

网络出版时间:2024-12-05 13:51:13 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.009

敲低 *E2F1* 抑制人舌鳞癌细胞增殖及迁移的机制研究

杜明珠,张 斌

(锦州医科大学附属第一医院口腔颌面外科, 锦州 121000)

摘要 **目的** 在人舌鳞癌细胞中敲低 *E2F* 转录因子 1 (*E2F1*),探究其对舌鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响并探索其可能的作用机制。**方法** RT-PCR 检测人舌鳞癌组织及癌旁组织样本中 *E2F1* 表达。RT-PCR 检测口腔上皮细胞 HOEC 和人舌鳞癌细胞 SCC-9、CAL-27、TSCCa 和 SCC-25 细胞中 *E2F1* 基因的本底表达,筛选 *E2F1* 显著高表达的细胞株进行后续实验。在舌鳞癌候选细胞中敲低 *E2F1* 基因后利用 CCK-8、EdU、克隆形成、细胞划痕、Transwell、细胞凋亡和细胞周期实验检测敲低 *E2F1* 对人舌鳞癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响。Western blot 检测上皮间充质转化(EMT)标志物钙粘蛋白 E(E-cadherin)、钙粘蛋白 N(N-cadherin)和蜗牛家族转录抑制因子 1(Snail)蛋白及 WNT 信号通路标志物 WNT 家族成员 3A(WNT3A)、 β -连环蛋白(β -catenin)和细胞周期蛋白 D1(CCND1)表达变化。**结果** RT-PCR 结果显示,相比癌旁组织,*E2F1* 在癌组织中表达明显升高($P < 0.001$);同时相比 HOEC 细胞,*E2F1* 在 SCC-9、CAL-27、TSCCa 和 SCC-25 细胞中表达均明显升高($P < 0.05$),而在 SCC-25 细胞中高表达最为明显,因此,后续实验使用 SCC-25 作为实验细胞株。SCC-25 细胞中敲低 *E2F1* 后,CCK-8 细胞存活能力明显被抑制($P < 0.001$);EdU 阳性细胞数、细胞克隆成球数明显减少($P < 0.001$);细胞总凋亡比例明显升高($P < 0.001$);细胞处于 G_1 期细胞比例增多($P < 0.01$),相反处于 G_2 期细胞比例减少($P < 0.01$);细胞迁移和侵袭能力均明显被抑制($P < 0.001$);WNT 信号通路蛋白 WNT3A、 β -catenin 和 CCND1 蛋白表达降低($P < 0.001$),同时 EMT 相关蛋白 N-cadherin 和 Snail 蛋白表达降低($P < 0.001$),而 E-cadherin 蛋白表达升高($P < 0.001$)。**结论** 敲低 *E2F1* 抑制人舌鳞癌 SCC-25 细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 过程,同时促进细胞凋亡,这种抑癌作用可能是通过阻断 WNT 信号通路的激活而实现。

关键词 *E2F1*;舌鳞癌;增殖;迁移;侵袭;凋亡;EMT;WNT**中图分类号** R 782**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2127-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.009

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是口腔癌最广泛存在的形式之一^[1],TSCC 除了影响患者的言语、咀嚼和吞咽障碍之外,还可能导致外观改变,从而降低患者的生活质量^[2]。目前,TSCC 的治疗包括手术、化疗、放疗或综合治疗,主要视患者的病情而定^[3]。尽管目前 TSCC 在诊断和治疗方面取得了很大的进步,但 TSCC 的病死率仍然很高,有研究^[4]显示,晚期 TSCC 患者的 5 年生存率低于 50%。针对 TSCC 迫切需要更有效的治疗靶点和疗法,因此,有必要建立预测 TSCC 预后的新方法。

E2F 转录因子 1 (*E2F* transcription factor 1, *E2F1*)是 *E2F* 家族中的一种转录因子,是复制应激抑制因子和细胞周期调节因子,因此,*E2F1* 可以导致程序性细胞死亡并限制癌细胞的无限制增殖^[5]。

已发现,*E2F1* 在多种癌症组织中广泛表达,如肺癌^[6]、肠癌^[7]、胃癌^[8]和肝癌^[9]等,并促进它们的侵袭和转移,成为确定肿瘤预后的关键分子标记物。然而,目前仅有资料显示 *E2F1* 在 TSCC 肿瘤组织中呈高表达^[10],但 *E2F1* 是否调控 TSCC 并未得到证实。该研究通过在 TSCC 细胞中敲低 *E2F1*,探究敲低 *E2F1* 对细胞增殖、迁移和侵袭的影响并初步探究 *E2F1* 调控 TSCC 的分子作用机制,这将对 TSCC 的诊断和分子药物靶点开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人口腔上皮细胞 HOEC(货号:CP-H203)、人舌鳞癌细胞 SCC-9(货号:CL-0571)、CAL-27(货号:CL-0265)、TSCCa(货号:CL-0235)和 SCC-25(货号:CL-0569)细胞均购自武汉普诺赛生物公司;DMEM 细胞培养液(货号:G4516)、1640 细胞培养液(货号:G4535)、PBS(货号:G4202)、青-链霉素双抗混合液(货号:G4003)、结晶紫染液(货号:G1014)和 CCK-8(货号:G4103)检测试剂盒购自武汉赛维尔生物公司;胎牛血清(货号:E600001)、EdU

2024-09-14 接收

基金项目:辽宁省教育厅科学技术研究项目(编号:JYTJCZR2020062)

作者简介:杜明珠,女,硕士研究生;

张 斌,男,教授,硕士生导师,通信作者,E-mail: zhang-binjin@sina.com

检测试剂盒(货号:E607204)、细胞周期、凋亡试剂盒(货号:E606336)、RT-PCR 检测试剂盒(货号:B110031)、RIPA 裂解液(货号:C510006)、5 × 蛋白 loading buferr(货号:C508320)购自上海生工生物公司;TRIzol(货号:T9424)购自美国 sigma 公司;RT-PCR 引物合成自苏州金唯智生物公司;matrigel 基质胶(货号:356234)购自美国 BD 公司;实验所用抗体均购自美国 affinity 公司:E2F 转录因子 1(E2F transcription factor 1, E2F1)一抗(货号:AF6377)、WNT 家族成员 3A(Wnt family member 3A, WNT3A)一抗(货号:DF6113)、β-连环蛋白(catenin beta 1, β-catenin)一抗(货号:AF6266)、细胞周期蛋白 D1(cyclin D1, CCND1)一抗(货号:AF0931)、钙粘蛋白 E(cadherin 1, E-cadherin)一抗(货号:AF0131)、钙粘蛋白 N(cadherin 2, N-cadherin)一抗(货号:AF5239)、蜗牛家族转录抑制因子 1(snail family transcriptional repressor 1, Snail)一抗(货号:AF6032)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗(货号:AF7021)、山羊抗兔 IgG 二抗(货号:S0001);E2F1 敲低慢病毒购自上海汉恒生物公司。人舌鳞癌组织和人舌鳞癌旁组织取自锦州医科大学附属第一医院,共 5 对,所有患者均签署知情同意书。

1.2 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱(型号:HERAcell I)购自美国赛默飞公司;低温高速冷冻离心机(型号:CT15RE)购自日本日立电子公司;荧光定量 PCR 仪(型号:CFX Connect)购自美国伯乐公司;蛋白成像系统(型号:ImageQuantLAS4000)购自美国通用公司;荧光显微镜(型号:IX71)购自日本奥林巴斯公司;微量分光光度计(NANODROP 2000)购自美国赛默飞公司;流式细胞仪(型号:FACSCanto II)购自美国 BD 公司。

1.3 细胞培养 HOEC、SCC-9、CAL-27、TSCCa 和 SCC-25 细胞使用对应的完全培养液培养,培养条件:37 ℃、5% CO₂。

1.4 方法

1.4.1 检测人舌鳞癌组织与癌旁组织样本中 E2F1 表达 取 5 对人舌鳞癌组织(Tumor 组)和与癌旁组织(Normal 组),液氮研磨后,TRIzol 法提取组织的总 RNA,微量分光光度计测定 RNA 浓度,每组样本按照 1 μg 的 RNA 总量进行 RNA 的反转录反应,生成的 cDNA 作为模板进行 RT-PCR 检测,检测 E2F1 在组织中的表达情况。RT-PCR 反应条件:预变性 95 ℃ 10 min;变性 95 ℃ 5 s;退火 60 ℃ 20 s;延伸

72 ℃ 10 s;共 40 个循环反应;待 RT-PCR 结束,统计数据并进行计算。RT-PCR 反应所用的引物信息见表 1。

表 1 RT-PCR 引物表

Tab.1 Sequence of RT-PCR primer

Primer name	Primer sequences
GAPDH	F: 5'-ATCATCAGCAATGCCTCC-3'
GAPDH	R: 5'-CATCACGCCACAGTTTCC-3'
E2F1	F: 5'-AAGAACCGCTGTGTCCCG-3'
E2F1	R: 5'-GAGGCCGAAGTGCTAGTCG-3'

1.4.2 检测细胞本底的 E2F1 表达 取生长状态良好的 HOEC、SCC-9、CAL-27、TSCCa 和 SCC-25 细胞,TRIzol 法提取 5 组细胞总 RNA,微量分光光度计测定 RNA 浓度,每组样本按照 1 μg 的 RNA 总量进行反转录反应,生成的 cDNA 作为模板进行 RT-PCR 检测,检测 E2F1 在人舌鳞癌细胞中的本底表达情况,RT-PCR 反应条件同 1.3.1。

1.4.3 E2F1 敲低慢病毒的感染 取生长状态良好的 SCC-25 细胞,胰酶消化并计数,以 2×10^5 个/孔将细胞接种于 6 孔板,待细胞完全贴壁后,弃去 6 孔板培养上清液,更换为 1 ml Opti-MEM,加入按照 MOI = 20 的条件计算所需的 E2F1 敲低(shE2F1)组和对照(shCtrl)组病毒总量,将病毒滴加于 6 孔板后混匀,继续置于培养箱培养,18 h 后更换为 DMEM 完全培养液,继续培养 3 d 后检测 E2F1 的表达效率。

1.4.4 RT-PCR 检测 E2F1 敲低效率 TRIzol 法提取 E2F1 敲低组和对照组的 SCC-25 细胞的总 RNA,测定好浓度后进行 RNA 的逆转录反应,RT-PCR 检测 E2F1 的敲低效率,实验方法同步骤 1.3.1,RT-PCR 反应完毕后对结果进行统计分析。

1.4.5 Western blot 检测 E2F1 敲低效率 取 shE2F1 组和 shCtrl 组的 SCC-25 细胞,弃去培养上清液后,PBS 清洗细胞 1 次,加入 500 μl 的 RIPA 裂解蛋白,随后对蛋白浓度进行定量,加入 5 × 蛋白 loading buffer 混匀后置于 100 ℃ 恒温加热板上蛋白变性 10 min。配置 SDS-PAGE 蛋白凝胶,按照 20 μg/孔蛋白将两组样本蛋白上样,设置电泳仪参数后进行蛋白电泳。蛋白电泳结束后,进行切胶、转膜,E2F1 和 GAPDH 一抗按照 1 : 2 000 浓度过夜孵育,二抗按照 1 : 5 000 室温孵育 2 h 孵育,ECL 发光法检测 E2F1 的蛋白表达并对结果进行分析。

1.4.6 CCK-8 实验 取 shE2F1 组和 shCtrl 组的

SCC-25 细胞,胰蛋白酶消化并计数,按照 2×10^3 个/孔将细胞接种于 96 孔板,共接种 3 块 96 孔板,培养箱中继续培养。待细胞完全贴壁后取出第 1 块 96 孔板,每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 3 h,使用多功能酶标仪检测 450 nm 处的细胞吸光度,第 2、3 块板步骤同上,3 d 后对结果进行分析。

1.4.7 EdU 实验 取 shE2F1 组和 shCtrl 组的 SCC-25 细胞,胰蛋白酶消化并计数,以 2×10^5 个/孔将细胞接种于 6 孔板,待细胞完全贴壁后使用 EdU 试剂盒对两组细胞进行 EdU 染料孵育,hochest 对细胞核进行染色,在荧光显微镜下拍照并对结果进行分析。

1.4.8 细胞克隆形成实验 取 shE2F1 组和 shCtrl 组的 SCC-25 细胞,胰蛋白酶消化并计数,以 1×10^3 个/孔将细胞接种于 6 孔板,培养箱中继续培养,期间每 3 d 更换 1 次培养液,12 d 后弃去 6 孔板培养上清液,使用结晶紫染色 5 min,去离子水清洗细胞 3 次,拍照并对结果进行分析。

1.4.9 细胞凋亡实验 取 shE2F1 组和 shCtrl 组的 SCC-25 细胞,胰蛋白酶消化并计数,以 5×10^5 个/样将细胞收集于无菌 EP 管中,1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液,PBS 洗涤细胞 1 次,弃去上清液,用 0.5 ml binding buffer 重悬细胞,加入 5 μ l Annexin V-FITC 染色,吹打混匀,再加入 10 μ l PI 进行细胞核染色,吹打混匀,室温避光孵育 15 min,使用 binding buffer 将每个样本补足至 1 ml,流式细胞仪进行细胞凋亡检测并对结果进行分析。

1.4.10 细胞周期检测 取 shE2F1 组和 shCtrl 组的 SCC-25 细胞,胰蛋白酶消化并计数,以 5×10^5 个/样将细胞收集于无菌 EP 管中,1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液,PBS 洗涤细胞 1 次,弃去上清液,加入新的 1 ml PBS 重悬细胞,加入 10 μ l PI 进行核染色,吹打混匀,室温避光孵育 15 min,流式细胞仪进行细胞周期检测并对结果进行分析。

1.4.11 细胞划痕实验 取 shE2F1 组和 shCtrl 组的 SCC-25 细胞,胰蛋白酶消化并计数,以 5×10^4 个/孔将细胞接种于 96 孔板,培养箱中继续培养,待细胞完全贴壁后使用 10 μ l 的无菌枪头对细胞进行划痕处理,100 μ l PBS 清洗细胞 1 次,补足 100 μ l 无血清培养液,显微镜下对 0 h 的细胞进行拍照,24 h 后再次对细胞拍照,对结果进行分析。

1.4.12 Transwell 实验 按照 1:8 稀释 Matrigel 基质胶,200 μ l 的基质胶包被 Transwell 小室上室,37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 30 min,使基质胶聚合成凝胶,取 shE2F1 组和 shCtrl 组的 SCC-25 细胞,胰蛋白酶消

化并计数,以 5×10^4 个/孔将细胞接种于 Transwell 内室,外室添加 600 μ l 30% FBS 的 DMEM 培养液,培养箱中继续培养 24 h。24 h 后,取出 Transwell 小室,结晶紫染色 5 min,去离子水洗净小室中残留结晶紫,显微镜下进行拍照并对结果进行分析。

1.4.13 Western blot 检测 EMT 和 WNT 通路蛋白表达 取 shE2F1 组和 shCtrl 组的 SCC-25 细胞,通过 Western blot 的方法检测 WNT 信号通路蛋白 WNT3A、 β -catenin 和 CCND1 的表达变化,同时检测 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin 和 Snail 的表达变化,实验方法同步骤 1.4.5,对结果进行分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量资料均符合正态分布,以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 舌鳞癌组织样本中 E2F1 表达情况 RT-PCR 检测结果显示,相比 Normal 组 (1.123 ± 0.348),Tumor 组 (4.183 ± 1.650) 中 E2F1 mRNA 表达明显升高 (LSD-*t* = -7.025, $P < 0.001$)。见图 1A。

2.2 E2F1 细胞本底表达情况 RT-PCR 检测结果显示,相比人口腔上皮细胞 HOCE (1.000 ± 0.027),E2F1 在 SCC-9 (2.011 ± 0.125)、CAL-27 (4.902 ± 0.049)、TSCCa (3.016 ± 0.407) 和 SCC-25 细胞 (5.995 ± 0.377) 中表达均升高 (LSD-*t* = -13.725、-121.257、-8.571、-22.911,均 $P < 0.05$),而在 SCC-25 细胞中高表达最为明显,因此,后续实验使用 SCC-25 作为实验细胞株。见图 1B。

2.3 E2F1 敲低效率 RT-PCR 检测结果显示,相比 shCtrl (1.006 ± 0.127) 组,shE2F1 组 (0.145 ± 0.010) 的 E2F1 mRNA 表达水平明显降低 (LSD-*t* = 11.714, $P < 0.01$)。见图 1C。Western blot 检测结果显示,相比 shCtrl 组 (1.000 ± 0.034),shE2F1 组 (0.256 ± 0.074) 的 E2F1 蛋白表达水平明显降低 (LSD-*t* = 15.792, $P < 0.001$)。见图 1D。E2F1 蛋白表达结果和 PCR 结果保持一致,均证明成功敲低了 SCC-25 细胞中 E2F1 基因的表达。

2.4 敲低 E2F1 后细胞增殖的变化 CCK-8 检测结果显示,相比 shCtrl 组,shE2F1 组 48 h 和 72 h 细胞存活能力均明显降低 (LSD-*t* = 8.758、20.304,均 $P < 0.01$)。见图 2A。

2.5 敲低 E2F1 后细胞增殖的变化 EdU 检测结果显示,相比 shCtrl 组 (0.436 ± 0.024),shE2F1 组

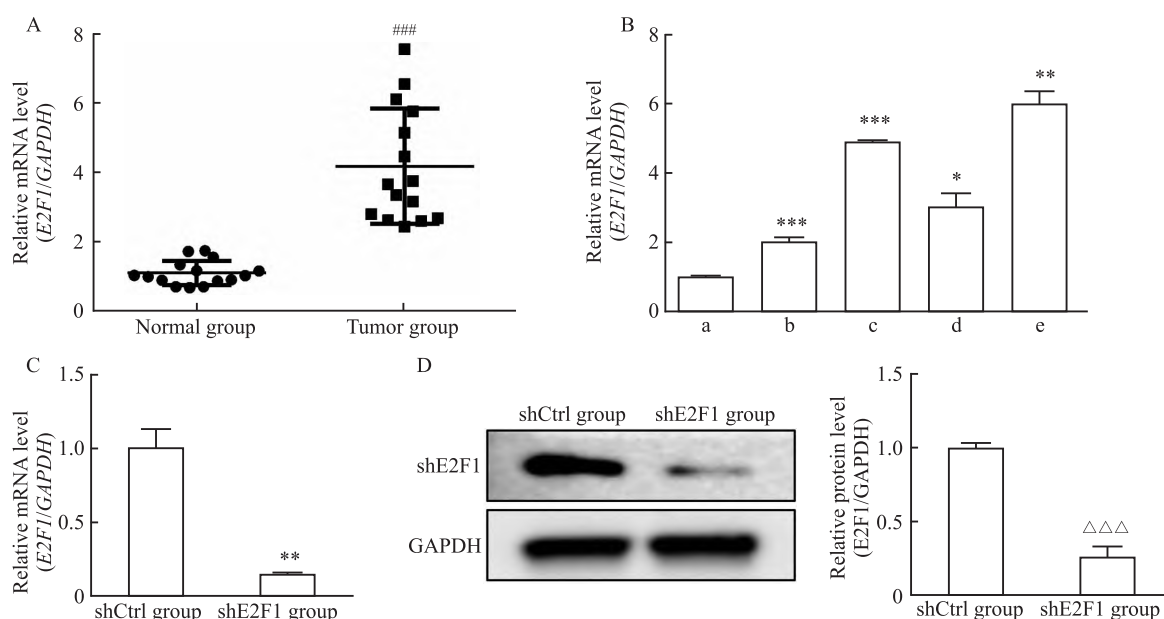


图1 *E2F1* 在舌鳞癌组织和细胞中的表达及在 SCC-25 细胞中敲低效率

Fig. 1 The expression of *E2F1* in tongue squamous cell carcinoma tissues and cells and knockdown efficiency in SCC-25 cells

A: The expression of *E2F1* in tongue squamous cell carcinoma detected by RT-PCR; B: The background expression of *E2F1* in tongue squamous cell carcinoma cells detected by RT-PCR; C: The knockdown efficiency of *E2F1* in SCC-25 cells was detected by RT-PCR; D: The knockdown efficiency of *E2F1* in SCC-25 cells was detected by Western blot; a: HOEC group; b: SCC-9 group; c: CAL-27 group; d: TSCCa group; e: SCC-25 group; ### $P < 0.01$ vs Normal group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs HOEC group; △△△ $P < 0.001$ vs shCtrl group.

(0.247 ± 0.019) 细胞 EdU 阳性细胞比例明显减少 ($\text{LSD-}t = 10.413$, $P < 0.001$)。见图 2B。细胞克隆形成实验检测结果显示,相比 shCtrl 组,shE2F1 组细胞成球能力明显被抑制 ($\text{LSD-}t = 8.290$, $P < 0.01$)。见图 2C。

2.6 敲低 *E2F1* 对细胞凋亡的影响 流式检测结果显示,相比 shCtrl 组 (4.690 ± 0.130),shE2F1 组 (10.930 ± 0.210) 细胞总凋亡数量明显升高 ($\text{LSD-}t = -44.422$, $P < 0.001$)。见图 2D。

2.7 敲低 *E2F1* 对细胞周期的影响 流式检测结果显示,相比 shCtrl 组,shE2F1 组处于细胞 G_1 期细胞比例 (51.250 ± 1.160 vs 54.830 ± 0.470) 升高 ($\text{LSD-}t = -4.965$, $P < 0.01$),处于 G_2 期细胞比例 (15.110 ± 0.670 vs 14.060 ± 0.690) 降低 ($\text{LSD-}t = 8.570$, $P < 0.01$),而处于 S 期的细胞比例无明显变化。见图 2E。

2.8 敲低 *E2F1* 对细胞迁移、侵袭能力的影响 细胞划痕实验检测结果显示,相比 shCtrl 组 (0.630 ± 0.011),shE2F1 组 (0.42 ± 0.010) 细胞迁移能力明显被抑制 ($\text{LSD-}t = 23.543$, $P < 0.001$)。见图 3A。Transwell 实验检测结果显示,相比 shCtrl 组 (1.000 ± 0.118),shE2F1 组 (0.390 ± 0.030) 细胞侵袭能力

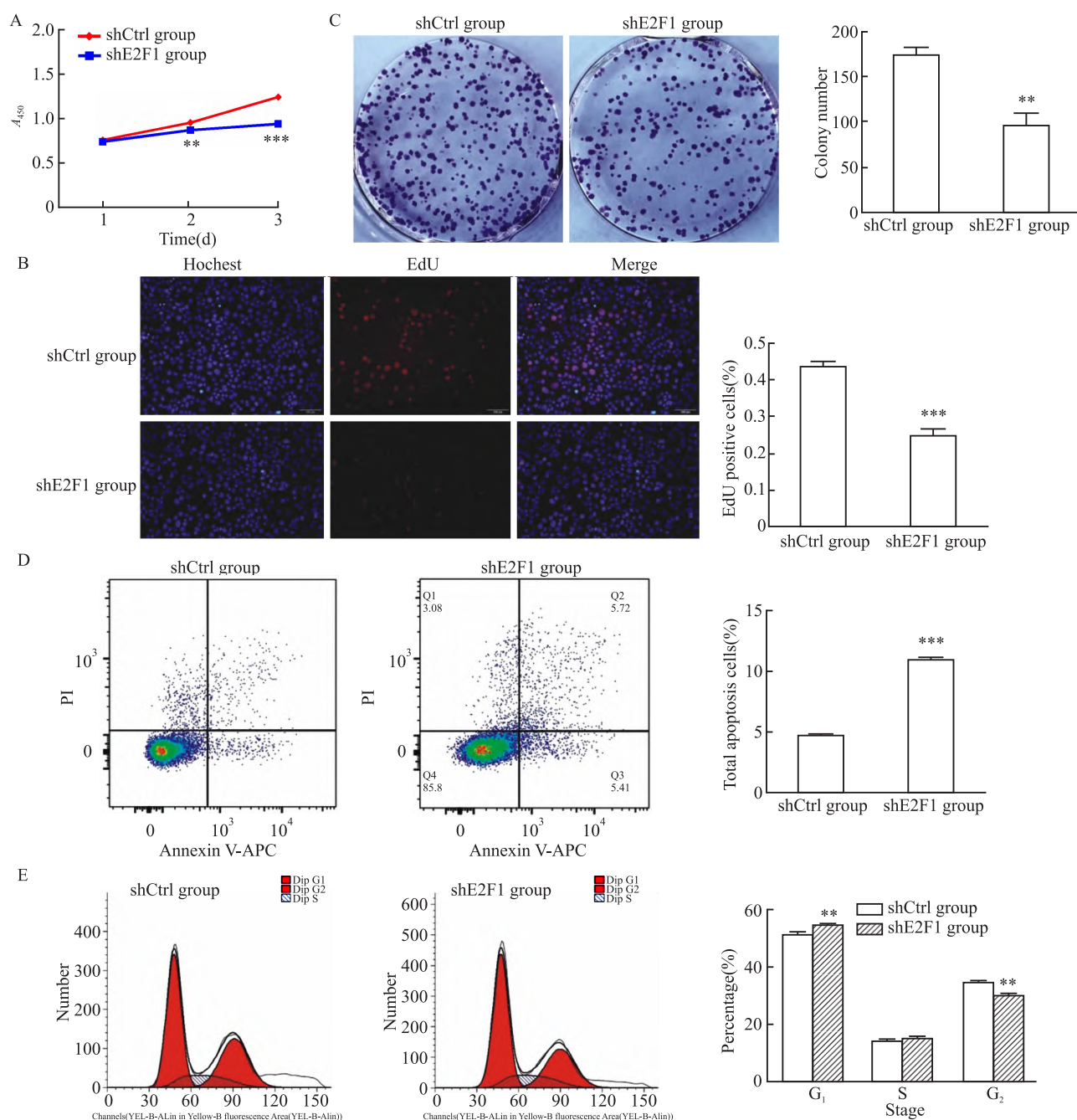
明显被抑制 ($\text{LSD-}t = 8.638$, $P < 0.001$)。见图 3B。

2.9 Western blot 检测 *E2F1* 敲低后 EMT 及 WNT 通路蛋白表达变化 Western blot 检测结果显示,相比 shCtrl 组,shE2F1 组 EMT 标志物 E-cadherin 蛋白表达升高,N-cadherin 和 Snail 蛋白表达降低 ($\text{LSD-}t = -7.286, 8.466, 45.881$, 均 $P < 0.01$);且 WNT 信号通路 WNT3A、 β -catenin 和 CCND1 蛋白表达均降低 ($\text{LSD-}t = 78.405, 39.141, 20.471$, 均 $P < 0.001$)。见图 3C。

3 讨论

口腔癌和咽喉癌在全球占第六位,TSCC 占口腔癌的 90% 以上^[11]。TSCC 起源于口腔黏膜角质形成细胞,其病因与其他癌症一样,主要因为 DNA 突变导致,常自发发生,但化学、物理和微生物诱变剂会增加患病率^[12]。目前,TSCC 的流行病学模式正在发生变化,其中,TSCC 在年轻人中的患病率有所上升,这与年轻人中较高的烟草和酒精使用有关^[13]。

TSCC 由于舌头中发育良好的血管系统和淋巴系统,发生转移的可能性更高,预后较差^[14]。目前诊断口腔恶性肿瘤的金标准是对代表性组织进行活

图2 敲低 *E2F1* 对 SCC-25 细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响Fig. 2 Effect of *E2F1* knockdown on proliferation, apoptosis and cell cycle of SCC-25 cells

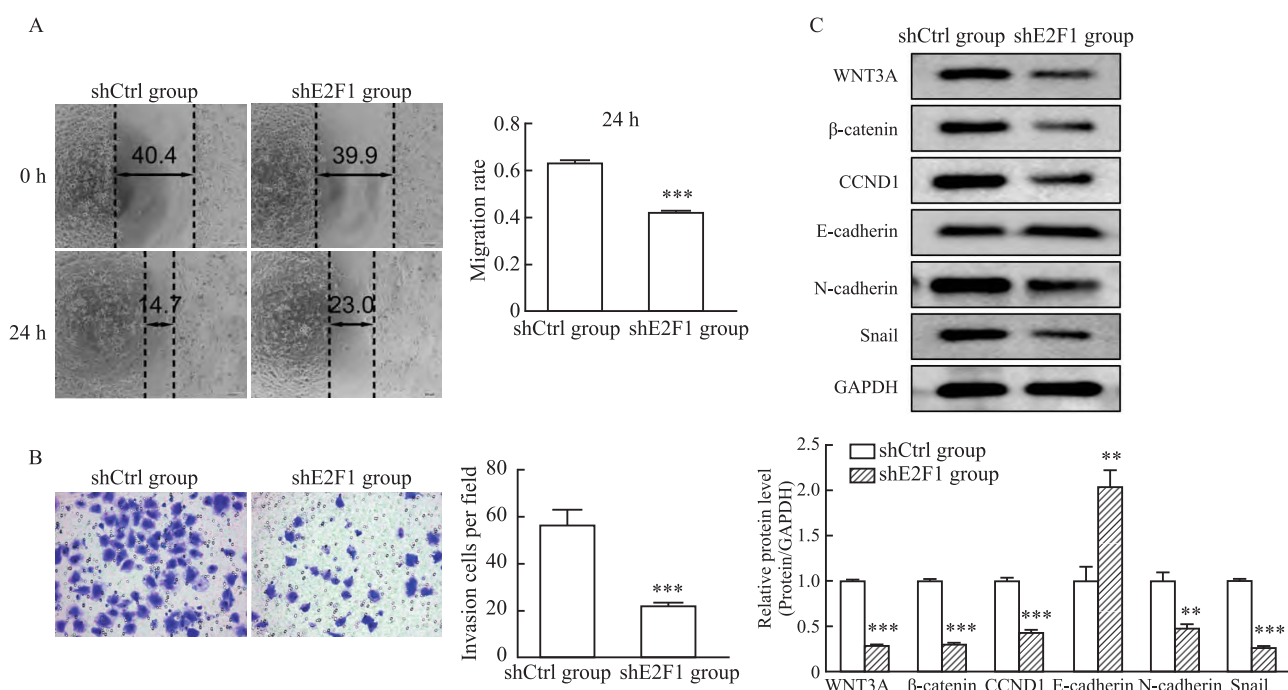
A: The results of CCK-8; B: The results of EdU; C: The results of cell clone formation assay; D: The results of cell apoptosis; E: The results of cell cycles; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs shCtrl group.

检,然后进行组织学评估^[15]。然而,这是一种痛苦和侵入性的手术,还需要专业的设备和经验丰富的专业人员。因此,寻找更多、更精确的早期诊断生物标志物将极大提高口腔癌的患者预后。

E2F1 由人类 *E2F1* 基因编码,是在 *E2F* 家族中发现的第一个成熟转录激活剂,*E2F1* 结构域使其能够作为转录激活剂驱动基因表达,控制细胞周期从

G_1 期有序过渡到 S 期,并增强细胞增殖^[16]。*E2F1* 对正常细胞稳态也有重要意义,能够独特地诱导细胞凋亡^[17]。*E2F1* 在多种肿瘤组织中观察到高表达,且与癌症类型的不良预后直接相关,并已被证明是癌症的关键生物标志物^[18]。

现阶段关于 *E2F1* 调控 TSCC 恶性进展的研究缺乏,仅有研究^[10]指出 *E2F1* 在 TSCC 临床样本中

图3 敲低 *E2F1* 对 SCC-25 细胞迁移、侵袭及 WNT 通路蛋白的影响Fig. 3 The effects of *E2F1* knockdown on migration, invasion and WNT pathway proteins in SCC-25 cells

A: The results of cell scratches; B: The results of Transwell; C: The WNT pathway proteins detected by Western blot; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs shCtrl group.

高表达,但其是否会影响肿瘤的进展并未被证实。基于现有的研究报道,本研究在 SCC-25 细胞中敲低 *E2F1* 发现,细胞的增殖能力被抑制,细胞凋亡数增多,细胞凋亡在多细胞生物的发育中起着至关重要的作用,它直接影响细胞群体的调节和维持。敲低 *E2F1* 导致的 SCC-25 细胞增殖和存活抑制说明 *E2F1* 和 TSCC 的恶性进展相关,同时在 SCC-25 中敲低 *E2F1* 后,细胞的迁移和侵袭能力明显受到抑制。综上,*E2F1* 可能是 TSCC 的促癌基因,这对于 TSCC 的病理生理学和肿瘤诊断极有意义。细胞分裂是细胞增殖和分化过程中调控因子,本研究结果显示,细胞处于 G_1 期比例明显增多,相反处于 G_2 期细胞比例明显减少,说明敲低 *E2F1* 后更多的细胞被阻滞于 DNA 分裂阶段,细胞将更晚地进入下一个细胞周期。靶向细胞增殖和凋亡已成为癌症治疗的一种有吸引力的干预策略,敲低 *E2F1* 对 TSCC 细胞的抑增殖和促凋亡效果也体现出 *E2F1* 在临床中的潜在价值。

本研究通过 Western blot 检测发现,敲低 *E2F1* 后,细胞的 E-cadherin 表达升高,相反 N-cadherin 和 Snail 表达减少,说明敲低的 *E2F1* 可以抑制细胞的 EMT 转化过程。EMT 是上皮细胞失去细胞极性和

细胞间黏附力而成为迁移性间充质干细胞的过程,EMT 在胚胎发生的不同阶段对细胞分化至关重要,但当其失调时,间充质细胞的高迁移、侵袭和对凋亡的抵抗力更高,可能导致癌症的负面结果。敲低 *E2F1* 表达抑制 TSCC 细胞的转移、侵袭和 EMT 过程对 TSCC 的治疗具有很大的临床价值,随着 CRISPR/Cas9 技术和核酸递送载体的快速发展,针对 *E2F1* 靶点开发分子靶向药物将变得极有可能。

目前已发现 WNT 信号通路参与多种肿瘤的发生和发展过程^[19]。本研究通过 Western blot 检测发现,在敲低 *E2F1* 的 SCC-25 细胞中,WNT 通路蛋白 WNT3A、 β -catenin 和通路下游基因 CCND1 蛋白表达明显降低,这也初步说明 *E2F1* 极可能通过影响 WNT 信号通路参与 TSCC 的恶性进展。本次研究初步证明 *E2F1* 作为 TSCC 细胞中 WNT 通路的一种调控因子,这种调控关系对于 TSCC 的发展至关重要。

本研究通过在 TSCC 细胞中敲低 *E2F1*,证明低表达的 *E2F1* 抑制细胞的增殖、迁移和侵袭,同时促进细胞凋亡,这种抑癌作用可能是通过阻断 WNT 信号通路的激活而实现。本次研究将为 TSCC 的诊断提供可用的分子标志物,为 TSCC 治疗药物的开

发提供参考。

参考文献

- [1] Almangush A, Hagström J, Haglund C, et al. The prognostic role of single cell invasion and nuclear diameter in early oral tongue squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2024, 24(1):213. doi:10.1186/s12885-024-11954-y.
- [2] Lin Y, Tang M, Liu Y, et al. A narrative review on machine learning in diagnosis and prognosis prediction for tongue squamous cell carcinoma[J]. Transl Cancer Res, 2022, 11(12):4409-15. doi:10.21037/tcr-22-1669.
- [3] Hararah M K, Stokes W A, Oweida A, et al. Epidemiology and treatment trends for primary tracheal squamous cell carcinoma[J]. Laryngoscope, 2020, 130(2):405-12. doi:10.1002/lary.27994.
- [4] Wang S, Cui Q, Chen X, et al. Ailanthone inhibits cell proliferation in tongue squamous cell carcinoma via PI3K/AKT pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022:3859489. doi:10.1155/2022/3859489.
- [5] Gobbi G, Grieco A, Torricelli F, et al. The long non-coding RNA TAZ-AS202 promotes lung cancer progression via regulation of the E2F1 transcription factor and activation of Ephrin signaling[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(11):752. doi:10.1038/s41419-023-06277-y.
- [6] Feng D D, Cao Q, Zhang D Q, et al. Transcription factor E2F1 positively regulates interferon regulatory factor 5 expression in non-small cell lung cancer[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12:6907-15. doi:10.2147/OTT.S215701.
- [7] Yao H, Lu F, Shao Y. The E2F family as potential biomarkers and therapeutic targets in colon cancer[J]. PeerJ, 2020, 8:e8562. doi:10.7717/peerj.8562.
- [8] Fu Y, Hu C, Du P, et al. E2F1 maintains gastric cancer stemness properties by regulating stemness-associated genes[J]. J Oncol, 2021, 2021:6611327. doi:10.1155/2021/6611327.
- [9] Li J, Wang J, Wang Y, et al. E2F1 combined with LINC01004 super-enhancer to promote hepatocellular carcinoma cell proliferation and metastasis[J]. Clin Epigenetics, 2023, 15(1):17. doi:10.1186/s13148-023-01428-6.
- [10] Luo Q, Wu X, Chang W, et al. ARID1A prevents squamous cell carcinoma initiation and chemoresistance by antagonizing pRb/E2F1/c-Myc-mediated cancer stemness[J]. Cell Death Differ, 2020, 27(6):1981-97. doi:10.1038/s41418-019-0475-6.
- [11] Chimenos-Küstner E, Marques-Soares M S, Schemel-Suárez M. Aetiopathology and prevention of oropharyngeal cancer[J]. Semergen, 2019, 45(7):497-503. doi:10.1016/j.semerg.2019.03.004.
- [12] Chegini S, Mitsimponas K, Shakib K. A review of recent advances in histopathological assessment of head and neck squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2020, 49(1):9-13. doi:10.1111/jop.12943.
- [13] Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview[J]. Oral Oncol, 2009, 45(4-5):301-8. doi:10.1016/j.oraloncology.2009.01.004.
- [14] Ba P, Xu M, Yu M, et al. Curcumin suppresses the proliferation and tumorigenicity of cal27 by modulating cancer-associated fibroblasts of TSCC[J]. Oral Dis, 2020, 26(7):1375-83. doi:10.1111/odi.13306.
- [15] Panarese I, Aquino G, Ronchi A, et al. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2019, 19(2):105-19. doi:10.1080/14737140.2019.1561288.
- [16] Emanuele M J, Enrico T P, Mouery R D, et al. Complex cartography: regulation of E2F transcription factors by cyclin F and ubiquitin[J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(8):640-52. doi:10.1016/j.tcb.2020.05.002.
- [17] Kahn R S, Sommer I E, Murray R M, et al. Schizophrenia[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1:15067. doi:10.1038/nrdp.2015.67.
- [18] Shen C, Li J, Chang S, et al. Advancement of E2F1 in common tumors[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2020, 23(10):921-6. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2020.101.32.
- [19] Zou G, Park J I. Wnt signaling in liver regeneration, disease, and cancer[J]. Clin Mol Hepatol, 2023, 29(1):33-50. doi:10.3350/cmh.2022.0058.

The mechanism of knockdown of *E2F1* inhibiting the proliferation and migration of human tongue squamous cell carcinoma cells

Du Mingzhu, Zhang Bin

(Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000)

Abstract Objective To investigate the effects of knockdown of E2F transcription factor 1 (*E2F1*) in human tongue squamous cell carcinoma cells on proliferation, migration, and invasion of tongue squamous cell carcinoma cells, and to explore its possible mechanisms. **Methods** The expression of *E2F1* in human tongue squamous cell carcinoma was detected by RT-PCR, and the background expression of *E2F1* gene in HOEC, SCC-9, CAL-27, TSCCa and SCC-25 cells was detected by RT-PCR, and the cell lines with significantly high expression of E2F1 were screened for subsequent experiments. CCK-8, EdU, colony formation, cell scratch, Transwell, apoptosis and cell cycle experiments were used to detect the effects of knockdown of *E2F1* on proliferation, migration, invasion and apoptosis of human tongue squamous cell carcinoma cells after knockdown of *E2F1* gene in tongue squamous cell carcinoma candidate cells. Western blot was used to detect the expression of epithelial mesenchymal transition markers E-cadherin, N-cadherin and snail family transcription inhibitor 1 (Snail) protein and WNT signaling path-

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