

缺氧相关的长链非编码RNA *LINC00970* 在唾液腺腺样囊性癌中的表达及其作用

朱韵莹¹ 高晓琳¹ 戈艳萍¹ 王张嵩¹ 林钊宇² 李劲松² 武东辉¹

¹广州市海珠区口腔医院,广州 510220; ²中山大学孙逸仙纪念医院,广州 510120

通信作者:武东辉,Email:89619545@qq.com

【摘要】 目的 探讨唾液腺腺样囊性癌(SACC)中长链非编码RNA(lncRNA) *LINC00970* 表达与缺氧的关系及其作用。**方法** 低氧(1% O₂)诱导48 h后,lncRNA芯片检测SACC-83细胞中缺氧诱导的lncRNA,并用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)验证。使用临床样本分析*LINC00970*在SACC组织中的表达及其与预后的关系。*LINC00970*敲低质粒转染SACC-LM和SACC-83细胞后,细胞增殖检测(CCK-8)和平板克隆实验检测细胞增殖能力和克隆形成能力,Transwell实验检测细胞侵袭和迁移能力,Western blot检测E-cadherin、Vimentin、Snail和N-cadherin的表达。荧光定量PCR、Western blot和Transwell等实验均重复3次所得均值为该样本测量值,使用SPSS 20.0软件进行统计学分析。SACC组织细胞与正常唾液腺组织中*LINC00970*相对表达量差异,采用配对*t*检验分析;比较沉默*LINC00970*对SACC-83和SACC-LM细胞增殖、克隆形成、侵袭及迁移能力的影响,以及*LINC00970*沉默对上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白的影响,应用独立*t*检验进行统计学分析。采用Kaplan-Meier法计算*LINC00970*的表达与SACC患者总生存时间的相关性,并绘制生存曲线。*P* < 0.05为差异有统计学意义。**结果** lncRNA芯片及实时荧光定量PCR结果显示,*LINC00970*是SACC-83细胞中在缺氧反应性表达最高的lncRNA(15.13 ± 0.57 vs 1.08 ± 0.06),差异有统计学意义(*t* = 24.56, *P* < 0.001)。临床样本数据分析显示,*LINC00970*在SACC组织表达显著高于正常唾液腺组织(0.49 ± 0.41 vs 0.08 ± 0.16, *t* = 2.53, *P* < 0.001),且*LINC00970*高表达患者生存率明显低于*LINC00970*低表达患者(HR = 0.42, *P* = 0.03)。SACC细胞敲低*LINC00970*后,缺氧促进的侵袭和迁移能力受抑制,且缺氧升高后的间质标志物N-cadherin表达下调,而缺氧诱导降低的上皮标志物E-cadherin恢复上调。**结论** 缺氧可诱导SACC细胞中*LINC00970*的表达,其高表达与SACC患者的不良预后密切相关,*LINC00970*可能通过调控EMT从而促进细胞侵袭和迁移。

【关键词】 癌,腺样囊性; 唾液腺; 细胞缺氧; 长链非编码RNA; 上皮-间充质转化

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(A2021142)

引用著录格式:朱韵莹,高晓琳,戈艳萍,等. 缺氧相关的长链非编码RNA *LINC00970*在唾液腺腺样囊性癌中的表达及其作用[JOL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2023,17(3):210-217.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.03.009

The expression and role of hypoxia-induced long noncoding RNA *LINC00970* in salivary adenoid cystic carcinoma cells

Zhu Yunying¹, Gao Xiaolin¹, Ge Yanping¹, Wang Zhangsong¹, Lin Zhaoyu², Li Jinsong², Wu Donghui¹

¹Stomatology Hospital of Haizhu District, Guangzhou 510220, China; ²Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: Wu Donghui, Email:89619545@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship and function between the expression of long noncoding RNA (lncRNA) *LINC00970* and hypoxia in salivary adenoid cystic carcinoma (SACC) cells. **Methods** After 48 hours of hypoxia (1% O₂) induction, lncRNA chip was used to detect the lncRNA induced by hypoxia in SACC-83 cells and verified by qRT-PCR. Clinical samples were used to analyze the expression and prognostic impact of *LINC00970* in SACC tissues. After transfection of SACC-LM and SACC-83 cells with *LINC00970* shRNA plasmids, the cell proliferation, clonal formation ability, cell

invasion and migration ability, and the expression of E-cadherin and N-cadherin were detected by CCK-8, plate cloning, Transwell assay and Western blot, respectively. Experiments such as fluorescence quantitative PCR, Western blot and Transwell were repeated three times to get the average value of the sample, and SPSS 20.0 software was used for statistical analysis. The difference between the relative expression of *LINC00970* between SACC tissue cells and normal salivary gland tissue was analyzed by paired *t*-test. The independent *t*-test was used to compare the influence of silent *LINC00970* on the proliferation, cloning, invasion and migration ability of SACC-83 and SACC-LM cells, as well as the effect of *LINC00970* silence on EMT-related proteins. The KaplanMeier method was used to calculate the correlation between the expression of *LINC00970* and the total survival time of SACC patients, and to draw the survival curve. $P < 0.05$ was taken as statistically significant for the difference. **Results** The results of lncRNA microarray and qRT-PCR showed that *LINC00970* was the most highly expressed lncRNA in SACC-83 cells in response to hypoxia (15.13 ± 0.57 vs 1.08 ± 0.06 , $t = 24.56$, $P < 0.001$). Analysis of clinical sample data showed that the expression of *LINC00970* in SACC tissues was significantly higher than that in normal salivary gland tissues (0.49 ± 0.41 vs 0.08 ± 0.16 , $t = 2.53$, $P < 0.001$), and the survival rate of patients with high expression of *LINC00970* was significantly lower than that of patients with low expression of *LINC00970* ($HR = 0.42$, $P = 0.03$). After the knockdown of *LINC00970* in SACC cells, the invasion and migration ability promoted by hypoxia were inhibited, and the expression of interstitial marker N-cadherin was down-regulated after increased hypoxia, while the expression of epithelial marker E-cadherin was up-regulated after hypoxia-induced decrease. **Conclusions** Hypoxia can induce the expression of *LINC00970* in SACC cells, with its high expression closely related to the poor prognosis of SACC patients. *LINC00970* may promote cell invasion and migration by regulating EMT.

【Key words】 Carcinoma, adenoid cystic; Salivary; Cell hypoxia; RNA, long noncoding; Epithelial-mesenchymal transition

Fund program: Medical science and Technology Project of Guangdong Province(A2021142)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.03.009

作为唾液腺中最常见的恶性肿瘤之一,唾液腺腺样囊性癌(salivary adenoidcystic carcinoma, SACC)具有局部侵袭性强、易侵犯神经和血管、易发生远处转移等特点,目前治疗手段有手术、化疗和靶向治疗等,但治疗效果不佳,5年生存率仍低于20%^[1-2]。缺氧微环境是包括SACC在内的实体瘤的重要特征,诱导产生缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factors, HIF), HIF家族中HIF-1 α 和HIF-2 α 的转录活化或稳定过表达是促进肿瘤转移、肿瘤生长或血管形成的重要因子^[3-4]。HIF-1 α 和HIF-2 α 能够激活一系列促进肿瘤生长、血管生成和转移的基因(如编码基因*STAT3*、*Bcl-2*等)、微小RNA(如miRNA-210、miRNA-Let-7a等)^[5-6]。研究发现,缺氧相关的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)通过多种机制精确调节肿瘤细胞的增殖、侵袭转移、侵犯血管、代谢特性等从而影响到肿瘤患者的预后^[7-8]。Peng等^[9]发现,缺氧诱导的lncRNA *RP11-367G18.1*通过调节组蛋白4赖氨酸16乙酰化(H4K16Ac)标记促进头颈癌细胞转移。然而,缺氧相关的lncRNA在SACC的表达及其调控机制仍有待研究,本研究

通过lncRNA芯片发现SACC细胞中缺氧诱导的lncRNA *LINC00970*高表达,并对其在SACC的侵袭及迁移的影响进行了研究。

材料与方法

一、组织标本

收集2015年3月至2018年9月在中山大学孙逸仙纪念医院确诊为SACC的患者共计64例,术前均未接受放、化疗和免疫治疗。取64例SACC组织标本(术后病理学检查均确诊为SACC),15例正常唾液腺组织标本(来源于成釉细胞瘤患者同期分离的颌下腺组织),均在切除离体后迅速置于液氮罐中,置于-80℃冰箱中保存。本研究符合《赫尔辛基宣言》的要求,术前均告知患者并签署知情同意书。

二、细胞系及主要试剂

人SACC细胞系SACC-83和SACC-LM由上海交通大学医学院附属第九人民医院肿瘤实验室惠赠。DMEM培养基及青霉素-链霉素(Hyclone,美国)。胰酶和Lipofectamine™ 3000转染试剂(Invitrogen,美

国)。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; 杭州四季青生物工程材料有限公司), TRIzol 试剂(北京天根生化科技有限公司)。细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8; 上海碧云天生物技术有限公司)。逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒及引物(TaKaRa, 日本)。Matrigel 基质胶(BD, 美国), HIF-1 α 抗体(Santacruz, 美国), E-cadherin、Vimentin、Snail、N-cadherin 和 GAPDH 以及辣根过氧化物酶(horseradishperoxidase, HRP)标记的羊抗兔二抗(Abclonal, 美国), Transwell 小室(Millipore, 美国)。

三、实验方法

1. 细胞培养: 常规培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的常规培养箱; 缺氧诱导环境为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、1% O_2 、94% N_2 的缺氧培养箱。培养液为含 10% FBS 的 DMEM。

LINC00970-shRNA 转染 SACC-83 和 SACC-LM 细胞采取慢病毒感染方法。以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=10, 取对数期 SACC-83 和 SACC-LM 细胞分别接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 细胞状态良好时, 每孔加入一定滴度的慢病毒与 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 聚凝胺并与培养基混合, 24 h 后磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后更换为完全培养基, 72 h 后在倒置荧光显微镜下观察荧光强度判断转染效率。*LINC00970* shRNA 靶序列为: CCTCCCTCACACCTCGTCAAAAC。

2. 实时荧光定量 PCR 检测 SACC 组织及细胞系中 *LINC00970* mRNA 的表达: 组织及培养细胞中的总 RNA 提取参照 TRIzol 试剂标准化流程, RNA 浓度及纯度采用紫外分光光度计进行检测。用 PrimeScript RT 试剂盒合成 cDNA, 参照相关指引使用 SYBR Premix Ex Taq II 进行聚合酶链反应, 在 Bio-Rad CFX96™ Manager(Bio-Rad, 美国)仪上进行定量

PCR, 每样本设 3 个复孔。引物序列见表 1。

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 共 40 个循环。基因表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行数据分析。

3. 细胞增殖实验: 在 SACC-83 和 SACC-LM 细胞内中转染了 *LINC00970* 敲低质粒和阴性对照质粒。转染 *LINC00970* 敲低质粒的 SACC-83 为实验组 SACC-83-sh*LINC00970*, 对照组为 SACC-83-shNC; 转染 *LINC00970* 敲低质粒的 SACC-LM 为实验组 SACC-LM-sh*LINC00970*, 对照组为 SACC-LM-shNC。

采用 CCK-8 法检测细胞增殖能力。在 96 孔板中每孔接种对数成长期细胞 1 000 个, 每 24 h 取 3 个复孔加入 10 μL CCK-8 试剂后继续孵育 2 h, 使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度(A)值。

4. 平板克隆实验: 取对数生长期细胞以 1 000 个细胞/孔接种于 6 孔板中, 细胞分散均匀。每 72 h 换液 1 次, 处于明显克隆增殖时, 弃去上清液, PBS 冲洗后以 4% 多聚甲醛固定 30 min, 其后去固定液, 结晶紫染色并计克隆数。

5. Western blot 检测 SACC 细胞中 HIF-1 α 、N-cadherin、E-cadherin 和蛋白的表达: 在转染 48 h 后, 用 RIPA 裂解细胞, 蛋白浓度测定试剂盒 BCA 检测细胞裂解后的蛋白浓度。制备 SDS-PAGE 凝胶, 加入样品蛋白和蛋白 marker 后行 SDS-PAGE 电泳、转 PVDF 膜, 封闭液(5% 脱脂牛奶)室温封闭 1 h, 分别加入按 1: 1 000 稀释的 HIF-1 α 、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail 和 GAPDH 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。过夜后用 TBST 脱色摇床上漂洗 3 次(10 min/次), 加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1: 2 000)并与膜接触, 常温孵育 1 h, TBST 脱色摇床上漂洗 3 次, 使用高灵敏化学发光检测试剂盒 ECL 显影, Image J 软件分析目标带的分子量和灰度值。

表 1 引物序列

基因名称	上游引物	下游引物
<i>LINC00970</i>	TTGGATTCCCTGCTGGTTTC	TCCTTCACAGCGTCAAATGG
<i>ADAMTS14-AS1</i>	AGCAAGGAAGTGCAGACTTG	TGTGCTTTTGGGACTGCATG
<i>HOTTIP</i>	TTTTTGGGGCGGTGTTTACC	AAACCGAAGAGGCTCAAAGC
<i>LINC00658</i>	AATCACCAGCACCACCTTTGC	AGGGTCTCTCATGATGTTGCAG
<i>MEST11</i>	ACAACACAGGCCAGAAACAC	ACATGTTCCATGGCCTTCAG
<i>LINC01149</i>	AACAATTCACCCACCTTGGC	AGACTATCGATGCTGGGAAAGG
<i>RPS6KA2-AS1</i>	CAACACAGGTGAAATGGCTCAG	AGGAAGAAACCGCAAGCAAC
<i>LINC00896</i>	ACCTTGCCCTGCTGAGACATAG	AAACCCAACACGATGACTGC
<i>LIFR-AS1</i>	TGGCCAAGTTTGCAGTCATC	GGCTGCAGTGAGCTGTAATTG
<i>LINC00351</i>	AACTCCGGACACATTTGAGC	AATGAAGCTGCAGACCCTTG

6. Transwell 实验检测 SACC 细胞的侵袭及迁移能力

(1)细胞侵袭实验:Matrigel 胶和无血清培养基以 1:8 的比例稀释,吸取 60 μL 垂直加入 Transwell 上室中,均匀平铺在底部,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜,使 Matrigel 聚合成薄膜。将上室中多余液体吸掉,在每孔中加入 100 μL 无血清培养基后,于培养箱放置 30 min,进行基底膜水化,将上室中液体吸掉。Transwell 小室放入 24 孔板后,无血清 DMEM 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h 后,吸出小室内培养基;用胰酶消化细胞,以密度为 1×10^4 细胞/mL,使用无血清 DMEM 培养液重悬。每个 Transwell 上室加入 100 μL 细胞悬液,下室加入 600 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养液,常规培养 24 h 后,取出小室,用棉签轻轻擦拭 Matrigel 和上室内的细胞。室温下先用甲醇固定 15 min,然后使用 0.5% 结晶紫染色 20 min, PBS 清洗 2 次除去未与细胞结合的结晶紫,用棉签轻轻擦拭小室的上侧,将非特异性结合于小室上表面的染料擦掉,以便后续镜检。适当风干后,于倒置相差显微镜下($\times 40$)计数穿膜细胞数。

(2)细胞迁移实验:方法同细胞侵袭实验,但 Matrigel 胶不必包被基底膜外。

四、统计学处理方法

荧光定量 PCR、Western blot 和 Transwell 等实验均重复 3 次所得均值为该样本测量值,使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。SACC 组织细胞与正常唾液腺组织中 *LINC00970* 相对表达量差异,采用配对 *t* 检验分析;比较沉默 *LINC00970* 对 SACC-83 和 SACC-LM 细胞增殖、克隆形成、侵袭及迁移能力的影响,以及 *LINC00970* 沉默对上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白的

影响,应用独立 *t* 检验进行统计学分析。采用 Kaplan-Meier 法计算 *LINC00970* 的表达与 SACC 患者总生存时间的相关性,并绘制生存曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、缺氧对 SACC-83 细胞 *LINC00970* 表达的影响

缺氧环境培养 SACC-83 细胞 48 h 后 Western blot 显示 HIF-1 α 的表达升高(图 1A)。通过 lncRNA 芯片检测缺氧诱导的 lncRNA,图 1B 显示了缺氧诱导变化倍数较大的 lncRNA。实时荧光定量 PCR 进一步检测缺氧诱导 SACC-83 细胞后 lncRNA 表达,发现相比常氧时的表达量(1.08 ± 0.06),*LINC00970* 在缺氧时表达量最高(15.13 ± 0.57),差异具有统计学意义($t = 24.56, P < 0.001$,图 1C)。

二、*LINC00970* 表达与 SACC 患者预后的关系

实时荧光定量 PCR 结果显示,*LINC00970* 在 SACC 组织中相对表达水平(0.49 ± 0.41)显著高于正常唾液腺组织(0.08 ± 0.16),差异有统计学意义($t = 2.53, P < 0.001$,图 2A)。以 *LINC00970* 的表达中位值为临界值(0.41)将患者分为高表达组和低表达组,使用 KM 法计算后示,*LINC00970* 高表达组患者的总生存率较 *LINC00970* 低表达组显著降低($HR = 0.42, P = 0.03$,图 2B)。以上结果提示,*LINC00970* 在 SACC 发生、发展中可能起到促进作用。

三、沉默 *LINC00970* 对唾液腺腺样囊性癌细胞增殖能力的影响

在 SACC-83 和 SACC-LM 细胞内中转染了 *LINC00970* 敲低质粒和阴性对照质粒。实时荧光定量 PCR 结果显示,在 SACC-83 细胞内 sh-*LINC00970* 组细胞中 *LINC00970* mRNA 表达水平(1.08 ± 0.08)较

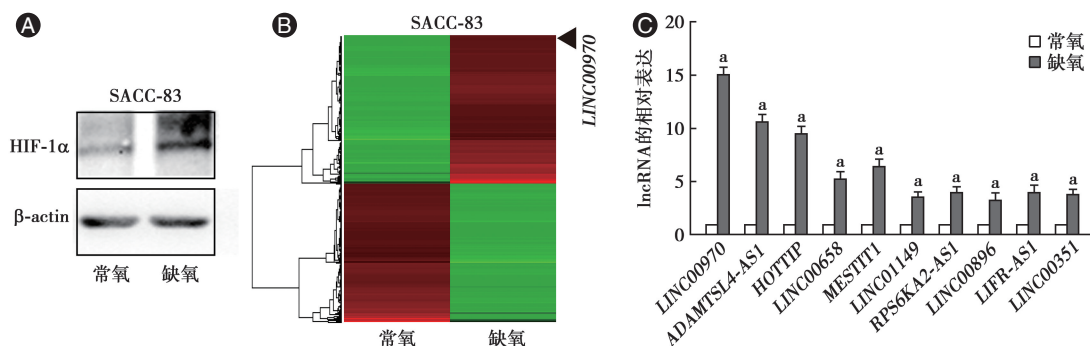


图1 缺氧对唾液腺腺样囊性癌细胞 SACC-83 中 *LINC00970* 表达的影响 A: Western blot 检测缺氧诱导 48 h 后 HIF-1 α 的表达; B: 芯片检测 SACC-83 细胞内缺氧诱导的 lncRNA; C: 实时荧光定量 PCR 检测缺氧诱导 SACC-83 细胞后高表达的 10 个 lncRNA 的表达, 组间比较差异有统计学意义(* $P < 0.05$)。

对照组 SACC-83-shNC (0.37 ± 0.06) 显著降低, 差异有统计学意义 ($t=18.19, P<0.001$); 而在 SACC-LM 细胞内 sh-LINC00970 组细胞中 LINC00970 mRNA 表达水平 (1.06 ± 0.08) 较对照组 SACC-LM-shNC (0.43 ± 0.08) 显著降低, 差异有统计学意义 ($t=11.97, P<0.001$, 图 3A)。

CCK-8 法检测 LINC00970 沉默对 SACC 细胞增殖能力的差异, 结果表明转染后 SACC-83 和 SACC-LM 在第 3 天时, sh-LINC00970 组的 A 值明显高于 sh-NC 组 (SACC-83: 0.703 ± 0.055 vs 0.866 ± 0.006 ; SACC-LM: 0.850 ± 0.058 vs 1.310 ± 0.045), 差异具有统计学意义 ($t_{\text{SACC-83}}=3.10, P_{\text{SACC-83}}=0.04$; $t_{\text{SACC-LM}}=5.41, P_{\text{SACC-LM}}=$

0.03); 同时第 4 天时 SACC-83 和 SACC-LM 细胞中 sh-LINC00970 组的 A 值相较于 sh-NC 组显著下降 (SACC-83: 0.930 ± 0.040 vs 1.210 ± 0.052 , SACC-LM: 0.910 ± 0.074 vs 1.305 ± 0.078), 差异具有统计学意义 ($t_{\text{SACC-83}}=6.09, P_{\text{SACC-83}}=0.03$; $t_{\text{SACC-LM}}=5.14, P_{\text{SACC-LM}}=0.04$, 图 3B~3C)。

平板克隆实验结果表明, LINC00970 敲减后 SACC-83 和 SACC-LM 细胞的克隆形成能力均减少 (图 3D), 且差异具有统计学意义 (SACC-83: 98.5 ± 5.0 vs $37.0 \pm 8.5, t_{\text{SACC-83}}=8.85, P_{\text{SACC-83}}=0.01$; SACC-LM: 59.9 ± 2.7 vs $10.3 \pm 4.5, t_{\text{SACC-LM}}=16.12, P_{\text{SACC-LM}}<0.001$, 图 3E)。

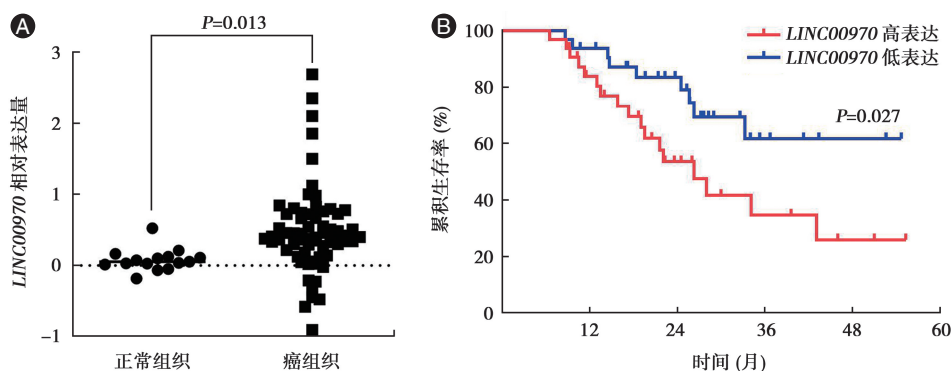


图2 唾液腺腺样囊性癌(SACC)临床样本中 LINC00970 的表达及与预后的关系 A: LINC00970 在 SACC 组织和正常唾液腺组织中的表达; B: 不同 LINC00970 表达水平患者的总生存曲线。

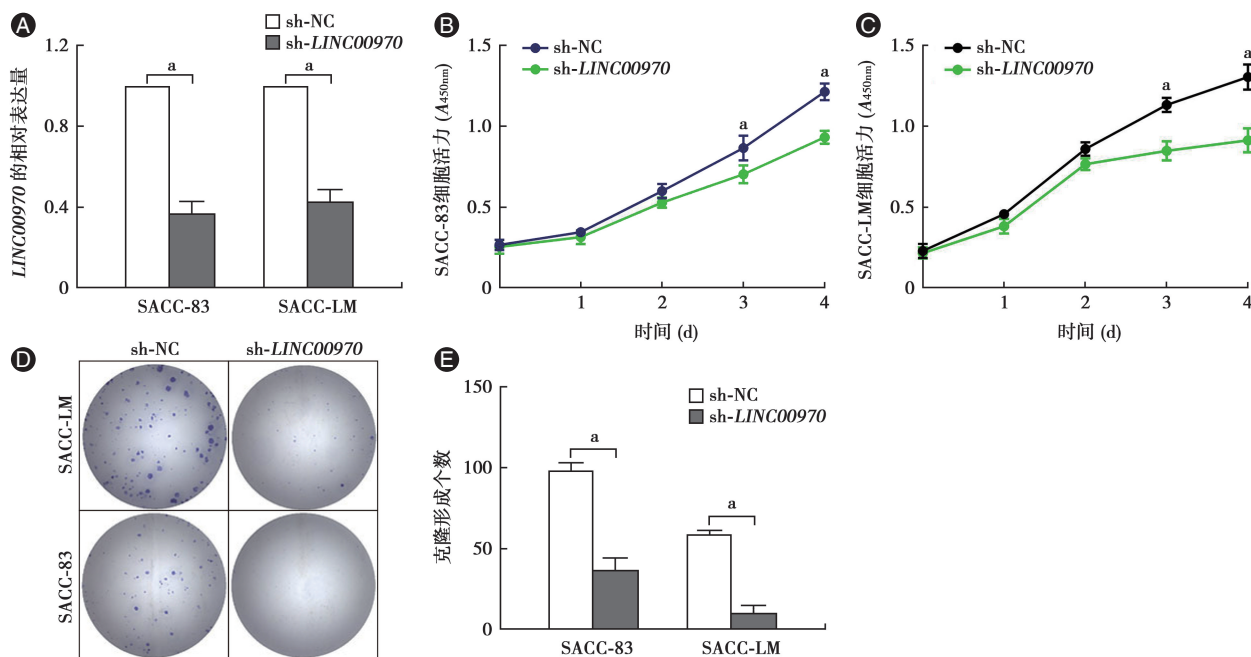


图3 沉默 LINC00970 对唾液腺腺样囊性癌(SACC)细胞增殖能力的影响 A: LINC00970 沉默后在 SACC-83 和 SACC-LM 细胞内的表达, 其表达水平显著下降, 组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); B~C: CCK-8 检测沉默 LINC00970 对 SACC-83 和 SACC-LM 细胞增殖能力的影响, 其细胞增殖能力显著下降, 组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); D: 沉默 LINC00970 对 SACC-83 和 SACC-LM 的平板克隆实验图; E: 沉默 LINC00970 对 SACC-83 和 SACC-LM 细胞克隆形成个数统计图, 其细胞克隆形成个数显著减少, 组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

4. 缺氧条件下 *LINC00970* 对 SACC 细胞侵袭及迁移能力的影响: Transwell 迁移实验显示(图 4A ~ 4D)与常氧状态相比, 缺氧环境显著增强 SACC-83 和 SACC-LM 细胞的迁移能力(SACC-83: 206 ± 16 vs 93 ± 10 , $t_{\text{SACC-83}} = 10.73$, $P_{\text{SACC-83}} < 0.001$; SACC-LM: 149 ± 13 vs 66 ± 11 , $t_{\text{SACC-LM}} = 8.76$, $P_{\text{SACC-LM}} < 0.001$)。Transwell 侵袭实验也显示与常氧状态相比, 缺氧环境显著增强 SACC-83 和 SACC-LM 细胞的迁移能力, 差异均具有统计学意义(SACC-83: 183 ± 7 vs 64 ± 9 , $t_{\text{SACC-83}} = 18.13$, $P_{\text{SACC-83}} < 0.001$; SACC-LM: 128 ± 22 vs 38 ± 8 , $t_{\text{SACC-LM}} = 6.57$, $P_{\text{SACC-LM}} < 0.001$)。此外, 在缺氧条件下抑制 *LINC00970* 表达后, 缺氧诱导 SACC-83 和 SACC-LM 细胞迁移的作用受到较大抑制(SACC-83: 206 ± 16 vs 97 ± 7 , $t_{\text{SACC-83}} = 11.11$, $P_{\text{SACC-83}} < 0.001$; SACC-LM: 149 ± 13 vs 87 ± 19 , $t_{\text{SACC-LM}} = 4.80$, $P_{\text{SACC-LM}} = 0.09$)。Transwell 侵袭实验也显示抑制 *LINC00970* 表达后缺氧增强的 SACC-83 和 SACC-LM 细胞侵袭能力减弱(SACC-83: 183 ± 7 vs 71 ± 11 , $t_{\text{SACC-83}} = 15.61$, $P_{\text{SACC-83}} < 0.001$; SACC-LM: 128 ± 22 vs 73 ± 20 , $t_{\text{SACC-LM}} = 3.27$, $P_{\text{SACC-LM}} = 0.03$)。

以上结果提示, *LINC00970* 参与调控缺氧条件下 SACC 细胞的侵袭和迁移能力。

5. 缺氧条件下 *LINC00970* 对 EMT 相关蛋白表达的影响: 在缺氧条件下沉默 SACC-83 和 SACC-LM 细胞中 *LINC00970* 后检测 EMT 相关蛋白的表达。Western blot 结果显示, 缺氧条件下 SACC-83 内间叶细胞标志物 N-cadherin、Vimentin 和 Snail 的表达上调, 而上皮细胞标志物 E-cadherin 表达下调; 而缺氧环境下敲低 *LINC00970* 后 N-cadherin、Vimentin 和 Snail 的表达较对照组下调, 而上皮细胞标志物 E-cadherin 表达较对照组上调, 这提示 *LINC00970* 可能通过促进 EMT 过程促进细胞的侵袭和迁移(图 5)。

讨 论

实体瘤内缺氧微环境与肿瘤的侵袭和转移、增殖、代谢及患者不良预后密切相关, 组织缺氧是实体瘤的重要特征之一, 广泛存在于头颈鳞癌、黑色素瘤等多种肿瘤内^[10]。SACC 同样存在缺氧微环境, 其所诱导产生的 HIF 家族发挥转录因子, 调控下

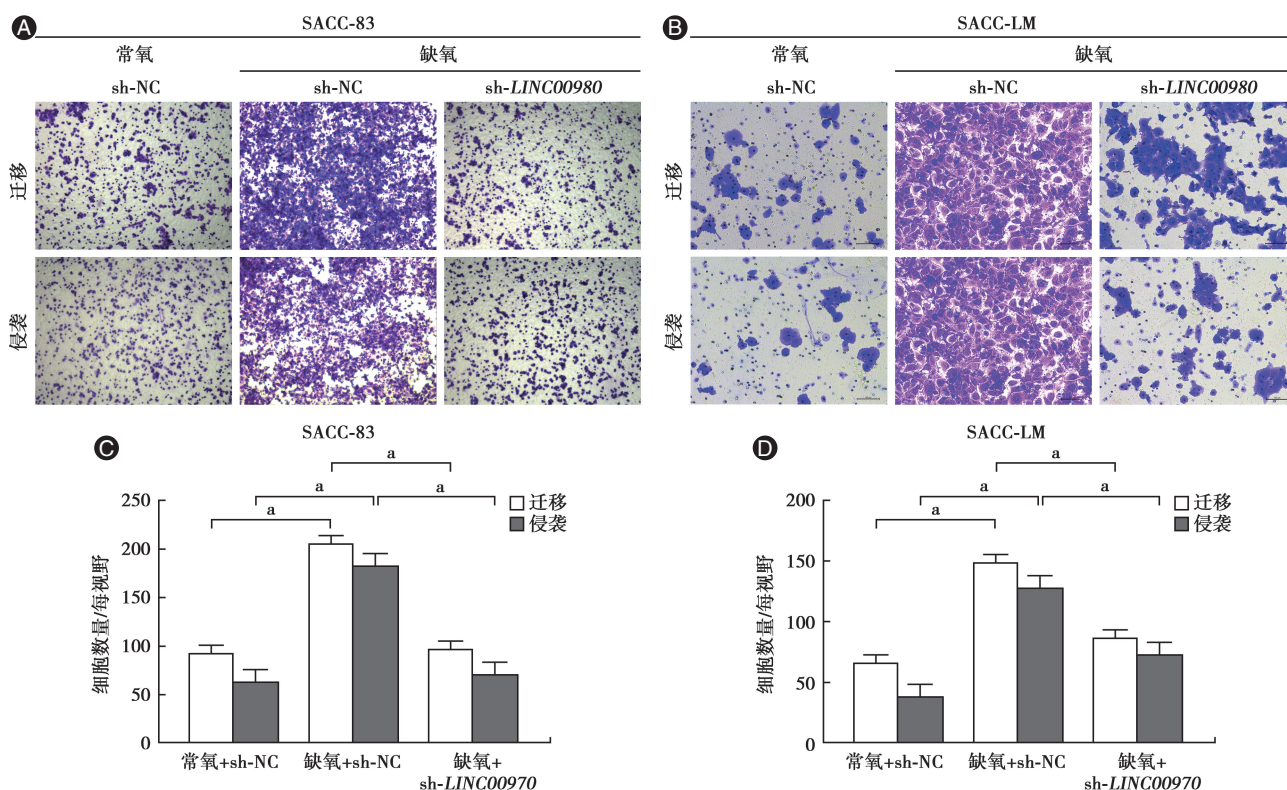


图4 缺氧条件下抑制 *LINC00970* 对 SACC-83 [A 为 Transwell 实验检测(高倍放大)、C 为统计图, 结果显示缺氧环境下, 细胞迁移能力显著增强, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 缺氧条件下抑制 *LINC00970* 表达后, 细胞迁移的作用受到较大抑制, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)] 和 SACC-LM [B 为 Transwell 实验检测(高倍放大)、D 为统计图, 结果显示缺氧环境下, 细胞迁移能力显著增强, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 缺氧条件下抑制 *LINC00970* 表达后, 细胞迁移的作用受到较大抑制, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)] 细胞侵袭和迁移的影响。

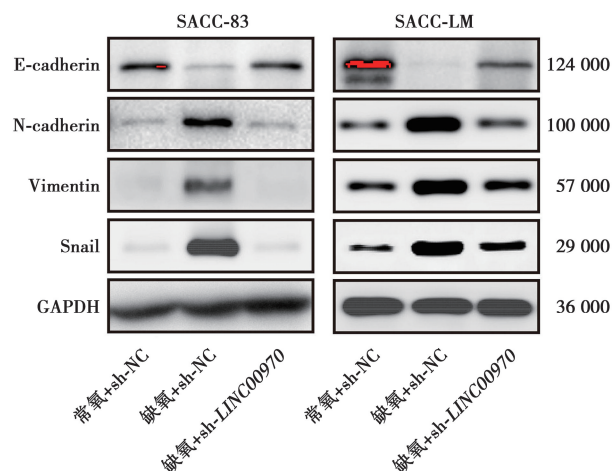


图5 缺氧条件下抑制 *LINC00970* 对唾液腺腺样囊性癌(SACC)细胞上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白表达的影响

游基因的表达^[11-13]。lncRNA 因具有多样的生物学功能和广泛的调控机制而在肿瘤研究中受到重视,有研究证实缺氧诱导 lncRNA 在肿瘤的增殖、侵袭转移和血管生成中发挥了重要作用^[14-16]。因此,深入研究缺氧诱导的 lncRNA 是否在 SACC 增殖、侵袭转移和血管生成中起到作用,将有助于完善 SACC 发生、发展的分子机制。本研究首先通过 lncRNA 芯片检测验证缺氧是否诱导 SACC-83 细胞中 lncRNA 的异常表达,发现 *LINC00970* 异常增高,并通过实时荧光定量 PCR 进行了进一步验证。通过收集的临床样本分析进一步发现相对于正常唾液腺组织, *LINC00970* 在 SACC 组织中表达显著上调。 *LINC00970* 敲减后 SACC-83 和 SACC-LM 细胞后, CCK-8 法检测发现其增殖能力显著下降;平板克隆实验证实其克隆形成能力均减弱。此外, *LINC00970* 高表达与 SACC 患者预后不良密切相关,以上结果提示 *LINC00970* 可能参与调控 SACC 的进程。

多项研究结果表明,缺氧诱导的 lncRNA 可以通过多种机制调控肿瘤增殖、侵袭转移、侵犯血管和代谢特性等生物学行为^[17-18]。Zhang 等^[19]发现 PCGEM1 是一种缺氧反应性 lncRNA,通过 SNAIL 影响胃癌细胞 EMT 继而促进胃癌转移。Deng 等^[20]研究发现缺氧诱导的 lncRNA BX111887 通过将转录因子 Y-box 蛋白(YB1)招募到其启动子区域,继而激活 ZEB1 转录,促进胰腺癌细胞 EMT 和转移。本研究通过 Transwell 实验发现抑制 *LINC00970* 表达可降低缺氧对 SACC 细胞侵袭和迁移的促进作用。

EMT 是肿瘤浸润前沿的上皮细胞获得间质细胞表型的过程,从而促进肿瘤细胞迁移或干性,是

肿瘤转移的起始,有研究发现 lncRNA 通过调控 EMT 过程影响肿瘤侵袭和转移^[21-23],如 lncRNA SNHG12 通过靶向 miR-516a-5p/HEG1 信号轴促进肝癌细胞的 EMT 过程,即促进 N-cadherin、ZEB1 表达并抑制 E-cadherin 表达,继而促进肝癌细胞的迁移和侵袭^[23]。本研究发现缺氧可促进间叶细胞标志物 N-cadherin、Vimentin 和 Snail 的表达,而抑制上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达,抑制 *LINC00970* 可减轻缺氧对这些蛋白的调控作用。这提示 *LINC00970* 可能促进 SACC 的 EMT,继而促进 SACC 细胞的侵袭和迁移。

本研究发现 *LINC00970* 参与了缺氧诱导的 SACC 细胞侵袭、转移等生物学行为,并发现了 *LINC00970* 调控缺氧诱导的侵袭迁移的初步机制,为 SACC 转移的研究提供了一定的理论基础。但缺氧诱导的 lncRNA 可能参与多种信号通路调控 SACC 转移,缺氧诱导的 *LINC00970* 具体通过何种分子机制调控 EMT 继而促进 SACC 转移仍有待深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 朱韵莹:论文撰写、实验操作;高晓琳、戈艳萍、王张嵩、林钊宇:实验操作、统计分析;李劲松:研究指导;武东辉:实验设计、论文修改

参 考 文 献

- [1] Wang W, Zhang H, Li J, et al. Upregulation of lncRNA ADAMTS9-AS2 promotes salivary adenoid cystic carcinoma metastasis via PI3K/Akt and MEK/Erk signaling[J]. Mol Ther, 2018, 26(12):2766-2778. DOI:10.1016/j.yjthe.2018.08.018.
- [2] Andrade NP, Warner KA, Zhang Z, et al. Survival of salivary gland cancer stem cells requires mTOR signaling[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(1):108. DOI:10.1038/s41419-021-03391-7.
- [3] Jing X, Yang F, Shao C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1):157. DOI:10.1186/s12943-019-1089-9.
- [4] Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, et al. Cancer cell metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11):5703. DOI:10.3390/ijms22115703.
- [5] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10):721-732. DOI:10.1038/nrc1187.
- [6] Lu Y, Li Y, Wang Z, et al. Downregulation of RGMA by HIF-1A/miR-210-3p axis promotes cell proliferation in oral squamous cell carcinoma[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108608. DOI:10.1016/j.biopha.2019.108608.
- [7] Kuo TC, Kung HJ, Shih JW. Signaling in and out: Long-noncoding RNAs in tumor hypoxia[J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1):59. DOI:10.1186/s12929-020-00654-x.

- [8] Peng PH, Hsu KW, Chieh-Yu Lai J, et al. The role of hypoxia-induced long noncoding RNAs (lncRNAs) in tumorigenesis and metastasis[J]. Biomed J, 2021,44(5):521-533. DOI:10.1016/j.bj.2021.03.005.
- [9] Peng PH, Lai JC, Chang JS, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by hypoxia-induced lncRNA RP11-367G18.1 through regulating the histone 4 lysine 16 acetylation (H4K16Ac) mark[J]. Am J Cancer Res, 2021,11(6):2618-2636.
- [10] Yang G, Shi R, Zhang Q. Hypoxia and oxygen-sensing signaling in gene regulation and cancer progression[J]. Int J Mol Sci, 2020,21(21):8162. DOI:10.3390/ijms21218162.
- [11] Wang HF, Wang SS, Zheng M, et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by vascular endothelial growth factor A mediating epithelial-mesenchymal transition in salivary adenoid cystic carcinoma[J]. Cell Prolif, 2019,52(3):e12600. DOI:10.1111/cpr.12600.
- [12] Xiao C, Pan Y, Zeng X, et al. Downregulation of hypoxia-inducible factor-1 α inhibits growth, invasion, and angiogenesis of human salivary adenoid cystic carcinoma cells under hypoxia[J]. Oncol Rep, 2018,40(3):1675-1683. DOI:10.3892/or.2018.6559.
- [13] Liu C, Li S, Pang F, et al. Autophagy-related gene expression regulated by HIF-1 α in salivary adenoid cystic carcinoma[J]. Oral Dis, 2019,25(4):1076-1083. DOI:10.1111/odi.13058.
- [14] Lin Z, Song J, Gao Y, et al. Hypoxia-induced HIF-1 α /lncRNA-PMAN inhibits ferroptosis by promoting the cytoplasmic translocation of ELAVL1 in peritoneal dissemination from gastric cancer[J]. Redox Biol, 2022,52:102312. DOI:10.1016/j.redox.2022.102312.
- [15] Yang H, Hu Y, Weng M, et al. Hypoxia inducible lncRNA-CBSLR modulates ferroptosis through m⁶A-YTHDF2-dependent modulation of CBS in gastric cancer[J]. J Adv Res, 2021,37:91-106. DOI:10.1016/j.jare.2021.10.001.
- [16] Wang Y, Liu S. LncRNA GHET1 promotes hypoxia-induced glycolysis, proliferation, and invasion in triple-negative breast cancer through the Hippo/YAP signaling pathway[J]. Front Cell Dev Biol, 2021,9:643515. DOI:10.3389/fcell.2021.643515.
- [17] Chang YN, Zhang K, Hu ZM, et al. Hypoxia-regulated lncRNAs in cancer[J]. Gene, 2016,575(1):1-8. DOI:10.1016/j.gene.2015.08.049.
- [18] Cho HS, Han TS, Hur K, et al. The roles of hypoxia-inducible factors and non-coding RNAs in gastrointestinal cancer[J]. Genes (Basel), 2019,10(12):1008. DOI:10.3390/genes10121008.
- [19] Zhang J, Jin HY, Wu Y, et al. Hypoxia-induced lncRNA PCGEM1 promotes invasion and metastasis of gastric cancer through regulating SNAH1[J]. Clin Transl Oncol, 2019,21(9):1142-1151. DOI:10.1007/s12094-019-02035-9.
- [20] Deng SJ, Chen HY, Ye Z, et al. Hypoxia-induced lncRNA-BX111 promotes metastasis and progression of pancreatic cancer through regulating ZEB1 transcription[J]. Oncogene, 2018,37(44):5811-5828. DOI:10.1038/s41388-018-0382-1.
- [21] Dhamija S, Diederichs S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis[J]. Int J Cancer, 2016,139(2):269-280. DOI:10.1002/ijc.30039.
- [22] Li J, Meng H, Bai Y, et al. Regulation of lncRNA and its role in cancer metastasis[J]. Oncol Res, 2016,23(5):205-217. DOI:10.3727/096504016X14549667334007.
- [23] Chen PP, Zhang ZS, Wu JC, et al. LncRNA SNHG12 promotes proliferation and epithelial mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma through targeting HEG1 via miR-516a-5p[J]. Cell Signal, 2021,84:109992. DOI:10.1016/j.cellsig.2021.109992.

(收稿日期:2022-12-22)

(本文编辑:王嫚)