DOI:10.16016/j.1000-5404.202005261

下调 HOXA-AS2/miR-20a 通路促进皮肤鳞癌细胞凋亡并抑制其侵袭迁移

许 文[1],刘绪宏[2],刘 华[3] 225003 江苏 扬州,武警江苏省总队医院:皮肤科[1],门诊部[2],特色专业一科[3]

[摘要] **目的** 研究下调长链非编码 RNA(lncRNA) HOXA-AS2/miR-20a 通路对皮肤鳞癌细胞凋亡和侵袭的影响。**方法** qRT-PCR 检测皮肤鳞癌组织中 HOXA-AS2 的表达变化。在皮肤鳞癌细胞 A431 中转染 HOXA-AS2 siRNA,MTT 测定细胞增殖,克隆形成实验测定细胞克隆形成能力,流式细胞仪测定细胞凋亡,Transwell 小室实验检测细胞迁移和侵袭,采用 Western blot 检测 MMP-2、MMP-9、C-Caspase-3 蛋白表达。生物信息学软件预测 HOXA-AS2 和 miR-20a 有互补结合位点,荧光素酶报告系统鉴定二者的靶向关系。qRT-PCR 检测皮肤鳞癌组织中 miR-20a 的表达变化。在皮肤鳞癌细胞 A431 中共转染 HOXA-AS2 siRNA、miR-20a inhibitor,检测细胞增殖、克隆、凋亡、迁移、侵袭能力的变化。**结果** HOXA-AS2 在皮肤鳞癌组织中的表达升高。转染 HOXA-AS2 siRNA 后的皮肤鳞癌细胞 A431 增殖、克隆、侵袭、迁移能力下降,细胞凋亡水平升高,MMP-2、MMP-9 蛋白表达减少,C-Caspase-3 蛋白表达增高。下调 HOXA-AS2 靶向促进 miR-20a 表达。miR-20a 在皮肤鳞癌组织中的表达与 HOXA-AS2 负相关。miR-20a inhibitor 可以逆转 HOXA-AS2 siRNA 对皮肤鳞癌细胞 A431 增殖、克隆、侵袭、迁移和凋亡作用。**结论** 下调 HOXA-AS2/miR-20a 通路降低皮肤鳞癌细胞增殖、克隆、侵袭、迁移能力,诱导细胞凋亡。

[关键词] 皮肤鳞癌;HOXA-AS2 ;细胞凋亡;肿瘤侵袭
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R739.5 [文献标志码] A

Down-regulating HOXA-AS2/miR-20a pathway promotes apoptosis and inhibits invasion and migration of skin squamous carcinoma cells

XU Wen[1], LIU Xuhong[2], LIU Hua[3] [1]Department of Dermatology, [2]Department of Outpatient, [3]First Department of Characteristic Specialities, Jiangsu Provincial General Hospital of Armed Police, Yangzhou, Jiangsu Province, 225003, China

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of down-regulation of long non-coding RNA (lncRNA) HOXA cluster antisense RNA 2 (HOXA-AS2)/miR-20a pathway on apoptosis and invasion of skin squamous cell carcinoma cells *in vitro*. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of HOXA-AS2 and miR-20a in 50 clinical specimens of skin squamous cell carcinoma and paired adjacent tissues. Skin squamous carcinoma cell line A431 was transfected with HOXA-AS2 siRNA, and the changes in cell proliferation, clonogenic ability, apoptosis, migration and invasion were evaluated by using MTT assay, clone formation experiment, flow cytometry, and Transwell assay respectively. Western blotting was performed to detect the expression of MMP-2, MMP-9, and cleaved caspase-3 proteins in the cells. Bioinformatics software predicted that HOXA-AS2 and miR-20a had complementary binding sites, and a luciferase reporter system was employed to verify their targeting relationship. A431 cells were co-transfected with HOXA-AS2 siRNA and miR-20a inhibitor, and the changes in cell proliferation, clone formation, apoptosis, migration and invasion were assessed. **Results** The expression level of HOXA-AS2 was increased in skin squamous cell carcinoma tissues. Transfection of A431 cells with HOXA-AS2 siRNA significantly suppressed the cell proliferation, clone formation, invasion and migration, promoted cell apoptosis, decreased the expression of MMP-2 and

[通信作者] 刘 华,E-mail:912962528@qq.com

MMP-9 proteins, and increased the expression of cleaved caspase-3 protein. Down-regulation of HOXA-AS2 significantly up-regulated miR-20a expression. The expression level of miR-20a in skin squamous cell carcinoma tissues was negatively correlated with that of HOXA-AS2. In A431 cells, miR-20a inhibitor obviously reversed the effects of HOXA-AS2 siRNA on proliferation, clone formation, invasion, migration and apoptosis of the cells. **Conclusion** Down-regulation of HOXA-AS2/miR-20a pathway can promote the expression of miR-20a, suppress the proliferation, clone formation, invasion and migration, and induce apoptosis of skin squamous cell carcinoma cells *in vitro*.

[**Key words**] skin squamous cell carcinoma; HOXA cluster antisense RNA 2; apoptosis; neoplasm invasion

Corresponding author: LIU Hua, E-mail:912962528@qq.com

皮肤鳞癌是一种常见的皮肤恶性肿瘤,主要起源于皮肤以及皮肤附属器,老年人好发,男性发病率高于女性,皮肤鳞癌的恶性程度较高,破坏范围更广,其可以沿着淋巴组织转移至邻近组织或全身[1]。研究显示:皮肤鳞癌的发生、发展可能与参与调控肿瘤细胞的生长、转移、凋亡的基因异常表达紧密相关,靶向基因治疗皮肤鳞癌已经成为目前的研究方向[2]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是在真核生物体内广泛表达的非编码 RNA,其在人体组织中的表达具有特异性、时序性等特点,lncRNA 参与胚胎发育、细胞分化、细胞稳态维持等生理过程[3]。lncRNA 在肿瘤中异常表达,其可以调控肿瘤的转移和恶性生长,lncRNA 可能是肿瘤治疗的有效靶点[4]。lncRNA HOXA-AS2 是近年来发现的与肿瘤进展有关的调控因子,已知其在胃癌、非小细胞肺癌等肿瘤中表达上调,并且下调其表达可以降低肿瘤细胞恶性程度[5-6]。前期的预实验发现 miR-20a 和 HOXA-AS2 有互补结合位点。既往研究显示:miR-20a 在皮肤鳞癌中低表达,并且上调 miR-20a 能够抑制皮肤鳞癌细胞生长和侵袭能力[7]。现阶段对于 HOXA-AS2 在皮肤鳞癌细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移中的作用还不明确。本实验以皮肤鳞癌细胞 A431 为研究对象,探讨 HOXA-AS2 对皮肤鳞癌细胞生长、凋亡、迁移能力的影响和机制,为寻找有效的分子标记物来治疗皮肤鳞癌提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2016 年 2 月至 2019 年 12 月在武警江苏总队医院手术切除的皮肤鳞癌组织和对应的癌旁正常组织各 50 例,组织采集经过患者和家属知情同意,组织标本保存在液氮中。HOXA-AS2 siRNA、HOXA-AS2 siRNA 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;MMP-2 抗体购自上海科顺生物科技有限公司;miR-20a inhibitor、inhibitor control、miR-20a mimics、mimics control 购自广州复能基因有限公司;MUT、WT 由上海伯易生物科技有限公司合成;MMP-9、C-Caspase-3 抗体购自上海歌凡生物科技有限公司;皮肤鳞癌细胞 A431 购自通派(上海)生物科技有限公司。

1.2 qRT-PCR 检测皮肤鳞癌组织中 HOXA-AS2、miR-20a 表达变化

用 TRIzol 试剂提取皮肤鳞癌组织以及对应的癌旁正常组织中的总 RNA,RNA 经过紫外分光光度计检测浓度和纯度以后,放在 -80 ℃ 的冰箱中保存。mRNA 检测的逆转录体系包括:2 μL 的 PrimeSLiPt mix、8 μL 的 RNA 提取液+DEPC 水。miRNA 检测的逆转录体系为:2 μL 的 5×*g* DNA Eraser Buffer、200 μg 的 RNA、1 μL 的 gDNA Eraser、1 μL 的 Primer Script RT Enzyme Mix Ⅰ、3 μL 的 miRNA RT primer、4 μL 的 5× PrimeScript Buffer,添加 DEPC 水至 20 μL。逆转录反应条件为:在 37 ℃孵育 15 min,85 ℃孵育 5 s,4 ℃保存。mRNA 检测的 PCR 反应体系包括:2 μL 的 cDNA、0.4 μL 的上下游引物、5 μL 的 SYBR Ⅱ、2.2 μL 的 DEPC 水。miRNA PCR 反应体系包括:1 μL 的 cDNA、0.4 μL 的上下游引物、5 μL 的 SYBR primer *Ex Taq*,添加 DEPC 水至 20 μL。PCR 反应条件为:放在 95 ℃孵育 5 min,95 ℃孵育 30 s,60 ℃孵育 1 min,72 ℃孵育 1 min,40 个循环。HOXA-AS2 以 GAPDH 作为内参,miR-20a 以 U6 作为内参,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达变化。

1.3 细胞分组

皮肤鳞癌细胞接种到 12 孔板内,细胞密度为 60% 时,用 Lipofectamine 2000 将 HOXA-AS2 siRNA 和 siRNA control 分别转染到细胞中,命名为 si-HOXA-AS2 和 si-NC 组,将未转染干预的皮肤鳞癌细胞作为 Control 组。细胞培养 24 h,采用 qRT-PCR 检测 HOXA-AS2、miR-20a 表达变化,步骤同 1.2。

1.4 MTT 检测细胞增殖

在 96 孔板中接种皮肤鳞癌细胞,每个孔中添加

100 μL 的细胞培养液(含有约 3 000 个细胞),按照 Control、si-NC、si-HOXA-AS2 组分组方法处理细胞,放在 37 ℃、5 % CO_2 培养箱中培养 24、48、72、96 h 以后,取出培养板,吸取 MTT 工作溶液添加到 96 孔板中,每孔 10 μL,于 37 ℃继续孵育 4 h。去上清,加入 DMSO 溶液 150 μL,孵育 10 min,置于酶标仪上(检测波长为 450 nm)测定每孔的光密度值 $D(450)$,以该值表示细胞增殖能力。

1.5 克隆形成实验检测细胞克隆

将 Control、si-NC、si-HOXA-AS2 组细胞接种到 10 cm 的细胞培养皿中,每个培养皿接种 1 000 个细胞,放在 37 ℃、5 % CO_2 培养箱中培养 21 d。取出细胞培养皿,用 4 %的多聚甲醛固定 15 min 以后,用吉姆萨染色液染色,放在显微镜下观察细胞克隆形成数目(细胞数目>50 个的克隆团)。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集培养 24 h 以后的 Control、si-NC、si-HOXA-AS2 组细胞,将细胞悬浮在 PBS 溶液中,调整细胞浓度为每毫升含 10^6 个细胞。吸取细胞培养液 1 mL,1 000×g 离心 10 min,去上清,加入 Binding Buffer 400 μL,充分混合,分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液各 5 μL,加入到悬浮细胞溶液中,放在避光条件下孵育 15 min。采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡。

1.7 Transwell 小室实验检测细胞侵袭和迁移

侵袭实验步骤:吸取 5 mg/mL 的 Matergel 添加到 Transwell 小室的上室中,在室温条件下风干 1 h。取 Control、si-NC、si-HOXA-AS2 组细胞,采用无血清的细胞培养液重悬细胞浓度为 1×10^5/mL,吸取 200 μL 添加到上室中,然后在下室中添加 500 μL 的含血清的细胞培养液,放在 37 ℃、5 % CO_2 培养箱中培养 24 h。PBS 洗涤小室,甲醛固定,0.1%的结晶紫染色,镜下记录细胞侵袭数目即细胞穿膜数目。细胞迁移实验同侵袭实验,无 Matergel 包被步骤。

1.8 Western blot 检测 MMP-2、MMP-9、C-Caspase-3 蛋白表达

收集培养 24 h 以后的 Control、si-NC、si-HOXA-AS2 组细胞,添加 RIPA 裂解液,冰浴 20 min。12 000×g、4 ℃离心 10 min,收集上清即为细胞总蛋白。以 BCA 方法检测蛋白浓度。在蛋白中添加 5×Loading Buffer 混合煮沸反应 5 min。常规方法制备 5%的浓缩胶和 10%的分离胶,60 V 恒压在浓缩胶中电泳,80 V 恒压在分离胶中电泳。将 NC 膜裁剪成合适大小,浸泡在转移缓冲液中 10 min。以 400 mA 恒流转膜 1 h。将 NC 膜放在封闭液(5%牛血清白蛋白)中,在室温条件下孵育 2 h,再将 NC 膜放在一抗稀释液中,在 4 ℃环境中结合过夜,最后把 NC 膜置于二抗稀释液中,室温结合 2 h。滴加 ECL 显色试剂,静置 1 min。用 Image J 分析条带的光密度值,GAPDH 作为内参,分析目的蛋白表达变化。

1.9 HOXA-AS2 靶基因预测和鉴定

用生物信息学软件 starbase(http://starbase.sysu.edu.cn/starbase2/)分析 HOXA-AS2 靶基因,HOXA-AS2 与 miR-20a 有互补结合位点,用荧光素酶报告系统鉴定二者的靶向关系。把 MUT、WT 分别与 miR-20a mimics、mimics control 共转染至皮肤鳞癌细胞,转染 24 h,严格按照试剂盒的要求检测荧光素酶活性。MUT、WT 分别为含有突变以后的 HOXA-AS2 结合位点、含没有突变的 HOXA-AS2 结合位点的荧光素酶报告载体。

1.10 miR-20a inhibitor 对 HOXA-AS2 siRNA 影响皮肤鳞癌细胞增殖、克隆、凋亡、侵袭、迁移的作用检测

在皮肤鳞癌细胞中分别将 HOXA-AS2 siRNA、inhibitor control 和 HOXA-AS2 siRNA、miR-20a inhibitor 共转染,命名为 si-HOXA-AS2+anti-NC 和 si-HOXA-AS2 +anti-miR-20a 组,利用 MTT 方法检测细胞增殖(步骤同 1.4),克隆形成实验检测细胞克隆能力(步骤同 1.5),流式细胞仪检测细胞凋亡(步骤同 1.6),Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移(步骤同 1.7),Western blot 检测 MMP-2、MMP-9、C-Caspase-3 蛋白表达(步骤同 1.8)。

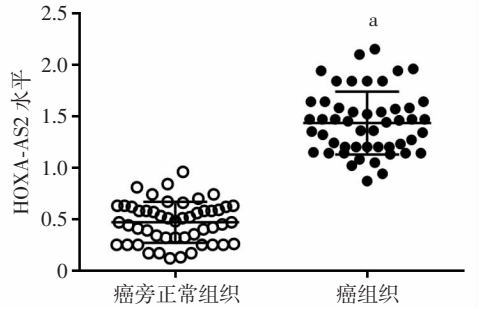
1.11 统计学分析

利用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组数据间比较用独立样本 t 检验,多组数据比较用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HOXA-AS2 在皮肤鳞癌组织中的表达上调

皮肤鳞癌组织中 HOXA-AS2 表达高于癌旁正常组织($P<0.05$,图 1)。HOXA-AS2 在皮肤鳞癌组织中表达上调。



a: $P<0.05$,与癌旁正常组织比较

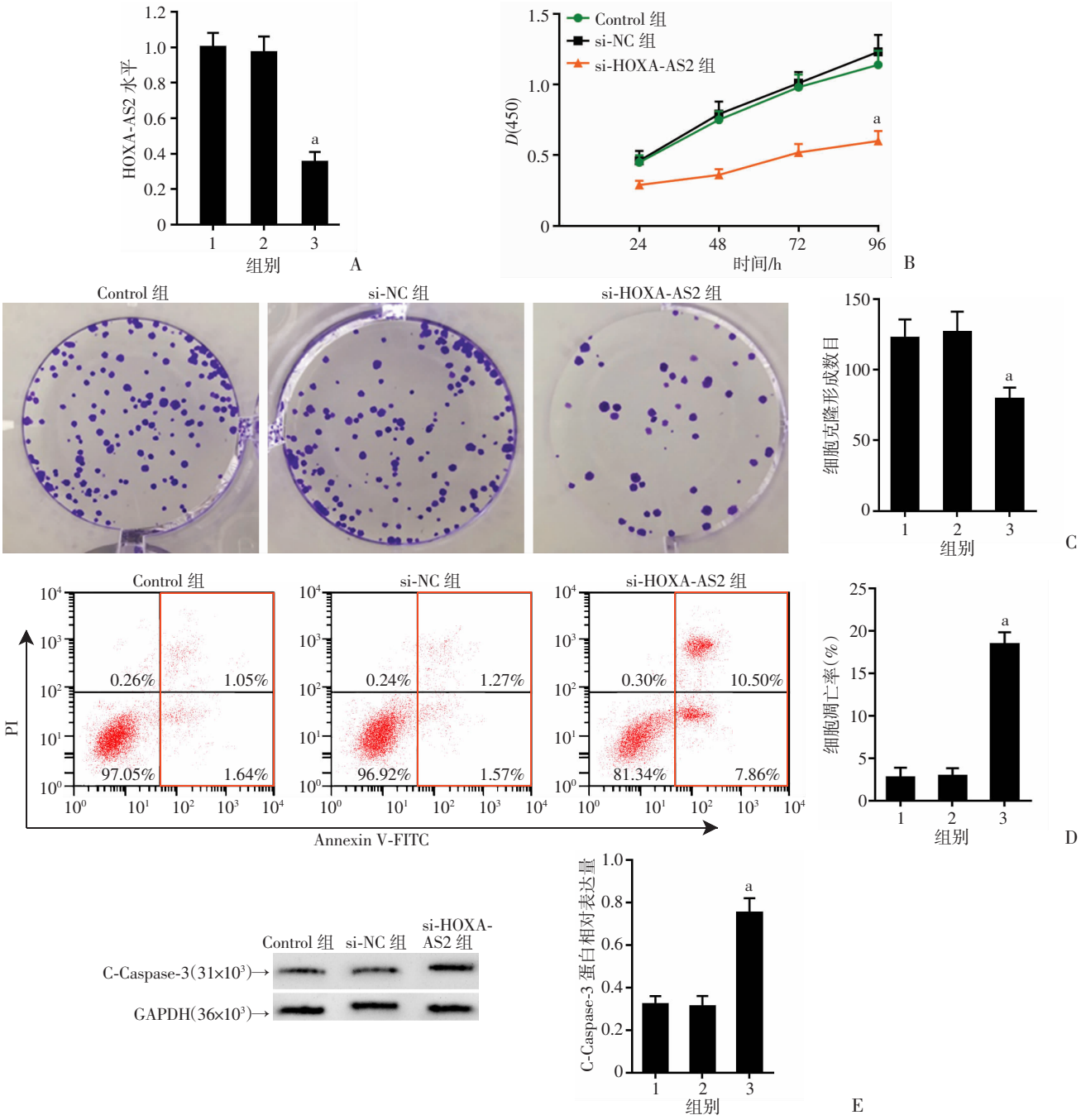
图 1 qRT-PCR 检测皮肤鳞癌组织中 HOXA-AS2 的表达

2.2　HOXA-AS2 siRNA 对皮肤鳞癌细胞增殖、克隆和凋亡的影响

与 si-NC 组比较,si-HOXA-AS2 组皮肤鳞癌细胞中 HOXA-AS2 表达下降,细胞增殖能力降低,细胞克隆形成数目减少,凋亡率升高,C-Caspase-3 蛋白表达增多($P<0.05$,图 2)。结果表明:HOXA-AS2 siRNA 下调皮肤鳞癌细胞中 HOXA-AS2 表达,降低细胞增殖、克隆能力,诱导细胞凋亡。

2.3　HOXA-AS2 siRNA 对皮肤鳞癌细胞侵袭和迁移的影响

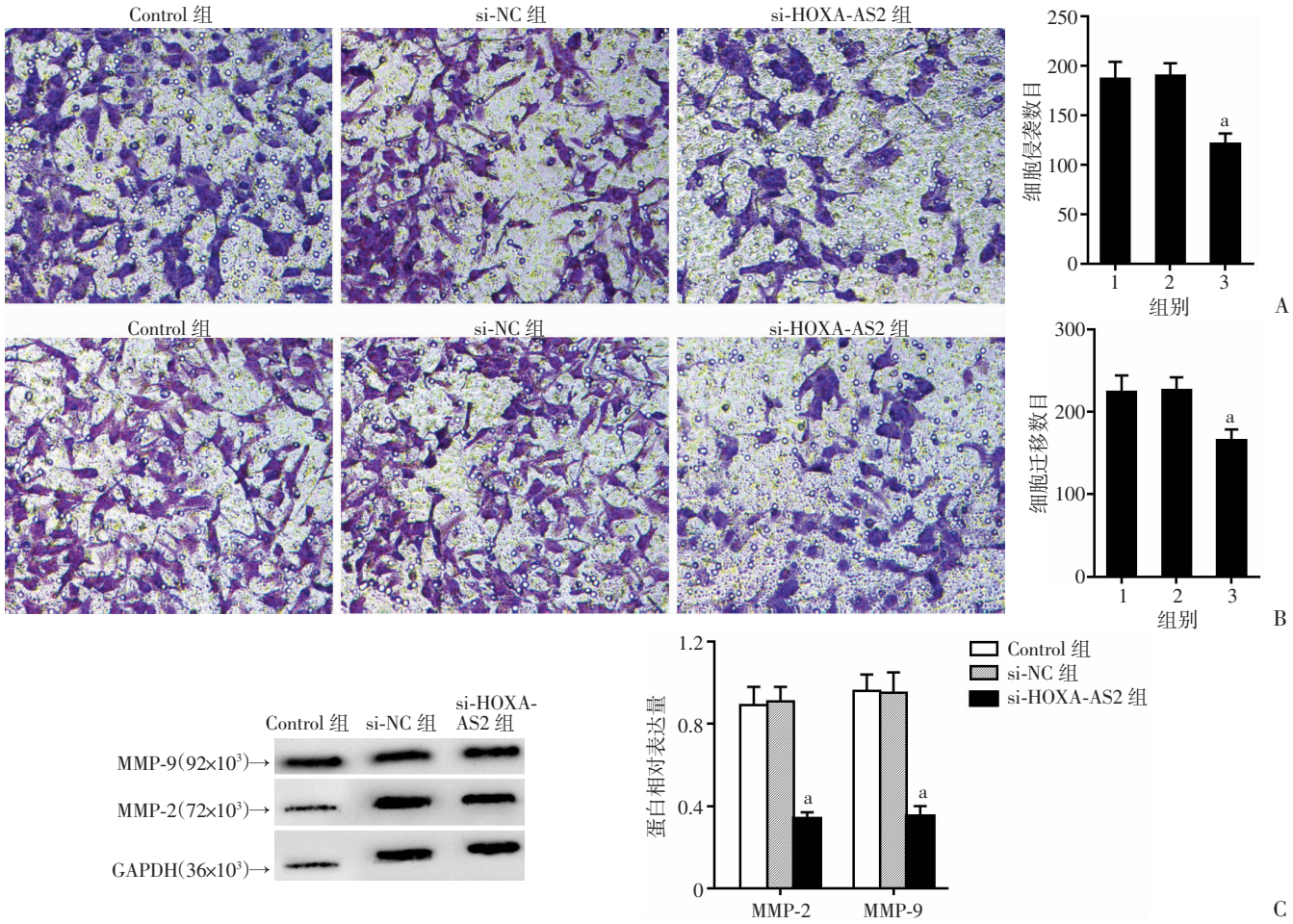
与 si-NC 组比较,si-HOXA-AS2 组皮肤鳞癌细胞侵袭数目和迁移数目减少,MMP-2、MMP-9 蛋白表达减少($P<0.05$,图 3)。结果表明:HOXA-AS2 siRNA 抑制皮肤鳞癌细胞侵袭和迁移。



1:Control 组;2:si-NC 组;3:si-HOXA-AS2 组;a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

A:qRT-PCR 检测 HOXA-AS2 表达;B:MTT 检测细胞增殖能力;C:克隆形成实验检测细胞克隆形成数目;D:流式细胞仪检测细胞凋亡;E:Western blot 检测 C-Caspase-3 蛋白表达

图 2　HOXA-AS2 siRNA 对皮肤鳞癌细胞增殖、克隆、凋亡和 C-Caspase-3 蛋白表达影响



1:Control 组;2:si-NC 组; 3: si-HOXA-AS2 组;a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

A:Transwell 小室实验检测细胞侵袭(×200);B:Transwell 小室实验检测细胞迁移(×200);C:Western blot 检测 MMP-2、MMP-9 蛋白表达

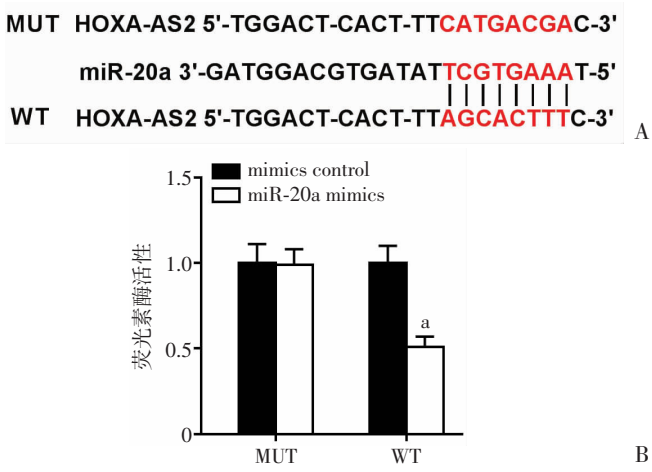
图 3 HOXA-AS2 siRNA 对皮肤鳞癌细胞侵袭、迁移和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

2.4 HOXA-AS2 和 miR-20a 互为靶向关系

生物信息学软件预测 HOXA-AS2 和 miR-20a 有互补结合位点,并且 WT 和 miR-20a mimics 共转染后的细胞荧光素酶活性降低($P<0.05$,图 4)。结果表明:HOXA-AS2 和 miR-20a 互为靶向关系。

2.5 HOXA-AS2 siRNA 对皮肤鳞癌细胞中 miR-20a 表达的影响

皮肤鳞癌组织中 miR-20a 表达低于正常组织($P<0.05$,图 5A);皮肤鳞癌组织中 miR-20a 表达与 HOXA-AS2 负相关(图 5B);与 si-NC 组比较,si-HOXA-AS2 组皮肤鳞癌细胞中 miR-20a 表达升高($P<0.05$,图 5C)。结果表明:皮肤鳞癌组织中 miR-20a 和 HOXA-AS2 负相关,HOXA-AS2 siRNA 促进皮肤鳞癌细胞中 miR-20a 表达。

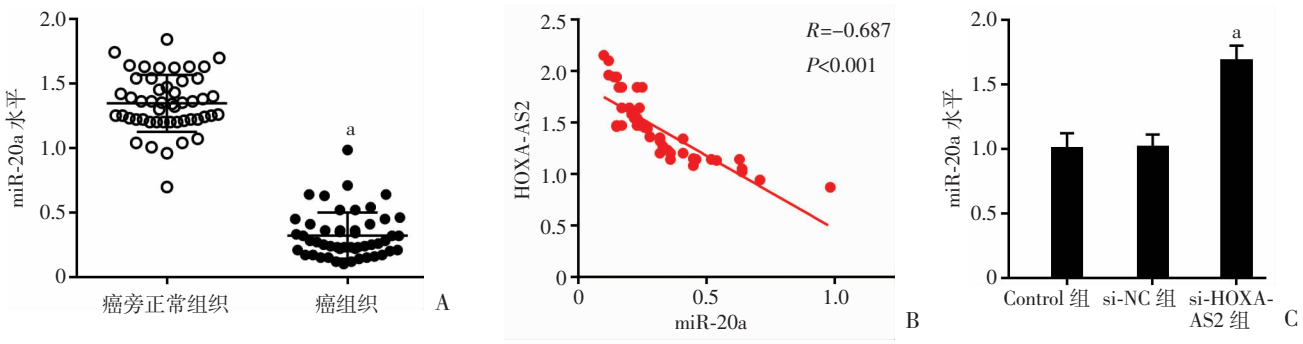


A:生物信息学软件预测 HOXA-AS2 和 miR-20a 结合位点;B:荧光素酶报告系统鉴定二者的靶向关系 a:$P<0.05$,与 mimics control 比较

图 4 HOXA-AS2 和 miR-20a 互为靶向关系

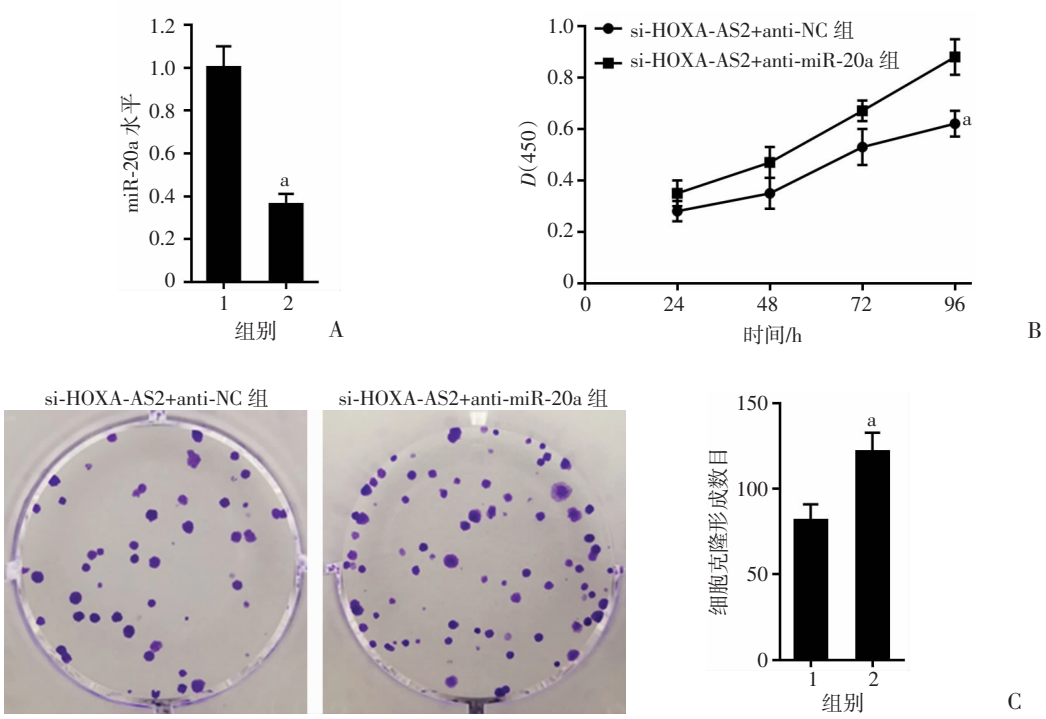
2.6　miR-20a inhibitor 对 HOXA-AS2 siRNA 影响皮肤鳞癌细胞增殖、克隆、凋亡、侵袭、迁移的作用

与 si-HOXA-AS2+anti-NC 组比较,si-HOXA-AS2+anti-miR-20a 组皮肤鳞癌细胞中 miR-20a 表达降低,细胞增殖能力、克隆形成数目升高,凋亡率降低,细胞中 C-Caspase-3 蛋白表达减少,细胞侵袭数目、迁移数目增加,细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达升高($P<0.05$,图 6、7)。结果表明:miR-20a inhibitor 逆转 HOXA-AS2 siRNA 对皮肤鳞癌细胞增殖、克隆、侵袭、迁移抑制作用和凋亡促进作用。



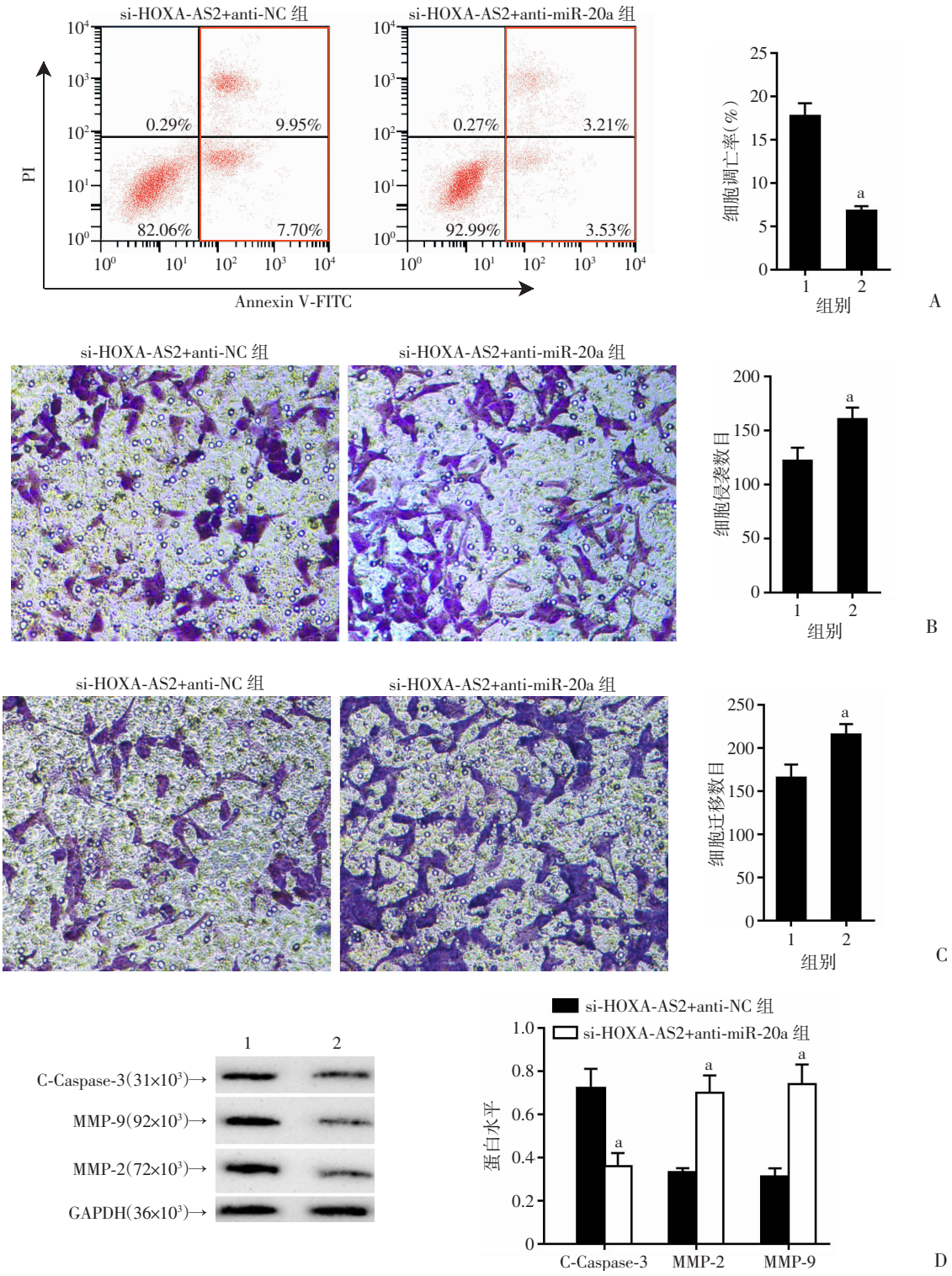
A:qRT-PCR 检测皮肤鳞癌组织中 miR-20a 的表达　a:$P<0.05$,与癌旁正常组织比较;B:皮肤鳞癌组织中 miR-20a 与 HOXA-AS2 表达的相关性分析;C:下调 HOXA-AS2 后,皮肤鳞癌细胞中 miR-20a 的表达　a:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

图 5　皮肤鳞癌组织中 miR-20a 表达变化及下调 HOXA-AS2 对皮肤鳞癌细胞中 miR-20a 表达的影响



1:si-HOXA-AS2+anti-NC 组;2:si-HOXA-AS2+anti-miR-20a 组;a:$P<0.05$,与 si-HOXA-AS2+anti-NC 组比较
A:qRT-PCR 检测细胞中 miR-20a 表达;B:MTT 检测两组细胞增殖能力;C:克隆形成实验检测细胞克隆形成数目

图 6　HOXA-AS2 siRNA 和 miR-20a inhibitor 共转染后皮肤鳞癌细胞增殖和克隆能力变化



1:si-HOXA-AS2+anti-NC 组;2:si-HOXA-AS2+anti-miR-20a 组;a:$P<0.05$,与 si-HOXA-AS2+anti-NC 组比较

A:流式细胞仪检测细胞凋亡;B:Transwell 小室实验检测细胞侵袭(×200);C:Transwell 小室实验检测细胞迁移(×200);D:Western blot 检测细胞中 MMP-2、MMP-9、C-Caspase-3 蛋白表达

图 7 HOXA-AS2 siRNA 和 miR-20a inhibitor 共转染后皮肤鳞癌细胞凋亡、侵袭、迁移和细胞中 MMP-2、MMP-9、C-Caspase-3 蛋白表达

3 讨论

lncRNA 是一类长度大于 200 nt 的非编码 RNA,在人体组织中均有表达[8]。绝大多数的 lncRNA 没有编码蛋白质的功能,但其可以通过复杂的调控网络,影响下游基因表达,参与如细胞凋亡、细胞衰老、细胞分化等多种生理病理过程[9]。lncRNA 还与人类多种疾病如胃炎、糖尿病、阿尔茨海默病等有关,lncRNA 可能是疾病治疗的分子靶点[10]。HOXA-AS2 是近年来研究发现的与肿瘤发生和转移关系密切的 lncRNA,其在肿瘤组织中表达改变,参与肿瘤细胞的生长、转移等过程[11]。在非小细胞肺癌中发现 HOXA-AS2 高表达,并且 HOXA-AS2 具有促进肺癌进展和转移的作用[5]。下调 HOXA-AS2 降低甲状腺乳头状癌细胞侵袭和迁移能力[12]。本研究结果显示:HOXA-AS2 在皮肤鳞癌组织中表达上调,并且下调 HOXA-AS2 可以降低皮肤鳞癌细胞增殖、克隆、侵袭、迁移能力,诱导细胞凋亡,HOXA-AS2 在皮肤鳞癌进展中可能发挥类似癌基因的作用,这与以前的研究报道相符合,均说明 HOXA-AS2 在肿瘤中发挥促进作用。

细胞凋亡是机体内多种因素共同作用的结果,受细胞内多种基因共同调控。Caspase 是一个与细胞凋亡关系密切的蛋白家族,其含有多个蛋白成员,这些蛋白成员在正常情况下多以没有活性的形式存在,当受到细胞凋亡信号刺激以后,细胞内的 Caspase 蛋白成员被激活,共同诱导细胞凋亡发生[13]。Caspase-3 是 Caspase 凋亡级联反应中的下游因子,在细胞凋亡过程中发挥凋亡执行的作用,其活化后被认为是细胞凋亡的不可逆标志[14-15]。肿瘤细胞转移与细胞外基质降解相关,肿瘤细胞合成的细胞外基质降解酶可促进细胞的侵袭和迁移[16]。基质金属蛋白酶家族具有分解细胞外基质的功能[17],MMP-2、MMP-9 是目前发现的与肿瘤转移关系最密切的基质金属蛋白酶家族成员,表达升高后可以诱导肿瘤转移[18-19]。本研究结果表明:下调 HOXA-AS2 后的皮肤鳞癌细胞中 C-Caspase-3 蛋白表达升高,MMP-2、MMP-9 蛋白表达下降,提示下调 HOXA-AS2 诱导皮肤鳞癌细胞凋亡,抑制细胞侵袭和迁移,这与细胞凋亡、迁移、侵袭检测结果一致。

lncRNA 的功能多样与其复杂的调控机制有关,其可以通过与 miRNA 结合影响 miRNA 的表达,发挥生物学作用[20-21]。本研究结果表明:HOXA-AS2 与 miR-20a 互为靶向关系,并且皮肤鳞癌组织中 HOXA-AS2、miR-20a 负相关,这可能提示 HOXA-AS2 作用机制与 miR-20a 有关。miR-20a 是一个与肿瘤有关的调控子,miR-20a 在乳腺癌中低表达,并且其可以通过靶向负调控高迁移率族蛋白 A2(high mobility group A2,HMGA2)的表达抑制乳腺癌细胞侵袭和迁移,诱导细胞凋亡[22]。子宫内膜癌中 miR-20a 低表达,miR-20a 通过靶向抑制信号转录和激活因子 3(signal transducer and activators of transcription 3, STAT3)表达降低子宫内膜癌细胞转移能力[23]。在皮肤鳞癌中的研究表明:miR-20a 可以抑制皮肤鳞癌细胞的生长、侵袭等恶性生物学行为,机制与 miR-20a 靶向下调 LIM 激酶 1(LIM kinase 1,LIMK1)表达有关,miR-20a 在皮肤鳞癌进展中发挥抑制作用[7]。本研究结果显示:下调 miR-20a 可以逆转下调 HOXA-AS2 对皮肤鳞癌细胞增殖、克隆、侵袭、迁移和凋亡的作用,这证实 HOXA-AS2 作用机制与 miR-20a 有关。

综上所述,HOXA-AS2 在皮肤鳞癌发生和转移中可能发挥类似癌基因的作用,下调其表达可以降低皮肤鳞癌细胞生长、迁移、侵袭能力,诱导细胞凋亡,作用机制与靶向促进 miR-20a 的表达有关。本研究结果为靶向基因治疗皮肤鳞癌提供了新思路,为研究皮肤鳞癌分子发生机制提供了研究数据。本研究没有分析皮肤鳞癌患者临床病理特征与 HOXA-AS2 表达的关系,没有在体内以及多株皮肤鳞癌细胞中进行验证,在以后的实验中将对上述问题进行深入探讨。

参考文献:

[1] BANDER T S, NEHAL K S, LEE E H. Cutaneous squamous cell carcinoma: updates in staging and management[J]. Dermatol Clin, 2019, 37(3): 241-251. DOI: 10.1016/j.det.2019.03.009.

[2] HU G L, LIANG L L, LIU Y L, *et al*. TWEAK/Fn14 interaction confers aggressive properties to cutaneous squamous cell carcinoma[J]. J Investig Dermatol, 2019, 139(4): 796-806. DOI: 10.1016/j.jid.2018.09.035.

[3] CAI C B, YANG L, TANG Y L, *et al*. Prediction of overall survival in gastric cancer using a nine-lncRNA[J]. DNA Cell Biol, 2019, 38(9): 1005-1012. DOI: 10.1089/dna.2019.4832.

[4] WANG D, WAN X C, ZHANG Y L, *et al*. A novel androgen-reduced prostate-specific lncRNA, PSLNR, inhibits prostate-cancer progression in part by regulating the p53-dependent pathway[J]. Prostate, 2019, 79(12): 1362-1377. DOI: 10.1002/pros.23840.

[5] CUI T J, LIN G S, DAI Y M, *et al*. LncRNA HOXA-AS2 regulates microRNA-216a-5p to promote malignant progression of non-small cell lung cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 264-273. DOI: 10.26355/eurrev_201908_18656.

[6] XIE M, SUN M, ZHU Y N, *et al*. Long noncoding RNA

HOXA-AS2 promotes gastric cancer proliferation by epigenetically silencing P21/PLK3/DDIT3 expression[J]. Oncotarget, 2015, 6(32): 33587-33601. DOI: 10.18632/oncotarget.5599.

[7] ZHOU J D, LIU R, LUO C Q, *et al*. MiR-20a inhibits cutaneous squamous cell carcinoma metastasis and proliferation by directly targeting LIMK1[J]. Cancer Biol Ther, 2014, 15(10): 1340-1349. DOI: 10.4161/cbt.29821.

[8] YANG Q, WAN Q, ZHANG L T, *et al*. Analysis of LncRNA expression in cell differentiation[J]. RNA Biol, 2018, 15(3): 413-422. DOI: 10.1080/15476286.2018.1441665.

[9] WANG J, WANG Z P, YAO W, *et al*. The association between lncRNA LINC01296 and the clinical characteristics in neuroblastoma[J]. J Pediatr Surg, 2019, 54(12): 2589-2594. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2019.08.032.

[10] SCHMITZ S U, GROTE P, HERRMANN B G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(13): 2491-2509. DOI: 10.1007/s00018-016-2174-5.

[11] DONG X Y, FANG Z G, YU M X, *et al*. Knockdown of long noncoding RNA HOXA-AS2 suppresses chemoresistance of acute myeloid leukemia *via* the miR-520c-3p/S100A4 axis[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(2): 886-896. DOI: 10.1159/000495387.

[12] XIA F D, CHEN Y, JIANG B, *et al*. Long noncoding RNA HOXA-AS2 promotes papillary thyroid cancer progression by regulating miR-520c-3p/S100A4 pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(5): 1659-1672. DOI: 10.1159/000494786.

[13] YAO Q, WANG W M, JIN J, *et al*. Synergistic role of Caspase-8 and Caspase-3 expressions: prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer[J]. Cancer Biomark, 2018, 21(4): 899-908. DOI: 10.3233/CBM-170967.

[14] YANG J, MENG X L, YU Y, *et al*. LncRNA POU3F3 promotes proliferation and inhibits apoptosis of cancer cells in triple-negative breast cancer by inactivating caspase 9[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019, 83(6): 1117-1123. DOI: 10.1080/09168451.2019.1588097.

[15] BOUDREAU M W, PEH J, HERGENROTHER P J. Procaspase-3 overexpression in cancer: a paradoxical observation with therapeutic potential[J]. ACS Chem Biol, 2019, 14(11): 2335-2348. DOI: 10.1021/acschembio.9b00338.

[16] JELENIEWICZ W, CYBULSKI M, NOWAKOWSKI A, *et al*. MMP-2 mRNA expression in ovarian cancer tissues predicts patients' response to platinum-taxane chemotherapy[J]. Anticancer Res, 2019, 39(4): 1821-1827. DOI: 10.21873/anticanres.13289.

[17] BAKAR F, KILIC-KURT Z, CAGLAYAN M G, *et al*. The effects of 1, 3, 5-trisubstitutedindole derivatives on cell growth, apoptosis and MMP-2/9 mRNA expression of MCF-7 human breast cancer cells[J]. Anti-Cancer Agents Med Chem, 2017, 17(5): 762-767.

[18] HUNG C Y, LEE C H, CHIOU H L, *et al*. Praeruptorin-B inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell invasion by targeting AKT/NF-κB *via* matrix metalloproteinase-2/-9 expression in human cervical cancer cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2019, 52(6): 1255-1266. DOI: 10.33594/000000088.

[19] LOU C H, ZHU Z H, ZHAO Y P, *et al*. Arctigenin, a lignan from Arctium lappa L., inhibits metastasis of human breast cancer cells through the downregulation of MMP-2/-9 and heparanase in MDA-MB-231 cells[J]. Oncol Rep, 2017, 37(1): 179-184. DOI: 10.3892/or.2016.5269.

[20] HUANG Y. The novel regulatory role of lncRNA-miRNA-mRNA axis in cardiovascular diseases[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(12): 5768-5775. DOI: 10.1111/jcmm.13866.

[21] QIAN Y, MAO Z D, SHI Y J, *et al*. Comprehensive analysis of miRNA-mRNA-lncRNA networks in non-smoking and smoking patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(3): 1140-1153. DOI: 10.1159/000494541.

[22] ZHAO W Y, GENG D H, LI S Q, *et al*. LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis *via* the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer[J]. Cancer Med, 2018, 7(3): 842-855. DOI: 10.1002/cam4.1353.

[23] HUANG Y, YANG N. MicroRNA-20a-5p inhibits epithelial tomesenchymal transition and invasion of endometrial cancer cells by targeting STAT3[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(12): 5715-5724.

(收稿:2020-05-28;修回:2020-08-12)

(编辑 邓强庭)