

LncRNA ASB16-AS1调节miR-185-5p/TRAM2轴 对口腔鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

靳瑞¹ 焦合主² 黄颖² 张敏^{2*}

(¹中国人民解放军空降兵部队医院口腔科, 武汉 430000;

²中国人民解放军空降兵部队医院机关门诊部, 武汉 430000)

摘要 该文旨在探讨长链非编码RNA ASB16-AS1(LncRNA ASB16-AS1)靶向微小RNA-185-5p(miR-185-5p)/易位相关膜蛋白2(TRAM2)轴对口腔鳞状细胞癌(又称口腔鳞癌)细胞增殖、迁移和侵袭的影响。体外培养人口腔鳞癌细胞SCC-9, 将其分为对照组、sh-NC组、sh-ASB16-AS1组、sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组、sh-ASB16-AS1+miR-185-5p inhibitor组。用qRT-PCR法检测各组细胞LncRNA ASB16-AS1、miR-185-5p、TRAM2 mRNA表达水平; 用CCK-8试剂盒检测SCC-9细胞增殖情况; 用流式细胞术检测SCC-9细胞凋亡情况; 用划痕实验检测SCC-9细胞迁移情况; 用Transwell法检测SCC-9细胞侵袭情况; Western blot检测TRAM2蛋白表达水平。双荧光素酶报告实验验证LncRNA ASB16-AS1与miR-185-5p及miR-185-5p与TRAM2之间的靶向关系。与对照组和sh-NC组相比, sh-ASB16-AS1组中LncRNA ASB16-AS1、TRAM2 mRNA、TRAM2蛋白表达水平以及D值、划痕愈合率、细胞侵袭数降低, miR-185-5p水平、细胞凋亡率升高($P<0.05$); 与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比, sh-ASB16-AS1+miR-185-5p inhibitor组中miR-185-5p水平、细胞凋亡率降低, TRAM2 mRNA表达水平、TRAM2蛋白表达水平、D值、划痕愈合率、细胞侵袭数升高($P<0.05$), 而LncRNA ASB16-AS1水平无显著变化($P>0.05$); 生物学信息网站预测显示miR-185-5p与LncRNA ASB16-AS1和TRAM2均存在靶向结合位点, 且双荧光素酶报告基因实验证实LncRNA ASB16-AS1与miR-185-5p, 以及miR-185-5p与TRAM2之间均存在靶向关系($P<0.05$)。在口腔鳞癌细胞中LncRNA ASB16-AS1表达上调, 抑制LncRNA ASB16-AS1的表达可靶向上调miR-185-5p的表达, 抑制TRAM2的表达, 进而促进口腔鳞癌细胞凋亡, 抑制口腔鳞癌细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词 长链非编码RNA ASB16-AS1; 微小RNA-185-5p/易位相关膜蛋白2; 口腔鳞癌; 增殖; 迁移; 侵袭

Effects of LncRNA ASB16-AS1 on the Proliferation, Migration, and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells by Regulating the miR-185-5p/TRAM2 Axis

JIN Rui¹, JIAO Hezhu², HUANG Ying², ZHANG Min^{2*}

(¹Department of Stomatology, Chinese People's Liberation Army Airborne Troops Hospital, Wuhan 430000, China;

²Department of Outpatient, Chinese People's Liberation Army Airborne Troops Hospital, Wuhan 430000, China)

Abstract This study aims to investigate the effects of LncRNA ASB16-AS1 (long non-coding RNA ASB16-AS1) on the proliferation, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma cells by targeting the

收稿日期: 2024-04-26

接受日期: 2024-06-06

*通信作者: Tel: 0712-2952436, E-mail: 958913970@qq.com

Received: April 26, 2024

Accepted: June 6, 2024

*Corresponding author. Tel: +86-712-2952436, E-mail: 958913970@qq.com

miR-185-5p/TRAM2 axis. Human oral squamous cell carcinoma cells SCC-9 were cultured *in vitro* and grouped into control group, sh-NC group, sh-ASB16-AS1 group, sh-ASB16-AS1+inhibitor NC group, and sh-ASB16-AS1+miR-185-5p inhibitor group. qRT-PCR method was applied to detect the expression of LncRNA ASB16-AS1, miR-185-5p, and *TRAM2* mRNA of cells in each group. SCC-9 cell proliferation was detected using CCK-8 assay kit. SCC-9 cell apoptosis was detected by flow cytometry. SCC-9 cell migration was detected using scratch assay, and SCC-9 cell invasion was detected using Transwell method. Western blot was applied to detect the expression of TRAM2 protein. Dual luciferase reporter assay was applied to verify the targeting relationship between LncRNA ASB16-AS1 and miR-185-5p, and miR-185-5p and *TRAM2*. Compared with the control group and sh-NC group, the expression levels of LncRNA ASB16-AS1, *TRAM2* mRNA, and TRAM2 protein, as well as *D* value, scratch healing rate, and number of invasive cells were reduced in the sh-ASB16-AS1 group, while the level of miR-185-5p and cell apoptosis rate were increased ($P<0.05$). Compared with the sh-ASB16-AS1+inhibitor NC group, the miR-185-5p level and cell apoptosis rate in the sh-ASB16-AS1+miR-185-5p inhibitor group were reduced, while the expression levels of *TRAM2* mRNA and TRAM2 protein, *D* values, scratch healing rate, and number of invasive cells were elevated ($P<0.05$), however, there were no significant changes in the levels of LncRNA ASB16-AS1 ($P>0.05$). Biological information websites predicted that miR-185-5p had targeted binding sites with LncRNA ASB16-AS1 and *TRAM2*, and dual luciferase reporter gene experiments confirmed the existence of targeted relationships between LncRNA ASB16-AS1 and miR-185-5p, and miR-185-5p and *TRAM2* ($P<0.05$). The expression of LncRNA ASB16-AS1 is upregulated in oral squamous cell carcinoma cells. Inhibiting the expression of LncRNA ASB16-AS1 can target and upregulate the expression of miR-185-5p, inhibit the expression of TRAM2, promote apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells, and inhibit their proliferation, migration, and invasion.

Keywords long non-coding RNA ASB16-AS1; microRNA-185-5p/translocation associated membrane protein 2; oral squamous cell carcinoma; proliferation; migration; invasion

口腔癌是临床上常见的头颅部位恶性肿瘤, 引起原因主要为口腔及其邻近部位病变, 已有相关统计显示, 在2020年, 口腔癌的新增病例达到37.7万, 新增死亡人数也达到17.7万^[1]。其中口腔鳞状细胞癌是口腔癌中最为常见的一种类型, 又被称为口腔鳞癌, 约占口腔癌的80%以上^[2]。口腔鳞癌是起源于上皮细胞的实体肿瘤, 其发生率在全球恶性肿瘤中排名第六^[3]。目前认为, 口腔卫生以及病毒感染等都是造成口腔鳞癌的影响因素, 但其具体的发病机制并不十分清楚^[4]。目前, 随着社会以及科学技术的不断深入发展, 许多长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)已经被发现, 其长度大于200个核苷酸, 在机体的生理生化过程中发挥重要作用^[5]。研究发现, LncRNA在细胞的增殖、迁移等生物学过程中发挥重要作用^[6]。研究发现, 在卵巢癌中, 长链非编码RNA ASB16-AS1(LncRNA ASB16-AS1)参与其疾病进展及化疗耐药性^[7]。但针对LncRNA ASB16-AS1在口腔癌中的作用尚不十分清楚。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种在真核细胞中广泛存在的、非编码的、高度保守的单链小RNA^[8]。miRNA可以对mRNA的表达进行调

控, 从而参与疾病的发生发展过程^[9]。已有相关文献报道, 微小RNA-185-5p(miR-185-5p)参与乳腺恶性肿瘤的发生发展过程^[10]。另外研究发现, miR-185-5p在口腔鳞癌组织中表达下调, 且与患者不良预后密切相关, 其具有作为口腔鳞癌治疗关键靶点的潜力^[11]。已有相关研究表明, 易位相关膜蛋白2(translocation associated membrane protein 2, TRAM2)在口腔癌细胞转移中发挥关键作用, 其在口腔鳞癌细胞和组织中过表达, 并能促进细胞迁移、侵袭等恶性生物学行为^[12]。本研究经网站预测发现miR-185-5p与LncRNA ASB16-AS1和TRAM2之间可能存在靶向结合位点。因此, 本研究旨在探讨LncRNA ASB16-AS1对口腔鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响及其可能的作用机制, 为口腔鳞癌的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与主要试剂 人口腔鳞癌细胞 SCC-9(货号: CL-0571)购于武汉益普生物科技有限公司; DMEM培养基(货号: YBM-D)购于亿泽丰生物科技(上海)有

限公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号: BES2AS0185)、qRT-PCR试剂盒(货号: BES20373MB)购于上海博尔森生物科技有限公司; CCK-8试剂盒(货号: 96992-100TESTS-F)购于浙江联硕生物科技有限公司; 基质胶(货号: 354248)购于美国Corning公司; Lipofectamine 2000转染试剂(货号: 11668019)购于美国ThermoFisher Scientific公司; TRAM2抗体(货号: ab167163)、GAPDH抗体(货号: ab181602)购于英国Abcam公司。

1.1.2 主要仪器 酶标仪(型号: Sunrise™)购于上海帝肯实验器材有限公司; CO₂细胞培养箱(型号: Cel-IXpert C170i)购于德国Eppendorf公司; 显微镜(型号: DMi1)购于德国Leica公司; 流式细胞仪(型号: DxP Athena)购于美国Cytex Biosciences公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将SCC-9细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中, 在37 °C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中进行培养, 并定期对培养液进行更换。待细胞生长至对数生长期时, 对细胞进行传代。

1.2.2 细胞转染 对在DMEM培养基(含10%胎牛血清)中生长至对数生长期的SCC-9细胞进行不同的处理和分组。其中, 对照组: 正常培养基培养; sh-NC组: 转染sh-NC; sh-ASB16-AS1组: 转染sh-ASB16-AS1; sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组: 共转染sh-ASB16-AS1和inhibitor NC; sh-ASB16-AS1+miR-185-5p inhibitor组: 共转染sh-ASB16-AS1和miR-185-5p inhibitor。各组均使用Lipofectamine 2000转染试剂在37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养48 h进行转染, 随后检测转染效率, 并进行后续实验研究。

1.2.3 qRT-PCR检测LncRNA ASB16-AS1、miR-185-5p和TRAM2 mRNA表达水平 对各组细胞进行收集, 利用Trizol试剂盒对总RNA进行提取, 并将其逆转录为cDNA, 以cDNA为模版进行PCR扩增反应。PCR反应

体系: 4 μL PCR预混液(PCR Master Mix), 0.5 μL上游引物, 0.5 μL下游引物, 2 μL cDNA模板, 加双蒸水至20 μL; 扩增条件: 97.5 °C预变性8 min; 97.5 °C变性30 s, 60 °C退火20 s, 72.5 °C延伸10 s, 共40个循环。其中miR-185-5p的内参选择U6, LncRNA ASB16-AS1和TRAM2的内参选择GAPDH, 各个因子的相对表达量用2^{-ΔΔCt}法计算。引物序列如表1所示。

1.2.4 CCK-8试剂盒检测SCC-9细胞增殖情况 “1.2.2”中各组细胞用胰蛋白酶在37 °C条件下消化5 min, 并使用DMEM培养基重悬后以1×10⁴个/mL的密度接种到96孔板中培养48 h, 在每个孔中加入10 μL CCK-8溶液, 置于37 °C、5% CO₂细胞培养箱中培养, 孵育2 h, 利用酶标仪对450 nm波长处的吸光度(D)值进行检测, 即得到D₄₅₀值(450 nm波长处的吸光度值)。

1.2.5 流式细胞术检测SCC-9细胞凋亡情况 收集各组对数生长期细胞并将其接种在6孔板中, 加入胰蛋白酶在37 °C条件下对细胞消化5 min, PBS清洗2次, 每次30 s, 离心(室温、800 r/min、3 min)取沉淀, 加入结合缓冲液对细胞浓度进行调整, 然后分别加入Annexin V-FITC和PI, 暗处反应15 min。利用流式细胞仪对细胞凋亡情况进行检测。

1.2.6 划痕实验检测SCC-9细胞迁移情况 收集各组细胞并使用DMEM培养基重悬, 分别接种于6孔板中, 置于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中培养24 h, 使用200 μL枪头对6孔板进行垂直划线, 继续培养24 h。在显微镜下对0 h和24 h的划痕情况进行观察, 并拍照记录、计算划痕愈合率。划痕愈合率(%)=[(0 h的划痕宽度-48 h的划痕宽度)/0 h的划痕宽度]×100%。

1.2.7 Transwell法检测SCC-9细胞侵袭情况 在Transwell上室加入100 μL基质胶, 收集各组培养的细胞并使用DMEM培养基重悬使其浓度为1×10⁵个/mL, 之后将200 μL重悬后的细胞液加入已包被的Transwell上室, Transwell下室加入600 μL含有血清的培养基, 置于细

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Sequences of qRT-PCR primers

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
miR-185-5p	TGA GGA GCC GAT CAC GTC	GTG CCG GTG CAG AGG T
U6	GCA AGG ATG ACA CGC AAA TTC	GCG AGC ACA GAA TTA ATA CGA C
LncRNA ASB16-AS1	CGG CCC TGA GGC AAA CAT AC	TGA AAC ACT GCG CCAACT TC
TRAM2	GAC CTC CTG CGA ACA ACC ATC AC	AAG GCT TAA CTG GGG CTG GAA AAT C
GAPDH	CCT GAC CTG CGT GTG GAC T	GCT GTG GAT GGG GAG GTG TC

胞培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养24 h。将侵袭细胞用4%的多聚甲醛在室温下固定30 min,并用0.5%的结晶紫在室温下进行染色2 h,在显微镜下观察并拍照计算侵袭细胞数。

1.2.8 Western blot检测TRAM2蛋白表达情况 收集各组培养细胞,加入蛋白裂解液对总蛋白进行提取,提取的总蛋白用BCA试剂盒检测蛋白浓度,SDS-PAGE凝胶电泳进行样品分离,并将PAGE胶上的蛋白样品转至聚偏二氟乙烯膜上,用5%的脱脂奶粉在室温下进行封闭2 h,加入TRAM2(1:1 000)和GAPDH(1:1 000)一抗,在4 °C下孵育过夜,加入二抗(1:1 000),室温下孵育2 h。利用凝胶成像仪对蛋白的表达情况进行观察。

1.2.9 双荧光素酶报告基因检测 根据在线网站(<https://rnasysu.com/encori/agoClipRNA.php?source=mRNA>)预测LncRNA ASB16-AS1与miR-185-5p、miR-185-5p与TRAM2的结合位点。构建双荧光素酶报告基因表达载体质粒(ASB16-AS1-WT、ASB16-AS1-MUT和TRAM2-WT、TRAM2-MUT),将上述质粒分别与miR-NC或miR-185-5p mimic共转染于SCC-9细胞,转染48 h后对荧光素酶活性进行检测。

1.3 统计学分析

利用Graphpad Prism 8.0.1软件处理数据。计量资料,如划痕愈合率等,以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用F检验(进一步两两比较用SNK-q检验)。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组SCC-9细胞中LncRNA ASB16-AS1、miR-185-5p、TRAM2 mRNA及TRAM2蛋白的表达水平

与对照组和sh-NC组相比,sh-ASB16-AS1组中Ln-

cRNA ASB16-AS1、TRAM2 mRNA、TRAM2蛋白表达水平降低,miR-185-5p水平升高(P<0.05);与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比,sh-ASB16-AS1+miR-185-5p inhibitor组中miR-185-5p水平降低,TRAM2 mRNA、TRAM2蛋白表达水平升高(P<0.05),而LncRNA ASB16-AS1水平无显著变化(P>0.05)(图1和图2)。

2.2 比较各组SCC-9细胞增殖能力

与对照组和sh-NC组相比,sh-ASB16-AS1组中D值降低,即细胞增殖能力降低(P<0.05);与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比,sh-ASB16-AS1+miR-185-5p inhibitor组中D值升高,即细胞增殖能力增强(P<0.05)(图3)。

2.3 比较各组SCC-9细胞凋亡率

与对照组和sh-NC组相比,sh-ASB16-AS1组中细胞凋亡率升高(P<0.05);与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比,sh-ASB16-AS1+miR-185-5p inhibitor组中细胞凋亡率降低(P<0.05)(图4)。

2.4 比较各组SCC-9细胞迁移能力

与对照组和sh-NC组相比,sh-ASB16-AS1组划痕愈合率降低(P<0.05);与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比,sh-ASB16-AS1+miR-185-5p inhibitor组划痕愈合率升高(P<0.05)(图5)。

2.5 比较各组SCC-9细胞侵袭能力

与对照组和sh-NC组相比,sh-ASB16-AS1组中细胞侵袭数降低(P<0.05);与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比,sh-ASB16-AS1+miR-185-5p inhibitor组中细胞侵袭数升高(P<0.05)(图6)。

2.6 验证miR-185-5p与ASB16-AS1和TRAM2的靶向关系

利用网站预测miR-185-5p与LncRNA ASB16-

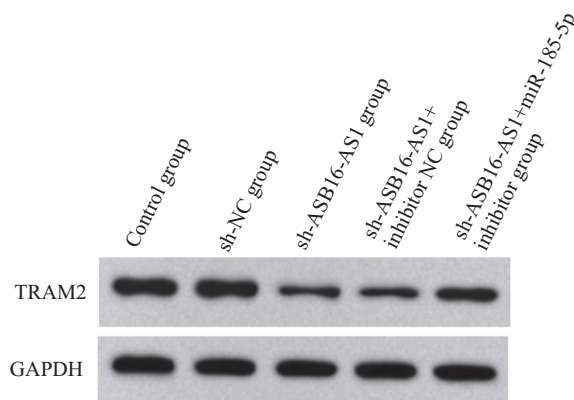
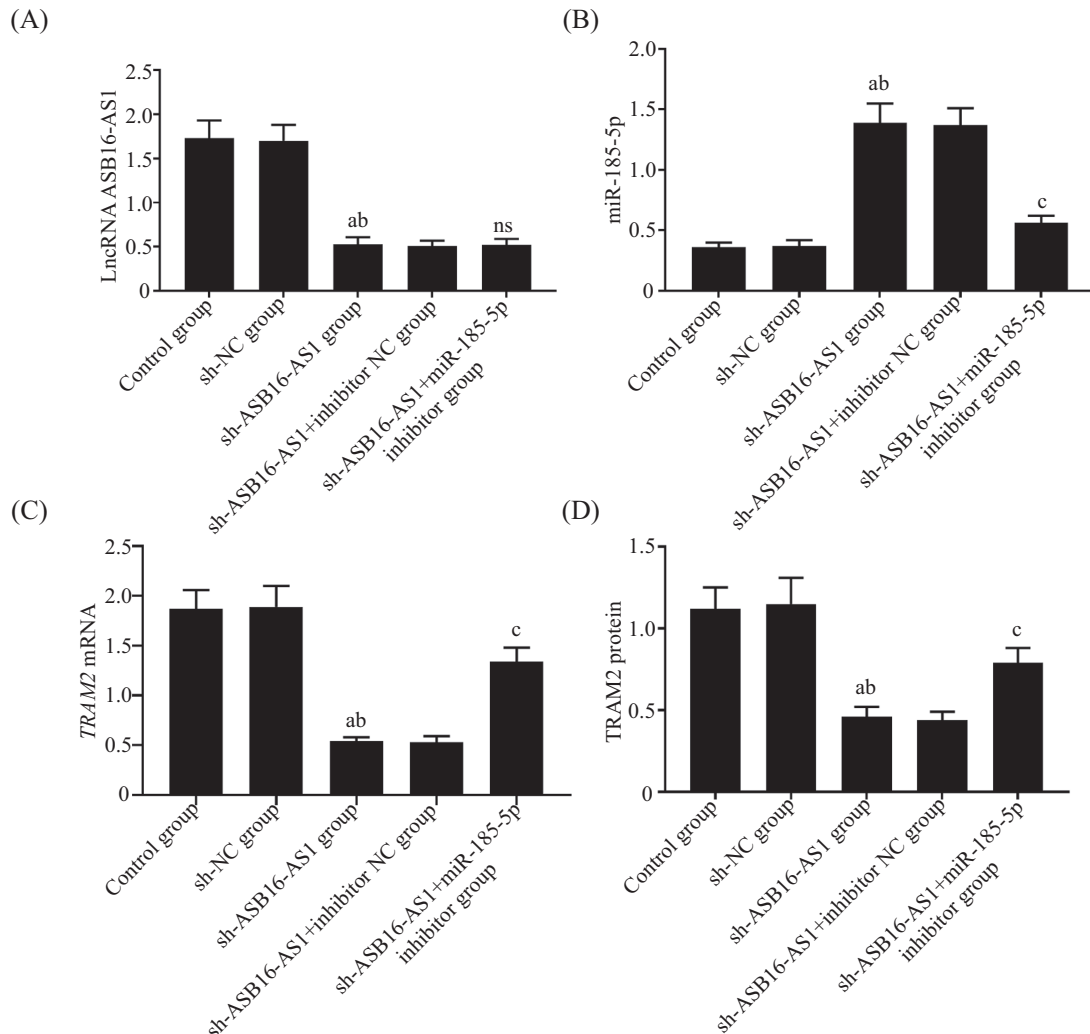


图1 Western blot检测SCC-9细胞中TRAM2蛋白表达水平

Fig.1 Western blot to detect TRAM2 protein expression in SCC-9 cells



A: 各组LncRNA ASB16-AS1表达比较; B: 各组miR-185-5p表达比较; C: 各组TRAM2 mRNA表达比较; D: 各组TRAM2蛋白表达比较。^{ns} $P>0.05$, 与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比; ^a $P<0.05$, 与对照组相比; ^b $P<0.05$, 与sh-NC组相比; ^c $P<0.05$, 与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比。

A: comparison of LncRNA ASB16-AS1 expression in each group; B: comparison of miR-185-5p expression in each group; C: comparison of TRAM2 mRNA expression in each group; D: comparison of TRAM2 protein expression in each group. ^{ns} $P>0.05$ compared with the sh-ASB16-AS1+inhibitor NC group; ^a $P<0.05$ compared with the control group; ^b $P<0.05$ compared with the sh-NC group; ^c $P<0.05$ compared with the sh-ASB16-AS1+inhibitor NC group.

图2 各组SCC-9细胞中LncRNA ASB16-AS1、miR-185-5p、TRAM2 mRNA、TRAM2蛋白的表达水平

Fig.2 Expression of LncRNA ASB16-AS1, miR-185-5p, TRAM2 mRNA and TRAM2 protein in SCC-9 cells of each group

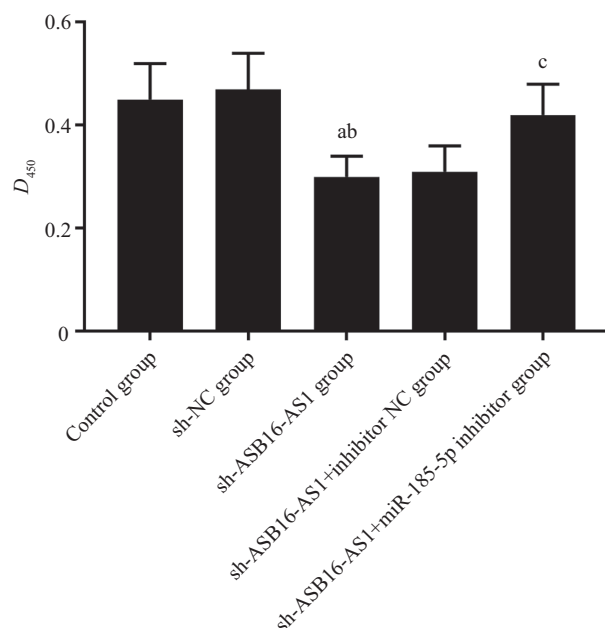
AS1和TRAM2的结合位点,结果见图7和图8。与miR-NC+ASB16-AS1-WT组相比,miR-185-5p mimic+ASB16-AS1-WT组荧光素酶活性显著降低($P<0.05$),表明ASB16-AS1和miR-185-5p存在靶向关系;与miR-NC+TRAM2-WT组相比,miR-185-5p mimic+TRAM2-WT组荧光素酶活性显著降低($P<0.05$),表明TRAM2和miR-185-5p存在靶向关系(图9)。

3 讨论

口腔鳞癌是在临床上常见的头颈部恶性肿瘤,主要是由发生于口腔部位的上皮组织的病变引起的^[13]。

已有相关研究发现,口腔鳞癌具有生长迅速、扩散性强以及预后差的特点^[14]。目前在临床上常用的治疗方法主要包括手术治疗、化疗以及放疗,但对于部分晚期患者而言,其术后生存率仍较低^[15]。目前,关于口腔鳞癌发生发展的分子机制还不十分明确,因此,需要深入研究其发生发展涉及的相关机制,为口腔鳞癌的早期诊断以及治疗提供理论依据。

LncRNA ASB16-AS1主要位于17q 21.31染色体上,且研究已经发现,其具有致癌基因的作用^[16]。有研究报道,LncRNA ASB16-AS1可以促进肝癌细胞的生长与侵袭^[17]。ZHANG等^[18]研究发现,LncRNA ASB16-AS1在

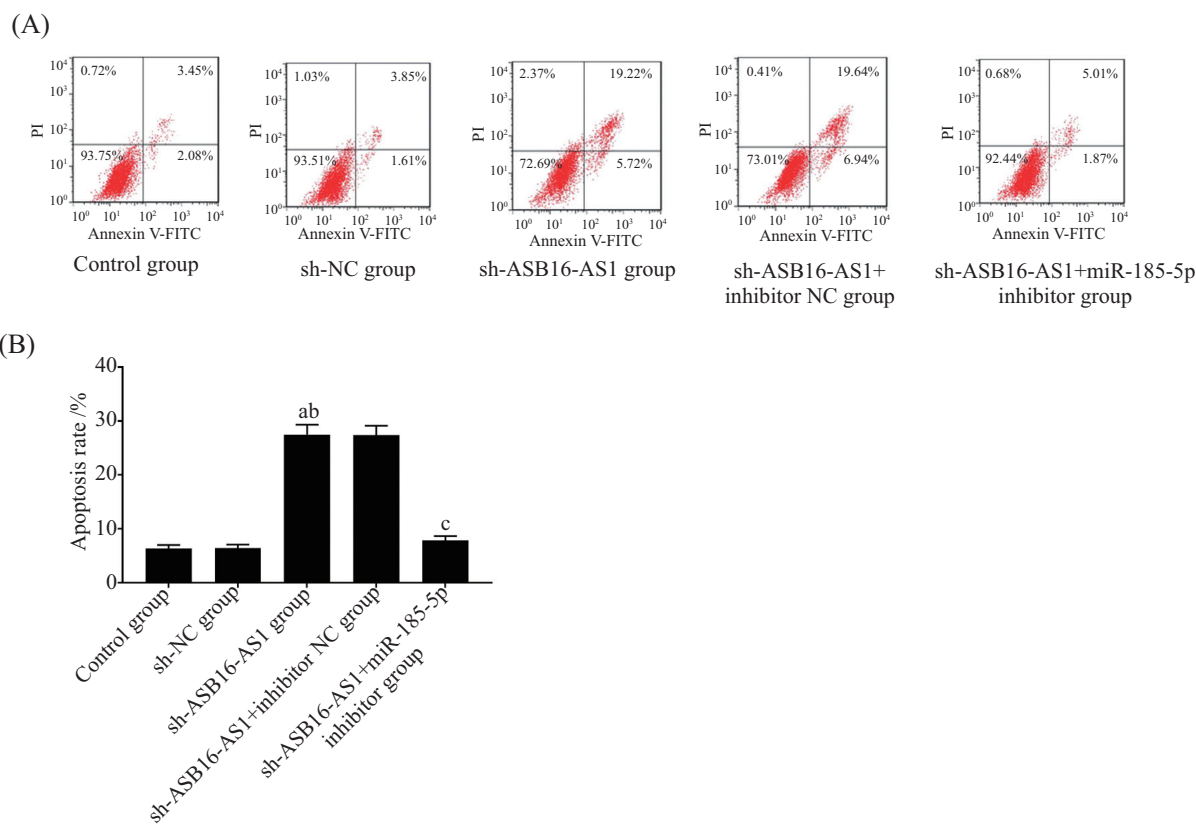


^a $P < 0.05$, 与对照组相比; ^b $P < 0.05$, 与sh-NC组相比; ^c $P < 0.05$, 与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比。

^a $P < 0.05$ compared with the control group; ^b $P < 0.05$ compared with the sh-NC group; ^c $P < 0.05$ compared with the sh-ASB16-AS1+inhibitor NC group.

图3 各组SCC-9细胞增殖能力比较

Fig.3 Comparison of proliferative capacity of SCC-9 cells in each group

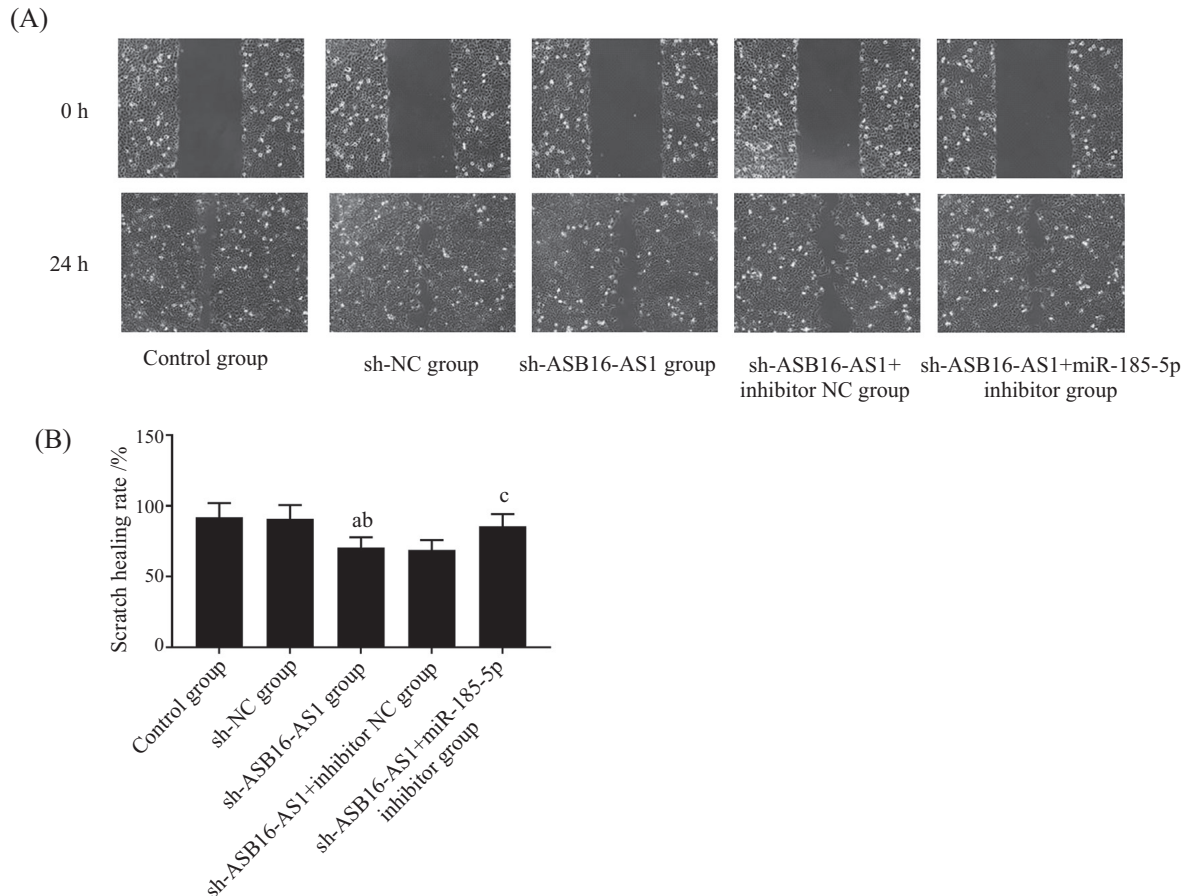


A: 流式细胞术检测各组SCC-9细胞凋亡; B: 各组SCC-9细胞凋亡率比较。 ^a $P < 0.05$, 与对照组相比; ^b $P < 0.05$, 与sh-NC组相比; ^c $P < 0.05$, 与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比。

A: flow cytometry detection of apoptosis of SCC-9 cells in each group; B: comparison of apoptosis rate of SCC-9 cells in each group. ^a $P < 0.05$ compared with the control group; ^b $P < 0.05$ compared with the sh-NC group; ^c $P < 0.05$ compared with the sh-ASB16-AS1+inhibitor NC group.

图4 各组SCC-9细胞凋亡率比较

Fig.4 Comparison of apoptosis rate of SCC-9 cells in each group



A: 划痕实验检测各组SCC-9细胞的迁移能力; B: 各组SCC-9细胞迁移能力比较。^a $P < 0.05$, 与对照组相比; ^b $P < 0.05$, 与sh-NC组相比; ^c $P < 0.05$, 与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比。

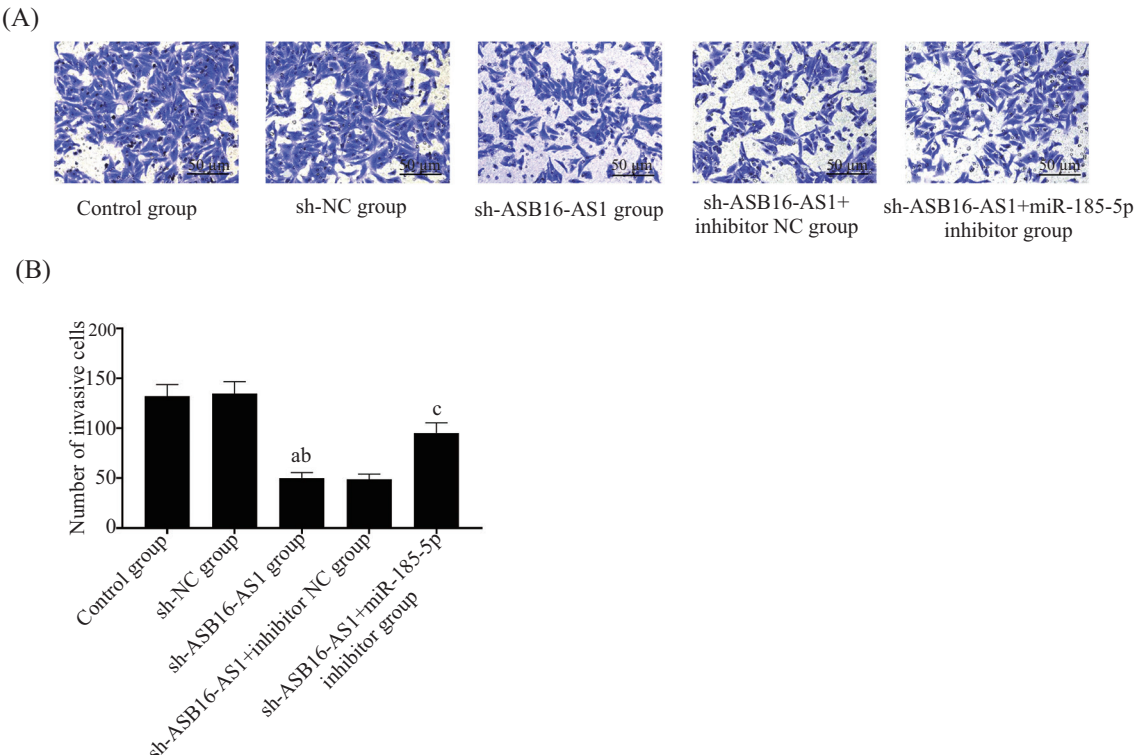
A: scratch assay was used to detect the migratory ability of various groups of SCC-9 cells; B: comparison of migration ability of SCC-9 cells in each group. ^a $P < 0.05$ compared with the control group; ^b $P < 0.05$ compared with the sh-NC group; ^c $P < 0.05$ compared with the sh-ASB16-AS1+inhibitor NC group.

图5 各组SCC-9细胞迁移能力比较

Fig.5 Comparison of migration ability of SCC-9 cells in each group

胶质瘤细胞中呈高表达。miRNA是一种参与真核细胞基因的表达和调控、大小为18~25 bp的小分子,其主要通过碱基互补的方式与mRNA的3'-UTR结合参与细胞分化、增殖以及凋亡等生物学过程,其异常表达与疾病的发生发展有关^[19-20]。有研究发现,在前列腺癌中,对miR-185-5p进行过表达会抑制肿瘤细胞的增殖以及侵袭,促进肿瘤细胞的凋亡^[21]。NIU等^[22]研究发现,miR-185-5p参与肝癌细胞的生物学行为过程。本研究结果显示,沉默LncRNA ASB16-AS1的表达后,miR-185-5p的表达水平显著升高,且口腔鳞癌细胞增殖、迁移、侵袭能力降低,细胞凋亡率升高,提示LncRNA ASB16-AS1在口腔鳞癌中起促癌作用。荧光素酶活性实验结果表明,LncRNA ASB16-AS1与miR-185-5p存在一定的靶向关系,并通过进一步实验发现,在下调LncRNA ASB16-AS1表达的同时下调miR-185-5p的表达,可逆

转沉默LncRNA ASB16-AS1对口腔鳞癌细胞增殖、迁移、侵袭能力的抑制作用,并降低细胞凋亡率。这说明LncRNA ASB16-AS1对口腔鳞癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭等生物学行为具有调节作用,且通过海绵化miR-185-5p进行。研究发现,TRAM2参与胰腺癌的发生发展过程^[23]。FUKUSHIMA等^[12]研究发现,在口腔鳞癌的转移过程中,TRAM2发挥重要作用。本研究结果表明,下调LncRNA ASB16-AS1表达后,miR-185-5p表达水平升高,TRAM2表达水平降低。此外,在miR-185-5p抑制剂的回补实验中发现TRAM2表达水平再次升高,并且本研究证实miR-185-5p与TRAM2存在有一定的靶向关系,这提示下调LncRNA ASB16-AS1表达会对miR-185-5p/TRAM2轴产生调控作用,并进一步抑制口腔鳞癌细胞的增殖、迁移、侵袭。本研究仅通过细胞实验探究LncRNA ASB16-AS1在口腔鳞癌中的作用及



A: Transwell法检测各组SCC-9细胞的侵袭能力; B: 各组SCC-9细胞的侵袭能力比较。^a*P*<0.05, 与对照组相比; ^b*P*<0.05, 与sh-NC组相比; ^c*P*<0.05, 与sh-ASB16-AS1+inhibitor NC组相比。

A: Transwell assay was used to detect the invasive ability of various groups of SCC-9 cells; B: comparison of invasion ability of SCC-9 cells in each group. ^a*P*<0.05 compared with the control group; ^b*P*<0.05 compared with the sh-NC group; ^c*P*<0.05 compared with the sh-ASB16-AS1+inhibitor NC group.

图6 各组SCC-9细胞的侵袭能力比较

Fig.6 Comparison of invasion ability of SCC-9 cells in each group

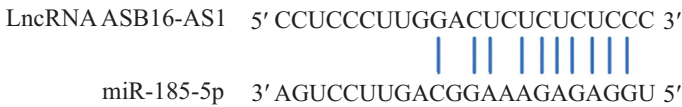


图7 miR-185-5p与LncRNA ASB16-AS1的靶向结合位点

Fig.7 Target binding site of miR-185-5p with LncRNA ASB16-AS1



图8 miR-185-5p与TRAM2的靶向结合位点

Fig.8 Target binding site of miR-185-5p with TRAM2

潜在机制, 后续我们将进一步通过动物实验进行研究, 并纳入临床样本分析LncRNA ASB16-AS1与患者临床特征的关系, 为LncRNA ASB16-AS1的临床应用提供参考。

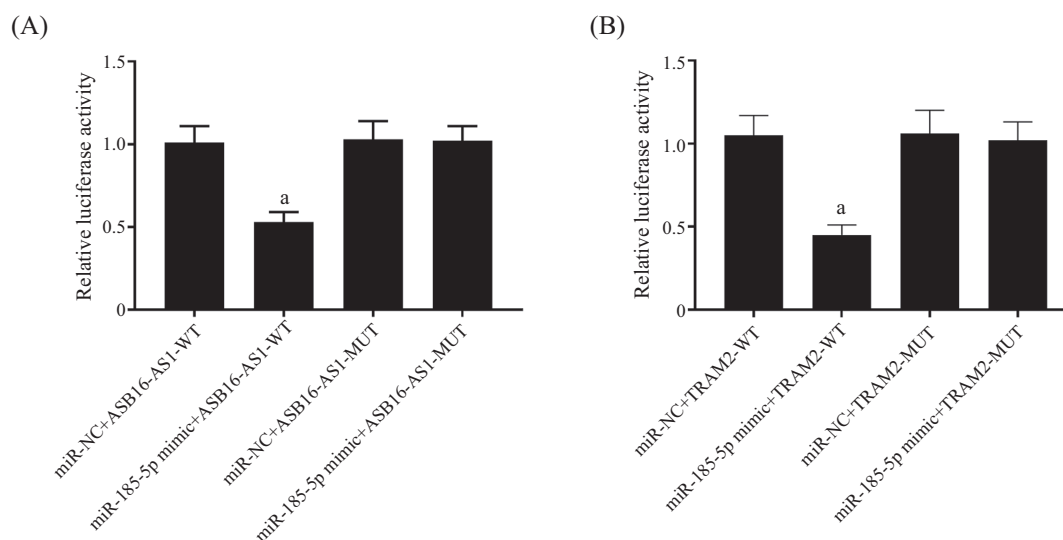
综上所述, 沉默LncRNA ASB16-AS1的表达, 可以通过靶向上调miR-185-5p的表达, 进一步使TRAM2的表达下调, 抑制口腔鳞癌细胞的增殖、迁移、侵袭, 从

而促进口腔鳞癌细胞凋亡。

参考文献 (References)

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.

[2] 任晗. 常规小剂量化疗治疗口腔癌临床疗效及安全性研究[J].



A: miR-185-5p与LncRNA ASB16-AS1靶向关系验证。^a $P < 0.05$, 与miR-NC+ASB16-AS1-WT组相比; B: miR-185-5p与TRAM2靶向关系验证。^a $P < 0.05$, 与miR-NC+TRAM2-WT组相比。

A: verification of the targeting relationship between miR-185-5p and LncRNA ASB16-AS1, ^a $P < 0.05$ compared with miR-NC+ASB16-AS1-WT group; B: verification of the targeting relationship between miR-185-5p and TRAM2, ^a $P < 0.05$ compared with the miR-NC+TRAM2-WT group.

图9 荧光素酶活性比较

Fig.9 Comparison of luciferase activities

- 中国医学文摘(耳鼻咽喉科学)(REN H. Study on the clinical efficacy and safety of conventional low-dose chemotherapy in the treatment of oral cancer [J]. China Medical Abstracts, Otolaryngology, 2022, 37(5): 72-4.
- [3] 张超杰, 仵楠, 赵举红, 等. 口腔鳞状细胞癌中RAI14的表达及其临床意义[J]. 石河子大学学报(自然科学版)(ZHANG C J, WU N, ZHAO J H, et al. The expression of RAI14 in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance [J]. Journal of Shihezi University, Natural Science), 2021, 39(4): 511-4.
 - [4] 王云婷, 陈钰, 朱智慧, 等. 磁共振扩散加权成像对口腔鳞状细胞癌颈部淋巴结转移诊断及预后预测价值分析[J]. 临床军医杂志(WANG Y T, CHEN Y, ZHU Z H, et al. Analysis of the diagnostic and prognostic predictive value of magnetic resonance diffusion-weighted imaging for cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma [J]. Journal of Clinical Military Medicine), 2021, 49(11): 1229-32.
 - [5] TAN Y T, LIN J F, LI T, et al. LncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer [J]. Cancer Commun, 2021, 41(2): 109-20.
 - [6] 吴品庚, 张宇曦, 张哲, 等. 长链非编码RNA RP1-90L14.1对前列腺癌LNCaP细胞生物学行为的影响及其机制研究[J]. 中华男科学杂志(WU P G, ZHANG Y X, ZHANG Z, et al. Effects of long-stranded non-coding RNA RP1-90L14.1 on the biological behavior of prostate cancer LNCaP cells and its mechanisms [J]. Chinese Journal of Male Science), 2019, 25(3): 209-15.
 - [7] FAN Y, WANG L, HAN X, et al. LncRNA ASB16-AS1 accelerates cellular process and chemoresistance of ovarian cancer cells by regulating GOLM1 expression via targeting miR-3918 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 675(1): 1-9.
 - [8] 麦尔哈巴·阿不都热依木, 潘燕. 非编码RNA作为ceRNA在人癌症中的功能及机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报(MARHABA ABDUREYIM, PAN Y. The function and mechanism of non-coding RNAs acting as ceRNAs in human cancer [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology), 2020, 36(8): 895-902.
 - [9] 马楚晗, 于亚男, 刘敬文, 等. miRNA对肝纤维化TGF-β/smad信号通路的影响[J]. 中国临床解剖学杂志(MA C H, YU Y N, LUI Q W, et al. Effect of miRNA on the TGF-β/smad signal pathway in hepatic fibrosis [J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy), 2021, 39(3): 369-72.
 - [10] DE G, ERLI E, TORUN V, et al. miR-185-5p response to usnic acid suppresses proliferation and regulating apoptosis in breast cancer cell by targeting Bcl2 [J]. Biol Res, 2020, 53(1): 19-33.
 - [11] WANG X, FENG X, WANG H. LncRNA LSINCT5 drives proliferation and migration of oral squamous cell carcinoma through the miRNA-185-5p/ZNF703 axis [J]. J BUON, 2021, 26(1): 124-31.
 - [12] FUKUSHIMA R, KASAMATSU A, NAKASHIMA D, et al. Overexpression of translocation associated membrane protein 2 leading to cancer-associated matrix metalloproteinase activation as a putative metastatic factor for human oral cancer [J]. J Cancer, 2018, 9(18): 3326-33.
 - [13] 刘盼, 多力昆·吾甫尔, 蔡志刚, 等. 维吾尔族口腔鳞状细胞癌患者中血清鳞状细胞癌抗原的表达研究[J]. 国际口腔医学杂志(LIU P, DUOLIKUN WUFUER, CAI Z G, et al. Clinical significance of serum squamous cell carcinoma antigens in Uyghur patients with oral squamous cell carcinoma [J]. International Journal of Stomatology), 2016, 43(6): 645-50.
 - [14] 李蕾, 李晓东, 庄乾伟, 等. 超声热疗联合TPF化疗治疗19例老年晚期口腔鳞癌的疗效分析[J]. 上海口腔医学(LI L, LI X D, ZHUANG Q W, et al. Analysis of curative effect of ultrasonic hyperthermia combined with TPF chemotherapy on 19 elderly with advanced oral squamous cell carcinoma [J]. Shanghai Journal of

- Stomatology), 2021, 30(5): 543-7.
- [15] 张泽君, 南欣荣, 闫星泉. III~IV期口腔鳞癌患者术后复发的危险因素及复发患者的预后分析[J]. 医学研究杂志(ZHANG Z J, NAN X R, YAN X Q. Risk factors for postoperative recurrence and prognosis of recurrent patients with stage III-IV oral cancer [J]. *IMed Res*), 2021, 50(2): 102-6.
- [16] TAN L J, LIU J T, YANG M, et al. LncRNA ASB16-AS1 promotes proliferation and inhibits apoptosis of non small cell lung cancer cells by activating the Wnt/ β catenin signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(4): 1870-6.
- [17] YAO X X, YOU G Q, ZHOU C, et al. LncRNA ASB16-AS1 promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma through regulating mir-1827/fzd4 axis and activating Wnt/ β -Catenin pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11(1): 9371-8.
- [18] ZHANG D, ZHOU H, LIU J, et al. Long noncoding RNA ASB16-AS1 promotes proliferation, migration, and invasion in glioma cells [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019(1): 5437531.
- [19] LIANG H, HU C, LIN X, et al. MiR-548d-3p promotes gastric cancer by targeting RSK4 [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12(3): 13325-37.
- [20] YIN H, WANG H, LI Z, et al. RNA micelles for the systemic delivery of anti-miRNA for cancer targeting and inhibition without ligand [J]. *ACS Nano*, 2018, 13(1): 706-17.
- [21] OSTADRAHIMI S, ABEDI VALUGERDI M, HASSAN M, et al. miR-1266-5p and miR-185-5p promote cell apoptosis in human prostate cancer cell lines [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(1): 2305-11.
- [22] NIU Y, TANG G. miR-185-5p targets ROCK2 and inhibits cell migration and invasion of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 5087-93.
- [23] LI C, CAI J, LIU W, et al. Downregulation of circ-STK39 suppresses pancreatic cancer progression by sponging mir-140-3p and regulating TRAM2-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Apoptosis*, 2023, 28(7/8): 1024-34.