后以1 000 r/min离心5 min,使用1×Binding Buffer重悬细胞。向离心管中加入Annexin V-APC/Annexin V-FITC(5 μl)和PI(10 μl),避光室温孵育15 min,在1 h内上机检测。

1.4 统计学处理 通过GraphPad Prism 8.0对数据进行统计学分析,定量数据符合正态分布,以均数±标准差表示,两独立样本采用 t 检验比较,多组数据间的比较采用方差分析,事后两两比较采用了Tukey's Honest Significant Difference(HSD)检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TIMER数据库对BMI1基因的泛癌差异分析结果 通过在TIMER数据库中检索BMI1基因并进行泛癌分析,33种癌症中BMI1表达水平的箱线图如图1所示。结果显示,在13种癌症中,BMI1呈显著高表达,分别是乳腺浸润性癌(BRCA),宫颈鳞状细胞癌及宫颈腺癌(CESC),胆管癌(CHOL),食管

癌(ESCA),头颈部鳞状细胞癌(HNSC),肾嫌色细胞癌(KICH),肾乳头状细胞癌(KIRC),肝细胞癌(LIHC),前列腺腺癌(PRAD),皮肤黑色素瘤(SKCM),胃腺癌(STAD),子宫内膜癌(UCEC)。与正常组织相比,*BMII*在HNSCC肿瘤组织中表达明显上调($P < 0.001$)。

2.2 *BMII* 敲低及过表达的 CAL27 稳定转染细胞株的鉴定结果 倒置荧光显微镜下观察慢病毒感染后的细胞,携带 GFP 荧光比率大于 90% (图 2)。RT-qPCR、Western blot 检测 *BMII* 稳转细胞株构建效果如图 3 所示。各组之间 *BMII* 的 mRNA 表达水平及蛋白表达水平差异有统计学意义,相较 shNC 组及 Blank 组,敲低组 sh*BMII*-2 细胞 *BMII* 的 mRNA 表达水平($q = 15.15$ 、 13.79 , 均 $P < 0.001$)及蛋白表达水平($q = 15.78$ 、 17.01 , 均 $P < 0.001$)下调

最明显,因此选取 sh*BMII*-2 作为敲低组作后续实验。相较 NC 组和 Blank 组,过表达 *BMII* 组的 mRNA($q = 44.39$ 、 45.20 , 均 $P < 0.0001$)及蛋白表达水平($q = 8.49$ 、 7.89 , 均 $P < 0.01$)明显上调,差异具有统计学意义。

2.3 *BMII* 表达水平对 NOTCH 信号通路的影响

Western blot 检测各组 *BMII* 稳定感染细胞中 NOTCH 通路下游蛋白的表达(图 4A-4D)。相较 shNC 组,sh*BMII* 组的通路基因蛋白 NOTCH1、DLL1、JAG1、HES1 的表达下降($t = 4.91$ 、 6.27 、 6.69 、 7.38 , 均 $P < 0.01$),过表达 *BMII* 的细胞中,通路基因蛋白相较 NC 组上调($t = 11.19$ 、 4.42 、 7.96 、 4.58 , 均 $P < 0.05$)。使用细胞免疫荧光技术检测 NOTCH1 表达水平,标记了荧光素的 NOTCH1 抗体与细胞的 NOTCH1 蛋白形成抗原抗体复合物。

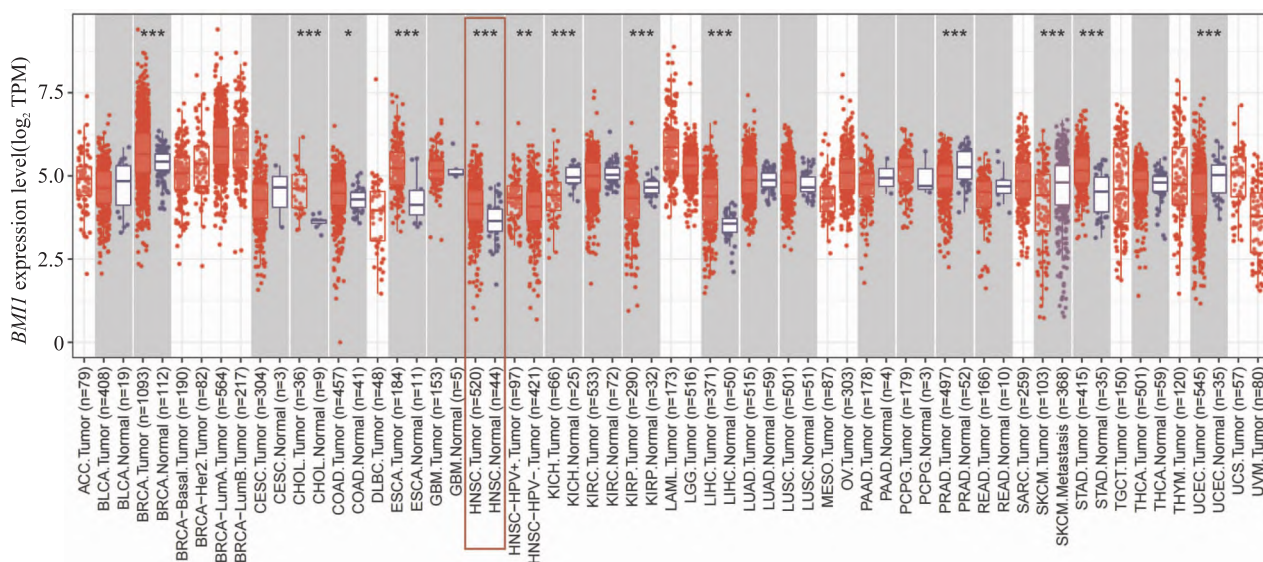


图 1 TIMER 数据库中 *BMII* 基因在肿瘤组织和正常组织中的泛癌分析

Fig. 1 Pan-cancer analysis of *BMII* expression in tumor and normal tissues using TIMER database

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Normal tissue.

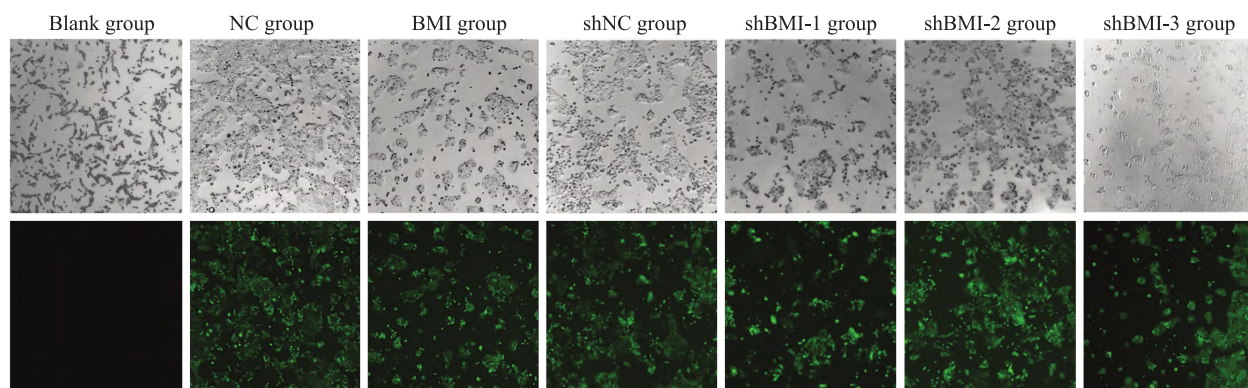


图 2 慢病毒感染 CAL27 细胞的 GFP 荧光覆盖 $\times 40$

Fig. 2 GFP fluorescence coverage of CAL27 cells after lentivirus infection $\times 40$

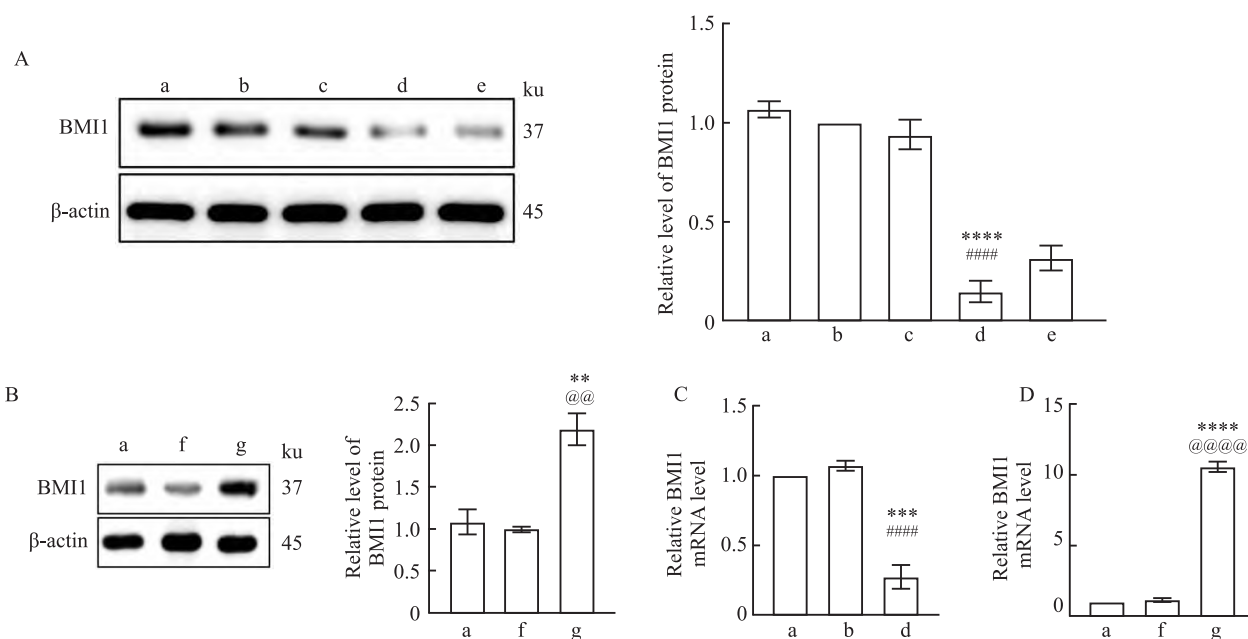


图3 各组 BMI1 蛋白和 mRNA 表达水平的比较

Fig. 3 Comparison of BMI1 protein and mRNA expression in groups

A, B: Comparison of BMI1 protein expression among cell groups; C, D: Comparison of BMI1 mRNA expression among cell groups; a: Blank group; b: shNC group; c: shBMI1-1 group; d: shBMI1-2 group; e: shBMI1-3 group; f: NC group; g: BMI1 group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Blank group; ##### $P < 0.0001$ vs shNC group; @ $P < 0.01$, @@@ $P < 0.0001$ vs NC group.

镜下观察荧光覆盖情况,结果与 Western blot 统计结果趋势相符,BMI1 过表达组的 NOTCH1 表达最高,shBMI1 组的 NOTCH1 表达量最低,荧光覆盖面积最少(图 4E)。

2.4 BMI1-NOTCH 通路轴对人口腔癌细胞活力的影响 采用 CCK-8 法检测各组稳转细胞株的细胞活力。shNC 组在 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度 CDDP 下,加入 DAPT(8 $\mu\text{mol/L}$) 培养 48 h 后细胞活力降低($q_{48\text{h}} = 6.89, 7.68, 10.41, 7.87$, 均 $P < 0.05$),在 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 浓度下,加入 DAPT(8 $\mu\text{mol/L}$) 培养 72 h 后细胞活力降低($q_{72\text{h}} = 5.40, 13.73, 5.67$, 均 $P < 0.05$)。与 shNC 组比较,shBMI1 组在 10.0、15.0 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 下培养 48 h 以及所有浓度 CDDP 下培养 72 h 后,细胞活力均降低($q_{48\text{h}} = 6.35, 5.74$, $q_{72\text{h}} = 9.07, 8.72, 23.36, 13.3, 6.70$, 均 $P < 0.05$);且 shBMI1 组在各个浓度 CDDP 下加入 DAPT 培养后的细胞活力进一步降低,差异有统计学意义($q_{48\text{h}} = 5.96, 8.02, 8.56, 9.94, 5.88, 9.18, 7.05$, $q_{72\text{h}} = 7.86, 12.09, 10.12, 13.44, 9.64, 19.27, 5.61, 13.24, 5.19$, 均 $P < 0.05$) (图 5 A-B)。BMI1 组细胞在各个浓度培养中均可见其细胞活力普遍较 NC 组偏高,仅在 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CDDP 中处理 72 h 后细胞活力高于 NC 组,

差异有统计学意义($q_{72\text{h}} = 6.14$, $P < 0.05$)。同时,在各个浓度 CDDP 下加入 DAPT(8 $\mu\text{mol/L}$),NC 组细胞活力较单独 CDDP 培养时有不同程度下降,仅在 72 h, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 中无统计学意义(NC group CDDP + DAPT: $q_{48\text{h}} = 6.17, 6.43, 7.66, 10.10, 6.65$, $q_{72\text{h}} = 10.31, 9.53, 8.92, 6.14, 5.85$, 均 $P < 0.05$)。在 BMI1 组中可见 48 h, 5.0、10.0、15.0 $\mu\text{mol/L}$ 及 72 h 的各个药物浓度中,细胞活力较单独 CDDP 培养组下降(BMI1 group CDDP + DAPT: $q_{48\text{h}} = 6.43, 6.75, 6.94$, $q_{72\text{h}} = 7.97, 8.78, 8.68, 7.95, 8.41$, 均 $P < 0.05$)。在 48 h, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 72 h, 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 中联合用药的 BMI1 组细胞活力较 NC 组高,有统计学意义(BMI1 group CDDP + DAPT: $q_{48\text{h}} = 5.93$, $q_{72\text{h}} = 5.59$, 均 $P < 0.05$) (图 5 C-D)。根据实验结果,5.0 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 可保留一定的细胞活力,因此作为后续实验浓度。

2.5 BMI1-NOTCH 通路轴对人口腔癌细胞迁移、侵袭和形成克隆能力的影响 细胞划痕实验结果显示,使用 DMSO、CDDP、DAPT、CDDP + DAPT 处理 48 h 后,shBMI1 组划痕愈合率低于 shNC 组($q = 9.52, 5.54, 9.33, 6.45$, 均 $P < 0.05$),过表达 BMI1 组细胞整体划痕间愈合距离均高于 NC 组($q = 8.65, 6.77, 7.43, 5.86$, 均 $P < 0.05$),且各组细胞中的

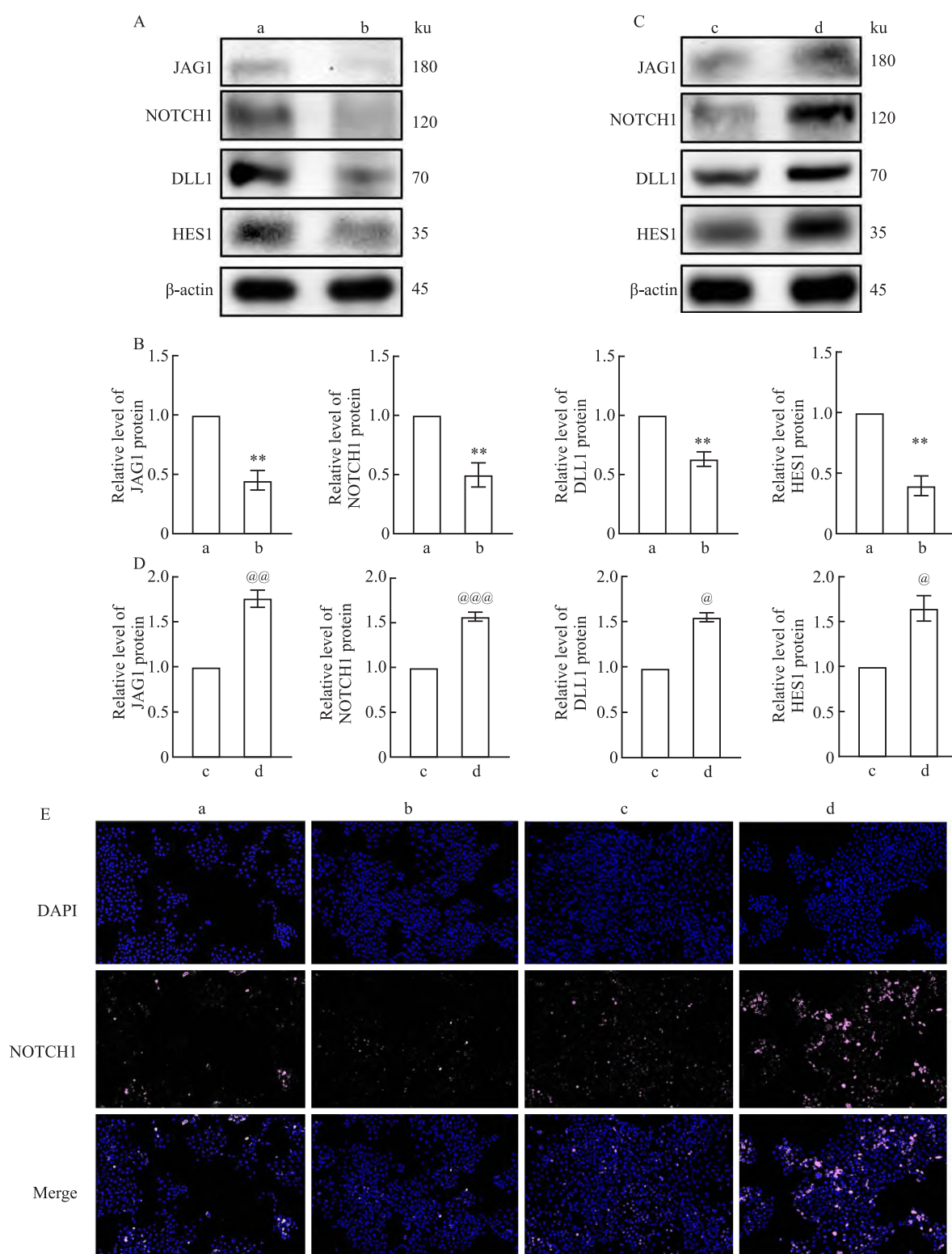


图4 NOTCH 通路相关蛋白表达水平的比较

Fig. 4 Comparison of NOTCH pathway-related protein expression levels

A – D: NOTCH signaling pathway protein expression in cell groups; E: Immunofluorescence staining to observe NOTCH1 protein expression in each cell group $\times 40$; a: shNC group; b: shBMI1 group; c: NC group; d: BMI1 group; ** $P < 0.01$ vs shNC group; @ $P < 0.05$, @@ $P < 0.01$, @@@ $P < 0.001$ vs NC group.

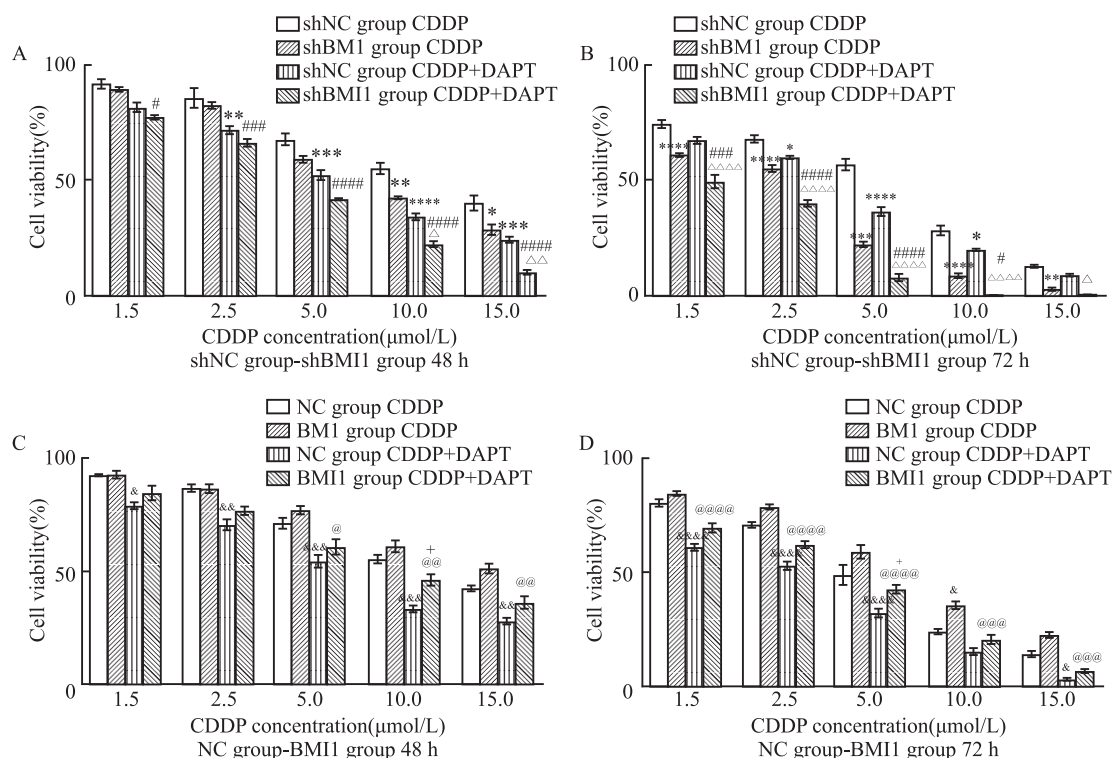


图5 不同浓度 CDDP、CDDP + DAPT 作用 48 h 及 72 h 后各组细胞活力的变化

Fig. 5 Cell viability after 48 h and 72 h of CDDP and CDDP + DAPT treatment

A, B: Cell viability of shBMI1 group and shNC group; C, D: Cell viability of BMI1 group and NC group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs shBMI1 group CDDP; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs shNC group CDDP; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.0001$ vs shNC group CDDP + DAPT; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$, &&&& $P < 0.0001$ vs NC group CDDP; @ $P < 0.05$, @@ $P < 0.01$, @@@ $P < 0.001$, @@@@ $P < 0.0001$ vs BMI1 group CDDP; + $P < 0.05$ vs NC group CDDP + DAPT.

CDDP + DAPT 处理组细胞迁移能力均下降 (shNC group: $q = 5.36$, $P = 0.0267$; shBMI1 group: $q = 5.97$, $P = 0.0149$; NC group: $q = 7.69$, $P = 0.0011$; BMI1 group: $q = 8.60$, $P = 0.0003$) (图 6A - 6D)。Transwell 检测结果显示, 药物处理后的 shBMI1 组侵袭能力较 shNC 组降低 (shBMI1 group: $q = 16.14$, 12.37 , 12.36 , 6.40 , 均 $P < 0.01$), 而 BMI1 组穿过铺有基质胶的聚碳酸酯膜细胞数目较 NC 组多 (BMI1 group: $q = 9.65$, 10.38 , 8.22 , 6.97 , 均 $P < 0.01$)。各组细胞经 CDDP + DAPT 干预后穿膜数较 CDDP 组减少, 其中 shNC group CDDP + DAPT 和 BMI1 group CDDP + DAPT 较同组细胞经 CDDP 处理的穿膜数显著减少 (shNC group: $q = 8.07$, $P = 0.0007$; BMI1 group: $q = 8.15$, $P = 0.0006$) (图 6E - 6H)。平板克隆结果显示, shBMI1 组细胞经 DMSO、CDDP、CDDP + DAPT 处理 48 h 后的克隆数较 shNC 低, 有统计学意义 (shBMI1 group: $q = 14.09$, 9.85 , 8.12 , 均 $P < 0.001$), 经 DMSO、CDDP、DAPT 培养后的 BMI1 组细胞集落形成数目较 NC

组高, 具有统计学意义 (BMI1 group: $q = 8.24$, 6.28 , 6.12 , 均 $P < 0.01$), CDDP + DAPT 组的细胞克隆数均较 CDDP 组集落数少 (shNC group: $q = 6.80$, $P = 0.0037$; shBMI1 group: $q = 5.58$, $P = 0.0199$; NC group: $q = 5.06$, $P = 0.0401$; BMI1 group: $q = 6.73$, $P = 0.0041$) (图 6I - 6L)。

2.6 BMI1-NOTCH 通路轴对人口腔癌细胞凋亡的影响 流式细胞术检测各组细胞在 DMSO、CDDP、DAPT、CDDP + DAPT 处理后的细胞凋亡率。sh-BMI1 组 CDDP、DAPT、CDDP + DAPT 处理的细胞凋亡率较 shNC 组高 (shBMI1 group: $q = 9.16$, 6.86 , 8.10 , $P < 0.001$), BMI1 组经 CDDP 和 CDDP + DAPT 处理后的细胞凋亡率较 NC 组少, 有统计学意义 (BMI1 group: $q = 4.92$, 10.15 , $P < 0.05$)。CDDP + DAPT 作用组较 CDDP 组的细胞凋亡率上升 (shNC group: $q = 11.70$, $P < 0.0001$; shBMI1 group: $q = 10.64$, $P < 0.0001$; NC group: $q = 15.07$, $P < 0.0001$; BMI1 group: $q = 9.84$, $P < 0.0001$) (图 7)。

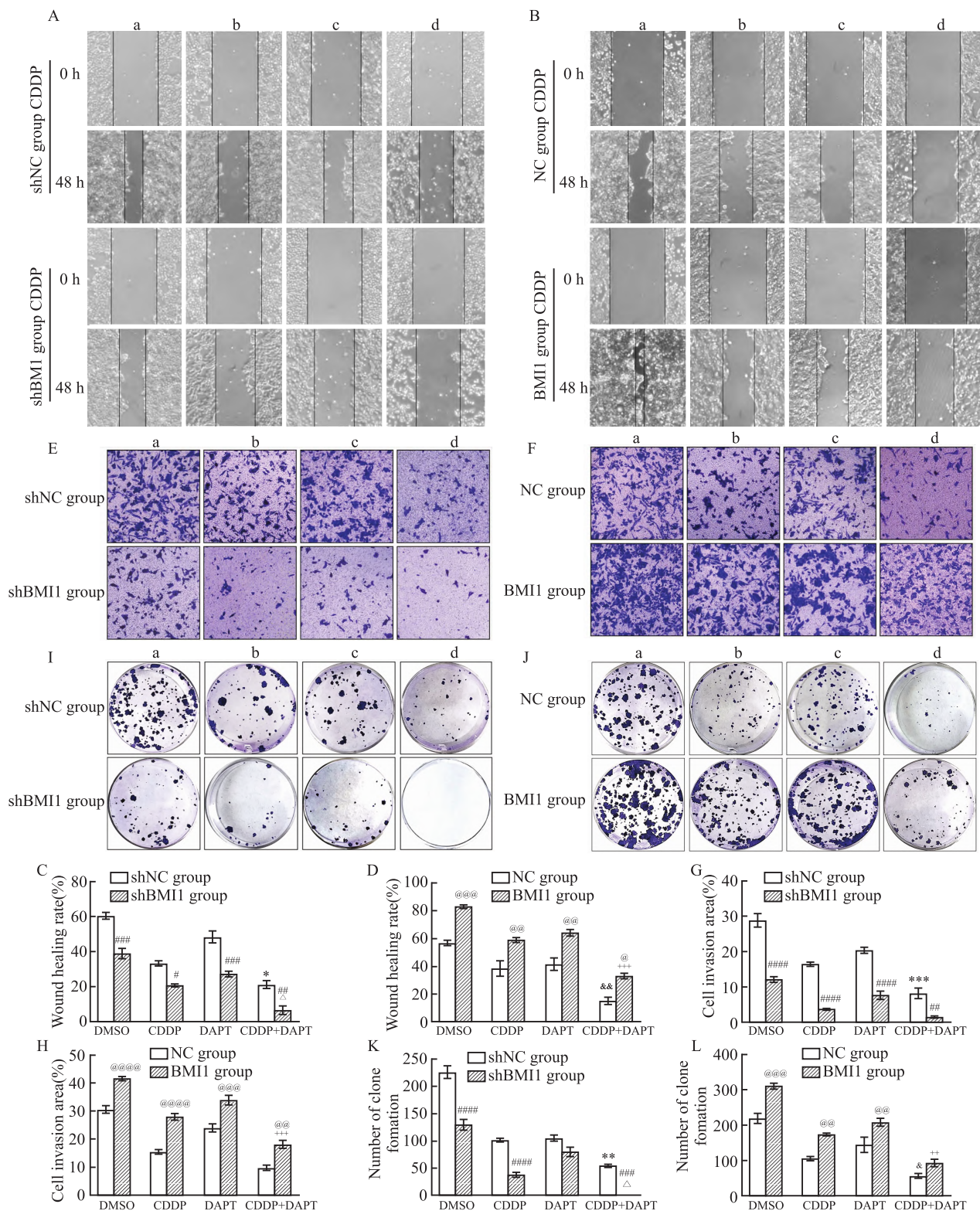


图6 使用DMSO、CDDP、DAPT、CDDP + DAPT处理各组细胞,检测细胞的迁移、侵袭和平板克隆能力变化

Fig. 6 Effects of DMSO, CDDP, DAPT, and CDDP + DAPT on cell migration, invasion, and colony formation

A - D: Wound healing at 48 h post-treatment $\times 40$; E - H: Cell invasion at 24 h post-treatment $\times 200$; (I - L) Colony formation at 48 h post-treatment; a: DMSO; b: CDDP (5 $\mu\text{mol/L}$); c: DAPT (8 $\mu\text{mol/L}$); d: CDDP + DAPT (5 $\mu\text{mol/L}$ + 8 $\mu\text{mol/L}$); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs shNC group; @ $P < 0.05$, @@ $P < 0.01$, @@@ $P < 0.001$, @@@@ $P < 0.0001$ vs NC group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs shNC group CDDP; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs NC group CDDP; Δ $P < 0.05$ vs shBMI1 group CDDP; ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ vs BMI1 group CDDP.

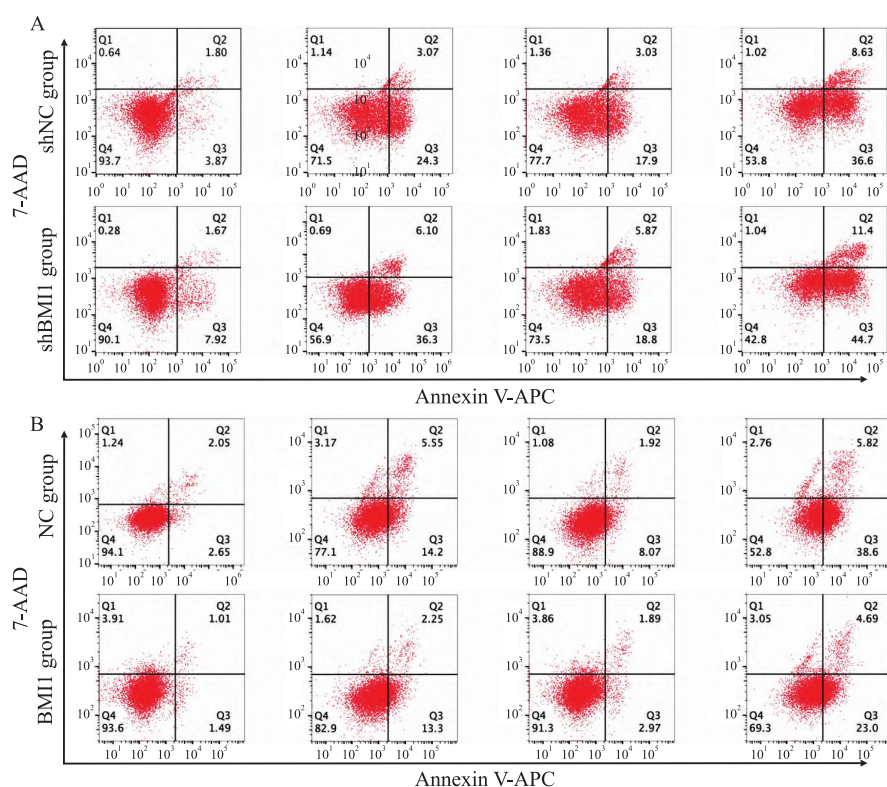


图7 使用DMSO、CDDP、DAPT、CDDP + DAPT处理各组细胞后各组细胞凋亡情况

Fig. 7 Apoptosis of cells after treatment with DMSO, CDDP, DAPT, and CDDP + DAPT

A, B: FMC analysis of apoptosis; Q1

(nuclei only), Q2 (late apoptosis or necrosis), Q3 (early apoptosis), Q4 (live cells); C, D: Statistical analysis of apoptosis rates (Q2 + Q3);

$P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs shNC group; @ $P < 0.05$, @@@ $P < 0.0001$ vs NC group; **** $P < 0.0001$ vs shNC group CDDP; &&&& $P < 0.0001$ vs NC group CDDP; △△△△ $P < 0.0001$ vs shBMI1 group CDDP; + + + + $P < 0.0001$ vs BMI1 group CDDP.

3 讨论

目前,对于 OSCC 患者的治疗主要根据其肿瘤侵犯的解剖部位、病理分型、浸润深度等,有计划、合理地应用多学科综合序列治疗。然而患者的 5 年总体生存率仅约 50%,肿瘤复发或转移患者的中位总生存期为 10 ~ 13 个月^[2]。多项文献^[10-11]报道 *BMII* 作为 OSCC 的促癌基因在患者肿瘤组织样本中异常表达,其高表达在肿瘤的发展过程中起着重要的作用,涉及肿瘤的发生、异常增殖、侵袭和转移。并且靶向抑制或敲除 *BMII* 基因后,OSCC 的肿瘤干细胞致瘤性显著减弱,放化疗敏感性增强,提示 *BMII* 基因是一个提高 OSCC 放化疗效率的潜在靶点^[12]。同时,相关研究^[9]数据显示,NOTCH 信号通路在肿瘤的化疗耐药中起着关键作用。在前列腺癌的耐药研究中也观察到 NOTCH 信号的激活^[13]。由于 OSCC 的发展是多分子、多信号通路互相串扰的复杂调控过程,还需要深入了解 *BMII* 上下游分子信号的传递。

本研究通过构建 *BMII* 基因敲低/过表达及阴性对照的 CAL27 细胞株,使用 RT-qPCR 及 Western blot 验证转染效果。选出最佳敲低效果的细胞株

后,检测 NC、BMI1、shNC、shBMI1 组细胞的 NOTCH 信号通路 NOTCH1、DLL1、JAG1、HES1 表达情况,Western blot 和细胞免疫荧光染色结果表明,NOTCH 信号通路相关蛋白在过表达 *BMII* 的细胞组中高表达,在 shBMI1 组中表达量相应下调。

在 OSCC 临床常用的 TPF 方案中,化疗药物对人体细胞非特异性的杀伤作用可导致明显的治疗副作用,造成患者机体损伤和生活质量的下降,同时癌细胞的耐药导致临床用药剂量的增加或者肿瘤复发与不良预后。因此寻找肿瘤特异性强且对患者机体损伤较小的化疗方案至关重要。在过去的 20 年里,由于成本问题、安全因素、医学伦理及实验对象(细胞、动物)与人类的遗传学和生物学上的差异,只有极少数新药进入晚期 HNSCC 患者的临床实践。

在基础实验方面,研究者也一直在积极探索肿瘤的耐药机制,寻找可靠的耐药基因及通路。McAuliffe^[9]团队在原发性卵巢癌患者样本的研究中发现,CDDP 与 NOTCH 通路抑制剂 DAPT 组合可增强肿瘤细胞 DNA 损伤反应、导致 G₂/M 细胞周期阻滞、促进细胞凋亡。本实验结果与该文献报道的趋势相符,通过使用 DMSO、CDDP、DAPT、CDDP + DAPT 分别处理 NC 组、BMI1 组、shNC 组和 shBMI1

组稳转细胞株 CAL27, 利用细胞表型实验 CCK-8、划痕愈合实验、Transwell、平板克隆、流式细胞术对各组的细胞活力、迁移、侵袭及细胞凋亡等情况进行检测。实验结果显示, 过表达 *BMII* 组细胞株的 NOTCH 通路激活, 细胞活力、平板克隆能力、迁移及侵袭性均增强, 细胞凋亡减少, 细胞恶性程度上升, *shBMII* 则呈相反趋势。当 CDDP 与 DAPT 联合应用时, 对各组细胞的杀伤作用均显著增强。

本实验的研究结果初步验证 NOTCH 通路抑制剂对 OSCC 细胞的 CDDP 耐药性具有抑制作用, 能够与 CDDP 协同诱导细胞凋亡。因此推测 *BMII*、NOTCH 通路与 OSCC 的肿瘤恶性程度和 CDDP 耐药之间存在重要关联。

现如今的国内外研究结果中, 尚不能明确阐述 NOTCH 信号通路中的下游基因 (*NOTCH1*、*NOTCH2*、*NOTCH3*、*NOTCH4* 及 DLL 和 JAG 家族基因等) 在肿瘤细胞和机体中产生的作用及机制, 通路中的基因、转录产物及其蛋白产物在不同类型的肿瘤和个体中的突变、修饰及激活过程中存在细微的差异, 这些都导致最终的表型及蛋白功能大相径庭。因此针对 *BMII*-NOTCH 通路轴的分子机制方面仍需要进行更多的基础研究及组织学方面的验证, 以深入探索 *BMII*-NOTCH 通路介导的 OSCC 生物学行为变化和 CDDP 耐药性, 有助于优化 OSCC 化疗策略, 为开发 CDDP 耐药逆转药物提供基础研究支持。

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] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. Int J Cancer, 2019, 144 (8): 1941–53. doi: 10.1002/ijc.31937.
- [3] Koramati S L, Sarathy V, Varayathu H, et al. Addition of nimotuzumab to standard TPF regimen in locally advanced head and neck cancer: a single institutional study [J]. J Oncol, 2021, 2021: 6641963. doi: 10.1155/2021/6641963.
- [4] Bernadach M, Lapeyre M, Dillies A F, et al. Predictive factors of toxicity of TPF induction chemotherapy for locally advanced head and neck cancers [J]. BMC Cancer, 2021, 21 (1): 360. doi: 10.1186/s12885-021-08128-5.
- [5] Alkema M J, Wiegant J, Raap A K, et al. Characterization and chromosomal localization of the human proto-oncogene BMI-1 [J]. Hum Mol Genet, 1993, 2 (10): 1597–603. doi: 10.1093/hmg/2.10.1597.
- [6] Tamburri S, Lavarone E, Fernández-Pérez D, et al. Histone H2AK119 mono-ubiquitination is essential for polycomb-mediated transcriptional repression [J]. Mol Cell, 2020, 77 (4): 840–56. e5. doi: 10.1016/j.molcel.2019.11.021.
- [7] Wu C P, Du H D, Gong H L, et al. Hypoxia promotes stem-like properties of laryngeal cancer cell lines by increasing the CD133 + stem cell fraction [J]. Int J Oncol, 2014, 44 (5): 1652–60. doi: 10.3892/ijo.2014.2307.
- [8] Jia L, Zhang W, Wang C Y. BMI1 inhibition eliminates residual cancer stem cells after PD1 blockade and activates antitumor immunity to prevent metastasis and relapse [J]. Cell Stem Cell, 2020, 27 (2): 238–53. e6. doi: 10.1016/j.stem.2020.06.022.
- [9] McAuliffe S M, Morgan S L, Wyant G A, et al. Targeting notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109 (43): E2939–48. doi: 10.1073/pnas.1206400109.
- [10] Ma H, Dai H, Duan X, et al. Independent evaluation of a FOXM1-based quantitative malignancy diagnostic system (qMIDS) on head and neck squamous cell carcinomas [J]. Oncotarget, 2016, 7 (34): 54555–63. doi: 10.18632/oncotarget.10512.
- [11] Rao R S, Raju K L, Augustine D, et al. Prognostic significance of ALDH1, Bmi1, and OCT4 expression in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma [J]. Cancer Control, 2020, 27 (1): 1073274820904959. doi: 10.1177/1073274820904959.
- [12] Sharma M, Fonseca F P, Hunter K D, et al. Loss of oral mucosal stem cell markers in oral submucous fibrosis and their reactivation in malignant transformation [J]. Int J Oral Sci, 2020, 12 (1): 23. doi: 10.1038/s41368-020-00090-5.
- [13] Chang W H, Lai A G. Aberrations in notch-hedgehog signalling reveal cancer stem cells harbouring conserved oncogenic properties associated with *in vitro* hypoxia and *in vivo* immunoevasion [J]. Br J Cancer, 2019, 121 (8): 666–78. doi: 10.1038/s41416-019-0572-9.

BMII induces malignant biological behavior in human oral squamous carcinoma cells *via* the NOTCH signaling pathway

Huang Yang^{1,2}, Ma Hong^{1,2}, Xiang Hang^{1,2}

(¹Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatological Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004; ²School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To investigate the *BMII*-NOTCH signaling pathway that regulates proliferation, migration, (下转第 2134 页)

way markers WNT family members 3A (WNT3A), β -catenin and cyclin D1 (CCND1). **Results** RT-PCR results showed that the expression of *E2F1* in cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P < 0.001$). At the same time, compared with HOEC cells, the expression of *E2F1* in SCC-9, CAL-27, TSCCa and SCC-25 cells significantly increased ($P < 0.05$), and the high expression in SCC-25 cells was the most obvious. SCC-25 would be used as an experimental cell line in subsequent experiments. After knocking down *E2F1* in SCC-25 cells, the viability of CCK-8 cells was significantly inhibited ($P < 0.001$). The number of EdU positive cells decreased significantly ($P < 0.001$). The number of cell clones was significantly reduced ($P < 0.001$). The proportion of total apoptosis significantly increased ($P < 0.001$). The proportion of cells in G_1 phase increased ($P < 0.01$). The proportion of cells in G_2 phase decreased ($P < 0.01$). The cell migration and invasion ability were significantly inhibited ($P < 0.001$). Western blot showed that the expression of WNT signaling pathway proteins WNT3A, β -catenin and CCND1 decreased ($P < 0.001$), while the expression of EMT-related proteins N-cadherin and Snail decreased ($P < 0.001$), while the expression of E-cadherin increased ($P < 0.001$). **Conclusion** Knockdown of *E2F1* inhibits the proliferation, migration, invasion and EMT process of human tongue squamous cell carcinoma SCC-25 cells, and promotes apoptosis. This anti-tumor effect may be achieved by blocking the activation of WNT signaling pathway.

Key words *E2F1*; tongue squamous cell carcinoma; proliferation; migration; invasion; apoptosis; EMT; WNT

Fund program Science and Technology Research Project of Liaoning Provincial Department of Education (No. JYTJCZR2020062)

Corresponding author Zhang Bin, E-mail: zhangbinjin@sina.com

(上接第 2126 页)

invasion, apoptosis, and cisplatin (CDDP) sensitivity in human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells. **Methods** Human OSCC cell line CAL27 was used to construct the CAL27 cell line with lentivirus, which knocked down or overexpressed *BMII* gene. The knockdown and control groups included: shBMII-1, shBMII-2, shBMII-3, and shNC group, while the overexpression and control groups were BMII and NC group. RT-qPCR and Western blot were employed to verify transfection efficiency and select the cell group with the most effective knockdown. Western blot was used to detect the expression of NOTCH signaling pathway proteins, including NOTCH1, Delta-like ligand 1 (*DLL1*), Jagged1 (*JAG1*), and Hairy/enhancer-of-split 1 (*HES1*), in the transformed CAL27 cells. Subsequently, the cells in each group were cultured with the drug solvents dimethyl sulfoxide (DMSO), CDDP, NOTCH pathway inhibitor gamma-secretase inhibitor (DAPT), and CDDP + DAPT, respectively, and the cell phenotype in each group were detected using CCK-8 assay, Wound healing assay, Transwell invasion assay, colony formation assay, and flow cytometry. **Results** Overexpression of *BMII* increased the expression levels of NOTCH pathway gene proteins *NOTCH1*, *DLL1*, *JAG1*, and *HES1* ($P < 0.05$). Under CDDP intervention, cells in the BMII group exhibited increased viability, invasion, migration, and colony formation abilities, and decreased apoptosis compared to the shBMII group ($P < 0.05$). When comparing the CDDP group with the CDDP + DAPT group, the combination of medications resulted in a significant increase in the apoptosis rate and an increase in the sensitivity of cancer cells to CDDP ($P < 0.05$). **Conclusion** *BMII* may increase the cellular malignancy of CAL27 cell line by activating the NOTCH signaling pathway, promoting cell viability, migration, and invasion, as well as decreasing the cellular drug sensitivity to CDDP. Inhibition of the NOTCH pathway increases the cisplatin sensitivity of CAL27, and CDDP + DAPT has a synergistic cytotoxic effect to promote OSCC cell apoptosis.

Key words *BMII*; OSCC; NOTCH; cisplatin resistance; proliferation; invasion

Fund program Scientific and Technological Project of Guizhou Health Commission (No. gzwkj2023-442)

Corresponding authors Ma Hong, E-mail: mahong1966@126.com; Xiang Hang, E-mail: 393005823@qq.com