

LINC01355通过miR-545-5p/FOXD1信号通路对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

高静¹, 魏校通², 李星辰³, 闫威², 王浩²

(沧州市中心医院 1. 体检中心; 2. 口腔颌面外科; 3. 皮肤性病科, 河北 沧州 061000)

摘要 **目的** 探讨LINC01355通过miR-545-5p/叉头盒D1 (FOXD1) 信号通路对口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。**方法** 体外培养人OSCC细胞系Cal-27, 随机分为对照组、转染LINC01355 siRNA (si-LINC01355) 组、转染LINC01355过表达质粒 (pc-LINC01355) 组、转染LINC01355 siRNA阴性对照+miR-545-5p阴性对照+空载质粒 (si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC) 组、转染LINC01355 siRNA+miR-545-5p抑制剂 (si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor) 组。转染后实时定量PCR检测各组细胞LINC01355、miR-545-5p及FOXD1表达; 转染后的Cal-27细胞通过皮下接种构建各组移植瘤裸鼠模型, 测量移植瘤生长情况; CCK-8法、流式细胞术、Transwell实验分别检测各组细胞增殖、凋亡和侵袭情况; 免疫组织化学染色检测细胞上皮-间质转化 (EMT) 相关蛋白Vimentin、E-cadherin表达; Western blotting检测细胞增殖相关蛋白 [增殖细胞核抗原 (PCNA)、C-myc]、凋亡相关蛋白 [切割型胱天蛋白酶-3 (cleaved caspase-3)、BCL-2相关X蛋白 (Bax)] 与FOXD1表达。双荧光素酶报告实验鉴定LINC01355与miR-545-5p/FOXD1信号通路的靶向关系。**结果** 与对照组比较, si-LINC01355组LINC01355、FOXD1 mRNA表达, 增殖活性, 侵袭数量, Vimentin蛋白阳性表达, PCNA、C-myc与FOXD1蛋白表达, 移植瘤体积均降低 (均 $P < 0.05$); 而miR-545-5p表达, 细胞凋亡率, cleaved caspase-3、Bax蛋白表达, E-cadherin蛋白阳性表达均升高 (均 $P < 0.05$)。pc-LINC01355组各指标变化趋势与si-LINC01355组相反。与si-LINC01355组比较, si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor组LINC01355、FOXD1 mRNA表达, 增殖活性, 侵袭数量, Vimentin蛋白阳性表达, PCNA、C-myc与FOXD1蛋白表达, 移植瘤体积均增加 (均 $P < 0.05$), 而miR-545-5p表达、细胞凋亡率、cleaved caspase-3与Bax蛋白表达、E-cadherin蛋白阳性表达均降低 (均 $P < 0.05$)。Cal-27细胞中LINC01355可靶向下调miR-545-5p表达, 且miR-545-5p可靶向下调FOXD1表达。**结论** LINC01355可通过调控miR-545-5p/FOXD1信号通路促进OSCC细胞增殖和侵袭, 抑制细胞凋亡。

关键词 口腔鳞状细胞癌; LINC01355; miR-545-5p/FOXD1信号通路; 增殖; 凋亡; 侵袭

中图分类号 R739.8 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2025)03-0238-08

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250318.1426.002>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.03.010

Effect of LINC01355 on the proliferation, apoptosis, and invasion of oral squamous cell carcinoma cells through miR-545-5p/FOXD1 signaling pathway

GAO Jing¹, WEI Xiaotong², LI Xingchen³, YAN Wei², WANG Hao²

(1. Medical Examination Center, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, China; 3. Department of Dermatology and Venereology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, China)

Abstract **Objective** To investigate the effects of LINC01355 on the proliferation, apoptosis, and invasion of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells via the miR-545-5p/forkhead box D1 (FOXD1) signaling pathway. **Methods** Cal-27 cells were cultured in vitro and randomly separated into the control group, si-LINC01355 (transfected with LINC01355 siRNA) group, pc-LINC01355 (transfected with LINC01355 overexpression plasmid) group, si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC (transfected with LINC01355 siRNA negative control, miR-545-5p negative control and empty plasmid) group, and si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor (transfected with LINC01355 siRNA and miR-545-5p inhibitor) group. After transfection, quantitative real-time PCR was applied to detect the expression of LINC01355, miR-545-5p, and FOXD1 in cells. The Cal-27 cells transfected into groups were then subcutaneously inoculated to construct nude mouse models of transplanted tumors in each group, and the growth of the transplanted tumors was measured. The CCK-8 method, flow cytometry, and Transwell assay were applied in order to detect cell proliferation, apoptosis, and invasion, respectively. Immunohistochemical staining was applied to detect the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins Vimentin and E-cadherin in cells. Western blotting was applied to detect the expression of cell proliferation related proteins (proliferating cell nuclear antigen [PCNA]),

基金项目: 河北省医学科学研究课题 (20240509)

作者简介: 高静 (1990-), 女, 主治医师, 本科。

通信作者: 魏校通, E-mail: weixiaotong0820@163.com

收稿日期: 2024-01-18

网络出版时间: 2025-03-19 11:51:32

C-myc), apoptosis related proteins (cleaved cysteinyl aspartate-specific proteases-3 [cleaved caspase-3], BCL-2-associated X protein [Bax]), and FOXD1 protein. A dual-luciferase reporter assay was used to identify the relationship between LINC01355 and the miR-545-5p/FOXD1 signaling pathway. **Results** Compared with the control group, the expression of LINC01355 and FOXD1 mRNA, proliferation activity, number of invasions, positive expression of Vimentin protein, expression of PCNA, C-myc and FOXD1 protein, and transplanted tumor volume reduced (All $P < 0.05$); the expression of miR-545-5p, apoptosis rate, cleaved caspase-3 and Bax protein expression, and positive expression of E-cadherin protein increased (All $P < 0.05$) in the si-LINC01355 group. The trend of changes in the various indicators of the pc-LINC01355 group was opposite to that of the si-LINC01355 group. Compared with the si-LINC01355 group, the expression of LINC01355 and FOXD1 mRNA, proliferation activity, number of invasions, positive expression of Vimentin protein, expression of PCNA, C-myc and FOXD1 proteins, and the transplanted tumor volume in the si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor group increased (All $P < 0.05$), whereas the expression of miR-545-5p, apoptosis rate, cleaved caspase-3 and Bax protein expression, and positive expression of E-cadherin protein decreased (All $P < 0.05$). LINC01355 was able to downregulate miR-545-5p expression in Cal-27 cells and miR-545-5p was able to downregulate FOXD1 expression. **Conclusion** LINC01355 promotes OSCC cell proliferation and invasion, and inhibits apoptosis by targeting the miR-545-5p/FOXD1 signaling pathway.

Keywords oral squamous cell carcinoma; LINC01355; miR-545-5p/FOXD1 signaling pathway; proliferation; apoptosis; invasion

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是常见且死亡率较高的头颈部恶性肿瘤^[1-2]。LINC01355是一种长链非编码RNA,在多种癌症中表达失调,发挥致癌作用。敲除LINC01355可增强CD8⁺T细胞的抗肿瘤活性,并抑制OSCC细胞迁移、侵袭和增殖^[3]。miR-545-5p是一种微RNA,其表达下调可逆转由LINC00342沉默引起的胃癌细胞迁移、侵袭和增殖活性的降低^[4];过表达miR-545-5p可显著抑制非小细胞肺癌体外增殖及体内肿瘤生长,减轻其迁移、侵袭和上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[5]。诱导miR-545-5p表达可减弱CD8⁺T细胞耗竭,进而增强其对OSCC的抗肿瘤作用^[6]。叉头盒D1(forkhead box D1, FOXD1)属于FOX蛋白家族,已发现其在多种癌症中发挥致癌作用,FOXD1异常高表达与头颈部鳞状细胞癌患者的细胞增殖、细胞迁移和低生存率有关^[7];而且高表达FOXD1的头颈部鳞状细胞癌患者的预后比低表达患者差^[8],敲除FOXD1-AS1可抑制OSCC细胞的增殖、迁移、侵袭和EMT^[9],由此可知LINC01355、miR-545-5p、FOXD1是OSCC治疗的潜在靶点。本研究通过体外培养人OSCC细胞系Cal-27并制备其移植瘤裸鼠模型,探究LINC01355通过miR-545-5p/FOXD1信号通路对OSCC细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞

SPF级雄性6~7周龄BALB/c-nu裸鼠,体重18~21

g,购自广东药康生物科技有限公司,生产许可证号为SCXK(粤)2020-0054。人OSCC细胞系Cal-27购自上海钰博生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

LINC01355 siRNA、LINC01355 siRNA阴性对照、野生型miR-545-5p(miR-545-5p-wt)、突变型miR-545-5p(miR-545-5p-mut)、LINC01355过表达质粒、空载质粒、野生型FOXD1 3'-UTR报告质粒(FOXD1-wt)、突变型FOXD1 3'-UTR报告质粒(FOXD1-mut)、miR-545-5p mimics、miR-545-5p阴性对照由广州派真生物技术有限公司构建;总RNA提取试剂(TRIZOL)、一步法实时定量PCR试剂盒购自武汉君诺德生物技术有限公司;Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒、增强型细胞活力检测试剂盒(CCK-8)、二步法免疫组织化学试剂盒(兔/小鼠,附DAB显色液)、小鼠源抗人抗Vimentin、E-cadherin一抗购自武汉伊莱瑞特科技股份有限公司;双荧光素酶检测试剂盒购自武汉金开瑞生物工程有限公司;兔源抗人抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、C-myc、切割型胱天蛋白酶-3(cleaved cysteinyl aspartate specific proteases-3, cleaved caspase-3)、GAPDH、BCL-2相关X蛋白(BCL-2-associated X protein, Bax)与FOXD1一抗、(驴抗兔)酶标二抗购自美国CST公司。

LightCycler 96 QT-PCR仪购自北京强欣博瑞生物技术有限公司;iBlot 3 Western blotting转印系统、Attune流式细胞仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;ReadMax 1900Plus光吸收全波长酶标仪购自

上海闪谱生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分组转染Cal-27细胞并构建移植瘤裸鼠模型:39.8 °C水浴中迅速解冻Cal-27细胞,1 000 r/min离心(室温,5 min),RPMI-1640基础培养基清洗,细胞完全培养基重悬混匀后接种在25 cm²培养瓶内,培养至约80%细胞融合,胰酶消化后传代,取第2代Cal-27细胞在24孔板接种培养至对数生长期,随机分为对照组、转染LINC01355 siRNA (si-LINC01355)组、转染LINC01355过表达质粒(pc-LINC01355)组、转染LINC01355 siRNA阴性对照+miR-545-5p阴性对照+空载质粒(si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC)组、转染LINC01355 siRNA+miR-545-5p抑制剂(si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor)组,用脂质体转染试剂按照说明书对实验组细胞进行分组转染。各组细胞均转染

24 h,然后收集细胞做后续检测。

参照文献[10]制备Cal-27移植瘤裸鼠模型。转染24 h后各组细胞用胰酶消化,收集细胞以PBS缓冲液清洗、重悬、混匀和计数,制成3 × 10⁷/mL的单细胞悬液,取200 μL在裸鼠背部右侧靠近腋窝处皮下注射,然后饲养裸鼠7 d并观察注射部位成瘤情况,当皮下出现直径≥5 mm的硬块时,表明Cal-27移植瘤裸鼠模型制备成功。

1.3.2 实时定量PCR检测LINC01355、miR-545-5p及FOXDI表达:用TRIzol分别提取转染后的各组细胞总RNA,然后使用一步法实时定量PCR试剂盒进行检测,GAPDH或U6为内参,得到各组细胞LINC01355、GAPDH、miR-545-5p、U6、FOXDI的循环阈值,采用2^{-ΔΔCt}法计算基因的相对表达量。引物序列见表1。

1.3.3 各组移植瘤体积检测:用标尺测量各组裸鼠

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequence

Gene	Primer sequence
LINC01355	Forward,5'-GTACAGTGGCATGATCTCAG-3'
	Reverse,5'-CTGCTCTAGCCCCCTAAAGATAG-3'
FOXDI	Forward,5'-GATCTGTGAGTTCATCAGCGGC-3'
	Reverse,5'-TGACGAAGCAGTCGTTGAGCGA-3'
GAPDH	Forward,5'-CGACTATGCAGTGACAGGTTGTG-3'
	Reverse,5'-ACGGATTTGGTTCGTATTGGGC-3'
miR-545-5p	Forward,5'-TCAGTAAATGTTTATTAGATGA-3'
	Reverse,5'-GTGCAGGCTCCGAGGTATTC-3'
U6	Forward,5'-CGCTTCGGCAGCACATATACTA-3'
	Reverse,5'-ATGGAACGCTTCACGAATTTGC-3'

移植瘤的最长径(L)和最短径(W),然后计算体积(V)。V(mm³)=L × W² × 0.5。皮下接种28 d后检测各组裸鼠移植瘤体积。

1.3.4 CCK-8法、流式细胞术和Transwell实验分别检测各组细胞增殖、凋亡和侵袭情况:

1.3.4.1 CCK-8法 取第2代Cal-27细胞在96孔板接种培养至对数生长期,按照1.3.1方法分组转染24 h后用CCK-8试剂处理90 min,按照增强型细胞活力检测试剂盒说明书测量各组细胞吸光度值。增殖活性(%)=实验组细胞吸光度值/对照组细胞吸光度值 × 100。

1.3.4.2 流式细胞术 胰酶消化转染后的各组细胞,

然后PBS缓冲液清洗、重悬、计数,制成2 × 10⁵/mL的单细胞悬液,按照Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒说明书操作,取500 μL加入FITC、PI避光孵育,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3.4.3 Transwell实验 胰酶消化转染后的各组细胞,然后用不含血清的RPMI-1640基础培养基清洗、重悬、计数,制成2 × 10⁵/mL的单细胞悬液,取1 mL接种在用基质胶提前包被过的24孔Transwell上室中,当细胞贴壁后向下室加入含10%血清的细胞完全培养基,在恒温培养箱中培养24 h后取出,对下室细胞进行洗涤、固定、结晶紫染色、漂洗处理,显微镜下观察各组侵袭至下室的细胞并计数。

1.3.5 免疫组织化学检测各组细胞EMT相关蛋白表达:胰酶消化转染后的各组细胞,PBS缓冲液清洗、重悬、计数,制成 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 的单细胞悬液,取适量滴加到以铬矾明胶提前处理过的载玻片上,然后进行固定、透化、内源性过氧化物酶清除、封闭处理,孵育小鼠源抗人抗Vimentin或E-cadherin一抗,清洗后按二步法免疫组织化学试剂盒说明书孵育二抗、DAB显色,清洗后显微镜下观察各组细胞,并运用ImageJ软件分析各组Vimentin或E-cadherin光密度值。

1.3.6 Western blotting检测细胞增殖、凋亡相关蛋白的表达:用RAPI裂解液提取转染后的各组细胞总蛋白,用BCA法测出其浓度后在沸水浴中加热变性,每组取25 μg 总蛋白样本进行电泳分离、湿式转印、脱脂牛奶封闭处理,孵育兔源抗人抗PCNA、C-myc、cleaved caspase-3、GAPDH、Bax和FOXD1一抗,清洗后孵育酶标二抗,清洗后进行化学发光显色,采集各组显色后的蛋白条带,运用ImageJ软件计算各组PCNA、C-myc、cleaved caspase-3、Bax和FOXD1相对表达量。

1.3.7 双荧光素酶报告实验验证Cal-27细胞中LINC01355与miR-545-5p、miR-545-5p与FOXD1的靶向关系:取第2代Cal-27细胞在24孔板接种培养,待细胞增殖至对数生长期时将miR-545-5p-wt与pc-LINC01355、miR-545-5p-wt与pc-NC、miR-545-5p-mut与pc-LINC01355、miR-545-5p-mut与pc-NC、FOXD1-

wt与miR-545-5p mimics、FOXD1-wt与miR-545-5p-NC、FOXD1-mut与miR-545-5p mimics、FOXD1-mut与miR-545-5p-NC分别共转染到Cal-27细胞中,24 h后使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组荧光素酶活性。

1.4 统计学分析

利用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组LINC01355、miR-545-5p及FOXD1 mRNA表达比较

结果显示,与对照组比较,si-LINC01355组细胞LINC01355和FOXD1 mRNA表达降低($P < 0.05$),miR-545-5p表达升高($P < 0.05$);pc-LINC01355组细胞LINC01355和FOXD1 mRNA表达升高($P < 0.05$),miR-545-5p表达降低($P < 0.05$);si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC组细胞LINC01355、miR-545-5p和FOXD1 mRNA表达无统计学差异($P > 0.05$)。与si-LINC01355组相比,si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor组细胞LINC01355表达无统计学差异($P > 0.05$),miR-545-5p表达降低($P < 0.05$),FOXD1 mRNA表达升高($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组Cal-27细胞LINC01355、miR-545-5p和FOXD1 mRNA表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.2 Comparison of expression of LINC01355, miR-545-5p, and FOXD1 mRNA of Cal-27 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	LINC01355	miR-545-5p	FOXD1 mRNA
Control group	1.01 \pm 0.15	0.97 \pm 0.14	1.03 \pm 0.19
si-LINC01355 group	0.30 \pm 0.08 ¹⁾	2.68 \pm 0.21 ¹⁾	0.32 \pm 0.09 ¹⁾
pc-LINC01355 group	2.73 \pm 0.20	0.29 \pm 0.08 ¹⁾	2.61 \pm 0.22 ¹⁾
si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC group	1.02 \pm 0.12	0.96 \pm 0.12	1.04 \pm 0.15
si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor group	0.31 \pm 0.09	1.03 \pm 0.17 ²⁾	0.99 \pm 0.16 ²⁾

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. si-LINC01355 group.

2.2 各组裸鼠移植瘤体积比较

对照组、si-LINC01355组、pc-LINC01355组、si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC组、si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor组裸鼠移植瘤体积分别为(957.85 ± 27.46) mm^3 、(342.73 ± 23.15) mm^3 、($1\ 560.95 \pm 34.21$) mm^3 、

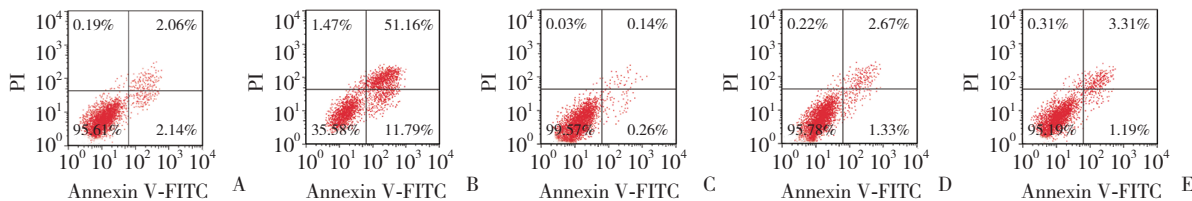
(970.64 ± 28.61) mm^3 、(932.94 ± 30.53) mm^3 。与对照组比较,si-LINC01355组裸鼠移植瘤体积减小($P < 0.05$),pc-LINC01355组裸鼠移植瘤体积增大($P < 0.05$),si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC组裸鼠移植瘤体积无统计学差异($P > 0.05$)。与si-LINC01355组比

较, si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor组裸鼠移植瘤体积增大($P < 0.05$)。

2.3 各组细胞增殖、凋亡和侵袭情况比较

结果显示, 与对照组比较, si-LINC01355组细胞增殖活性、侵袭数量降低($P < 0.05$), 凋亡率升高($P < 0.05$); pc-LINC01355组细胞增殖活性、侵袭数量升

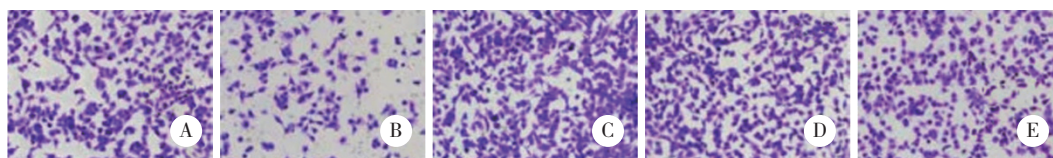
高($P < 0.05$), 凋亡率降低($P < 0.05$); si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC组细胞增殖活性、侵袭数量、凋亡率无统计学差异($P > 0.05$)。与si-LINC01355组比较, si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor组细胞增殖活性、侵袭数量升高($P < 0.05$), 凋亡率降低($P < 0.05$)。见图1、2, 表3。



A, control group; B, si-LINC01355 group; C, pc-LINC01355 group; D, si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC group; E, LINC01355+miR-545-5p inhibitor group.

图1 流式细胞术检测各组Cal-27细胞凋亡情况

Fig.1 Flow cytometry detection of Cal-27 cell apoptosis in each group



A, control group; B, si-LINC01355 group; C, pc-LINC01355 group; D, si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC group; E, LINC01355+miR-545-5p inhibitor group.

图2 Transwell实验检测各组Cal-27细胞侵袭情况 × 200

Fig.2 Invasion of Cal-27 cells in each group using Transwell assay × 200

表3 各组Cal-27细胞增殖活性、侵袭数量、凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.3 Comparison of proliferation activity, invasion quantity, and apoptosis rate of Cal-27 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Proliferation activity (%)	Number of invasion	Apoptosis rate (%)
Control	100.00 ± 0.00	290.80 ± 24.30	4.01 ± 0.54
si-LINC01355	39.98 ± 7.16 ¹⁾	91.70 ± 18.52 ¹⁾	61.85 ± 1.67 ¹⁾
pc-LINC01355	245.63 ± 13.25 ¹⁾	473.40 ± 28.63 ¹⁾	0.38 ± 0.12 ¹⁾
si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC	106.14 ± 12.70	302.10 ± 23.42	3.91 ± 0.48
si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor	94.86 ± 11.90 ²⁾	272.30 ± 20.13 ²⁾	4.43 ± 0.61 ²⁾

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. si-LINC01355 group.

2.4 各组细胞EMT相关蛋白表达比较

与对照组相比, si-LINC01355组细胞Vimentin蛋白阳性表达减少($P < 0.05$), E-cadherin蛋白阳性表达增加($P < 0.05$); pc-LINC01355组细胞Vimentin蛋白阳性表达增加($P < 0.05$), E-cadherin蛋白阳性表达减少($P < 0.05$); si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC组细胞Vimentin、E-cadherin蛋白阳性表达无统计学差异($P > 0.05$)。与si-LINC01355组相比, si-LINC01355+

miR-545-5p inhibitor组细胞Vimentin蛋白阳性表达增加($P < 0.05$), E-cadherin蛋白阳性表达减少($P < 0.05$)。见图3、表4。

2.5 各组细胞增殖、凋亡相关蛋白表达比较

结果显示, 与对照组比较, si-LINC01355组细胞PCNA、C-myc与FOXD1蛋白表达减少($P < 0.05$), cleaved caspase-3与Bax蛋白表达增加(均 $P < 0.05$); pc-LINC01355组细胞PCNA、C-myc与FOXD1蛋白表

达增加(均 $P < 0.05$), cleaved caspase-3与Bax蛋白表达减少($P < 0.05$); si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC组细胞PCNA、C-myc、cleaved caspase-3、Bax与FOXD1蛋白表达无统计学差异(均 $P > 0.05$)。与si-LINC01355

组相比, si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor组细胞PCNA、C-myc与FOXD1蛋白表达增加(均 $P < 0.05$), cleaved caspase-3与Bax蛋白表达减少(均 $P < 0.05$)。见图4、表5。

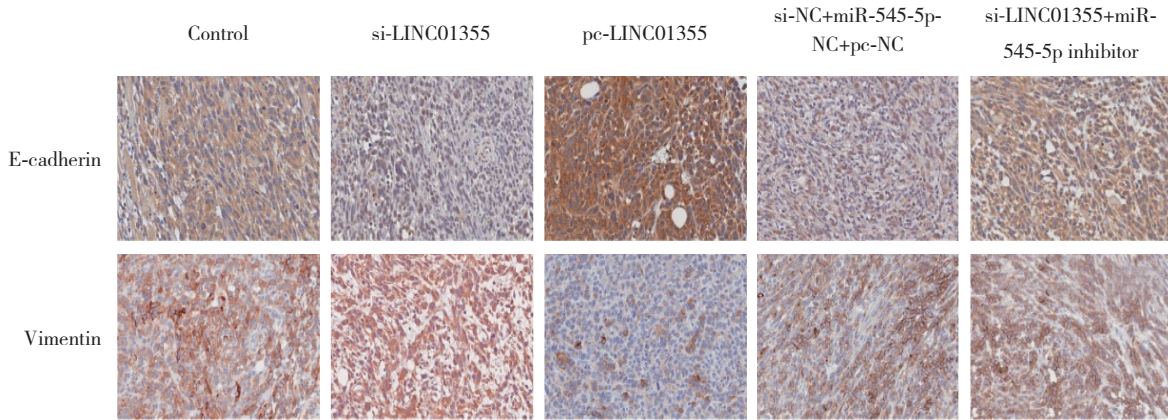


图3 免疫组化染色检测各组Cal-27细胞EMT相关蛋白的表达 × 200

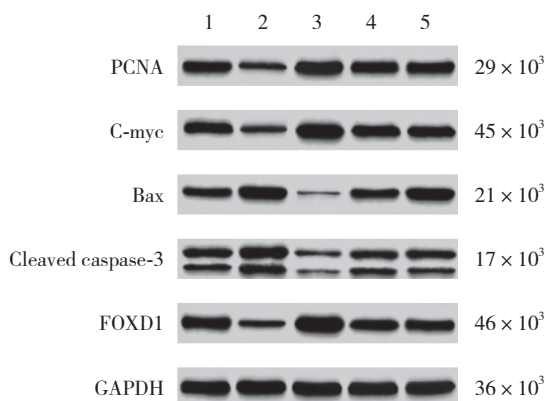
Fig.3 EMT-related protein expression of Cal-27 cells in each group by immunohistochemical staining × 200

表4 各组Cal-27细胞EMT相关蛋白阳性表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.4 Positive expression of EMT-related proteins in Cal-27 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Vimentin	E-cadherin
Control	1.08 ± 0.14	0.61 ± 0.11
si-LINC01355	0.36 ± 0.10 ¹⁾	1.13 ± 0.16 ¹⁾
pc-LINC01355	1.84 ± 0.17 ¹⁾	0.16 ± 0.05 ¹⁾
si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC	0.37 ± 0.11	0.60 ± 0.13
si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor	1.05 ± 0.13 ²⁾	0.63 ± 0.10 ²⁾

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. si-LINC01355 group.



1, control group; 2, si-LINC01355 group; 3, pc-LINC01355 group; 4, si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC group; 5, si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor group.

图4 Western blotting检测各组细胞增殖、凋亡相关蛋白的表达
Fig.4 The expression of proliferation and apoptosis-related proteins of cells in each group by Western blotting

2.6 Cal-27细胞中LINC01355与miR-545-5p、miR-545-5p与FOXD1的靶向关系验证结果

ENCORI数据库(<https://masysu.com/encori/>)查询结果显示, LINC01355与miR-545-5p间存在结合位点, miR-545-5p与FOXD1存在结合位点, 见图5。

miR-545-5p-wt+pc-NC组、miR-545-5p-wt+pc-LINC01355组、miR-545-5p-mut+pc-NC组、miR-545-5p-mut+pc-LINC01355组的相对荧光素酶活性分别为 1.00 ± 0.11 、 0.26 ± 0.07 、 0.99 ± 0.10 和 0.97 ± 0.12 。与miR-545-5p-wt+pc-NC组比较, miR-545-5p-wt+pc-LINC01355组相对荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$); 而miR-545-5p-mut+pc-NC组与miR-545-5p-mut+pc-LINC01355组相对荧光素酶活性比较无统计学差异($P > 0.05$)。

FOXD1-wt+miR-545-5p-NC组、FOXD1-wt+miR-545-5p mimics组、FOXD1-mut+miR-545-5p-NC组、FOXD1-mut+miR-545-5p mimics组的相对萤光素酶活性分别为 1.02 ± 0.14 、 0.30 ± 0.08 、 1.03 ± 0.15 和 1.01 ± 0.13 。与FOXD1-wt+miR-545-5p-NC比较,FOXD1-wt+

miR-545-5p mimics组相对萤光素酶活性显著降低($P < 0.05$);而FOXD1-mut+miR-545-5p-NC组与FOXD1-mut+miR-545-5p mimics组相对萤光素酶活性比较无统计学差异($P > 0.05$)。

表5 各组Cal-27细胞增殖、凋亡相关蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.5 Relative protein expression of proliferation and apoptosis-related proteins in Cal-27 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	PCNA	C-myc	Cleaved caspase-3	Bax	FOXD1
Control	0.65 ± 0.10	0.69 ± 0.11	0.71 ± 0.12	0.58 ± 0.09	0.80 ± 0.17
si-LINC01355	$0.20 \pm 0.06^{1)}$	$0.23 \pm 0.07^{1)}$	$1.20 \pm 0.16^{1)}$	$1.06 \pm 0.14^{1)}$	$0.33 \pm 0.10^{1)}$
pc-LINC01355	$1.12 \pm 0.14^{1)}$	$1.16 \pm 0.15^{1)}$	$0.22 \pm 0.07^{1)}$	$0.10 \pm 0.03^{1)}$	$1.30 \pm 0.19^{1)}$
si-NC+miR-545-5p-NC+pc-NC	0.64 ± 0.12	0.70 ± 0.12	0.72 ± 0.14	0.57 ± 0.10	0.81 ± 0.16
si-LINC01355+miR-545-5p inhibitor	$0.63 \pm 0.09^{2)}$	$0.67 \pm 0.10^{2)}$	$0.74 \pm 0.15^{2)}$	$0.60 \pm 0.11^{2)}$	$0.77 \pm 0.15^{2)}$

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. si-LINC01355 group.

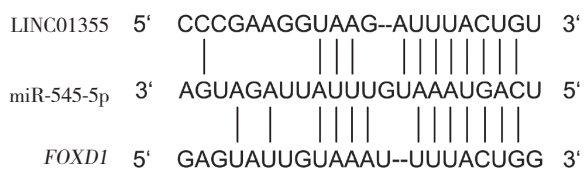


图5 基因结合位点
Fig.5 Gene binding site

3 讨论

OSCC的发病机制复杂,一般认为与吸烟、过量饮酒等有关,手术是OSCC治疗的首选,辅助化疗或放疗可取得较好的治疗效果。然而,大多数晚期患者已发生转移,治疗效果较差。因此,明确OSCC的发病机制,进而寻找更有效的治疗方法尤为重要^[11-13]。LINC01355是具有致癌活性的RNA分子,在人类癌症发生和发展中起着重要作用,对肾透明细胞癌具有临床预测价值^[14],研究^[15]显示LINC01355在胃癌细胞和组织中显著上调,可诱导胃癌细胞增殖,同时抑制细胞凋亡,与患者预后不良相关。本研究结果显示,与对照组比较,si-LINC01355组细胞LINC01355表达下调,细胞增殖活性、侵袭数量,Vimentin蛋白阳性表达,PCNA与C-myc蛋白表达均减少,移植瘤体积缩小;而细胞凋亡率,cleaved caspase-3与Bax蛋白表达,E-cadherin蛋白阳性表达均增加,表明敲低LINC01355可降低OSCC细胞EMT、增殖、侵袭活性并促进凋亡,并且可以抑制移植瘤

在裸鼠体内生长,而增强LINC01355表达对OSCC细胞发挥相反的作用,提示LINC01355可能是OSCC的潜在治疗靶点。

miR-545-5p是具有抑癌活性的RNA分子,其表达上调可通过减轻卵巢癌细胞生长和转移而发挥肿瘤抑制作用^[16];也可导致骨肉瘤细胞体外增殖、迁移和侵袭、异种移植物体内生长的抑制^[17];还可显著降低鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭,并促进凋亡^[18]。研究^[6]显示,miR-545-5p表达可显著增强OSCC患者体内分离的肿瘤浸润性CD8⁺T细胞的抗肿瘤作用。FOXDI在头颈部鳞状细胞癌组织中高表达,敲低FOXDI可促使头颈部鳞状细胞癌细胞衰老与凋亡,并降低其增殖能力^[19]。FOXDI表达降低可抑制OSCC细胞自噬,继而发挥抗癌作用^[20]。本研究双萤光素酶报告实验结果显示,Cal-27细胞内LINC01355靶向下调miR-545-5p表达,同时miR-545-5p靶向下调FOXDI表达,表明LINC01355可靶向调控miR-545-5p/FOXDI信号通路,从而介导OSCC的发生、发展。将si-LINC01355和miR-545-5p抑制剂联合转染到Cal-27细胞内,可减弱单独转染si-LINC01355对OSCC细胞EMT、增殖、侵袭活性的降低作用,削弱其对OSCC细胞凋亡的促进作用,拮抗其对OSCC移植瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用,最终逆转了对OSCC的抗癌作用,表明敲低LINC01355可减弱OSCC增殖与侵袭,增强其凋亡,可能是通过上调

miR-545-5p实现的。

综上所述,LINC01355可通过调节miR-545-5p/FOXD1信号通路来调控OSCC发生、发展,敲减LINC01355可升高miR-545-5p表达水平而降低FOXD1的表达水平,继而降低OSCC细胞EMT、侵袭、增殖活性,增强其凋亡活性,同时可抑制其异种裸鼠移植瘤生长,最终起到肿瘤抑制作用。本研究为OSCC的临床治疗提供了新的作用靶点,并为明确其发病机制提供了丰富的实验资料。本研究偏重于细胞体外实验,体内研究有限,今后还需进一步研究论证。

参考文献:

- [1] DE LA FUENTE C, PRAT-VALERO N, ALBEROLA-FERRANTI M, et al. Occult metastases of oral maxillary squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis [J]. *Head Neck*, 2023, 45 (3): 733-744. DOI: 10.1002/hed.27276.
- [2] MATOS LL, GUIMARÃES YLM, LEITE AK, et al. Management of stage III oral cavity squamous cell carcinoma in light of the new staging system: a critical review [J]. *Curr Oncol Rep*, 2023, 25 (2): 107-113. DOI: 10.1007/s11912-022-01353-6.
- [3] ZOU C, WU SY, WEI HG, et al. LINC01355 contributes to malignant phenotype of oral squamous cell carcinoma and cytotoxic T cell infiltration via activating Notch signaling pathway [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 1830790. DOI: 10.1155/2021/1830790.
- [4] LIU R, YANG XW. LncRNA LINC00342 promotes gastric cancer progression by targeting the miR-545-5p/CNRY2 axis [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21 (1): 1163. DOI: 10.1186/s12885-021-08829-x.
- [5] LIU C, LI QG, ZHOU Y, et al. LncRNA NR2F2-AS1 induces epithelial-mesenchymal transition of non-small cell lung cancer by modulating BVR/ATF-2 pathway via regulating miR-545-5p/c-Met axis [J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11 (10): 4844-4865.
- [6] AI YL, WU SY, GAO H, et al. Repression of CRNDE enhances the anti-tumour activity of CD8⁺ T cells against oral squamous cell carcinoma through regulating miR-545-5p and TIM-3 [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (23): 10857-10868. DOI: 10.1111/jcmm.16909.
- [7] PAZHANI J, VEERARAGHAVAN VP, JAYARAMAN S. Transcription factors: a potential therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Epigenomics*, 2023, 15 (2): 57-60. DOI: 10.2217/epi-2023-0046.
- [8] JIANG WM, LI YD, LI RY, et al. The prognostic significance of FOXD1 expression in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *J Pers Med*, 2023, 13 (3): 530. DOI: 10.3390/jpm13030530.
- [9] MA YX, HAN JC, LUO X. FOXD1-AS1 upregulates FOXD1 to promote oral squamous cell carcinoma progression [J]. *Oral Dis*, 2023, 29 (2): 604-614. DOI: 10.1111/odi.14002.
- [10] YAO ZX, TU JH, LIU YL, et al. Long non-coding RNA LINC00342 promotes the proliferation, invasion, and migration of primary hepatocellular carcinoma cells by regulating the expression of miRNA-19a-3p, miRNA-545-5p, and miRNA-203a-3p [J]. *Biochem Genet*, 2024, 62 (2): 675-697. DOI: 10.1007/s10528-023-10420-x.
- [11] BADWELAN M, MUADDI H, AHMED A, et al. Oral squamous cell carcinoma and concomitant primary tumors, what do we know? A review of the literature [J]. *Curr Oncol*, 2023, 30 (4): 3721-3734. DOI: 10.3390/curroncol30040283.
- [12] CAREY RM, ANAGNOS VJ, PRASAD A, et al. Nodal metastasis in surgically treated oral cavity squamous cell carcinoma [J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2023, 85 (6): 348-359. DOI: 10.1159/000534491.
- [13] KAMAL MV, RAO M, DAMERLA RR, et al. A mechanistic review of methotrexate and celecoxib as a potential metronomic chemotherapy for oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Invest*, 2023, 41 (2): 144-154. DOI: 10.1080/07357907.2022.2139840.
- [14] WANG G, LIU PH, LI JF, et al. Novel prognosis and therapeutic response model of immune-related lncRNA pairs in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Vaccines*, 2022, 10 (7): 1161. DOI: 10.3390/vaccines10071161.
- [15] PIAO HY, LIU Y, KANG Y, et al. Hypoxia associated lncRNA HYPAL promotes proliferation of gastric cancer as ceRNA by sponging miR-431-5p to upregulate CDK14 [J]. *Gastric Cancer*, 2022, 25 (1): 44-63. DOI: 10.1007/s10120-021-01213-5.
- [16] SUN PP, BAO AM, HUA XD, et al. RP5-1148A21.3 (lncRP5) exerts oncogenic function in human ovarian carcinoma [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2022, 54 (2): 209-219. DOI: 10.3724/abbs.2022002.
- [17] ZHOU HZ, CHEN B, LI XJ, et al. MicroRNA-545-5p regulates apoptosis, migration and invasion of osteosarcoma by targeting dimethyladenosine transferase 1 [J]. *Oncol Lett*, 2021, 22 (5): 763. DOI: 10.3892/ol.2021.13024.
- [18] GE SC, JIANG CY, LI M, et al. Long non-coding RNA CRNDE exacerbates NPC advancement mediated by the miR-545-5p/CCND2 axis [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21 (1): 650. DOI: 10.1186/s12935-021-02348-2.
- [19] WU T, YANG ZY, CHEN WC, et al. MiR-30e-5p-mediated FOXD1 promotes cell proliferation by blocking cellular senescence and apoptosis through p21/CDK2/Rb signaling in head and neck carcinoma [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9 (1): 295. DOI: 10.1038/s41420-023-01571-2.
- [20] ALAA EL-DIN Y, SABRY D, H AHMED S, et al. FOXD1-mTOR signaling pathway on oral squamous cell carcinoma and its inhibition by rosemary extract (invitro-study) [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2022, 23 (9): 3071-3081. DOI: 10.31557/APJCP.2022.23.9.3071.

(编辑 武玉欣)