doi:10.11659/jjssx.10E021015

·基础研究·

lncRNA BLACAT1 在下咽鳞状细胞癌中介导自噬调控肿瘤细胞的化疗敏感性

迪丽努尔·尼加提,杨 娜,古丽娜尔·吐尔地 (新疆维吾尔自治区人民医院放疗中心,新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘 要] **目的** 探究长链非编码 RNA(lncRNA)膀胱癌相关转录因子 1(BLACAT1)对下咽鳞状细胞癌(HSCC)细胞株顺铂(DDP)敏感性的影响及其作用机制。**方法** 采用 qRT-PCR 检测 40 例 HSCC 患者的癌组织、癌旁组织、HSCC 细胞株 FaDu 及 DDP 耐药细胞株 FaDu/DDP 中 lncRNA BLACAT1 的表达水平,CCK-8 检测经不同浓度 DDP 处理后 FaDu 细胞和 FaDu/DDP 细胞的存活率。分别转染 siRNA-BLACAT1 序列和 siRNA 阴性对照至 FaDu/DDP 细胞中,记为 si-BLACAT1 组和 si-NC 组,以未转染的 FaDu/DDP 细胞作为对照组,qRT-PCR 验证转染效果,CCK-8 检测转染后经不同浓度 DDP 处理的 FaDu/DDP 细胞存活率,流式细胞术检测细胞凋亡率,透射电子显微镜观察细胞自噬情况,免疫荧光染色测定 LC3B 荧光斑点的形成情况,Western blot 检测细胞自噬相关蛋白的表达。**结果** HSCC 组织中 lncRNA BLACAT1 mRNA 相对表达量显著高于癌旁组织($P<0.01$);FaDu/DDP 细胞中 lncRNA BLACAT1 mRNA 相对表达量高于 FaDu 细胞($P<0.05$)。si-BLACAT1 组细胞 lncRNA BLACAT1 mRNA 相对表达量低于对照组和 si-NC 组($P<0.05$);当 DDP 作用浓度在 6.25 μmol/L 及以上时,FaDu/DDP 细胞存活率高于 FaDu 细胞($P<0.05$),si-BLACAT1 + DDP 组细胞存活率低于 DDP 组和 si-NC + DDP 组($P<0.05$)。与对照组比较,DDP 组和 si-NC + DDP 组 FaDu/DDP 细胞凋亡率升高($P<0.05$);与 DDP 组和 si-NC + DDP 组比较,si-BLACAT1 + DDP 组细胞凋亡率也升高($P<0.05$)。对照组有一些自噬体和自噬溶酶体形成,DDP 组和 si-NC + DDP 组自噬溶酶体形成较多,而 si-BLACAT1 + DDP 组细胞中未观察到自噬体及自噬溶酶体。DDP 组和 si-NC + DDP 组细胞内 LC3B 荧光斑点数较对照组增加($P<0.05$);si-BLACAT1 + DDP 组细胞内 LC3B 荧光斑点数较 DDP 组和 si-NC + DDP 组均减少($P<0.05$)。与对照组比较,DDP 组和 si-NC + DDP 组 FaDu/DDP 细胞中 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平上调,Beclin-1蛋白表达量上升,p62 蛋白表达量下降($P<0.05$);与 DDP 组和 si-NC + DDP 组比较,si-BLACAT1 + DDP 组细胞中 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平下调,Beclin-1 蛋白表达量下降,p62 蛋白表达量上升($P<0.05$)。**结论** lncRNA BLACAT1 在 HSCC 组织及 DDP 耐药细胞株 FaDu/DDP 中高表达,下调 lncRNA BLACAT1 能够提高 HSCC 细胞对 DDP 的敏感性,其作用机制可能通过抑制自噬水平实现。

[关键词] 下咽鳞状细胞癌;lncRNA BLACAT1;自噬;化疗敏感性;头颈癌

[中图分类号] R73-3;R739.63 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-10-08

lncRNA BLACAT1 mediating autophagy in hypopharyngeal squamous cell carcinoma to modulate the chemosensitivity of tumor cells

Dilinuer·Nijiati, YANG Na, Gulinaer·Tuerdi (Center of Radiotherapy, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumchi Xinjiang 830000, China)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2018D01C251)

[通信作者] 古丽娜尔·吐尔地,E-mail:52576537@qq.com

[17] Vincent TL. Peripheral pain mechanisms in osteoarthritis[J]. Pain, 2020,161 (Suppl 1):S138 - S146. doi:10.1097/j.pain.0000000000001923.

[18] 张 力,黄正泉,李晓辰,等.膝痹宁对膝骨关节炎模型大鼠滑膜纤维化的影响[J].时珍国医国药,2020,31(1):29 - 32.

[19] 李炳亮,王 建,杨 娅.4-苯基丁酸抑制 PERK/Bip 信号通路缓解骨关节炎大鼠内质网应激[J].解剖科学进展,2020,26(6):673 - 676. doi:10.16695/j.cnki.1006 - 2947.2020.06.015.

[20] Precerutti M, Formica M, Bonardi M, et al. Acromioclavicular osteoarthritis and shoulder pain:a review of the role of ultrasonography[J]. J Ultrasound,2020,23(3):317 - 325. doi:10.1007/s40477 - 020 - 00498 - z.

[21] 崔 璀,朱 悦,王正大.骨细胞分化增殖凋亡及内质网应激信号通路特异性蛋白表达实验研究[J].广东医学,2019,40(15):2139 - 2142. doi:10.13820/j.cnki.gdyx.20190604.

[22] 张璐瑶,刘 维.中药治疗骨关节炎作用机制的研究进展[J].中国中医基础医学杂志,2020,26(12):1901 - 1904.

[23] Zhang P, McGrath B, Li S, et al. The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas[J]. Mol Cell Biol,2002,22(11):3864 - 3874. doi:10.1128/MCB.22.11.3864 - 3874.2002.

[24] Wang FM, Galson DL, Roodman GD, et al. Resveratrol triggers the pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress response and represses pro-survival XBP1 signaling in human multiple myeloma cells[J]. Exp Hematol,2011,39(10):999 - 1006. doi:10.1016/j.exphem.2011.06.007.

(编辑:魏 源)

Abstract: Objective To explore the effect of long non-coding RNA (lncRNA) bladder cancer associated transcript 1 (BLACAT1) on the sensitivity of hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC) cell lines to cisplatin (DDP) and its mechanism. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression levels of lncRNA BLACAT1 in the cancer tissues and adjacent tissues of 40 HSCC patients, HSCC cell line FaDu and DDP-resistant cell line FaDu/DDP, CCK-8 was used to detect the survival rate of FaDu cells and FaDu/DDP cells after treated by different concentrations of DDP. The siRNA-BLACAT1 sequence and the siRNA negative control were transfected into the FaDu/DDP cells respectively, which were designated as the si-BLACAT1 group and the si-NC group, and the untransfected FaDu/DDP cells were designated as the control group; qRT-PCR was used to verify the transfection effect, CCK-8 was used to detect the survival rate of FaDu/DDP cells treated by different concentrations of DDP after transfection, flow cytometry was used to detect the apoptosis rate, transmission electron microscopy was used to observe the autophagy, immunofluorescence staining was used to determine the formation of LC3B fluorescent spots, Western blot was used to detect the expression of autophagy-related proteins. **Results** The relative expression of lncRNA BLACAT1 mRNA in the HSCC tissues was significantly higher than that in the adjacent tissues ($P<0.01$); the relative expression of lncRNA BLACAT1 mRNA in the FaDu/DDP cells was higher than that in the FaDu cells ($P<0.05$). The relative expression of lncRNA BLACAT1 mRNA in the si-BLACAT1 group was lower than that in the control group and the si-NC group ($P<0.05$); when the concentrations of DDP were 6.25 μmol/L and above, the survival rate of FaDu/DDP cells was higher than that of the FaDu cells ($P<0.05$), the survival rate in the si-BLACAT1 + DDP group was lower than that in the DDP group and the si-NC + DDP group ($P<0.05$). Compared with the control group, the apoptosis rate of FaDu/DDP cells in the DDP group and the si-NC + DDP group increased ($P<0.05$); compared with the DDP group and the si-NC + DDP group, the apoptosis rate of the si-BLACAT1 + DDP group also increased ($P<0.05$). A number of autophagosomes and autophagolysosomes were observed in the control group, more autophagolysosomes were observed in the DDP group and the si-NC + DDP group, while autophagosomes and autophagolysosomes were not observed in the si-BLACAT1 + DDP group. Compared with the control group, the number of intracellular LC3B fluorescent spots in the DDP group and the si-NC + DDP group increased ($P<0.05$); compared with the DDP group and the si-NC + DDP group, the number of intracellular LC3B fluorescent spots in the si-BLACAT1 + DDP group decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the levels of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ in FaDu/DDP cells were up-regulated, Beclin-1 protein expression increased, and p62 protein expression decreased in the DDP group and the si-NC + DDP group ($P<0.05$); compared with the DDP group and the si-NC + DDP group, the level of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ was down-regulated, Beclin-1 protein expression decreased, and p62 protein expression increased in the si-BLACAT1 + DDP group ($P<0.05$). **Conclusion** The lncRNA BLACAT1 is highly expressed in the HSCC tissues and the DDP-resistant cell line FaDu/DDP. The down-regulation of lncRNA BLACAT1 can increase the sensitivity of HSCC cells to DDP, and its mechanism may be achieved via inhibiting the level of autophagy.

Keywords: hypopharyngeal squamous cell carcinoma; lncRNA BLACAT1; autophagy; chemosensitivity; head and neck cancer

下咽鳞状细胞癌(hypopharyngeal squamous cell carcinoma, HSCC)是一种发生于下咽部的侵袭性恶性肿瘤,约占所有头颈部鳞状细胞癌的5%。近年来,由于诊断技术和治疗方式的改进,HSCC患者的生存率有所提高,但由于下咽组织结构特殊,发病部位较为隐匿,多数患者确诊时已处于晚期,并伴肿瘤转移或复发,导致其5年生存率低于50%[1-2]。化疗是HSCC的有效辅助治疗手段;然而,化疗抗性的出现和发展在很大程度上限制了其治疗效果[3]。因此,深入了解HSCC化疗抗性产生的分子机制对于HSCC的诊断、治疗和预后至关重要。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一种长度超过200个核苷酸且没有蛋白质编码潜力的调控型RNA,在各种基因表达和生物过程中发挥重要调节作用。越来越多的证据表明,lncRNA在包括HSCC在内的癌症发展及转移中起关键作用,且其介导的化疗抗性在大量研究中均有报道。如lncRNA UCA1在口腔鳞状细胞癌的进展中发挥致癌作用,可调控肿瘤细胞的增殖、侵袭和凋亡,其表达降低可增强顺铂(cisplatin, DDP)诱导的细胞凋亡和化疗敏感性[4];lncRNA膀胱癌相关转录因子1(bladder cancer associated transcript 1, BLACAT1)在喉鳞状细胞癌中高表达,可通过促进肿瘤细胞迁移和抑制肿瘤细胞凋亡来触发细胞对化疗药物的耐受性[5]。

lncRNA BLACAT1位于人类染色体1q32.1的基因座上,最初被发现于膀胱癌中,随后研究发现其在胃癌、小细胞肺癌和结直肠癌等多种癌症中过表达,并可促进癌细胞的增殖、迁移及侵袭等恶性行为过程[6-8]。然而,lncRNA BLACAT1在HSCC中的表达、功能以及对化疗敏感性的作用尚不清楚。因此,本研究拟探讨lncRNA BLACAT1在HSCC组织中的表达及其对肿瘤细胞DDP敏感性的影响,初步探究可能的作用机制,旨在为HSCC的靶向诊治提供新思路。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2018年6月至2020年12月在我院耳鼻咽

喉科就诊且接受 HSCC 肿瘤手术切除的患者 40 例,其中男 33 例,女 7 例;年龄 35 ~ 68 岁,平均(54.22 ± 5.71)岁。收集术中切除的 HSCC 肿瘤组织标本及对应癌旁正常黏膜组织(癌旁组织,距离肿瘤外缘 2 cm 以上),迅速置于液氮中冷冻后移至 -80 ℃冰箱保存,所有肿瘤组织标本经病理科 2 位医师证实为 HSCC。患者术前均未行放疗、化疗或免疫治疗等,临床资料完整,本研究经过我院医学伦理委员会审核(KY20180423031),病例标本收集前均告知患者或家属。

1.2 主要材料与试剂

人 HSCC 细胞株 FaDu 及 DDP 耐药细胞株 FaDu/DDP(武汉淼灵生物),DDP(美国 Sigma 公司),胰蛋白酶和 DMEM 培养液(美国 GibcoBRL 公司),反转录试剂盒和荧光定量测定试剂盒(大连 Takara 公司),TRIzol试剂和 LipofectAMINE 3000 转染试剂盒(美国 Invitrogen公司),CCK-8 试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 试剂盒(日本同仁化学公司),免疫荧光染色试剂盒(北京索莱宝生物公司),BCA 蛋白测定试剂盒和 ECL 发光液(上海碧云天生物研究所),兔抗人 LC3B 多克隆抗体、兔抗人 Beclin-1 多克隆抗体、兔抗人 p62 多克隆抗体、FITC 偶联的山羊抗兔、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗兔或山羊抗鼠以及兔抗人 GAPDH 多克隆抗体(英国 Abcam 公司)。引物序列及 siRNA 序列由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。

1.3 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

应用 TRIzol 法分别提取 HSCC 组织、癌旁组织、FaDu 细胞和 FaDu/DDP 细胞的总 RNA,NanoVueTM Plus 光度计检测 RNA 的纯度和浓度,取合格的 RNA 样品(A260/A280 为 1.8 ~ 2.1)进行逆转录,按照试剂盒说明书合成 cDNA,再以 cDNA 为模板,使用 SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒进行 qRT-PCR 扩增。扩增条件为:95 ℃ 5 min,循环 1 次;95 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s,循环 40 次。采用比较循环阈值 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的相对表达水平,以 GAPDH 为内参,各组设置 3 个复孔。引物序列如下:lncRNA BLACAT1 上游 5'-TGA CGTCTTACTACACCCATCCT-3',下游 5'-CTGC-CACCTATAGGAAATGCG-3';GAPDH 上游 5'-TGTGA-AGGTCGGTGTGAAC-3',下游 5'-CAGATGGTGATGGG-CTGCC-3'。

1.4 CCK-8 检测细胞存活率

取生长状态良好的 FaDu 细胞和 FaDu/DDP 细胞,按照 1×10^4/孔的密度单层接种于 96 孔板,于 37 ℃、5% CO_2 的孵育器中培养 24 h 后,分别加入不同浓度(3.125、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L)的 DDP 进行处理,每个浓度设置 5 个复孔,培养 48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂液混匀继续培养 4 h,采用全自动酶标仪在 450 nm 处检测各孔细胞光密度(OD)值,计算细胞存活率。细胞存活率 =(实验 OD 值 - 背景 OD 值)/(未经处理 OD 值 - 背景 OD 值)×100%。

1.5 细胞转染、分组与 DDP 处理

转染前 24 h,取状态良好的 FaDu/DDP 细胞按照 1×10^4/孔的密度单层接种于 24 孔板,置于 37 ℃、5% CO_2 的孵育器中培养。采用 LipofectAMINE 3000 转染 siRNA 序列至 FaDu/DDP 细胞,其中对照组 FaDu/DDP 细胞正常培养;si-NC 组 FaDu/DDP 细胞转染 siRNA 阴性对照;si-BLACAT1 组 FaDu/DDP 细胞转染 siRNA-BLACAT1。转染后收集细胞,qRT-PCR 测定各组细胞内 lncRNA BLACAT1 mRNA 表达量,以确定转染是否成功。

使用不同浓度(3.125、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L)的 DDP 处理各转染组 FaDu/DDP 细胞,其中 DDP 组 FaDu/DDP 细胞仅加入不同浓度 DDP 处理,si-NC + DDP 组 FaDu/DDP 细胞转染 siRNA 阴性对照后加入不同浓度 DDP 处理;si-BLACAT1 + DDP 组 FaDu/DDP 细胞转染 siRNA-BLACAT1 后加入不同浓度 DDP 处理。培养 48 h 后,CCK-8 检测细胞存活率,非线性回归计算 si-BLACAT1 + DDP 组的 IC_{50} 值。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况

收集转染后经 DDP 处理的各组 FaDu/DDP 细胞,胰酶消化,重悬于 500 μL 结合缓冲液中,接着在细胞悬浮液中依次加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 双染色剂,混匀后室温避光孵育 15 min,流式细胞仪测定细胞凋亡情况。

1.7 自噬结构分析

PBS 洗涤各组 FaDu/DDP 细胞,加入含 4% 多聚甲醛和 0.2% 戊二醛的 PBS 固定,再用 1% 四氧化锇固定,采用乙醇和丙酮进行分级脱水,包埋后切成超薄切片,采用 3% 柠檬酸铅—醋酸双氧铀染色,铜网烤干,透射电子显微镜下成像,观察细胞自噬情况。

1.8 免疫荧光染色观察自噬斑点

各组 FaDu/DDP 细胞进行爬片,PBS 洗涤后,4% 多聚甲醛固定 20 min,配制 0.3% Triton X-100 溶液并加入细胞中透化处理 10 min,再用山羊血清封闭 10 min,于 4 ℃ 下加入兔抗人 LC3B 多克隆抗体(1∶200)反应过夜;次日 PBS 洗涤,添加 FITC 偶联的山羊抗兔二抗(1∶500)室温避光反应 1 h,再以 DAPI

复染5 min,封片。在共聚焦激光荧光显微镜下计数细胞内LC3B荧光斑点数。

1.9 Western blot检测相关蛋白表达

收集各组FaDu/DDP细胞,采用RIPA裂解细胞,离心收集蛋白样品,BCA法测定蛋白浓度。制备10% SDS-PAGE,按照每个泳道40 μg蛋白的量上样,进行电泳分离,电转移至PVDF膜上;TBST洗涤后置于5%山羊血清中室温封闭2 h,弃去封闭液,TBST洗涤,加入一抗(LC3-Ⅰ、LC3-Ⅱ、Beclin-1和p62),均按照1∶1 000稀释,4 ℃下孵育过夜。次日TBST洗膜后,与对应HRP标记的二抗(1∶5 000)室温共同孵育2 h,结束后取膜,TBST再次洗涤,ECL试剂液显影,Image J软件分析各蛋白条带灰度值,以GAPDH为内参蛋白,计算各蛋白表达量。

1.10 统计学分析

使用Graphpad prism 8.3软件分析数据,绘制统计图。计量资料均符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间比较采用t检验,多组间比较采用*ANOVA*分析,组间两两比较采用*LSD-t*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSCC组织及癌旁组织中lncRNA BLACAT1的表达

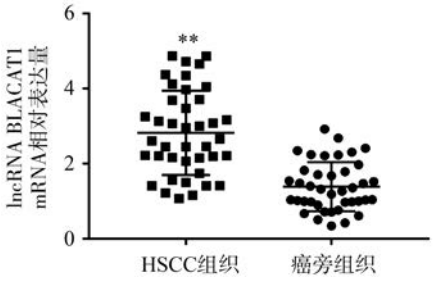
qRT-PCR检测结果显示,HSCC组织中lncRNA BLACAT1 mRNA相对表达量显著高于癌旁组织($P<0.01$),见图1。

2.2 FaDu细胞及FaDu/DDP细胞中lncRNA BLACAT1的表达

qRT-PCR检测结果显示,与FaDu细胞比较,FaDu/DDP细胞中lncRNA BLACAT1 mRNA相对表达量较高($P<0.05$),见图2。

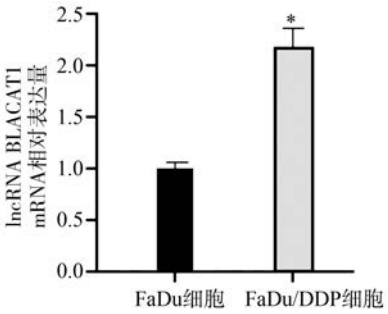
2.3 抑制lncRNA BLACAT1对DDP处理后FaDu/DDP细胞活性的影响

qRT-PCR检测结果显示,si-BLACAT1组细胞lncRNA BLACAT1 mRNA相对表达量低于对照组和si-NC组($P<0.05$),见图3a。CCK-8检测结果显示,经不同浓度DDP处理后FaDu细胞和FaDu/DDP细胞存活率均呈下降趋势,当DDP作用浓度在6.25 μmol/L及以上时,FaDu/DDP细胞存活率高于FaDu细胞($P<0.05$),见图3b。经3.125 μmol/L及以上浓度DDP处理后,si-BLACAT1+DDP组细胞存活率低于DDP组和si-NC+DDP组($P<0.05$),见图3c。si-BLACAT1+DDP组细胞对DDP的IC_{50}值为24.29 μmol/L,因此后续选择25 μmol/L浓度作为DDP的处理浓度。



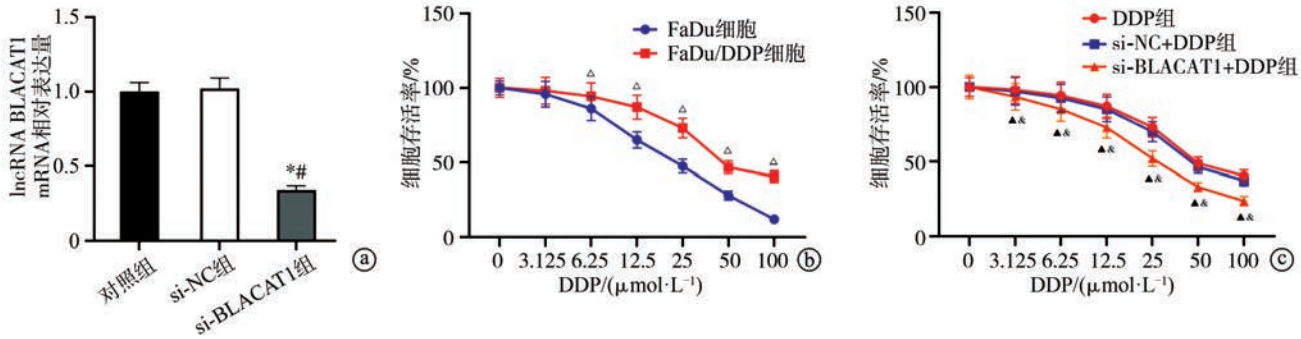
**:与癌旁组织比较,$P<0.01$

图1 HSCC组织和癌旁组织中lncRNA BLACAT1 mRNA的表达



*:与FaDu细胞比较,$P<0.05$

图2 FaDu细胞及FaDu/DDP细胞中lncRNA BLACAT1 mRNA的表达



a:转染后各组FaDu/DDP细胞中lncRNA BLACAT1 mRNA的表达;b:不同浓度DDP处理后FaDu/DDP细胞存活率;c:不同浓度DDP处理后各转染组FaDu/DDP细胞存活率 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与si-NC组比较,$P<0.05$;△:与FaDu细胞比较,$P<0.05$;▲:与DDP组比较,$P<0.05$;&:与si-NC+DDP组比较,$P<0.05$

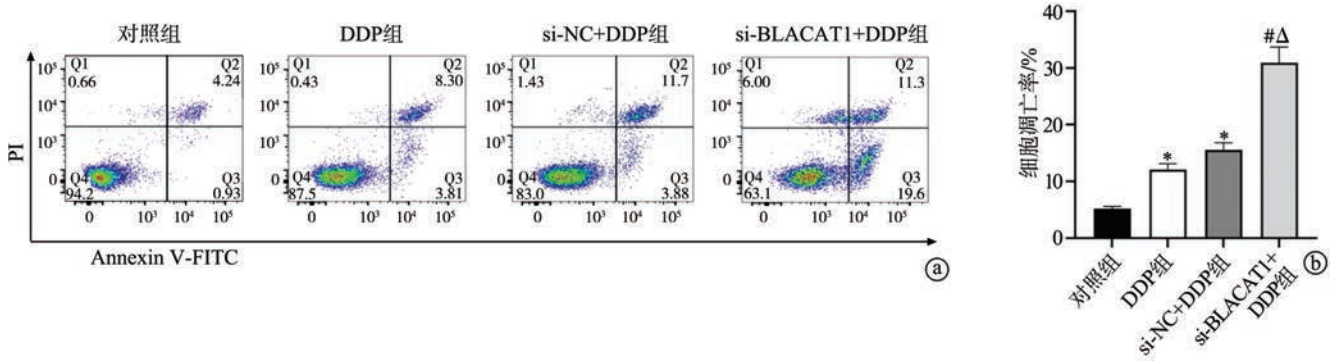
图3 FaDu/DDP细胞中lncRNA BLACAT1 mRNA的表达及不同浓度DDP处理后细胞存活率

2.4 抑制 lncRNA BLACAT1 对 DDP 处理后 FaDu/DDP 细胞凋亡的影响

流式细胞术结果显示,与对照组比较,DDP 组和 si-NC + DDP 组 FaDu/DDP 细胞凋亡率升高($P<0.05$);与 DDP 组和 si-NC + DDP 组比较,si-BLACAT1 + DDP 组细胞凋亡率也升高($P<0.05$),见图 4。

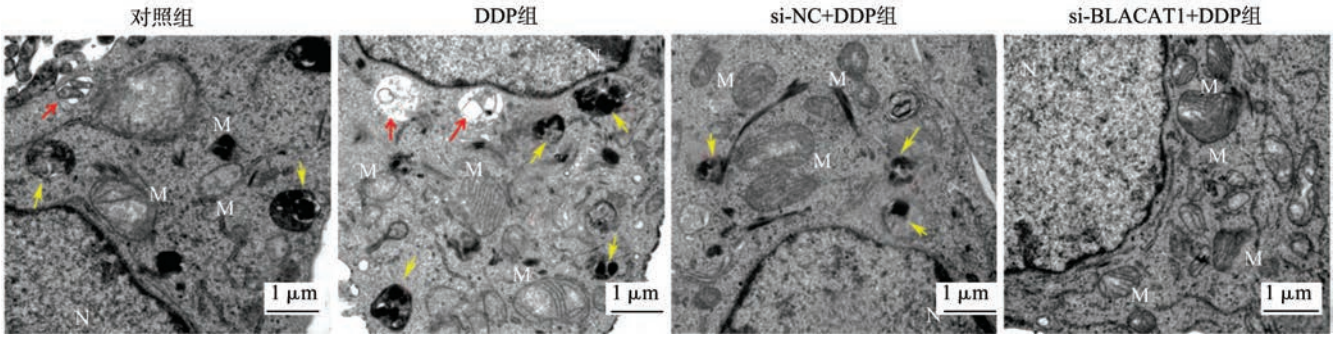
2.5 抑制 lncRNA BLACAT1 对 DDP 处理后 FaDu/DDP 细胞自噬的影响

透射电子显微镜观察细胞自噬超微结构,结果显示,对照组有一些自噬体和自噬溶酶体形成,DDP 组和 si-NC + DDP 组内自噬溶酶体形成均较多,且 DDP 组可见自噬体,而 si-BLACAT1 + DDP 组细胞中未观察到自噬体及自噬溶酶体,见图 5。免疫荧光染色结果显示,各组细胞均有绿色斑点,DDP 组和 si-NC + DDP 组细胞内 LC3B 荧光斑点数较对照组增加($P<0.05$);si-BLACAT1 + DDP 组细胞内 LC3B 荧光斑点数较 DDP 组和 si-NC + DDP 组均减少($P<0.05$),见图 6。说明 si-BLACAT1 + DDP 组细胞自噬受到抑制。Western blot 检测结果亦显示,与对照组比较,DDP 组和 si-NC + DDP 组 FaDu/DDP 细胞中 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平上调,Beclin-1 蛋白表达量上升,p62 蛋白表达量下降($P<0.05$);与 DDP 组和 si-NC + DDP 组比较,si-BLACAT1 + DDP组细胞中 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平下调,Beclin-1蛋白表达量下降,p62 蛋白表达量上升($P<0.05$),见图 7。



a:流式细胞术检测 FaDu/DDP 细胞凋亡水平;b:FaDu/DDP 细胞凋亡率 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 DDP 组比较,$P<0.05$;△:与 si-NC + DDP 组比较,$P<0.05$

图 4 各组 FaDu/DDP 细胞凋亡情况



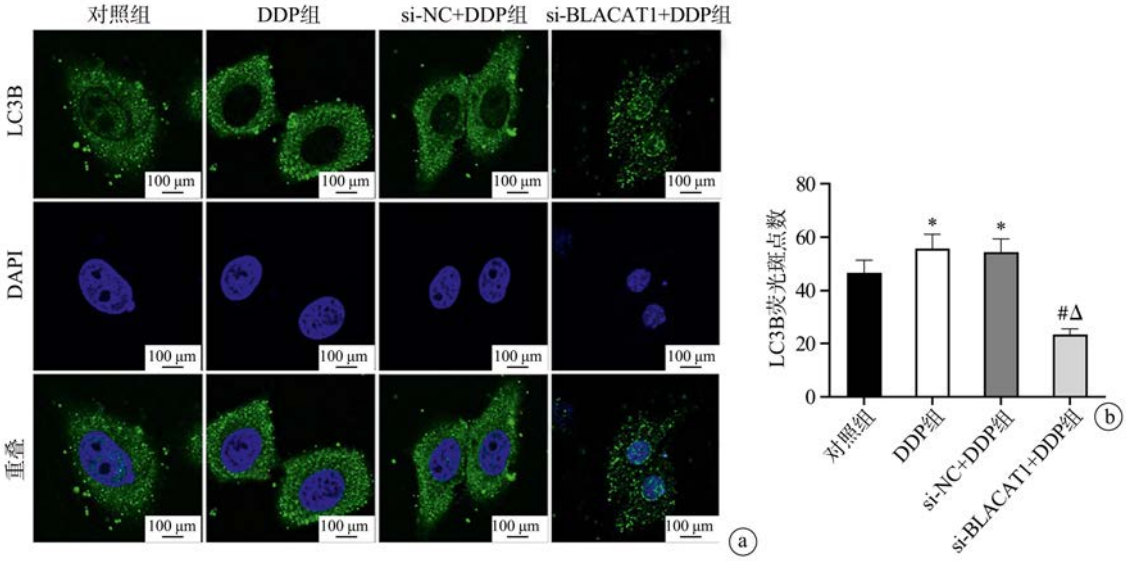
M:线粒体;N:细胞核;红色箭头:自噬体;黄色箭头:自噬溶酶体

图 5 细胞自噬超微结构

3 讨论

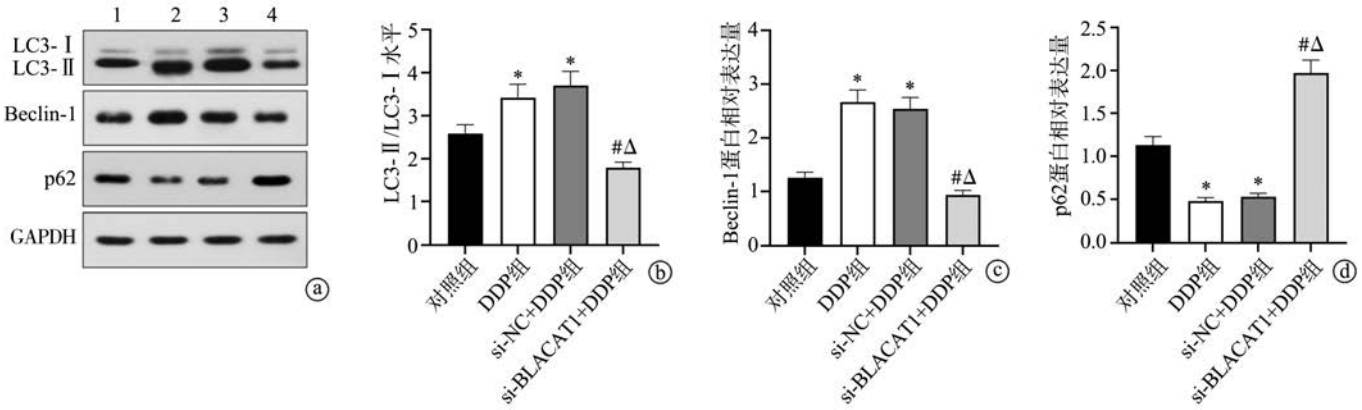
HSCC 是恶性程度较高的头颈癌之一,近年来其发病率在世界范围内呈升高趋势。虽然有手术切除、化疗和放疗等综合治疗方法,但 HSCC 患者的预后仍然很差。化疗抗性是导致 HSCC 治疗失败的重要因素,尽管目前已经进行了大量研究以寻找导致各种肿瘤类型化疗抗性的因素,但关于 HSCC 化疗抗性的潜在机制仍尚未完全明确。DDP 是一种铂类抗癌药物,可用于多种癌症的治疗,但其存在严重的副作用,且患者长期使用 DDP 会产生化疗抗性,使得该药物的临床应用受到限制[9]。因此,探究 HSCC 中 DDP 抗性获得的分子机制对于提高 HSCC 患者的治疗效果至关重要。

本研究结果显示,HSCC 组织中 lncRNA BLACAT1 的表达明显高于癌旁组织,提示 lncRNA BLACAT1 可能参与调控 HSCC 的相关病理过程。lncRNA 在细胞生物学行为中的分子机制极其复杂,以往研究表明,lncRNA BLACAT1 在不同癌症组织及细胞中广泛异常表达,并具有一定的调控作用。Li 等[10] 发现在神经胶



a:免疫荧光染色观察 FaDu/DDP 细胞中 LC3B 荧光斑点;b:LC3B 荧光斑点数 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 DDP 组比较,$P<0.05$;△:与 si-NC + DDP 组比较,$P<0.05$

图 6 各组 FaDu/DDP 细胞自噬荧光斑点数



a:Western blot 检测 FaDu/DDP 细胞自噬相关蛋白表达;b:FaDu/DDP 细胞中 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平;c:FaDu/DDP 细胞中 Beclin-1 蛋白相对表达;d:FaDu/DDP 细胞中 p62 蛋白相对表达 1:对照组;2:DDP 组;3:si-NC + DDP 组;4:si-BLACAT1 + DDP 组;*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与 DDP 组比较,$P<0.05$;△:与 si-NC + DDP 组比较,$P<0.05$

图 7 各组 FaDu/DDP 细胞自噬相关蛋白表达

质瘤组织及其 5 个不同细胞系中 lncRNA BLACAT1 表达均升高,并可通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路促进神经胶质瘤细胞的增殖和侵袭。Xu 等[11]发现,lncRNA BLACAT1 的高表达与非小细胞肺癌的总生存期和无进展生存期缩短显著相关,沉默 lncRNA BLACAT1通过调节上皮间质转化和 Wnt/β-catenin 信号通路从而抑制非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭。本研究发现,FaDu/DDP 细胞中 lncRNA BLACAT1 表达水平高于 FaDu 细胞,由此推测,lncRNA BLACAT1 可能参与 HSCC 细胞 DDP 化疗抗性的产生。以往研究探讨了 lncRNA BLACAT1 在化疗敏感性方面的作用,结果显示,在阿法替尼耐药的非小细胞肺癌细胞中 lncRNA BLACAT1 表达升高,下调其表达可以逆转肿瘤细胞对阿法替尼的耐药性[12];lncRNA BLACAT1 在奥沙利铂抗性胃癌组织和细胞中的表达均高于奥沙利铂敏感的胃癌组织和细胞,沉默 lncRNA BLACAT1 可促进体内外奥沙利铂抗性胃癌细胞的凋亡,并抑制肿瘤的生长和转移[13]。本研究在 FaDu/DDP 细胞中抑制 lncRNA BLACAT1 表达,并经 DDP 处理后 FaDu/DDP 细胞存活率降低,细胞凋亡率升高,提示抑制 lncRNA BLACAT1 表达可提高 HSCC 耐药细胞对 DDP 的敏感性,进一步明确了 lncRNA BLACAT1 参与肿瘤细胞化疗抗性的产生。

有研究显示,参与肿瘤细胞化疗抗性形成的机制较多,如 DNA 损伤修复、细胞凋亡抗性、溶酶体膜透化、细胞周期阻滞和自噬等[14-15]。自噬作为一种高度

进化的保守过程,几乎发生在所有真核细胞中,并与各种生理和病理过程有关;在该过程中无功能和受损细胞器被降解,以获取能量及完成细胞器的更新,满足细胞的基本代谢需要,自噬介导的强大保护作用使得细胞能够对各种内在或外在刺激作出反应。有研究发现,化疗可促进自噬过程,而抑制自噬可增加化疗诱导的细胞凋亡[16-18]。本研究通过 DDP 处理 FaDu/DDP 细胞后发现,细胞内自噬体和自噬溶酶体的形成增加,LC3B 荧光斑点数增加,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平上调,Beclin-1 蛋白表达量上升,p62 蛋白表达量下降;而在抑制 lncRNA BLACAT1 的表达后,细胞内未观察到自噬体及自噬溶酶体,LC3B 荧光斑点数减少,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平下调,Beclin-1 蛋白表达量下降,p62 蛋白表达量上升,表明抑制 lncRNA BLACAT1 表达可减少 FaDu/DDP 细胞自噬,从而促进 DDP 诱导的 FaDu/DDP 细胞凋亡。

综上所述,lncRNA BLACAT1 在 HSCC 组织及 DDP 耐药细胞株 FaDu/DDP 中高表达,通过外源性抑制 lncRNA BLACAT1 的表达能够减少自噬,逆转 FaDu/DDP 细胞对 DDP 的耐药性,提示 lncRNA BLACAT1 可作为 HSCC 化疗的耐药分子标志物。但本研究只对 lncRNA BLACAT1 影响 HSCC 化疗敏感性的可能机制进行了初步探索,后续需进一步明确其具体分子机制,完善 lncRNA BLACAT1 在 HSCC 中的相关作用,为 HSCC 的精准化治疗提供有力的实验依据。

[参考文献]

[1] Iuchi H,Kyutoku T,Ito K,et al. Impacts of inflammation-based prognostic scores on survival in patients with hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. OTO Open,2020,4(4):2473974X20978137. doi:10.1177/2473974X20978137.

[2] Wang J,Tian S,Sun J,et al. The presence of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) and the ratios between different subsets serve as prognostic factors in advanced hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer,2020,20(1):731. doi:10.1186/s12885-020-07234-0.

[3] Rosenberg AJ,Vokes EE. Optimizing treatment de-escalation in head and neck cancer:current and future perspectives[J]. Oncologist,2021,26(1):40-48. doi:10.1634/theoncologist.2020-0303.

[4] Fang Z,Zhao J,Xie W,et al. LncRNA UCA1 promotes proliferation and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma by sunppressing miR-184 expression[J]. Cancer Med,2017,6(12):2897-2908. doi:10.1002/cam4.1253.

[5] Jiang Q,Liu S,Hou L,et al. The implication of LncRNA MALAT1 in promoting chemo-resistance of laryngeal squamous cell carcinoma cells[J]. J Clin Lab Anal,2020,34(4):e23116. doi:10.1002/jcla.23116.

[6] Hu Y,Pan J,Wang Y,et al. Long noncoding RNA linc-UBC1 is negative prognostic factor and exhibits tumor pro-oncogenic activity in gastric cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(1):594-600.

[7] Chen W,Hang Y,Xu W,et al. BLACAT1 predicts poor prognosis and serves as oncogenic lncRNA in small-cell lung cancer[J]. J Cell Biochem,2018. doi:10.1002/jcb.27548.

[8] Gao X,Wen J,Gao P,et al. Overexpression of the long non-coding RNA,linc-UBC1,is associated with poor prognosis and facilitates cell proliferation,migration,and invasion in colorectal cancer[J]. Onco Targets Ther,2017,10:1017-1026. doi:10.2147/OTT.S129343.

[9] Makovec T. Cisplatin and beyond:molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy[J]. Radiol Oncol,2019,53(2):148-158. doi:10.2478/raon-2019-0018.

[10] Li X,Qi S,Ma D,et al. Long non-coding RNA BLACAT1 promotes the proliferation and invasion of glioma cells via Wnt/β-catenin signaling[J]. Exp Ther Med,2019,17(6):4703-4708. doi:10.3892/etm.2019.7468.

[11] Xu R,Cao XR,Zhang BQ,et al. BLACAT1 is negatively associated with prognosis in patients with NSCLC and inhibits cell progression,metastasis and epithelial-mesenchymal transition through down-regulating Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(14):6217-6225. doi:10.26355/eurrev_201907_18439.

[12] Shu D,Xu Y,Chen W. Knockdown of lncRNA BLACAT1 reverses the resistance of afatinib to non-small cell lung cancer via modulating STAT3 signalling[J]. J Drug Target,2020,28(3):300-306. doi:10.1080/1061186X.2019.1650368.

[13] Wu X,Zheng Y,Han B,et al. Long noncoding RNA BLACAT1 modulates ABCB1 to promote oxaliplatin resistance of gastric cancer via sponging miR-361[J]. Biomed Pharmacother,2018,99:832-838. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.130.

[14] Huang T,Song X,Yang Y,et al. Autophagy and hallmarks of cancer[J]. Crit Rev Oncog,2018,23(5/6):247-267. doi:10.1615/CritRevOncog.2018027913.

[15] Pérez-Hernández M,Arias A,Martínez-García D,et al. Targeting autophagy for cancer treatment and tumor chemosensitization[J]. Cancers (Basel),2019,11(10):1599. doi:10.3390/cancers11101599.

[16] Dubois C,Kondratskyi A,Bidaux G,et al. Co-targeting mitochondrial Ca^{2+} homeostasis and autophagy enhances cancer cells' chemosensitivity[J]. iScience,2020,23(7):101263. doi:10.1016/j.isci.2020.101263.

[17] Zhou F,Yang X,Zhao H,et al. Down-regulation of OGT promotes cisplatin resistance by inducing autophagy in ovarian cancer[J]. Theranostics,2018,8(19):5200-5212. doi:10.7150/thno.27806.

[18] Gasiorkiewicz BM,Koczurkiewicz-Adamczyk P,Piska K,et al. Autophagy modulating agents as chemosensitizers for cisplatin therapy in cancer[J]. Invest New Drugs,2021,39(2):538-563. doi:10.1007/s10637-020-01032-y.

(编辑:龙小芬)