

网络出版时间:2024-10-21 11:13:02 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241018.0938.010

c-Myc 调控 lncRNA KCTD13-DT 对口腔鳞癌的影响

李文丽¹,朱友明^{1,2},何家才^{1,2}⁽¹⁾ 安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,合肥 230032;⁽²⁾ 安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032)

摘要 **目的** 探讨长链非编码 RNA (lncRNAs) lncRNA KCTD13-DT 在口腔鳞癌 (OSCC) 中的作用机制及与转录因子 c-Myc 的潜在相互作用,为 OSCC 患者提供新的治疗靶点和途径。**方法** 用 qRT-PCR 检测 OSCC 及癌旁组织中 lncRNA KCTD13-DT 的表达。检测敲低和过表达人舌鳞癌细胞 HN6、CAL27 中 c-Myc 后 lncRNA KCTD13-DT 的表达。采用荧光原位杂交实验 (FISH) 检测 lncRNA KCTD13-DT 在细胞内的定位。采用双荧光素酶报告基因分析 c-Myc 与 lncRNA KCTD13-DT 启动子区域的靶向结合作用。通过慢病毒感染的方式在人 OSCC 细胞系 HN6、CAL27 中构建 lncRNA KCTD13-DT 敲低和过表达的稳转细胞系,通过 qRT-PCR 检测 lncRNA KCTD13-DT 的敲低和过表达效率;采用生长曲线实验、CCK-8 法、克隆形成实验检测细胞增殖变化,采用划痕实验和 Transwell 检测细胞迁移情况。**结果** lncRNA KCTD13-DT 在 OSCC 组织和 OSCC 细胞系 (HN6、CAL27) 中表达水平均降低,Western blot 验证在 HN6、CAL27 中敲低和过表达 c-Myc 的效果,实验表明过表达 c-Myc 显著下调 lncRNA KCTD13-DT 水平,敲低 c-Myc 明显上调 lncRNA KCTD13-DT 水平。双荧光素酶报告基因显示 c-Myc 可靶向调控 lncRNA KCTD13-DT, c-Myc 可以参与调节并且抑制 lncRNA KCTD13-DT 的转录活性。FISH 显示 lncRNA KCTD13-DT 主要存在于细胞核中。生长曲线实验、CCK-8 法、细胞划痕实验、Transwell、克隆形成等实验显示,敲低 lncRNA KCTD13-DT 促进 OSCC 细胞的生长增殖,过表达 lncRNA KCTD13-DT 明显抑制 OSCC 细胞增殖与迁移能力。**结论** lncRNA KCTD13-DT 受 c-Myc 负性调控,敲低 lncRNA KCTD13-DT 会促进细胞增殖与迁移,反之则抑制细胞增殖与迁移。

关键词 长链非编码 RNA; c-Myc; 口腔鳞癌; 细胞增殖; 细胞迁移**中图分类号** R 739.86**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1759-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.010

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA。研究^[1]表明, lncRNA 参与了基因组组织和生命过程的广泛功能,如生长和发育、细胞增殖、分化、免疫应答和某些疾病,如癌症和心血管疾病。长期以来一直

认为 c-Myc 是抗癌治疗的理想靶标。然而,由于 c-Myc 难以靶向的特征,已经开发了替代方法,通过靶向参与 c-Myc 失调的必需上游因子或 c-Myc 信号传导的下游效应物来治疗 c-Myc 激活的癌症^[2]。然而目前关于 lncRNA 与口腔癌两者之间关系的研究尚不详细,该研究以人舌鳞癌细胞系 CAL27 为研究对象,建立 CAL27 c-Myc 稳定敲低细胞系,并利用高通量测序技术进行检测,从中筛选出一个表达差异显著且由 c-Myc 负调控的 lncRNA, lncRNA KCTD13-DT (ENST00000450909),确定为后续研究对象。该研究旨在探讨 lncRNA KCTD13-DT 在口腔鳞癌

2024-06-06 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81771117);安徽省自然科学基金项目(编号:2308085Y23)

作者简介:李文丽,女,硕士研究生;

何家才,男,教授,主任医师,博士生导师,通信作者,

E-mail: hejiacai@163.com

in OSCC cells ($P < 0.05$). Transfection with siRNA-CD155 in OSCC cells resulted in significantly reduced proliferation, migration and invasion abilities compared to the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** CD155 is highly expressed in OSCC tissues and is associated with poor patient prognosis. Modulating CD155 expression can influence the biological functions of OSCC cells, leading to and inhibition of proliferation, migration, and invasion.

Key words oral squamous cell carcinoma; CD155; cellular migration; cellular proliferation; cellular invasion**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 82160572); 2023 Graduate Education Innovation Project of The Xinjiang Production and Construction Corps (No. BT2023052)**Corresponding author** Xu Jiang, E-mail: 1437759520@qq.com

(oral squamous cell carcinoma, OSCC) 中的表达及定位,并分析其是否能够通过靶向调控 c-Myc 对口腔鳞癌细胞发生发展产生影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 患者组织样本 实验中的 10 对组织样本来自安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科手术中切除的 OSCC 组织和癌旁组织,未做过放疗或化疗,已通过病理证实。手术切除的组织放到冻存管内,立即放在液氮罐中进行保存。以上组织样本是在患者知情同意的情况下进行的收集,该研究获得安徽医科大学附属口腔医院伦理委员会批准 (No. 2022001),符合伦理法规。

1.1.2 试剂与仪器 人胚肾细胞 293T、人舌鳞癌细胞 HN6、CAL27、人正常口腔上皮细胞 HOK、大肠埃希菌 DH5 α (安徽省口腔疾病研究重点实验室提供);慢病毒载体 plko. 1-puro、质粒体系 pGag、pRev、pVsvg (美国 Sigma-Aldrich 公司);表达载体 plko. 1-shc-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提供);过表达载体 PCDH-lncRNA KCTD13-DT、sh-lncRNA KCTD13-DT-1、sh-lncRNA KCTD13-DT-2、pGL3-lncRNA KCTD13-DT-wt 质粒和 pGL3-lncRNA KCTD13-DT-mut 质粒 (上海生工生物公司);胎牛血清 (上海 Lonsera 公司,货号:S771-001S)、DMEM 高糖培养基 (加拿大 Wisent 公司,货号:319-005);转染试剂 lipofectamine2000 (美国 invitrogen 公司,货号:11668019);qRT-PCR 相关试剂 (日本 TaKaRa 公司)。质粒提取试剂盒、DNA 片段回收试剂盒 (美国 Axygen 公司)。Bradford 蛋白酶浓度测定试剂盒、DEPC 水、RIPA 裂解液、DMSO 试剂 (上海碧云天科技有限公司)、4% 多聚甲醛通用型组织固定液 (合肥 Biosharp 生物技术有限公司,货号:BL539A);荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司,型号:9700);全自动化学发光分析仪 (上海天能生命科学有限公司,型号:5200)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 环境为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度,所用培养基为含有 10% FBS 及 1% 双抗的高糖培养基,每日观察细胞,保证传代时细胞密度为 70% ~ 80%。

1.2.2 plko. 1-sh-lncRNA KCTD13-DT 表达载体的

构建 从 NCBI 数据库中查询 lncRNA KCTD13-DT 的基因序列,根据 plko. 1-puro 载体的敲低骨架特征,设计 plko. 1-sh-lncRNA KCTD13-DT 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 sh-lncRNA KCTD13-DT-1、sh-lncRNA KCTD13-DT-2。获得扩增基因后,37 $^{\circ}\text{C}$ 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埃希菌 DH5 α ,涂于 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 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-lncRNA KCTD13-DT-1、plko. 1-sh-lncRNA KCTD13-DT-2。

1.2.3 慢病毒包装和构建稳定转染细胞系 取上述已构建成功且携带目的片段的表达载体 (3 μg) 和病毒包装质粒: 3 μg pGag、3 μg pRev、1.5 μg 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。转染 48 h 后收集病毒,转染 72 h 后二次收集病毒,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。病毒感染前 1 天,0.25% 铺板靶细胞 HN6、CAL27,待细胞汇合度达 60% 时,将病毒原液分别感染靶细胞。加入 3.5 μl 的 polybrene (浓度为 8 mg/ml),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h,加入嘌呤霉素筛选 1 ~ 2 周。

表 1 敲低引物序列

Tab.1 Knockdown primer sequences

shRNA	Primer sequences (5'-3')
plko. 1-sh-lncRNA KCTD13-DT-1	F: ccggCAATCTGTCTTAATGTCTActcgagTAGACA- TTAAGACAGATTGttttg R: aattcaaaaaCAATCTGTCTTAATGTCTActcgagTA- GACATTAAGACAGATTG
plko. 1-sh-lncRNA KCTD13-DT-2	F: ccggGCTGATGCTTGAAGCTAActcgagTTAGCT- TCCAACCATCAGCttttg R: aattcaaaaaGCTGATGCTTGAAGCTAA ctcgagTT- AGCTTCCAACCATCAGC

1.2.4 qRT-PCR 检测 lncRNA KCTD13-DT 及 c-Myc 在 OSCC 组织及细胞的表达水平提取各组细胞的总 RNA。逆转录合成 cDNA 模板,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。PCR 反应体系 (20 μl) 包括: 上游引物 0.8 μl , 下游引物 0.8 μl , 2 $\times$ qRT-PCR Mix 10 μl , ROX 0.4 μl , cDNA 2 μl , 无菌蒸馏水 6 μl 。PCR 扩增反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s, 重复 55 个循环。以 β -actin 作为分子内参,采用

2^{-ΔΔC_T}法分析比较各组 lncRNA KCTD13-DT 的表达。引物序列见表2。

表2 引物序列
Tab.2 Primer sequences

Gene name	Primer sequences (5'-3')
lncRNA KCTD13-DT	F: GGATTACAGGCACCCACCATCATG R: CAACCAAGGACCACCAGGAAGC
β-actin	F: CTCATCCTGGCCTCGCTGT R: GCTGTCACCTTCACCGTTCC
c-Myc	F: AGGAGCAGCAGAGAAAGGGAGAG R: AGAGAGCCGCATGAATTAACACGC
GAPDH	F: AATTCACGGCACAGTCAAGGC R: AACATACTCAGCACCAGCATCACC

1.2.5 Western blot 检测 c-Myc 蛋白的表达 RIPA 裂解 shc-Myc、c-Myc 及其各自对照组的 HN6、CAL27 细胞,提取总蛋白,测定蛋白浓度,煮蛋白,凝胶电泳分离蛋白,转膜,室温下封闭 2 h,抗体孵育,TBST 充分洗膜,显影,分析条带灰度。

1.2.6 萤火虫双荧光素酶实验 将 293T 细胞以 2×10^4 个/孔铺种于 24 孔板。24 h 后,以质粒 500 ng、Lipo2000 1 μl 配制转染液,室温孵育 15 min,滴加进 24 孔板,6 h 后换液,转染 24 h 后,加入裂解液 100 μl/孔,置于冰上裂解 5 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液。96 孔板中加入 Luciferase Assay Reagent II 工作液 100 μl。加入 20 μl 细胞裂解液,移液枪吹打混匀 2~3 次,2 s 后测数据,记录 Firefly Luciferase 值。加入 100 μl Stop&Glo Reagent,移液枪吹打混匀 2~3 次,2 s 后测数据,记录 Renilla Luciferase 值。

1.2.7 荧光原位杂交实验(FISH) 用 4% 多聚甲醛,室温固定细胞 15 min;弃多聚甲醛,每孔加入 100 μl 的 0.1% buffer A,室温处理 15 min 后,用 PBS 洗 2 次,每次 5 min;每孔加入 100 μl 的 2 × buffer C,然后将其置于培养箱中 30 min;用提前放置于 73 ℃ 水浴锅中孵育 30 min 变澄清透亮的 buffer E 来配制探针混合液,探针浓度为 2 μmol/L,再放入 73 ℃ 水浴进行变性 5 min;加入变性后的探针混合液,避光 37 ℃ 杂交过夜;DAPI 复染细胞核,正置荧光显微镜下观察并进行拍照保存。

1.2.8 CCK-8 实验 准备稳转株细胞,96 孔板每孔细胞 2×10^3 个,设置 3 个平行复孔。待细胞贴壁,37 ℃ 分别培养 24、48、72 h;加入 10 μl 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 生长曲线实验 准备稳转株细胞,通过 qRT-PCR 验证其敲低或过表达的效果;细胞接种到 6 孔板中(1×10^5 个/孔),每组设 3 复孔;以细胞贴壁伸展后开始计时,24、48、72 h 分别将消化下来的细胞用自动细胞计数仪进行计数,并记录。

1.2.10 细胞划痕实验 用 marker 笔于 6 孔板的背面平行于长边画线,两条线间隔约 1 cm。每孔至少 5 条线。取准备稳转株细胞铺至 6 孔板,每组设置 3 个复孔。待细胞贴壁后用 200 μl 枪头划线后培养过夜。24 h 后在显微镜下观察拍照。

1.2.11 Transwell 实验 将稳转株细胞消化离心重悬,以无血清培养基将细胞稀释至 4×10^5 个/ml。Transwell 小室下室加 600 μl 含 20% 血清的培养基,上室加 200 μl 细胞悬液,37 ℃ 孵育 24 h。取出小室,PBS 洗 2 次,加 4% 多聚甲醛固定 15 min。加 0.1% 结晶紫溶液,室温染色 20 min。PBS 轻柔漂洗后,用棉签轻轻擦除上室表面细胞,室温干燥,在倒置显微镜下观察结果并拍照、计数。

1.2.12 克隆形成实验 将稳转株细胞接种于 6 孔板,800 个/孔,设 3 个复孔。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、计数。

1.3 统计学处理 所有的细胞和生化试验至少重复 3 次,得到明确的结果。文中的数据图表和数据分析采用 GraphPad Prism 8 进行绘制和分析,组间比较采用方差分析或 *t* 检验。数据的统计分析一律用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高通量测序技术筛选目标 lncRNA 该研究以 CAL27 为研究对象,建立 CAL27 c-Myc 稳定敲低细胞系,利用高通量测序技术进行检测,从中筛选出一个表达差异显著且由 c-Myc 负调控的 lncRNA, lncRNA KCTD13-DT (ENST00000450909),确定为后续研究对象。检测数据见表 3。

2.2 lncRNA KCTD13-DT 在 OSCC 组织和癌旁组织中的表达情况 该研究通过 qRT-PCR 检测显示在 OSCC 组织中 lncRNA KCTD13-DT 的表达水平绝大多数都低于癌旁组织($P < 0.000 1$),在两种口腔癌细胞系中 lncRNA KCTD13-DT 的表达水平也低于 HOK 对照组($t = 129.1、131.2$,均 $P < 0.000 1$)。见图 1。

2.3 敲低 c-Myc 对 HN6、CAL27 中 c-Myc 和 lncRNA KCTD13-DT 表达的影响 将 shc-Myc 转染

表3 lncRNA KCTD13-DT 基本信息

Tab.3 Basic information of lncRNA KCTD13-DT

Genetic parameters	Test results
Type	Noncoding
P value	<0.01
Absolute Fold Change	8.56
Source	GENCODE
RNA length	1 762
Chrom	chr 16
Strand	+
Txstart	29938156
Txend	29940254
Relationship (Class)	Natural antisense

至 HN6、CAL27 细胞,qRT-PCR 检测敲低 c-Myc 后 HN6、CAL27 细胞内 c-Myc 和 lncRNA KCTD13-DT 的表达量,显示 lncRNA KCTD13-DT 水平均高于 sh-ctrl 组。结果显示,lncRNA KCTD13-DT 的表达水平随着 c-Myc 的敲低而增加。Western blot 检测显示 HN6 和 CAL27 细胞分别感染上述 shc-Myc 病毒后,c-Myc 变化明显 ($t = 4.644$, $P < 0.01$; $t = 8.365$, $P < 0.01$; $t = 5.951$, $P < 0.01$; $t = 6.957$, $P < 0.001$)。见图 2。

2.4 过表达 c-Myc 对 HN6、CAL27 中 c-Myc 和

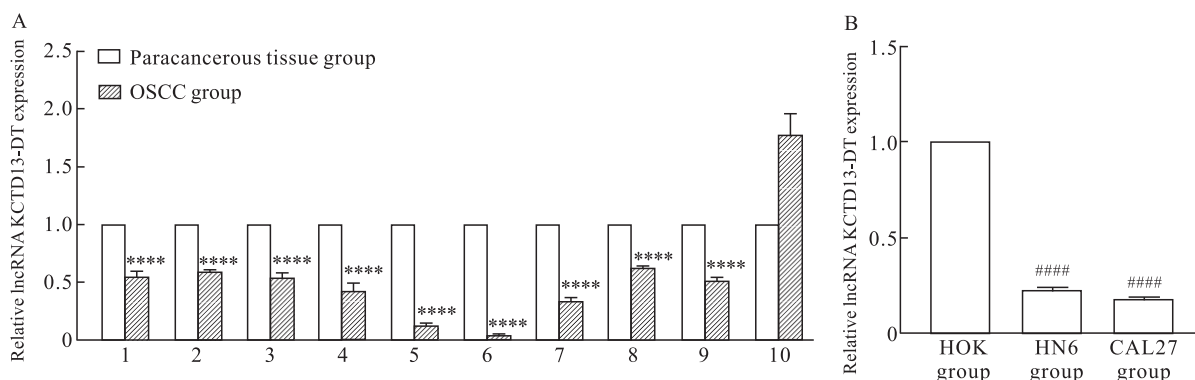


图1 OSCC 组织和口腔癌细胞系中 lncRNA KCTD13-DT 的分析

Fig.1 Analysis of lncRNA KCTD13-DT in OSCC tissues and oral cancer cell lines

A: Expression of lncRNA KCTD13-DT in OSCC tissues and paracancerous tissues; 1-10: case number; B: Expression of lncRNA KCTD13-DT in OSCC cell lines; **** $P < 0.0001$ vs Paracancerous tissues group; #### $P < 0.0001$ vs HOK group.

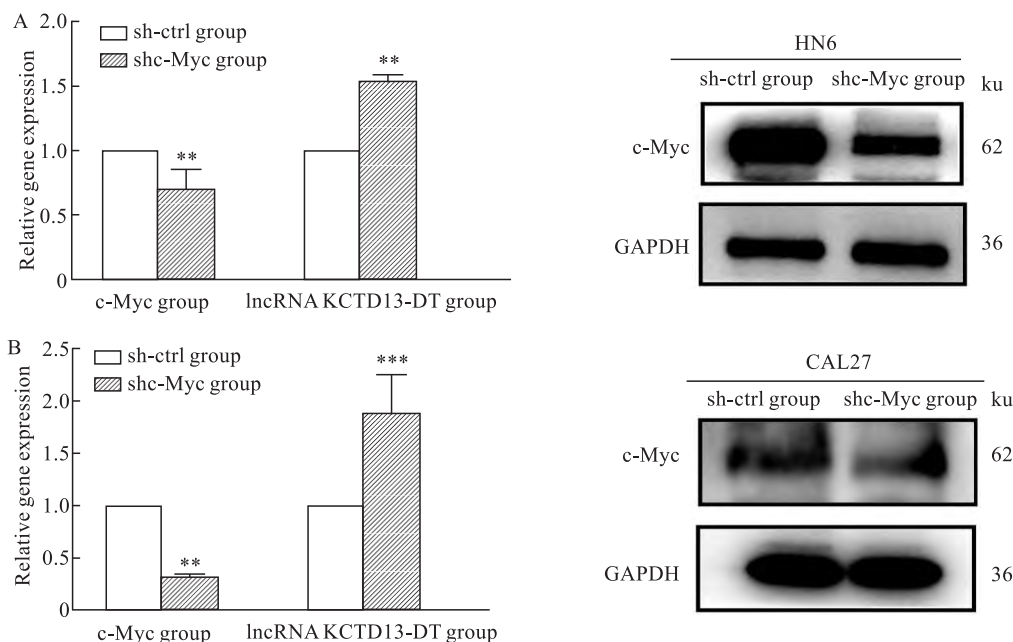


图2 shc-Myc 对 HN6、CAL27 细胞中 c-Myc 和 lncRNA KCTD13-DT 表达的影响

Fig.2 Effect of shc-Myc on the expression of c-Myc and lncRNA KCTD13-DT in HN6 and CAL27 cells

A, B: qRT-PCR to detect the expression of c-Myc and lncRNA KCTD13-DT after infection with shc-Myc virus in HN6 and CAL27 and Western blot to detect the expression of c-Myc protein after infection with shc-Myc virus in HN6 and CAL27; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs sh-ctrl group.

lncRNA KCTD13-DT 表达的影响 将 + c-Myc 转染至 HN6、CAL27 细胞,qRT-PCR 检测 c-Myc 过表达后的 HN6、CAL27 细胞内 c-Myc 和 lncRNA KCTD13-DT 的表达量,结果显示,lncRNA KCTD13-DT 的表达水平随着 c-Myc 的过表达而降低,Western blot 检测显示 HN6 和 CAL27 细胞分别感染 + c-Myc 病毒后, c-Myc 变化明显 ($t = 12.250, P < 0.001$; $t = 3.228, P < 0.05$; $t = 31.960, P < 0.0001$; $t = 17.240, P < 0.0001$)。见图 3。

2.5 FISH 检测 lncRNA KCTD13-DT 的细胞内定位 倒置荧光显微镜下观察,在 HN6 细胞系中,lncRNA KCTD13-DT 呈现出绿色荧光,细胞核被 DAPI

染成蓝色。将图像合并可见 lncRNA KCTD13-DT 定位于细胞核内。说明 lncRNA KCTD13-DT 可能在细胞核中发挥作用。见图 4。

2.6 双荧光素酶报告实验验证 c-Myc 与 lncRNA KCTD13-DT 基因启动子区域的结合 经 UCSC 和 JASPAR 网站预测进一步表明,在 lncRNA KCTD13-DT 启动子区域内发现与转录因子 c-Myc 的结合序列。见图 5A、5B。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-lncRNA KCTD13-DT-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-lncRNA

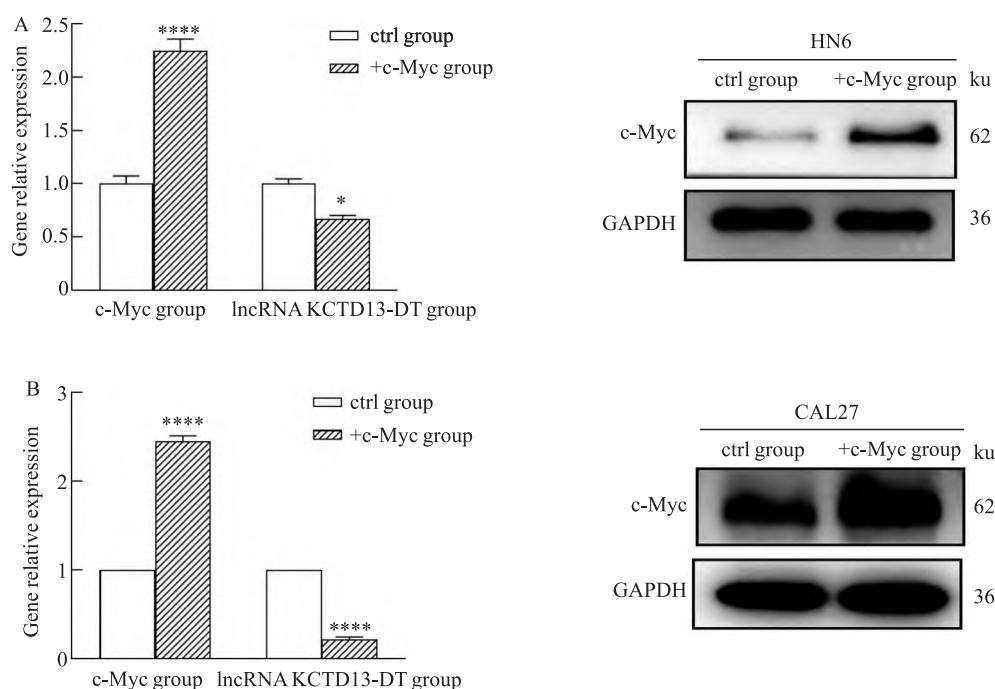


图3 +c-Myc 对 HN6、CAL27 细胞中 c-Myc 和 lncRNA KCTD13-DT 表达的影响

Fig. 3 Effect of +c-Myc on the expression of c-Myc and lncRNA KCTD13-DT in HN6 and CAL27 cells

A, B: qRT-PCR to detect the expression of c-Myc and lncRNA KCTD13-DT after HN6 and CAL27 infection + c-Myc virus and Western blot to detect the expression of c-Myc protein after HN6 and CAL27 infection + c-Myc virus; * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ vs ctrl group.

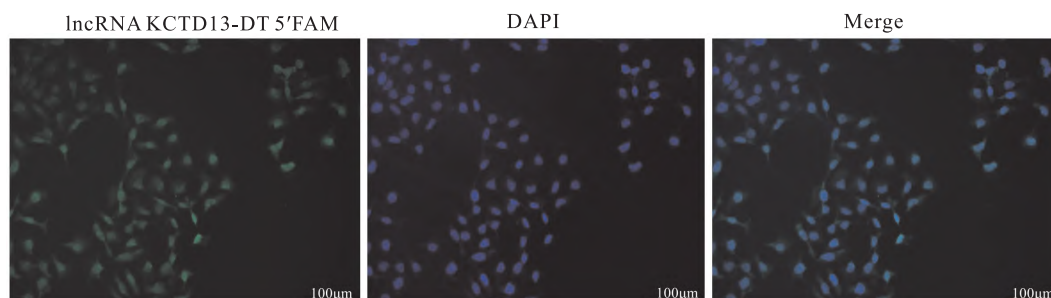


图4 lncRNA KCTD13-DT 在细胞内的定位 ×40

Fig. 4 Intracellular localization of lncRNA KCTD13-DT ×40

KCTD13-DT-wt 和 + c-Myc 组后荧光信号值显著低于对照组 ($t = 7.582$, $P < 0.01$)。见图 5C。

2.7 敲低 lncRNA KCTD13-DT 对 HN6、CAL27 细胞生长、增殖和迁移能力的影响 将 sh-lncRNA KCTD13-DT-1 (sh#1)、sh-lncRNA KCTD13-DT-2 (sh#2) 病毒感染 HN6、CAL27 细胞后, qRT-PCR 检测显示 sh#1、sh#2 组的 lncRNA KCTD13-DT 水平显著降低 (均 $P < 0.0001$)。CCK-8 法及细胞计数实验均显示, 敲低 lncRNA KCTD13-DT 组在转染后 48 h 后增殖率均明显上升 ($F_{\text{HN6}} = 115.10, 185.50$, $P < 0.001$; $F_{\text{CAL27}} = 146.60, 65.55$, $P < 0.0001$)。见图 6A、6B; 划痕实验的结果显示, 敲低 lncRNA KCTD13-DT 的 OSCC 细胞在划痕处理 24 h 后, 其相对迁移距离更大 ($P_{\text{HN6}} < 0.05$, $P_{\text{CAL27}} < 0.01$)。见图 6C。Transwell 的结果显示, 敲低 lncRNA KCTD13-DT 的细胞迁移能力增强 ($P_{\text{HN6}} < 0.001$, $P_{\text{CAL27}} < 0.0001$), 见图 6D。敲低 lncRNA KCTD13-DT 组细胞克隆形成的数量明显增多 [$(127 \pm 0.5) \text{ vs } (189 \pm 4.5)$, $(127 \pm 2.0) \text{ vs } (191 \pm 3.0)$, $P < 0.01$]; [$(90 \pm 0.5) \text{ vs } (188 \pm 4.0)$, $(90 \pm 0.5) \text{ vs } (147 \pm 0.5)$, $P < 0.01$], 见图 6E。因此, 下调 HN6 和 CAL27 的 lncRNA KCTD13-DT 可显著促进细胞的增殖和迁移。

2.8 过表达 lncRNA KCTD13-DT 对 HN6、CAL27 细胞生长、增殖和迁移能力的影响 QRT-PCR 结果显示, lncRNA KCTD13-DT 的表达水平升高 (均 $P < 0.001$)。CCK-8 法和细胞计数实验均显示, 过表达

lncRNA KCTD13-DT 组转染后 48 h 增殖率明显下降, 细胞生长速度有了明显的下降, 见图 7A、7B; 划痕实验的结果显示, 过表达 lncRNA KCTD13-DT 的口腔鳞癌细胞在划痕处理 24 h 后, 其相对迁移距离更小 ($P_{\text{HN6}} < 0.01$, $P_{\text{CAL27}} < 0.05$)。见图 7C。Transwell 实验结果表明, 过表达了 lncRNA KCTD13-DT 的细胞迁移能力降低, 见图 7D。过表达 lncRNA KCTD13-DT 组细胞克隆形成的数量减少 [$(172 \pm 5.0) \text{ vs } (99 \pm 9.0)$; $(177 \pm 12.5) \text{ vs } (103 \pm 2.0)$; $P < 0.05$]。见图 7E。因此, 上调 HN6 和 CAL27 的 lncRNA KCTD13-DT 可显著抑制细胞的增殖和迁移。

3 讨论

OSCC 约占头颈部鳞状细胞癌的 40%, 是一种起源于口腔黏膜内层的异质性肿瘤, 包括口腔、上下牙龈、口底、腭和颊黏膜^[3-4]。美国国家癌症数据库 (NCDB)^[5-6] 报道, OSCC 的 5 年总生存率 (OS) 约为 50%, 在过去 40 年中几乎没有变化。因此, 需要更好地了解 OSCC 的潜在机制, 以确定潜在的新靶点。该研究通过高通量测序技术, 筛选出长链非编码 RNA—lncRNA KCTD13-DT 作为研究对象, 探讨了 lncRNA KCTD13-DT 在口腔鳞癌发生和 c-Myc 的特异性机制, 为了进一步阐明 c-Myc 是否可以直接结合 lncRNA KCTD13-DT, 该研究用双荧光素酶报告实验验证了 c-Myc 与 lncRNA KCTD13-DT 基因启

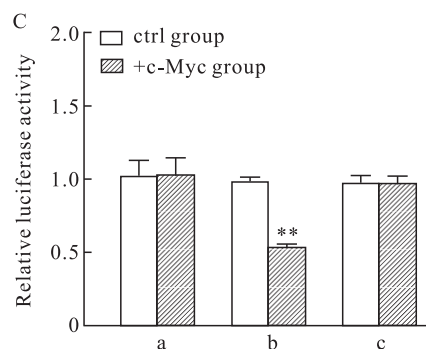
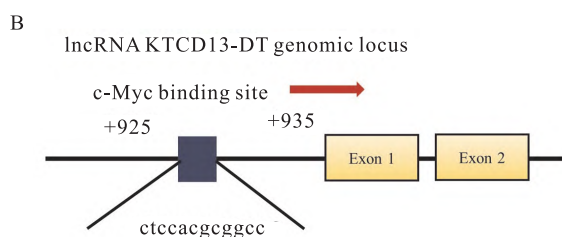
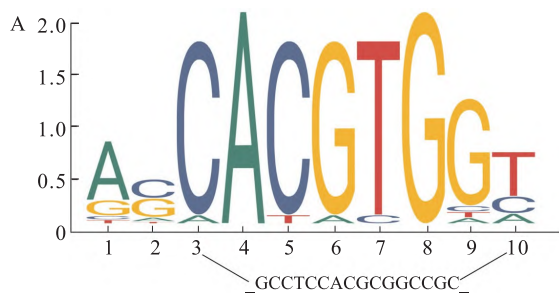


图5 c-Myc 对 lncRNA KCTD13-DT 的转录调控作用

Fig.5 Transcriptional regulation of lncRNA KCTD13-DT by c-Myc

A: Prediction of c-Myc binding sequence to the lncRNA KCTD13-DT promoter by JASPAR; B: Schematic representation of c-Myc binding site in the promoter region of lncRNA KCTD13-DT; C: Luciferase assay to verify c-Myc binding in the promoter region of lncRNA KCTD13-DT; a: pGL3- vector group; b: pGL3-lncRNA KCTD13-DT-wt group; c: pGL3-lncRNA KCTD13-DT-mut group; ** $P < 0.01$ vs ctrl group.

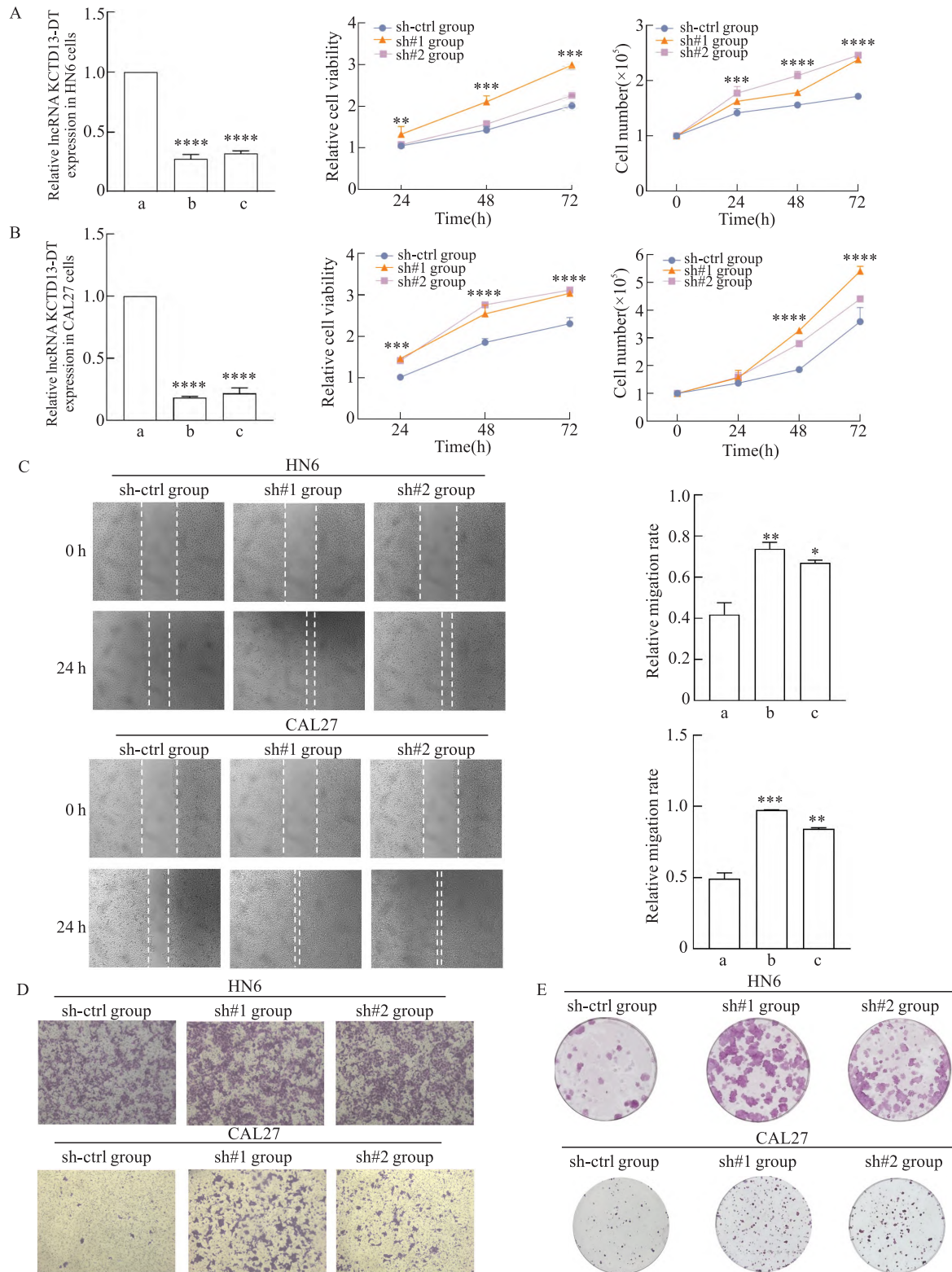


图6 敲低 lncRNA KCTD13-DT 对 OSCC 细胞系的生长、增殖和迁移的影响

Fig. 6 Effect of knockdown of lncRNA KCTD13-DT on growth, proliferation and migration of OSCC cell lines

A, B: qRT-PCR to detect the expression of lncRNA KCTD13-DT after OSCC cell line knockdown of lncRNA KCTD13-DT, cell counting and the results of cell proliferation detection by CCK-8 assay; C: Scratch healing assay after knockdown of lncRNA KCTD13-DT in OSCC cell line $\times 20$; D, E: Crystalline violet staining to observe the Transwell and colone formation of OSCC cell line after over Transwell and clone formation of OSCC cell lines after expression of lncRNA KCTD13-DT $\times 50$; a: sh-ctrl group; b: sh#1 group; c: sh#2 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs sh-ctrl group.

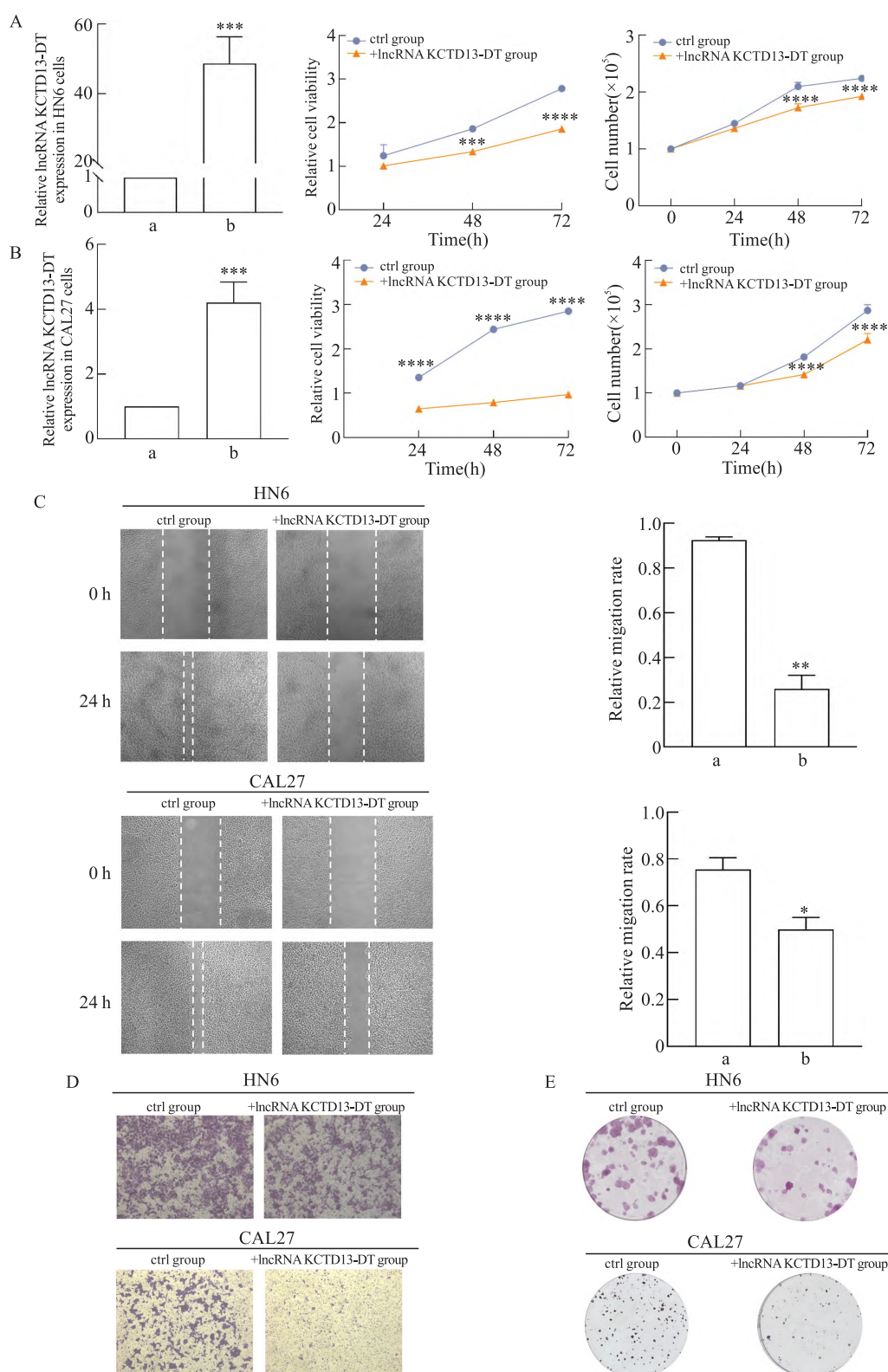


图7 过表达 lncRNA KCTD13-DT 对 OSCC 细胞系的生长、增殖和迁移的影响

Fig. 7 Effect of overexpression of lncRNA KCTD13-DT on growth, proliferation and migration of OSCC cell lines

A, B; qRT-PCR to detect the expression of lncRNA KCTD13-DT after overexpression of lncRNA KCTD13-DT in OSCC cell lines, the results of cell counting, and the results of cell proliferation detected by the CCK-8 assay; C; Scratch healing assay after the overexpression of lncRNA KCTD13-DT in OSCC cell lines $\times 20$; D, E; Crystalline violet Transwell and clone formation of OSCC cell lines after overexpression of lncRNA KCTD13-DT staining $\times 50$; a; ctrl group; b; + lncRNA KCTD13-DT group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs ctrl group.

动子区域的结合,说明 lncRNA KCTD13-DT 可能是 c-Myc 的直接靶点,c-Myc 对 lncRNA KCTD13-DT 启动子的转录活性有调节作用。另外,荧光原位杂交实验显示 lncRNA KCTD13-DT 定位在 OSCC 细胞核内,预测 lncRNA KCTD13-DT 在细胞核中发挥功能。

以往的研究^[7-8]表明,病理条件改变了 lncRNA 的正常功能,它们的异常表达可通过引起异常的细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭、耐药性和细胞周期破坏来干扰正常的生物学功能。该研究通过体外构建表达载体 sh #1、sh #2、+ lncRNA KCTD13-DT,转染至 HN6、CAL27 细胞,过表达、敲低 lncRNA KCTD13-DT 水平。通过 CCK-8 法、细胞计数实验、细胞划痕等实验检测细胞增殖情况,结果均显示 lncRNA KCTD13-DT 表达下调能促进口腔鳞癌细胞的增殖,反之则抑制细胞生长,说明 lncRNA KCTD13-DT 可调控癌细胞的生长。

C-Myc 常作为转录因子调节癌症活动,例如在非小细胞肺癌中,c-Myc 作为转录因子,激活 MET-TL3,随后导致 LINC 01006 的表达升高^[9]。c-Myc 调节的 lncRNA 也可以通过调节靶蛋白活性促进恶性转化^[10]。lncRNA 凝聚调节非编码 RNA (CONCR) 由 Myc 转录激活,并在多种癌症类型中上调。CONCR 与 DEAD/H-box 解旋酶 11 相互作用并增强其 DNA 依赖性 ATP 酶和解旋酶活性^[11]。除了 Myc 激活的 lncRNA 外,那些被 Myc 抑制的 lncRNA 也介导其致癌作用。被 Myc 转录抑制的 lncRNA IDH 1-AS1 使 MYC 能够与 HIF-1 α 合作激活肿瘤细胞中的有氧糖酵解^[12]。石清影等^[13-14]研究表明,lncRNA 可以在 c-Myc 调控作用下发挥促进 OSCC 细胞糖代谢、增殖、迁移的作用。该研究通过 qRT-PCR 检测显示在 HN6、CAL27 细胞中 c-Myc 下调后 lncRNA KCTD13-DT 表达增加,上调后 lncRNA KCTD13-DT 表达量减少。这与上述表型实验结果是一致的。该研究结果显示,在 OSCC 细胞中 lncRNA KCTD13-DT 与 c-Myc 表达之间存在负相关性,推测 lncRNA KCTD13-DT 受 c-Myc 负调控。

综上所述,该研究通过构建慢病毒稳定敲减和过表达 OSCC 细胞株,从体外实验的角度深入研究表明 lncRNA KCTD13-DT 在口腔癌组织中低表达,OSCC 中 lncRNA KCTD13-DT 受 c-Myc 负调控,敲低 lncRNA KCTD13-DT 能够促进 OSCC 的增殖和迁移能力,反之则会抑制细胞增殖和迁移,提示 lncRNA KCTD13-DT 是 OSCC 的潜在预测因子和癌症治疗靶点,这为探索 lncRNA 在 OSCC 的发生发展中的潜

在机制提供了新的思路。该课题组还将利用 RNA pulldown、RIP 等实验探索 lncRNA KCTD13-DT 的相互作用的蛋白,进一步研究 lncRNA KCTD13-DT 调控 OSCC 的潜在分子机制,同时从 OSCC 肿瘤转移和患者不良预后角度进一步研究 lncRNA KCTD13-DT 与 OSCC 临床预后因素的关联程度,为 OSCC 的检测提供更精准的靶标。

参考文献

- [1] Huang Y. The novel regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in cardiovascular diseases [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22 (12): 5768 - 75. doi:10.1111/jcmm.13866.
- [2] Llombart V, Mansour M R. Therapeutic targeting of "undruggable" Myc [J]. *EBioMedicine*, 2022, 75: 103756. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103756.
- [3] Li Q, Dong H, Yang G, et al. Mouse tumor-bearing models as preclinical study platforms for oral squamous cell carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 212. doi: 10.3389/fonc.2020.00212.
- [4] Loganathan S K, Schleicher K, Malik A, et al. Rare driver mutations in head and neck squamous cell carcinomas converge on NOTCH signaling [J]. *Science*, 2020, 367 (6483): 1264 - 9. doi:10.1126/science.aax0902.
- [5] Baillie R, Tan S T, Itinteang T. Cancer stem cells in oral cavity squamous cell carcinoma: a review [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 112. doi:10.3389/fonc.2017.00112.
- [6] Graillon N, Iocca O, Carey R M, et al. What has the national cancer database taught us about oral cavity squamous cell carcinoma? [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2022, 51 (1): 10 - 7. doi: 10.1016/j.ijom.2021.03.015.
- [7] Xie Z, Zhong C, Shen J, et al. LINC00963: a potential cancer diagnostic and therapeutic target [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 150:113019. doi:10.1016/j.biopha.2022.113019.
- [8] Zhang Q, Zhong C, Shen J, et al. Emerging role of LINC00461 in cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 152: 113239. doi:10.1016/j.biopha.2022.113239.
- [9] Liu C, Ren Q, Deng J, et al. c-Myc/METTL3/LINC01006 positive feedback loop promotes migration, invasion and proliferation of non-small cell lung cancer [J]. *Biomed J*, 2024, 47 (4): 100664. doi:10.1016/j.bj.2023.100664.
- [10] Tu R, Chen Z, Bao Q, et al. Crosstalk between oncogenic Myc and noncoding RNAs in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 75: 62 - 71. doi:10.1016/j.semcancer.2020.10.014.
- [11] Wu C, Wang Z, Tian X, et al. Long non-coding RNA DDX11-AS1 promotes esophageal carcinoma cell proliferation and migration through regulating the miR-514b-3p/RBX1 axis [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (1): 3772 - 86. doi: 10.1080/21655979.2021.1940617.
- [12] Xiang S, Gu H, Jin L, et al. lncRNA IDH1-AS1 links the functions of c-Myc and HIF1 α via IDH1 to regulate the Warburg effect [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115 (7): E1465 - 74.

- doi:10.1073/pnas.1711257115.
- [13] 石清影,朱友明. C-Myc 调控 lnc-CCDC117-1 对舌鳞癌进展的影响[J]. 安徽医科大学学报,2023,58(6):1001-10. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.021.
- [13] Shi Q Y,Zhu Y M. Effect of c-Myc-regulated lnc-CCDC117-1 on the progression of tongue squamous cell carcinoma [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*,2023,58(6):1001-10. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.021.
- [14] 许玉俊,朱友明,何家才. C-Myc 通过调控 lncRNA NEAT1 对口腔鳞癌细胞增殖作用的研究[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(12):1880-4. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.007.
- [14] Xu Y J,Zhu Y M,He J C. C-Myc regulates the effect of lncRNA NEAT1 on the proliferation of oral cancer cells[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*,2021,56(12):1880-4. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.007.

Effects of c-Myc regulation of lncRNA KCTD13-DT on oral squamous carcinoma

Li Wenli¹, Zhu Youming^{1,2}, He Jiakai^{1,2}

(¹College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the action mechanism of long non-coding RNA(lncRNAs) lncRNA KCTD13-DT in oral squamous cell carcinoma(OSCC) and its potential interaction with transcription factor c-Myc, providing a potential diagnostic and therapeutic target for patients with OSCC. **Methods** The expression of lncRNA KCTD13-DT in OSCC and paracancerous tissues was detected by qRT-PCR. The effects of c-Myc overexpression and knockdown on human tongue squamous carcinoma cells HN6 and CAL27 were detected by qRT-PCR. Fluorescence in situ hybridization (FISH) assessed the localization of lncRNA KCTD13-DT in cells. A dual luciferase reporter gene was used to analyze the role of c-Myc in target binding to the promoter region of lncRNA KCTD13-DT. Stable cell lines with knockdown or overexpression of lncRNA KCTD13-DT were constructed in human OSCC cell lines HN6 and CAL27 by lentiviral infection, and the knockdown and overexpression efficiencies of lncRNA KCTD13-DT were detected by qRT-PCR. Cell proliferation changes were detected by growth curve assay, CCK-8 assay, colony formation assay, and cell migration was detected by scratch assay and Transwell. **Results** lncRNA KCTD13-DT expression level was reduced in OSCC tissues and OSCC cells (HN6, CAL27), and Western blot verified that after knocking down and overexpression of c-Myc in HN6 and CAL27, the qRT-PCR experiments showed that c-Myc negatively regulated lncRNA KCTD13-DT, and overexpression of c-Myc significantly down-regulated lncRNA KCTD13-DT; knockdown of c-Myc significantly up-regulated lncRNA KCTD13-DT levels. Dual luciferase reporter gene showed that c-Myc could target lncRNA KCTD13-DT, and c-Myc could be involved in regulating and repressing the transcriptional activity of lncRNA KCTD13-DT. FISH showed that lncRNA KCTD13-DT mainly existed in the nucleus. Growth curve assay, CCK-8 assay, cell scratch assay, Transwell, and colony formation assay showed that knockdown of lncRNA KCTD13-DT promoted the growth and proliferation of OSCC cells, and overexpression of lncRNA KCTD13-DT significantly inhibited the proliferation and migration of OSCC cells. **Conclusion** lncRNA KCTD13-DT is negatively regulated by c-Myc. Knockdown of lncRNA KCTD13-DT promotes cell proliferation, while overexpression of it inhibits cell growth.

Key words long non-coding RNA; c-Myc; oral squamous cell carcinoma; cell proliferation; cell migration

Fund programs National Natural Science Foundation of China(No. 81771117); Natural Science Foundation of Anhui Province(No. 2308085Y23)

Corresponding author He Jiakai, E-mail: hejiakai@163.com