DOI:10.16016/j.2097-0927.202202015

生物钟基因 PER1 调控口腔鳞癌细胞中 BAX、BCL2 和 PCNA 表达的昼夜节律

尹仕琳,张志伟,唐 洪,杨 凯 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科

[摘要] **目的** 探讨生物钟基因 PER1 对口腔鳞癌细胞(oral squamous cell carcinoma,OSCC)的增殖和凋亡及细胞内 BAX、BCL2 和 PCNA 表达昼夜节律的调控作用。**方法** 建立稳转过表达 PER1 的口腔鳞癌 SCC15 细胞(OE-PER1-SCC15)和不含 PER1 基因序列慢病毒感染的阴性对照 SCC15 细胞(NC-SCC15);建立稳转沉默 PER1 的口腔鳞癌 TSCCA 细胞(RNAi-PER1-TSCCA)和不含 PER1 片段的 scramble 质粒慢病毒感染的阴性对照 TSCCA 细胞(Scramble-TSCCA)。通过流式细胞术、RT-qPCR 和 Western blot 检测各组细胞中细胞增殖指数、凋亡指数及细胞内 PER1、BAX、BCL2 和 PCNA 在 24 h 内 6 个不同时间点的表达。对数据进行方差分析和余弦分析,以中值、振幅和峰值相位为指标分析各基因表达的昼夜节律特征。**结果** 在 OE-PER1-SCC15 和 NC-SCC15 中,细胞增殖指数和凋亡指数及细胞内 PER1、BAX、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白的表达具有昼夜节律性($P<0.05$)。与 NC-SCC15 细胞相比,OE-PER1-SCC15 细胞凋亡指数、PER1 和 BAX mRNA 和蛋白表达的中值显著升高,而细胞增殖指数、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白表达的中值显著降低($P<0.05$);细胞凋亡指数和 BAX mRNA 表达的振幅显著升高,而 BCL2 和 PCNA mRNA 表达的振幅显著降低($P<0.05$);细胞凋亡指数、PER1 和 BAX mRNA 和蛋白表达的峰值相位前移,而细胞增殖指数、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白表达的峰值相位后移。与 Scramble-TSCCA 细胞相比,RNAi-PER1-TSCCA 细胞中 BAX 蛋白的表达发生昼夜节律紊乱,但细胞增殖指数、凋亡指数及细胞内 PER1、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白以及 BAX mRNA 的表达具有昼夜节律($P<0.05$),其昼夜节律特征与 OE-PER1-SCC15 细胞相反。**结论** PER1 表达改变后导致其自身的昼夜节律特征发生改变,同时调控口腔鳞癌细胞增殖和凋亡及 BAX、BCL2 和 PCNA 表达的昼夜节律特征发生改变。

[关键词] PER1 基因;昼夜节律;口腔鳞癌;细胞增殖;细胞凋亡
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R739.85 [文献标志码] A

Biological clock gene PER1 regulates circadian rhythms of BAX, BCL2 and PCNA expression in oral squamous carcinoma cells

YIN Shilin, ZHANG Zhiwei, TANG Hong, YANG Kai Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the regulative role of biological clock gene PER1 in the circadian rhythms of proliferation, apoptosis and expression of intracellular BAX, BCL2 and PCNA in oral squamous carcinoma cells (OSCC). **Methods** The SCC15 cells stably overexpressing PER1 gene (OE-PER1-SCC15) and negative control SCC15 cells (NC-SCC15) infected with lentiviral virus without PER1 sequence were established. The TSCCA cells with stable PER1 knockdown (RNAi-PER1-TSCCA) and the negative control TSCCA cells (Scramble-TSCCA) of scramble plasmid lentivirus infection without PER1 fragment were also constructed. The cell proliferation index, apoptosis index and the expression of intracellular PER1, BAX, BCL2 and PCNA at 6 different time points within 24 h were detected in each group by flow cytometry, RT-

[基金项目] 重庆英才·创新创业领军人才项目(cstc2022ycjh-bgzxm0064);重庆市自然科学基金一般项目(cstc2018jcyjAX0208)
[通信作者] 杨 凯,E-mail:cqfyyk@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

qPCR and Western blotting, respectively. The data were subjected to ANOVA and cosine analysis, and the mesor, amplitude and acrophase were used as indicators to analyze the circadian rhythm characteristics of each gene expression. **Results** In OE-PER1-SCC15 and NC-SCC15 cells, the cell proliferation index, apoptosis index, and the mRNA and protein levels of PER1, BAX, BCL2 and PCNA showed circadian rhythms ($P<0.05$). As compared with the NC-SCC15 cells, the OE-PER1-SCC15 cells had significantly increased mesors of apoptosis index and mRNA and protein levels of PER1 and BAX, while decreased mesors of proliferation index and mRNA and protein levels of BCL2 and PCNA ($P<0.05$). The amplitudes of apoptosis index and BAX mRNA level were remarkably elevated, while those of BCL2 and PCNA mRNA levels were reduced in OE-PER1-SCC15 cells ($P<0.05$). In addition, the acrophases of apoptosis index, and PER1 and BAX mRNA and protein levels were notably advanced, which were delayed in proliferation index, mRNA and protein levels of BCL2 and PCNA. When compared with the Scramble-TSCCA cells, the circadian rhythm of BAX protein expression was disturbed in the RNAi-PER1-TSCCA cells, but the cell proliferation index, apoptosis index and the mRNA and protein levels of PER1, BCL2 and PCNA, as well as mRNA level of BAX presented circadian rhythms ($P<0.05$), whose characteristics were opposite to those of OE-PER1-SCC15 cells. **Conclusion** The changes in PER1 expression lead to the alteration in both its own circadian rhythm characteristics, and the circadian rhythm characteristics of proliferation, apoptosis, and BAX, BCL2, and PCNA expression in OSCC cells.

[**Key words**] PER1; circadian rhythm; oral squamous cell carcinoma; cell proliferation; cell apoptosis

Supported by the Chongqing Talents Innovation Leading Talents Project (cstc2022ycjh-bgzxm0064) and the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2018jcyjAX0208). Corresponding author: YANG Kai, E-mail: cqfyyk@aliyun.com

口腔癌为常见的头颈部恶性肿瘤,约90%为鳞状细胞癌[1]。虽然目前包括手术、放疗和化疗等各种治疗手段取得了很大进步,但由于口腔鳞癌发病机制不清,近30年来患者的5年生存率仍未得到明显提高[2-3]。研究证明,人体生理活动表现出约以24 h为周期的节律性振荡,称为昼夜节律[4-5]。昼夜节律是由细胞内一系列生物钟基因在转录-翻译水平上构成复杂的正负反馈环路而形成[4-5],揭示生物体内细胞的生理活动和相关基因表达是呈24 h为周期的节律性振荡,而不是每天保持在一个固定的水平[6-7]。中值、振幅和峰值相位是反映24 h昼夜节律振荡特征的3个维度[8]。昼夜节律通过以上3个维度协调细胞内众多复杂的生理过程和基因表达在时间和空间上保持协同有序,对于维持细胞生理稳态至关重要[9-10]。昼夜节律异常改变或紊乱与多种癌症的发生发展密切相关[6-7],深入研究昼夜节律可能为治疗癌症提供新的思路和方法。

细胞增殖和凋亡平衡的失调是癌症发生的根本原因[11]。PCNA是促细胞增殖基因,BAX和BCL2分别为促凋亡基因和抑凋亡基因,其异常改变导致细胞增殖和凋亡平衡失调,与癌症的发生发展密切相关[11]。目前发现在多种细胞中PCNA、BAX和BCL2的表达具有昼夜节律[12-13],但其调控机制不清楚。PER1是重要的核心生物钟基因[5],我们前期研究发现,PER1在口腔鳞癌中表达降低,与患者临床分期和生存时间显著相关,具有重要的抑癌作用[14],并且其表达具有昼夜节律性[15]。在此基础上,本研究通过建立沉默或过表达PER1的口腔鳞癌细胞,探索口腔鳞癌细胞内PER1表达改变后其自身昼夜节律表达特征改变情况,以及对口腔鳞癌细胞增殖、凋亡和细胞中PCNA、BAX和BCL2表达的昼夜节律的调控作用,希望为基于昼夜节律发展治疗口腔鳞癌的新策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人口腔鳞癌细胞系TSCCA和SCC15购自上海中桥新舟生物科技有限公司,PER1过表达慢病毒和PER1-shRNA干扰慢病毒购自上海吉凯基因化学公司;RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司;RIPA裂解液购自中国碧云天公司,PER1抗体购自美国GeneTex公司,BAX和BCL2抗体购自美国Proteintech公司,PCNA和β-actin抗体购自美国CST公司;梯度PCR仪购自美国Bio-Rad公司,ECL-Advance蛋白质印迹检测系统购自美国Bio-Rad公司,流式细胞仪购自美国FACSVantage公司。

1.2 PER1过表达和沉默载体的构建与转染

用过表达PER1的慢病毒感染SCC15细胞,构建稳

转过表达 PER1 的 SCC15 细胞(OE-PER1-SCC15 细胞),用不含 PER1 基因序列的慢病毒感染 SCC15 细胞作为阴性对照(NC-SCC15 细胞)。用 PER1-shRNA 慢病毒感染 TSCCA 细胞,构建稳转沉默 PER1 的 TSCCA 细胞(RNAi-PER1-TSCCA 细胞),以不含 PER1 片段的 scramble 质粒慢病毒感染 TSCCA 细胞作为阴性对照(scramble-TSCCA 细胞)。详细方法见我们前期报道[16]。

1.3 细胞培养和细胞昼夜节律同步化

实验前先行细胞昼夜节律同步化处理。将生长状态良好的各组细胞(OE-PER1-SCC15、NC-SCC15、RNAi-PER1-TSCCA 和 Scramble-TSCCA)接种于含完全培养液的培养皿内,当细胞生长达 60%左右时,将完全培养液替换成不含血清含有终浓度为 1 μmol/L 地塞米松培养液,置于细胞培养箱孵育 2 h 后替换为完全培养基,把这一时间点设置为授时时间 0 点(zeitgeber time 0,ZT 0),继续培养,每隔 4 h 设置 ZT 4、ZT 8、ZT 12、ZT 16、ZT 20、ZT 24 这 6 个不同时间点,收集细胞,提取 RNA 和蛋白质。其中 ZT 0~ZT 12 代表主观白天,ZT 12~ZT 24 代表主观夜晚。

1.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

① RNA 提取:根据 TaKaRa RNAiso Plus 试剂盒的说明书提取总 RNA。用显微分光光度法测定总 RNA 的纯度和浓度。② cDNA 合成:用逆转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。反应条件为:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃ 恒温。③ RT-qPCR 反应:目的基因 PER1、BAX、BCL2、PCNA 和 β-actin 的引物用 Oligo 7.0 软件设计,引物序列见表 1。根据 TB Green® Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)说明书进行 RT-qPCR。反应条件为: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。每个样品设置 3 个复孔。以 β-actin 为参照,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的 mRNA 相对表达量。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	序列(5′→3′)
PER1	正义链:GACACCACTGCCGATCC 反义链:TTCAGCCCGAGGGTTCT
BAX	正义链:TGCGTCCACCAAGAAGC 反义链: TCCAGTTCGTCCCCGAT
BCL2	正义链:TTTGTGGAACTGTACGGCCC 反义链:TCACTTGTGGCCCAGATAGG
PCNA	正义链:AAGCACCAAACCAGGAGA 反义链:GCAAATTCACCAGAAGGC
β-actin	正义链:CTTCTACAATGAGCTGCGTGTG 反义链:AGAGGCGTACAGGGATAGCACAG

1.5 蛋白免疫印迹实验(Western blot)

用裂解液裂解细胞,冰上裂解 30 min,离心 15 min(4 ℃,12 000 r/min)后收集上清液,用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白(20~30 μg)经 8%~12%的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,通过湿转法转移到 0.45 μm PVDF 膜上。PVDF 膜在含有 5%脱脂奶粉的封闭液中室温封闭 1.5 h。并与 PER1、BAX、BCL2、PCNA 和 β-actin 的一抗接触,在 4 ℃孵育过夜。然后将 PVDF 膜浸泡在 HRP 标记的二抗稀释液中,室温孵育 1 h。加入超敏化学发光液后曝光,采集图像。以 β-actin 作为对照。使用 Image 5.0 软件对蛋白质条带进行灰度分析。

1.6 流式细胞术

细胞增殖检测:细胞经同步化处理后时间设置为 ZT 0,分别在 ZT 4、ZT 8、ZT 12、ZT 16、ZT 20 和 ZT 24 时间点用 0.25%胰酶消化,PBS 洗涤 2 次,并重悬于 100 μL PBS 和 900 μL 预冷的 75%乙醇中固定,4 ℃过夜。然后,PBS 洗涤 2 次,并加入 400 μL 碘化丙啶染色液和 100 μL RNase (100 μg/mL),于 4 ℃避光孵育 30 min,用流式细胞仪检测细胞周期分布,并通过细胞周期拟合软件 ModFit 分析。

细胞增殖指数 $=(S+G_2/M)/(G_0/G_1+S+G_2/M)\times 100\%$

细胞凋亡检测:细胞经同步化处理后时间设置为 ZT 0,分别在 ZT 4、ZT 8、ZT 12、ZT 16、ZT 20 和 ZT 24 时间点用 0.25%胰酶消化,PBS 洗涤 2 次,用 PBS 将细胞数调节至 1×10^6/mL。将 200 μL 的 Annexin V-APC 染色液加入 1 mL 细胞悬液中,室温避光孵育 15 min。然后加入 200 μL 碘化丙啶染色液混合。采用流式细胞仪进行细胞计数。

细胞凋亡指数=凋亡细胞数/被检测细胞总数×100%

1.7 统计学分析

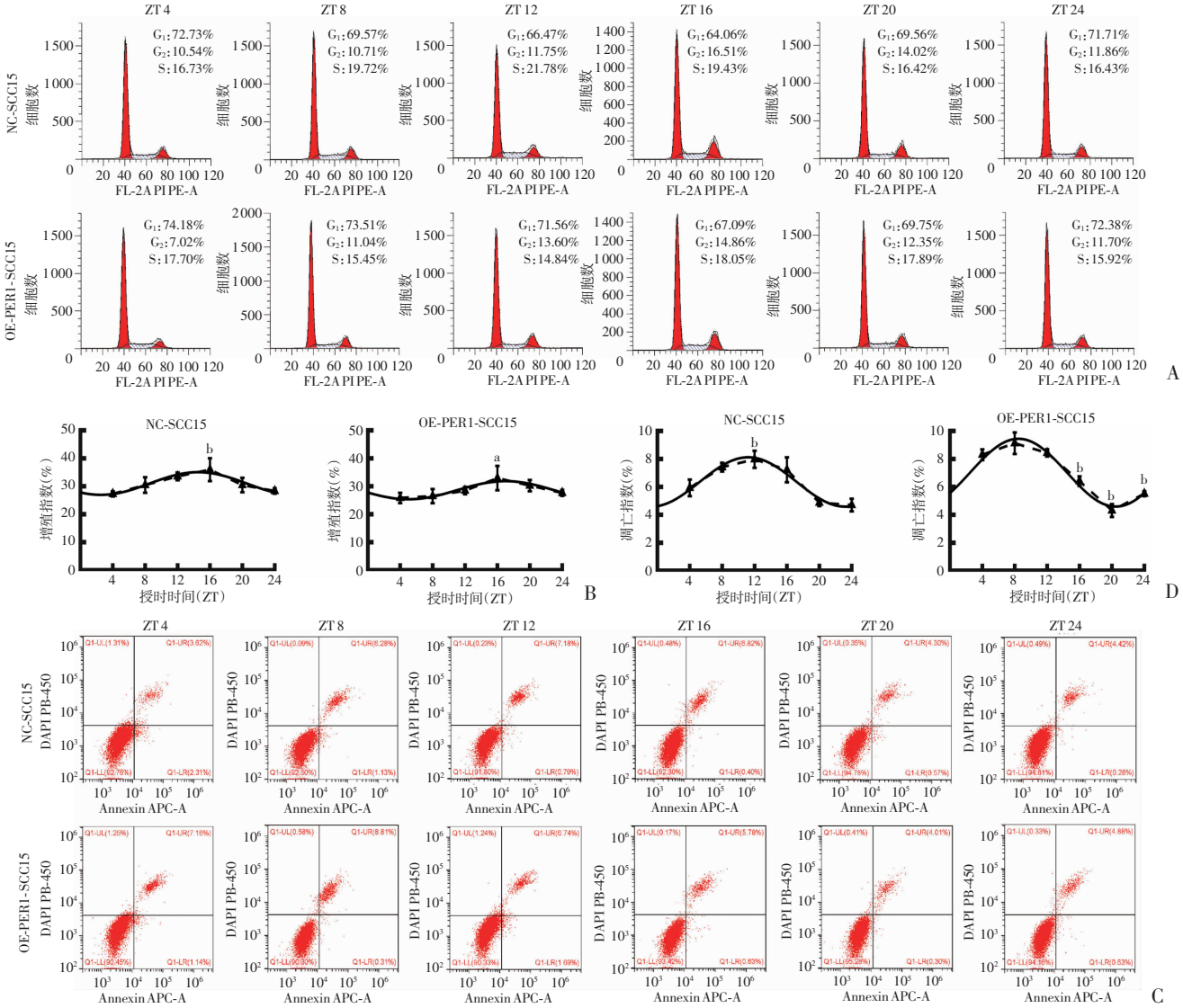
采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行方差分析,检验昼夜 6 个时间点各基因的差异性表达。用 Matlab 8.6(美国,MathWorks)软件中的 Cosinor 程序包对数据进行余弦拟合分析,拟合方程为 $Y = M+A\cos[w(t-\Phi)]$,其中 M 表示中值,A 表示振幅、w 表示角频率、Φ 表示峰值相位,t 代表时间点。同时满足单因素方差分析($P<0.05$)和余弦分析($P<0.05$)表明该基因的表达具有昼夜节律[17]。用 CircaCompare 程序包比较不同余弦曲线间中值和振幅的差异[18],$P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　过表达 PER1 对细胞增殖和凋亡及细胞内 BAX、BCL2 和 PCNA 昼夜节律表达的调控

为探索 PER1 表达改变对细胞增殖和凋亡昼夜节律的调控作用,在过表达 PER1 的口腔鳞癌 SCC15 细胞(OE-PER1-SCC15)中检测细胞增殖、凋亡及生物钟基因 PER1、促凋亡基因 BAX、抑凋亡基因 BCL2 和增殖基因 PCNA 表达的昼夜节律情况。流式细胞、RT-qPCR 和 Western blot 检测结果表明,在 OE-PER1-SCC15 细胞和 NC-SCC15 细胞中细胞增殖指数和凋亡指数及 PER1、BAX、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白表达均具有昼夜节律(单因素方差分析:$P<0.05$;余弦分析:$P<0.05$),见图 1、2 和表 2、3。

与 NC-SCC15 细胞组相比,OE-PER1-SCC15 细胞增殖指数的中值显著降低($P<0.01$),而振幅无显著改变($P>0.05$),峰值相位延后 2.47 h,由主观夜晚的早期(ZT 14.54)后移到主观夜晚的中期(ZT 17.01),见图 1A、B 和表 2;细胞凋亡指数的中值和振幅显著升高($P<0.05$),峰值相位虽然提前 2.74 h(从 ZT 11.21 前移到 ZT 8.47),但仍位于主观白天的晚期(图 1C、D 和表 2)。



A:流式细胞术检测 NC-SCC15 和 OE-PER1-SCC15 细胞在 24 h 内不同时间点的增殖指数;B:NC-SCC15 和 OE-PER1-SCC15 细胞增殖指数在 24 h 内不同时间点实际检测均值和昼夜节律的余弦拟合曲线;C:流式细胞术检测 NC-SCC15 和 OE-PER1-SCC15 细胞在 24 h 内不同时间点的凋亡指数;D:NC-SCC15 和 OE-PER1-SCC15 细胞凋亡指数在 24 h 内不同时间点实际检测均值和昼夜节律变化的余弦拟合曲线　实线:余弦拟合曲线;虚线:昼夜不同时间点的实际均值连线;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 ZT 4 比较

图 1　NC-SCC15 和 OE-PER1-SCC15 细胞增殖指数和凋亡指数的昼夜节律变化和余弦拟合曲线

表 2 NC-SCC15 和 OE-PER1-SCC15 细胞增殖和凋亡的昼夜节律特征

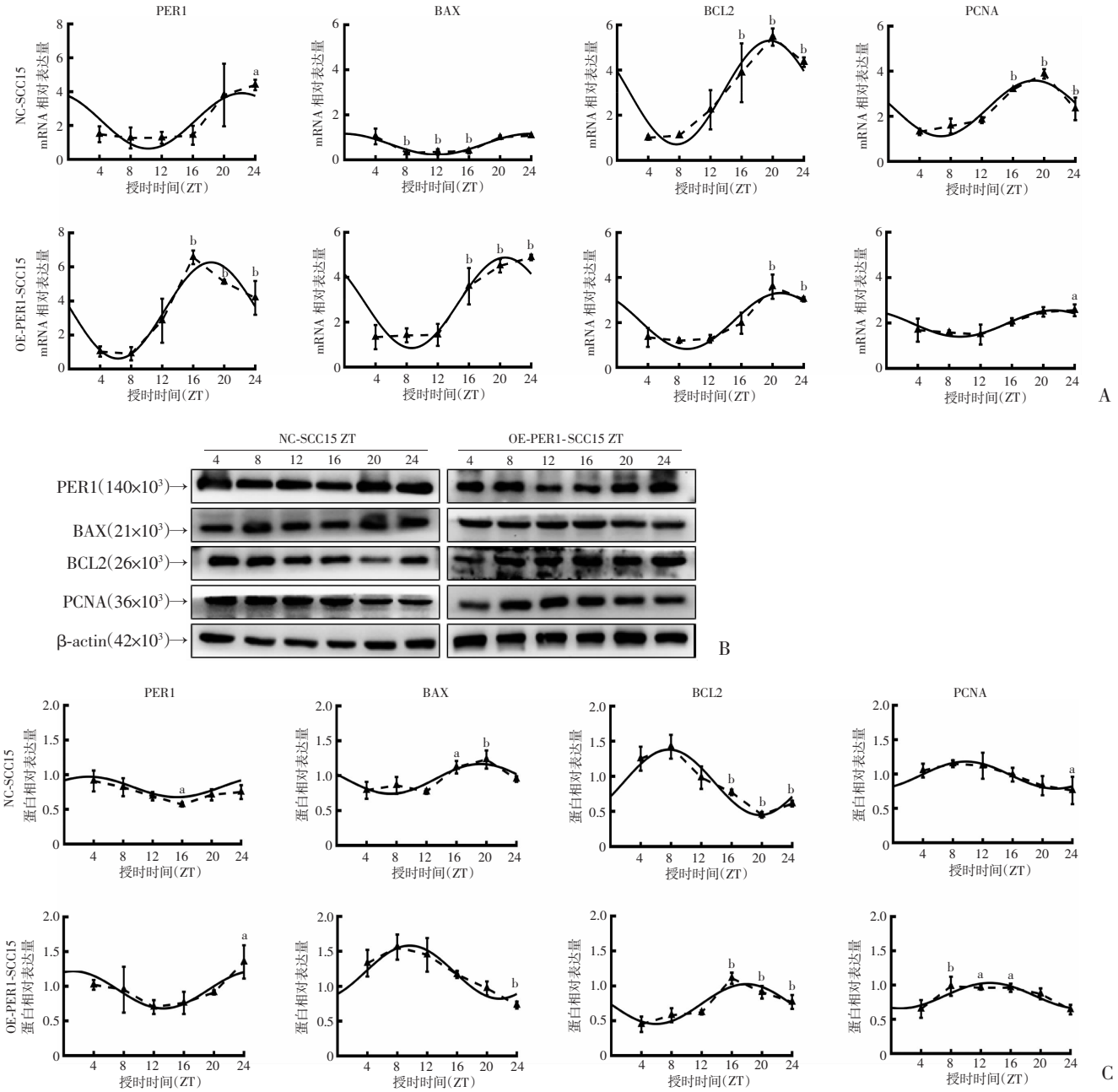
检测项目	细胞	中值	振幅	峰值相位(ZT)	峰值	谷值	*P* 值
增殖指数	NC-SCC15	30.98	4.06	14.54	35.04	26.92	0.016
	OE-PER1-SCC15	28.59	3.24	17.01	31.83	25.35	0.026
凋亡指数	NC-SCC15	6.35	1.77	11.21	8.12	4.58	0.004
	OE-PER1-SCC15	7.01	2.42	8.47	9.43	4.59	0.003

与对照组相比,OE-PER1-SCC15 细胞中 PER1 mRNA 表达的中值显著升高($P<0.05$),而振幅无显著改变($P>0.05$),峰值相位前移 3.96 h,由主观夜晚的晚期(ZT 22.27)提前到主观夜晚的中期(ZT 18.31)。BAX mRNA 表达的中值和振幅显著升高($P<0.05$),峰值相位虽然提前 3.24 h(从 ZT 23.89 前移到 ZT 20.65),但仍位于主观夜晚的晚期。BCL2 mRNA 表达的中值和振幅显著降低($P<0.05$),峰值相位滞后 1.38 h,由主观夜晚中期(ZT 19.63)延后到主观夜晚晚期(ZT 21.01)。PCNA mRNA 表达的中值和振幅显著降低($P<0.05$),峰值相位滞后 2.61 h,由主观夜晚中期(ZT 18.74)后移到主观夜晚晚期(ZT 21.35),见图 2A 和表 3。从蛋白表达比较,PER1 蛋白表达的中值显著升高($P<0.05$),而振幅无显著差异($P>0.05$),峰值相位前移 3.13 h,由主观白天的中期(ZT 4.39)提前到主观白天的早期(ZT 1.26)。BAX 蛋白表达的中值显著升高($P<0.05$),而振幅无显著改变($P>0.05$),峰值相位前移 9.50 h,由主观夜晚的中期(ZT 19.19)提前到主观白天的晚期(ZT 9.69)。BCL2 蛋白表达的中值显著降低($P<0.05$),而振幅无显著差异($P>0.05$),峰值相位滞后 10.20 h,由主观白天的中期(ZT 7.75)后移到主观夜晚的中期(ZT 17.95)。PCNA 蛋白表达的中值显著降低($P<0.05$),而振幅无显著改变($P>0.05$),峰值相位滞后 3.51 h,由主观白天的晚期(ZT 9.74)后移到主观夜晚的早期(ZT 13.25),见图 2B、C 和表 3。

上述结果表明:PER1 过表达后其自身昼夜节律表达特征发生改变,同时调控口腔鳞癌细胞的增殖和凋亡及细胞内 BAX、BCL2、PCNA mRNA 和蛋白昼夜节律表达特征改变。

表 3 NC-SCC15 和 OE-PER1-SCC15 细胞中各基因 mRNA 和蛋白表达的昼夜节律特征

检测项目	基因名称	细胞	中值	振幅	峰值相位(ZT)	峰值	谷值	*P* 值
mRNA	PER1	NC-SCC15	2.27	1.64	22.27	3.91	0.63	0.032
		OE-PER1-SCC15	3.44	2.82	18.31	6.26	0.62	0.019
	BAX	NC-SCC15	0.69	0.47	23.89	1.16	0.22	0.029
		OE-PER1-SCC15	2.86	2.01	20.65	4.87	0.85	0.041
	BCL2	NC-SCC15	3.00	2.29	19.63	5.29	0.71	0.015
		OE-PER1-SCC15	2.07	1.24	21.01	3.31	0.83	0.036
	PCNA	NC-SCC15	2.35	1.23	18.74	3.58	1.12	0.027
		OE-PER1-SCC15	1.97	0.58	21.35	2.55	1.39	0.022
蛋白	PER1	NC-SCC15	0.74	0.14	4.39	0.88	0.60	0.032
		OE-PER1-SCC15	0.95	0.27	1.26	1.22	0.68	0.025
	BAX	NC-SCC15	0.95	0.21	19.19	1.16	0.74	0.044
		OE-PER1-SCC15	1.20	0.38	9.69	1.58	0.82	0.035
	BCL2	NC-SCC15	0.91	0.47	7.75	1.38	0.44	0.019
		OE-PER1-SCC15	0.74	0.29	17.95	1.03	0.45	0.025
	PCNA	NC-SCC15	0.98	0.20	9.74	1.18	0.78	0.017
		OE-PER1-SCC15	0.85	0.19	13.25	1.04	0.66	0.022



A: RT-qPCR 检测 NC-SCC15 和 OE-PER1-SCC15 细胞中 PER1、BAX、BCL2 和 PCNA mRNA 表达及其余弦拟合曲线; B、C:Western blot 检测 NC-SCC15 和 OE-PER1-SCC15 细胞中 PER1、BAX、BCL2 和 PCNA 蛋白表达及其余弦拟合曲线　实线:余弦拟合曲线;虚线:昼夜不同时间点的实际均值连线;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 ZT 4 比较

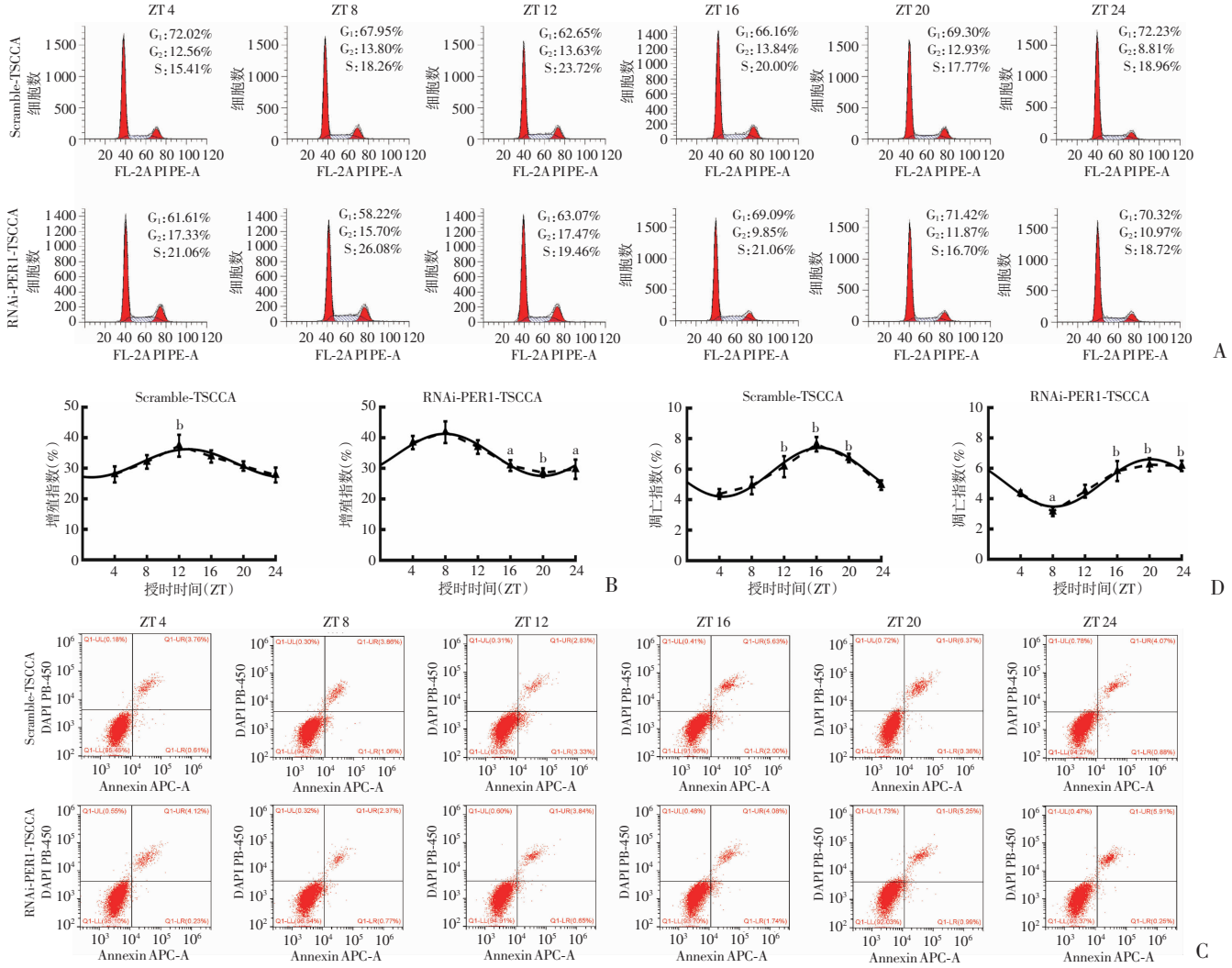
图 2　PER1、BAX、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白在 NC-SCC15 和 OE-PER1-SCC15 细胞中表达的昼夜节律变化和余弦拟合曲线

2.2　敲减 PER1 对细胞增殖和凋亡及细胞内 BAX、BCL2 和 PCNA 昼夜节律表达的调控作用

在敲减 PER1 的口腔鳞癌 TSCCA 细胞(RNAi-PER1-TSCCA)中检测细胞增殖和凋亡及 PER1、BAX、BCL2 和 PCNA 表达的昼夜节律情况。流式细胞检测结果表明,在 RNAi-PER1-TSCCA 细胞和对照组 Scramble-TSCCA 细胞中细胞增殖指数和凋亡指数均具有昼夜节律(单因素方差分析:$P<0.05$;余弦分析:$P<0.05$),见图 3、表 4。RT-qPCR 检测结果表明,PER1、BAX、BCL2 和 PCNA mRNA 表达均具有昼夜节律(单因素方差分析:$P<0.05$;余弦分析:$P<0.05$),见图 4A、表 5。Western blot 检测结果表明,PER1、

BCL2 和 PCNA 蛋白表达均具有昼夜节律，BAX 蛋白在 Scramble-TSCCA 细胞具有昼夜节律(单因素方差分析:$P<0.05$；余弦分析:$P<0.05$)，但在 RNAi-PER1-TSCCA 细胞中发生昼夜节律紊乱($P>0.05$，图 4B、C 和表 5)。

与对照组相比，RNAi-PER1-TSCCA 细胞增殖指数的中值和振幅显著升高($P<0.05$)，峰值相位前移 5.14 h，由主观夜晚的早期(ZT 13.10)提前到主观白天的中期(ZT 7.96)，见图 3A、B 和表 4；细胞凋亡指数的中值显著降低($P<0.01$)，而振幅无显著差异($P>0.05$)，峰值相位滞后 3.73 h，由主观夜晚的中期(ZT 16.41)后移到主观夜晚的晚期(ZT 20.14)，见图 3C、D 和表 4。



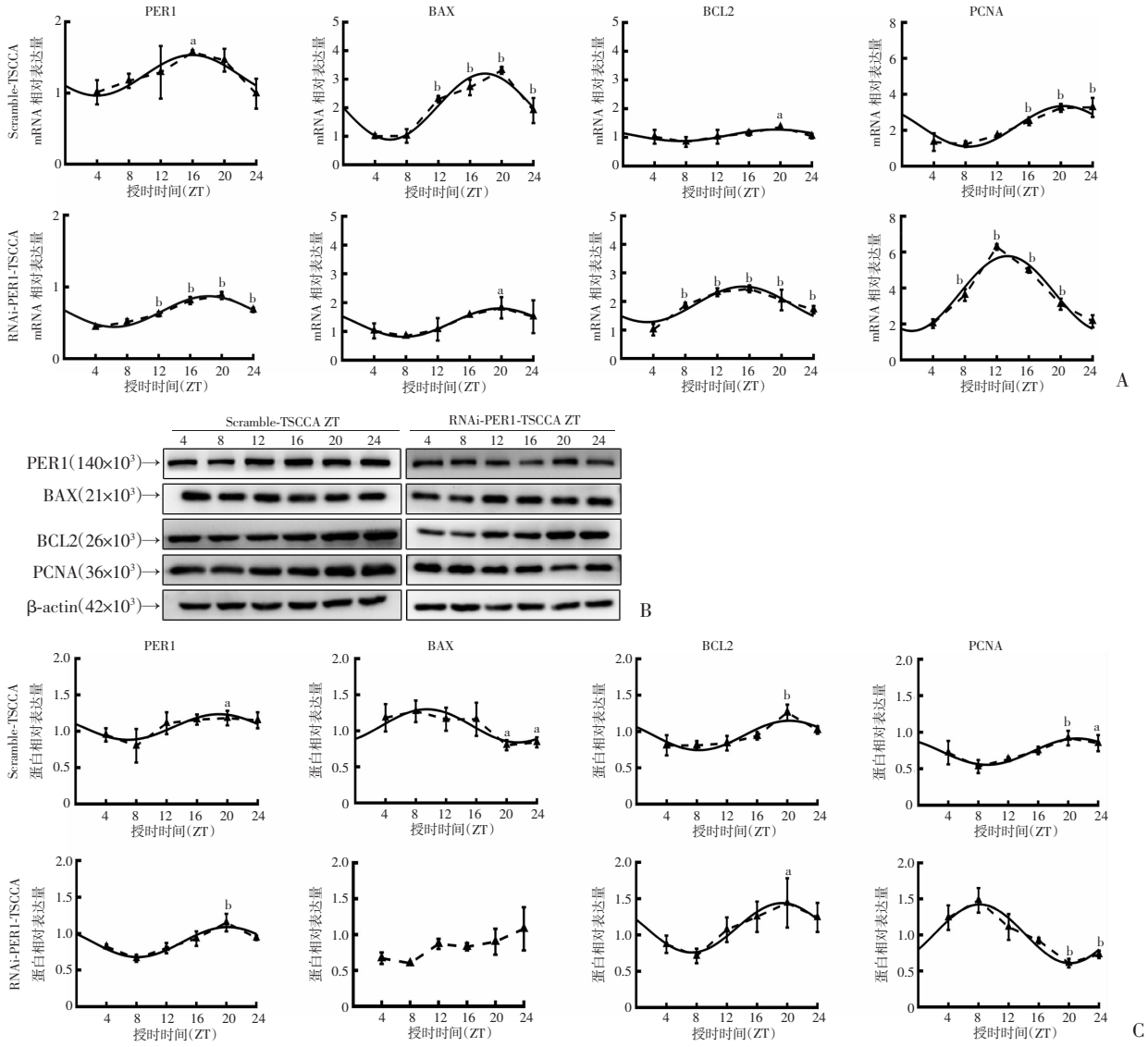
A：流式细胞术检测 Scramble-TSCCA 和 RNAi-PER1-TSCCA 细胞在 24 h 内不同时间点的增殖指数；B：Scramble-TSCCA 和 RNAi-PER1-TSCCA 细胞增殖指数在 24 h 内不同时间点实际检测均值和昼夜节律的余弦拟合曲线；C：流式细胞术检测 Scramble-TSCCA 和 RNAi-PER1-TSCCA 细胞在 24 h 内不同时间点的凋亡指数；D：Scramble-TSCCA 和 RNAi-PER1-TSCCA 细胞凋亡指数在 24 h 内不同时间点实际检测均值和昼夜节律的余弦拟合曲线
实线：余弦拟合曲线；虚线：昼夜不同时间点的实际均值连线；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 ZT 4 比较

图 3　Scramble-TSCCA 和 RNAi-PER1-TSCCA 细胞增殖指数和凋亡指数的昼夜节律变化和余弦拟合曲线

表 4　Scramble-TSCCA 和 RNAi-PER1-TSCCA 细胞增殖和凋亡的昼夜节律特征

检测项目	细胞	中值	振幅	峰值相位（ZT）	峰值	谷值	*P* 值
增殖指数	Scramble-TSCCA	31.62	4.59	13.10	36.21	27.03	0.014
	RNAi-PER1-TSCCA	34.38	6.86	7.96	41.24	27.52	0.005
凋亡指数	Scramble-TSCCA	5.79	1.60	16.41	7.39	4.19	0.004
	RNAi-PER1-TSCCA	5.03	1.56	20.14	6.59	3.47	0.012

与对照组相比,RNAi-PER1-TSCCA 细胞 PER1 mRNA 表达的中值显著降低($P<0.001$),而振幅无显著差异($P>0.05$),峰值相位滞后 2.41 h,由主观夜晚的早期(ZT 15.95)后移到主观夜晚的中期(ZT 18.36)。BAX mRNA 表达的中值和振幅显著降低($P<0.01$),峰值相位虽然滞后 1.95 h(从 ZT 17.83 后移到 ZT 19.78),但仍位于主观夜晚的中期。BCL2 mRNA 表达的中值和振幅显著升高($P<0.05$),峰值相位前移 4.15 h,由主观夜晚的中期(ZT 19.39)提前到主观夜晚的早期(ZT 15.24)。PCNA mRNA 表达的中值和振幅显著升高($P<0.05$),峰值相位前移 7.04 h,由主观夜晚的晚期(ZT 20.37)提前到主观夜晚的早期(ZT 13.33),见图 4A、表 5。从蛋白水平比较,PER1 蛋白表达的中值显著降低($P<0.01$),而振幅无显著改变($P>0.05$),峰值相位滞后 1.25 h,由主观夜晚的中期(ZT 18.92)后移到主观夜晚的晚期(ZT 20.17)。BAX 蛋白在 RNAi-PER1-TSCCA 细胞中发生节律紊乱。BCL2 蛋白表达的中值显著升高($P<0.05$),而振幅无显著差异($P>0.05$),峰值相位前移 0.95 h,由主观夜晚的晚期(ZT 20.27)提前到主观夜晚的中期(ZT 19.32)。PCNA 蛋白表达的中值和振幅显著升高($P<0.05$),峰值相位前移 13.03 h,由主观夜晚的晚期(ZT 21.18)提前到主观白天的晚期(ZT 8.15),见图 4B、C 和表 5。



A: RT-qPCR 检测 Scramble-TSCCA 和 RNAi-PER1-TSCCA 细胞中 PER1、BAX、BCL2 和 PCNA mRNA 表达及其余弦拟合曲线;B, C:Western blot 检测 Scramble-TSCCA 和 RNAi-PER1-TSCCA 细胞中 PER1、BAX、BCL2 和 PCNA 蛋白表达及其余弦拟合曲线　实线:余弦拟合曲线;虚线:昼夜不同时间点的实际均值的连线;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 ZT 4 比较

图 4　PER1、BAX、BCL2 和 PCNA 在 Scramble-TSCCA 和 RNAi-PER1-TSCCA 细胞中表达的昼夜节律变化和余弦拟合曲线

表 5 Scramble-TSCCA 和 RNAi-PER1-TSCCA 细胞中各基因 mRNA 和蛋白表达的昼夜节律特征

检测项目	基因名称	细胞	中值	振幅	峰值相位(ZT)	峰值	谷值	*P* 值
mRNA	PER1	Scramble-TSCCA	1.25	0.29	15.95	1.54	0.96	0.047
		RNAi-PER1-TSCCA	0.66	0.21	18.36	0.87	0.45	0.008
	BAX	Scramble-TSCCA	2.05	1.16	17.83	3.21	0.89	0.016
		RNAi-PER1-TSCCA	1.31	0.49	19.78	1.80	0.82	0.000
	BCL2	Scramble-TSCCA	1.07	0.20	19.39	1.27	0.87	0.034
		RNAi-PER1-TSCCA	1.90	0.62	15.24	2.52	1.28	0.042
	PCNA	Scramble-TSCCA	2.21	1.13	20.37	3.34	1.08	0.030
		RNAi-PER1-TSCCA	3.69	2.08	13.33	5.77	1.61	0.017
蛋白	PER1	Scramble-TSCCA	1.06	0.18	18.92	1.24	0.88	0.037
		RNAi-PER1-TSCCA	0.88	0.21	20.17	1.09	0.67	0.024
	BAX	Scramble-TSCCA	1.07	0.23	9.46	1.30	0.84	0.024
		RNAi-PER1-TSCCA	-	-	-	-	-	0.330
	BCL2	Scramble-TSCCA	0.95	0.20	20.27	1.15	0.75	0.034
		RNAi-PER1-TSCCA	1.10	0.34	19.32	1.44	0.76	0.009
	PCNA	Scramble-TSCCA	0.73	0.18	21.18	0.91	0.55	0.006
		RNAi-PER1-TSCCA	1.02	0.41	8.15	1.43	0.61	0.016

-:无昼夜节律

上述结果表明:PER1 敲减后其自身昼夜节律表达特征发生改变,同时调控口腔鳞癌细胞增殖和凋亡及细胞内 BAX、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白昼夜节律表达特征改变。

3 讨论

人体细胞中几乎都存在生物钟基因[6-7],这些生物钟基因通过形成正负反馈环路而产生昼夜节律振荡[5,19]。机体正常生理稳态的维持依靠各种细胞生理活动或基因表达在时间和空间上保持动态平衡[20-21]。昼夜节律是调控体内众多复杂的生理过程或基因表达能在时间和空间上保持协同有序的重要管理方式[20-22],昼夜节律异常改变与肿瘤等多种疾病的发生发展密切相关[7,10]。PER1 是核心生物钟基因之一[5],本研究结果显示,口腔鳞癌细胞中 PER1 表达改变能导致其自身的昼夜节律改变,并对细胞增殖和凋亡以及细胞内 BAX、BCL2、PCNA mRNA 和蛋白表达的昼夜节律具有重要的调控作用。中值、振幅和峰值相位是反映 24 h 昼夜节律振荡特征的 3 个维度[8]。中值代表 24 h 节律性振荡的平均值;振幅代表节律振荡高于或低于中值的程度,是反映基因的稳健性和同步化能力的重要指标;峰值相位代表节律振荡达到顶峰的时间点,反映该基因呈节律性的最大“开启”时间。因此,对昼夜节律的研究不仅会补充对癌症发生机制的深入理解,也可能为基于昼夜节律发展治疗癌症的新策略提供依据。

无限增殖和抵抗凋亡是恶性肿瘤两大基本特征[11]。PCNA 是一种增殖细胞核抗原。WEIGL 等[12]发现,雄性 BALB/c 小鼠肝脏和食管中 PCNA mRNA 表达存在昼夜节律。BCL2 和 BAX 是凋亡的重要调控因子,BAX 为促凋亡基因,BCL2 为抑凋亡基因[11]。GRANDA 等[13]研究表明,BCL2 和 BAX 蛋白在骨髓组织中的表达具有昼夜节律,且其昼夜节律呈相反模式。我们前期研究证明[16],在 3 株人口腔鳞癌细胞系 TSCCA、SCC15 和 CAL27 中,PER1 mRNA 和蛋白表达均显著低于正常口腔上皮细胞。为了探索口腔鳞癌细胞中 PER1 对 PCNA、BCL2 和 BAX 表达昼夜节律的调控作用,本研究在这 3 株口腔鳞癌细胞系中选择 PER1 表达最低的 SCC15 细胞建构稳定过表达 PER1 的 SCC15 细胞(OE-PER1-SCC15),选择 PER1 表达最高的 TSCCA 细胞构建稳定沉默 PER1 的 TSCCA 细胞(RNAi-PER1-TSCCA)。结果发现:在 OE-PER1-SCC15 中,PER1、BAX、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白的表达具有昼夜节律性;PER1 和 BAX mRNA 和蛋白表达的中值显著升高,BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白表达的中值显著降低;BAX mRNA 表达的振幅显著升高,BCL2

和 PCNA mRNA 表达的振幅显著降低;PER1 和 BAX mRNA 和蛋白表达的峰值相位前移,BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白表达的峰值相位后移。在 RNAi-PER1-TSCCA 中,BAX 蛋白的表达发生昼夜节律紊乱,但 PER1、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白以及 BAX mRNA 的表达具有昼夜节律,其昼夜节律特征与 OE-PER1-SCC15 中相反。表明口腔鳞癌细胞中 BAX、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白的表达在中值、振幅和峰值相位 3 个维度上的平衡失调与癌症的发生发展密切相关,PER1 对 BAX、BCL2 和 PCNA 表达的昼夜节律具有重要调控作用。如果能进一步对 SCC15 和 TSCCA 两种口腔鳞癌细胞分别既沉默又过表达,其结果会更加全面。

昼夜节律研究也为癌症的时间精准治疗提供了依据。因为基因表达包括转录产生 mRNA 和翻译产生蛋白等不同层面的动态过程[23],昼夜节律的最大优势就是不仅能获得基因表达在不同层面的中值和振幅水平,同时也能获得基因表达在不同层面的最大高峰或低谷时间,即峰值相位。本研究从 mRNA 和蛋白两个层面获得 PER1、PCNA、BAX 和 BCL2 表达的昼夜节律改变规律,结果表明 PER1、PCNA、BAX 和 BCL2 mRNA 表达的峰值相位与各基因蛋白表达的峰值相位之间存在数小时的时间差。这一结果提示,针对 PER1、PCNA、BAX 和 BCL2 的 mRNA 靶向制剂或蛋白靶向制剂获得最佳疗效的给药时间是不相同的。这种时间精准治疗在癌症治疗中具有很好的临床应用前景[24]。

总之,本研究结果显示,在口腔鳞癌细胞中,生物钟基因 PER1 表达改变能导致其自身的昼夜节律改变,并从中值、振幅和峰值相位 3 个维度调控细胞增殖和凋亡及细胞内 BAX、BCL2 和 PCNA mRNA 和蛋白表达的昼夜节律特征改变。本研究结果不仅加深对口腔鳞癌发生机制更全面和更精细的认识,同时也提示基于昼夜节律的研究可能为治疗口腔鳞癌提供新的策略。

参考文献:

[1] 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. DOI:10.3322/caac.21293.

[2] CRAMER J D, BURTNESS B, LE Q T, *et al*. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2019, 16(11): 669-683. DOI:10.1038/s41571-019-0227-z.

[3] GIRALDI L, LEONCINI E, PASTORINO R, *et al*. Alcohol and cigarette consumption predict mortality in patients with head and neck cancer: a pooled analysis within the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium[J]. Ann Oncol, 2017, 28(11): 2843-2851. DOI:10.1093/annonc/mdx486.

[4] DIBNER C, SCHIBLER U, ALBRECHT U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 517-549. DOI:10.1146/annurev-physiol-021909-135821.

[5] TAKAHASHI J S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock[J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(3): 164-179. DOI:10.1038/nrg.2016.150.

[6] KIM Y H, LAZAR M A. Transcriptional control of circadian rhythms and metabolism: a matter of time and space[J]. Endocr Rev, 2020, 41(5): 707-732. DOI:10.1210/endrev/bnaa014.

[7] TUREK F W. Circadian clocks: not your grandfather's clock[J]. Science, 2016, 354(6315): 992-993. DOI:10.1126/science.aal2613.

[8] TAN X M, YE H, YANG K, *et al*. Circadian variations of clock gene Per2 and cell cycle genes in different stages of carcinogenesis in golden hamster buccal mucosa[J]. Sci Rep, 2015, 5: 9997. DOI:10.1038/srep09997.

[9] GUAN D Y, XIONG Y, TRINH T M, *et al*. The hepatocyte clock and feeding control chronophysiology of multiple liver cell types[J]. Science, 2020, 369(6509): 1388-1394. DOI:10.1126/science.aba8984.

[10] KORONOWSKI K B, SASSONE-CORSI P. Communicating clocks shape circadian homeostasis[J]. Science, 2021, 371(6530): eabd0951. DOI:10.1126/science.abd0951.

[11] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013.

[12] WEIGL Y, ASHKENAZI I E, PELEG L. Rhythmic profiles of cell cycle and circadian clock gene transcripts in mice: a possible association between two periodic systems[J]. J Exp Biol, 2013, 216(Pt 12): 2276-2282. DOI:10.1242/jeb.081729.

[13] GRANDA T G, LIU X H, SMAALAND R, *et al*. Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor[J]. FASEB J, 2005, 19(2): 304-306. DOI:10.1096/fj.04-2665fje.

[14] YANG G J, YANG Y X, TANG H, *et al*. Loss of the clock gene Per1 promotes oral squamous cell carcinoma progression via the AKT/mTOR pathway[J]. Cancer Sci, 2020, 111(5): 1542-1554. DOI:10.1111/cas.14362.

[15] ZHAO N B, YANG K, YANG G L, *et al*. Aberrant expression of clock gene period1 and its correlations with the growth, proliferation and metastasis of buccal squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55894. DOI:10.1371/journal.pone.0055894.

[16] GONG X B, TANG H, YANG K. PER1 suppresses glycolysis and cell proliferation in oral squamous cell carcinoma *via* the PER1/RACK1/PI3K signaling complex [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(3): 276. DOI:10.1038/s41419-021-03563-5.

[17] LIU Y, LANG H D, ZHOU M, *et al*. The preventive effects of pterostilbene on the exercise intolerance and circadian misalignment of mice subjected to sleep restriction[J]. Mol Nutr Food Res, 2020, 64(11): e1900991. DOI:10.1002/mnfr.201900991.

[18] PARSONS R, PARSONS R, GARNER N, *et al*. CircaCompare: a method to estimate and statistically support differences in mesor, amplitude and phase, between circadian rhythms[J]. Bioinformatics, 2020, 36(4): 1208-1212. DOI:10.1093/bioinformatics/btz730.

[19] FARSHADI E, VAN DER HORST G T J, CHAVES I. Molecular links between the circadian clock and the cell cycle[J]. J Mol Biol, 2020, 432(12): 3515-3524. DOI:10.1016/j.jmb.2020.04.003.

[20] SULLI G, LAM M T Y, PANDA S. Interplay between circadian clock and cancer: new frontiers for cancer treatment[J]. Trends Cancer, 2019, 5(8): 475-494. DOI:10.1016/j.trecan.2019.07.002.

[21] VOIGT R M, FORSYTH C B, KESHAVARZIAN A. Circadian rhythms: a regulator of gastrointestinal health and dysfunction[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 13(5): 411-424. DOI: 10.1080/17474124.2019.1595588.

[22] DAVIS K, RODEN L C, LEANER V D, *et al*. The tumour suppressing role of the circadian clock[J]. IUBMB Life, 2019, 71(7): 771-780. DOI:10.1002/iub.2005.

[23] BUCCITELLI C, SELBACH M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control[J]. Nat Rev Genet, 2020, 21(10): 630-644. DOI:10.1038/s41576-020-0258-4.

[24] 杨凯, 郭伟, 孙沫逸, 等. 口腔鳞状细胞癌时辰化疗中国专家共识[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2019, 17(1): 7-12. DOI:10.19438/j.cjoms.2019.01.002.
YANG K, GUO W, SUN M Y, *et al*. Chinese expert consensus on chrono-chemotherapy for oral squamous cell carcinoma[J]. China J Oral Maxillofac Surg, 2019, 17(1): 7-12. DOI:10.19438/j.cjoms.2019.01.002.

(**收稿**:2022-02-09;**修回**:2022-05-31)

(编辑 刘秋池)