

长链非编码 R.NA NOP14-AS1 在舌鳞状细胞癌中表达的研究

李佳宜¹ 肖震² 陈学林¹ 张星焱¹ 戚荣¹

(1.齐齐哈尔医学院附属第三医院 黑龙江省齐齐哈尔市 161000 2.齐齐哈尔市第一医院 黑龙江省齐齐哈尔市 161000)

摘要:舌鳞状细胞癌是一种发病率较高的舌癌组织学分型,该类恶性肿瘤早期症状隐匿,临床症状出现较晚,预后不佳,需积极提升其早期诊断水平。但是,舌鳞状细胞癌缺少灵敏的早期标志物,导致其早期诊断率较低,而晚期患者长期生存率较低,预后较差,因此需积极探索更为可靠的早期标志物,提升舌鳞状细胞癌的早期诊断水平。近年来,临床研究发现,舌鳞状细胞癌的发生、发展过程,与长链非编码 RNA 异常表达存在密切联系,相关研究逐渐增多,其中长链非编码 RNA NOP14-AS1 研究相对较少,但是其与舌鳞状细胞癌的密切联系受到了临床医师的重视。为此,本文对长链非编码 RNA NOP14-AS1 在舌鳞状细胞癌中表达情况进行了综述分析,旨在进一步提升舌鳞状细胞癌的防控水平,现总结报道如下。

关键词:长链非编码 RNA; NOP14-AS1; 舌鳞状细胞癌; 促癌活性; 表达水平; 预后指标

舌鳞状细胞癌为最常见的口腔癌类型,具有无限的生长和高转移率特征,会导致口腔咀嚼功能障碍和语言障碍,若不及时治疗,还可危及患者生命安全。当前,舌鳞状细胞癌治疗水平不断提升,主要治疗方法主要包括手术切除、放/化疗和靶向治疗等,显著提高了舌鳞状细胞癌的临床效率。但是,舌鳞状细胞癌的长期生存率仍不令人满意,早期诊断率不足,缺少有效的预测、检测方法^[1]。近年来,舌鳞状细胞癌临床研究发现,该类恶性肿瘤的发生、发展与基因表达异常存在密切联系,而非编码 RNA 的异常表达在舌鳞状细胞癌发展中的多种生物学过程存在密切联系,其中包括多种反义非编码 RNA 可激活基因,促进其表达上调,可调监舌鳞状细胞癌迁移和侵袭。为此,应积极探索非编码 RNA 及相关分子标志物,提高舌鳞状细胞癌的防控水平。NOP14 反义 RNA1 (NOP14-AS1) 是非编码 RNA 的一类特殊基因,相关研究发现,舌鳞状细胞癌组织中存在 NOP14-AS1 上调表现,可能参与了生理和病理过程,但是其具体表达水平和生理作用尚不明确,有待深入分析。

1.长链非编码 RNA 概述

长链非编码 RNA 是一种新鉴定的 RNA 转录物类型,其转录本长度超过 200 个核苷酸,该类 RNA 不能编码蛋白质,其为蛋白质编码的潜力无限。但是,近年来肿瘤学临床研究证实,长链非编码 RNA 成为作为癌症发生和发展的新关键控制因子;长链非编码 RNA 在多种消化系统肿瘤中发挥了重要作用,参与了肿瘤发生、发展的生理和病理过程^[2]。随着基因芯片技术发展,长链非编码 RNA 的异常基因表达受到了关注,多种长链非编码 RNA 存在表达上调,其中多种高表达基因得到明确,但是其在肿瘤发生、发展中的生物学功能尚不明确。舌鳞状细胞癌研究发现,患者癌组织中存在长链非编码 RNA 的异常表达,其表达失调与癌细胞的调节有关,可通过碱基配对诱导 RNA 诱导沉默复合物来管理基因表达;同时,长链非编码 RNA 可作为 miRNA 的分子诱饵和支架,是导致其过度表达的靶基因,因此,应积极探索失调的长链非编码 RNA,全面认识其基因异常表达情况,便于开发新的治疗靶点^[3]。

2.长链非编码 RNA NOP14-AS1

2.1 研究现状

随着肿瘤生物学对长链非编码 RNA 研究的逐渐深入,相关基因的肿瘤调控作用已成为研究的热点。其中, NOP14 反义 RNA 1 (NOP14-AS1) 在部分癌症的中生物学功能受到了关注,其在舌鳞

状细胞癌存在表达异常情况,但是其表达状态、临床效果和生物学作用仍不明确,相关研究极少,需要进一步深入试验分析,探讨其相关机制作用。

2.2 表达情况

鳞状细胞癌相关研究发现,依照癌症基因组图谱,检测了患者癌组织、癌旁组织及正常组织, NOP14-AS1 在各组织中的均有表达,但是鳞状细胞癌组织中 NOP14-AS1 的表达上调,显著高于正常组组长,而癌旁组织(鳞状细胞癌)中 NOP14-AS1 表达水平相对较低。体外功能试验也证实,舌鳞状细胞癌组织具有比相邻正常组织更高的 NOP14-AS1 水平;正常牙龈上皮细胞与舌鳞状细胞癌组织相比,前者少有表达上调状态,而后者表达上调更为显著, NOP14-AS1 舌鳞状细胞癌组织细胞系中持续过度表达;通过 Kaplan - Meier 生存分析,以测试以 NOP14-AS1 高表达和低表达为特征的舌鳞状细胞癌患者的总体生存率,结果发现 NOP14-AS1 高表达的舌鳞状细胞癌患者面临的总生存期比 NOP14-AS1 低表达的患者更短^[4]。癌症基因组图谱数据库显示癌组织和正常组织中 NOP14-AS1 的表达状态存在明显不同,测定细胞增殖能力的变化发现, NOP14-AS1 表达上调可促进舌鳞状细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭,而 NOP14-AS1 下调抑制舌鳞状细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭,但在体外诱导细胞凋亡, NOP14-AS1 缺失限制细胞增殖、迁移和侵袭,并可促进细胞凋亡^[5]。此外,本次研究对鳞状细胞癌进行了 Transwell 迁移和侵袭试验,以评估 NOP14-AS1 干扰对 CAL-27 和 SCC-15 细胞迁移和侵袭的影响,来揭示 NOP14-AS1 影响鳞状细胞癌恶性行为的分子事件,结果发现, NOP14-AS1 表达水平与 CAL-27、SCC-15 细胞迁移和侵袭能力呈正相关性, NOP14-AS1 具有耗尽鳞状细胞癌细胞的恶性生物学行为。NOP14-AS1 基因的作用机制研究发现, NOP14-AS1 通过吸收 microRNA-665 作为竞争性内源性 RNA 发挥作用,并通过过度表达,提高 miR-665 的靶高迁移率,而过表达质粒或 miR-665 抑制剂的引入,可以消除由 NOP14-AS1 敲除引发的攻击性表型抑制作用^[6]。舌鳞状细胞癌细胞中, NOP14-AS1 作用于靶向 miR-665/HMGB3 轴,执行促癌活性,而 NOP14-AS1/miR-665/HMGB 通路在舌鳞状细胞癌细胞防控中的具体作用尚不明确,但是该通路预防、控制舌鳞状细胞癌细胞的价值受到了关注,有可能作为舌鳞状细胞癌细胞预后评估指标和治疗靶点^[7]。

3. 病例研究

当前,关于舌鳞状细胞癌长链非编码 RNA NOP14-AS1 表达的相关研究较多,针对性体外研究不足。相关研究对舌鳞状细胞癌的组织进行了长链非编码 RNA NOP14-AS1 表达检测,采用功能性实验来评估 NOP14-AS1 癌组织中的生物学行为,具体如下。

(1)确定舌鳞状细胞癌患者纳入标准后,选取舌鳞状细胞癌患者(齐齐哈尔医学院附属第三医院)的舌鳞状细胞癌组织和配对的邻近正常组织(术前患者从未接受过放疗或其他抗癌治疗);所有组织均保存在液氮中,直到进一步使用;(2)细胞培养与转染:将舌鳞状细胞癌细胞、NOP14-AS1(siNOP14-As1)和阴性对照(NC)siRNA(siRNAs),接种到六孔板中采用脂质体 2000 进行转染;定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)使用 miScript 逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA;随后,使用进行 PCR 扩增;细胞计数试剂盒-8 检测 24h 后,将转染后的细胞以 1×10^5 的密度接种到 96 孔板中^[8];然后在含 5%CO₂ 的 37° C 下培养细胞 0、24、48 和 72h;为了检测细胞增殖,96 孔板每孔装载 10 μ LCCCK-8 溶液,37° C 孵育 2 小时。使用酶标仪监测 450nm 处的吸光度^[9]。(3)免疫组化,免疫组化采用 SP 法,对舌鳞状细胞癌及癌旁组织中 NOP14 的表达进行检测,将石蜡切片置于 60 °C 烤箱中烘烤,使用二甲苯脱蜡,经梯度乙醇脱蜡水化后,将切片置于柠檬酸缓冲液中进行高温抗原修复,使用 3%H₂O₂,阻断内源性过氧化物酶活性 10min,将兔抗人 NOP14 抗体(1:100)加入后,4°C 孵育过夜,复温后滴加二抗 37 °C 孵育 30min,滴加 DAB 显色剂进行显色,再加入苏木精复染,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,使用中性树脂胶封固,自然风干后镜检并拍照记录^[10]。(4)Western blot 法处理,将舌鳞状细胞癌及对应癌旁组织进行充分裂解并使用 BCA 法进行总蛋白浓度测定,将每对蛋白样本进行等量上样,上样量为 50 μ L,经电泳、转膜、封闭后,加入 NOP14 一抗(1:1000),过夜孵育洗涤后加入二抗(1:10 000),显色、定影后使用 Alpha 王 Ease FC 成像系统(Alpha Immotech,美国)观察。分析 NOP14 蛋白与内参蛋白灰度值,计算目标蛋白和内参蛋白灰度值的比值,分析 NOP14 蛋白表达水平^[11]。

通过评估舌鳞状细胞癌及对应癌旁组织样品和细胞系中 NOP14-AS1 的表达情况,对 NOP14-AS1 的调控机制进行了进一步明确。舌鳞状细胞癌组织和细胞系中 NOP14-AS1 的表达上调,与相邻正常组织相比,舌鳞状细胞癌组织 NOP14 相对表达量较高,显著高于正常组织,且 NOP14-AS1 计数及丰度显著高于配对的邻近正常组织,可知舌鳞状细胞癌组织的 NOP14-AS1 计数及丰度更高,NOP14-AS1 上调较为显著。不同舌鳞状细胞癌患者的癌组织 NOP14-AS1 表达水平存在一定差异,但是疾病进展患者的癌组织和细胞系中 NOP14-AS1 表达水平更高;同时,癌组织 NOP14-AS1 不同表达水平患者,预后也存在较大差异,追踪患者预后发现,癌组织 NOP14-AS1 表达水平较低的患者,总生存期越长,长期生存率较高,而具有癌组织高表达状态的患者,面临着低生存期问题,总生存期更短,提示癌组织 NOP14-AS1 表达水平影响了患者预后,其表达水平与患者总生存期呈负相关性。在功能上,NOP14-AS1 耗竭促进了 TSCC 中的细胞凋亡,并阻碍了细胞增殖、迁移和侵袭。

在体内,NOP14-AS1 耗竭阻碍了 TSCC 细胞的生长。

4. 小结

早期检出率低、治疗技术不足、远处转移、复发是舌鳞状细胞癌不良预后的原因,基因学研究为舌鳞状细胞癌诊断、治疗及防控提供了新的途径,为此应积极探索相关基因及分子表达情况,全面认识舌鳞状细胞癌,为舌鳞状细胞癌诊断和治疗提供新的途径^[12]。长链非编码 RNANOP14-AS1 在舌鳞状细胞癌组织中,存在高表达状态,与该类肿瘤的发生、发展存在密切联系,需进一步深入其影响机制,为 NOP14-AS1 的表达和作用提供进一步的确凿证据,同时为舌鳞状细胞癌预测、防控、诊断及治疗提供可靠的依据。

项目名称:长链非编码 RNA NOP14-AS1 在舌鳞状细胞癌中表达的研究项目编号:LSFGG-2022016

参考文献:

- [1]孙智辉,徐仲秋,董丽,等.乳杆菌 A-2 代谢产物 LSPM1 通过 JAK/STAT3 通路调节人舌鳞状细胞癌细胞增殖和凋亡[J].南昌大学学报(医学版),2022,62(05):14-18+37.
- [2]秦建章.长链非编码 RNA00114 招募 EZH2 增强 H3K27me3/DLC1 调节食管鳞癌细胞生长及糖酵解的机制研究[D].河北医科大学,2022: 23-26.
- [3]李春燕.基于 CRISPR 激酶文库筛选 STK19 作为舌鳞癌中铂类协同致死靶点的作用及机制研究[D].昆明医科大学,2022: 31-35.
- [4]王剑,周兴玮,何娴.长链非编码 RNA XIST 可能通过 miR-22/NLRP3 促进喉鳞癌细胞增殖[J].中国免疫学杂志,2022,38(02):191-195.
- [5]赵卿,张晓月,刘海丹,等.Stat3 抑制剂 Stattic 抑制人舌鳞癌细胞增殖的机制研究[J].临床口腔医学杂志,2021,37(05):272-275.
- [6]周光明,梁衍灿,黄子贤,等.长链非编码 RNA FOXD2-AS1 对舌鳞癌细胞迁移、侵袭的影响[J].中国口腔颌面外科杂志,2020,18(06):495-500.
- [7]辛欣,蔡成,王昕.miR-184 靶向 ZNRF3 调控口腔鳞状细胞癌增殖和转移的分子机制[J].中国老年学杂志,2021,41(05):1075-1080.
- [8]闫启航.长链非编码 RNA OIP5-AS1 通过靶向 miR-30a-5p 介导 FOXD1/ERK1/2 信号通路抑制食管鳞癌细胞增殖的机制研究[D].浙江大学,2021:34-35.
- [9]姚洁琼,任景丽,胡桂明.长链非编码 RNA HAGLROS 在食管鳞癌组织中的表达及其对食管鳞癌细胞生物学行为的影响[J].肿瘤基础与临床,2021,34(01):11-16.
- [10]李瑞芳,南欣荣,闫星泉.长链非编码 RNA PCBP1-AS1 下调微 RNA-196a 抑制口腔鳞癌细胞增殖、迁移及侵袭[J].中华生物医学工程杂志,2021,27(01):62-65.
- [11]李冠睿,李建武,颜家渝.长链非编码 RNA LINC00478 抑制微小 RNA-214 对口腔鳞癌细胞顺铂耐药性的影响[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2021,42(01):19-25+70.
- [12]刘路阳,杜少华,王闪,等.miR-98-5p 对 STAT3 诱导的人舌鳞癌细胞 SCC-25 凋亡、增殖和成瘤性的影响[J].解剖学杂志,2020,43(06):481-486+510.