

• 基础研究 •

微小RNA-302a-3p 靶向溶酶体相关膜蛋白5 抑制口腔鳞状细胞癌侵袭转移的研究

余丽^{1,2} 周铁军³ 吴晓² 蔺辛红² 张晓艳^{1,2} 赖永先^{2,4}廖新月^{2,5} 斯航^{2,5} 冯云^{2,5} 简洁⁶ 冯燕^{2,5}

1. 西南医科大学附属口腔医院牙周黏膜病科, 泸州 646000;

2. 口颌面修复重建和再生泸州市重点实验室, 泸州 646000;

3. 西南医科大学附属医院病理科, 泸州 646000;

4. 西南医科大学附属口腔医院预防保健科, 泸州 646000;

5. 西南医科大学附属口腔医院儿童口腔科, 泸州 646000;

6. 德阳市口腔医院, 德阳 618000

[摘要] 目的 探讨溶酶体相关膜蛋白5 (LAMP5) 和miR-302a-3p在口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 中的表达及其对OSCC侵袭转移的影响。方法 癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库分析OSCC中LAMP5的表达及其作为预后指标的灵敏度。蛋白质印迹、定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和细胞免疫染色检测LAMP5在OSCC组织及细胞中的表达。细胞计数试剂盒-8 (CCK-8)、细胞免疫染色、迁移和侵袭实验评估LAMP5对细胞增殖、迁移和侵袭的影响。微小RNA (miR) 靶向预测网站预测调控LAMP5的miR并采用双荧光素酶报告实验验证。裸鼠荷瘤模型评估敲低LAMP5对OSCC生长的影响。结果 LAMP5在OSCC组织和细胞中高表达且具有较高的诊断灵敏度。敲低LAMP5显著抑制OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭; 而过表达LAMP5则促进OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭。LAMP5的表达受miR-302a-3p的调控。敲低LAMP5显著抑制荷瘤小鼠OSCC肿瘤的生长。结论 LAMP5通过增加OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭促进OSCC的恶性进展, 其表达受到miR-302a-3p因子的负向调控。

[关键词] 微小RNA-302a-3p; 溶酶体相关膜蛋白5; 口腔鳞状细胞癌; 侵袭转移

[中图分类号] R739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2024409



本文链接 开放科学标识码

miR-302a-3p targeting lysosomal-associated membrane protein 5 inhibits the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma

Yu Li^{1,2}, Zhou Tiejun³, Wu Xiao², Lin Xinhong², Zhang Xiaoyan^{1,2}, Lai Yongxian^{2,4}, Liao Xinyue^{2,5}, Si Hang^{2,5}, Feng Yun^{2,5}, Jian Jie⁶, Feng Yan^{2,5}

1. Dept. of Periodontal and Oral Mucosal Disease, The Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University,

Luzhou 646000, China; 2. Oral & Maxillofacial Recon-

struction and Regeneration of Luzhou Key Laboratory,

Luzhou 646000, China; 3. Dept. of Pathology, The Affili-

ated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou

646000, China; 4. Dept. of Preventive Health Care, The

Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical

University, Luzhou 646000, China; 5. Dept. of Pediatric

Dentistry, The Affiliated Stomatology Hospital of South-

west Medical University, Luzhou 646000, China; 6. Dey-

[收稿日期] 2024-11-08; **[修回日期]** 2025-01-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82403404); 四川省科学技术厅科技计划项目 (2024JDRC0040); 四川省医学青年创新课题计划 (Q23028); 泸州市科技计划项目 (2023JYJ002, 2023SYF139); 德阳市口腔医院-西南医科大学科技战略合作 (2024DYKQXNYD-03); 2024大学生创新创业计划项目 (202410632009, 2024368)

[第一作者] 余丽, 主治医师, 博士, E-mail: yulixt126@swmu.edu.cn

[通信作者] 简洁, 副主任医师, 硕士, E-mail: jianjie_4950@163.com; 冯燕, 主任医师, 硕士, E-mail: fyxt126@swmu.edu.cn

ang Stomatological Hospital, Deyang 618000, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China (82403404); Sichuan Science and Technology Program (2024JDRC0040); Youth Innovation Project of Sichuan Provincial Medical Association (Q23028); Luzhou Science and Technology Program (2023JYJ002, 2023SYF139); Deyang Stomatological Hospital-Southwest Medical University Science and Technology Strategic Cooperation Project (2024DYKQXNYD03); 2024 National and School Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Program (202410632009, 2024368)

Correspondence: Jian Jie, E-mail: jianjie_4950@163.com; Feng Yan, E-mail: fyxt126@swmu.edu.cn

[Abstract] **Objective** This study aimed to explore the expression of lysosomal-associated membrane protein 5 (LAMP5) and microRNA (miR)-302a-3p in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and their functional mechanism on the invasion and metastasis of OSCC. **Methods** The expression of LAMP5 in OSCC and its sensitivity as a prognostic indicator were analyzed on the basis of The Cancer Genome Atlas database. Western blot, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, and cell immunocytochemistry were used to detect the expression of LAMP5 in OSCC tissues and cells. The effect of LAMP5 on the proliferation, migration, and invasion of OSCC cells was evaluated through cell counting kit-8, immunocytochemistry, migration, and invasion assays, respectively. The miRNA targeting prediction websites were used to predict the miR that regulates LAMP5 and verify the targeted regulatory effect of miR-302a-3p on LAMP5. The effect of LAMP5 knockdown on OSCC tumor growth was evaluated in a nude mouse tumorigenesis model. **Results** LAMP5 was highly expressed in OSCC tissues and cells. It showed high sensitivity in the early diagnosis of OSCC. LAMP5 knockdown significantly inhibited the proliferation, migration, and invasion of OSCC cells, whereas LAMP5 overexpression increased these cell activities. The expression of LAMP5 was regulated by miR-302a-3p. *In vivo*, LAMP5 knockdown significantly inhibited the growth of OSCC tumor. **Conclusion** LAMP5 promotes the malignant progression of OSCC by enhancing the proliferation, migration, and invasion of OSCC cells. The expression of LAMP5 is negatively regulated by miR-302a-3p.

[Key words] microRNA-302a-3p; lysosomal-associated membrane protein 5; oral squamous cell carcinoma; invasion and metastasis

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是最常见的头颈部恶性肿瘤之一, 约占口腔癌的90%以上^[1-2]。OSCC的侵袭性强, 易发生远处转移^[3]。2022年, 全球约有39万新确诊OSCC病例和19万死亡病例^[4]。OSCC患者预后较差^[5], 5年生存率停滞在50%~60%^[6-7]。因此, 探讨OSCC侵袭转移的分子机制具有重要的理论和临床意义。

溶酶体相关膜蛋白5 (lysosomal-associated membrane protein 5, LAMP5) 是一种溶酶体膜蛋白, 参与调控细胞的增殖、自噬、代谢以及信号转导等过程^[8]。研究发现, LAMP5在胃癌^[9]、结直肠癌^[10]和混合谱系白血病^[11]等多种肿瘤中高表达, 参与肿瘤的侵袭转移和恶性进展。然而, LAMP5在OSCC中的具体作用及其上游调控机制仍未被深入探讨。微小RNA (microRNA, miR) 是一类内源性非编码小RNA, 通过与靶基因mRNA的3'非编码区 (3' untranslated region, 3' UTR) 结合, 负调控基因表达^[12]。miR在多种肿瘤中发挥抑瘤的作用^[13]。miR-302a-3p在多种恶性肿瘤中调控肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭能力。在食管癌中,

miR-302a-3p通过抑制食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭起到肿瘤抑制的作用^[14]; 在黑色素瘤中通过靶向甲基转移酶3抑制黑色素瘤细胞的增殖、侵袭和迁移^[15]; 此外, 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中靶向乙酰辅酶A乙酰转移酶1抑制NSCLC的进展^[16]。以上研究提示miR-302a-3p负调控肿瘤进展, 然而, miR-302a-3p是否通过靶向调控LAMP5的表达抑制OSCC的进展尚有待进一步的解析。

本研究拟通过生信分析、细胞实验和动物实验, 分析miR-302a-3p和LAMP5在OSCC中的表达以及miR-302a-3p对LAMP5的调控作用, 探讨miR-302a-3p/LAMP5信号轴在OSCC侵袭转移中的作用机制, 尝试为OSCC的诊断及靶向治疗提供新的理论依据和潜在靶点。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取2023年7月—2024年8月西南医科大学

附属口腔医院口腔颌面外科收治的OSCC患者31例为实验组。入选标准:1)无放化疗史;2)病理确诊为OSCC。排除标准:合并其他器官的恶性肿瘤,免疫系统、心血管系统功能异常的患者。选取同期西南医科大学附属口腔医院口腔颌面外科阻生牙拔除9例患者的健康牙龈为对照组。本研究通过西南医科大学附属口腔医院医学伦理审查(编号20230725001),所有纳入对象均签署知情同意书。

1.2 细胞系和主要试剂

人OSCC细胞HSC-4、CAL-27(中国医学科学院基础医学研究所细胞中心);人永生表皮细胞(Hacat,上海中乔新舟生物科技有限公司);氨基酸和葡萄糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、最低必需培养基(minimum essential eagle medium, MEM)、胎牛血清(fetal calf serum, FBS)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、LAMP5、增殖标志物Kiel 67(marker of proliferation Kiel 67, Ki67)、miR-302a-3p引物序列合成(上海生工生物技术服务有限公司);逆转录试剂盒(Thermo fisher公司,美国);RNA提取试剂盒、miR-302a-3p逆转录、定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)逆转录、定量试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司);Ki67抗体(bs-23103R,北京博奥森生物科技有限公司);LAMP5抗体(ABIN-1385955, antibodies-online GmbH公司,德国); β -actin抗体(湖南艾方生物科技有限公司);3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)试剂盒、PV9000型免疫组化染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);miR-302a-3p阴性对照(negative control, NC)、miR-302a-3p过表达模拟物(mimic)、shRNA-LAMP5和过表达RNA-LAMP5(上海和元生物技术股份有限公司);蛋白质印迹检测相关试剂(上海碧云天生物技术股份有限公司);Transwell小室(康宁公司,美国);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)(成都傲锐赛思生物科技有限公司)。

1.3 生物信息学分析

从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)下载并整理TCGA-ALL(泛癌)、TCGA-OSCC项目STAR的RNAseq数据并提取TPM格式的数据,

舍弃没有临床信息对应的数据,经 $\log_2(1+TPM)$ 方式进行归一化处理。分析LAMP5基因在肿瘤组织与癌旁组织中的表达差异,采用ggplot2软件制图。使用pROC包对数据进行受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析,结果用ggplot2进行可视化处理。

通过miR靶向预测综合分析网站Target Scan、miRDB及DIANA tool查询与LAMP5存在靶向关系的miR,取交集找出LAMP5的潜在调控miR,绘制韦恩图。相关性分析构建LAMP5与miR-302a-3p的表达相关性。

1.4 qRT-PCR

RNA提取试剂盒提取组织、细胞总RNA,逆转录合成cDNA,采用SYBR法检测基因表达水平。qRT-PCR扩增条件:预变性(95 °C, 2 min);变性(95 °C, 30 s),退火(60 °C, 30 s);延伸(65 °C, 2 min),共40个循环;最后延伸(70 °C, 5 min)。mirVana miRNA分离试剂盒提取细胞miRNAs。miRNAs用All-in-One miRNA qRT-PCR试剂盒进行检测。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法统计各组基因及miR-302a-3p的表达差异。

1.5 蛋白质印迹

组织匀浆中加入裂解液,提取OSCC组织和正常口腔黏膜组织的总蛋白进行凝胶电泳,蛋白分离后转膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,含0.1% Tween[®] 20去垢剂的Tris缓冲盐水(Tris-buffered saline with 0.1% Tween[®] 20 detergent, TBST)洗脱后加入LAMP5抗体(1:500),4 °C孵育过夜。次日TBST洗脱3遍,加入相应二抗室温孵育1 h。用TBST洗脱3遍,增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒显色,胶片曝光显像。分析蛋白条带的灰度值计算目标蛋白的相对内参(β -actin)的相对表达量。

1.6 细胞免疫染色(immunocytochemistry, ICC)

细胞接种于细胞爬片,待细胞长至密度为70%~80%时,用4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定,一抗LAMP5(1:100)、Ki67(1:100)染色,羊抗兔IgG(H+L)Alexa Fluor 594二抗孵育,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染;或与羊抗兔IgG(H+L)辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)二抗孵育,DAB显色后苏木素复染细胞核。使用BX-43型直立光学显微镜或BX-53型正交荧光显微镜拍照,ImageJ软件对阳性区域进行定量分析。

1.7 细胞转染和分组

分别培养 CAL-27 和 HSC-4 细胞, 对 CAL-27 细胞进行 LAMP5 的敲低处理, 分为对照组 (sh-control) 和 LAMP5 敲低组 (shLAMP5); 对 HSC-4 细胞进行 LAMP5 的过表达处理, 分为对照组 (oe-control) 和 LAMP5 过表达组 (oe-LAMP5)。将敲低或过表达的慢病毒载体分别转染至 CAL-27 细胞和 HSC-4 细胞, 嘌呤霉素筛选稳定敲低 LAMP5 (shLAMP5) 以及稳定过表达 LAMP5 (oe-LAMP5) 的细胞, qRT-PCR 和 ICC 检测敲低/过表达效率。

培养 CAL-27 细胞, 按照 Lipofectamine™ 3000 转染试剂盒操作说明书操作步骤对 CAL-27 细胞进行转染, 分为: miR-NC 组 (miR-NC 转染细胞)、miR-302a-3p mimic 组 (miR-302a-3p mimic 转染细胞)。

1.8 CCK-8 细胞增殖实验

将细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板, 空白组不接种细胞仅加入培养基。分别培养 24、48 和 72 h 后加入 CCK-8 溶液; 孵育 2 h 后测定 450 nm 处的吸光度值。细胞活力 = $[(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100\%$, 其中 As 为实验组吸光度, Ac 为对照组吸光度, Ab 为空白组吸光度。

1.9 Transwell 迁移和侵袭实验

将细胞以 2×10^5 个/孔接种于 Transwell 上室并加入 10%FBS 的 DMEM 培养基, 下室加入 10%FBS 的 DMEM 培养基, 每组 3 个复孔, 迁移 24 h 后用棉签移去上室未迁移细胞并用 4%PFA 固定细胞, 随后进行苏木素染色, 拍照进行定量分析。侵袭实验在接种细胞前对 Transwell 小室进行 Matrigel 试剂包被, 侵袭时间为 48 h, 其余步骤与迁移实验相同。

1.10 3D 细胞迁移和侵袭实验

采用非粘附 U 行板培养细胞, 300 个细胞/3D 细胞, 待 24 h 细胞长成 3D 细胞后转移至平板培养皿中, 于 0、12 和 24 h 拍照观察 3D 细胞的迁移情况; 3D 细胞侵袭实验在将 3D 细胞转移至平板培养皿之前, 对平板培养皿使用 Matrigel 试剂进行包被, 拍照时间点为 0、24 和 48 h。计算细胞迁移和侵袭的面积以评估迁移和侵袭能力。

1.11 双荧光素酶报告基因实验

构建含有 miR-302a-3p 结合位点的 LAMP5 的 3' UTR 野生型质粒 (pGL3-LAMP5 3' UTR-WT, LAMP5-WT) 和含有 miR-302a-3p 结合位点的突变型质粒 (pGL3-LAMP5 3' UTR-MUT, LAMP-

5-MUT), 将 LAMP5-WT 和 LAMP5-MUT 分别与 miR-302a-3p mimic 或 miR-NC 共转染于 CAL-27 细胞, 37 °C、5%CO₂ 培养 48 h 后弃培养基, 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 洗涤; 加入被动裂解缓冲液 (passive lysis buffer, PLB) 裂解 15 min; 收集裂解液, 测定荧光素酶活性。

1.12 肿瘤细胞成球实验

收集对数期 oe-control 组和 oe-LAMP5 组的 HSC-4 细胞, 将细胞以 1×10^4 个/孔接种于超低黏附的 96 孔板并培养 24 h, 拍照观察成球情况。

1.13 裸鼠移植瘤模型

基于慢病毒载体转染技术构建 LAMP5 稳定敲低的 CAL-27 细胞 (shLAMP5-CAL-27)。分为 sh-control-CAL-27 组和 shLAMP5-CAL-27 组, 分别接种 5×10^6 个 shcontrol-CAL-27 和 shLAMP5-CAL-27 细胞于裸鼠右背部皮下。注射 1 周后开始每 4 d 1 次测量肿瘤的体积和裸鼠体重, 肿瘤体积计算公式为 $(长 \times 宽^2) / 2$ 。在第 31 天处死裸鼠取出肿瘤并称重。苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 和免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 分别检测 2 组肿瘤组织的病理特征和 Ki67 的表达。裸鼠均在无特定病原体的条件下饲养。动物实验获得西南医科大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: SWMU20249989)。

1.14 统计学分析

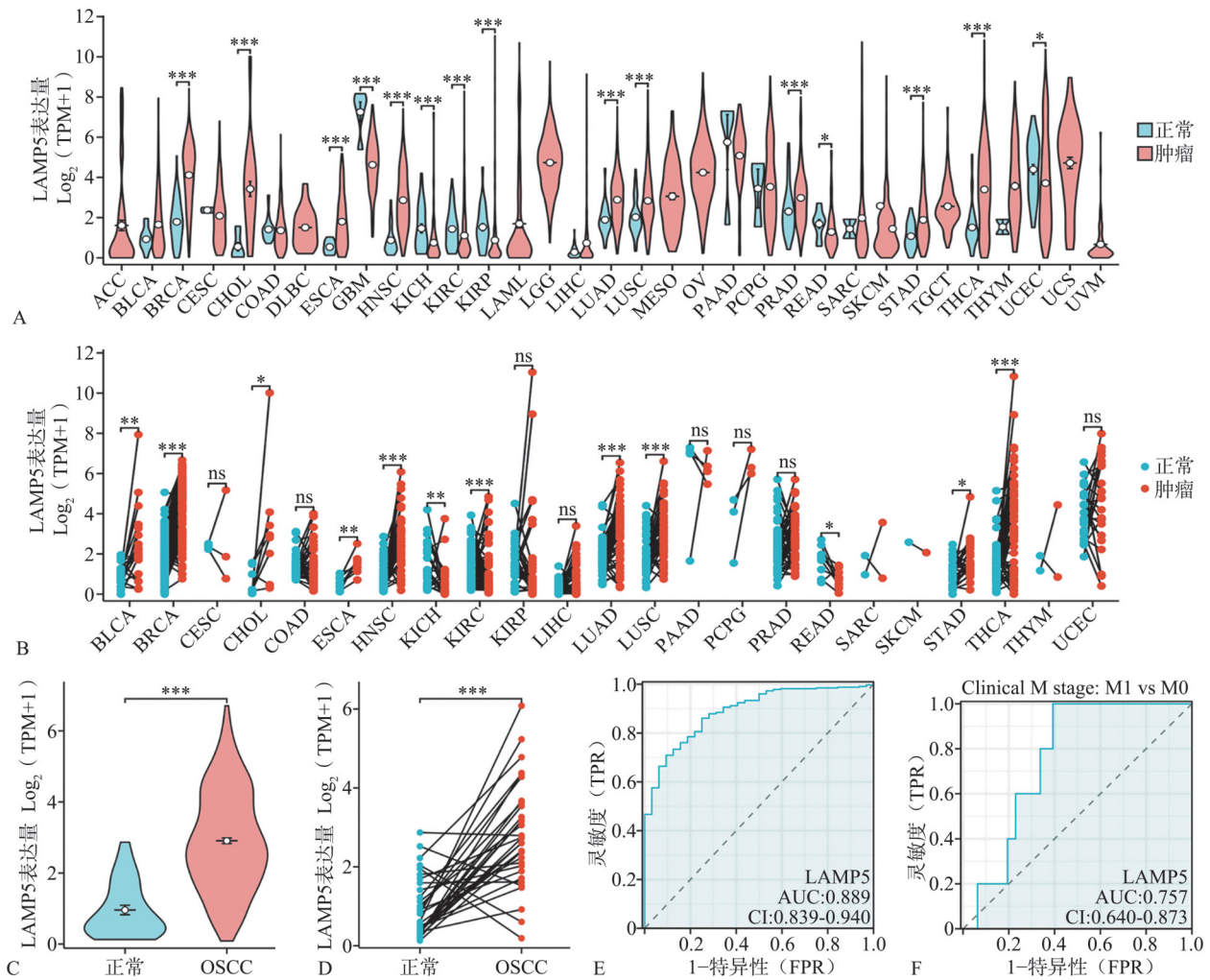
所有数据以 3 次独立实验的平均值 \pm 标准差表示。使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析, 两组间比较采用 Student-*t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAMP5 在 OSCC 中的表达及诊断灵敏度

在多数肿瘤的非配对样本中, LAMP5 在肿瘤组织中的表达显著高于正常组织 (图 1A)。排除非配对样本信息后获取 23 种肿瘤配对样本, 差异表达结果显示 LAMP5 在多种肿瘤组织中高表达 (图 1B)。

在 OSCC 非配对样本中, OSCC 中 LAMP5 的表达水平明显高于正常组织 (图 1C)。同时, 在 OSCC 配对样本的肿瘤组织同样检测到了 LAMP5 的表达上调 (图 1D)。LAMP5 的 AUC 值为 0.889, 提示 LAMP5 在预测结局上诊断效果较好。此外, LAMP5 预测肿瘤转移风险的 AUC 值为 0.757, 对预测肿瘤转移风险具有较高的准确率。



A: 泛癌非配对样本中LAMP5的基因表达; B: 泛癌配对样本中LAMP5的基因表达; C: OSCC非配对样本中LAMP5的基因表达; D: OSCC配对样本中LAMP5的基因表达; E: LAMP5的诊断ROC图; F: 基于转移的LAMP5诊断ROC图。ns为 $P>0.05$; *为 $P<0.05$; **为 $P<0.01$; ***为 $P<0.001$ 。

图1 LAMP5在OSCC中的表达及诊断灵敏度

Fig 1 Expression and diagnostic sensitivity of LAMP5 in OSCC

2.2 LAMP5在OSCC组织样本和OSCC细胞中的表达

LAMP5在OSCC组织中的表达明显高于正常口腔黏膜组织(图2A-C)。此外,OSCC细胞株HSC-4和CAL-27中的LAMP5的基因表达显著高于Hacat(图2D)。在蛋白水平上同样检测到HSC-4和CAL-27中的LAMP5的表达显著高于Hacat(图2E、F),与基因表达水平一致。

2.3 敲低LAMP5对OSCC细胞增殖的影响

为研究LAMP5对OSCC细胞增殖的影响,通过慢病毒载体转染构建了LAMP5稳定敲低(sh-LAMP5)的CAL-27细胞,并使用qRT-PCR和ICC检测了敲低效率,结果显示LAMP5的敲低效率高于80%(图3A-C)。

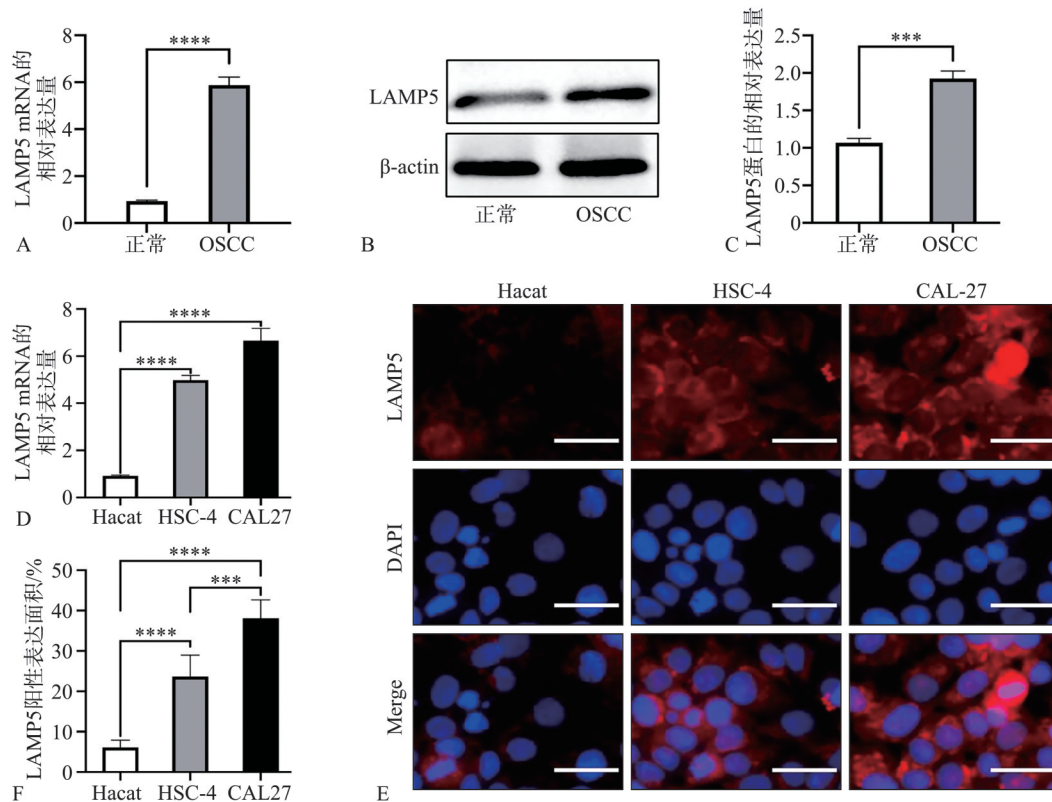
CCK-8结果显示,24 h时,sh-LAMP5组与

shcontrol(对照组)之间的细胞增殖差异无统计学意义,而在48 h和72 h时,shLAM-P5组的细胞增殖均显著低于对照组(图3D)。shLAMP5组的Ki67的基因表达水平显著低于对照组(图3E)。shLAMP5组的Ki67的蛋白表达水平显著低于对照组(图3F、G)。

2.4 过表达LAMP5对OSCC细胞增殖的影响

qRT-PCR和ICC结果显示成功构建LAMP5过表达细胞株(图4A-C)。

CCK-8检测结果显示,与oe-control(对照组)相比,oe-LAMP5组在24 h的细胞增殖差异无统计学意义,而在48 h和72 h时细胞增殖显著增加且细胞增殖呈时间依赖性趋势(图4D)。此外,oe-LAMP5组细胞的Ki67的基因表达水平(图4E)和蛋白表达水平(图4F、G)均显著高于对照组。



A: OSCC 临床组织和正常口腔黏膜组织中 LAMP5 的基因表达; B、C: LAMP5 的蛋白表达; D: 细胞 LAMP5 的基因表达水平; E、F: 细胞 LAMP5 的蛋白表达 (×40)。***为 $P < 0.001$; ****为 $P < 0.0001$ 。

图 2 LAMP5 在 OSCC 组织样本和 OSCC 细胞中的表达

Fig 2 The LAMP5 expression in OSCC specimens and OSCC cells

2.5 敲低 LAMP5 对 OSCC 细胞迁移和侵袭的影响

获得迁移和侵袭能力是肿瘤细胞向远处转移的运动基础。Transwell 小室迁移实验结果显示, shLAMP5 组细胞迁移率明显低于对照组 (图 5A、B)。Transwell 小室侵袭实验结果显示, shLAMP5 组发生侵袭的细胞数量明显低于对照组 (图 5A、C)。此外, 因为 3D 细胞比 2D 单层培养系统更能有效的重现体内肿瘤生长的生物学特征, 因此, 笔者构建了 3D 细胞并评估 shLAMP5 对 CAL-27 细胞迁移和侵袭能力的影响。与 2D 细胞 Transwell 迁移和侵袭实验结果一致, shLAMP5 组发生迁移 (图 5D、E) 和侵袭 (图 5F、G) 的细胞数量显著降低。

2.6 过表达 LAMP5 对 OSCC 细胞迁移和侵袭的影响

过表达 LAMP5 (oe-LAMP5 组) 后细胞的迁移效率显著高于对照组 (图 6A、B)。同时, oe-LAMP5 组发生侵袭的细胞数量明显高于对照组 (图 6A、C)。

2.7 调控 LAMP5 的 miRNA 预测结果

miRNA 靶向预测综合分析网站 Target Scan、

miRDB 和 DIANA tool 分析得出与 LAMP5 存在靶向关系的 miRNA 的韦恩图 (图 7A)。miR-302a-3p 与 LAMP5 结合位点预测结果 (图 7B)。

2.8 LAMP5 的表达受到 miR-302a-3p 的调控

qRT-PCR 检测到 CAL-27 细胞中的 miR-302a-3p 表达水平显著低于 Haca1 (图 8A), 且 miR-302a-3p 的表达与 LAMP5 的表达水平负相关 (图 8B)。过表达 miR-302a-3p 明显降低野生型 LAMP5-WT 的荧光素酶活性, 而对突变型 LAMP5-MUT 的荧光素酶活性无明显影响 (图 8C), 说明 miR-302a-3p 能直接靶向作用于 LAMP5。与 NC mimic 组相比, 过表达 miR-302a-3p 明显降低 LAMP5 的基因表达水平 (图 8D) 和蛋白表达水平 (图 8E、F)。

2.9 过表达 LAMP5 对 OSCC 细胞成球能力的影响

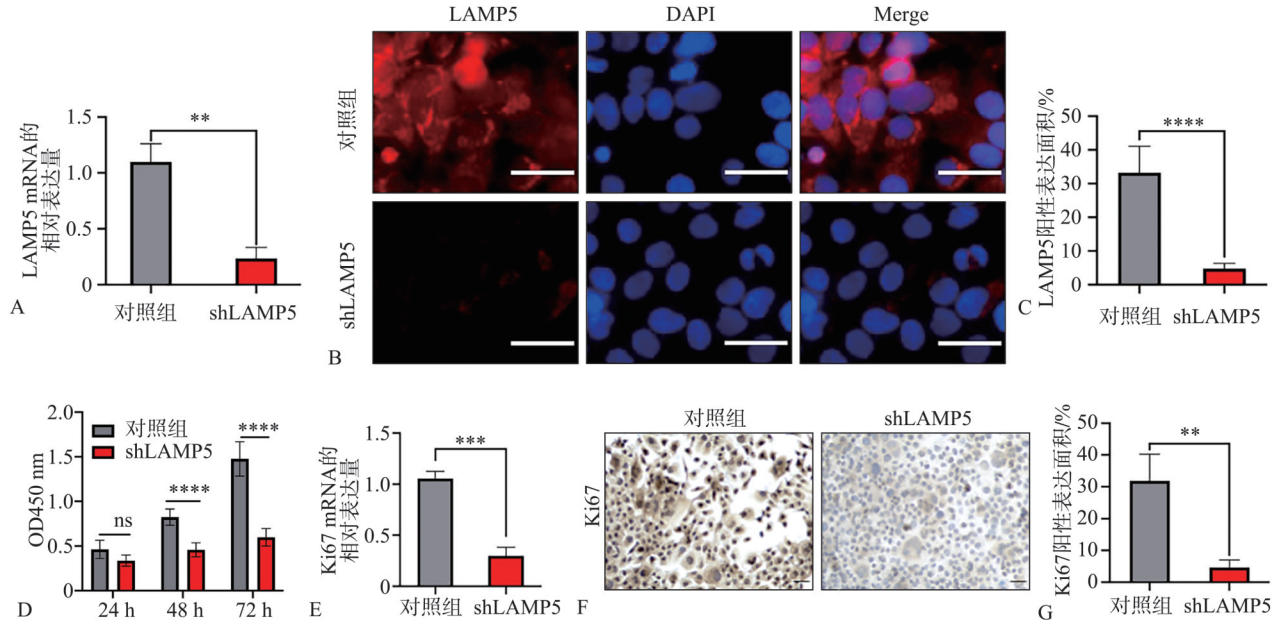
基于构建的 oe-LAMP5 细胞, 肿瘤细胞成球实验发现, 相比对照组, oe-LAMP5 组的细胞成球能力更显著, 具体表现为 24 h 后 oe-LAMP5 组的细胞成球数量明显增多且球体直径更大 (图 9)。

2.10 敲低 LAMP5 对裸鼠体内 OSCC 肿瘤生长的影响

对照组和 shLAMP5 组 2 组裸鼠的体重无明显

差异(图10A)。与对照组相比,shLAMP5组的肿瘤体积和重量明显降低(图10B-E)。HE染色结果显示shLAMP5组的细胞密度降低,空泡结构丰富,出现核碎裂等细胞坏死迹象(图10F)。sh-

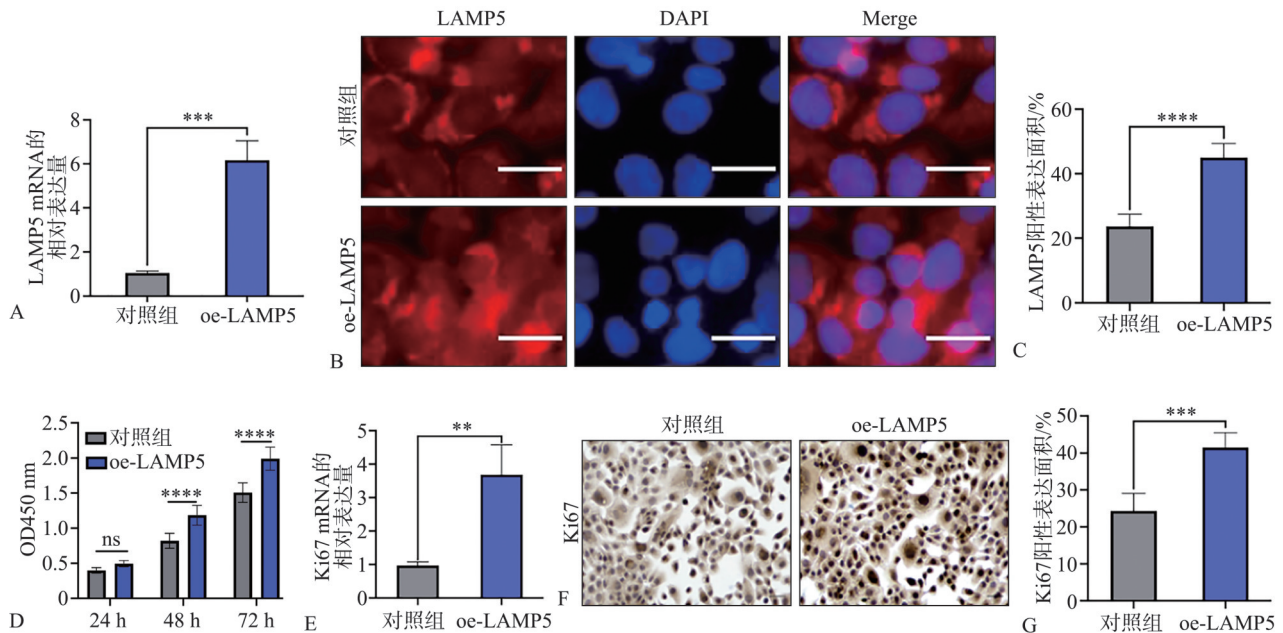
LAMP5组肿瘤组织中Ki67的表达量显著低于对照组(图10G、H)。以上结果表明敲低LAMP5可抑制肿瘤的体内生长。



A: 稳定敲低LAMP5后qRT-PCR检测LAMP5的基因表达; B、C: ICC检测稳定敲低LAMP5后LAMP5的蛋白表达(×40); D: CCK-8细胞增殖水平; E: 增殖基因Ki67的基因表达水平; F、G: 增殖基因Ki67的蛋白表达水平(×20)。sh表示短发卡。ns为P>0.05; **为P<0.01; ***为P<0.001; ****为P<0.0001。

图3 敲低LAMP5对OSCC细胞增殖的影响

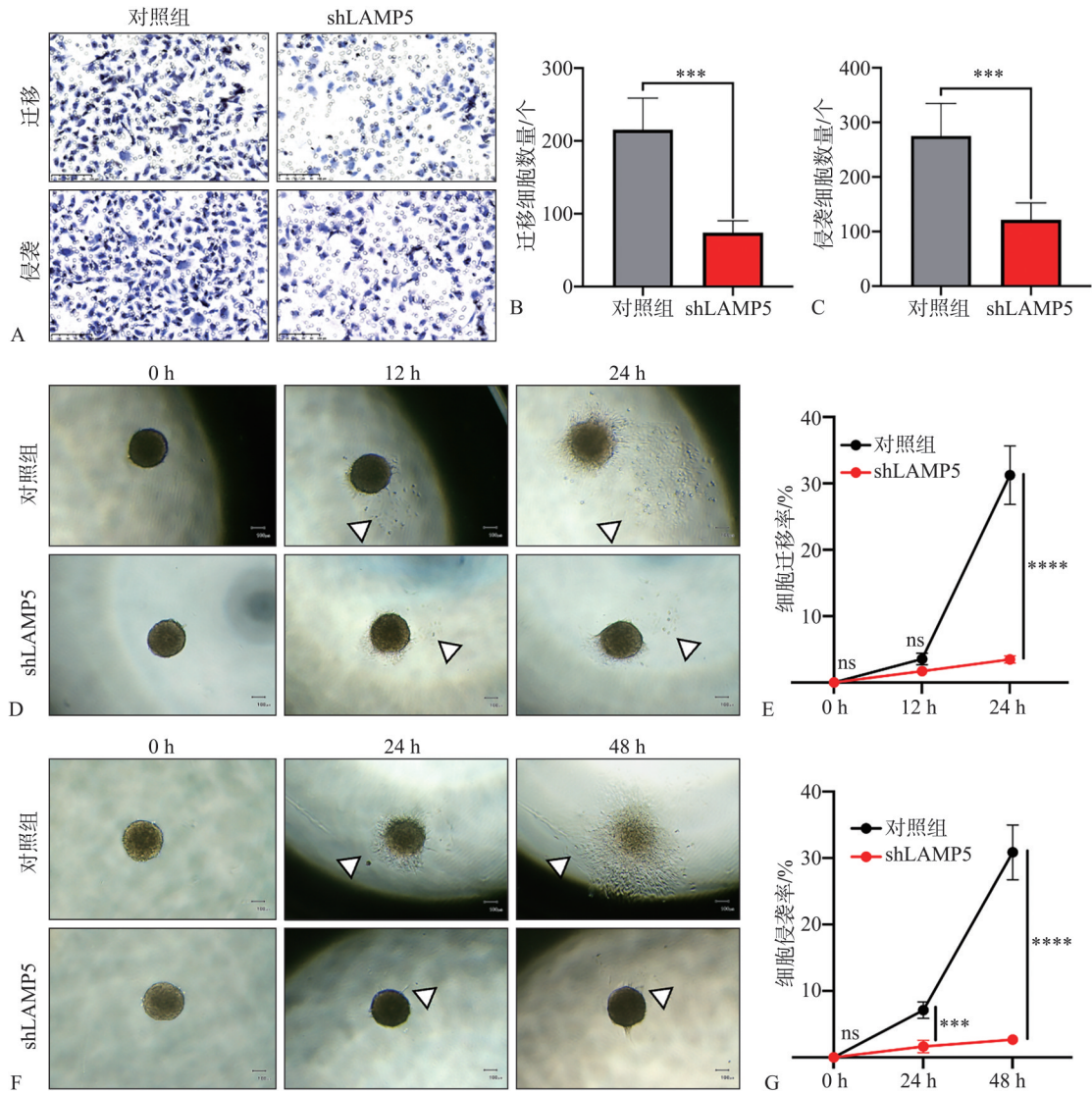
Fig 3 Effect of LAMP5 knockdown on OSCC cell proliferation



A: 过表达LAMP5后qRT-PCR检测LAMP5的基因表达; B、C: ICC检测过表达LAMP5后LAMP5的蛋白表达(×40); D: CCK-8细胞增殖水平; E: Ki67的基因表达水平; F、G: Ki67的蛋白表达水平(×20)。oe表示过表达。ns为P>0.05; **为P<0.01; ***为P<0.001; ****为P<0.0001。

图4 过表达LAMP5对OSCC细胞增殖的影响

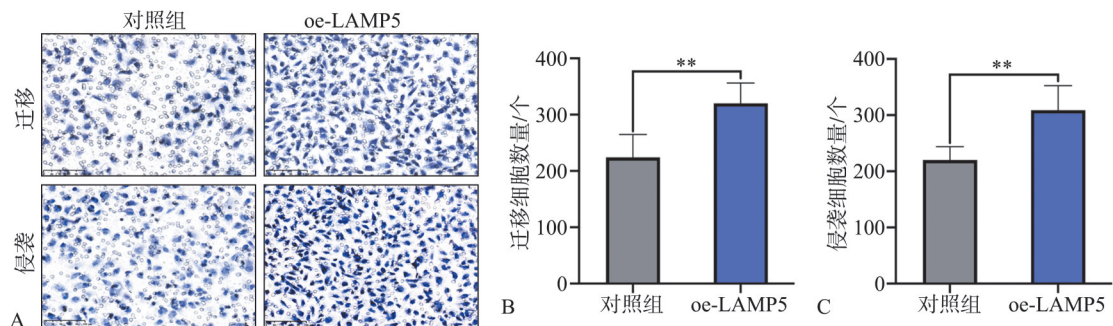
Fig 4 Effect of LAMP5 overexpression on OSCC cell proliferation



A: Transwell 迁移和侵袭实验结果图片 (×20); B: Transwell 迁移实验定量分析结果; C: Transwell 侵袭实验定量分析结果; D: 3D 细胞迁移实验图片 (箭头: 迁移的 CAL-27 细胞) (×4); E: 3D 细胞迁移实验定量分析结果; F: 3D 细胞侵袭实验图片 (箭头: 侵袭的 CAL-27 细胞) (×4); G: 3D 细胞侵袭实验定量分析结果。sh 表示短发卡。ns 为 $P>0.05$; ***为 $P<0.001$; ****为 $P<0.0001$ 。

图 5 敲低 LAMP5 对 OSCC 细胞迁移和侵袭的影响

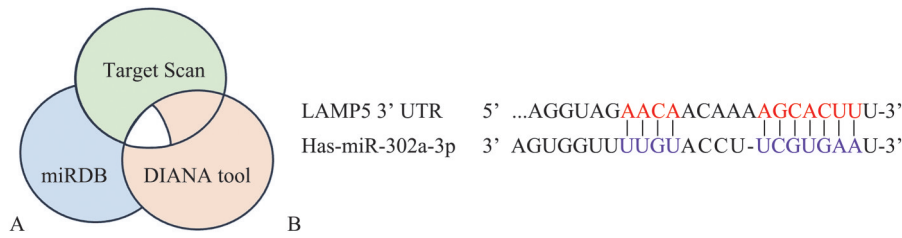
Fig 5 Effect of LAMP5 knockdown on the migration and invasion of OSCC cells



A: Transwell 迁移和侵袭实验结果图片 (×20); B: Transwell 迁移实验定量分析结果; C: Transwell 侵袭实验定量分析结果。oe 表示过表达。**为 $P<0.01$ 。

图 6 过表达 LAMP5 对 OSCC 细胞迁移和侵袭的影响

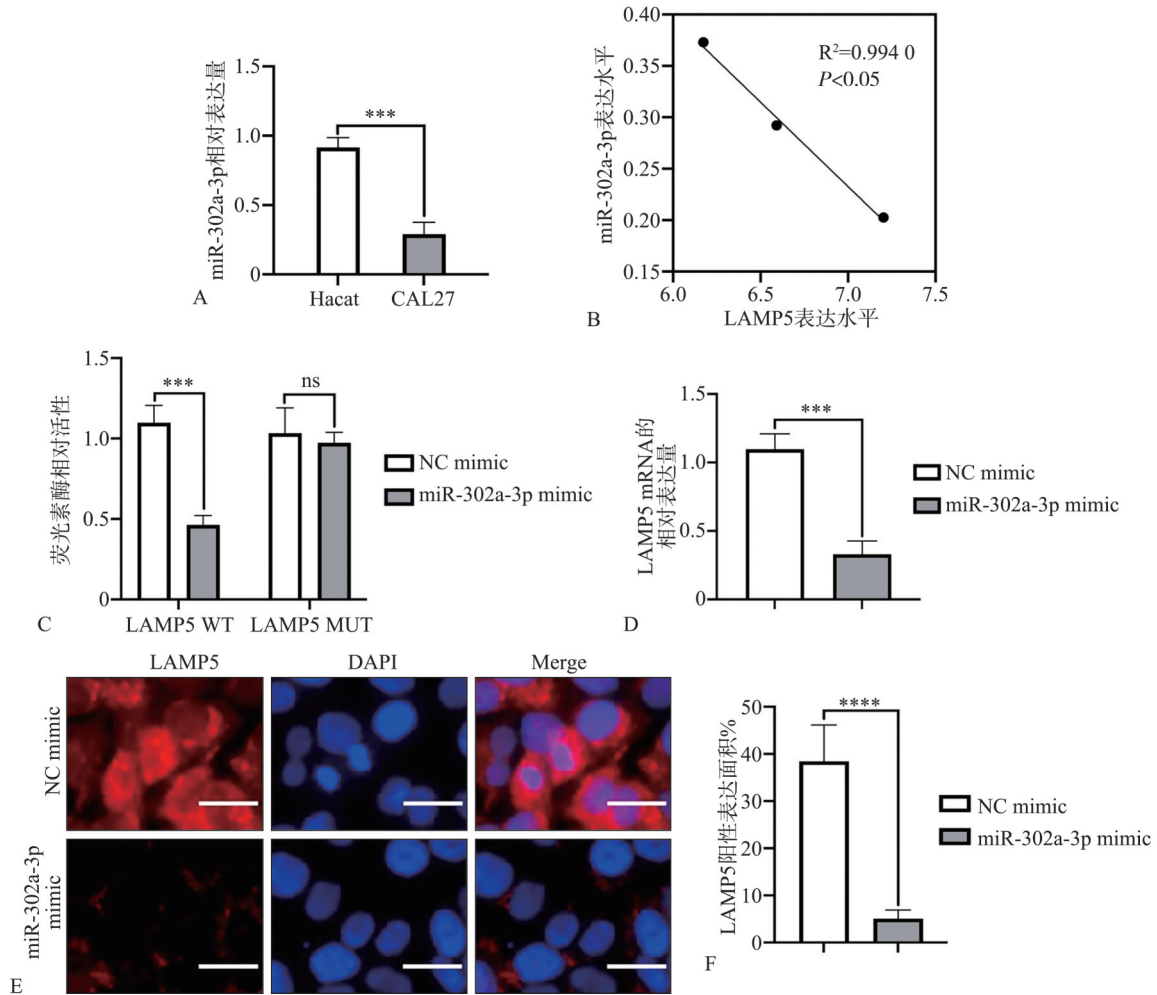
Fig 6 Effect of LAMP5 overexpression on the migration and invasion of OSCC cells



A: miRNA靶向预测韦恩图; B: miR-302a-3p与LAMP5的预测结合位点。

图7 调控LAMP5的miRNA预测结果

Fig 7 Prediction results of miRNA regulating LAMP5



A: miR-302a-3p在Hacat与CAL-27细胞中的表达; B: CAL-27细胞中miR-302a-3p与LAMP5表达的相关性; C: 双荧光素酶验证miR-302a-3p与LAMP5的靶向结合; D: 过表达miR-302a-3p后LAMP5的基因表达; E、F: 过表达miR-302a-3p后LAMP5的蛋白表达水平(×40)。ns为P>0.05; ***为P<0.001; ****为P<0.0001。

图8 LAMP5的表达受到miR-302a-3p的调控

Fig 8 The expression of LAMP5 is regulated by miR-302a-3p

3 讨论

OSCC是恶性程度较高的头颈部肿瘤,可致患者面部畸形、咀嚼困难、吞咽障碍和味觉丧失等症状,严重威胁患者生命健康^[17-18]。肿瘤转移是

OSCC患者主要的死亡原因,占比超过90%^[19-20]。本研究系统性分析了miR-302a-3p/LAMP5信号轴在OSCC进展中的调控机制,并揭示了LAMP5在促进OSCC增殖、迁移和侵袭方面的关键作用。靶向miR-302a-3p/LAMP5信号轴将有望用于控制OSCC的进展和转移。

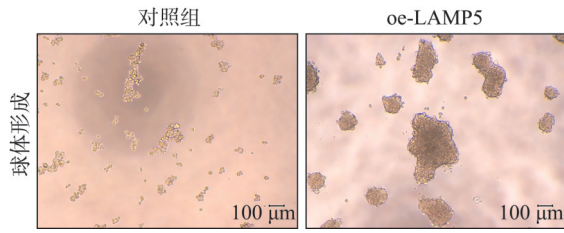


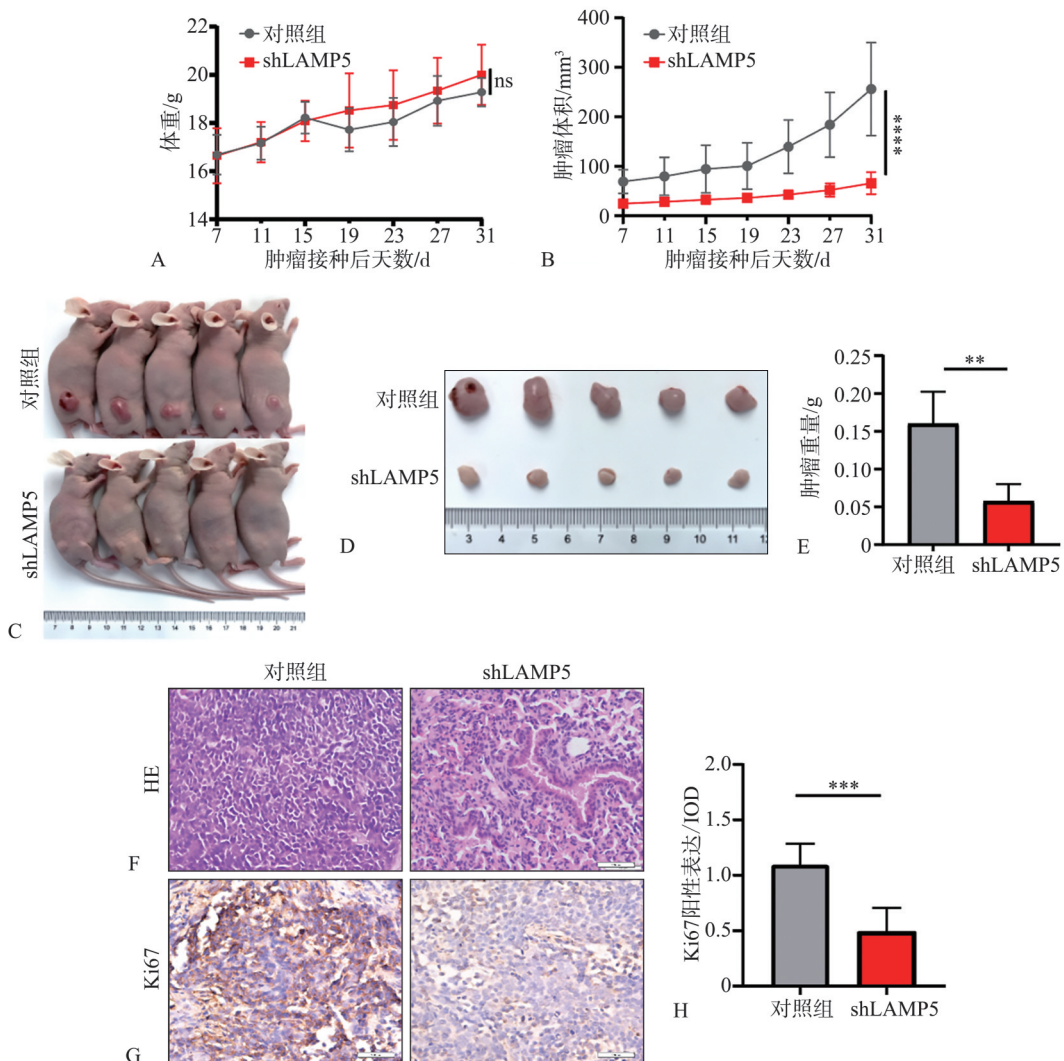
图 9 过表达LAMP5对OSCC细胞成球能力的影响

Fig 9 The effect of LAMP5 overexpression on the sphere formation of OSCC cells

研究^[21]结果指出, LAMP5在多发性骨髓瘤中高表达并且于预后不良相关, 而沉默LAMP5可通过降低P38蛋白的表达诱导细胞凋亡。Umeda等^[9]研究结果发现LAMP5在转移性胃癌组织高表达, 敲低LAMP5通过增加胃癌细胞的凋亡和细胞周期停滞抑制胃癌细胞的增殖, 同时敲低LAMP5可显

著抑制转移性肿瘤的生长。

本研究中, LAMP5在OSCC组织中的表达较正常组织上调, qRT-PCR和ICC显示LAMP5在OSCC细胞中表达升高。敲低或过表达LAMP5后进行增殖、Transwell迁移和侵袭以及3D细胞迁移和侵袭实验, 分别证实了LAMP5促进OSCC细胞增殖、迁移和侵袭的作用。此外, 在本研究的荷瘤鼠模型中, 敲低LAMP5可显著抑制OSCC肿瘤的生长, 本研究结果进一步验证了LAMP5在体内的促癌作用。此外, 本研究细胞和动物实验结果的一致性双重验证了本课题提出的LAMP5作为OSCC促癌基因的假设。本研究结果提示LAMP5可促进肿瘤细胞的增殖, 与LAMP5在其他肿瘤中促细胞增殖的研究结果一致。



A: 裸鼠体重变化曲线; B: 肿瘤体积的变化曲线; C: 裸鼠带瘤图片; D: 移植瘤瘤体图; E: 移植瘤瘤体重量图; F: HE染色图片; G: Ki67 IHC染色图片; H: Ki67 IHC定量分析结果。sh表示短发卡。ns为 $P>0.05$; **为 $P<0.01$; ***为 $P<0.001$; ****为 $P<0.0001$ 。

图 10 敲低LAMP5对裸鼠体内OSCC肿瘤生长的影响

Fig 10 The effect of LAMP5 stable knockdown on OSCC tumor growth in nude mice

miR-302a-3p已被证实参与调控多种肿瘤的恶性进展^[22-23],且与靶基因的异常表达密切相关。miR-302a-3p在肝细胞癌中低表达,过表达miR-302a-3p可抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭,提示miR-302a-3p低表达是预测肝细胞癌患者预后不良的潜在生物标志物^[22]。在人NSCLC中,miR-302a-3p直接与铁转运蛋白的3'UTR结合以抑制其蛋白表达来诱导NSCLC发生铁死亡从而抑制NSCLC的进展^[23]。

本研究发现,LAMP5在促进OSCC进展中的作用受到miR-302a-3p的直接调控。通过miRNA靶向预测综合分析网站预测miR-302a-3p与LAMP5存在结合位点,且双荧光素酶报告实验验证了LAMP5是miR-302a-3p的直接靶基因。过表达miR-302a-3p可显著抑制LAMP5的表达,敲低LAMP5可显著降低OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭,而过表达LAMP5可显著提升OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

综上所述,本研究揭示了miR-302a-3p通过抑制LAMP5的表达影响OSCC增殖、迁移和侵袭的关键作用,提示LAMP5可能是OSCC治疗的新靶点。本研究结果对学习OSCC发生发展中LAMP5的功能提供了一个新的途径,并有望为OSCC治疗提供一个新策略。然而,miR-302a-3p调控LAMP5的分子机制仍有待研究,探索LAMP5参与癌症相关信号通路的作用机理将是未来的研究重点之一。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] 高永强,施鹏伟,师文楷,等.长链非编码RNA HCG22在口腔鳞状细胞癌中的表达及作用机制研究[J].华西口腔医学杂志,2021,39(6):658-666.
Gao YQ, Shi PW, Shi WK, et al. Expression and mechanism of long non-coding RNA HCG22 in oral squamous cell carcinoma[J]. West China J Stomatol, 2021, 39(6): 658-666.
- [2] Arslan Bozdag L, Inan S, Elif Gultekin S. Microsatellite instability and loss of heterozygosity as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma: molecular mechanisms, detection techniques, and therapeutic strategies[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2024, 63(10): e70002.
- [3] Chaudhary AA, Fareed M, Khan SU, et al. Exploring the therapeutic potential of lipid-based nanoparticles in the management of oral squamous cell carcinoma[J]. Explor Target Antitumor Ther, 2024, 5(6): 1223-1246.
- [4] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.
- [5] Zhang JY, Ni ZH, Zhang Y, et al. DAZAP1 phase separation regulates mitochondrial metabolism to facilitate invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2024, 84(22): 3818-3833.
- [6] 丁啸,陈嘉雯,曲鹏宇,等.miR-362-3p调控垂体肿瘤转化基因1抑制口腔鳞状细胞癌侵袭及增殖的研究[J].华西口腔医学杂志,2024,42(1):46-55.
Ding X, Chen JW, Qu PY, et al. miR-362-3p inhibited the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells by targeting the regulation of pituitary tumor-transforming gene 1[J]. West China J Stomatol, 2024, 42(1): 46-55.
- [7] 李欣,裴辰玮,金建秋,等.光动力疗法在口腔鳞状细胞癌中的研究进展[J].中国医学前沿杂志(电子版),2024,16(10):85-91.
Li X, Pei CW, Jin JQ, et al. Research advances in action mechanisms of photodynamic therapy and photosensitizer[J]. Chin J Med Front (Electron Ed), 2024, 16(10): 85-91.
- [8] Alessandrini F, Pezzè L, Ciribilli Y. LAMPs: shedding light on cancer biology[J]. Semin Oncol, 2017, 44(4): 239-253.
- [9] Umeda S, Kanda M, Shimizu D, et al. Lysosomal-associated membrane protein family member 5 promotes the metastatic potential of gastric cancer cells[J]. Gastric Cancer, 2022, 25(3): 558-572.
- [10] 杨书瀚,裴筱涵,祁义军.LAMP5在结直肠癌发生发展和预后中的作用[J].安徽医科大学学报,2022,57(8):1338-1344.
Yang SH, Pei XH, Qi YJ. Expression of LAMP5 in colorectal cancer and its significance in occurrence, development and prognosis[J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(8): 1338-1344.
- [11] Gracia-Maldonado G, Clark J, Burwinkel M, et al. LAMP-5 is an essential inflammatory-signaling regulator and novel immunotherapy target for mixed lineage leukemia-rearranged acute leukemia[J]. Haematologica, 2022, 107(4): 803-815.
- [12] Ždravlević M, Radović A, Raonić J, et al. Advances in mi-

- croRNAs as emerging biomarkers for colorectal cancer early detection and diagnosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(20): 11060.
- [13] 陈卉, 高永泽, 党云, 等. miRNA 在宫颈恶性肿瘤中的意义及其研究进展[J]. *医学理论与实践*, 2024, 37(11): 1839-1842.
- Chen H, Gao YZ, Dang Y, et al. The significance of miRNA in cervical malignancies and its research progress[J]. *J Med Theory Pract*, 2024, 37(11): 1839-1842.
- [14] 任亚丽, 吴伟, 邵建华, 等. miR-302a-3p 在食管鳞癌中的表达及临床意义[J]. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2022, 43(6): 87-93.
- Ren YL, Wu W, Shao JH, et al. Expression and clinical significance of miR-302a-3p in esophageal squamous carcinoma[J]. *J Yangzhou Univ (Agric Life Sci Ed)*, 2022, 43(6): 87-93.
- [15] Chang X, Lin YY, Bai LN, et al. miR-302a-3p suppresses melanoma cell progression via targeting METTL3 [J]. *J Chemother*, 2022, 34(1): 55-66.
- [16] Li J, Li YZ, Sun XD, et al. Silencing lncRNA-DARS-AS1 suppresses non-small cell lung cancer progression by stimulating miR-302a-3p to inhibit ACAT1 expression[J]. *Mol Carcinog*, 2024, 63(4): 757-771.
- [17] Ghanem AS, Memon HA, Nagy AC. Evolving trends in oral cancer burden in Europe: a systematic review[J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1444326.
- [18] Tan YH, Wang ZH, Xu MT, et al. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions[J]. *Int J Oral Sci*, 2023, 15(1): 44.
- [19] Struckmeier AK, Eichhorn P, Agaimy A, et al. Comparison of the 7th and revised 8th UICC editions (2020) for oral squamous cell carcinoma: how does the reclassification impact staging and survival[J]. *Virchows Arch*, 2024, 484(6): 901-913.
- [20] Ganesh K, Massagué J. Targeting metastatic cancer[J]. *Nat Med*, 2021, 27(1): 34-44.
- [21] Chen Y, Ma T. LAMP5 may promote MM progression by activating p38[J]. *Pathol Oncol Res*, 2023, 29: 1611083.
- [22] Ye Y, Song YN, Zhuang JH, et al. microRNA-302a-3p suppresses hepatocellular carcinoma progression by inhibiting proliferation and invasion[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 8175-8184.
- [23] Wei D, Ke YQ, Duan P, et al. microRNA-302a-3p induces ferroptosis of non-small cell lung cancer cells via targeting ferroportin[J]. *Free Radic Res*, 2021, 55(7): 821-830.

(本文编辑 洪潇)

《口腔种植临床解剖学》出版发行

书籍名称：口腔种植临床解剖学

主编：邹多宏

出版社：辽宁科学技术出版社

内容简介：口腔种植学是近几十年中世界口腔医学领域里发展较快的一个专业。临床上，只有准确把握颌面部解剖学细节，才能够避免对神经、血管等周围组织造成不必要的损伤，提高手术的精准性。掌握颌面部与临床种植相关口腔解剖结构，并深刻理解解剖结构及其空间关系，是每一位口腔种植医生都需要面临的问题。本书基于对头颅颌面部的解剖结构记录，立足于剖析口腔临床种植技术的角度，遵循临床诊疗思路，描述了颌面部骨骼、神经、肌肉组织及其他重要解剖结构的临床解剖学特征。本书共有解剖原图照片 1 600 余张，配合示意图简洁明了地对口腔种植临床解剖的要点及种植操作进行解释说明，使读者可以直观地了解其中的细节。同时本书还探讨了多种复杂手术方式的相关解剖结构，并进行种植示教，帮助读者更好地理解手术过程、效果和潜在风险，从而提高对手术的信心。

