

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002169

LncRNA CASC9 高表达激活 PI3K/AKT 信号通路 促进口腔鳞癌细胞增殖转移

方正月, 杨 凯, 赵 丹, 唐 洪

(重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探索 lncRNA CASC9 在口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)中的表达、功能及机制。**方法:**用原位杂交检测 101 例口腔鳞癌组织中 CASC9 的表达并行临床相关性和生存分析; siRNA 干扰口腔鳞癌 SCC15 细胞中 CASC9; qPCR 和 Western blot 检测 SCC15 中 PI3K、AKT 和 p-AKT 的 mRNA 和蛋白表达水平; CCK-8 实验、流式细胞和 Transwell 分别检测细胞的增殖、迁移和侵袭。**结果:**CASC9 在口腔鳞癌组织中的表达明显升高($P=0.000$); CASC9 表达水平与肿瘤大小、颈淋巴结转移及临床分期呈显著正相关($P<0.05$), CASC9 高表达的患者生存时间明显缩短($P=0.007$); CASC9 是 OSCC 的独立危险因素($P<0.05$); 沉默 CASC9 后, PI3K 和 p-AKT 表达明显降低($P<0.05$), SCC15 细胞增殖、迁移和侵袭能力明显减弱($P<0.05$)。**结论:**CASC9 通过激活 PI3K/AKT 通路促进 OSCC 发展; CASC9 可能是 OSCC 新的临床预后标志物和治疗靶点。

【关键词】长链非编码 RNA; 口腔鳞癌; CASC9; 预后; 增殖; 转移

【中图分类号】R739.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-01-25

Overexpression of lncRNA CASC9 in oral squamous cell carcinoma promotes cancer cell proliferation and migration via activating the PI3K/AKT signaling pathway

Fang Zhengyue, Yang Kai, Zhao Dan, Tang Hong

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the expression and function of long non-coding RNA (lncRNA) CASC9 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), and to elucidate its potential mechanisms. **Methods:** The expression of CASC9 in OSCC tissues from 101 patients was determined by in situ hybridization assay, and the correlation between the expression of CASC9 and clinicopathological characteristics and survival were analyzed. CASC9 siRNA was transfected into the target OSCC cell line SCC15. The mRNA and protein expression levels of PI3K, AKT, and p-AKT in SCC15 cells were measured using qPCR and Western blot, and the proliferation, migration, and invasion of SCC15 cells were evaluated by CCK8 assay, flow cytometry, and Transwell assay, respectively. **Results:** The expression of CASC9 was significantly increased in OSCC tissues ($P=0.000$), and it was significantly positively correlated with tumor size, cervical lymph node metastasis, and clinical stage ($P<0.05$). The overall survival was significantly shortened in OSCC patients with high expression of CASC9 ($P=0.007$). CASC9 was an independent risk factor for OSCC ($P<0.05$). After silencing of CASC9, the expression of PI3K and p-AKT was significantly reduced ($P<0.05$), and the proliferation, migration, and invasion of SCC15 cells were significantly attenuated ($P<0.05$). **Conclusion:** CASC9 promotes OSCC progression by activating the PI3K/AKT pathway. CASC9 could potentially be a novel clinical prognostic marker and therapeutic target for OSCC.

【Key words】long non-coding RNA; oral squamous cell carcinoma; CASC9; prognosis; proliferation; metastasis

作者介绍: 方正月, Email: 546444133@qq.com,

研究方向: 口腔颌面部肿瘤防治。

通信作者: 杨 凯, Email: cqfyk@aliyun.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190520.1531.002.html>

(2019-05-21)

口腔癌中约 90%为口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)^[1], 口腔鳞癌具有预后差、易转移和局部复发等特性。目前治疗口腔鳞癌的主要方式是手术切除, 辅助放疗和化疗, 尽管手术和放化疗技术已取得很大进展, 但在过去的 30 年中, 口腔鳞癌患者的 5 年生存率一直维持在 50%左右并没有显著改善^[2]。因此, 深入研究口腔鳞癌发生发展的分子机制是发展新的有效治疗方法的关键。

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是指转录本长度超过 200 nt 且不编码蛋白的 RNA。近年来研究证明, lncRNA 能在表观遗传、转录和转录后多个水平调控基因表达, 影响细胞的多种生物和病理过程^[3]。lncRNA 的异常表达与癌症的发生发展密切相关^[4-6]。最近研究发现, lncRNA CASC9 (long non-coding RNA cancer susceptibility candidate 9)在食管鳞癌、鼻咽癌和肝癌中的表达明显升高, 发挥着重要的促癌作用^[7-9]。但目前 CASC9 在口腔鳞癌发生发展中的作用和分子机制还不清楚。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 组织标本 101 例口腔鳞癌患者的石蜡包埋组织切片均为 2007 年 1 月至 2012 年 12 月重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科住院患者, 均经病理确诊, 其中, 颊癌 35 例、舌癌 33 例、牙龈癌 26 例、口底癌 5 例、腭癌 2 例, 患者的具体临床病理资料见表 1。从 101 例石蜡切片中选取 41 例带有癌旁组织的标本作为对照组。其中, T1 和 T2 且无颈淋巴结转移患者单行手术治疗, 其余患者手术后加放疗或放化疗。以上所有患者手术前均未行过放疗、化疗等任何治疗。

1.1.2 实验试剂 RNA 提取及逆转录试剂盒购于大连 Takara 公司; CASC9 原位杂交试剂盒购于武汉博士德工程有限公司; si-RNAs 由上海吉玛制药技术有限公司设计合成; Lipofectamine 3000、Cell Counting Kit8 购于重庆茂百有限公司。口腔鳞癌细胞 SCC15 由口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室黄恩毅教授赠送。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将细胞株以单层接种在含 10%新生牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、 1×10^5 U/L 链霉素的 DMEM 培养液中, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。待细胞长到 90% 时进行传代培养, 将对数生长期细胞用 0.25%胰蛋白酶消化, 加含 10%新生牛血清的 DMEM 培养液终止消化。取对数生长期细胞进行实验。

表 1 患者临床病理资料

基本信息	例数 (n, %)
年龄 (岁)	
≥60	54 (53.5)
<60	47 (46.5)
性别	
男	52 (51.5)
女	49 (48.5)
临床分期	
I	22 (21.8)
II	31 (30.7)
III	28 (27.7)
IV	20 (19.8)
T 分期	
T1	25 (24.8)
T2	25 (24.8)
T3	28 (27.7)
T4	23 (22.7)
淋巴结转移	
有	56 (55.4)
无	45 (44.6)
分化程度	
高分化	40 (39.6)
中分化	33 (32.7)
低分化	28 (27.7)

1.2.2 原位杂交 根据 CASC9 原位杂交试剂盒说明书操作, CASC9 原位杂交探针序列见表 2。4 μm 厚的口腔鳞状细胞癌组织及癌旁组织石蜡切片脱蜡水化后, 胃蛋白酶消化; 滴加 CASC9 探针杂交液, 阴性对照为不含 CASC9 探针的预杂交液, 42 °C 孵育过夜; 滴加生物素标记的鼠抗地高辛, 37 °C 孵育 60 min; DAB 染色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。置于光学显微镜 (BX51TRF, OLYMPUS, Japan) 下观察。组织切片中胞质出现淡黄色至棕褐色者为阳性细胞标志, 结果以染色强度结合阳性细胞数百分比综合计分。染色强度计分: 无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。阳性细胞百分比: 0~5% 为 0 分, 6%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积: 0 分为阴性, 1~4 分为弱阳性, 5~8 分为中度阳性, 9~12 分为强阳性。以中度阳性和强阳性结果为 CASC9 高表达, 阴性和弱阳性结果为 CASC9 低表达。

表 2 CASC9 探针序列

CASC9 探针	序列 (5'→3')
1	GAATTGCTTTTCTGGAACATAGCCTGTGATAGCAGAACA
2	TCATGGGACTCATATTACCACTCTTCACATTTTCCTTTAAA
3	CTGTGCCAAGCGACATCATTTTCAACCTGCTGAAGATCTT

1.2.3 小干扰 RNA (siRNA) 转染 根据 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中 CASC9 转录本序列设计 3 条针对 CASC9 不同靶点的 siRNAs (si-1, si-2, si-3), 以 scrambled oligonu-

cleotides为阴性对照(si-NC),序列见表3。当细胞密度达到50%~70%时用Lipofectamine 3000(Invitrogen,USA)进行转染,转染后48 h提取RNA做定量即时聚合酶链锁反应(qRT-PCR)测量CASC9的干扰效率。

表3 CASC9小干扰RNA序列

si-RNAs	序列(5'→3')
si-1	正义链:GCCUGUGAUAGCAGAACAAATT 反义链:UUGUUCUGCUAUCACAGGCTT
si-2	正义链:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 反义链:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
si-3	正义链:GGAAGAAUUUCCAGAGUUUTT 反义链:AAACUCUGGAAAUCUUCCTT
si-NC	正义链:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 反义链:ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2.4 CCK-8实验 根据Cell Counting Kit8(CCK8,Dojido,Japan)说明书操作,在96孔板中每孔加入1 000个/100 μL的细胞悬液,每组设置3个复孔,培养箱过夜(在37℃,5%CO₂的条件下)。阴性对照组和实验组分别转染小干扰RNA后,分别在24、48、72 h每孔加入10 μL CCK-8溶液,培养箱中孵育2 h,酶标仪测定在450 nm处的吸光度值。

1.2.5 流式细胞检测 取对数生长期的各组细胞分别用0.25%胰酶消化,离心(1 000 r/min,5 min)弃上清,PBS洗涤细胞2次,加入80%冰乙醇,4℃过夜固定。固定后离心弃上清,4℃PBS洗涤细胞2次,PBS调整细胞浓度为1×10⁶个/mL,分别取1 mL细胞悬液加入465 μL碘化丙锭(1 mg/mL)染色缓冲液和5 μL RNaseA(10 mg/mL),37℃避光孵育30 min,再加入25 μL碘化丙锭,4℃染色10 min后,用流式细胞仪(FACSVantage SE,BD,USA)检测细胞周期分布和细胞增殖指数,细胞增殖指数(proliferation index,PI)=(S+G2/M)/(G0/G1+S+G2/M)×100%。

1.2.6 Transwell迁移侵袭实验 细胞转染24 h后,消化,离心,用不含血清的DMEM培养基悬浮细胞,调节细胞浓度为1×10⁵个/mL。各组细胞分别加入100 μL接种在Transwell(8 μm pore size,Corning Life Sciences,NY,USA)小室上室,侵袭实验在上室底部铺100 μL基质胶(1:8稀释,BD Biosciences,San Jose,CA,USA),下室加入700 μL含20% FBS的细胞培养液,培养24 h(迁移)或48 h(侵袭)后取出小室,PBS洗2遍并用小棉棒擦掉上室未迁移细胞,100%甲醇固定30 min,结晶紫(凯基,苏州,中国)染色10 min,PBS清洗2次适当晾干,在正置荧光显微镜(BX51TRF,OLYMPUS,Japan)下观察聚碳酸多孔滤膜的下室面细胞并拍照。随机选择5个视野用Image J(Windows,64-bit Java 1.8.0_112)计算平均细胞数,即迁移和侵袭的细胞数。

1.2.7 qRT-PCR 所有组织和细胞的RNA根据RNAiso Plus(Takara,Japan)说明书提取,Nanodrop ND 2000(Thermo

Scientific)测定提取的RNA在波长260 nm及280 nm处的光密度值,计算RNA浓度和纯度。按照Takara逆转录反应说明书合成cDNA。实时荧光定量PCR,用Oligo7.0软件设计、合成目的基因CASC9、PI3K、AKT和内参基因GAPDH的引物,引物序列见表4。反应条件均为:95℃预变性1.5 min,95℃变性10 s,60℃退火延伸30 s,扩增40个循环。60℃延伸时采集荧光信号使用,采用2^{-ΔΔCt}计算各基因mRNA的表达。

表4 引物序列

si-RNAs	序列(5'→3')
CASC9	正义链:TTGCTCAGCCACATTCATGCT 反义链:AGTGCCAATGACTCTCCAGC
PI3K	正义链:GGTTTTGCTGTTCGGTGCTT 反义链:GGCCAAACCTCTGCTAACT
AKT	正义链:GCTGAGATTGTGTGACGCCCT 反义链:CGACCGCACATCATCTCGTA
GAPDH	正义链:TCAAGAAGGTGCTGAAGCAGG 反义链:AGCGTCAAAGGTGGAGGAGTG

1.2.8 Western blot检测 收集各组细胞,RIPA裂解液(P0013B,碧云天,上海,中国)裂解、离心;BCA蛋白定量试剂盒(P0010,碧云天)测定的蛋白浓度;从每个样品中吸取30 μg的总蛋白加入到8%~15%的SDS-PAGE凝胶中进行电泳分离;通过湿转法将凝胶中的蛋白转移到0.45 μm孔径的PVDF膜上;PVDF膜浸泡于5%的脱脂牛奶或BSA中封闭1 h;以PI3K-p110α(4249T,CST),AKT(4691T,CST),p-AKT(ser473,4058T,CST),P21(2947,CST),MMP-2(ab86607,Abcam) and GAPDH(10494-1-AP,Proteintect)—抗抗体4℃孵育过夜;辣根过氧化物酶标记的二抗抗体37℃条件下孵育40 min;使用Western blot荧光试剂(34577,thermo Fisher scientific)进行显像,ImagJ-5.0软件(windows,64-bit Java 1.8.0_112)对条带进行灰度值分析。

1.3 统计学处理

用GraphPad Prism 7.0(Graphpad Software,La Jolla,CA)和SPSS 21.0(IBM Corporation,Chicago,USA)进行数据处理和统计学分析。数据结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组均数间的比较用单因素方差分析;CCK-8采用双因素方差分析,组间两两比较采用t检验;CASC9表达与临床参数相关性分析用卡方检验;Kaplan-Meier生存分析和log-rank检验分析CASC9表达与患者生存之间关系;Cox比例风险回归模型进行单因素和多因素分析。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 CASC9在口腔鳞癌组织中表达明显升高

原位杂交检测显示,CASC9在口腔鳞癌组织和癌旁组织中高表达率(中度阳性和强阳性)分别为57.43%(58/101),

14.63%(6/41);卡方检验显示差异有统计学意义($\chi^2=21.569$, $P=0.000$),如图 1 所示。

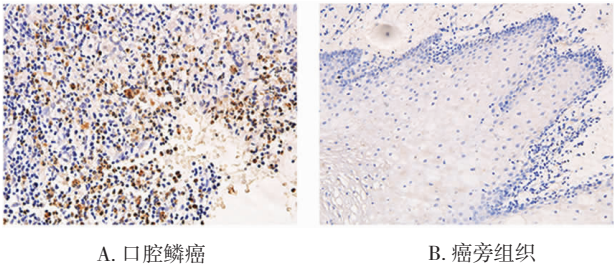


图 1 原位杂交:CASC9 在口腔鳞癌组织表达明显升高

2.2 CASC9 表达与口腔鳞癌临床病理参数相关性分析及生存分析

CASC9 表达与口腔鳞癌患者的临床病理参数分析表明,CASC9 表达水平与临床分期($P=0.028$)、肿瘤大小($P=0.026$)、颈淋巴结转移($P=0.018$)呈显著正相关,与患者年龄、性别以及肿瘤分化程度无显著关系($P>0.05$),见表 5;Cox 比例风险回归模型进行单因素分析结果显示 CASC9 表达 ($P=0.009$)、临床分期($P=0.000$)、肿瘤大小($P=0.000$)、淋巴结转移($P=0.000$)分别是口腔鳞癌的不良预后因素。Cox 逐步回归多因素分析结果表明,CASC9 表达($P=0.024$)、临床分期($P=0.044$)、肿瘤大小($P=0.044$)和淋巴结转移($P=0.040$)是口腔鳞癌患者独立危险因素($P<0.05$),见表 6。Kaplan-Meier 生存分析和 log-rank 检验分析显示,CASC9 高表达组和低表达组平均生存时间分别为(47.40 ± 4.51)个月和(67.40 ± 4.59)个月,CASC9 高表达的口腔鳞癌患者的生存时间明显短于低表达者($P=0.007$),如图 2 所示。CASC9 高表达组和低表达组 5 年生存率分别为 41.4%(24/58)和 62.7%(27/43),CASC9 高表达的口腔鳞癌患者 5 年生存率明显短于低表达者($\chi^2=4.529$, $P=0.033$)。

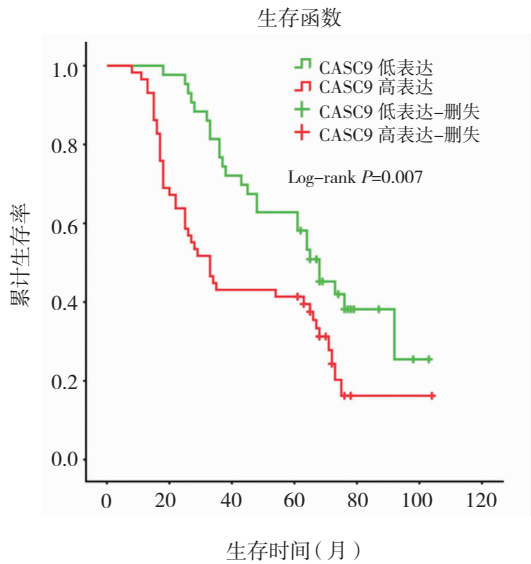


图 2 CASC9 高表达的口腔鳞癌患者的生存时间明显短于低表达者 ($P=0.007$)

2.3 si-RNA 干扰后 SCC15 细胞中 CASC9 表达改变

qRT-PCR 检测表明:CASC9 在 SCC15、si-NC、si-1、si-2 和 si-3 组中的表达分别为 1.00 ± 0.00 、 95.00 ± 2.00 、 58.70 ± 4.49 、 85.73 ± 6.41 和 24.68 ± 4.40 。si-3 组 CASC9 表达明显低于其他各组($P<0.05$),表明 si-3 对 CASC9 干扰效果最佳,选为实验组,实验组以(si-CASC9)表示。下面实验均设置为 3 组:实验组(si-CASC9 组)、阴性对照组(si-NC 组)和空白对照组(SCC15 组)。

表 5 口腔鳞癌患者各临床病理参数及与 lncRNA CASC9 表达的关系

临床参数	总数	CASC9 表达量		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
年龄(岁)				0.160	0.690
≥60	54	32	22		
<60	47	26	21		
性别				0.003	0.955
男	52	30	22		
女	49	28	21		
临床分期				9.104	0.028
I	22	10	12		
II	31	13	18		
III	28	20	8		
IV	20	15	5		
T 分期				9.246	0.026
T1	25	10	15		
T2	25	12	13		
T3	28	22	6		
T4	23	14	9		
淋巴结转移				5.594	0.018
有	56	38	18		
无	45	20	25		
分化程度				0.236	0.889
高分化	40	23	17		
中分化	33	18	15		
低分化	28	17	11		

注:P 值反映了卡方检验 lncRNA CASC9 表达与临床病理参数的关系。高表达(6~12 分),低表达(0~4 分)

2.4 干扰 CASC9 抑制 SCC15 细胞增殖

流式细胞检测表明,si-CASC9 组细胞增殖指数(PI)明显低于 si-NC 组和 SCC15 组($P<0.05$),G0/G1 期细胞数明显增加($P<0.05$),见表 7 和图 3A~C。CCK-8 实验结果表明:si-CASC9 组细胞增殖能力较 si-NC 组和 SCC15 组明显降低($P<0.05$),见表 8 和图 3D。

2.5 干扰 CASC9 后 SCC15 细胞迁移和浸润能力明显降低

Transwell 实验结果表明,si-CASC9 组迁移和侵袭细胞

数明显低于 si-NC 和 SCC15 组 ($P<0.05$), 见表 9 和图 4。证明干扰 CASC9 后 SCC15 细胞迁移和侵袭能力明显降低。

2.6 沉默 CASC9 后口腔鳞癌细胞中 PI3K/AKT 信号通路抑制

Western blot 和 qRT-PCR 检测表明, si-CASC9 组中

PI3K mRNA 和蛋白明显低于 si-NC 和 SCC15 组 ($P<0.05$), AKT mRNA 和蛋白在 3 组中表达无统计学差异 ($P>0.05$), 但 p-AKT 蛋白明显低于 si-NC 组和 SCC15 组 ($P<0.05$), 见表 10 和图 5。说明 CASC9 沉默后显著抑制了 PI3K/AKT 信号通路。

表 6 COX 回归单变量分析和多变量分析

变量	单变量分析			多变量分析		
	P 值	风险比	95% CI	P 值	风险比	95% CI
CASC9	0.009	1.928	1.180~3.153	0.024	1.832	1.083~3.098
年龄	0.619	1.128	0.702~1.813	0.173	0.705	0.427~1.165
性别	0.689	1.102	0.685~1.772	0.153	0.687	0.411~1.150
临床分期	0.000	3.470	2.555~4.714	0.044	1.945	1.017~3.722
T 分期	0.000	2.859	2.157~3.790	0.044	1.753	1.015~3.027
淋巴结转移	0.000	5.693	3.151~10.284	0.040	2.128	1.035~4.378
分化程度	0.405	0.884	0.660~1.182	0.508	0.897	0.649~1.239

注: P 值反映了 Cox 回归的总生存率与临床病理参数的关系

表 7 si-CASC9、si-NC 和 SCC15 组中细胞周期分布、细胞增殖

周期	si-CASC9 组	si-NC 组	SCC15 组	F 值	P 值	P_1 值	P_2 值	P_3 值
G ₀ /G ₁	61.62 ± 0.44	57.29 ± 2.15	56.43 ± 0.78	12.770	0.007	0.018	0.008	0.725
S	26.53 ± 0.96	34.23 ± 3.02	34.28 ± 0.52	17.350	0.003	0.005	0.005	0.999
G ₂ /M	11.85 ± 0.69	8.48 ± 1.14	9.28 ± 0.41	14.410	0.005	0.005	0.018	0.483
PI	38.39 ± 0.42	42.71 ± 2.15	43.57 ± 0.78	12.780	0.007	0.018	0.008	0.724

注: P 代表 3 组间单因素方差分析结果; P_1 、 P_2 、 P_3 分别代表 si-CASC9 组与 si-NC 组, si-CASC9 组与 SCC15 组, si-NC 组与 SCC15 组组内两两比较结果

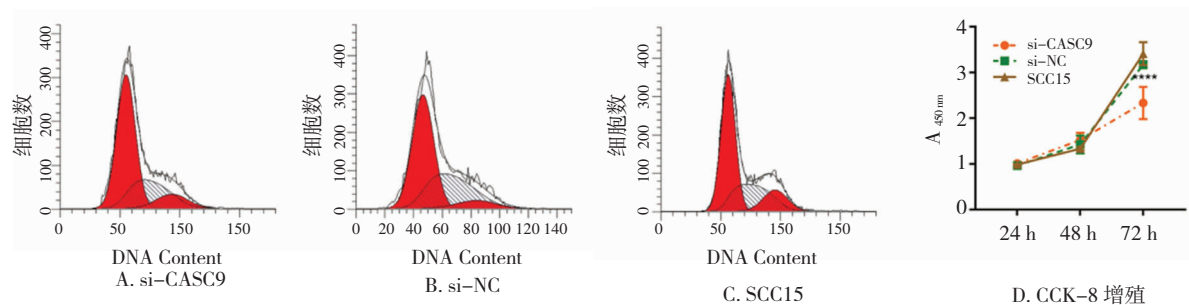


图 3 干扰 CASC9 后 SCC15 细胞增殖能力明显降低

表 8 各组细胞体外 CCK-8 增殖实验

组别	24 h	48 h	72 h
si-CASC9 组	1.010 ± 0.053	1.520 ± 0.160	2.333 ± 0.350
si-NC 组	0.960 ± 0.060	1.424 ± 0.200	3.170 ± 0.080
SCC15 组	0.980 ± 0.020	1.330 ± 0.037	3.410 ± 0.250

注: $F_{\text{时间}}=350.800$, $P_{\text{时间}}=0.000$; $F_{\text{分组}}=6.527$, $P_{\text{分组}}=0.0312$; $F_{\text{交互}}=13.950$, $P_{\text{交互}}=0.000$

表 9 si-CASC9、si-NC 和 SCC15 组中细胞迁移和侵袭数

组别	si-CASC9 组	si-NC 组	SCC15 组	F 值	P 值	P_1 值	P_2 值	P_3 值
迁移	35.67 ± 10.02	91.67 ± 15.18	96.33 ± 6.43	27.570	0.001	0.002	0.001	0.868
侵袭	22.67 ± 2.08	79.67 ± 6.03	87.33 ± 5.69	153.900	0.000	0.000	0.000	0.218

注: P 代表 3 组间单因素方差分析结果; P_1 、 P_2 、 P_3 分别代表 si-CASC9 组与 si-NC 组, si-CASC9 组与 SCC15 组, si-NC 组与 SCC15 组组内两两比较结果

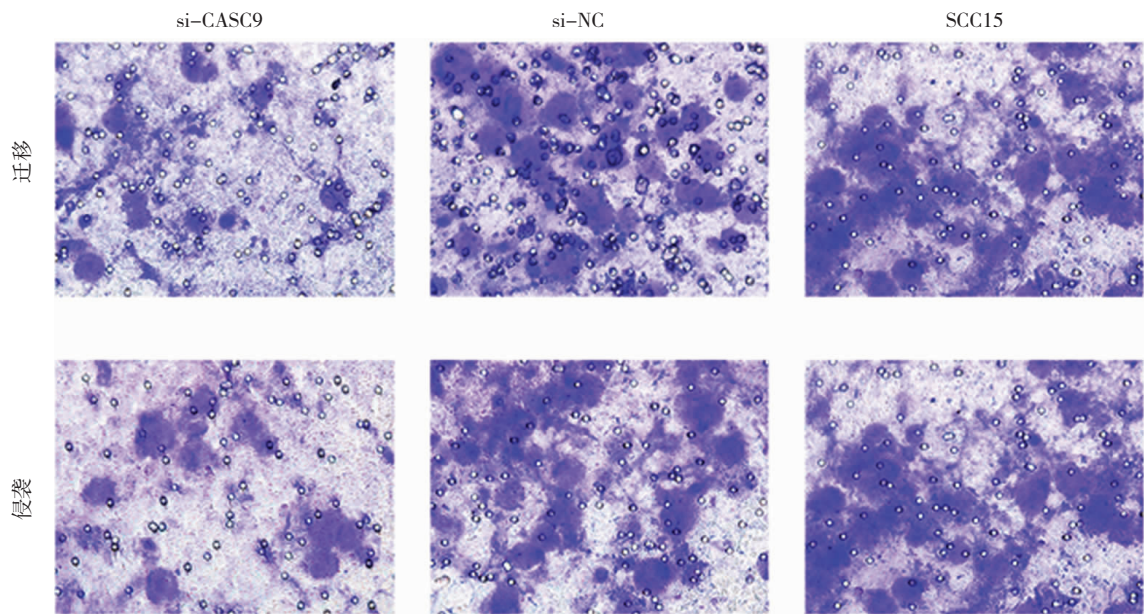


图 4 干扰 CASC9 后 SCC15 细胞迁移侵袭能力明显降低

表 10 si-CASC9、si-NC 和 SCC15 组中 PI3K/AKT 信号通路相关基因 mRNA 和蛋白表达

基因	si-CASC9组	si-NC组	SCC15组	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	<i>P</i> ₁ 值	<i>P</i> ₂ 值	<i>P</i> ₃ 值
PI3K mRNA	0.52 ± 0.09	0.95 ± 0.02	1.00 ± 0.00	83.800	0.000	0.000	0.000	0.488
AKT mRNA	0.97 ± 0.02	0.95 ± 0.03	0.94 ± 0.05	0.640	0.559	0.740	0.544	0.935
PI3K 蛋白	0.48 ± 0.03	1.20 ± 0.08	1.00 ± 0.00	162.100	0.000	0.000	0.000	0.007
AKT 蛋白	0.88 ± 0.06	0.90 ± 0.02	0.95 ± 0.05	1.770	0.248	0.867	0.239	0.442
p-AKT 蛋白	0.34 ± 0.04	1.01 ± 0.06	0.96 ± 0.02	192.000	0.000	0.000	0.000	0.463

注: *P* 代表 3 组间单因素方差分析结果; *P*₁、*P*₂、*P*₃ 分别代表 si-CASC9 组与 si-NC 组, si-CASC9 组与 SCC15 组, si-NC 组与 SCC15 组组内两两比较结果

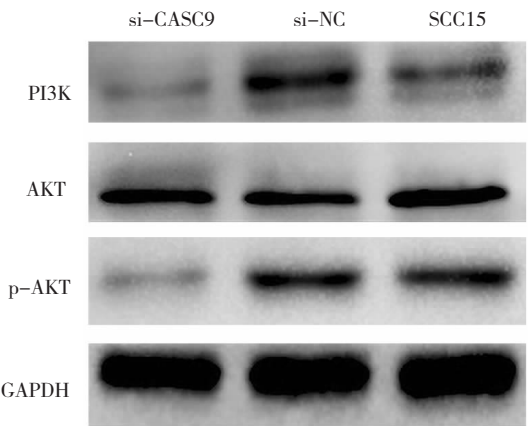


图 5 沉默 CASC9 后抑制 PI3K/AKT 信号通路

3 讨论

人类基因组序列转录产生的 RNA 中仅有不到 2% 能编码蛋白, 不能编码蛋白的 RNA 被称为非编

码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)^[3]。ncRNA 中大多数为 lncRNA, 如此众多的 lncRNA 以前被认为是无功能的“噪声”, 但近 10 年来发现, lncRNA 能在 DNA、转录和转录后多个水平调控基因表达, 影响细胞的多种生物学和病理学过程^[10], 与包括癌症在内的人类多种疾病的发生发展和预后有着密切联系^[11-12], 同时基于 lncRNAs 的调控不需要先被翻译成蛋白质, 因而 lncRNAs 对机体功能的调控比蛋白质系统的调控更直接和更快速^[13]。lncRNAs 为人们从基因表达调控网络来认识生命体的复杂性开启了新领域, 对 lncRNAs 的深入研究有可能帮助阐明癌症发生发展的复杂机制。

在人类基因组中目前已被确定有约 5.8 万个 lncRNA loci^[14], 但大多 lncRNA 的功能目前未知。目前已证实一些 lncRNA 在包括口腔鳞癌在内的多种癌症的发生发展中具有重要作用^[15-16]。本研究首次证明了 CASC9 在口腔鳞癌中表达明显升高,

CASC9 表达水平与口腔鳞癌患者的肿瘤大小、临床分期和淋巴结转移显著正相关,CASC9 高表达的口腔鳞癌患者的生存时间明显短于低表达者,证明 CASC9 是促进口腔鳞癌发生发展的重要癌基因,有可能成为口腔鳞癌新的治疗靶点和预后标记物。最近的研究也发现 CASC9 在食管鳞癌、鼻咽癌和肝癌中的表达明显升高,发挥着重要的促癌作用^[7-9]。综合这些研究表明,CASC9 高表达对促进包括口腔鳞癌在内的多种癌症的发生发展均具有重要作用,因此对 CASC9 的深入研究具有重要且广泛的临床转化前景。

细胞增殖和转移是癌症发生发展的重要原因,PI3K/AKT 信号通路是调控细胞增殖和转移的重要信号通路之一,PI3K/AKT 通路在包括口腔鳞癌在内的许多癌症发生发展中常被异常激活。PI3K 和 p-AKT 是 PI3K/AKT 信号通路中的关键分子,PI3K 和 p-AKT 表达升高是激活 PI3K/AKT 通路的关键^[7]。在本研究中,沉默口腔鳞癌细胞 SCC15 中 CASC9 后发现 PI3K、p-AKT 表达明显下降,细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显降低。证明 PI3K/AKT 通路是 CASC9 促进口腔鳞癌细胞增殖和转移的重要通路。然而,CASC9 调控 PI3K/AKT 通路的具体机制还需进一步深入研究。

综上所述,本研究证明了 CASC9 在口腔鳞癌中高表达,CASC9 高表达的患者有更高的临床分期、淋巴结转移及更差的预后;还证明了 CASC9 是通过调控 PI3K/AKT 通路促进 OSCC 发展的癌基因。CASC9 可能是 OSCC 新的临床预后标志物和治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(5): 401–421.
- [2] Takahashi H, Yanamoto S, Yamada S, et al. Effects of postoperative chemotherapy and radiotherapy on patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and multiple regional lymph node metastases [J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2014, 43(6): 680–685.
- [3] Kopp F, Mendell JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs [J]. Cell, 2018, 172(3): 393–407.
- [4] Yu C, Wang Y, Li G, et al. LncRNA PVT1 promotes malignant progression in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. J Cancer, 2018, 9(19): 3593–3602.
- [5] Wang X, Liu W, Wang P, et al. RNA interference of long noncoding RNA HOTAIR suppresses autophagy and promotes apoptosis and sensitivity to cisplatin in oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2018, 47(10): 930–937.
- [6] Ren J, Ding L, Zhang D, et al. Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19[J]. Theranostics, 2018, 8(14): 3932–3948.
- [7] Su X, Li G, Liu W. The long noncoding RNA cancer susceptibility candidate 9 promotes nasopharyngeal carcinogenesis via stabilizing HIF1alpha[J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(5): 394–400.
- [8] Pan Z, Mao W, Bao Y, et al. The long noncoding RNA CASC9 regulates migration and invasion in esophageal cancer[J]. Cancer Med, 2016, 5(9): 2442–2447.
- [9] Klingenberg M, Gross M, Goyal A, et al. The lncRNA CASC9 and RNA binding protein HNRNPL form a complex and co-regulate genes linked to AKT signaling[J]. Hepatology, 2018, 68(5): 1817–1832.
- [10] Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs[J]. Nature, 2012, 482(7385): 339–346.
- [11] Wang ZY, Hu M, Dai MH, et al. Upregulation of the long non-coding RNA AFAP1-AS1 affects the proliferation, invasion and survival of tongue squamous cell carcinoma via the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 3.
- [12] Li W, Jia G, Qu Y, et al. Long non-coding RNA (LncRNA) HOX-A11-AS promotes breast cancer invasion and metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition[J]. Medical Science Monitor, 2017, 23: 3393–3403.
- [13] Batista Pedro J, Chang Howard Y. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease[J]. Cell, 2013, 152(6): 1298–1307.
- [14] Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J]. Cancer Cell, 2016, 29(4): 452–463.
- [15] Yang CM, Wang TH, Chen HC, et al. Aberrant DNA hypermethylation-silenced SOX21-AS1 gene expression and its clinical importance in oral cancer[J]. Clin Epigenetics, 2016, 8: 129.
- [16] Shao T, Huang J, Zheng Z, et al. SCCA, TSGF, and the long non-coding RNA AC007271.3 are effective biomarkers for diagnosing oral squamous cell carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(1): 26–38.
- [17] Koundouros N, Poulgiannis G. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt signaling and redox metabolism in cancer[J]. Front Oncol, 2018, 8: 160.

(责任编辑:唐秋姗)