doi:10.11659/jjssx.12E021190

·基础研究·

LncRNA TTN-AS1 调控 miR-139-5p/PDK1/AKT/Caspase-3 信号通路促进鼻咽癌的生长和转移

刘春江,司峰志 (新疆医科大学第二附属医院耳鼻喉科,新疆 乌鲁木齐 830092)

[摘 要] **目的** 探究 lncRNA TTN-AS1 对鼻咽癌生长和转移的影响及机制。**方法** qRT-PCR 检测 TTN-AS1 在 NP69、TW03、C666-2、CNE2 细胞中的表达。将 CNE2 细胞分为 si-NC 组(转染 TTN-AS1 siRNA Negative Control)、si-TTN-AS1 组(转染TTN-AS1 siRNA)、si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组(共转染 TTN-AS1 siRNA 和 miR-139-5p inhibitor)、si-TTN-AS1 + PDK1 组(共转染 TTN-AS1 siRNA 和 PDK1 质粒)。CCK-8 检测各组细胞增殖能力,流式细胞术检测细胞凋亡水平,Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力,双荧光素酶报告基因实验检测 lncRNA NNT-AS1 与 miR-139-5p 的靶向关系以及 miR-139-5p 与 PDK1 的靶向关系,Western blot 检测各组细胞 PDK1、p-AKT、AKT、Caspase-3 表达。**结果** TTN-AS1 在鼻咽癌细胞系 TW03、C666-2、CNE2 中的表达显著高于鼻咽上皮细胞系 NP69($P<0.05$)。相比于 si-NC 组,si-TTN-AS1 组 CNE2 细胞增殖能力显著降低($P<0.05$),细胞凋亡水平显著较高($P<0.05$),细胞迁移和侵袭数显著减少($P<0.05$)。miR-139-5p 为 TTN-AS1 的靶基因,PDK1 为 miR-139-5p 的靶基因。相比于 si-TTN-AS1组,si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组和 si-TTN-AS1 + PDK1 组 CNE2 细胞增殖能力显著增加($P<0.05$)、细胞迁移和侵袭数显著增加($P<0.05$),细胞凋亡水平显著较低($P<0.05$)。相比于 si-NC 组,si-TTN-AS1 组 CNE2 细胞中 PDK1 蛋白表达显著下调($P<0.001$),Caspase-3 蛋白表达显著上调($P<0.001$),p-AKT 水平显著下调($P<0.001$);相比于 si-TTN-AS1 组,si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组和 si-TTN-AS1 + PDK1 组 CNE2 细胞中 PDK1 蛋白表达显著上调($P<0.001$),Caspase-3 蛋白表达显著下调($P<0.001$),p-AKT 水平显著上调($P<0.001$)。**结论** LncRNA TTN-AS1 可抑制鼻咽癌细胞的生长和转移,其机制为调控 miR-139-5p/PDK1/AKT/Caspase-3 信号通路。

[关键词] lncRNA TTN-AS1;鼻咽癌;生长和转移;机制

[中图分类号] R394.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-12-27

LncRNA TTN-AS1 regulates the miR-139-5p/PDK1/AKT/Caspase-3 signaling pathway to promote the growth and metastasis of nasopharyngeal carcinoma

LIU Chun-jiang, SI Feng-zhi (Department of Otorhinolaryngology, Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830092, China)

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of lncRNA TTN-AS1 on the growth and metastasis of nasopharyngeal carcinoma. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of TTN-AS1 in NP69, TW03, C666-2, and CNE2 cells. CNE2 cells were divided into the si-NC group (transfected with TTN-AS1 siRNA Negative Control), the si-TTN-AS1 group (transfected with TTN-AS1 siRNA), the si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor group (co-transfected with TTN-AS1 siRNA and miR-139-5p inhibitor), and the si-TTN-AS1 + PDK1 group (co-transfected with TTN-AS1 siRNA and PDK1 plasmid). CCK-8 method was used to detect the cell proliferation ability in each group; flow cytometry was used to detect the cell apoptosis level; Transwell chamber method was used to detect the cell migration and invasion ability; dual luciferase reporter gene assay was used to detect the targeting relationship between lncRNA NNT-AS1 and miR-139-5p, and the targeting relationship between miR-139-5p and PDK1; Western blot was used to detect the expression of PDK1, p-AKT, AKT, and Caspase-3 in each group. **Results** The expression of TTN-AS1 in the nasopharyngeal carcinoma cell lines TW03, C666-2, and CNE2 was significantly higher than that of the nasopharyngeal epithelial cell line NP69 ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the proliferation ability of CNE2 cell in the si-TTN-AS1 group was significantly decreased ($P<0.05$), the level of cell apoptosis was significantly increased ($P<0.05$), and the number of cell migration and invasion was significantly decreased ($P<0.05$). miR-139-5p was the target gene of TTN-AS1, and PDK1 was the target gene of miR-139-5p. Compared with the si-TTN-AS1 group, the cell proliferation ability of the si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor group and the si-TTN-AS1 + PDK1 group was significantly increased ($P<0.05$), the number of cell migration and invasion was significantly increased ($P<0.05$), and the level of cell apoptosis was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the si-NC group, the expression of PDK1 protein of the CNE2 cells in the si-TTN-AS1 group was significantly down-regulated ($P<0.001$), the expression of

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2021D01C375)

[通信作者] 司峰志,E-mail:95445860@qq.com

Caspase-3 protein was significantly up-regulated ($P<0.001$), and the level of p-AKT was significantly down-reduced ($P<0.001$). Compared with si-TTN-AS1 group, the expression of PDK1 protein of the CNE2 cells in the si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor group and the si-TTN-AS1 + PDK1 group was significantly up-regulated ($P<0.001$), the expression of Caspase-3 protein was significantly down-regulated ($P<0.001$), and the level of p-AKT was significantly up-regulated ($P<0.001$). **Conclusion** LncRNA TTN-AS1 can regulate the growth and metastasis of nasopharyngeal carcinoma by regulating the miR-139-5p/PDK1/AKT/Caspase-3 signaling pathway.

Keywords: lncRNA TTN-AS1; nasopharyngeal carcinoma; growth and metastasis; mechanism

鼻咽癌是常见的头颈部恶性肿瘤,起源于鼻黏膜上皮组织[1],虽然鼻咽癌细胞对放疗敏感,但由于鼻咽癌的发生部位隐匿,在早期不容易被发现及诊断,患者往往在确诊时已处于中晚期,为肿瘤的治疗带来一定的困难;中晚期鼻咽癌患者 5 年生存率不足 50%、严重威胁患者生命健康[2-3]。因此,深入研究鼻咽癌的发病机制,寻找新的诊断和治疗靶点意义重大。长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)是近年来被发现可调控肿瘤病理过程且具有成为肿瘤诊断和治疗靶点潜力的非编码 RNA[4],可在表观遗传水平、转录水平和转录后水平调控肿瘤的生长、转移、耐药、免疫逃逸等,从而影响肿瘤的发生发展[5]。在鼻咽癌中,lncRNA FAM225A 可通过调控 miR-590-3p/miR-1275 促进鼻咽癌细胞的生长和转移[6],lncRNA SNHG7 可调控上皮间充质转化从而促进鼻咽癌的生长[7]。LncRNA TTN-AS1(TTN-AS1)可调控多种肿瘤,如 TTN-AS1 结合 miR-376a-3p 可促进子宫内膜癌的发展[8],TTN-AS1 可通过激活 DGCR8 促进乳腺癌的转移[9],但是 TTN-AS1 在鼻咽癌中的作用目前尚不明确。因此,本文探究 TTN-AS1 对鼻咽癌细胞增殖、凋亡和转移的影响及其机制,以期为鼻咽癌的诊治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

鼻咽癌细胞系 TW03、C666-2、CNE2,鼻咽上皮细胞系 NP69,人胚胎肾细胞 HEK 293T 购自中科院上海细胞库;PrimeScript RT reagent Kit、Power SYBR Green 试剂盒购自日本 TAKARA 公司;Lipofectamine 2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;CCK-8 试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购自沈阳万类生物技术有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;PDK1 抗体、Caspase-3 抗体、AKT 抗体、p-AKT 抗体、GAPDH 抗体购自美国 Cell signaling Technlongy 公司。

1.2 细胞培养

TW03、C666-2、CNE2、NP69 细胞均培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,HEK 293T 细胞培养于 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,细胞复苏后置于 37 ℃、5% CO_2 恒温恒湿的细胞培养箱中,培养至细胞密度达 80% 时进行细胞传代,取对数生长期的细胞进行细胞转染。

1.3 细胞转染与分组

将 CNE2 细胞分为 si-NC 组、si-TTN-AS1 组、si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组、si-TTN-AS1 + PDK1 组,使用 Lipofectamine 2000 试剂盒,si-NC 组和 si-TTN-AS1组分别转染 TTN-AS1 siRNA Negative Control 和 TTN-AS1 siRNA,si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组共转染 TTN-AS1 siRNA 和 miR-139-5p inhibitor,si-TTN-AS1 + PDK1 组共转染 TTN-AS1 siRNA 和 PDK1 质粒,转染完成后继续培养 24 h,进行后续研究。

1.4 qRT-PCR

根据 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA,取 1 μg 的总 RNA 使用 PrimeScript RT reagent Kit 将其逆转录为 cDNA,所得 cDNA 使用 Power SYBR Green 试剂盒进行 qRT-PCR 反应,反应条件:50 ℃尿嘧啶 DNA 糖基化酶激活 2 min;95 ℃热启动 DNA 聚合酶 2 min;95 ℃变性 15 s,60 ℃退火/延伸 1 min,共 40 次循环。循环结束后设置 95 ℃ 15 s、60 ℃ 1 min、95 ℃ 15 s 进行 PCR 产物曲线溶解。记录各孔 Ct 值,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法以 GAPDH 为内参计算 TTN-AS1 的表达量,以 U6 为内参计算 miR-139-5p 的表达量。

表 1 引物序列

基因	引物序列
TTN-AS1	正向引物: CGGGAACAAGCCCTGTG
	反向引物: CCGGCCCAAAGATGATG
GAPDH	正向引物: TGCACCACCAACTGCTTAGC
	反向引物: GGCATGGACTGTGGTCATGAG
miR-139-5p	正向引物: UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU
	反向引物: ACUGGAGACACGUGCACUGUAGA
U6	正向引物: CTCGCTTCGGCAGCACA
	反向引物: AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.5 双荧光素酶报告基因实验

使用 StarBase 数据库预测 TTN-AS1 与 miR-139-5p 的结合位点,TargetScan 数据库预测 miR-139-5p 与 PDK1 的结合位点。采用 Lipofectamine 2000 试剂盒将 TTN-AS1 过表达质粒(TTN-AS1 WT)、突变质粒(TTN-AS1 MUT),PDK1 过表达质粒(PDK1 WT)和 PDK1 突变质粒(PDK1 MUT)转染至 HEK 293T 细胞,然后将 miR-NC 和 miR-139-5p mimic 转染至上述细胞,转染 24 h 后,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组细胞荧光酶活性。

1.6 CCK-8 检测细胞增殖情况

各组细胞按照每孔接种 2×10^3/100 μL 的密度平行接种于 4 块 96 孔板,置于细胞培养箱中,在接种 0 h、24 h、48 h、72 h 时,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,细胞培养箱中孵育 4 h 后,在酶标仪 450 nm波长处检测各孔吸光度值(OD 值)。

1.7 Transwell 小室检测细胞迁移与侵袭能力

各组细胞用不含血清的培养基重悬后,接种至 Transwell小室或铺有 Matrigel 胶的小室中,稀释 CNE2 细胞至 1×10^5/mL,每个小室中接种 100 μL,小室置于 24 孔板中,每孔加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基,培养箱中孵育 48 h 后取出小室,底部用无水甲醛固定后用结晶紫染色 10 min,清洗,晾干后于显微镜下观察并拍照,统计各组细胞迁移和侵袭数。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡情况

各组细胞用预冷的 PBS 洗涤 2 次,收集 1×10^5 个细胞并用 100 μL 1 × 结合缓冲液重悬。每管加入 5 μL FITC-Annexin V 和 5 μL PI 工作液。另准备两支新的流式管,每管加入 5 μL FITC-Annexin V 或 PI,用于流式单染的补偿调节,室温避光孵育 15 min,每管加入400 μL PBS,通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.9 Western blot 检测相关蛋白表达

使用 RIPA 蛋白裂解液试剂盒提取各组细胞总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后,将 Loading buffer 与蛋白样品 1∶1混合,沸水浴 5 min 后,取 10 μg 蛋白样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,80 V 30 min,120 V 恒压分离 60 min,随后 250 mA 恒流转膜 90 min,将蛋白转移至 PVDF 膜,经过封闭后与 PDK1、p-AKT、AKT、Caspase-3、GAPDH 一抗 4 ℃共孵育过夜,清洗后与山羊抗兔二抗共孵育 90 min,清洗后使用 ECL 试剂盒进行曝光并拍照,使用 Image J 软件进行定量分析。

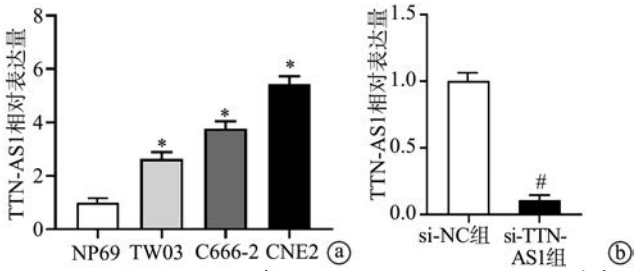
1.10 统计学分析

采用 GraphPadprism 7.0 软件进行统计分析,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间两两比较采用 *LSD-t* 检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TTN-AS1 在鼻咽癌细胞中高表达

qRT-PCR 检测结果显示,鼻咽癌细胞系 TW03、C666-2、CNE2 中 TTN-AS1 表达显著高于鼻咽上皮细胞系 NP69($P<0.05$),CNE2 细胞中 TTN-AS1 表达最高(图 1a),因此选择 CNE2 细胞转染 si-RNA 进行后续研究。相比于 si-NC 组,si-CCN-AS1 组 CNE2 细胞中 TTN-AS1 表达显著下调($P<0.05$),见图 1b。

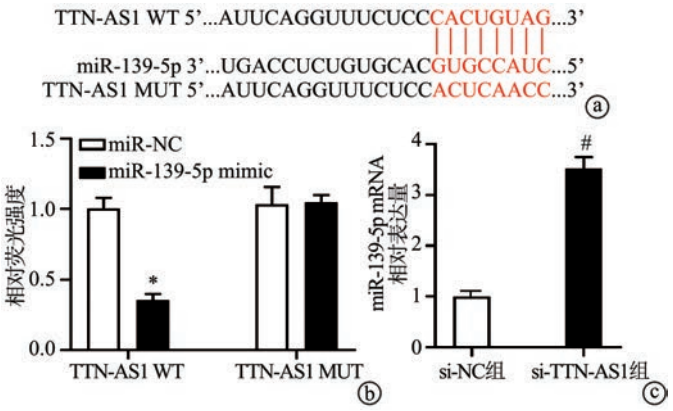


a:qRT-PCR 检测 TTN-AS1 在 TW03、C666-2、CNE2、NP69 细胞中的表达;b:qRT-PCR 检测 si-NC 组和 si-TTN-AS1 组 CNE2 细胞中 TTN-AS1 的表达 *:与 NP69 比较,$P<0.05$;#:与 si-NC 组比较,$P<0.05$

图 1 qRT-PCR 检测 TTN-AS1 在各鼻咽癌细胞以及转染后 CNE2 细胞中的表达

2.2 TTN-AS1 靶向调控 miR-139-5p

StarBase 数据库预测 TTN-AS1 与 miR-139-5p 的结合位点如图 2a 所示;双荧光素酶报告基因检测结果显示,HEK 293T 细胞转染 TTN-AS1 WT 和 miR-139-5p mimic 后其相对荧光强度显著低于转染 TTN-AS1 WT 和 miR-NC 的细胞($P<0.001$),而共转染 TTN-AS1 MUT 和 miR-139-5p mimic 的 HEK 293T 细胞与共转染 TTN-AS1 MUT 和 miR-NC 的 HEK 293T 细胞比较,细胞的相对荧光强度无显著变化($P>0.05$),见图 2b;qRT-PCR 检测结果显示,si-TTN-AS1 组 CNE2 细胞中 miR-139-5p mRNA 表达显著高于 si-NC 组($P<0.001$),见图 2c;说明 TTN-AS1 可调控 miR-139-5p 的表达。



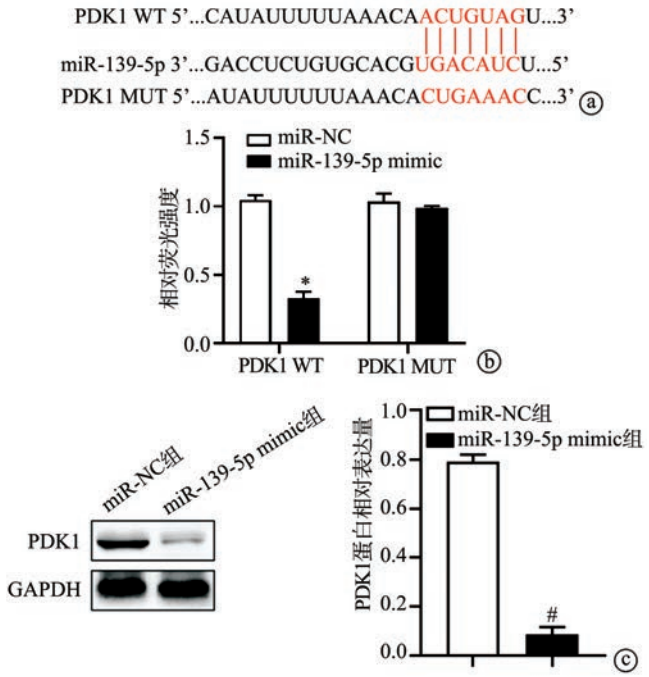
a:StarBase 数据库预测 TTN-AS1 和 miR-139-5p 的结合位点;b:双荧光素酶报告基因实验验证 TTN-AS1 和 miR-139-5p 的靶向关系;c:qRT-PCR 检测各组细胞 miR-139-5p mRNA 表达 *:与转染 miR-NC 比较,$P<0.001$;#:与 si-NC 组比较,$P<0.001$

图 2 TTN-AS1 靶向调控 miR-139-5p

2.3 miR-139-5p 靶向调控 PDK1

TargetScan 数据库预测 miR-139-5p 与 PDK1 结合位点如图 3a 所示;双荧光素酶报告基因检测结果显示,CNE2 细胞转染 PDK1 WT 和 miR-139-5p mimic 后其相对荧光强度显著低于转染 PDK1 WT 和 miR-NC 的细胞($P<0.001$),而 CNE2 细胞共转染 PDK1 MUT 和 miR-139-5p mimic 与共转染 PDK1 MUT 和 miR-NC

比较,细胞的相对荧光强度无显著变化($P>0.05$),见图 3b;Western blot 检测结果显示,miR-139-5p mimic 组 CNE2 细胞中 PDK1 蛋白表达显著低于 miR-NC 组($P<0.001$),见图 3c,说明 miR-139-5p 可调控 PDK1 蛋白的表达。



a:TargetScan 数据库预测 miR-139-5p 和 PDK1 的结合位点;b:双荧光素酶报告基因实验验证 miR-139-5p 和 PDK1 的靶向关系;c:Western blot 检测细胞 PDK1 蛋白表达 *:与转染 miR-NC 比较,$P<0.001$;#:与 miR-NC 组比较,$P<0.001$

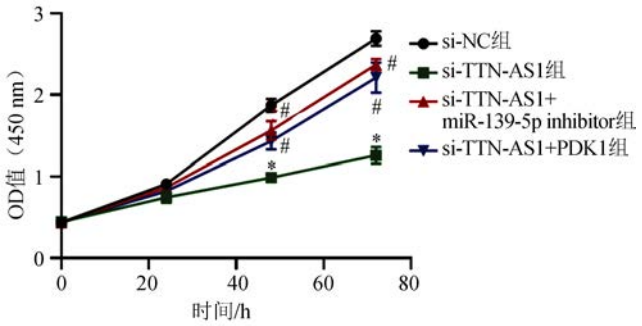
图 3 miR-139-5p 靶向调控 PDK1

2.4 TTN-AS1 调控 miR-139-5p/PDK1 影响鼻咽癌细胞的增殖、凋亡和迁移能力

CCK-8 检测结果显示,相比于 si-NC 组,si-TTN-AS1 组 CNE2 细胞增殖能力显著降低($P<0.05$),si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组和 si-TTN-AS1 + PDK1 组 CNE2 细胞增殖能力均显著高于 si-TTN-AS1 组($P<0.05$),见图 4。细胞迁移和侵袭检测结果显示,si-TTN-AS1 组 CNE2 细胞迁移和侵袭数显著少于 si-NC组($P<0.05$),si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组和 si-TTN-AS1 + PDK1 组细胞迁移和侵袭数均显著多于 si-TTN-AS1 组($P<0.05$),见图 5。流式细胞术检测结果显示,si-TTN-AS1组 CNE2 细胞凋亡水平显著高于 si-NC组($P<0.05$),si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组和si-TTN-AS1 + PDK1 组细胞凋亡水平均显著低于 si-TTN-AS1组($P<0.05$),见图 6。

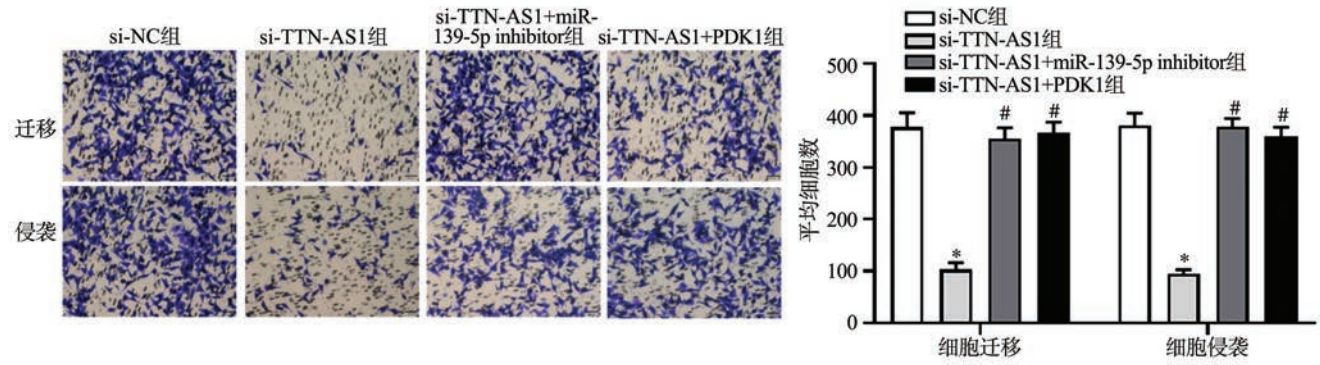
2.5 TTN-AS1 调控 miR-139-5p/PDK1/AKT/Caspase-3 信号通路

Western blot 检测结果显示,相比于 si-NC 组,si-TTN-AS1组 CNE2 细胞中 PDK1 蛋白表达显著下调($P<0.001$),Caspase-3 蛋白表达显著上调($P<0.001$),p-AKT水平显著下调($P<0.001$);相比于 si-TTN-AS1 组,si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组和 si-TTN-AS1 + PDK1 组 CNE2 细胞中 PDK1 蛋白表达显著上调($P<0.001$),Caspase-3 蛋白表达显著下调($P<0.001$),p-AKT 水平显著上调($P<0.001$),说明 TTN-AS1 调控 miR-139-5p/PDK1/AKT/Caspase-3 信号通路(图 7)。



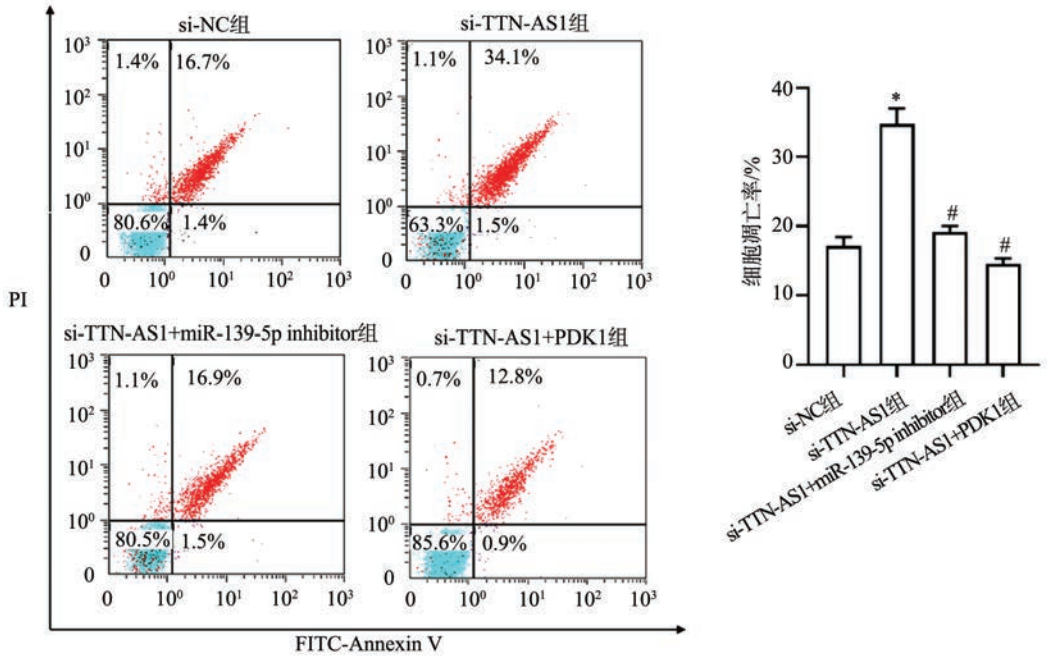
*:与 si-NC 组比较,$P<0.05$;#:与 si-TTN-AS1 组比较,$P<0.05$

图 4 CCK-8 检测各组细胞增殖能力



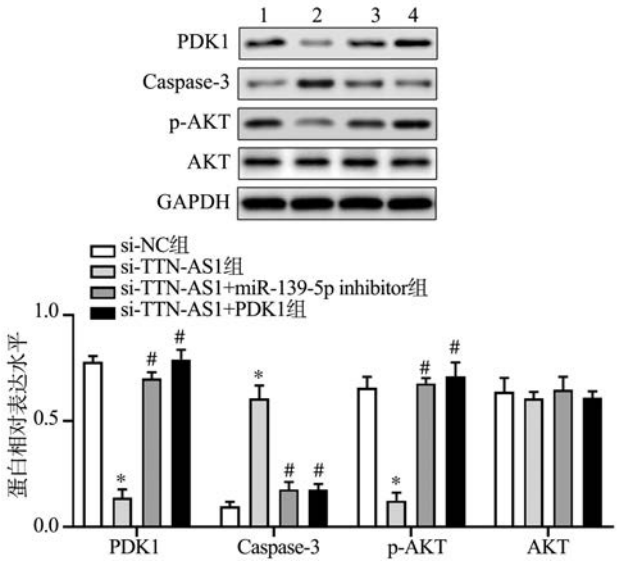
*:与 si-NC 组比较,$P<0.05$;#:与 si-TTN-AS1 组比较,$P<0.05$

图 5 Transwell 小室检测各组细胞迁移和侵袭能力



*:与 si-NC 组比较,$P<0.05$;#:与 si-TTN-AS1 组比较,$P<0.05$

图 6 流式细胞术检测各组凋亡细胞



1:si-NC 组;2:si-TTN-AS1 组;3:si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组;4:si-TTN-AS1 + PDK1 组 *:与 si-NC 组比较,$P<0.001$;#:与 si-TTN-AS1 组比较,$P<0.001$

图 7 TTN-AS1 调控 miR-139-5p/PDK1/AKT/Caspase-3 信号通路

3 讨论

鼻咽癌是一种常见的耳鼻喉恶性肿瘤,发病部位多为鼻咽腔顶部和侧壁,目前鼻咽癌的治疗方式主要为放疗和化疗,但是治疗效果并不理想,仍存在肿瘤转移、复发及预后较差等问题,因此需要探究更多鼻咽癌诊断和治疗的新靶点[10-11]。LncRNA 是一类长度超过 200 nt 的非编码 RNA,可在转录前、转录后以及蛋白翻译等过程中调控病理生理进程[12]。有研究发现,多种 lncRNA 的异常表达可促进肿瘤生长、转移及血管新生、免疫逃逸、化疗耐药等[13];亦有研究指出,lncRNA 具有肿瘤临床诊断和治疗的潜力[14]。鼻咽癌的发生发展受多种 lncRNA 的调控,如 lncRNA PVT1 可通过激活 KAT2A 乙酰转移酶和稳定 HIF-1α 促进鼻咽癌细胞的增殖[15];Liu 等[16]研究表明,lncRNA SNHG5 通过调控 miR-1179/HMGB3 信号通路促进鼻咽癌的发展;Wang 等[17]研究表明,下调 lncRNA SNHG7 可抑制 ROCK1 的表达,进而抑制鼻咽癌细胞的增殖和侵袭能力;而 Hu 等[18]的研究表明,lncRNA SNHG7 通过调控 miR-514a-5p/ELAVL1 轴促进鼻咽癌细胞的增殖。

TTN-AS1 是一种促癌基因,位于 2 号染色体,长度 1 077 bp,可通过海绵吸附的方式调控多种miRNA[19],从而影响肿瘤的发生发展,如 TTN-AS1 可以作用于 miR-376a-3p 促进大肠癌的进展[20];TTN-AS1 可通过作为 miR-376b-3p 的竞争性内源 RNA 促进胃癌进展[21];TTN-AS1 调控 miR-134-5p/PAK3 信号通路影响 P21 信号通路和 AKT/GSK-3β/β-catenin 信号通路,进而调控人大肠癌细胞的放疗敏感性[22]。本研究结果显示,TTN-AS1 在鼻咽癌细胞系中的表达显著高于其在鼻咽上皮细胞系中的表达,鼻咽癌细胞 CNE2 中转染 TTN-AS1 siRNA 抑制 TTN-AS1 表达后,CNE2 细胞的增殖、迁移和侵袭能力均显著降低,细胞凋亡能力显著增

加,说明抑制 TTN-AS1 表达可抑制鼻咽癌的进展。

LncRNA 发挥调控作用的重要机制是作为内源性 RNA 与 miRNA 结合,降低组织及细胞中靶 miRNA 丰度,减弱 miRNA 对 mRNA 结合作用及抑制 mRNA 翻译,从而提高 miRNA 靶蛋白表达水平[23],如 TTN-AS1 靶向抑制乳腺癌细胞中 miR-140-5p 表达[24];TTN-AS1 也可抑制 miR-1271 表达从而影响前列腺癌细胞的增殖和转移[25]。本研究通过数据库预测以及双荧光素酶报告基因实验验证发现,TTN-AS1 可靶向 miR-139-5p,miR-139-5p 可靶向结合于 PDK1 mRNA 的 3'UTR 区,TTN-AS1 可调控 miR-139-5p/PDK1 信号通路,且 si-TTN-AS1 + miR-139-5p inhibitor 组和 si-TTN-AS1 + PDK1 组细胞的增殖、迁移及侵袭能力均显著高于 si-TTN-AS1组,细胞凋亡水平显著低于 si-TTN-AS1 组,说明 TTN-AS1 可调控 miR-139-5p/PDK1 信号通路从而影响鼻咽癌细胞的生长和转移。

AKT 信号通路是调控肿瘤生长和转移的经典信号通路,该通路的激活可抑制肿瘤细胞的凋亡,促进肿瘤细胞的增殖;PDK1 是 AKT 上游的激活剂,可促进 AKT 的苏氨酸 308 位点的磷酸化,进而激活 AKT[26]。有研究表明,microRNA-503 可通过靶向 PDK1/AKT 信号通路抑制非小细胞肺癌进展[27],提高 PDK1 表达可激活 PI3K/AKT/mTOR 信号传导,进而促进肝细胞癌的抗辐射和去分化表型[28]。本研究结果显示,TTN-AS1可通过抑制 miR-139-5p 促进 PDK1 表达进而激活 AKT 信号通路。Caspase-3 是肿瘤中的促凋亡基因,AKT/Caspase-3 信号通路可调控多种细胞凋亡,如抑制 PI3K/AKT/Caspase-3 信号通路可抑制高糖诱导的人髓核细胞凋亡[29]。本研究结果显示,抑制TTN-AS1 后 Caspase-3 表达上调,抑制 TTN-AS1 并同时抑制 miR-139-5p或上调 PDK1 表达均可使 Caspase-3 表达下调,说明 TTN-AS1 可通过 miR-139-5p/PDK1 信号通路调控鼻咽癌细胞的凋亡。

综上所述,本课题组认为抑制 TTN-AS1 可通过调控 miR-139-5p/PDK1/AKT/Caspase-3 信号通路抑制鼻咽癌细胞的生长和转移。

[参考文献]

[1] Passarello K, Kurian S, Villanueva V. Endometrial cancer: an overview of pathophysiology, management, and care[J]. Semin Oncol Nurs, 2019, 35(2): 157 - 165. doi: 10.1016/j.soncn.2019.02.002.

[2] Trojano G, Olivieri C, Tinelli R, et al. Conservative treatment in early stage endometrial cancer: a review[J]. Acta Biomed, 2019, 90(4): 405 - 410. doi: 10.23750/abm.v90i4.7800.

[3] De Felice F, Marchetti C, Tombolini V, et al. Immune check-point in endometrial cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2019, 24(8): 910 - 916. doi: 10.1007/s10147 - 019 - 01437 - 7.

[4] Chen S, Shen X. Long noncoding RNAs: functions and mechanisms in colon cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 167 - 179. doi: 10.1186/s12943 - 020 - 01287 - 2.

[5] Tan YT, Lin JF, Li T, et al. LncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer[J]. Cancer Commun, 2021, 41(2): 109 - 120. doi: 10.1002/cac2.12108.

[6] Zheng ZQ, Li ZX, Zhou GQ, et al. Long noncoding RNA FAM225A promotes nasopharyngeal carcinoma tumorigenesis and metastasis by acting as ceRNA to sponge miR-590-3p/miR-1275 and upregulate ITGB3[J]. Cancer Res, 2019, 79(18): 4612 - 4626. doi: 10.1158/0008 - 5472.CAN - 19 - 0799.

[7] Xu W, Sun X, Zang C, et al. lncRNA SNHG7 promotes tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma via epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Oncol Lett, 2020, 20(4): 88 - 93. doi: 10.3892/ol.2020.11949.

[8] Shen L, Wu Y, Li A, et al. LncRNA TTN-AS1 promotes endometrial cancer by sponging miR-376a-3p[J]. Oncol Rep, 2020, 44(4): 1343 - 1354. doi: 10.3892/or.2020.7691.

[9] Qiu P, Dou Y, Ma LZ, et al. Long non-coding RNA TTN-AS1 promotes the metastasis in breast cancer by epigenetically activating DGCR8[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(14): 7559 - 7568. doi: 10.26355/eurrev_202007_22212.

[10] Chen YP, Chan ATC, Le QT, et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 2019, 394(10192): 64 - 80. doi: 10.1016/S0140 - 6736(19)30956 - 0.

[11] Chow JC, Ngan RK, Cheung KM, et al. Immunotherapeutic approaches in nasopharyngeal carcinoma[J]. Expert Opin Biol Ther, 2019, 19(11): 1165 - 1172. doi: 10.1080/14712598.2019.1650910.

[12] Ferrè F, Colantoni A, Helmer-Citterich M. Revealing protein-lncRNA interaction[J]. Brief Bioinform, 2016, 17(1): 106 - 116. doi: 10.1093/bib/bbv031.

[13] Wang W, Lou W, Ding B, et al. A novel mRNA-miRNA-lncRNA competing endogenous RNA triple sub-network associated with prognosis of pancreatic cancer[J]. Aging, 2019, 11(9): 2610 - 2627. doi: 10.18632/aging.101933.

[14] Fang Y, Fullwood MJ. Roles, functions, and mechanisms of long noncoding RNAs in cancer[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016, 14(1): 42 - 54. doi: 10.1016/j.gpb.2015.09.006.

[15] Wang Y, Chen W, Lian J, et al. The lncRNA PVT1 regulates nasopharyngeal carcinoma cell proliferation via activating the KAT2A acetyltransferase and stabilizing HIF-1α[J]. Cell Death Differ, 2020, 27(2): 695 - 710. doi: 10.1038/s41418 - 019 - 0381 - y.

[16] Liu D, Wang Y, Zhao Y, et al. LncRNA SNHG5 promotes nasopharyngeal carcinoma progression by regulating miR-1179/HMGB3 axis[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 178 - 188. doi: 10.1186/s12885 - 020 - 6662 - 5.

[17] Wang L, Xu T, Cui X, et al. Downregulation of lncRNA SNHG7 inhibits proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells through repressing ROCK1[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(15): 7917. doi: 10.26355/eurrev_202008_22451.

[18] Hu W, Li H, Wang S. LncRNA SNHG7 promotes the proliferation of nasopharyngeal carcinoma by miR-514a-5p/ELAVL1 axis[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 376 - 385. doi: 10.1186/s12885 - 020 - 06775 - 8.

[19] Zheng QX, Wang J, Gu XY, et al. TTN-AS1 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for multiple cancers[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 3(135): 169 - 178. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111169.

doi:10.11659/jjssx.11E021115

·基础研究·

颈椎后路单开门椎管扩大椎板成形联合选择性融合术的生物力学研究

王亚楠,王建法,李亚威,刘军伟,张 一,李志磊,孙国绍,邵世坤 (郑州大学附属郑州中心医院神经脊柱外科,河南 郑州 450000)

[摘 要] **目的** 评估颈椎后路单开门椎管扩大椎板成形联合选择性融合术与颈椎后路单开门椎管扩大成形微型钛板内固定术在本地羊颈椎椎体不稳标本中的力学特点。**方法** 取4具新鲜羊颈椎标本,每具标本分别制作为颈椎$C_{3/4}$节段失稳标本(失稳标本)、颈椎后路单开门椎管扩大成形微型钛板内固定术标本(传统术式标本)、颈椎后路单开门椎管扩大椎板成形联合选择性融合术标本(改良术式标本),分别对每具标本进行生物力学测试。记录在X射线透视下羊颈椎在不同状态下的颈椎活动度(ROM)、颈椎屈曲度(CFA)和颈椎后伸度(CEA)。**结果** 失稳标本与改良术式标本CFA、ROM比较,差异无统计学意义($P>0.05$),失稳标本与改良术式标本的CEA比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);传统术式标本与改良术式标本的ROM比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),但传统术式标本与改良术式标本CFA及CEA比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);失稳标本与传统术式标本CFA、CEA及ROM比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 与颈椎后路单开门椎管扩大成形微型钛板内固定术相比,颈椎后路单开门椎管扩大椎板成形联合选择性融合术能够在有效保留ROM的同时重建椎体稳定性。

[关键词] 颈椎;椎管扩大成形;羊;内固定
[中图分类号] R318.01 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-11-21

Biomechanical study of cervical posterior open-door laminoplasty combined with selective fusion

WANG Ya-nan, WANG Jian-fa, LI Ya-wei, LIU Jun-wei, ZHANG Yi, LI Zhi-lei, SUN Guo-shao, SHAO Shi-kun
(Department of Neurospinal Surgery, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou Henan 450000, China)

Abstract: Objective To evaluate the mechanical characteristics of cervical posterior open-door laminoplasty combined with selective fusion and cervical posterior open-door laminoplasty with micro titanium plate internal fixationin in local sheep specimens of cervical instability. **Methods** Four fresh sheep cervical specimens were taken, and each specimen was made into the specimen of $C_{3/4}$ segments instability

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(2018020761)
[通信作者] 李志磊,E-mail:549029321@qq.com

[20] Wang Y, Jiang F, Xiong Y, et al. LncRNA TTN-AS1 sponges miR-376a-3p to promote colorectal cancer progression via upregulating KLF15[J]. Life Sci, 2020, 244(14): 116936 - 116945. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116936.

[21] Dong MM, Peng SJ, Yuan YN, et al. LncRNA TTN-AS1 contributes to gastric cancer progression by acting as a competing endogenous RNA of miR-376b-3p[J]. Neoplasma, 2019, 66(4): 564 - 575. doi: 10.4149/neo_2018_180927N721.

[22] Zuo Z, Ji S, He L, et al. LncRNA TTN-AS1/miR-134-5p/PAK3 axis regulates the radiosensitivity of human large intestine cancer cells through the P21 pathway and AKT/GSK-3β/β-catenin pathway[J]. Cell Biol Int, 2020, 44(11): 2284 - 2292. doi: 10.1002/cbin.11436.

[23] Zhang G, Pian C, Chen Z, et al. Identification of cancer-related miRNA-lncRNA biomarkers using a basic miRNA-lncRNA network [J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0196681. doi: 10.1371/journal.pone.0196681.

[24] Xue J, Zhang Z, Li X, et al. Long non-coding RNA TTN-AS1 promotes breast cancer cell migration and invasion via sponging miR-140-5p [J]. Oncol Lett, 2020, 20(9): 1255 - 1260. doi: 10.3892/ol.2020.12018.

[25] Zhu Y, Yang Z, Luo XH, et al. Long noncoding RNA TTN-AS1 promotes the proliferation and migration of prostate cancer by inhibiting miR-1271 level[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(24): 10678 - 10684. doi: 10.26355/eurrev_202102_24813.

[26] Gagliardi PA, Puliafito A, Primo L. PDK1: at the crossroad of cancer signaling pathways[J]. Semin Cancer Biol, 2018, 2(48): 27 - 35. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.04.014.

[27] Wei Y, Liao Y, Deng Y, et al. MicroRNA-503 inhibits non-small cell lung cancer progression by targeting PDK1/PI3K/AKT pathway[J]. Onco Targets Ther, 2019, 31(12): 9005 - 9016. doi: 10.2147/OTT.S213059.

[28] Bamodu OA, Chang HL, Ong JR, et al. Elevated PDK1 expression drives PI3K/AKT/MTOR signaling promotes radiation-resistant and dedifferentiated phenotype of hepatocellular carcinoma[J]. Cells, 2020, 9(3): 746 - 764. doi: 10.3390/cells9030746.

[29] Ming-Yan Y, Jing Z, Shu-Qin G, et al. Liraglutide inhibits the apoptosis of human nucleus pulposus cells induced by high glucose through PI3K/Akt/caspase-3 signaling pathway[J]. Biosci Rep, 2019, 39(8): 109 - 119. doi: 10.1042/BSR20190109.

(编辑:贺绍梅)