

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.04.001
文章编号: 1005-8982 (2022) 04-0001-08

口腔疾病专题·论著

lncRNA UCA1 对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、 凋亡的影响及其机制研究

王怡¹, 陈袁伟²

[1. 南京大学医学院附属口腔医院(南京市口腔医院), 江苏 南京 210008;
2. 同济大学附属口腔医院 口腔颌面外科, 上海 200072]

摘要: 目的 探究长链非编码RNA尿路上皮癌相关基因1(*lncRNA UCA1*)通过靶向miR-206调控Yes相关蛋白1(YAP1)的表达,介导口腔鳞状细胞癌(OSCC)细胞增殖、凋亡的分子机制。**方法** 通过实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测人正常口腔角质细胞系HOK和人口腔鳞状细胞癌细胞株TSCCA、SCC15、HN13、CAL27、HSC3和SCC9中*lncRNA UCA1*和microRNA-206(miR-206)的表达;在HN13细胞中敲除*lncRNA UCA1*,采用CCK-8法和流式细胞术检测其对HN13细胞增殖和细胞凋亡的影响;通过生物信息学网站starBase预测*lncRNA UCA1*、YAP1与miR-206的互补结合位点,并通过双荧光素酶实验验证它们之间的结合关系;Western blotting检测YAP1蛋白的表达。**结果** qRT-PCR结果显示,相比于人正常口腔角质细胞系HOK,6种OSCC细胞中*lncRNA UCA1 mRNA*相对表达量上调($P < 0.05$),而*miR-206 mRNA*相对表达量均降低($P < 0.05$)。与转染siNC的对照组相比,siUCA1组细胞活力下降,凋亡比例升高($P < 0.05$)。生物信息学预测结合双荧光素酶实验证实miR-206与*lncRNA UCA1*、YAP1均存在互补结合。qRT-PCR和Western blotting检测结果显示,siUCA1组*miR-206 mRNA*相对表达量较对照组升高($P < 0.05$),YAP1 mRNA相对表达量较对照组降低($P < 0.05$),而同时转染siUCA1和miR-206 inhibitor则抑制miR-206表达,恢复YAP1的表达($P < 0.05$)。**结论** *lncRNA UCA1*在OSCC细胞中高表达,通过抑制miR-206的表达,上调YAP1,从而促进OSCC细胞增殖,抑制凋亡。

关键词: 口腔鳞状细胞癌;长链非编码RNA尿路上皮癌相关基因1;细胞增殖;凋亡
中图分类号: R739.8 **文献标识码:** A

The role of long non-coding RNA UCA1 in the proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cell

Yi Wang¹, Yuan-wei Chen²

(1. Nanjing Stomatological Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2. Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Tongji University, Shanghai 200072, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of long non-coding RNA urothelial carcinoma-associated 1 (*lncRNA UCA1*) mediating the proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells, potentially by regulating the expression of Yes-associated protein 1 (YAP1) via targeting miR-206. **Methods** The expression of *lncRNA UCA1* and miR-206 was detected via quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in normal human oral keratinocytes (HOKs) and human OSCC cell lines TSCCA, SCC15, HN13, CAL27, HSC3 and SCC9. The CCK8 assay and flow cytometry were used to assess the cell proliferation and apoptosis of HN13 after *lncRNA UCA1* knockdown, respectively. The binding site of *lncRNA UCA1* to miR-206,

收稿日期: 2020-09-13
[通信作者] 陈袁伟, E-mail: chenyw118@163.com

and that of miR-206 to YAP1 were predicted through the bioinformatics website starBase. Dual-luciferase reporter assay was applied to verify the interaction of miR-206 with lncRNA UCA1 and YAP1. Western blotting was performed to determine the protein expression level of YAP1. **Results** The qRT-PCR revealed that the expression of lncRNA UCA1 was increased ($P < 0.05$), while the expression of miR-206 was reduced ($P < 0.05$) in all OSCC cells relative to the normal HOKs. Compared with the control group, the cell viability of the siUCA1 group was lower, and the proportion of cell apoptosis was higher ($P < 0.05$). The bioinformatic analysis predicted and dual-luciferase reporter assay verified that miR-206 could bind to both lncRNA UCA1 and YAP1. The qRT-PCR and Western blotting showed that miR-206 was up-regulated ($P < 0.05$) and YAP1 was down-regulated ($P < 0.05$) in the siUCA1 group compared with the control group. Reversely, miR-206 expression was inhibited and YAP1 expression was restored after the co-transfection of siUCA1 and miR-206 inhibitor ($P < 0.05$). **Conclusions** lncRNA UCA1 was highly expressed in OSCC cells, which promotes the proliferation and suppresses the apoptosis of OSCC cells via inhibiting the expression of miR-206 and up-regulating the level of YAP1.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; long non-coding RNA UCA1; cell proliferation; apoptosis

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是最常见的头颈部肿瘤之一,是全球第六大最常见的癌症^[1-2],发病率高,易发生淋巴结转移且易复发^[3-4]。虽然目前OSCC的临床诊断和治疗方法有所进步,但是患者的5年生存率并没有明显的改善^[5]。在过去的几年中,越来越多的研究证实长链非编码RNA(lncRNAs)参与了癌症的进展,有一部分研究还建议将其作为癌症标志物^[6]。lncRNAs是一类>200个碱基且不具有蛋白编码能力的RNA分子^[7],在细胞中具有多种功能,可以充当分子信号通过表观遗传,转录或转录后调节^[8-9]。越来越多的证据表明lncRNAs在癌症细胞增殖、分化、凋亡和癌细胞转移过程中发挥了重要作用^[10]。长链非编码RNA尿路上皮癌相关基因1(*lncRNA UCA1*)在膀胱癌、乳腺癌和结直肠癌中异常表达,在多种肿瘤中发挥致癌作用,包括胶质母细胞瘤、膀胱癌、胃癌和前列腺癌等^[11-14]。最近的研究也表明*lncRNA UCA1*参与了OSCC的进展^[15],然而其在OSCC中的相关分子机制研究还很少。本研究旨在探讨*lncRNA UCA1*靶向miR-206调控YAP1基因对OSCC细胞增殖和细胞凋亡的影响,初步阐明其相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

HOK、TSCCA、SCC15、HN13、CAL27、HSC3和SCC9细胞均购自中国科学院上海细胞库。细胞培养相关试剂均购自美国Gibco公司,Lipofectamine 3000和实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)相关试剂盒

均购自美国Thermo Fisher Scientific公司,CCK-8试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,YAP1一抗、二抗购自美国Cell Signaling Technology公司,RNA引物由北京擎科生物科技有限公司合成,UCA1、miR-206、YAP1、miR-206 mimics、miR-206 inhibitor均由上海吉玛制药技术有限公司设计合成,流式细胞分析仪购自美国贝克曼库尔特有限公司。

1.2 细胞培养

将HOK、TSCCA、SCC15、HN13、CAL27、HSC3和SCC9细胞接种于含10%胎牛血清、青霉素(100 u/mL)、链霉素(100 μg/mL)的DMEM培养基中,在5%二氧化碳、饱和湿度、37℃培养箱中培养,每2~3天传代1次。

1.3 采用Lipofectamine 3000进行细胞转染

将 2×10^5 个/mL密度的HN13细胞接种于6孔板中并生长浓度至60%,换用无血清培养基培养。取浓度为100 nmol/L的siUCA1(阴性对照为siNC)或50 nmol/L miR-206 mimics(阴性对照为mimics NC)或50 nmol/L miR-206 inhibitor(阴性对照为inhibitor NC)分别加入200 μL无血清培养基稀释,充分混匀,制成RNA稀释液。在2 μL的Lipofectamine 3000中加入198 μL无血清培养基稀释液体,充分混匀,制成Lipofectamine 3000稀释液,室温静置5 min。将2种稀释液充分混合,室温静置15 min,制备成转染复合物。将100 μL转染复合物滴加到含有1 mL无血清培养基的细胞上,前后移动培养皿,混合均匀。在5%二氧化碳、37℃培养箱内孵育6 h,换用正常培养基培养24 h用于后续实验。控制组不做任何处理,对照组使用随机siRNA序列转染,实验组使用siUCA1转染。

1.4 qRT-PCR检测

采用TRIzol一步法提取细胞RNA, 40 μ L无核酸酶水溶解, 置入 -80°C 冷冻保存。取0.5 μg 总RNA, 用逆转录试剂盒合成cDNA, 再行PCR扩增目标基因。预先设计合成引物, 将所得cDNA加至PCR反应体系中扩增目标片段。在待测样品中加入1 μL 模板、1 μL 正向引物、1 μL 反向引物、5 μL SYBR 探针和3 μL DEPC水避光混匀后, 上机检测相关分子的表达。反应条件: 95°C 预变性15 min, 94°C 变性30 s, 55°C 退火30 s, 72°C 延伸30 s, 共40个循环。*GAPDH*和*U6*作为内参, 根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
<i>UCA1</i>	正向: 5'-TGACAACAGATAACCCACCT-3'	19
	反向: 5'-TCCGTATAGAAGACCACCTA-3'	20
<i>miR-206</i>	正向: 5'-CGTCAGAAGGAATGATGCACAG-3'	22
	反向: 5'-ACCTGCCTAGGTAGTTTCATGT-3'	22
<i>YAP1</i>	正向: 5'-TAGCCCTGCGTAGCCAGTTA	20
	反向: 5'-TCATGCTTAGTCCACTGTCTGT-3'	22
<i>GAPDH</i>	正向: 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTG-3'	22
	反向: 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'	22
<i>U6</i>	正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATA-3'	19
	反向: 5'-AACGATTCACGAATTTGCCT-3'	20

1.5 CCK-8法检测细胞增殖

以 2×10^3 个/mL细胞密度接种于96孔板中, 设置24 h、48 h、72 h和96 h 4个时间点, 每组设5个复孔, 培养过夜使细胞贴壁。待每组细胞处理并在相应时间点, 每孔加入10 μL CCK-8试剂, 继续培养2 h。最后在酶标仪450 nm处测定吸光度(OD)值, 重复3次, 并绘制生长曲线。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

将各组细胞培养至正常生长阶段, 转染48 h后胰酶消化, 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤, 1 000 r/min离心5 min, 收集细胞; 用预冷PBS重悬细胞1次, 1 000 r/min离心5 min, 洗涤细胞; 加入300 μL Binding Buffer重悬细胞; 再加入5 μL Annexin V-FITC混匀, 避光, 室温孵育15 min; 加入

5 μL PI染色5 min, 补加200 μL Binding Buffer。用FlowJo 10分析细胞凋亡比率。

1.7 双荧光素酶报告基因结合位点

使用starBase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>)预测miR-206与*UCA1*、*YAP1*的靶向结合位点。将含*UCA1*序列连接至双荧光素酶载体pGL3, 得到pGL3-*UCA1*-WT载体。同时, 通过定点突变将结合位点突变(MUT), 构建突变质粒pGL3-*UCA1*-MUT。同理, 构建pGL3-*YAP1*-WT和pGL3-*YAP1*-MUT质粒载体。将HN13细胞接种于96孔板中24 h, 当细胞融合到50%~70%时, 分别将*UCA1*-WT或*UCA1*-MUT质粒(*YAP1*-WT或*YAP1*-MUT)与mimics NC或miR-206 mimics同时转染HN13细胞。用双荧光素酶报告基因检测系统测定48 h荧光素酶相对活性。分别验证*UCA1*、*YAP1*的结合位点。

1.8 Western blotting检测

将各组细胞培养至对数生长期并转染24 h, 胰酶消化并收集细胞, 1 000 r/min离心5 min, PBS洗涤, 用RIPA裂解液分离提取细胞样本中的全蛋白, BCA试剂盒检测蛋白浓度。蛋白行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至PVDF膜上, 浸入含5%脱脂奶粉的TBST(封闭液)中, 室温下摇床封闭2 h。加入*YAP1*一抗(1:1 000), 4°C 共同孵育8 h。PBS洗涤3次, 加入相应二抗(1:5 000), 震荡孵育2 h。洗膜后, 加入化学发光试剂显色、胶片曝光。使用凝胶成像分析系统拍照, 通过Image J软件计算*YAP1*蛋白灰度值。

1.9 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 *lncRNA UCA1*、*miR-206* mRNA 相对表达量比较

qRT-PCR结果显示, HOK细胞*lncRNA UCA1* mRNA相对表达量为(1.10 ± 0.12)、TSCCA细胞为(1.98 ± 0.23)、SCC15细胞为(1.85 ± 0.19)、HN13细胞为(3.02 ± 0.18)、CAL27细胞为(2.32 ± 0.15)、HSC3细胞为(1.97 ± 0.18)、SCC9细胞为(2.59 ± 0.15), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义($F = 37.580$, $P =$

0.000), TSCCA、SCC15、HN13、CAL27、HSC3 和 SCC9 细胞均较 HOK 细胞升高 ($P < 0.05$)。

HOK 细胞 miR-206 mRNA 相对表达量为 (1.06 ± 0.10)、TSCCA 细胞为 (0.31 ± 0.09)、SCC15 细胞为 (0.42 ± 0.07)、HN13 细胞为 (0.26 ± 0.05)、CAL27 细胞为 (0.38 ± 0.08)、HSC3 细胞为 (0.41 ± 0.04)、SCC9 细胞为 (0.40 ± 0.13)，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ($F = 32.070, P = 0.000$)，TSCCA、SCC15、HN13、CAL27、HSC3 和 SCC9 细胞均较 HOK 细胞降低 ($P < 0.05$)。其中 HN13 细胞 miR-206 mRNA 表达差异更显著，故选择该细胞株进行后续实验。

2.2 lncRNA UCA1 促进 OSCC 细胞凋亡

qRT-PCR 结果显示，对照组 lncRNA UCA1 相对表达量为 (1.05 ± 0.08)、控制组为 (1.05 ± 0.10)、实验组为 (0.21 ± 0.07)，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ($F = 99.991, P = 0.000$)。对照组与控制组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；对照组与实验组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，说明转染成功。

各组 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的 OD 值比较，经

重复测量设计的方差分析，结果：①不同时间点的 OD 值有差异 ($F = 191.904, P = 0.000$)；②各组 OD 值有差异 ($F = 27.801, P = 0.000$)，实验组低于对照组；③各组的 OD 值变化趋势有差异 ($F = 9.042, P = 0.000$)。表明敲除 lncRNA UCA1 使细胞活力明显降低。见表 2。

表 2 各组不同时间点 OD 值比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
控制组	0.19 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.88 ± 0.10
对照组	0.21 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.99 ± 0.13
实验组	0.21 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.56 ± 0.06

流式细胞术结果显示，控制组凋亡率为 (4.14 ± 0.94)%、对照组为 (4.04 ± 1.46)%、实验组为 (14.96 ± 1.59)%，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ($F = 64.221, P = 0.000$)。对照组与控制组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，实验组凋亡率较对照组升高 ($P < 0.05$)，敲除 lncRNA UCA1 诱导细胞凋亡。见图 1。

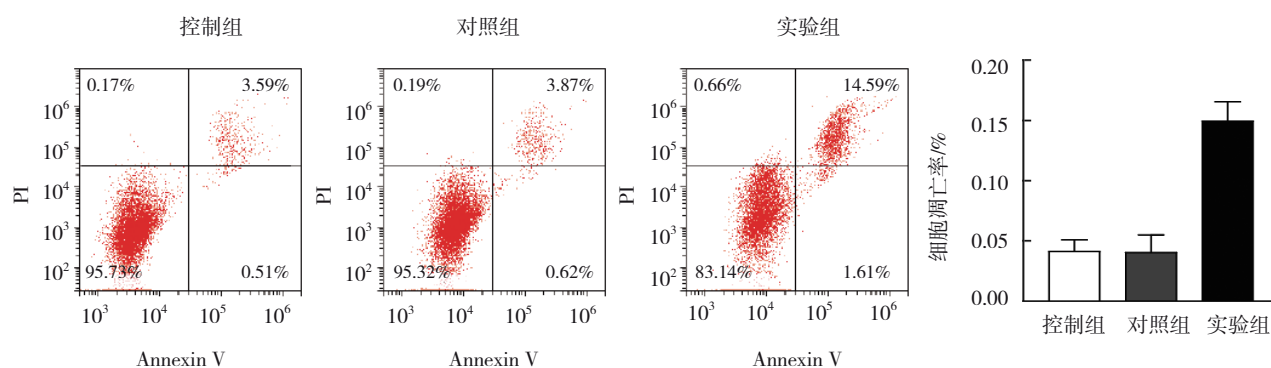


图 1 3 组 NH13 细胞凋亡率比较

2.3 lncRNA UCA1 能够靶向 miR-206

通过 starBase 数据库预测 lncRNA UCA1 与 miR-206 存在结合位点，并构建了突变序列 (见图 2)。UCA1-WT 转染 miR-206 mimics 荧光素相对活性为 (0.48 ± 0.08)、UCA1-MUT miR-206 mimics NC 为 (1.04 ± 0.09)，经 t 检验，差异有统计学意义 ($t = 7.849, P = 0.001$)，UCA1-MUT 转染 miR-206 mimics 荧光素相对活性为 (1.02 ± 0.11)，UCA1-MUT 转染 mimics NC 为 (1.01 ± 0.19)，经 t 检验，差异无统计学意义 ($t = 0.395, P = 0.713$)，UCA1-WT 荧光素酶相对活性被显著抑制 ($P < 0.05$)，而 UCA1-MUT 荧光

素酶相对活性无显著变化 ($P > 0.05$)，证实两者间的靶向结合关系。

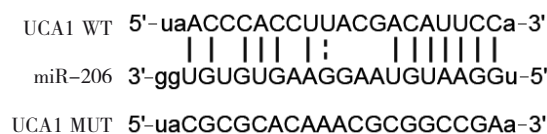


图 2 lncRNA UCA1 与 miR-206 的结合位点

将对照组均分为对照组 1 和对照组 2，并分别转染 siNC 和过表达空载体；将实验组均分为实验组 1 和实验组 2，实验组 1 和实验组 2 分别转染 siUCA1 和 UCA1 过表达载体。qRT-PCR 结果显示，对照组 1

miR-206 相对表达量为 (1.02 ± 0.07) 、实验组 1 为 (2.34 ± 0.23) 、对照组 2 为 (1.06 ± 0.09) 、实验组 2 为 (0.22 ± 0.08) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=131.527, P=0.000$), 实验组 1 较对照组 1 升高 ($P<0.05$), 实验组 2 较对照组 2 降低 ($P<0.05$)。

2.4 YAP1 是 miR-206 的靶基因

通过 starBase 预测 miR-206 与 YAP1 存在结合位点, 并构建了突变序列 (见图 3)。YAP1-WT 转染 miR-206 mimics 荧光素相对活性为 (0.42 ± 0.07) 、YAP1-MUT miR-206 mimics NC 为 (1.03 ± 0.10) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=8.398, P=0.001$), YAP1-MUT 转染 miR-206 mimics 荧光素相对活性为 (1.03 ± 0.10) , YAP1-MUT 转染 mimics NC 为 (1.04 ± 0.15) , 经 t 检验, 差异无统计学意义 ($t=0.365, P=0.733$), YAP1-WT mimics 荧光素酶活性被抑制 ($P<0.05$), 而 YAP1-MUT mimics 荧光素酶活性无显著变化 ($P>0.05$), 证实两者的靶向结合关系。

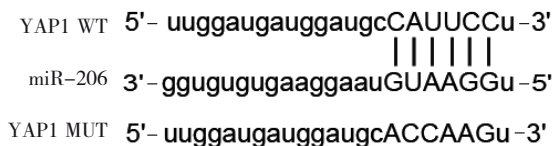


图3 miR-206与YAP1的结合位点

控制组不做任何处理, 对照组 1 和对照组 2 分别转染 mimics NC 和 inhibitor NC, 实验组 1 和实验组 2 分别转染 miR-206 mimics 和 inhibitor。qRT-PCR 结果显示, 对照组 1 的 miR-206 mRNA 相对表达量为 (1.01 ± 0.18) 、对照组 2 为 (1.04 ± 0.21) 、实验组 1 为 (2.56 ± 0.19) 、实验组 2 为 (0.22 ± 0.08) 、控制组为 (1.05 ± 0.10) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=84.583, P=0.000$)。对照组 1、对照组 2 与控制组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 实验组 1 miR-206 mRNA 相对表达量较对照组 1 显著升高 ($P<0.05$), 实验组 2 较对照组 2 显著降低 ($P<0.05$), 提示 miR-206 mimics 和 inhibitor 细胞转染有效。另外, 对照组 1 的 YAP1 mRNA 相对表达量为 (1.08 ± 0.18) 、对照组 2 为 (0.99 ± 0.12) 、实验组 1 为 (0.47 ± 0.06) 、实验组 2 为 (1.68 ± 0.19) 、控制组为 (1.00 ± 0.16) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=25.662, P=0.000$), 实验组 1 较对照组 1 降低 ($P<0.05$), 实验组 2 较对照组 2 升高 ($P<0.05$)。Western blotting 检测结果显示, 对照组 1 的

YAP1 蛋白相对表达量为 (0.58 ± 0.08) 、对照组 2 为 (0.59 ± 0.05) 、实验组 1 为 (0.31 ± 0.04) 、实验组 2 为 (0.84 ± 0.06) 、控制组为 (0.59 ± 0.09) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=28.324, P=0.000$), 实验组 1 较对照组 1 降低 ($P<0.05$), 实验组 2 较对照组 2 升高 ($P<0.05$) (见图 4)。

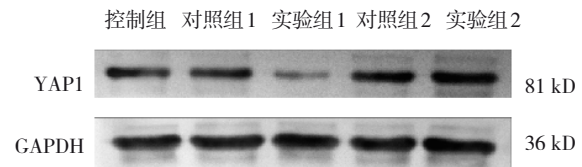


图4 各组YAP1蛋白的表达

2.5 *lncRNA UCA1* 通过 miR-206/YAP1 促进 OSCC 细胞的增殖并抑制凋亡

为进一步验证该信号机制, 笔者在细胞中转染 siUCA1 的同时转染 miR-206 inhibitor, 对照组不做处理, 实验组 1 转染 siUCA1, 实验组 2 转染 siNC 和 miR-206 inhibitor 的阴性对照, 实验组 3 转染 siUCA1 和 miR-206 inhibitor。对照组 miR-206 mRNA 相对表达量为 (1.05 ± 0.11) 、实验组 1 为 (2.45 ± 0.15) 、实验组 2 为 (2.37 ± 0.25) 、实验组 3 为 (1.16 ± 0.12) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=62.351, P=0.000$), 实验组 1 较对照组升高 ($P<0.05$), 促进了 miR-206 的表达; 实验组 3 较实验组 2 降低, 抑制了 miR-206 的表达 ($P<0.05$)。对照组 YAP1 mRNA 相对表达量为 (1.09 ± 0.16) 、实验组 1 为 (0.45 ± 0.07) 、实验组 2 为 (0.43 ± 0.08) 、实验组 3 为 (0.96 ± 0.13) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=24.863, P=0.000$), 实验组 1 较对照组降低 ($P<0.05$), 抑制 YAP1 mRNA 的表达, 实验组 3 较实验组 2 升高 ($P<0.05$), 恢复 YAP1 的表达。Western blotting 检测结果显示, 对照组 YAP1 蛋白相对表达量为 (0.67 ± 0.08) 、实验组 1 为 (0.42 ± 0.06) 、实验组 2 为 (0.43 ± 0.10) 、实验组 3 为 (0.74 ± 0.10) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=11.503, P=0.003$), 实验组 1 YAP1 蛋白相对表达量较对照组降低 ($P<0.05$), 抑制 YAP1 蛋白的表达, 实验组 3 较实验组 2 升高, 恢复了 YAP1 蛋白的表达 ($P<0.05$) (见图 5)。

各组 24 h、48 h、72 h、96 h 的 OD 值比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的 OD 值有差异 ($F=232.034, P=0.000$); ②各组的 OD 值有差异 ($F=24.691, P=0.000$); ③各组的 OD 值变化趋势有差异

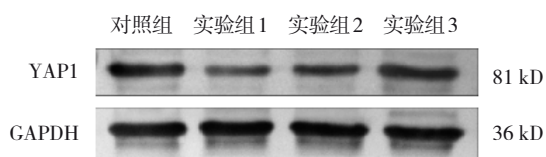


图 5 各组 YAP1 蛋白表达

($F=8.123, P=0.000$)(见表 3)。流式细胞术结果显示, 对照组细胞凋亡率为 $(4.14 \pm 1.04)\%$ 、实验组 1 为 $(14.14 \pm 1.49)\%$ 、实验组 2 为 $(14.54 \pm 1.81)\%$ 、实验组 3 为 $(6.06 \pm 1.67)\%$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=37.312, P=0.000$)。实验组 1 细胞凋亡率较对照组升高 ($P < 0.05$), 实验组 3 较实验组 2 降低 ($P < 0.05$) (见图 6)。

表 3 各组不同时间点 OD 值比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	0.19 ± 0.05	0.32 ± 0.03	0.52 ± 0.06	0.93 ± 0.06
实验组 1	0.21 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.36 ± 0.05 ^①	0.58 ± 0.06 ^①
实验组 2	0.21 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.35 ± 0.07	0.56 ± 0.10
实验组 3	0.22 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.51 ± 0.05 ^②	0.86 ± 0.08 ^②

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与实验组 2 比较, $P < 0.05$ 。

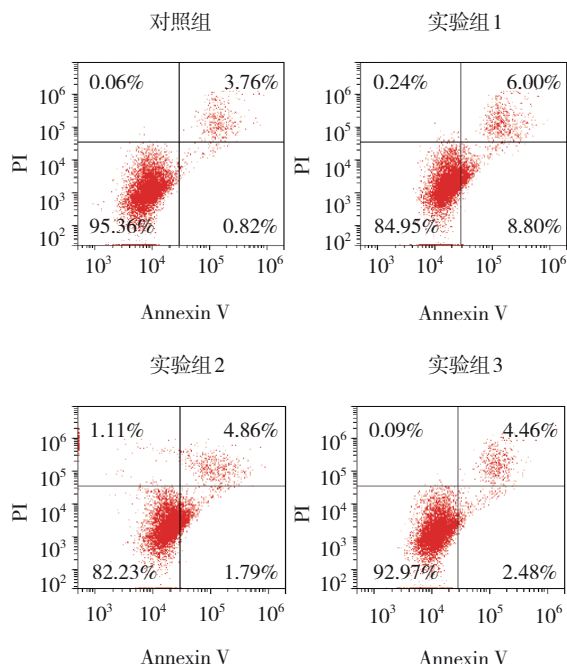


图 6 各组 NH13 细胞流式细胞图

3 讨论

近年来, 越来越多的研究证实了 lncRNAs 通过调控细胞的增殖、分化、迁移侵袭等生物学进程参

与癌症的进展^[10]。目前发现多种 lncRNA 在 OSCC 中表达有差异, lncRNA HOXA11-AS、lncRNA AC007271.3 和 lncRNA CASC9 等在 OSCC 中高表达从而促进 OSCC 细胞增殖, 抑制凋亡, 加速 OSCC 的进展^[16-18]。现今 lncRNA UCA1 已经被报道在胶质母细胞瘤、膀胱癌、胃癌和前列腺癌等癌症中发挥致癌作用^[11-14]。而少有的几篇关于 lncRNA UCA1 在 OSCC 中的研究证实了其在 OSCC 中表达升高, 并能够促进细胞增殖和增强耐药性^[15, 19-20]。本研究结果与其一致, 证实 lncRNA UCA1 在 OSCC 细胞中的表达水平显著高于人正常口腔角质细胞, 通过抑制 lncRNA UCA1 表达能够显著阻碍细胞增殖并促进细胞凋亡。并且通过生物信息学预测结果与实验验证发现 lncRNA UCA1 通过 miR-206/YAP1 促进 OSCC 进展的分子机制, 这是不同于先前报道的新发现。

miRNAs 也是一种非编码 RNA 且高度保守, 长度只有 20~25 个核苷酸, 能通过与靶基因 mRNA 结合调控蛋白表达, 参与多种细胞生物学过程^[21]。已有文献证实 miRNAs 能够参与各种疾病的进展, 尤其是癌症^[22]。其中, miR-206 在癌症中作为一种抑癌因子, 通常抑制癌症进展, 这已在非小细胞肺癌^[23]、前列腺癌^[24]、甲状腺癌^[25]和宫颈癌^[26]等研究中得到证实。目前关于 miR-206 在 OSCC 中的功能尚不清楚, 而本研究证实 miR-206 在 OSCC 细胞中表达水平显著降低, 其作为肿瘤抑制因子发挥作用, 这与 miR-206 在其他癌症中的研究结果相一致。并且本研究结果证实 miR-206 能够与 lncRNA UCA1 互补结合, 其表达被 lncRNA UCA1 调控, 并进一步影响下游基因表达。而通过转染 miR-206 inhibitor 抑制 miR-206 的表达能够逆转 siUCA1 的功能, 促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡。此外, 本研究结果证实了 miR-206 是通过调控 YAP1 蛋白的表达水平实现对癌细胞生物学过程的调控。

YAP1 表达水平升高往往促进癌症的进展, 相关研究表明 YAP1 能够促进结直肠癌上皮间质转化和血管生成^[27], 在乳腺癌^[28]、甲状腺癌^[29]和胰腺导管癌^[30]中都具有促癌作用。有研究表明, YAP1 同样也在 OSCC 中发挥了促癌作用, 对其抑制能够显著抑制癌症进展^[31-33], 本研究结果与以上结果一致, YAP1 能够促进 OSCC 细胞增殖, 抑制凋亡。本研究还证实 YAP1 是 miR-206 的 1 个靶基因, 其表达受到 miR-

206的调控,而 *lncRNA UCA1*能够通过 *miR-206*间接调控 *YAP1*的表达,从而影响 OSCC 细胞的增殖、凋亡,参与 OSCC 的进展。本研究结果显示了敲除 *lncRNA UCA1*后, *YAP1* 蛋白表达水平显著下降,同时细胞活力显著降低,凋亡细胞显著增多。本研究通过敲除 *lncRNA UCA1*在 OSCC 中的表达,证实了其促癌作用,并生物信息学预测结果和双荧光素酶验证了 *miR-206*和 *lncRNA UCA1*、*YAP1*间的靶向结合关系,进一步实验验证了三者 in OSCC 中的相互作用及对 OSCC 进展的影响。

综上所述,本研究阐明了 *lncRNA UCA1*在 OSCC 中通过靶向 *miR-206*调控 *YAP1*的表达,介导 OSCC 细胞增殖和凋亡,这一分子机制的发现为 OSCC 的诊断和治疗提供了新思路。然而,鉴于 *lncRNAs*的多功能靶向作用, *lncRNA UCA1*在 OSCC 中更详细的分子机制还有待进一步探索,对其在临床诊断治疗中的应用还需更多的研究和论证。

参 考 文 献 :

- [1] ZHANG L, MENG X, ZHU X W, et al. Long non-coding RNAs in oral squamous cell carcinoma: biologic function, mechanisms and clinical implications[J]. *Molecular Cancer*, 2019, 18(1): 102.
- [2] CHI A C, DAY T A, NEVILLE B W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma-an update[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(5): 401-421.
- [3] ALVES A M, DIEHL L F, LAMERS M L. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a systematic review[J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47(5): 460-467.
- [4] ZHAO W, CUI Y, LIU L W, et al. Splicing factor derived circular RNA circuhrf1 accelerates oral squamous cell carcinoma tumorigenesis via feedback loop[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2020, 27(3): 919-933.
- [5] SAFI A F, GROCHAU K, DREBBER U, et al. A novel histopathological scoring system for patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *Clinical Oral Investigations*, 2019, 23(10): 3759-3765.
- [6] ARUN G, DIERMEIER S D, SPECTOR D L. Therapeutic targeting of long non-coding RNAs in cancer[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2018, 24(3): 257-277.
- [7] MOMEN-HERAVI F, BALA S. Emerging role of non-coding RNA in oral cancer [J]. *Cell Signal*, 2018, 42: 134-143.
- [8] RANSOHOFF J D, WEI Y, KHAVARI P A. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(3): 143-157.
- [9] WANG M Q, ZHU W J, GAO P. New insights into long non-coding RNAs in breast cancer: biological functions and therapeutic prospects[J]. *Exp Mol Pathol*, 2021, 120: 104640.
- [10] LORENZI L, AVILA COBOS F, DECOCK A, et al. Long noncoding RNA expression profiling in cancer: challenges and opportunities[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58(4): 191-199.
- [11] LI Y, ZENG Q G, QIU J L, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes breast cancer by upregulating ptp1b expression via inhibiting miR-206[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 275.
- [12] WANG C J, ZHU C C, XU J, et al. The lncRNA UCA1 promotes proliferation, migration, immune escape and inhibits apoptosis in gastric cancer by sponging anti-tumor miRNAs[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 115.
- [13] HE C, LU X W, YANG F, et al. lncRNA UCA1 acts as a sponge of miR-204 to up-regulate CXCR4 expression and promote prostate cancer progression[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): DOI: 10.1042/BSR20181465.
- [14] GOU L Y, LIU M Y, XIA J, et al. BMP9 Promotes the proliferation and migration of bladder cancer cells through up-regulating lncRNA UCA1[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1116.
- [15] DUAN Q Y, XU M, WU M, et al. Long noncoding RNA UCA1 promotes cell growth, migration, and invasion by targeting miR-143-3p in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Medicine*, 2020, 9(9): 3115-3129.
- [16] NIU X Y, YANG B, LIU F, et al. lncRNA HOXA11-AS promotes OSCC progression by sponging miR-98-5p to upregulate YBX2 expression[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 121: 109623.
- [17] SHAO T R, ZHENG Z N, CHEN Y C, et al. lncRNA AC007271.3 promotes cell proliferation, invasion, migration and inhibits cell apoptosis of OSCC via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Life Sciences*, 2019, 239: 117087.
- [18] YANG Y X, CHEN D, LIU H, et al. Increased expression of lncRNA CASC9 promotes tumor progression by suppressing autophagy-mediated cell apoptosis via the Akt/mTOR pathway in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(2): 1-16.
- [19] YANG Y T, WANG Y F, LAI J Y, et al. Long non-coding RNA UCA 1 contributes to the progression of oral squamous cell carcinoma by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Cancer Science*, 2016, 107(11): 1581-1589.
- [20] FANG Z, ZHAO J F, XIE W H, et al. lncRNA UCA1 promotes proliferation and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma by suppressing miR-184 expression[J]. *Cancer Medicine*, 2017, 6(12): 2897-2908.
- [21] DAOUD A Z, MULHOLLAND E J, COLE G, et al. MicroRNAs in pancreatic cancer: biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 1130.
- [22] ALI SYEDA Z, LANGDEN S S S, MUNKHZUL C, et al. Regulatory mechanism of microrna expression in cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(5): 1723.
- [23] LIAO M, PENG L. MiR-206 may suppress non-small lung

- cancer metastasis by targeting CORO1C[J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2020, 25(1): 1-13.
- [24] WANG Y, XU H T, SI L H, et al. MiR-206 inhibits proliferation and migration of prostate cancer cells by targeting cxcl11[J]. the Prostate, 2018, 78(7): 479-490.
- [25] WANG P, GU J L, WANG K J, et al. miR-206 inhibits thyroid cancer proliferation and invasion by targeting RAP1B[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(11): 18927-18936.
- [26] WANG Y Y, TIAN Y J. miR-206 inhibits cell proliferation, migration, and invasion by targeting BAG3 in human cervical cancer[J]. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 2018, 26(6): 923-931.
- [27] SUN Z Q, OU C L, LIU J B, et al. YAP1-induced malat1 promotes epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis by sponging miR-126-5p in colorectal cancer[J]. Oncogene, 2019, 38(14): 2627-2644.
- [28] GUO L W, CHEN Y T, LUO J, et al. YAP 1 overexpression is associated with poor prognosis of breast cancer patients and induces breast cancer cell growth by inhibiting pten[J]. FEBS Open Bio, 2019, 9(3): 437-445.
- [29] HUANG Y, ZHANG K W, LI Y H, et al. The dlgl-as1/miR-497/YAP1 axis regulates papillary thyroid cancer progression[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(22): 23326-23336.
- [30] TU B, YAO J, FERRI-BORGOGNO S, et al. YAP1 oncogene is a context-specific driver for pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. JCI insight, 2019, 4(21): e130811.
- [31] OMORI H, NISHIO M, MASUDA M, et al. YAP1 is a potent driver of the onset and progression of oral squamous cell carcinoma[J]. Science Advances, 2020, 6(12): DOI: 10.1126/sciadv.aay3324.
- [32] LI C X, YE J S, ZHANG Z J, et al. Long non-coding RNA rbm5-as1 promotes the aggressive behaviors of oral squamous cell carcinoma by regulation of miR-1285-3p/YAP1 axis[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 123: 109723.
- [33] OMORI H, NISHIO M, MASUDA M, et al. YAP1 is a potent driver of the onset and progression of oral squamous cell carcinoma[J]. Sci Adv, 2020, 6(12): DOI: 10.1126/sciadv.aay3324.

(李科 编辑)

本文引用格式: 王怡, 陈袁伟. *lncRNA UCA1* 对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32(4): 1-8.

Cite this article as: WANG Y, CHEN Y W. The role of long non-coding RNA UCA1 in the proliferation and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cell[J]. China Journal of Modern Medicine, 2022, 32(04): 1-8.