

LncRNA CASC9通过调控miR-423-5p/NRSN2轴促进口腔鳞状细胞癌细胞增殖并抑制细胞凋亡

李立恒^{1*} 王蕊¹ 王芹¹ 张智轶¹ 安峰¹ 张璇¹ 王晓明¹ 张凡²

(¹河北北方学院附属第一医院口腔科, 张家口 075000; ²河北北方学院附属第一医院病理科, 张家口 075000)

摘要 口腔鳞状细胞癌(OSCC)是一种侵袭性强的头颈部恶性肿瘤, 严重威胁着人类的身体健康。该研究旨在探讨长链非编码RNA肿瘤易感候选者9(LncRNA CASC9)调控miR-423-5p/neurensin-2(NRSN2)轴对OSCC细胞增殖和凋亡的影响。采用qRT-PCR检测OSCC癌组织及HSC-3、CAL-27、SCC-15细胞中CASC9水平; 将SCC-15细胞分为对照组、sh-NC-1组、sh-CASC9组、miR-NC组、miR-423-5p mimics组、anti-miR-NC组、anti-miR-423-5p组、sh-NC组、sh-NRSN2组、sh-CASC9+anti-miR-NC组、sh-CASC9+anti-miR-423-5p组, qRT-PCR检测CASC9和miR-423-5p表达, CCK-8、流式细胞术、Western blot分别检测细胞增殖、凋亡及NRSN2蛋白表达情况; 裸鼠体内移植瘤实验观察CASC9对肿瘤生长的影响; RNA pull down及双荧光素酶报告基因实验检测miR-423-5p与CASC9、NRSN2的靶向关系。结果显示, 在OSCC组织和细胞中CASC9呈高表达, 且在SCC-15细胞中CASC9表达量最高, 故以SCC-15细胞为研究对象; 沉默CASC9可抑制SCC-15细胞增殖、促进凋亡并抑制裸鼠体内肿瘤的形成($P<0.05$); CASC9靶向负调控miR-423-5p表达, miR-423-5p靶向负调控NRSN2表达; 抑制miR-423-5p可促进SCC-15细胞增殖、抑制凋亡; 下调NRSN2可抑制SCC-15细胞增殖、促进凋亡; 抑制miR-423-5p表达减弱了沉默CASC9对OSCC细胞所发挥的作用($P<0.05$)。总之, 沉默CASC9可能通过靶向上调miR-423-5p来抑制NRSN2表达进而抑制SCC-15细胞的增殖, 促进细胞凋亡。

关键词 长链非编码RNA肿瘤易感候选者9; miR-423-5p; neurensin-2; 口腔鳞状细胞癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

LncRNA CASC9 Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells by Regulating miR-423-5p/NRSN2 Axis

LI Liheng^{1*}, WANG Rui¹, WANG Qin¹, ZHANG Zhiyi¹, AN Feng¹, ZHANG Xuan¹, WANG Xiaoming¹, ZHANG Fan²

(¹Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

²Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract OSCC (oral squamous cell carcinoma) is a highly invasive malignant tumor of the head and neck, which seriously threatens human health. The purpose of the study was to investigate the effects of LncRNA CASC9 (long chain non coding RNA tumor susceptible candidate 9) regulating the miR-423-5 p/NRSN2 (neurensin-2) axis on the proliferation and apoptosis of OSCC cells. qRT-PCR (quantitative real-time PCR) was used to de-

收稿日期: 2022-12-21 接受日期: 2023-03-14

2021年度河北省医学科学研究课题计划项目(批准号: 20210802)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18931311692, E-mail: jugrnu@163.com

Received: December 21, 2022 Accepted: March 14, 2023

This work was supported by the Hebei Medical Science Research Project Plan for 2021 (Grant No.20210802)

*Corresponding author. Tel: +86-18931311692, E-mail: jugrnu@163.com

检测CASC9在癌组织中的表达水平,选取21例OSCC患者癌组织及hSC-3、CAL-27、SCC-15细胞;将SCC-15细胞分为对照组、sh-NC-1组、sh-CASC9组、miR-NC组、miR-423-5p mimics组、anti-miR-NC组、anti-miR-423-5p组、sh-NC组、sh-NRSN2组、sh-CASC9+anti-miR-NC组和sh-CASC9+anti-miR-423-5p组,qRT-PCR用于检测CASC9和miR-423-5p的表达,细胞增殖、凋亡及NRSN2蛋白表达分别通过CCK-8、流式细胞术和Western blot检测;CASC9对肿瘤生长的影响通过裸鼠肿瘤移植实验观察;RNA pull down和双荧光素酶报告基因实验用于检测CASC9与miR-423-5p、miR-423-5p与NRSN2的靶向关系。结果显示,CASC9在OSCC组织和细胞中表达最高,SCC-15细胞表达最高,因此选择SCC-15细胞为研究对象;沉默CASC9可抑制SCC-15细胞增殖,促进凋亡并抑制肿瘤形成于裸鼠($P<0.05$);CASC9靶向并负调控miR-423-5p表达,miR-423-5p靶向并负调控NRSN2表达;抑制miR-423-5p可促进增殖并抑制凋亡,下调NRSN2可抑制增殖并促进凋亡;抑制miR-423-5p表达削弱了沉默CASC9对OSCC细胞($P<0.05$)。总之,沉默CASC9通过上调miR-423-5p抑制NRSN2表达,从而抑制OSCC细胞增殖并促进凋亡。

Keywords long non-coding RNA cancer susceptibility candidate 9; miR-423-5p; neuronsin-2; oral squamous cell carcinoma; cell proliferation; cell apoptosis

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是一种侵袭性强的头颈部恶性肿瘤,可侵袭邻近的骨骼、肌肉、皮肤组织和局部淋巴组织^[1]。尽管手术和放疗技术取得了进步,但OSCC患者的总生存率仍然很低^[2]。以往的研究显示,癌细胞的高增殖率是影响OSCC治疗效果的主要原因^[3],但其具体机制尚不完全明确。因此,挖掘OSCC的发病和调控OSCC进展的机制,对于降低OSCC发病率,提高患者的生存率具有重要意义。长链非编码RNA(long non-coding RNA, LncRNA)可参与不同的细胞进程,如细胞增殖和细胞凋亡^[4]。LncRNA肿瘤易感候选者9(cancer susceptibility candidate 9, CASC9)位于染色体8q21.13上,其在食管癌、喉癌、胃癌、乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤中具有促进肿瘤发展的作用^[5]。最近的研究表明,沉默CASC9可抑制OSCC细胞增殖、迁移^[6],但具体分子机制尚不完全明确。本研究首先通过生物信息学分析,发现CASC9与miR-423-5p相互作用,且miR-423-5p与NRSN2(neurensin-2)存在结合位点。此外,已有研究显示,沉默CASC9通过上调miR-423-5p抑制了舌鳞状细胞癌细胞增殖、迁移和侵袭^[7]。这表明CASC9可通过负调控miR-423-5p影响肿瘤进展,而CASC9能否通过调控miR-423-5p影响OSCC细胞增殖与凋亡尚不明确。因此,本研究

旨在研究CASC9和miR-423-5p在OSCC中的相互作用以及其对OSCC细胞生物学功能的影响,为OSCC的治疗提供新策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

收集2018年5月至2020年5月期间在河北北方学院附属第一医院首次确诊为OSCC患者的癌组织以及癌旁组织,共21对。其中男15例,女6例,年龄56~69岁,中位年龄64岁。所有组织切除后立即冻存在液氮中。本研究获得河北北方学院附属第一医院伦理委员会的批准(批号:1800239),所有患者均提供了知情同意书。

人正常口腔角质形成细胞HOKs及人口腔鳞状细胞癌细胞HSC-3、SCC-15、CAL-27均购自中国科学院上海细胞库。

15只雄性BALB/c裸鼠,5周龄,体质量约为16~18 g,购自广州赛业百沐生物科技有限公司,许可证号为:SCXK(粤)2020-0055。所有裸鼠均饲养在特定的无病原体条件下的层流架中。所有动物实验均遵循3R原则,该研究得到河北北方学院附属第一医院动物伦理委员会的批准,伦理批号为2018-016。

1.2 主要试剂

miR-423-5p模拟物(miR-423-5p mimics, 序列为5'-GCC TGA GGG GCA GAG AGC-3')及其阴性对照(miR-NC, 序列为5'-GCC TAA CTG TGT CAG AAG GAA-3')、miR-423-5p抑制物(anti-miR-423-5p, 序列为5'-ATC TTT GGT GGC CGT AGA CCT-3')及其阴性对照(anti-miR-NC, 序列为5'-GCC TAA CTG TGT CAG AAG GAA-3')、sh-RNA CASC9(sh-CASC9, 序列为5'-GGG CAU UGA GAA GUU AGA ATT-3')及其阴性对照(sh-NC-1, 序列为5'-AAU ACA UGC UUC CAU UGC UUU GCU G-3')、sh-NRSN2(sh-NRSN2, 序列为5'-CAA TCT TCT GTG CAG ACT ATC-3')及其阴性对照sh-NC(sh-NC, 序列为5'-CGA GGA CAG GCT GAT CTT CC-3')均购自美国Thermo Fisher公司; 二奎啉甲酸(bicinc honinic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司; CCK-8试剂盒购自赛因百奥生物技术(北京)有限公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自沈阳万类生物公司; 兔源一抗NRSN2、 β -actin及辣根过氧化物酶(horseradis hperoxidase, HRP)标记的羊抗兔二抗均购自英国Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 将人正常口腔角质形成细胞HOKs及人口腔鳞状细胞癌细胞HSC-3、SCC-15、CAL-27在含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中培养。取对数生长期的SCC-15细胞并将其分为对照组(细胞未转染)、sh-NC-1组(转染sh-NC-1慢病毒)、sh-CASC9组(转染sh-CASC9慢病毒)、miR-NC组(转染miR-NC慢病毒)、miR-423-5p mimics组(转染miR-423-5p mimics前体分子慢病毒)、

sh-NRSN2组(sh-NRSN2慢病毒转染细胞)、sh-NC组(sh-NC慢病毒转染细胞)、sh-CASC9+anti-miR-NC组(sh-CASC9慢病毒和anti-miR-NC慢病毒共转染细胞)、sh-CASC9+anti-miR-423-5p组(sh-CASC9慢病毒和anti-miR-423-5p前体分子慢病毒共转染细胞)。转染48 h后, 收集病毒转染的SCC-15细胞, 加入嘌呤霉素(浓度依次为0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进行筛选, 当观察到3~4天时细胞全部死亡的孔对应的药物浓度即为筛选转株所需浓度, 此时嘌呤霉素浓度为2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此选用2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素作为筛选稳定转染细胞株的浓度, 并用含有0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素培养稳定转染细胞以维持其稳定性, 最后通过检测各转染细胞株中对应分子的变化来确定是否为稳转细胞株, 通过倒置荧光显微镜观察细胞荧光强度以评估转染效率。将各组所得的稳转细胞株用于后续实验。

1.3.2 实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测 LncRNA CASC9及 miR-423-5p水平 Trizol试剂被用于从OSCC组织和细胞中提取总RNA。对于miR-423-5p表达分析, 使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒和TaqMan Universal PCR Master Mix进行qRT-PCR。最后以U6或GAPDH为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析miR-423-5p或CASC9的相对表达水平, 每个样品设置6个复孔。所用引物见表1。

1.3.3 CCK-8法检测细胞增殖 将SCC-15细胞(1×10^4 个/孔)接种于96孔板中, 分别在细胞转染24、48、72 h时向各孔中加入10 μL CCK-8试剂, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育2 h。利用酶标仪检测450 nm处的吸光度(D)值。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况 将各组SCC-15细胞用0.25%胰蛋白酶消化并用磷酸盐缓冲

表1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	预期扩增产物长度/bp Expected amplification product length /bp
U6	F: AAC GAG ACG ACG ACA GAC R: GCA AAT TCG TGA AGC GTT CCA TA	96
miR-423-5p	F: GGG ACA GGT GAG GTT CTT G R: GAG TTG GAG GTT GCG TTA GA	68
CASC9	F: AGC AGC AAA TGT GTC CAT C R: CAG ACA GCA GCA AAG CAA T	132
GAPDH	F: AAG GTC GGA GTC AAC GGA R: TTA AAA GCA GCC CTG GTG A	156

液洗涤两次后,用磷酸盐缓冲液将细胞浓度调节至 1×10^6 个/mL。再将200 μ L Annexin V-FITC染色溶液加入到1 mL细胞悬液中,并在室温下避光孵育15 min。然后,加入200 μ L碘化丙啶染色溶液并混合。运用流式细胞术检测细胞凋亡。

1.3.5 体内异种移植瘤实验 将15只雄性BALB/c裸鼠随机分为对照组、sh-NC-1组、sh-CASC9组,每组5只。将细胞浓度为 5×10^7 个/mL的0.2 mL sh-NC-1稳定转染SCC-15细胞悬液注射到sh-NC-1组裸鼠右腋下,sh-CASC9组裸鼠于右腋下注射等量的sh-CASC9稳定转染SCC-15细胞悬液,而对照组则注射等量的SCC-15细胞悬液,分别在饲养3、6、9、12、15天时称量裸鼠体质量。micro-CT造影技术计算裸鼠体内肿瘤体积,15天后腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉并处死裸鼠,分离肿瘤并测量肿瘤质量,并检测肿瘤组织中miR-423-5p、NRSN2蛋白表达情况。

1.3.6 双荧光素酶报告基因实验 分别构建CASC9野生型、突变型3'-UTR区质粒,并将其命名为WT-CASC9(5'-ACU CCC CGG AGU CUG GCG C-3')、MUT-CASC9(5'-UGA GGC CGG AGU CUG GCG C-3')。将WT-CASC9和MUT-CASC9分别与miR-NC或miR-423-5p mimics共转染于SCC-15细胞,48 h后,观察荧光素酶活性变化情况,每组设置6个复孔。如上所述,进行荧光素酶报告分析以验证miR-423-5p与NRSN2 3'-UTR的结合关系。

1.3.7 RNA pull down验证CASC9与miR-423-5p的靶向结合 使用生物素RNA标记miR-423-5p或miR-NC,并将其分别命名为bio-miR-423-5p、bio-NC。将bio-NC、bio-miR-423-5p分别与SCC-15细胞的裂解物在37 $^{\circ}$ C下共孵育30 min,再将洗脱所得的RNA利用qRT-PCR技术评估CASC9与miR-423-5p表达水平。

1.3.8 Western blot检测NRSN2蛋白表达情况 用RIPA缓冲液从细胞中提取蛋白质,蛋白质经定量、电泳、转膜、封闭后,再与一抗NRSN2(1:1 000)、 β -actin(1:3 000)在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。之后,将膜与HRP标记的二抗(1:2 000)在37 $^{\circ}$ C下共同孵育1 h。使用ECL试剂可视化蛋白,ImageJ软件评估蛋白灰度值,每个样品设置6个复孔。

1.4 统计学分析

采用IBM SPSS 19.0软件进行统计分析OSCC组织、癌旁组织、HOKs、HSC-3、SCC-15、CAL-

27细胞中CASC9表达水平,SCC-15细胞 D_{450} 值(24、48、72 h)、细胞凋亡率、miR-423-5p表达、NRSN2蛋白表达情况及裸鼠体质量、肿瘤体积、肿瘤质量、肿瘤组织中miR-423-5p、NRSN2蛋白表达情况均满足正态性和方差齐性,并以 $\bar{x} \pm s$ 表示,癌组织和癌旁组织比较采用配对 t 检验,独立样本 t 检验用于两组间的差异比较,单因素方差分析用于多组间的差异比较,对照组与sh-CASC9组、sh-NC-1组sh-CASC9组、对照组与anti-miR-423-5p组、anti-miR-NC组与anti-miR-423-5p组、对照组与sh-NRSN2组、sh-NC组与sh-NRSN2组、sh-CASC9组与sh-CASC9+anti-miR-423-5p组、sh-CASC9+anti-miR-NC组与sh-CASC9+anti-miR-423-5p组的组间的比较采用SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CASC9在OSCC组织和细胞中高表达

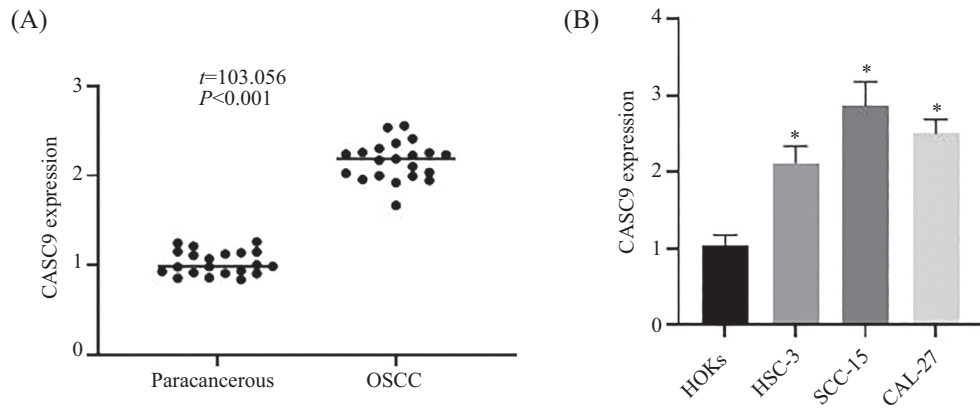
CASC9在OSCC组织中的表达水平(2.15 ± 0.26)高于癌旁组织(1.02 ± 0.14)($t = 103.056$, $P < 0.001$)(图1A);与HOKs(1.03 ± 0.15)比较,HSC-3(2.12 ± 0.22)、SCC-15(2.87 ± 0.31)、CAL-27(2.51 ± 0.18)中CASC9表达水平升高($P < 0.05$),且在SCC-15细胞中CASC9表达量最高,因此,以SCC-15细胞为研究对象(图1B)。

2.2 沉默CASC9抑制SCC-15细胞增殖,促进细胞凋亡

倒置荧光显微镜下观察control组、sh-NC-1组、sh-CASC9组细胞转染效果,sh-NC-1组、sh-CASC9组均可见较强绿色荧光,control组未见绿色荧光(图2A)。与对照组、sh-NC-1组相比,sh-CASC9组CASC9水平、 D_{450} 值(24、48、72 h)降低,细胞凋亡率升高($P < 0.05$)(图2B、图2C和图2D)。

2.3 沉默CASC9对裸鼠体内SCC-15肿瘤形成、miR-423-5p和NRSN2蛋白表达情况的影响

与对照组和sh-NC-1组比较,sh-CASC9组裸鼠肿瘤质量、裸鼠体质量(3、6、9、12、15天)、肿瘤体积(3、6、9、12、15天)、NRSN2蛋白表达情况降低,miR-423-5p表达水平升高($P < 0.05$)。裸鼠体质量的时间变化与组间存在交互效应($F_{交互} = 3.123$, $P_{交互} = 0.027$)。组间比较:对照组、sh-NC-1组、sh-CASC9组裸鼠体质量进行组间比较,差异有统计学意义($F_{组间} = 182.217$, $P_{组间} = 0.000$)。时间比较:饲养3、6、9、12、15天时各组裸鼠体质量变化差异有统计学意义($F_{时间} = 21.734$, $P_{时间} = 0.000$)。肿瘤

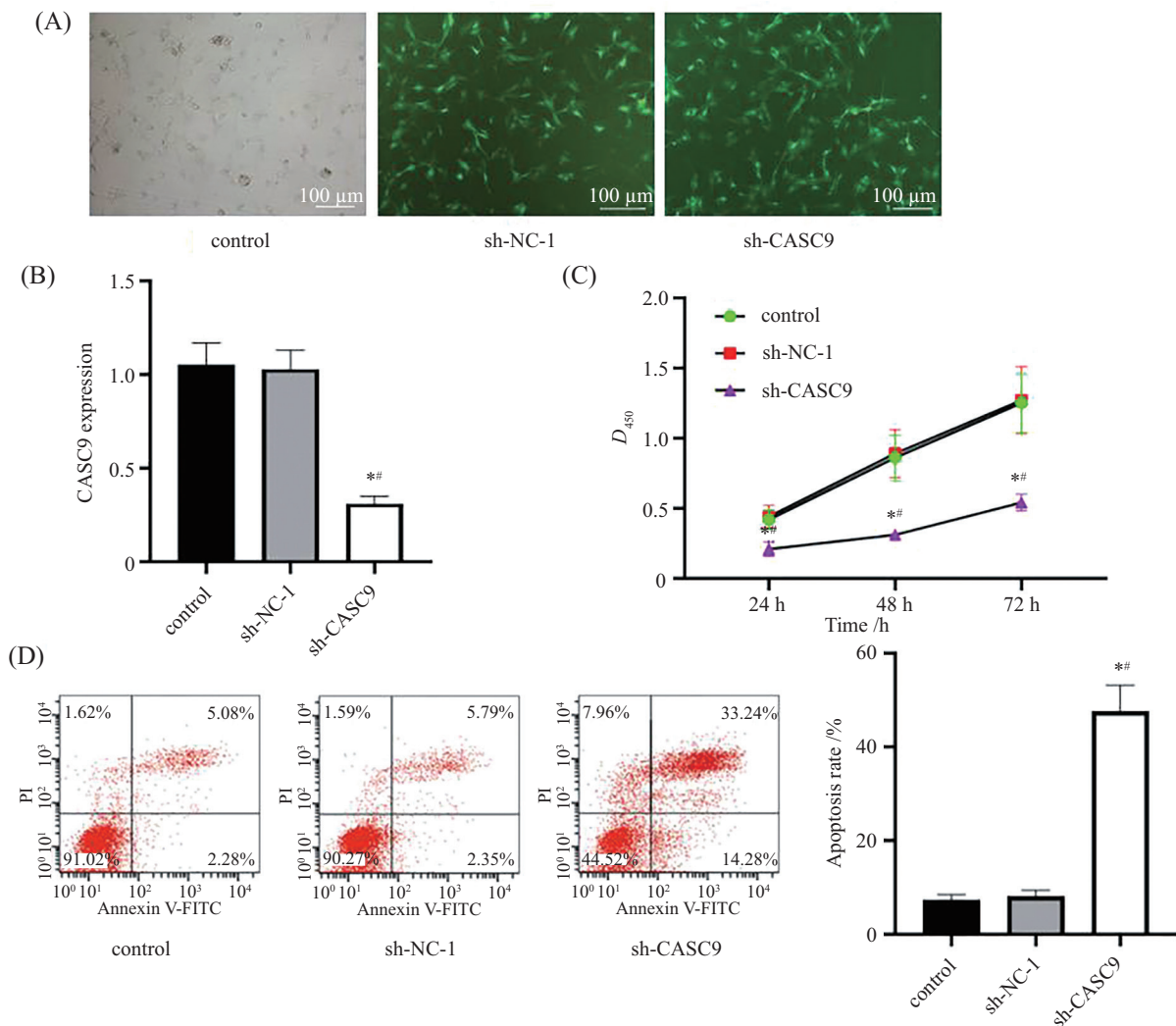


A: CASC9在组织中的相对表达水平; B: CASC9在细胞中的相对表达水平, * $P < 0.05$, 与 HOKs 细胞比较。

A: the relative expression level of CASC9 in tissues; B: the relative expression level of CASC9 in cells, * $P < 0.05$ compared with HOKs cells.

图1 CASC9在OSCC组织和细胞中高表达

Fig.1 High expression of CASC9 in OSCC tissues and cells



A: 细胞转染效果图; B: CASC9相对表达水平; C: D_{450} 值; D: 细胞凋亡流式图及结果分析。* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与si-NC组比较。

A: effect diagram of cell transfection; B: relative expression level of CASC9; C: D_{450} value; D: cell apoptosis flow cytometry and result analysis.

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with si-NC group.

图2 各组SCC-15细胞中CASC9表达、细胞增殖及凋亡情况分析

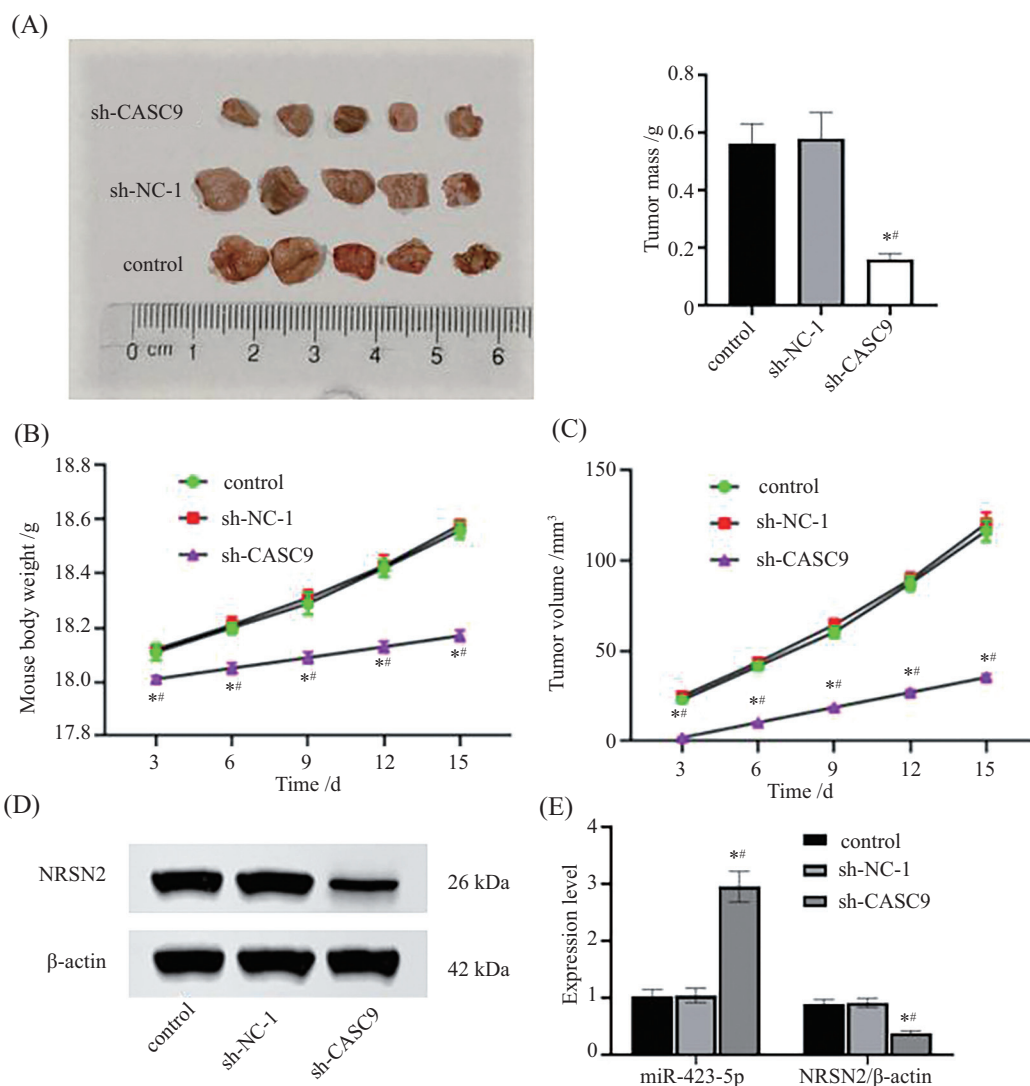
Fig.2 Analysis of CASC9 expression, cell proliferation and apoptosis in SCC-15 cells of each group

体积的时间变化与组间存在交互效应($F_{交互}=4.267$, $P_{交互}=0.015$)。组间比较: 对照组、sh-NC-1组、sh-CASC9组肿瘤体积进行组间比较, 差异有统计学意义($F_{组间}=142.255$, $P_{组间}=0.000$)。时间比较: 饲养3、6、9、12、15天时各组肿瘤体积变化差异有统计学意义($F_{时间}=16.624$, $P_{时间}=0.000$)(图3和表2)。

2.4 CASC9与miR-423-5p/NRSN2轴相互作用

使用 miRDB 预测 miR-423-5p 与 CASC9 的结合位点(图4A); 与 miR-NC+WT-CASC9 组(1.08 ± 0.12)相

比, miR-423-5p mimics+WT-CASC9 组(0.27 ± 0.05)荧光素酶活性降低($P<0.05$), miR-423-5p mimics+ MUT-CASC9 组(1.12 ± 0.14)与 miR-NC+MUT-CASC9 组(1.09 ± 0.13)荧光素酶活性差异不显著($P>0.05$)(图4B); qRT-PCR 结果显示, 与对照组和 sh-NC-1 组比较, sh-CASC9 组 miR-423-5p 表达水平升高($P<0.05$); 与对照组和 miR-NC 组比较, miR-423-5p mimics 组 miR-423-5p 表达升高($P<0.05$), 而 CASC9 表达变化差异无统计学意义($P>0.05$)(图4C); RNA 下拉结果显示, 与



A: 肿瘤生长及质量的分析结果; B: 3、6、9、12、15天时裸鼠体质量的分析结果; C: 3、6、9、12、15天时肿瘤体积的分析结果; D: NRSN2蛋白表达条带图; E: miR-423-5p表达、NRSN2蛋白表达的分析结果。* $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与sh-NC-1组比较。

A: analysis results of tumor growth and quality; B: analysis results of body weight of nude mice at days 3, 6, 9, 12, and 15; C: analysis results of tumor volume at days 3, 6, 9, 12, and 15; D: NRSN2 protein expression band diagram; E: analysis results of miR-423-5p expression and NRSN2 protein expression. * $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with sh-NC-1 group.

图3 各组移植瘤裸鼠生长及肿瘤组织中miR-423-5p表达、NRSN2蛋白表达情况分析

Fig.3 Analysis of the expression of miR-423-5p and NRSN2 protein in the growth and tumor tissue of transplanted nude mice in each group

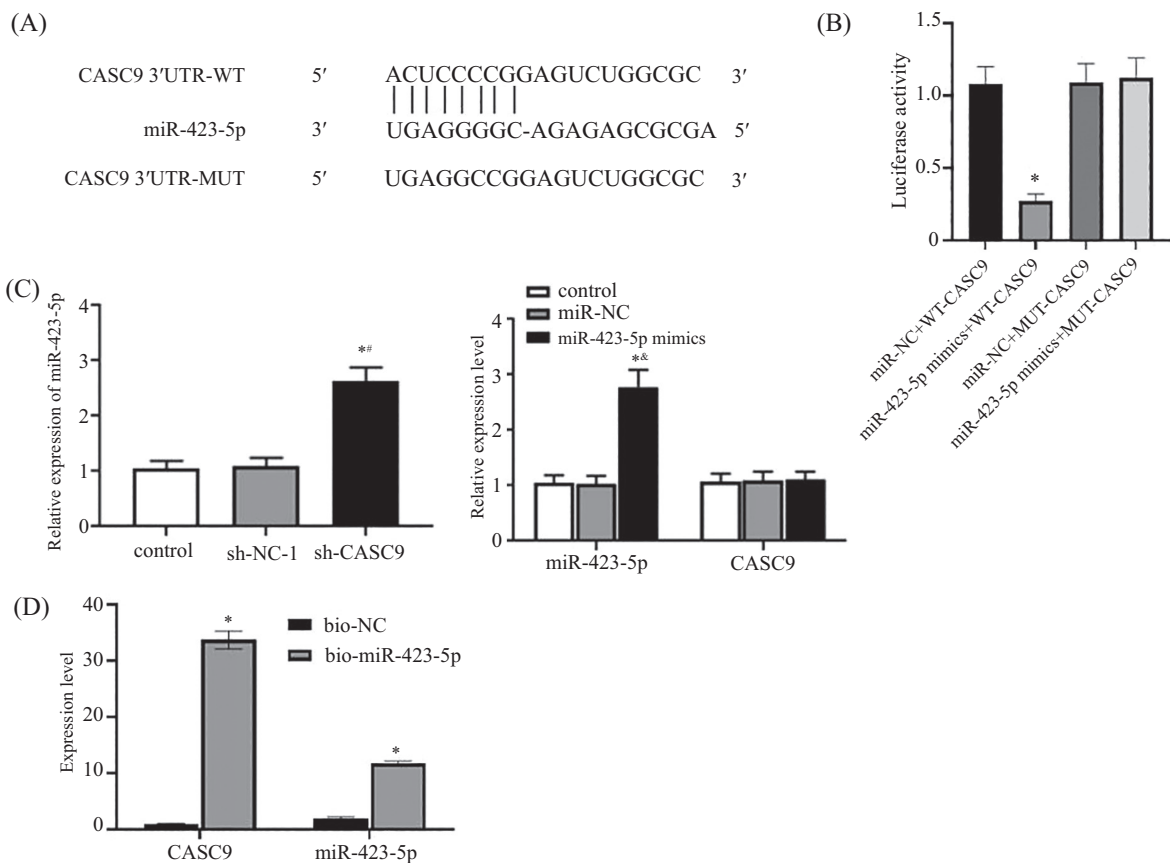
表2 各组裸鼠体质量、肿瘤质量与体积、肿瘤组织中miR-423-5p表达、NRSN2蛋白表达比较

Table 2 Comparison of body weight, tumor mass and volume, expression of miR-423-5p and NRSN2 protein in tumor tissue of nude mice in each group

分组 Groups	时间 Time	control	sh-NC-1	sh-CASC9
Tumor quality /g		0.56±0.07	0.58±0.09	0.16±0.02 [#]
	3 d	18.14±0.03	18.15±0.02	18.01±0.01 [#]
	6 d	18.24±0.05	18.26±0.03	18.08±0.02 [#]
Body weight of nude mice /g	9 d	18.32±0.06	18.34±0.05	18.16±0.05 [#]
	12 d	18.41±0.07	18.43±0.06	18.21±0.03 [#]
	15 d	18.61±0.07	18.63±0.09	18.25±0.06 [#]
	3 d	26.22±0.03	26.19±0.02	0.05±0.01 [#]
	6 d	49.36±0.06	49.41±0.05	8.23±0.03 [#]
Tumor volume /mm ³	9 d	68.62±0.07	68.66±0.05	17.73±0.04 [#]
	12 d	97.76±0.09	97.79±0.09	23.35±0.06 [#]
	15 d	118.85±0.16	119.22±0.08	35.54±0.07 [#]
NRSN2/β-actin		0.89±0.08	0.91±0.08	0.38±0.04 [#]
miR-423-5p		1.03±0.12	1.04±0.13	2.95±0.27 [#]

$\bar{x}\pm s$; $n=5$; * $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与sh-NC-1组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=5$; * $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with sh-NC-1 group.



A: miRDB predicts the binding site of miR-423-5p to CASC9; B: double luciferase reporter gene experiment results, * $P<0.05$, 与miR-NC+WT-CASC9比较; C: miR-423-5p, CASC9相对表达水平, * $P<0.05$, 与对照组比较; # $P<0.05$, 与sh-NC-1组比较; * $P<0.05$, 与miR-NC组比较; D: RNA pull down验证CASC9与miR-423-5p的靶向结合情况, * $P<0.05$, 与bio-NC组比较。

A: miRDB predicts the binding site of miR-423-5p to CASC9; B: double luciferase reporter gene experiment results, * $P<0.05$ compared with miR-NC+WT-CASC9; C: relative expression levels of miR-423-5p and CASC9, * $P<0.05$ compared with the control group; # $P<0.05$ compared with si-NC group; * $P<0.05$ compared with miR-NC group; D: RNA pull down was used to verify the targeted binding of CASC9 to miR-423-5p, * $P<0.05$ compared with the bio-NC group.

图4 CASC9靶向调控miR-423-5p表达
Fig.4 CASC9 targeted regulation of miR-423-5p expression

bio-NC组相比, bio-miR-423-5p组中的CASC9和miR-423-5p表达均升高 ($P<0.05$)(图4D)。这说明CASC9可靶向负调控miR-423-5p的表达。

使用TargetScan预测发现NRSN2为miR-423-5p的靶基因(图5A)。与miR-NC+WT-NRSN2组(1.16 ± 0.18)相比, miR-423-5p mimics+WT-NRSN2组(0.36 ± 0.07)荧光素酶活性降低 ($P<0.05$), 而miR-NC+MUT-NRSN2组(1.18 ± 0.15)与miR-423-5p mimics+MUT-NRSN2组(1.17 ± 0.14)相比, 荧光素酶活性变化差异不显著 ($P>0.05$); 4组之间荧光素酶活性变化差异显著 ($F=49.599$, $P<0.05$)(图5B)。miR-423-5p mimics组(0.32 ± 0.04)中NRSN2蛋白水平低于对照组(0.85 ± 0.12)、miR-NC组(0.87 ± 0.14)($F=49.197$, $P<0.05$), sh-CASC9组(0.27 ± 0.02)中NRSN2蛋白表

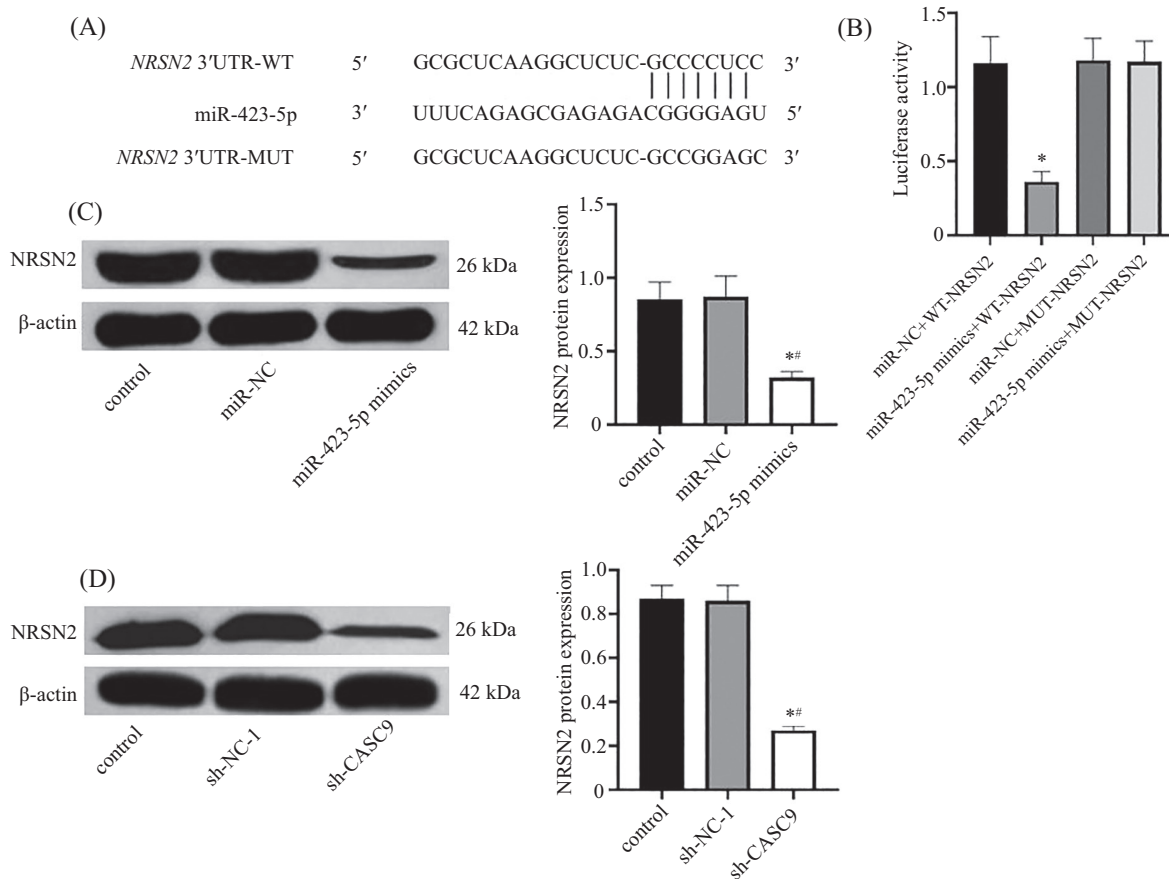
达情况水平低于对照组(0.87 ± 0.06)和sh-NC-1组(0.86 ± 0.07)($F=238.719$, $P<0.05$)(图5C和图5D)。

2.5 干扰miR-423-5p或NRSN2对SCC15细胞凋亡和增殖的影响

与对照组、anti-miR-NC组比较, anti-miR-423-5p组miR-423-5p表达水平、细胞凋亡率降低, D_{450} 值(24、48、72 h)、NRSN2蛋白表达水平升高 ($P<0.05$); 与对照组、sh-NC组比较, sh-NRSN2组NRSN2蛋白、 D_{450} 值(24、48、72 h)降低, 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), miR-423-5p表达变化差异无统计学意义 ($P>0.05$)(图6和表3)。

2.6 CASC9通过海绵吸附miR-423-5p调控NRSN2表达来影响SCC-15细胞的增殖与凋亡

与sh-CASC9组和sh-CASC9+anti-miR-NC组比较,

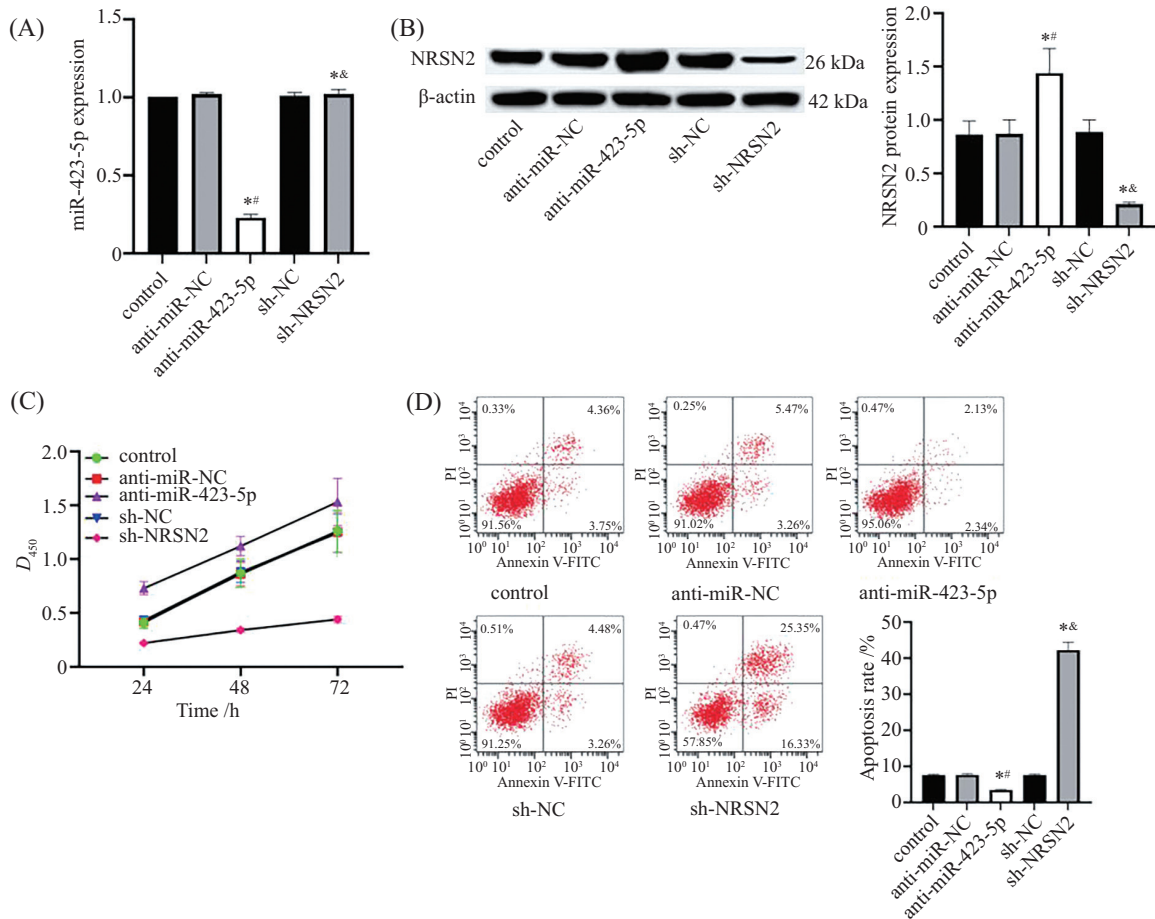


A: TargetScan预测NRSN2与miR-423-5p的结合位点; B: 双荧光素酶报告基因实验验证miR-423-5p与NRSN2的关系, $*P<0.05$, 与miR-NC+WT-NRSN2比较; C: NRSN2蛋白表达条带图及分析结果, $*P<0.05$, 与对照组比较; $^{\#}P<0.05$, 与miR-NC组比较; D: NRSN2蛋白表达条带图及分析结果, $*P<0.05$, 与对照组比较; $^{\#}P<0.05$, 与sh-NC-1组比较。

A: TargetScan predicts the binding site of NRSN2 to miR-423-5p; B: double luciferase reporter gene experiment verified the relationship between miR-423-5p and NRSN2, $*P<0.05$ compared with miR-NC+WT NRSN2; C: NRSN2 protein expression band diagram and analysis results, $*P<0.05$ compared with the control group; $^{\#}P<0.05$ compared with miR-NC group; D: NRSN2 protein expression band diagram and analysis results, $*P<0.05$ compared with the control group; $^{\#}P<0.05$ compared with sh-NC-1 group.

图5 miR-423-5p靶向调控NRSN2表达

Fig.5 miR-423-5p targeted regulation of NRSN2 expression



A: miR-423-5p相对表达水平; B: NRSN2蛋白表达条带图及分析结果; C: D_{450} 值; D: 细胞凋亡流式图及分析结果。* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与anti-miR-NC组比较; & $P < 0.05$, 与sh-NC组比较。

A: the relative expression level of miR-423-5p; B: NRSN2 protein expression pattern and analysis results; C: D_{450} value; D: cell apoptosis flow cytometry and analysis results.* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with anti -miR-NC group; & $P < 0.05$ compared with sh-NC group.

图6 干扰miR-423-5p或NRSN2对各组SCC15细胞增殖、凋亡的影响

Fig.6 Effect of interference with miR-423-5p or NRSN2 on cell proliferation and apoptosis in SCC15 cells

表3 各组SCC15细胞中miR-423-5p、NRSN2蛋白表达、 D_{450} 值及凋亡率比较

Table 3 Comparison of miR-423-5p, NRSN2 protein expression, D_{450} value and apoptosis rate in SCC15 cells of each group

分组 Groups	miR-423-5p	NRSN2/β-actin	D_{450} value			细胞凋亡率/% Cell apoptosis rate /%
			24 h	48 h	72 h	
control	1.00±0.00	0.86±0.13	0.41±0.05	0.87±0.13	1.26±0.20	7.55±0.27
anti-miR-NC	1.02±0.01	0.87±0.13	0.42±0.03	0.86±0.11	1.25±0.19	7.68±0.29
anti-miR-423-5p	0.23±0.02*#	1.44±0.23*#	0.73±0.06*#	1.12±0.09*#	1.53±0.22*#	3.52±0.14*#
sh-NC	1.01±0.02	0.89±0.11	0.43±0.04	0.88±0.10	1.24±0.18	7.62±0.25
sh-NRSN2	1.02±0.03*&	0.21±0.02*&	0.22±0.01*&	0.34±0.02*&	0.44±0.03*&	42.25±2.16*&

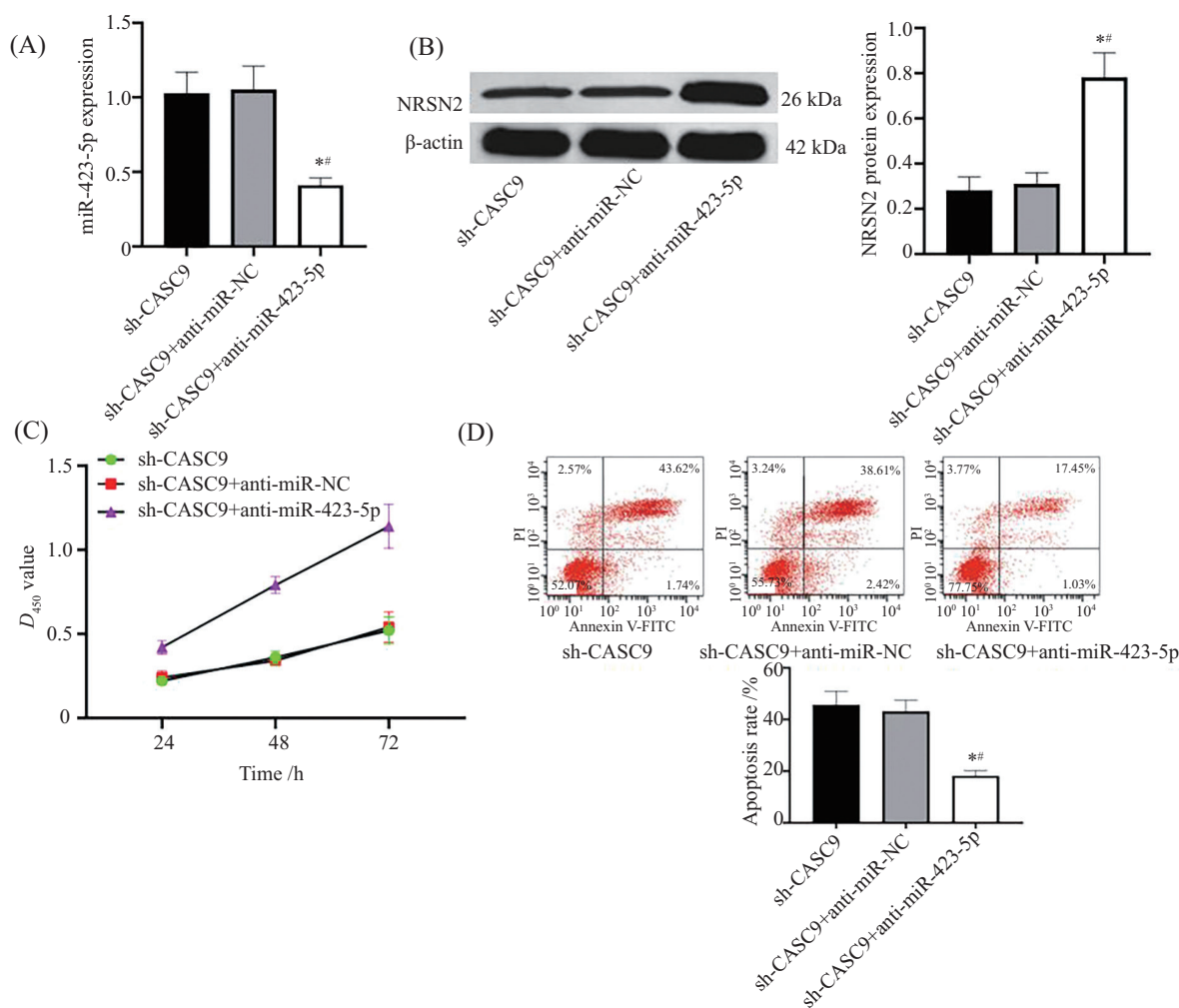
$\bar{x} \pm s$; $n=6$; * $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与anti-miR-NC组比较; & $P < 0.05$, 与sh-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$; $n=6$; * $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with anti -miR-NC group; & $P < 0.05$ compared with sh-NC group.

sh-CASC9+anti-miR-423-5p组 SCC-15细胞中 miR-423-5p表达水平、细胞凋亡率降低, NRSN2蛋白表达水平及 D_{450} 值(24、48、72 h)升高($P < 0.05$)(图7和表4)。

3 讨论

OSCC是一种常见的头颈部鳞状细胞癌, 它在全世界范围内的发病率相对较高^[8-9]。随着LncRNA在各种癌症中的调控功能不断被探索, 许多LncRNA



A: miR-423-5p相对表达水平; B: NRSN2蛋白表达条带图及分析结果; C: D_{450} 值; D: 细胞凋亡流式图及分析结果。* P <0.05, 与sh-CASC9组比较; # P <0.05, sh-CASC9+anti-miR-NC组比较。

A: the relative expression level of miR-423-5p; B: NRSN2 protein expression pattern and analysis results; C: D_{450} value; D: cell apoptosis flow cytometry and analysis results. * P <0.05 compared with sh-CASC9 group; # P <0.05 compared with sh-CASC9+anti-miR-NC group.

图7 同时沉默CASC9和miR-423-5p对SCC15细胞增殖及凋亡的影响

Fig.7 Effect of simultaneous silencing of CASC9 and miR-423-5p on cell proliferation and apoptosis in SCC15 cells

表4 各组SCC15细胞中miR-423-5p、NRSN2蛋白表达、 D_{450} 值及凋亡率比较

Table 4 Comparison of miR-423-5p, NRSN2 protein expression, D_{450} value and apoptosis rate in SCC15 cells of each group

分组 Groups	miR-423-5p	NRSN2/ β -actin	D_{450} Value			细胞凋亡率/% Cell apoptosis rate /%
			24 h	48 h	72 h	
sh-CASC9	1.03 \pm 0.14	0.28 \pm 0.06	0.22 \pm 0.02	0.36 \pm 0.04	0.52 \pm 0.08	45.67 \pm 5.25
sh-CASC9+anti-miR-NC	1.05 \pm 0.16	0.31 \pm 0.05	0.24 \pm 0.04	0.34 \pm 0.02	0.54 \pm 0.09	43.13 \pm 4.37
sh-CASC9+anti-miR-423-5p	0.41 \pm 0.05**	0.78 \pm 0.11**	0.42 \pm 0.04**	0.79 \pm 0.05**	1.14 \pm 0.13**	18.16 \pm 2.12**

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; * P <0.05, 与sh-CASC9组比较; # P <0.05, sh-CASC9+anti-miR-NC组比较。

$\bar{x}\pm s$; $n=6$; * P <0.05 compared with sh-CASC9 group; # P <0.05 compared with sh-CASC9+anti-miR-NC group.

也被证实在促进肿瘤的发展中起着至关重要的作用。CASC9作为一种具有广泛临床前景的LncRNA, 已成为科学界的热门话题。LIANG等^[10]发现, CASC9通过与环磷腺苷效应元件结合蛋白相互作用上调层粘连蛋白 $\gamma 2$ 表达促进食管鳞状细胞癌转移;

YANG等^[11]报道, CASC9通过丝氨酸-苏氨酸激酶/哺乳动物雷帕霉素靶点通路促进细胞增殖和抑制自噬介导的细胞凋亡来促进OSCC进展; 陈文琦等^[12]表明, CASC9在肝癌组织中呈高表达状态, 且CASC9高表达与肝癌患者的不良预后显著相关; 方正月等^[13]阐

述, CASC9高表达激活磷脂酰肌醇3-激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶信号通路促进口腔鳞癌细胞增殖、迁移、侵袭; CHEN等^[14]阐明, CASC9在人甲状腺乳头状癌组织和细胞中高表达, CASC9通过调节 miR-488-3p/解聚素基质蛋白酶9途径促进甲状腺乳头状癌的恶性表型。本研究发现, CASC9在 OSCC组织和细胞中呈高表达状态, 且 SCC-15细胞中 CASC9表达量最高, 因此, 以 SCC-15细胞为研究对象; 本研究利用 siRNA 干扰技术沉默 CASC9 后, 发现沉默 CASC9 可显著抑制 SCC-15 细胞增殖、促进细胞凋亡、抑制裸鼠体内肿瘤的形成, 提示 CASC9 在 SCC-15 细胞中发挥着促癌的作用。

近年来, 大量研究表明 LncRNA 可通过海绵 miRNA 来调节 mRNA, 从而参与癌症进展的调控^[15-17]。生物信息学预测显示, CASC9 可能与 miR-423-5p 相互作用。据报道, 过表达 miR-423-5p 可抑制结肠癌细胞的增殖和侵袭^[18]; miR-423-5p 可作为卵巢癌诊断的重要分子标志物并在卵巢癌中起到抑癌作用^[19]; 上调 miR-423-5p 可抑制甲状腺乳头状癌细胞的增殖和侵袭^[20]。本研究通过双荧光素酶报告基因实验证实 miR-423-5p 为 CASC9 下游的靶基因, qRT-PCR 结果显示, 下调 CASC9 可显著上调 miR-423-5p 的表达, 而上调 miR-423-5p 对 CASC9 表达无显著影响, 说明 CASC9 可靶向负调控 miR-423-5p 的表达, 本研究还发现抑制 miR-423-5p 表达, 减弱了沉默 CASC9 对 OSCC 细胞增殖抑制及促进凋亡的作用, 提示 CASC9 通过吸附海绵 miR-423-5p 来调控 OSCC 细胞增殖和凋亡。

本研究进一步通过双荧光素酶报告基因验证了 NRSN2 为 miR-423-5p 的靶向 mRNA。NRSN2 是一个小的神经元膜蛋白, 位于神经细胞的小囊泡中, 已有研究报道其在鼻咽癌患者的组织和血清中的水平平均升高, 且术后血清中 NRSN2 水平显著降低^[21]; NRSN2 通过激活核转录因子 κ B 信号通路促进乳腺癌转移^[22]; NRSN2 在骨肉瘤组织中高表达, 并可促进骨肉瘤细胞的增殖^[23]; 敲低 NRSN2 可明显抑制结直肠癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[24]; 激活的 NRSN2 通过蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素蛋白通路促进食管鳞状细胞癌进展^[25]。本研究发现, 过表达 miR-423-5p 靶向抑制 NRSN2 的表达, 而沉默 CASC9 可下调 NRSN2 蛋白表达情况, 提示沉默 CASC9 通过海绵吸附 miR-423-5p 下调 NRSN2 表达来抑制 SCC-15 细胞

的增殖、促进细胞凋亡。

综上所述, 沉默 CASC9 通过海绵吸附 miR-423-5p 下调 NRSN2 表达, 来抑制 SCC-15 细胞的增殖、促进细胞凋亡。LncRNA CASC9/miR-423-5p/NRSN2 轴可能成为临床上治疗 OSCC 的潜在新的靶点。该研究可能会增强我们对 OSCC 细胞增殖与凋亡机制的理解, 并有助于开发有效的分子靶向治疗方案。然而本研究仅用一种细胞来研究 OSCC 细胞增殖与凋亡的分子机制, 存在着一定的局限性, LncRNA CASC9/miR-423-5p/NRSN2 轴在其他 OSCC 细胞中是否具有相同的作用, 这将是本研究后续探讨的重点内容之一。

参考文献 (References)

- [1] 于宇, 李晓宁. LncRNA PCBPI-AS1 对口腔鳞癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响[J]. 蚌埠医学院学报(YU Y, LI X N. Effects of LncRNA PCBPI-AS1 on proliferation, invasion and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells [J]. Journal of Bengbu Medical College), 2021, 46(2): 154-8.
- [2] 高庆年, 王德元, 穆晓燕. JUP 对人口腔鳞状细胞癌生物学特性及预后的影响及机制分析[J]. 临床和实验医学杂志(GAO Q N, WANG D Y, MU X Y. Effects of JUP on the biological characteristics and prognosis of human oral squamous cell carcinoma [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine), 2020, 19(9): 906-10.
- [3] SHEELAM S, REDDY S P, KULKARNI P G, et al. Role of cell proliferation and vascularity in malignant transformation of potentially malignant disorders [J]. J Oral Maxillofac Pat hol, 2018, 22(2): 281-91.
- [4] ZHAO W, GENG D, LI S, et al. LncRNA hOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer [J]. Cancer Med, 2018, 7(3): 842-55.
- [5] 高宁, 阳柳雪. 长链非编码 RNA CASC9 在肿瘤中的研究进展[J]. 当代医学(GAO N, YANG L X. Research progress of long-chain non-coding RNA CASC9 in tumor [J]. Contemporary Medicine), 2021, 27(7): 192-4.
- [6] NING B, GUO S, MEI Y. Long non-coding RNA CASC9 promotes tumor progression in oral squamous cell carcinoma by regulating microRNA-545-3p/laminin subunit gamma 2 [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 7907-19.
- [7] CHEN X, XU H, SUN G, et al. LncRNA CASC9 affects cell proliferation, migration, and invasion of tongue squamous cell carcinoma via regulating miR-423-5p/SOX12 axes [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12(1): 277-87.
- [8] FAN T, WANG X, ZHANG S, et al. NUPR1 promotes the proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells by activating TFE3-dependent autophagy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 130-40.
- [9] SHEN T, YANG T, YAO M, et al. BTC as a novel biomarker contributing to EMT via the PI3K-AKT pathway in OSCC [J]. Front Genet, 2022, 13(1): 875617-27.

- [10] LIANG Y, CHEN X, WU Y, et al. LncRNA CASC9 promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis through upregulating LAMC2 expression by interacting with the CREB-binding protein [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(11): 1980-95.
- [11] YANG Y, CHEN D, LIU H, et al. Increased expression of lncRNA CASC9 promotes tumor progression by suppressing autophagy-mediated cell apoptosis via the AKT/mTOR pathway in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 41-56.
- [12] 陈文琦, 严倩, 李珊珊, 等. 生物信息学探究lncRNA CASC9在肝细胞癌中的功能及作用机制[J]. *临床医学研究与实践* (CHEN W Q, YAN Q, LI S S, et al. Study on the function and mechanism of lncRNA CASC9 in hepatocellular carcinoma by bioinformatics [J]. *Clinical Medical Research and Practice*), 2021, 6(16):19-23.
- [13] 方正月, 杨凯, 赵丹, 等. LncRNA CASC9高表达激活PI3K/AKT信号通路促进口腔鳞癌细胞增殖转移[J]. *重庆医科大学学报*(FANG Z Y, YANG K, ZHAO D, et al. High expression of LncRNA CASC9 activates PI3K/AKT signaling pathway and promotes proliferation and metastasis of oral squamous cell cancer cells [J]. *Journal of Chongqing Medical University*), 2019, 44(7): 898-904.
- [14] CHEN Y, LI Y, GAO H. Long noncoding RNA CASC9 promotes the proliferation and metastasis of papillary thyroid cancer via sponging miR-488-3p [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(5): 1830-41.
- [15] 皮益苑, 周爽, 简鸣, 等. LncRNA中miRNA海绵活性与肿瘤的研究进展[J]. *中南医学科学杂志*(PI Y Y, ZHOU S, JIAN M, et al. Research progress of miRNA sponge activity and tumor in LncRNA [J]. *Central South Journal of Medical Science*), 2019, 47(3): 230-4.
- [16] 王玲华, 陈艳, 李叶若. lncRNA TTN-AS1通过 miR-138-5p/EGFR轴调控胆囊癌细胞增殖、凋亡和迁移[J]. *中国细胞生物学学报*(WANG L H, CHEN Y, LI Y R. lncRNA TTN-AS1 regulates proliferation, apoptosis and migration of gallbladder carcinoma cells through miR-138-5p/EGFR axis [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2023, 45(1): 64-74.
- [17] 王媛, 洪军, 王树伟, 等. LncRNA LINC00941/miR-597-5p/AR HGEF4分子轴促进神经胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的机制[J]. *中国老年学杂志*(WANG Y, HONG J, WANG S W, et al. Molecular axis of LncRNA LINC00941/miR-597-5p/AR HGEF4 promotes glioma cell proliferation, migration and invasion [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2022, 42(21): 5303-8.
- [18] JIA W, YU T, AN Q, et al. MicroRNA-423-5p inhibits colon cancer growth by promoting caspase-dependent apoptosis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(2): 1225-31.
- [19] TANG X, ZENG X, HUANG Y, et al. miR-423-5p serves as a diagnostic indicator and inhibits the proliferation and invasion of ovarian cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6): 4723-30.
- [20] YANG C, LIU Z, CHANG X, et al. NR2F1-AS1 regulated miR-423-5p/SOX12 to promote proliferation and invasion of papillary thyroid carcinoma [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(2): 2009-18.
- [21] 张卫东, 吴蔚, 张秀娟. 鼻咽癌组织及血清的NRSN2水平及临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*(ZHANG W D, WU W, ZHANG X J. NRSN2 levels in nasopharyngeal carcinoma tissues and serum and their clinical significance [J]. *Journal of Clinical Oncology*), 2017, 22(11): 1001-5.
- [22] REN F, ZHANG W, LU S, et al. NRSN2 promotes breast cancer metastasis by activating PI3K/AKT/mTOR and NF- κ B signaling pathways [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 813-23.
- [23] KEREMU A, MAIMAITI X, AIMAITI A, et al. NRSN2 promotes osteosarcoma cell proliferation and growth through PI3K/Akt/MTOR and Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(3): 565-73.
- [24] WANG G, YANG K. Neurensin-2 promotes proliferation, invasion and migration of colorectal cancer cells via interaction with SOX12 [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(6): 389-96.
- [25] YAN Z, XU T, LU J, et al. E2F1-activated NRSN2 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression through AKT/mTOR pathway [J]. *Pathol Res Pract*, 2022, 236(1): 153963-74.