

网络出版时间: 2023-05-31 09:53:58 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1634.020.html>

c-Myc 调控 lnc-CCDC117-1 对舌鳞癌进展的影响

石清影 朱友明

摘要 目的 探讨长链非编码 RNA(lncRNAs) lnc-CCDC117-1 与致癌转录因子 c-Myc 之间的靶向调控关系及 lnc-CCDC117-1 敲低、过表达后对舌鳞癌细胞发展的影响。方法 将携带有 flag-c-Myc、plko.1-shc-Myc 及其对照的慢病毒载体分别转染 HN6、SCC9、CAL27 细胞,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 lnc-CCDC117-1 的表达情况。此外,荧光原位杂交实验检测 lnc-CCDC117-1 在细胞内的定位。在此基础上,构建 lnc-CCDC117-1 的表达载体、敲低载体并转染 HN6、SCC9、CAL27 细胞,CKK-8 法、克隆形成等实验验证舌鳞癌细胞的增殖状况。结果 通过基因芯片技术初步筛选出了受 c-Myc 正调控的 lncRNAs,在舌鳞癌细胞 HN6 中过表达或敲低 c-Myc 后,验证了这些 lncRNAs 与芯片结果一致,并表明 lnc-CCDC117-1 的表达差异最显著。qRT-PCR 实验表明 c-Myc 对 lnc-CCDC117-1 具有正性调节的作用,过表达 c-Myc 显著上调 lnc-CCDC117-1;敲低 c-Myc 明显下调 lnc-CCDC117-1 水平。双荧光素酶报告基因显示 c-Myc 可靶向调控 lnc-CCDC117-1,c-Myc 可以参与调节并且增强 lnc-CCDC117-1 的转录活性。核质分离实验以及 FISH 定位显示 lnc-CCDC117-1 主要存在于细胞核当中。qRT-PCR 结果显示 shlnc-CCDC117-1 显著降低 lnc-CCDC117-1 及 c-Myc 的表达;过表达 lnc-CCDC117-1 使 lnc-CCDC117-1 的表达明显上调。生长曲线实验、CKK-8 法、克隆形成、细胞划痕等实验显示,过表达 lnc-CCDC117-1 明显促进舌鳞癌细胞增殖与迁移能力,敲低 lnc-CCDC117-1 抑制舌鳞癌细胞的生长增殖。结论 lnc-CCDC117-1 受 c-Myc 正性调控,过表达 lnc-CCDC117-1 会促进细胞增殖,反之则抑制细胞生长。

关键词 长链非编码 RNA; c-Myc; 舌鳞癌; lnc-CCDC117-1; 细胞增殖

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)06-1001-10
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.021

目前,人类基因组中只有 2% 的 RNA 能编码蛋

白质^[1],其余 98% 为非编码 RNA^[2],其中长度 > 200 nt 的被归类为长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNAs)。lncRNAs 具有低丰度及组织特异性表达,通过直接与 DNA、RNA 和(或)蛋白质结合^[3]或在染色质、DNA、转录和转录后水平调控基因表达^[4],影响神经系统、癌症以及心血管疾病等重大疾病的发生和结局。目前,多种 lncRNAs 在肿瘤中具有促癌、抑癌作用,如 lncRNA BC200、lncRNA MALAT1、H19 等^[5]。c-Myc 是一种关键的致癌转录因子,参与调控人类基因当中约 15% 的表达^[6-7]。其中包括细胞增殖、分化、凋亡、血管生成、能量代谢、翻译和蛋白合成等一系列生理过程,并与细胞激活和转化相关^[8-9]。相关研究^[2]表明,c-Myc 在肿瘤中有高表达,如 Burkitt 淋巴瘤、CRC 等,并证实 c-Myc 在恶性肿瘤进展和维持中的关键作用,因此目前其已成为癌症治疗的理想靶点。

因此,鉴于 lncRNAs 与 c-Myc 在肿瘤进展过程中的密切联系,从致癌转录因子 c-Myc 切入,利用基因芯片技术在 c-Myc tet off 的 P493 细胞中进行筛选(在该系统中,加入 Doxycycline 后 c-Myc 会下调),结果显示一些由 c-Myc 正调控和负调控的新 lncRNAs,从中选择了一个表达差异显著且由 c-Myc 正调控的 lncRNA, lnc-CCDC117(ENST00000451486),确定为后续研究对象。lnc-CCDC117-1 定位于人类 22 号染色体上,长约 347 个核苷酸。目前,在恶性肿瘤研究的相关进展中鲜有关于 lnc-CCDC117-1 生物学功能的报道。该研究表明 c-Myc 与 lnc-CCDC117-1 两者间调控的相关性;通过构建表达载体及 shRNA 技术,过表达、敲低 lnc-CCDC117-1 探究其对舌鳞癌细胞发展的影响,并为舌鳞癌的早期诊断和治疗提供一个新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人胚肾细胞 293T、人舌鳞癌细胞系 HN6、SCC9、CAL27,人正常口腔上皮细胞 HOK、大肠杆菌 DH5 α (安徽医科大学口腔实验室保存)。慢病毒载体 plko.1-puro、质粒体系 pGag、pRev、pVs-vg(美国 Sigma-Aldrich 公司)。表达载体 plko.1-shc-

2023-03-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31970677)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:石清影,女,硕士研究生;

朱友明,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 95640021@qq.com

Myc、pLKO.1-sh-ctrl、flag-c-Myc(+ c-Myc)、pGL3 质粒、+ c-Myc 质粒以及 renilla 质粒(中国科学技术大学生命科学院实验室提供)。表达载体 + lnc-CCDC117-4、sh-lnc-CCDC117-4-1、sh-lnc-CCDC117-1-2、pGL3-lnc-CCDC117-4-wt 质粒和 pGL3-lnc-CCDC117-4-mut 质粒(上海生工生物公司);敲低慢病毒载体 pLKO.1-sh-lnc-CCDC117-4-1、pLKO.1-sh-lnc-CCDC117-4-2 以及对照组 pLKO.1-sh-ctrl(本实验室构建);胎牛血清(上海 Lonsera 公司)、DMEM 高糖培养基(以色列 BI 公司);转染试剂 lipofectamine2000(美国 invitrogen 公司,货号:11668019);q-PCR 相关试剂(美国 Axygen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用含有 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 DMEM 高糖培养液培养 HN6、SCC9、CAL27、293T 细胞,放置于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中常规培养;传代时使用 0.25% 胰蛋白酶进行消化。

1.2.2 pLKO.1-sh-lnc-CCDC117-4 表达载体的构建

从 NCBI 数据库中查询 lnc-CCDC117-4 的基因序列,根据 pLKO.1-puro 载体的敲低骨架特征,设计 pLKO.1-sh-lnc-CCDC117-4 载体构建所需的引物,选择 PAGE 纯化方式,送上海生工合成。引物序列见表 1。分别合成 sh-lnc-CCDC117-4-1、sh-lnc-CCDC117-1-2。获得扩增基因后,37 °C 水浴中消化双酶切 pLKO.1-puro 载体,回收酶切产物。1% 琼脂糖凝胶电泳,由 T4 连接酶将回收的酶切产物和基因片段连接。将上述连接产物转入感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂于 LB(含 Amp 抗性)平板上,37 °C 倒置培养过夜。第 2 天挑取菌落,筛选阳性克隆,送公司测序鉴定,成功构建 pLKO.1-sh-lnc-CCDC117-4-1、pLKO.1-sh-lnc-CCDC117-4-2。

表 1 敲低引物序列

shRNA	序列(5'-3')
pLKO.1-sh-lnc-CCDC117-4-1	F: ceggGCTTCCAAGTGAAGGCTTCGggatccCGAAGCCTTTCACCTTGGAAGCttttg R: aattcaaaaaGCTTCCAAGTGAAGGCTTCGggatccCGAAGCCTTTCACCTTGGAAGC
pLKO.1-sh-lnc-CCDC117-4-2	F: ceggGCTCTGTGCGACTAGTTCAGAGgagatccTCTTGAACTAGTCGACAGAGC R: aattcaaaaaGCTCTGTGCGACTAGTTCAGAGgagatccCTTGAAGTCTGACAGAGC

1.2.3 慢病毒包装和转染 HN6/SCC9/CAL27 细胞

取上述已构建成功且携带目的片段的表达载体(3 μ g)和病毒包装质粒:3 μ g pGag、3 μ g pRev、1.5

μ g pVsvg,共转染 293T 细胞,使用不含血清的 DMEM 培养 8 h 后更换为 10% FBS 的正常培养基。40 h 后收集病毒上清液,0.45 μ m PVDF 滤器过滤分装,-80 °C 保存备用。慢病毒转染:病毒感染前 1 天,0.25% 胰蛋白酶消化 HN6/SCC9/CAL27 细胞,铺至小皿,待细胞汇合度达 60% ~ 70% 时,将病毒原液分别感染 HN6/SCC9/CAL27 细胞。同时加入 3.5 μ l 的 polybrene(浓度为 8 mg/ml),37 °C 孵育 12 h,加入嘌呤霉素筛选 1 ~ 2 周。

1.2.4 qRT-PCR 检测 lnc-CCDC117-4 的表达水平

收集转染 48 h 后的 HN6/SCC9/CAL27 细胞各 5 组(转染 shc-Myc、+ c-Myc、sh-lnc-CCDC117-4-1、sh-lnc-CCDC117-4-2、+ lnc-CCDC117-4 及其各对照组),按 TRIzol 试剂说明书分别提取各组细胞的总 RNA。逆转录合成 cDNA 模板,-20 °C 保存待用。将含有待扩增序列的 cDNA 模板进行 PCR 反应,总体积 20 μ l 包括:上游引物 0.8 μ l,下游引物 0.8 μ l,2 $\times$ q-PCR Mix 10 μ l,ROX 0.4 μ l,cDNA 2 μ l,无菌蒸馏水 6 μ l。在 PCR 扩增仪上完成 PCR 扩增,扩增反应程序为:95 °C、2 min,95 °C、5 s,60 °C、15 s,72 °C、20 s,重复 55 个循环。反应结束后读取各组结果,以 β -actin 作为分子内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法分析比较各组 lnc-CCDC117-4 的表达。引物序列见表 2。

表 2 引物序列

基因名称	序列(5'-3')
lnc-CCDC117-4	F: AACAAATGTGCTTCAGCCAAAAGC R: GAATGCCAAGTCGAAGCCTTTCAC
β -actin	F: CTCCATCCTGGCCTCGCTGT R: GCTGTCACCTTCACCGTTCC
c-Myc	F: AGGAGCAGCAGAGAAAGGGAGAG R: AGAGAGCCGCATGAATTAACACTACCG
U6	F: GCTCGCTTCGGCAGCACATATAC R: CGAATTTCGCTGTCATCCTTGCG
GAPDH	F: AATTCCACGGCAGCAAGTCAAGGC R: AACATACTCAGCACCAGCATCACC

1.2.5 双荧光素酶报告系统检测启动子活性

共转染 pGL3-lnc-CCDC117-4-wt 与 + c-Myc 组,pGL3-lnc-CCDC117-4-mut 与 + c-Myc 组及其对照组。转染后 48 h 加入 100 μ l 细胞裂解液,冰上充分裂解 5 min。吸取细胞裂解液至新的 EP 管中,12 000 r/min 离心 2 min,收集上清液备用。取干净的 EP 管放在 Promega 荧光检测仪中检测本底荧光值,记作 L0。吸取 10 μ l Luciferase Substrate 到新的 EP 管内,小心的吸取 20 μ l 细胞裂解液上清液,吹打混匀 5 次后

立即放入荧光检测仪中检测。该值是萤火虫荧光素酶的荧光值,记作 L1。继续向管中加入 10 μ l Renilla Substrate 工作液,迅速吹打混匀 5 次放入荧光检测仪中检测。该值为海肾荧光素酶的荧光值,记作 R1。整理得到的荧光值,用 $L1 - L0 / R1 - L0$ 计算出每管样品的数值,绘制柱状图。

1.2.6 荧光原位杂交实验检测 lnc-CCDC117-1 在细胞内的定位 将准备好的细胞置于 4% 的多聚甲醛,室温下固定 15 min。根据试剂盒说明配制好所需溶液(Buffer A, Buffer C, Buffer E, Buffer F)。弃去固定液,每孔加入 200 μ l 0.1% 的 Buffer A,室温静置 15 min; PBS 润洗细胞 2 次。向孔中加入 200 μ l $2 \times$ Buffer C, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min; 继续加入 200 μ l 变性处理后的探针混合液,避光孵育至杂交过夜。次日依次向每孔加入 200 μ l 42 $^{\circ}$ C 预热的 Buffer F、Buffer C 浸洗 5 min。避光条件下 DAPI 染核 20 min。滴加 3~5 μ l 抗淬灭剂,于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.7 生长曲线实验 将转染 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2、+ lnc-CCDC117-1 及其对照组的 HN6/SCC9/CAL27 细胞按 1×10^4 个/孔密度铺至 12 孔板,每组设置 3 个复孔。37 $^{\circ}$ C 分别培养 24、48、72、96 h 后收集细胞并计数,绘制生长曲线。

1.2.8 CCK-8 法检测 HN6/SCC9/CAL27 细胞生长 收取转染了 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2、+ lnc-CCDC117-1 及其对照组的 HN6/SCC9/CAL27 细胞,按照 2×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板,设置 3 个平行复孔。待细胞贴壁,37 $^{\circ}$ C 分别培养 12、24、48、72 h; 加入 10 μ l CCK-8 溶液,继续避光孵育 4 h,在酶标仪 450 nm 处测量各孔的吸光值(OD)。

1.2.9 细胞划痕实验 取 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2、+ lnc-CCDC117-1 和对照组 HN6、SCC9 细胞铺至 6 孔板,每组设置 3 个复孔。待细胞贴壁后用 20 μ l 黄枪头划线后培养过夜。24 h 后在显微镜下观察拍照,分析对比细胞划痕变化。

1.2.10 克隆形成实验 取 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2、+ lnc-CCDC117-1 和对照组 CAL27 细胞接种于 6 孔板,400 个/孔,设置 3 个复孔。每孔加入 2 ml 培养液。培养 14 d,4% 多聚甲醛室温下固定 30 min,1% 结晶紫染色 4 h,清洗晾干并观察拍照。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件

和 Image J 软件进行统计学分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。所有柱状图及折线图均由 GraphPad Prism 8.0 软件绘制。

2 结果

2.1 lnc-CCDC117-1 的筛选与鉴定 该研究通过基因芯片技术,在 c-Myc tet off 的 P493 细胞中进行筛选(在该系统中,加入 Doxycycline 后 c-Myc 会下调)结果显示有一些 c-Myc 正调控和负调控的 lncRNAs。进一步在 HN6 细胞系中进行验证,从中选择了一个高表达且变化量约 15 倍的 lncRNA: lnc-CCDC117-1 (ENST00000451486),认为其表达差异有统计学意义,因此确定为后续研究对象。因在该系统中 c-Myc 下调,而在此结果中检测到 lnc-CCDC117-1 表达也下调,故猜测 lnc-CCDC117-1 受 c-Myc 正性调控。检测数据见表 3-5。qRT-PCR 检测 HOK、HN6、SCC9、CAL27 4 种细胞系中 lnc-CCDC117-1 的表达情况。显示与 HOK 对照组相比,HN6 组、SCC9 组、CAL27 组内 lnc-CCDC117-1 表达水平上调($t = 2.804$, $P < 0.05$; $t = 2.866$, $P < 0.05$; $t = 5.374$, $P < 0.01$),见图 1。因此,选择有高表达水平的 HN6、SCC9、CAL27 细胞系用于后续实验。

表 3 在 P493 细胞筛选中显示 3 个 lncRNA 响应 c-Myc

下调 lncRNAs	注释	差异倍数
ENST00000451486	CTA-292E10.6	15.140 708 38
ENST00000419422	RP11-32A1.4	27.249 867 94
ENST00000427080	RP11-344B5.4	17.504 689 51

表 4 在 HN6 细胞中验证 c-Myc 对 3 个 lncRNA 的影响

lncRNAs	差异倍数	
	过表达 c-Myc	敲低 c-Myc
ENST00000451486	68.127 114 71	0.223 869 75
ENST00000419422	51.180 011 13	0.181 896 86
ENST00000427080	49.081 976 24	0.266 946 08

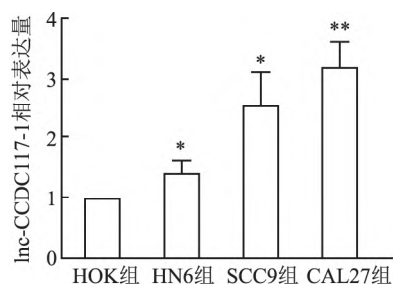


图 1 lnc-CCDC117-1 在 3 种口腔癌细胞系中的表达情况
与 HOK 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表5 lnc-CCDC117-1 基本数据

基因参数	检测结果
Probename	ASHGA5P037905
P 值	<0.001
Absolute Fold Change	15.141
Regulation	down
Type	noncoding
Seqname	ENST00000451486
GeneSymbol	CTA-292E10.6
Source	GENCODE
RNA length	347
Chrom	chr22
Strand	+
Txstart	29197879
Txend	29218203
Sequence	TAAAGCAAATTACAAAATGTGAAATTCCTCC AGAAATGCACAGCAATACCTTCTTAACAA
Relationship(Class)	intergenic

2.2 检测 c-Myc 对 lnc-CCDC117-1 启动子活性的影响 合成 pGL3-lnc-CCDC117-1-wt 和 pGL3-lnc-CCDC117-1-mut 序列,克隆到荧光素酶报告质粒 pGL3-basic 中。将构建的荧光素酶质粒载体与 ctrl、+c-Myc 共转染到 293T 细胞中,比较各组荧光信号的强弱。结果显示,pGL3-lnc-CCDC117-1-mut 和 +c-Myc 共转染细胞后,细胞的荧光信号值与对照组相比无明显变化,但共转染 pGL3-lnc-CCDC117-1-wt 和 +c-Myc 组后荧光信号值显著高于对照组($t = 6.133, P < 0.01$)。见图 2。

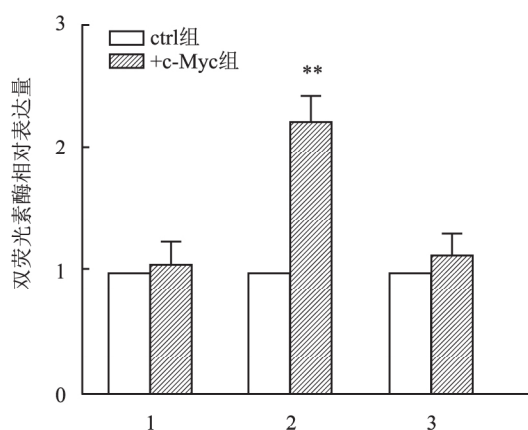


图2 双荧光素酶报告系统验证 c-Myc 和 lnc-CCDC117-1 靶向结合
1: pGL3-vector 组; 2: pGL3-lnc-CCDC117-1-wt 组; 3: pGL3-lnc-CCDC117-1-mut 组; 与 ctrl 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 lnc-CCDC117-1 在细胞中的定位情况

2.3.1 核质分离实验 取成功分离的细胞上清液和沉淀,分别通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测,结果显示 lnc-CCDC117-1 主要定位于细胞核内($t =$

22.02, $P < 0.001$)。见图 3。

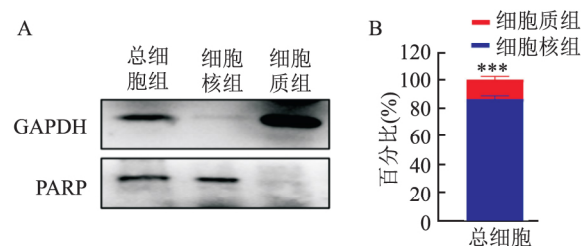


图3 核质分离 Western blot 法、qRT-PCR 法检测 lnc-CCDC117-1 的定位情况

A: Western blot 法检测 GAPDH、PARP 蛋白在细胞中的表达情况; B: qRT-PCR 检测 lnc-CCDC117-1 在细胞核、细胞质中的占比情况; 与细胞质组比较: *** $P < 0.001$

2.3.2 Fish 检测 lnc-CCDC117-1 的细胞内定位

倒置荧光显微镜下观察,lnc-CCDC117-1 呈现出绿色荧光,细胞核被 DAPI 染成蓝色。将图像合并可见 lnc-CCDC117-1 定位于细胞核内。说明 lnc-CCDC117-1 可能在细胞核中发挥作用。见图 4。

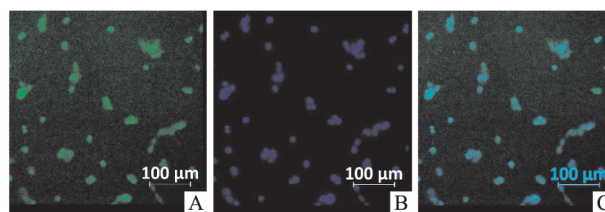


图4 lnc-CCDC117-1 在细胞内的定位 ×40

A: lnc-CCDC117-1; B: 细胞核; C: Merge 为共定位

2.4 敲低 c-Myc 对舌鳞癌细胞 HN6/SCC9/CAL27 中 lnc-CCDC117-1 表达的影响 将 shc-Myc 转染至 HN6/SCC9/CAL27 细胞,qRT-PCR 检测敲低 c-Myc 后 HN6/SCC9/CAL27 细胞内 lnc-CCDC117-1 的表达量,显示 lnc-CCDC117-1 水平均低于 sh-ctrl 组($t = 14.13, 68.24, 11.59, P < 0.001$)。见图 5。

2.5 过表达 c-Myc 对舌鳞癌细胞 HN6/SCC9/CAL27 中 lnc-CCDC117-1 表达的影响 将 +c-Myc 转染至 HN6/SCC9/CAL27 细胞,qRT-PCR 检测 c-Myc 过表达后的 HN6/SCC9/CAL27 细胞内 lnc-CCDC117-1 的表达量,显示 lnc-CCDC117-1 水平均高于转染 ctrl 组($t = 9.513, P < 0.001; t = 29.71, P < 0.001; t = 5.309, P < 0.01$)。见图 6。

2.6 shlnc-CCDC117-1 干扰 lnc-CCDC117-1 和 c-Myc 的表达情况 将 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2、+lnc-CCDC117-1 转染 HN6/SCC9/CAL27 细胞后,qRT-PCR 检测显示转染 sh-lnc-

CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组的 lnc-CCDC117-1 水平显著低于转染 sh-ctrl 组 ($t = 5.781, P < 0.01$; $t = 9.176, P < 0.001$)、($t = 5.931, P < 0.01$; $t = 13.940, P < 0.001$)、($t = 7.362, P < 0.01$; $t = 4.359, P < 0.05$)。见图 7。同样,转染 sh-lnc-CCDC117-1-

1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组的 c-Myc 水平明显低于对照组 ($t = 6.267, P < 0.01$; $t = 9.557, P < 0.001$)、($t = 18.370, P < 0.001$; $t = 27.040, P < 0.001$)、($t = 3.947, P < 0.05$; $t = 3.405, P < 0.05$)。见图 8。

2.7 +lnc-CCDC117-1 对 lnc-CCDC117-1 表达水

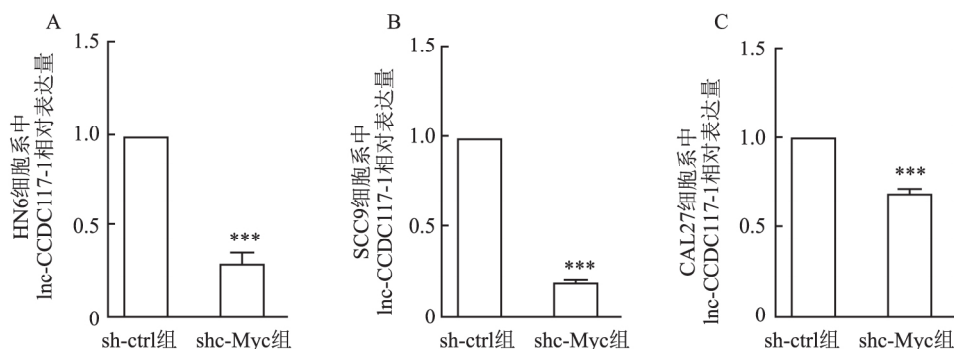


图5 shc-Myc 对 HN6/SCC9/CAL27 细胞中 lnc-CCDC117-1 表达的影响

A: 在 HN6 细胞系中转染 shc-Myc 组; B: 在 SCC9 细胞系中转染 shc-Myc 组; C: 在 CAL27 细胞系中转染 shc-Myc 组; 与 sh-ctrl 组比较:

*** $P < 0.001$

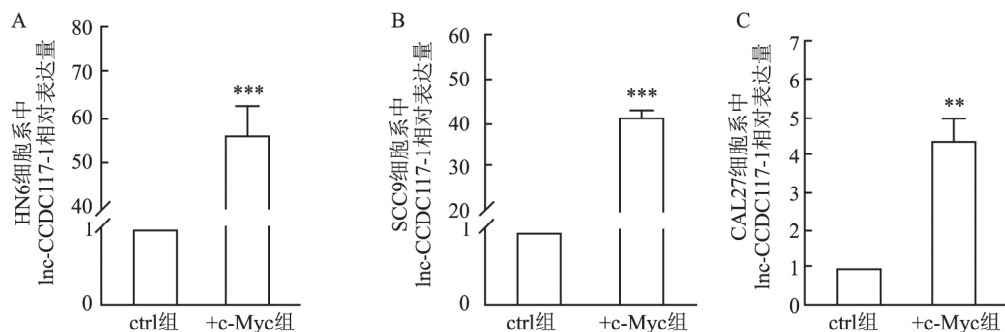


图6 +c-Myc 对 HN6/SCC9/CAL27 细胞中 lnc-CCDC117-1 表达的影响

A: 在 HN6 细胞系中转染 +c-Myc 组; B: 在 SCC9 细胞系中转染 +c-Myc 组; C: 在 CAL27 细胞系中转染 +c-Myc 组; 与 ctrl 组比较: ** $P <$

0.01, *** $P < 0.001$

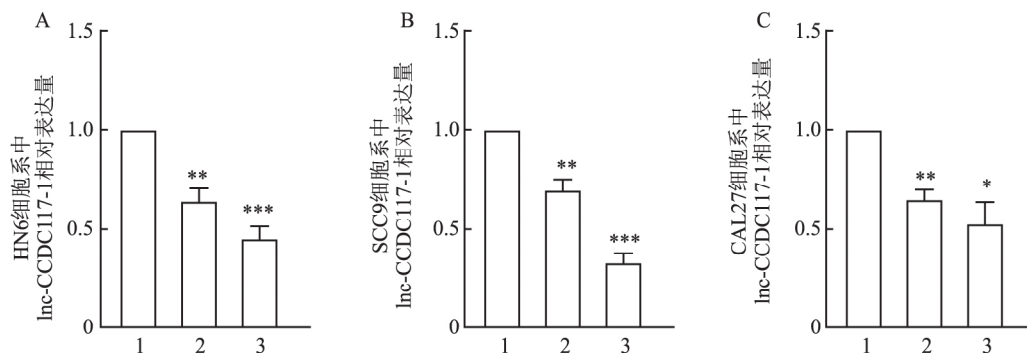


图7 shlnc-CCDC117-1 对 HN6/SCC9/CAL27 细胞中 lnc-CCDC117-1 表达的影响

A: 在 HN6 细胞系中转染 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; B: 在 SCC9 细胞系中转染 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; C: 在 CAL27 细胞系中转染 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; 1: sh-ctrl 组; 2: sh-lnc-CCDC117-1-1 组; 3: sh-lnc-CCDC117-1-2 组; 与 sh-ctrl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

平的影响 将 + lnc-CCDC117-1 转染 HN6/SCC9/CAL27 细胞, qRT-PCR 检测显示转染 + lnc-CCDC117-1 组的 lnc-CCDC117-1 水平明显高于转染 ctrl 组 ($t = 12.470$, $P < 0.001$; $t = 12.110$, $P < 0.001$; $t = 6.269$, $P < 0.01$)。见图 9。

2.8 lnc-CCDC117-1 对 HN6/SCC9/CAL27 细胞生长、增殖、侵袭能力的影响 细胞生长曲线、CCK-8 法、细胞迁移实验、克隆形成实验检测转染 + lnc-CCDC117-1、sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组后 HN6/SCC9/CAL27 细胞的生长增殖、迁移以及集落形成能力。结果表明, 与 ctrl 组相比, + lnc-CCDC117-1 组转染后 48 h 的细胞生长速率明显增加 ($t = 14.440$, $P < 0.001$; $t = 4.909$, $P < 0.05$; $t = 16.140$, $P < 0.01$) , 见图 10A、C、E; 转染 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组, 细胞生长速率明显低于 sh-ctrl 组 ($F = 48.360$, $F = 19.210$, $F = 17.020$, $P < 0.01$) , 见图 10B、D、F。CCK-8 法实验显示 + lnc-CCDC117-1 组转染后 24 h 增值率明显上

升 ($t = 4.635$, $P < 0.05$; $t = 10.65$, $P < 0.01$; $t = 11.820$, $P < 0.01$) , 见图 11A、C、E; 转染 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组, 细胞增殖明显减慢 ($F = 148.600$, $F = 11.530$, $F = 143.800$, $P < 0.01$) , 见图 11B、D、F。另外, 与转染 ctrl 组比较, + lnc-CCDC117-1 组转染后 24 h 后细胞迁移速率增加; 转染 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组, 细胞迁移速率明显低于 sh-ctrl 组, 见图 12。+ lnc-CCDC117-1 组细胞形成集落的数量比 ctrl 组增多 [161.00 ± 3.74] vs [214.67 ± 9.29] ($t = 7.581$, $P < 0.01$) ; 与 sh-ctrl 组比较, 转染 sh-lnc-CCDC117-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组的集落个数减少 [193.33 ± 6.13] vs [109.33 ± 5.56] , (193.33 ± 6.13) vs (85.00 ± 3.56) , $F = 239$, $P < 0.001$] , 见图 13。因此, 可以看出过表达 HN6/SCC9/CAL27 细胞内 lnc-CCDC117-1 显著促进细胞增殖; 反之, 敲低 HN6/SCC9/CAL27 细胞中 lnc-CCDC117-1 明显抑制细胞增殖与迁移。

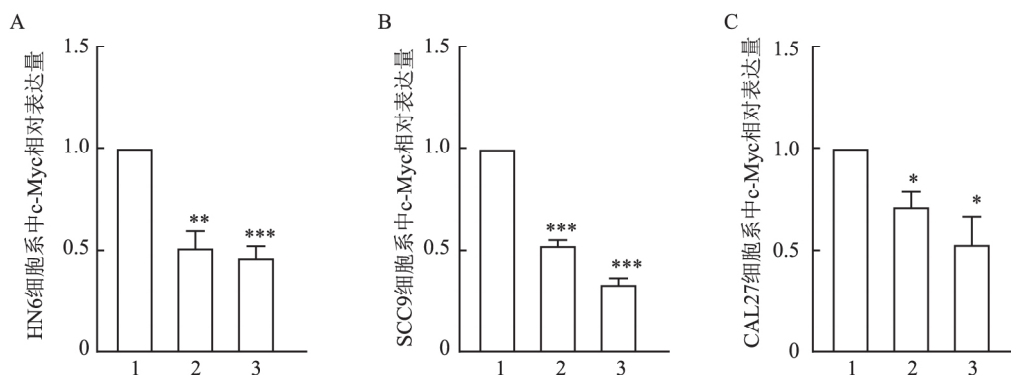


图8 shlnc-CCDC117-1 对 HN6/SCC9/CAL27 细胞中 c-Myc 表达的影响

A: 在 HN6 细胞系中转染 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; B: 在 SCC9 细胞系中转染 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; C: 在 CAL27 细胞系中转染 sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; 1: sh-ctrl 组; 2: sh-lnc-CCDC117-1-1 组; 3: sh-lnc-CCDC117-1-2 组; 与 sh-ctrl 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

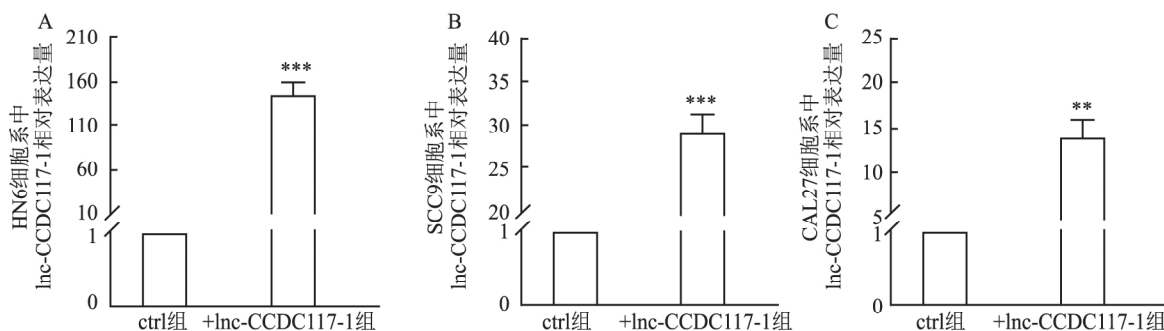


图9 +lnc-CCDC117-1 对 HN6/SCC9/CAL27 细胞中 lnc-CCDC117-1 表达的影响

A: 在 HN6 细胞系中, 转染 + lnc-CCDC117-1 组; B: 在 SCC9 细胞系中, 转染 + lnc-CCDC117-1 组; C: 在 CAL27 细胞系中, 转染 + lnc-CCDC117-1 组; 与 ctrl 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

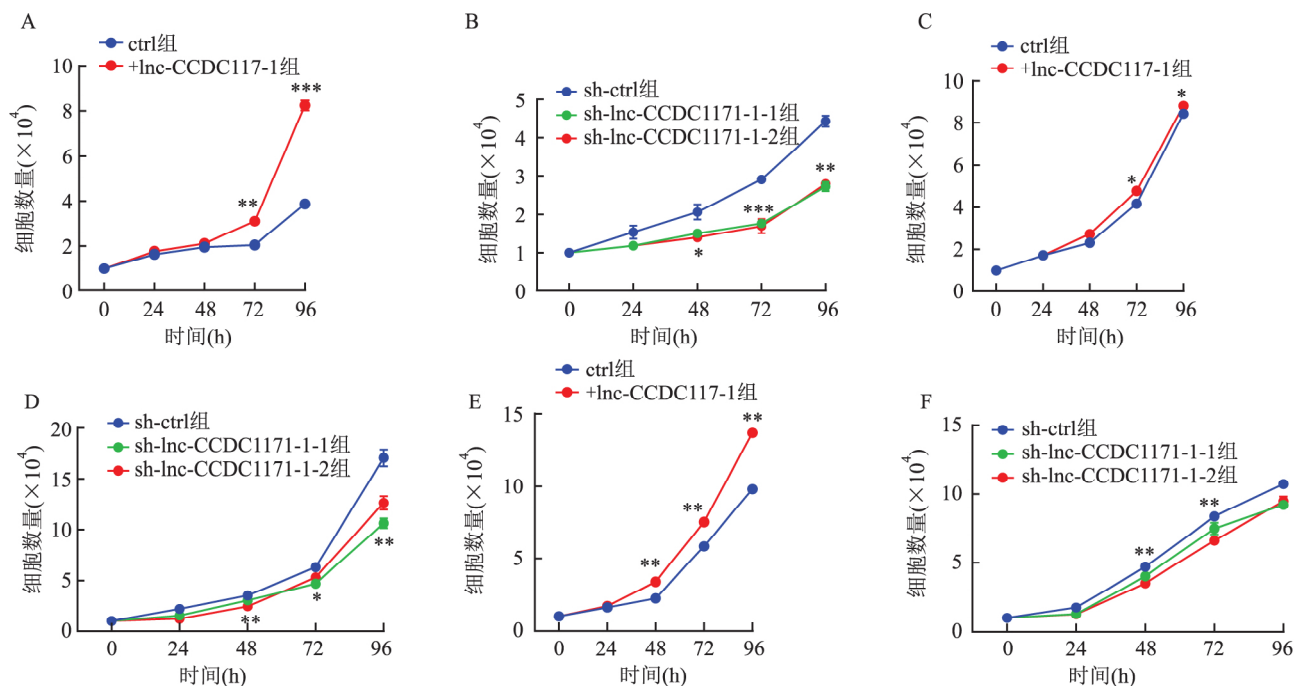


图 10 生长曲线实验结果

A、B: 在 HN6 细胞系中转染 + lnc-CCDC117-1 组、sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; C、D: 在 SCC9 细胞系中转染 + lnc-CCDC117-1 组、sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; E、F: 在 CAL27 细胞系中转染 + lnc-CCDC117-1 组、sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

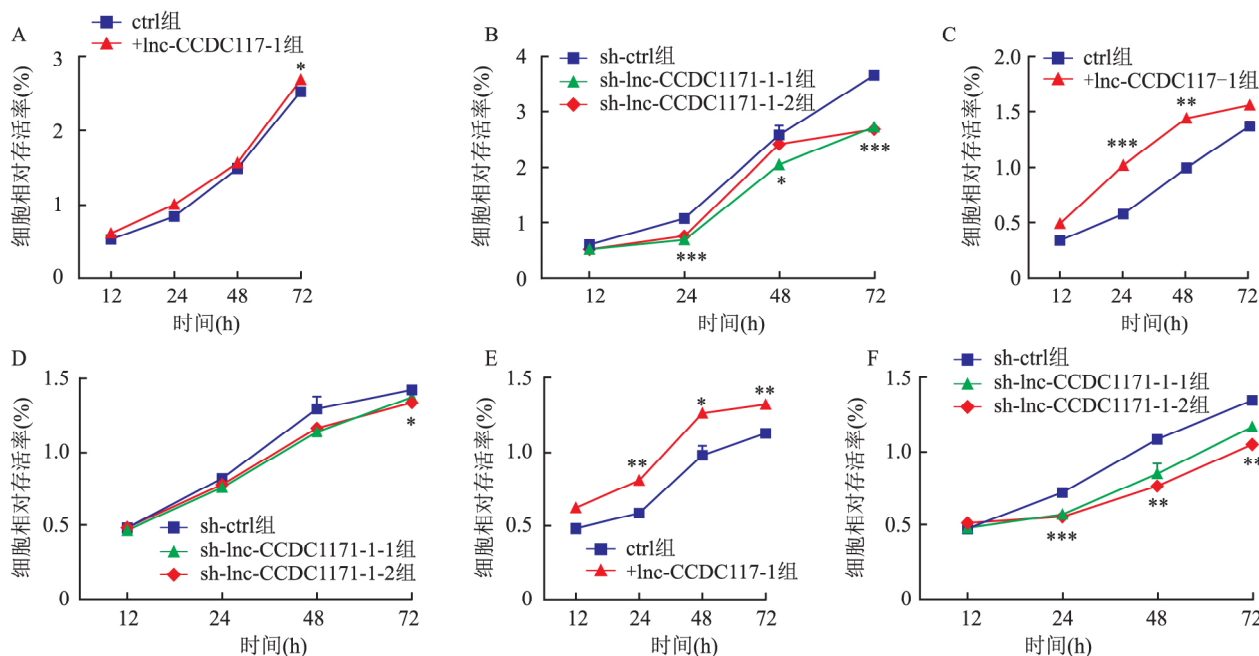


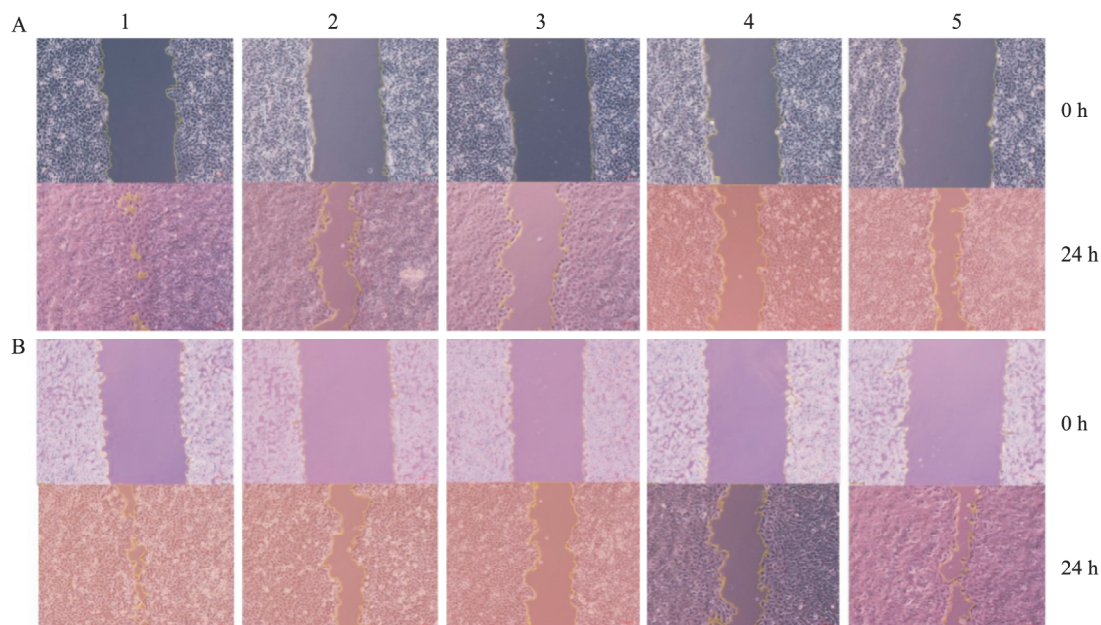
图 11 CCK-8 细胞增殖实验结果

A、B: 在 HN6 细胞系中, 转染 + lnc-CCDC117-1 组、sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; C、D: 在 SCC9 细胞系中, 转染 + lnc-CCDC117-1 组、sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; E、F: 在 CAL27 细胞系中, 转染 + lnc-CCDC117-1 组、sh-lnc-CCDC117-1-1、sh-lnc-CCDC117-1-2 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

OSCCs 是世界上第 6 大最常见的恶性肿瘤^[10],

5 年病死率约为 50%。主要危险因素有吸烟、饮酒和人乳头状瘤病毒感染^[11]。作为一种复杂的肿瘤性疾病, 口腔鳞状细胞癌好发于口腔各个部位, 其中

图 12 细胞划痕实验 $\times 20$

A、B: HN6、SCC9 细胞迁移的情况; 1: sh-ctrl 组; 2、3: sh-lnc-CCDC117-1 组、sh-lnc-CCDC117-2 组; 4: ctrl 组; 5: +lnc-CCDC117-1 组

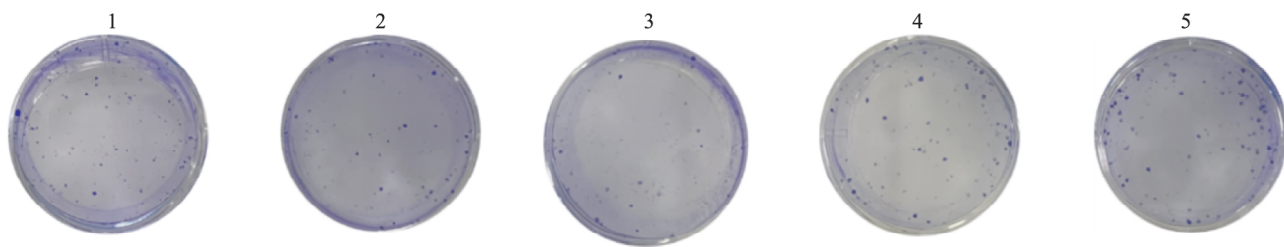


图 13 结晶紫染色观察转染 sh-lnc-CCDC117-1、+lnc-CCDC117-1 后 CAL27 细胞集落形成情况

1: sh-ctrl 组; 2、3: sh-lnc-CCDC117-1 组、sh-lnc-CCDC117-2 组; 4: ctrl 组; 5: +lnc-CCDC117-1 组

以舌鳞癌最为常见。近些年来由于其恶性程度高、转移快、病死率高而预后较差成为临床治疗的难题,因此随着肿瘤分子生物学发展,探究舌鳞癌发生的潜在通路机制联合基因治疗受到越来越多的关注^[12]。

C-Myc 被列为人类最重要的致癌基因之一。C-Myc 的失调受多种病理条件干扰,包括基因组不稳定、免疫细胞逃逸、不受控制的细胞增殖、永生化和血管生成和转移等^[13-14]。研究表明 lncRNA 在肿瘤中表达异常, c-Myc 可以调控一些 lncRNA 的表达,而 lncRNA 也能结合 c-Myc 抑制其表达,两者形成的 lncRNA-c-Myc 网络影响了肿瘤的进程,在肿瘤的转移和激活中发挥关键作用。已有研究表明一些受 c-Myc 调控的 lncRNA,例如在 OSCC 中, c-Myc 上调 lncRNA NEAT1 促进细胞的增殖进而提高 OSCC3 细胞的糖酵解代谢水平;舌鳞癌细胞 SCC3 中 lncRNA55 受 c-Myc 负调控, c-Myc 敲低可以使 lncRNA 表达明显上调。另有研究^[12]表明非小细胞肺

癌 H19 是 c-Myc 的下游靶基因, c-Myc 能上调 H19 表达, H19 进而下调 miR-107 促进肿瘤生长。Feng et al^[15] 研究表明 lncRNA MILIP 在人类癌症中上调,其表达与 MYC 表达水平呈正相关。MILIP 通过抑制 TRIML2 降低肿瘤蛋白 p53 的 SUMO 化促进细胞存活、增殖和致癌性,最终导致肿瘤蛋白 p53 转化,表明 MILIP 可能是对抗 c-Myc 轴的抗癌靶点。该研究通过基因芯片技术,筛选出因 c-Myc 下调引起表达差异的 lnc-CCDC117-1 作为研究对象,探究 c-Myc 与 lnc-CCDC117-1 的调控关系,并分析 lnc-CCDC117-1 对舌鳞癌细胞发展的影响。

为了验证舌鳞癌细胞中 lnc-CCDC117-1 与 c-Myc 表达之间的联系,建立双荧光素酶报告基因系统,结果显示, c-Myc 增强了 lnc-CCDC117-1 野生型报告基因的相对活性,说明 lnc-CCDC117-1 可能是 c-Myc 的直接靶点, c-Myc 对 lnc-CCDC117-1 的转录活性有调节作用。为了增加结果的可信度,PCR 检测显示在 HN6/SCC9/CAL27 细胞中 c-Myc 上调 lnc-

CCDC117-1 表达增加,下调后 lnc-CCDC117-1 表达量减少。结论与上述一致。该研究结果显示,在舌鳞癌细胞中 lnc-CCDC117-1 与 c-Myc 表达之间存在正相关性,推测 lnc-CCDC117-1 受 c-Myc 正调控。进一步探究 lnc-CCDC117-1 在舌鳞癌细胞中的生物学功能,体外构建表达载体 sh-lnc-CCDC117-1-1, sh-lnc-CCDC117-1-2、+ lnc-CCDC117-1,转染至 HN6/SCC9/CAL27 细胞,过表达、敲低 lnc-CCDC117-1 水平。通过 CCK-8 法、细胞划痕等实验检测细胞增殖情况,结果均显示 lnc-CCDC117-1 表达上调能促进舌鳞癌细胞的增殖,反之则抑制细胞生长,说明 lnc-CCDC117-1 可调控影响癌细胞的生长。另外,荧光原位杂交实验显示 lnc-CCDC117-1 定位在舌鳞癌细胞核内,预测 lnc-CCDC117-1 在细胞核中发挥功能。

综上所述,该研究表明舌鳞癌细胞 HN6/SCC9/CAL27 中 lnc-CCDC117-1 受 c-Myc 正调控, c-Myc 参与调节 lnc-CCDC117-1 的转录活性。过表达 lnc-CCDC117-1 水平促进 HN6/SCC9/CAL27 细胞增殖、迁移能力,反之则会抑制细胞生长;并表明 lnc-CCDC117-1 存在于细胞核当中。但该实验研究尚处于初级阶段,对于 c-Myc-lnc-CCDC117-1 通路怎样从分子水平干扰细胞生长仍是未知的。继续深入研究 lnc-CCDC117-1 在舌鳞癌细胞中的抑制机制,将为口腔恶性肿瘤的靶向治疗提供新的思路和临床指导意义。

参考文献

- [1] Bridges M C, Daulagala A C, Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function [J]. *J Cell Biol*, 2021, 220 (2): e202009045.
- [2] Qian X, Zhao J, Yeung P Y, et al. Revealing lncRNA structures and interactions by sequencing-based approaches [J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(1): 33–52.
- [3] S Zibitt M, Hartford C C R, Lal A. Interrogating lncRNA functions via CRISPR/Cas systems [J]. *RNA Biol*, 2021, 18(12): 2097–106.
- [4] Zhao Z, Sun W, Guo Z, et al. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis [J]. *Life Sci*, 2020, 254: 116900.
- [5] Chen S, Shen X. Long noncoding RNAs: functions and mechanisms in colon cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 167.
- [6] Grieb B C, Eischen C M. MTBP and MYC: a dynamic duo in proliferation, cancer, and aging [J]. *Biology (Basel)*, 2022, 11(6): 881.
- [7] Reyes-González J M, Vivas-Mejía P E. c-MYC and epithelial ovarian cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 601512.
- [8] Caforio M, Sorino C, Iacovelli S, et al. Recent advances in searching c-Myc transcriptional cofactors during tumorigenesis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 239.
- [9] Mastronikolis N, Ragos V, Kyrodimos E, et al. Mechanisms of C-myc oncogenic activity in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *J BUON*, 2019, 24(6): 2242–4.
- [10] Abati S, Bramati C, Bondi S, et al. Oral cancer and precancer: a narrative review on the relevance of early diagnosis [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(24): 9160.
- [11] Kaur J, Jacobs R, Huang Y, et al. Salivary biomarkers for oral cancer and pre-cancer screening: a review [J]. *Clin Oral Investig*, 2018, 22(2): 633–40.
- [12] 韩瞳瞳,徐艳雪,朱友明,等. c-Myc 调控的长链非编码 RNA lncRNA55 对舌鳞癌细胞生长的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(11): 1700–5.
- [13] Yoshida G J. Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 173.
- [14] Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, et al. Emerging roles of C-Myc in cancer stem cell-related signaling and resistance to cancer chemotherapy: a potential therapeutic target against colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2340.
- [15] Feng Y C, Zhao X H, Teng L, et al. The pan-cancer lncRNA MILIP links c-Myc to p53 repression. [J]. *Mol Cell Oncol*, 2020, 8(1): 1842714.

Effect of c-Myc-regulated lnc-CCDC117-1 on the progression of tongue squamous cell carcinoma

Shi Qingying Zhu Youming

(School of Stomatology, Anhui Medical University, Laboratory of Anhui Oral Disease Research Center, Hefei 230032)

Abstract Objective To clarify the targeted regulatory relationship between long non-coding RNA (lncRNAs) lnc-CCDC117-1 and oncogenic transcription factor c-Myc, and to explore the effect of lnc-CCDC117-1 knockdown and overexpression on the development of tongue squamous cell carcinoma cells. **Methods** Lentiviral vectors carrying flag-c-Myc, plko.1-shc-Myc and their controls were transfected into HN6, SCC9 and CAL27 cells respectively, and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of lnc-CCDC117-1. In addition, the intracellular localization of lnc-CCDC117-1 was detected by fluorescence in situ hybridization. On this basis,

the lnc-CCDC117-1 expression vector and knockdown vector were constructed and transfected with HN6 , SCC9 , CAL27 cells , CCK-8 method , cloning and formation to verify the proliferation of tongue squamous cell. **Results** LncRNAs positively regulated by c-Myc were initially screened by gene chip technology. After overexpression or c-Myc knockdown in tongue squamous cell HN6 , these lncRNAs were verified to be consistent with the results of the chip , and the expression difference of lnc-CCDC117-1 was found to be the most significant. qRT-PCR test showed that c-Myc had a positive regulatory effect on lnc-CCDC117-1. When c-Myc was overexpressed , the expression of lnc-CCDC117-1 could be significantly up-regulated. lnc-CCDC117-1 expression was significantly down-regulated by c-Myc knockdown. Dual luciferase reporter genes showed that c-Myc could target the regulation of lnc-CCDC117-1 , and c-Myc was involved in regulating and enhancing the transcriptional activity of lnc-CCDC117-1. lnc-CCDC117-1 mainly existed in the nucleus of the cell. qRT-PCR results showed that the expression of lnc-CCDC117-1 and c-Myc significantly decreased by sh-lnc-CCDC117-1. The expression of lnc-CCDC117-1 was significantly up-regulated by + lnc-CCDC117-1. The results of growth curve assay , CCK-8 assay , cell scratch assay and cloning formation showed that overexpression of lnc-CCDC117-1 significantly promoted the proliferation and migration of tongue squamous cell cells , while knockdown of lnc-CCDC117-1 could inhibit the growth and proliferation of tongue squamous cell carcinoma cells. **Conclusion** lnc-CCDC117-1 is positively regulated by c-Myc , and overexpression of lnc-CCDC117-1 can promote cell proliferation , on the contrary , inhibit cells growth.

Key words long non-coding RNA; c-Myc; tongue squamous cell carcinoma; lnc-CCDC117-1; cell proliferation

(上接第 1000 页)

Preliminary study on the expression and function of bone morphogenetics protein 7 in ESCC

Sun Mengfei¹ , Huang Hongfang¹ , Dong Yuhang¹ , Zhang Huakun¹ , Zhou Ziru¹ , Sun Qi² ,
Guan Wenyan² , Zhao Linyue² , Cui Xiaobin² , Chen Yunzhao³ , Li Feng¹

(¹Dept of Pathology , School of Medicine , Shihezi University Shihezi 832002; ²Dept of Pathology Nanjing Drum Tower Hospital , The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School , Nanjing 210008;

³Dept of Pathology , The People's Hospital of SND , Suzhou 215129)

Abstract Objective To analyze the expression and immune infiltration levels of the BMP7 gene(BMP7) in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) . **Methods** Initially , in 274 cases of ESCC and 242 cases of normal tissues , the level of BMP7 was verified by immunohistochemistry , and the relationship between the expression difference and the survival cycle and clinical pathological characteristics of patients with ESCC was explored , and BMP7 overexpression plasmid transfection of ESCC cells was established , and the effect of BMP7 on the biological behavior of ESCC cells was examined by CCK-8 , Clone , and Transwell. **Results** BMP7 expression in normal esophageal tissues was higher than that of ESCC($P < 0.001$) , the expression level of BMP7 was correlated with the degree of differentiation of patients($P = 0.006$) and TNM staging($P < 0.001$) , and the survival of patients with high expression of BMP7 exceeded that of patients with low BMP7($P = 0.041$) , and the experiments of CCK-8 and Clone showed that the proliferation effect of cells in the overexpressed BMP7 group was lower than that of the control group. Transwell experiments confirmed that the cell invasion migration capacity of the overexpressed BMP7 group was less than that of the control one. The immune infiltration results showed that BMP7 was positively correlated with macrophages($P = 0.008$) and negatively correlated with γ - δ T cells($P = 0.028$) . **Conclusion** BMP7 is low in ESCC and associated with poor prognosis and immune infiltration levels in patients.

Key words esophageal squamous cell carcinoma; BMP7; immunity; prognosis