

人源性长寿保障基因 2 在口腔鳞癌组织中表达 及对细胞增殖和侵袭能力的影响

汪晓龙¹ 曹顺顺¹ 张鹏¹ 舒传继¹ 夏林^{2*}

(1. 鄂东医疗集团市中心医院,湖北理工学院附属医院口腔科 湖北黄石 435000;

2. 鄂东医疗集团市中心医院,湖北理工学院附属医院头颈肿瘤内科 湖北黄石 435000)

[摘要] 目的:探讨人源性长寿保障基因 2(LASS2)在口腔鳞癌组织中表达,以及沉默人口腔鳞癌 CAL-27 细胞中 LASS2 基因表达对细胞增殖和侵袭能力的影响。方法:选取口腔鳞癌患者 64 例,利用实时荧光定量 PCR 技术和 Western blot 法检测口腔鳞癌和癌旁组织中 LASS2 基因和蛋白表达,培养 CAL-27 细胞并分为 siRNA-LASS2 组、阴性对照组和空白组,实时荧光定量 PCR 技术检测 LASS2 基因表达,MTT 法检测细胞增殖,划痕实验检测细胞迁移能力,Transwell 小室法检测细胞侵袭力。结果:口腔鳞癌组织中 LASS2 mRNA 和蛋白相对表达量均低于癌旁组织($P < 0.05$);口腔鳞癌组织中 LASS2 mRNA 和蛋白相对表达量与 TNM 分期、分化程度、临床分期和淋巴结转移有关($P < 0.05$);siRNA-LASS2 组细胞中 LASS2 mRNA 相对表达量低于阴性对照组和空白组($P < 0.05$);siRNA-LASS2 组 1、2、3 和 4 d 时 A 值均高于阴性对照组和空白组($P < 0.05$);siRNA-LASS2 组 24 h 和 48 h 时细胞迁移率高于阴性对照组和空白组($P < 0.05$);siRNA-LASS2 组侵袭细胞数高于阴性对照组和空白组($P < 0.05$)。结论:LASS2 在口腔鳞癌组织中呈低表达,特异性抑制口腔鳞癌细胞中 LASS2 表达可促进细胞增殖、加速细胞迁移及侵袭。

[关键词] 口腔鳞癌 人源性长寿保障基因 2 细胞增殖 侵袭力

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)02—0142—05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.02.010

Expression of Homo Sapiens Longevity Assurance Homologue 2 of Yeast LAG1 in Oral Squamous Cell Carcinoma and Its Effect on Cell Proliferation and Invasion. WANG Xiao-long¹, CAO Shun-shun¹, ZHANG Peng¹, SHU Chuan-ji¹, XIA Lin^{2*}. 1. Department of Stomatology, Edong Medical Group Huangshi Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei Institute of Technology, Huangshi 435000, China; 2. Department of Head and neck oncology, Edong Medical Group Huangshi Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei Institute of Technology, Huangshi 435000, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of homo sapiens longevity assurance homologue 2 of yeast LAG1 (LASS2) in oral squamous cell carcinoma, and explore the effect of silencing LASS2 gene expression on proliferation and invasion of CAL27 cells. **Methods:** A total of 64 cases of patients with oral squamous cell carcinoma were selected. The expressions of LASS2 gene and protein in oral squamous cell carcinoma and adjacent tissues were detected by using real-time quantitative PCR and Western blot. CAL-27 cells were cultured and divided into siRNA-LASS2 group, negative control group, and blank group. The expression of LASS2 gene in cells was detected by using real-time quantitative PCR. The cell proliferation was detected by using MTT assay. The cell migration was detected by using scratch test. The cell invasive was detected by using Transwell chamber. **Results:** The relative expression levels of LASS2 mRNA and protein in the oral squamous cell carcinoma tissues were lower than those in the adjacent tissues ($P < 0.05$). The relative expression levels of LASS2 mRNA and protein in oral squamous cell carcinoma tissues were related to TNM stage, differentiation degree, clinical stage, and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The relative expression level of LASS2 mRNA in the siRNA-LASS2 group was lower than those in the negative control group and the blank group ($P < 0.05$). The absorbance A values at 1 d, 2 d, 3 d, and 4 d in the siRNA-LASS2 group were higher than those in the negative control group and the blank group ($P < 0.05$). The cell migration rates at 24h and 48h in the siRNA-LASS2 group were higher than those in the

作者简介 汪晓龙(1977~),男,湖北鄂州人,主治医师,硕士,主要从事口腔临床和科研工作。

* 通讯作者 夏林, E-mail: 33680406@qq.com

negative control group and the blank group ($P < 0.05$). The number of invasive cells in the siRNA-LASS2 group was higher than that in the negative control group and the blank group ($P < 0.05$). **Conclusion:** LASS2 was lowly expressed in oral squamous cell carcinoma tissues. Specific inhibition of LASS2 expression in oral squamous cell carcinoma cells could promote cell proliferation and accelerate cell migration and invasion.

[Key words] Oral squamous cell carcinoma Homo sapiens longevity assurance homologue 2 of yeast LAG1
Cell proliferation Invasiveness

人源性长寿保障基因 2(homo sapiens longevity assurance homologue 2 of yeast LAG1, LASS2) 是长寿保障基因家族成员, 具有抑制肿瘤转移的功能^[1], 研究发现, 其在多种恶性肿瘤发生、转移及侵袭中发挥重要作用^[2]。本研究分析口腔鳞癌组织中 LASS2 表达, 并利用小分子干扰 RNA (small RNA interfere, siRNA) 技术特异性沉默人口腔鳞癌 CAL-27 细胞中 LASS2 基因表达, 观察其对细胞增殖和侵袭力的影响。

1 材料与方法

1.1 资料

1.1.1 临床资料 选取 2015 年 4 月~2017 年 12 月在我院口腔科择期行手术治疗的口腔鳞癌患者 64 例, 所有患者术前均未行放疗化疗, 术后经病理学检查确诊。其中, 男性 41 例, 女性 23 例, 年龄 36~75 岁, 平均年龄 (54.7 ± 10.4) 岁, 根据第七版 UICC/AJCC 关于 TNM 分期标准: T1~T2 期 35 例, T3~T4 期 29 例; 分化程度: 低分化 12 例, 中分化 21 例, 高分化 31 例; 临床分期: I 期 16 例, II 期 11 例, III 期 21 例, IV 期 16 例; 发生淋巴结转移 34 例。术中留取口腔鳞癌组织及癌旁距离肿瘤边缘至少 2 cm 癌旁组织, 快速置于液氮中, 保存于 -80 °C 冰箱。本研究通过医院伦理委员会批准, 所有患者均知情同意。

1.1.2 主要试剂和设备 Trizol 总 RNA 提取试剂和 Lipofectamine 2000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司), 逆转录和 PCR 扩增试剂 [宝生物工程 (大连) 有限公司], LASS2 和内参引物由上海生工生物公司设计合成, 羊抗人 LASS2 多克隆抗体 (北京博奥森生物技术公司), BCA 蛋白含量检测试剂 (上海雅吉生物科技有限公司), siRNA-LASS2 和阴性对照序列由北京赛百胜公司设计合成, CAL-27 细胞 [通派 (上海) 生物科技公司], 胎牛血清和 DMEM 培养液 (美国 Hyclone 公司), 噻唑蓝 (MTT) 试剂、二甲基亚砜 (DMSO)、胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司), Transwell 小室 (美国 Corning 公司), Matrigel 基质胶 (美国 BD 公司), 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI

公司), 凝胶电泳成像分析系统 (美国 Bio-rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 技术检测口腔鳞癌和癌旁组织中 LASS2 基因表达 取口腔鳞癌和癌旁组织, 研磨, 根据 Trizol 总 RNA 提取试剂说明提取组织中总 RNA, 行琼脂糖凝胶电泳, 使用紫外分光光度计检测总 RNA 纯度。按逆转录试剂说明将总 RNA 合成模板链 cDNA。使用实时荧光定量 PCR 仪按 PCR 扩增试剂盒说明对引物进行扩增, 引物序列见表 1。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 1 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 73 °C 延伸 30 s, 连续循环 38 次。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算口腔鳞癌和癌旁组织中 LASS2 mRNA 相对表达量。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences for RT-PCR.

基因名称	引物序列 (5'→3')
LASS2	上游: GCCTTGCTCTCTCCTCATCGTTC
	下游: TGCTTGCCACTGGTCAGGTAGA
GAPDH	上游: GGTCTCCTCTGACTTCAACA
	下游: GAGGGTCTCTCTCTCTCT

1.2.2 Western blot 法检测口腔鳞癌和癌旁组织中 LASS2 蛋白表达 取口腔鳞癌和癌旁组织, 研磨, 提取总蛋白, 按照蛋白含量检测试剂说明检测总蛋白浓度。取总蛋白 50 μg, 行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至聚偏氟乙烯膜上, 用含 0.05% Tween20 的 TBS 缓冲液 (Tris buffered saline tween, TBST) 漂洗 3 次。用 5% 脱脂奶粉进行封闭 60 min, 将一抗羊抗人 LASS2 多克隆抗体按 1:500 稀释后加入, 4 °C 过夜孵育。室温下, 用 TBST 漂洗 3 次, 加入二抗, 孵育 120 min, 用 TBST 漂洗 3 次, 加入电化学发光试剂, 避光反应 20 min, 拍照。用 Image J 图像分析软件对条带进行分析。

1.2.3 细胞培养和分组 将 CAL-27 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 在饱和湿度含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养。取对数生长期细胞, 胰酶消化, 接种于 6 孔板, 密度为 2×10^5 /mL,

培养 24 h,按转染试剂盒说明进行分组转染:(1) siRNA-LASS2 组:转染 LASS2 基因的干扰序列:5'-UAGUUAACAUCUUGGCAG-3';(2)阴性对照组:转染阴性对照序列:5'-ACGUGA-CACGUUCGGAGAA-3';(3)空白组:不作任何处理。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 技术检测细胞中 LASS2 基因表达 取各组细胞,加入细胞裂解液,其余步骤同 1.2.1。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖 取各组细胞,接种于 96 孔板,细胞密度为 2×10^4 /孔,在饱和湿度含 5%CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养。分别于培养 0.5、1、2、3 和 4 d 时,各孔加入 MTT 液(5 g/L)20 μL,培养 4 h,去除上清,各孔加入 150 μL 的 DMSO,充分振荡 15 min,用酶标仪在 490 nm 处检测各孔 A 值。

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 取各组细胞,接种于 6 孔板,细胞密度为 3×10^5 /孔,过夜培养,利用 100 μL 的移液器枪头垂直于孔板划直线,用无血清培养液洗掉划落的细胞,加入含 10%胎牛血清的培养液培养,分别于 24 h 和 48 h 时,测量细胞迁移距离,计算细胞迁移率=(初始划痕宽度-24 h/48 h 时划痕宽度)×100%。

1.2.7 Transwell 小室法检测细胞侵袭力 取 Matrigel 基质胶,按 9:1 的比例用不含胎牛血清的培养液进行稀释,平铺于小室上室,于 37°C 条件下

湿化 4 h。取各组细胞,离心取细胞沉淀,用不含血清培养液重悬,调整细胞密度为 5×10^5 /mL,取 200 μL 加入小室上室,下室则加入含 20%胎牛血清的培养液 500 μL,培养 24 h。多聚甲醛固定,结晶紫染色。显微镜下随机取 6 个高倍视野计数穿膜细胞数。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 17.0 统计软件分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 口腔鳞癌和癌旁组织中 LASS2 基因和蛋白表达 口腔鳞癌组织中 LASS2 mRNA 和蛋白相对表达量均低于癌旁组织($P < 0.05$),见表 2。

表 2 口腔鳞癌和癌旁组织中 LASS2 基因和蛋白表达

Tab. 2 Expressions of LASS2 gene and protein in oral squamous cell carcinoma and adjacent tissues $\bar{x} \pm s$

组别	LASS2 mRNA	LASS2 蛋白
口腔鳞癌	0.37±0.07	0.46±0.07
癌旁组织	1.02±0.05	0.87±0.10
<i>t</i> 值	60.872	27.905
<i>P</i> 值	0.000	0.000

2.2 口腔鳞癌组织中 LASS2 基因和蛋白表达与临床病理特征之间关系 口腔鳞癌组织中 LASS2 mRNA 和蛋白相对表达量均与性别和年龄无关($P > 0.05$),而与 TNM 分期、分化程度、临床分期

表 3 口腔鳞癌组织中 LASS2 基因和蛋白表达与临床病理特征之间关系

Tab. 3 Relationship between expressions of LASS2 gene and protein in oral squamous cell carcinoma tissues and clinicopathological features $\bar{x} \pm s$

指标	例数	LASS2 mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	LASS2 蛋白	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
性别							
男性	41	0.38±0.08	0.861	0.392	0.45±0.06	1.200	0.235
女性	23	0.36±0.07			0.47±0.09		
年龄/岁							
≥55	39	0.36±0.05	1.651	0.104	0.44±0.05	1.656	0.103
<55	25	0.39±0.09			0.47±0.07		
TNM 分期							
T1~T2 期	35	0.45±0.10	7.177	0.000	0.50±0.10	5.247	0.000
T3~T4 期	29	0.29±0.07			0.39±0.08		
分化程度							
中低分化	33	0.25±0.07	7.740	0.000	0.36±0.09	8.263	0.000
高分化	31	0.41±0.10			0.53±0.08		
临床分期							
I 期+II 期	27	0.46±0.08	11.485	0.000	0.51±0.10	5.805	0.000
III 期+IV 期	37	0.24±0.07			0.37±0.09		
淋巴结转移							
是	34	0.23±0.06	11.793	0.000	0.32±0.07	10.845	0.000
否	30	0.45±0.08			0.57±0.11		

表 4 各组细胞增殖能力

Tab. 4 Proliferation ability of cells in each group

组别	0.5 d	1 d	2 d	3 d	4 d
siRNA-LASS2 组	0.13±0.04	0.40±0.05 ^{*1*2}	0.56±0.10 ^{*1*2}	0.72±0.10 ^{*1*2}	0.80±0.08 ^{*1*2}
阴性对照组	0.12±0.04	0.23±0.07	0.33±0.07	0.41±0.05	0.54±0.04
空白组	0.15±0.02	0.29±0.03	0.36±0.08	0.42±0.07	0.48±0.07
F	0.919	16.034	13.948	31.288	38.106
P	0.420	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,*1 P<0.05;与阴性对照组比较,*2 P<0.05

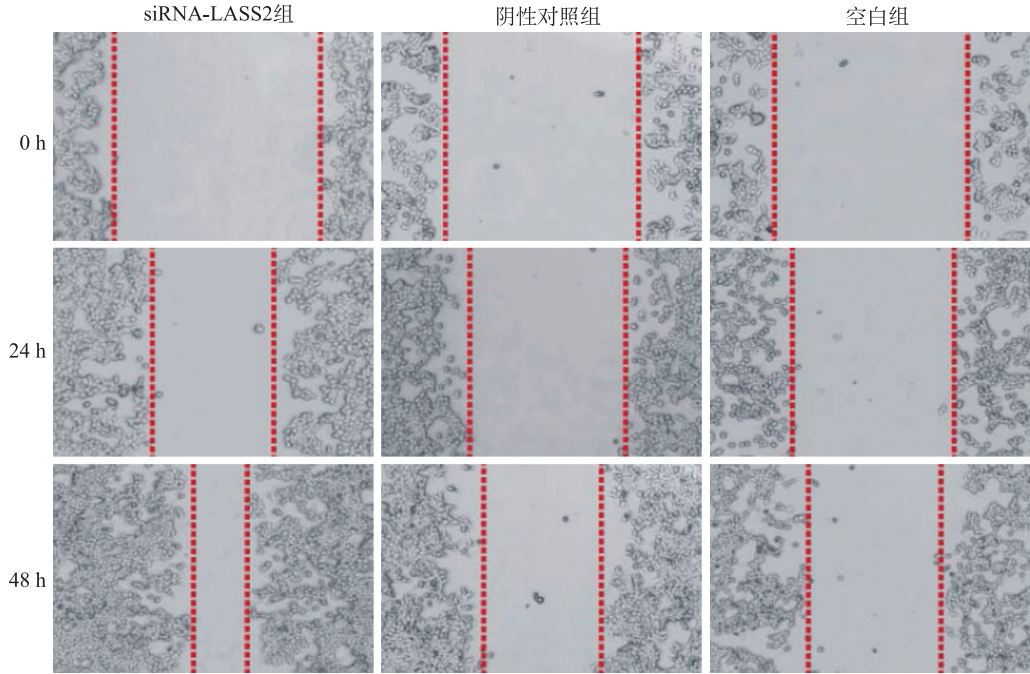


图 1 划痕实验检测各组细胞迁移能力

Fig. 1 Scratch test was used to detect migration ability of cells in each group.

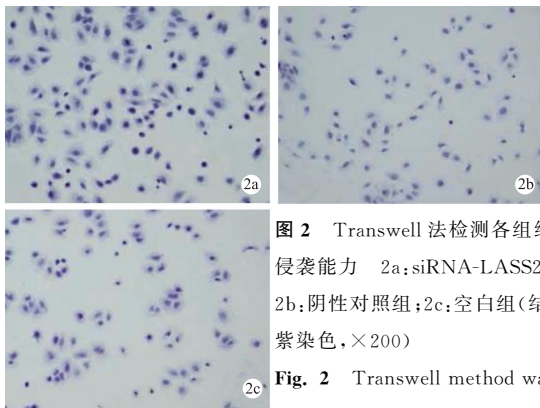


图 2 Transwell 法检测各组细胞侵袭能力 2a: siRNA-LASS2 组; 2b: 阴性对照组; 2c: 空白组(结晶紫染色, ×200)

Fig. 2 Transwell method was used to detect the invasive ability

of cells in each group (Crystal violet, × 200)

和淋巴结转移有关(P<0.05),见表 3。

2.3 各组细胞中 LASS2 基因表达 siRNA-LASS2 组、阴性对照组和空白组细胞中 LASS2 mRNA 相对表达量分别为(0.35±0.06)、(1.12±0.09)和(1.07±0.12),差异有统计学意义(F=133.098, P=0.000),阴性对照组和空白组细胞中

LASS2 mRNA 相对表达量无差异(P=0.377), siRNA-LASS2 组细胞中 LASS2 mRNA 相对表达量低于阴性对照组和空白组(P<0.05)。

2.4 各组细胞增殖能力 siRNA-LASS2 组 1 d、2 d、3 d 和 4 d 时 A 值均高于阴性对照组和空白组(P<0.05),见表 4。

2.5 各组细胞迁移能力 siRNA-LASS2 组 24 h 和 48 h 时细胞迁移率高于阴性对照组和空白组(P<0.05),见表 5 和图 1。

表 5 各组细胞迁移能力

Tab. 5 Migration ability of cells in each group

组别	24 h	48 h
siRNA-LASS2 组	51.24±7.64 ^{*1*2}	78.64±3.91 ^{*1*2}
阴性对照组	18.52±2.35	37.52±2.00
空白组	20.95±2.56	34.77±1.74
F	85.018	486.706
P	0.000	0.000

注:与空白组比较,*1 P<0.05;与阴性对照组比较,*2 P<0.05

2.6 各组细胞侵袭能力 siRNA-LASS2 组、阴性对照组和空白组侵袭细胞数分别为 (125.95 ± 5.51) 、 (64.30 ± 7.13) 和 (68.25 ± 3.39) , 差异有统计学意义 ($F=230.936, P=0.000$); 阴性对照组和空白组侵袭细胞数无差异 ($P=0.237$), siRNA-LASS2 组侵袭细胞数高于阴性对照组和空白组 ($P<0.05$), 见图 2。

3 讨论

口腔鳞癌具有发病率高、生存率低的特点^[3], 且患者生存率及预后改善有限^[4]。研究表明, 肿瘤细胞高侵袭转移性是影响口腔鳞癌患者预后的重要因素^[5]。LASS2 是由我国科学家发现并命名的基因, 可通过调控 V-ATPase 质子泵活性、基因转录、神经酰胺表达等而在多种恶性肿瘤发生、进展、侵袭、转移等过程中发挥重要作用^[6-8], 亦有研究指出^[9,10], LASS2 与恶性肿瘤预后及耐药性有关。本研究结果显示, 口腔鳞癌组织中 LASS2 mRNA 和蛋白相对表达量均低于癌旁组织, 说明 LASS2 在口腔鳞癌组织中呈低表达, 提示 LASS2 可能作为一种抑癌基因而参与了口腔鳞癌发生过程。本研究结果显示, TNM 分期 T3-T4 期、中低分化、临床分期 III 期+IV 期及发生淋巴结转移的口腔鳞癌组织中 LASS2 mRNA 和蛋白均呈低表达, 说明 LASS2 可能参与了口腔鳞癌恶性化及转移过程。

本研究利用 siRNA 技术特异性抑制人口腔鳞癌 CAL-27 细胞中 LASS2 基因表达, 结果显示, siRNA-LASS2 组细胞中 LASS2 基因表达被成功抑制。本研究结果显示, siRNA-LASS2 组 1、2、3 和 4 d 时 A 值均高于阴性对照组和空白组, 说明特异性抑制细胞中 LASS2 基因表达可促使细胞增殖, 亦从另一个方面说明 LASS2 基因在抑制肿瘤生长中发挥重要作用^[11], 是一种抑癌基因。本研究结果显示, siRNA-LASS2 组 24 h 和 48 h 时细胞迁移率及侵袭细胞数高于阴性对照组和空白组, 说明特异性

抑制细胞中 LASS2 基因表达可促使细胞迁移和侵袭。

综上所述, LASS2 在口腔鳞癌组织中呈低表达, 特异性抑制口腔鳞癌细胞中 LASS2 表达可促进细胞增殖、加速细胞迁移及侵袭, 有望为口腔鳞癌机制研究及基因治疗提供新的靶点。

参考文献

- [1] Wang H, Zuo Y, Ding M, et al. LASS2 inhibits growth and invasion of bladder cancer by regulating ATPase activity [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(2):661-668.
- [2] 何俊, 王海峰, 王剑松. LASS2 基因对恶性肿瘤转移抑制作用的研究进展 [J]. *山东医药*, 2016, 56(36):100-102.
- [3] 郑政, 何盈洋, 谢狄亚, 等. Rab38 在口腔鳞癌中的表达及临床意义 [J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(9):946-949.
- [4] 刘冲, 李吉辰, 赛音乌力吉, 等. IL-24 在口腔鳞状细胞癌中的表达及其临床意义 [J]. *口腔医学研究*, 2018, 34(6):632-635.
- [5] Xie N, Wang C, Zhuang Z, et al. Decreased miR-320a promotes invasion and metastasis of tumor budding cells in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40):65744-65757.
- [6] 保欣, 王海峰, 王剑松. LASS2/TMSG1 基因对肿瘤疾病和神经损伤修复的影响 [J]. *医学与哲学*, 2016, 37(6B):59-62.
- [7] Xu X, Liu B, Zou P, et al. Silencing of LASS2/TMSG1 enhances invasion and metastasis capacity of prostate cancer cell [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(4):731-743.
- [8] Chen Y, Wang H, Xiong T, et al. The role of LASS2 in regulating bladder cancer cell tumorigenicity in a nude mouse model [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5):5149-5156.
- [9] Ke RH, Wang Y, Mao Y, et al. Decreased expression of LASS2 is associated with worse prognosis in meningiomas [J]. *J Neurooncol*, 2014, 118(2):369-376.
- [10] Obanda DN, Yu Y, Wang ZQ, et al. Modulation of sphingolipid metabolism with calorie restriction enhances insulin action in skeletal muscle [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(7):687-695.
- [11] Wang H, Zuo Y, Ding M, et al. LASS2 inhibits growth and invasion of bladder cancer by regulating ATPase activity [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(2):661-668.

[收稿日期:2018-08-21]

(本文编辑 李四群)