

沉默 Ras 同源物家族成员 C 对唾液腺腺样囊性癌增殖、侵袭和迁移的影响

于汶源^{1,2} 赵鹏² 邵禹¹ 徐勇³ 徐进³ 谢磊⁴ 于承浩⁴ 何秋萍⁴ 陈正岗^{3,5}

1. 山东第二医科大学口腔医学院, 潍坊 261053;

2. 康复大学青岛医院(青岛市市立医院)口腔科, 青岛 266071;

3. 滨州医学院口腔医学院, 烟台 264000;

4. 青岛大学青岛医学院, 青岛 266073;

5. 滨州医学院附属烟台口腔医院, 烟台 264000

[摘要] **目的** 探讨沉默 Ras 同源物家族成员 C (RhoC) 对唾液腺腺样囊性癌 (SACC) 增殖、凋亡、侵袭、迁移和上皮-间充质转化 (EMT) 的影响及其分子机制。**方法** 选择 2019 年 1 月 1 日—2024 年 3 月 1 日于青岛市市立医院手术切除的 SACC 病灶和正常唾液腺组织各 27 例, 通过蛋白免疫印迹 (Western blot) 和免疫组织化学法检测 RhoC 的表达水平。针对 RhoC 基因序列设计 3 条小干扰 RNA (siRNA), 转染至 SACC-LM 和 SACC-83 细胞系中并评估转染效率。通过 Western blot 比较 RhoC、Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 1 (ROCK1)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK)、磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK)、扭曲家族 bHLH 转录因子 1 (TWIST1)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 的蛋白表达水平。CCK-8 实验、流式细胞术、Transwell 侵袭实验、伤口愈合实验分别检测各组细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移能力的差异。生物信息学方法预测 RhoC 可能的上游微小 RNA (miRNA) 及其在 SACC 中的表达情况, 双荧光素酶报告基因实验验证二者的结合位点。**结果** RhoC 在 SACC 中的表达显著上升 ($P<0.05$)。沉默 RhoC 后, 实验组 ROCK1、p-p38MAPK、TWIST1、N-cadherin、Vimentin 的表达显著下降, E-cadherin 的表达显著上升 ($P<0.05$); p38MAPK 的表达无明显差异 ($P>0.05$); 细胞增殖、侵袭和迁移能力显著下降, 凋亡率显著上升 ($P<0.05$)。miR-138-5p 在 SACC 中低表达, miR-138-5p mimic 可以显著下调转染 RhoC 野生型质粒后 293T 细胞的荧光素酶活性 ($P<0.05$)。**结论** RhoC 在 SACC 中高表达, 沉默 RhoC 可能靶向下游 ROCK1/p38MAPK/TWIST1 信号通路从而抑制 SACC 的增殖、侵袭、迁移和 EMT, 同时促进其凋亡。miR-138-5p 在 SACC 中低表达, 是 RhoC 潜在的上游基因, 二者可能存在结合位点。

[关键词] 唾液腺腺样囊性癌; Ras 同源物家族成员 C; Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 1; 上皮-间充质转化; miR-138-5p

[中图分类号] R782 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2024092



本文链接 开放科学标识码

Effect of silencing Ras homolog family member C on proliferation, invasion, and migration of salivary adenoid cystic carcinoma

Yu Wenyuan^{1,2}, Zhao Peng², Shao Yu¹, Xu Yong³, Xu Jin³, Xie Lei⁴, Yu Chenghao⁴, He Qiuping⁴, Chen Zhenggang^{3,5}

1. School of Stomatology, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China; 2. Dept. of Stomatology, Qingdao Hospital, University of Health and Rehabilitation Sciences (Qingdao Municipal Hospital), Qingdao 266071, China;

3. Institute of Stomatology, Binzhou Medical University, Yantai 264000, China; 4. Qingdao Medical College of Qingdao University, Qingdao 266073, China; 5. The Affiliated Yantai Stomatological Hospital, Binzhou Medical University, Yantai 264000, China

[收稿日期] 2024-03-15; **[修回日期]** 2024-09-14

[基金项目] 山东省医药卫生科技项目 (202308020420)

[作者简介] 于汶源, 住院医师, 硕士, E-mail: 1344634661@qq.com

[通信作者] 陈正岗, 教授, 博士, E-mail: chenzhg1973@163.com

Supported by: Medical and Health Science and Technology Project of Shandong Province (202308020420)

Correspondence: Chen Zhenggang, E-mail: chenzhg1973@163.com

[Abstract] Objective This study aimed to investigate the effects of silencing Ras homolog family member C (RhoC) on the proliferation, apoptosis, invasion, migration, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of salivary adenoid cystic carcinoma (SACC) and its molecular mechanisms. **Methods** A total of 27 SACC lesions and normal salivary gland tissues that were surgically resected at Qingdao Municipal Hospital from January 1, 2019 to March 1, 2024 were selected, and the expression levels of RhoC were detected by Western blot and immunohistochemistry. Three small interfering RNA (siRNAs) were designed to target the RhoC gene sequence, transfected into SACC-LM and SACC-83 cell lines, and evaluated for transfection efficiency. The protein expression levels of RhoC, Rho-associated protein kinase-1 (ROCK1), p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), phosphorylated-p38MAPK (p-p38MAPK), twist family bHLH transcription factor 1 (TWIST1), E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin were compared using Western blot. CCK-8 assay, flow cytometry, transwell invasion assay, and wound healing assay were conducted to assess the differences in cell proliferation, apoptosis, invasion, and migration abilities among the groups. Bioinformatics methods were also used to predict possible upstream micro RNAs (miRNAs) of RhoC and their expression levels in SACC. Moreover, dual-luciferase reporter gene experiments were performed to verify the binding sites of miR-138-5p and RhoC. **Results** RhoC was highly expressed in SACC ($P<0.05$). After silencing RhoC, the test group showed a significant decrease in the expression level of ROCK1, p-p38MAPK, TWIST1, N-cadherin, and Vimentin, as well as a significant increase in the expression level of E-cadherin ($P<0.05$). No significant difference in the expression level of p38MAPK was observed ($P>0.05$). The cell proliferation, invasion, and migration ability decreased in the test group, whereas the apoptosis rates significantly increased ($P<0.05$). miR-138-5p was lowly expressed in SACC, and miR-138-5p mimic can significantly downregulated the luciferase activity of 293T cells after transfection with a RhoC wild-type plasmid ($P<0.05$). **Conclusion** RhoC is highly expressed in SACC, and RhoC silencing may target the downstream ROCK1/p38MAPK/TWIST1 signaling pathway, thereby inhibiting the proliferation, invasion, migration, and EMT of SACC while promoting its apoptosis. On the contrary, miR-138-5p is lowly expressed in SACC and is a potential upstream gene of RhoC, and there may be binding sites between the two genes.

[Key words] salivary adenoid cystic carcinoma; Ras homolog family member C; Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1; epithelial-mesenchymal transition; miR-138-5p

唾液腺腺样囊性癌 (salivary adenoid cystic carcinoma, SACC) 是一种常见的上皮来源的恶性肿瘤, 占唾液腺恶性肿瘤的10%, 占头颈部恶性肿瘤的1%^[1]。该肿瘤具备高度神经浸润性、极易远处转移等恶性标志, 发生远处转移时10年总生存率可骤降52%^[2]。目前对于SACC的治疗方法是手术为主的综合序列治疗, 但难以抑制肿瘤的扩散和复发。因此, 探究SACC进展的分子机制并加以干预具有重要的临床意义。

Ras同源物家族成员C (Ras homolog family member C, RhoC) 是一种常见的致癌基因, 该基因编码的RhoC蛋白属于Rho GTP酶家族, 可在三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 和二磷酸鸟苷 (guanosine diphosphate, GDP) 结合态之间切换, 调节细胞骨架, 影响肌动蛋白和肌球蛋白活性, 从而调控细胞运动、极性和分裂等多种

功能^[3-4]。近年来多项研究证实, RhoC既可影响Rho相关蛋白激酶 (Rho-associated protein kinases, ROCK) 和丝切蛋白 (cofilin, CFL) 等下游信号来促进肿瘤的侵袭和迁移^[3-5], 同时又受到miR-106b、miR-93等上游基因的调控^[6]。本课题组既往研究^[7]证实该家族成员RhoA可促进SACC的恶性生物学行为, 但有关RhoC对SACC影响的研究仍然较少。

本研究通过体外实验观察RhoC在SACC中的表达情况, 采用小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 将其沉默后观察下游信号和SACC增殖、凋亡、侵袭、迁移及上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的改变, 同时通过生物信息学方法预测RhoC可能的上游微小RNA (micro RNA, miRNA), 以期对SACC的分子靶向治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 组织样本

液氮冻存的SACC标本及正常唾液腺组织各6例来自2024年1月1日—3月1日于青岛市市立医院口腔颌面外科行手术切除的6名患者。其中5例来自腮腺,1例来自腭腺。患者年龄为41~74岁,中位数为61岁;男4例,女2例。免疫组化所需SACC石蜡组织切片及正常唾液腺组织各21例,取自2019年1月1日—2024年3月1日于青岛市市立医院病理科明确诊断的21名SACC患者。其中14例来自腮腺,4例来自腭腺,3例来自舌下腺。患者年龄为41~81岁,中位数为66岁;男12例,女9例。纳入标准:1)手术切除原发灶;2)术前未经放化疗;3)肿瘤组织经组织病理学诊断为SACC;4)正常唾液腺组织经组织病理学检查未见癌变。排除标准:1)原发灶已行放化疗或其他非手术治疗;2)既往有恶性肿瘤病史或全身伴随其他恶性肿瘤;3)严重糖尿病、肾衰竭或其他系统性疾病,全身情况差,无法耐受手术者;4)临床及病理资料不完整者。本研究已得到青岛市市立医院伦理委员会审核批准(批准号:2024-LW-023),所有患者均已知晓手术风险与标本用途,并签署知情同意书。

1.1.2 细胞系

人SACC-LM细胞系购自武汉尚恩生物技术有限公司;人SACC-83细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司;人胚胎肾细胞293(HEK293T)购自美国模式培养物集存库。

1.1.3 其他材料

RPMI-1640培养基、青-链霉素、0.25%胰蛋白酶(Thermo Fisher公司,美国);胎牛血清(BI公司,以色列);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Amersco公司,美国);SteadyPure通用型RNA提取试剂盒、EvO M-MLV反转录预混型试剂盒、SYBR GreenPro Taq HS预混型实时定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司);siRNA-RhoC(上海吉玛公司);引物磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)、RhoC(上海生工生物工程有限公司);抗RhoC、抗Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶1(Rho-associated coiled-coil containing

protein kinase 1, ROCK1)、抗p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38-MAPK)、抗磷酸化p38MAPK(p-p38MAPK)、抗GAPDH(Cell Signaling Technology公司,美国);抗扭曲家族bHLH转录因子1(twist family bHLH transcription factor 1, TWIST1)、抗E-钙黏蛋白(E-cadherin)、抗N-钙黏蛋白(N-cadherin)、抗波形蛋白(Vimentin)、辣根过氧化物酶二抗(Abcam公司,英国);CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);流式细胞术试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);Transwell小室(Corning公司,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 SACC细胞培养

将SACC-LM和SACC-83细胞置于含10%胎牛血清和1%青-链霉素的4 mL RPMI-1640培养基中,并于37 °C、5%CO₂的恒温培养箱中培养。细胞密度达80%~90%后,弃原培养液,PBS冲洗,加入2 mL胰酶消化3 min后,加入等体积完全培养基终止消化,1 000 r/min离心5 min后,弃上清液,加入完全培养基重悬成单细胞悬液,最后以1:3比例传代。

1.2.2 RhoC在SACC中的表达测定

向分别盛放有6例SACC标本和正常唾液腺组织的研钵中加入液氮并反复研磨直至均匀,粉末置于1.5 mL无菌EP管并于-80 °C下保存,提取总蛋白后采用Western blot检测RhoC在SACC标本和正常唾液腺组织中的表达。采用一步法配胶,上样量每孔5 μL,Marker 2.5 μL。120 V电泳时间1 h,400 mA转膜时间30 min,TBST洗膜3次后5%脱脂牛奶封闭。加入一抗4 °C孵育过夜,TBST洗膜3次,加入二抗室温摇床孵育1 h。TBST洗膜3次后显影,拍照并分析灰度值。以GAPDH为内参,RhoC抗体配制浓度为1:1 000,GAPDH抗体配制浓度为1:5 000。将免疫组化所需的SACC标本和正常唾液腺组织各21例蜡块于实验前一日进行切片、烘片。实验当日脱蜡后采用乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)修复液修复,过氧化物阻断剂阻断10 min,PBS清洗,5%山羊血清封闭15~20 min,加入RhoC一抗(配制浓度1:400)于37 °C恒温箱处理1 h,PBS清洗3次后加入PV-6000二抗避光处理20 min,加入DAB显色液,苏木素染色细胞核,脱水并封片。显微镜下统计着色率和着色强度,RhoC以细胞核和(或)细胞质出现黄色或棕褐色为阳性表达。

统计着色率时, 0~5%记0分, 6%~25%记1分, 26%~50%记2分, 51%~75%记3分, 76%~100%记4分。统计着色强度时, 不着色记0分, 淡黄色记1分, 黄色记2分, 棕褐色记3分。将着色率与着色深度得分相加, 总和0~1分记为阴性(-), 2~3分记为弱阳性(+), 4~5分记为阳性(++), 6~7分记为强阳性(+++)。其中弱阳性、阳性和强阳性均视为阳性。

1.2.3 转染 siRNA 及效率测定

根据 RhoC 基因序列设计 3 条 siRNA 和 1 条阴性对照 (表 1)。严格按照说明书进行操作, 于转染实验前 24 h 将处于对数生长期且适量传代的 SACC 细胞以密度为 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板。待细胞生长至 60%~80% 时开始转染。取 1.5 mL 无菌 EP 管 2 支, 分别加入 200 μ L RPMI-1640 无血清培养基, 再分别加入 GP-transfect-Mate 转染试剂和 RNA oligo 各 7.5 μ L, 静置 5 min 后, 将 GP-transfect-Mate 培养基混合物滴加至 RNA oligo 培养基混合物中, 再次静置 15~20 min 后, 立刻转染。6 孔板每孔采用 PBS 冲洗后, 加入上述转染试剂混合物与 1 585 μ L RPMI-1640 完全培养基, 至反应终体系为 2 000 μ L, RNA oligo 终浓度为 $75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。恒温培养箱培养 24 h 后, RT-qPCR 测 RhoC 的表达水平。使用 SteadyPure 通用型 RNA 提取试剂盒于各组细胞中提取总 RNA, 去除基因组 DNA 并以紫外分光光度仪检测 RNA 纯度及浓度后, 采用 EvO M-MLV 反转录预混型试剂盒行逆转录, 各组均取 2 μ L 互补 DNA 为模板, SYBR GreenPro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒处理后行扩增。每组设置 3 个孔, 实验重复 3 次。以 GAPDH 为内参。RhoC 上游引物序列为 5'-AAGTTCCTTTGCCCGTCTG-3', 下游引物序列为 5'-ACAGTGGCAACTCAAGGGTC-3'; GAPDH 上游引物序列为 5'-TGAAATGTGACCGCACCAAG-3', 下游引物序列为 5'-GGGAAGCAGCATTTCAGGTCT-3'。PCR 程序设置: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 40 个循环。反应结束后, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较转染后各组细胞中 RhoC mRNA 的表达差异。选择沉默效率最高的组别作为实验组 (siRNA-RhoC), 同时设置阴性对照组和空白对照组, 分别转染 siRNA-NC 基因和只加入转染试剂, 进行后续细胞学实验。

1.2.4 Western blot 检测 RhoC 下游信号通路及 EMT 相关蛋白的表达

各组细胞经 RIPA 裂解液处理后提取总蛋白, 使用 BCA 法测定蛋白浓度后测定 RhoC 下游 RO-

CK1/p38MAPK/TWIST1 信号通路及 EMT 相关蛋白的相对表达量, 方法同 1.2.2。ROCK1、p38MAPK、p-p38MAPK、TWIST1、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 抗体配制浓度为 1 : 1 000; GAPDH 为 1 : 5 000。

表 1 RhoC 的 siRNA 序列

Tab 1 Sequences of siRNA of RhoC

| siRNA | 序列 |
|---------------|---------------------|
| siRNA-RhoC 1# | GUGCCUUUGGCUACCUUGA |
| siRNA-RhoC 2# | CTACTGTCTTTGAGAACTA |
| siRNA-RhoC 3# | GACTGCTGTAGGCCTTCTT |
| siRNA-NC | UUCUUCGACGUGUCACGU |

1.2.5 CCK-8 实验检测细胞增殖能力

沉默目的基因 24 h 后, 以 1.5×10^3 个/孔细胞密度将 SACC-LM 和 SACC-83 接种于 96 孔板, 同时设置对照组仅加入培养液消除其对光密度 (optical density, OD) 值的影响。在避光环境下以 10% CCK-8 染色剂和 90% RPMI-1640 培养基配制反应液。在接种 0、24、48、72 h 后分别加入上述孔板并于培养箱中培养 2 h。通过酶标仪检测波长 450 nm 的 OD 值, 每组设 5 个孔, 实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

沉默目的基因 24 h 后, 加入胰酶消化, PBS 冲洗后重悬并调整细胞密度为 5×10^5 个/mL。取 1 mL 细胞悬液, 300 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 500 μ L 稀释的 Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。细胞悬液中加入 5 μ L Annexin V-FITC Reagent 和 5 μ L PI Reagent (50 μ g/mL)。涡旋混匀后, 室温避光孵育 15~20 min, 立即上机检测, 实验重复 3 次。

1.2.7 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

将基质胶置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜解冻并与预冷的 RPMI-1640 基础培养基以 1 : 8 比例配制。取 60 μ L 基质胶垂直均匀加入上室, 避免产生气泡和贴壁, 培养箱中孵育 3 h 后聚合成膜, 弃上室余液。上下室每孔加入 500 μ L RPMI-1640 基础培养基后, 培养 2 h 使膜水化。转染后 24 h 取各组细胞, 以 RPMI-1640 无血清培养基调整细胞密度为 2.5×10^5 个/mL, 下室加入 600 μ L 含 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 上室加入 200 μ L 上述细胞悬液并培养 48 h。弃上下室液体, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, PBS 冲洗, 棉棒轻擦上室。随机选取 5 个区域显微镜下拍照, 计算穿膜细胞数量, 实验重复 3 次。

1.2.8 伤口愈合实验检测细胞迁移能力

沉默目的基因24 h后,将SACC-LM及SACC-83细胞以 5×10^5 个/孔接种于6孔板,待细胞密度达80%~90%时,用同一支1 000 μ L移液枪头垂直孔板底部按直线划痕。PBS冲净划下细胞,每孔加入2 mL RPMI-1640基础培养基,以消除细胞增殖对实验的影响。而后分别于培养后0、24、48 h在倒置显微镜下观察各组细胞迁移情况,每组取上、中、下3个视野,实验重复3次。使用Image J软件进行测量并记录各组细胞的相对愈合率。计算公式:相对愈合率=(0 h划痕宽度-24 h或48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度。

1.2.9 生物信息学预测SACC中RhoC的上游miRNA

从美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中GEO(Gene Expression Omnibus)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库下载包含SACC患者miRNA表达数据的GSE59700和GSE117275数据集。使用RNA相互作用数据库(Encyclopedia of RNA interactomes, ENCORI, Starbase)(<https://rnasysu.com/encori/>)、miRNA靶向预测综合分析网站(miRmap)(<https://mirmap.ezlab.org>)查询与RhoC可能存在靶向关系的miRNA,与上述数据库取交集并绘制韦恩(Venn)图。选择差异明显($|\log FC| > 1$, $P < 0.05$)且miRmap score较高者绘制火山图。使用ENCORI预测RhoC与上游miRNA的结合位点。

1.2.10 双荧光素酶报告基因实验验证RhoC与上游miRNA的结合位点

针对ENCORI预测的结合位点设计报告基因质粒。将293T细胞以 1×10^5 个/孔接种于24孔板,每组设置3个孔,实验重复3次。实验分4组:1) RhoC野生型报告基因质粒+miR-138-5p mimic; 2) RhoC野生型报告基因质粒+miR-138-5p mimic对照; 3) RhoC突变型报告基因质粒+miR-138-5p mimic; 4) RhoC突变型报告基因质粒+miR-138-5p mimic对照。各组细胞分别于无血清RPMI-1640中共转染,转染6 h后更换完全培养基。转染48 h后,弃液,PBS冲洗。每孔加入100 μ L Passive Lysis Buffer裂解液处理15 min。裂解液收集至1.5 mL EP管中,12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心1 min,上清液收集至新EP管中。不透光96孔板中加入100 μ L LAR II,再加入20 μ L裂解上清液,混匀后测量Firefly luciferase值为报告基因发光值。加入100 μ L Stop &

Glo Reagent,混匀后测定记录Renilla luciferase值为内参。

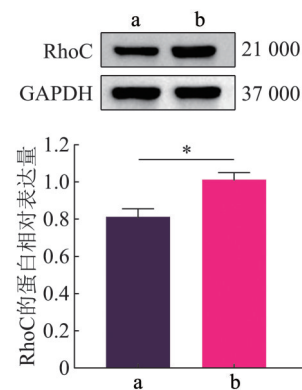
1.3 统计学分析

使用SPSS 18.0及GraphPad Prism 8.0分析各组结果。K-S检验(Kolmogorov-Smirnov test)对正态性进行评估,同时使用莱文检验(Levene test)检验方差齐性。计量资料符合正态分布者用均数 \pm 标准差表示,采用方差分析(ANOVA)进行多组间比较;方差齐者选择LSD-*t*检验行进一步的两两比较,方差不齐者则选用Games-Howell法。符合偏态分布者用M(P25, P75)表示,选择Kruskal-Wallis *H*检验进行多组间比较,进一步比较选择用Bonferroni校正的Mann-Whitney *U*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RhoC在SACC中的表达

Western blot结果显示:RhoC在6例SACC中的蛋白相对表达量显著高于6例正常唾液腺组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图1)。免疫组化结果显示:RhoC主要表达在细胞浆,在SACC中的阳性表达率为66.67%(14/21),显著高于正常唾液腺组织的28.57%(6/21),差异具有统计学意义($P < 0.05$,图2)。由此说明,RhoC在SACC中过表达。



a: 正常唾液腺组织; b: SACC。*: $P < 0.05$ 。

图1 RhoC在SACC和正常唾液腺组织中的蛋白表达水平

Fig 1 Protein expression levels of RhoC in SACC and normal salivary gland tissues

2.2 siRNA的转染效率

qRT-PCR结果显示:在SACC-LM与SACC-83两种细胞系中,与空白对照组和阴性对照组相比,转染后siRNA-RhoC 1#组、siRNA-RhoC 2#组和siRNA-RhoC 3#组RhoC mRNA相对表达量均显著

降低，差异具有统计学意义 ($P<0.05$ ，图3)。同时空白对照组和阴性对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$ ，图3)，由此说明转染成功。其中 siRNA-RhoC 3#组转染效率最高，选择为实验组进行后续研究。

2.3 RhoC下游信号通路相关蛋白的表达

Western blot结果显示：在 SACC-LM 与 SACC-83 两种细胞系中，与空白对照组和阴性对照组相比，转染后 RhoC、ROCK1、p-p38MAPK、TWIST1 的蛋白相对表达量显著下降，差异具有统计学意义 ($P<0.05$ ，图4)；p38MAPK 的蛋白相对表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$ ，图4)。同时空白对照组和阴性对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$ ，图4)。由此说明，沉默 RhoC 可能抑制其下游 ROCK1/p38MAPK/TWIST1 信号通路而对 SACC

恶性行为产生影响。

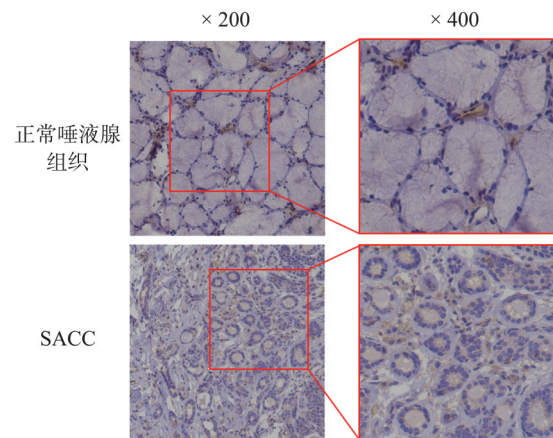


图2 SACC和正常唾液腺组织中RhoC的免疫组化染色结果

Fig 2 Immunohistochemical staining results of RhoC in SACC and normal salivary gland tissues

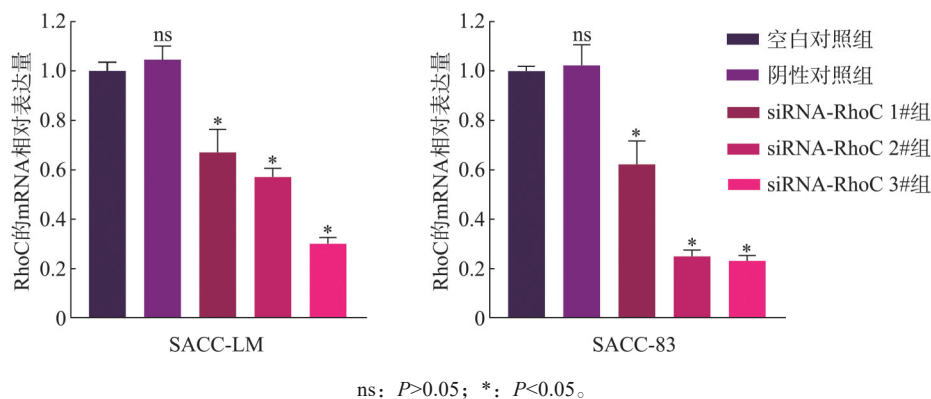
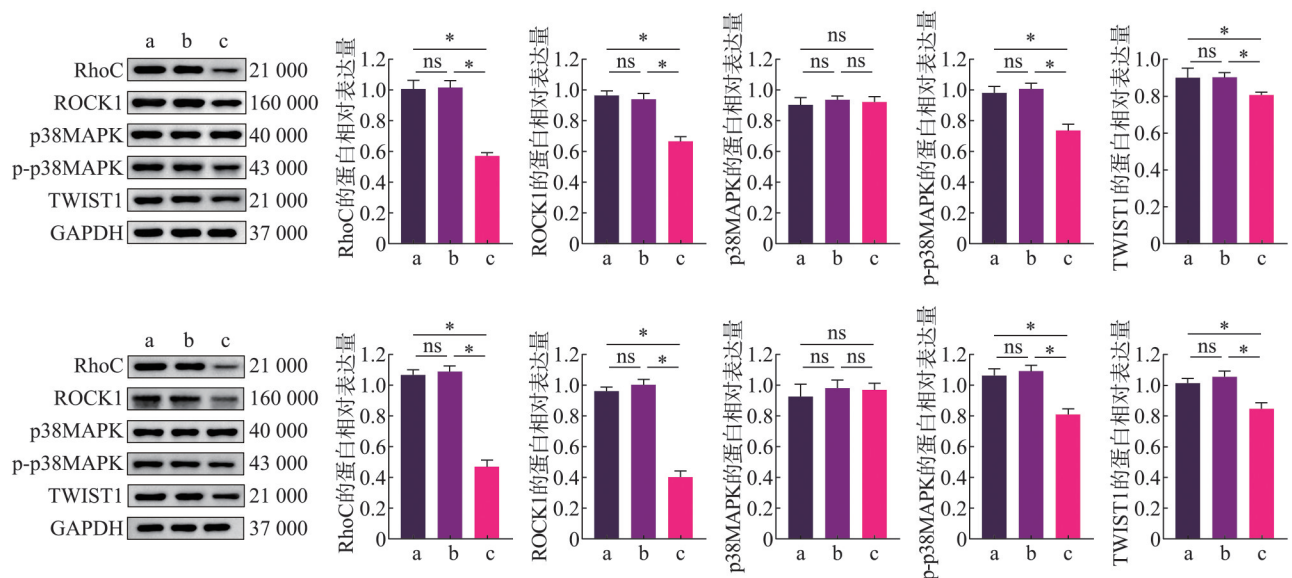


图3 两种细胞系中转染效率的比较

Fig 3 Comparison of transfection efficiency in two cell lines



上：SACC-LM；下：SACC-83。a：空白对照组；b：阴性对照组；c：实验组。ns： $P>0.05$ ；*： $P<0.05$ 。

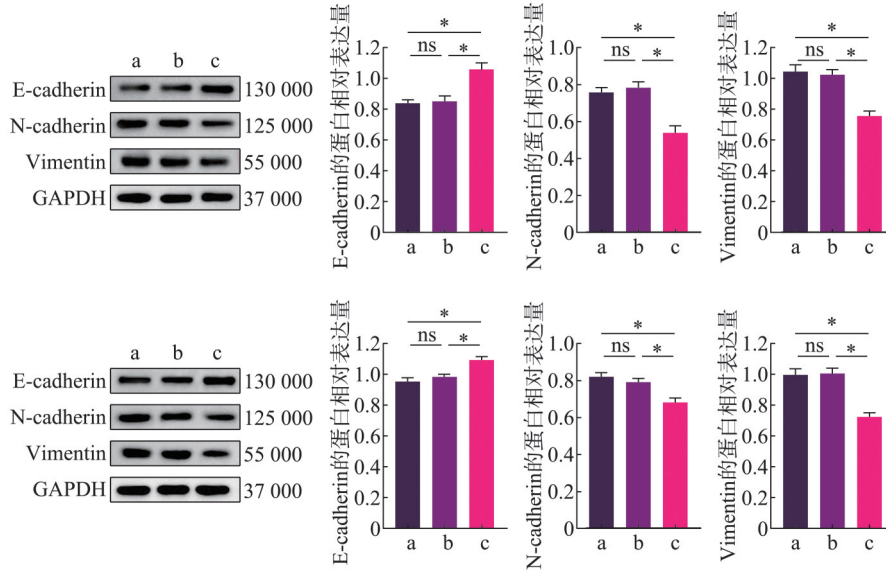
图4 转染后RhoC下游信号通路蛋白表达水平

Fig 4 Protein expression levels of RhoC downstream signaling pathways after transfection

2.4 EMT相关蛋白的表达

Western blot结果显示: 在SACC-LM与SACC-83两种细胞系中, 与空白对照组和阴性对照组相比, 转染后N-cadherin、Vimentin的蛋白相对表达量显著下降, E-cadherin的蛋白相对表达量显著上

升, 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$, 图5)。同时空白对照组和阴性对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图5)。由此说明, 沉默RhoC可显著抑制SACC的EMT水平。



上: SACC-LM; 下: SACC-83。a: 空白对照组; b: 阴性对照组; c: 实验组。ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$ 。

图5 转染后EMT相关蛋白表达水平

Fig 5 Protein expression levels of EMT after transfection

2.5 沉默RhoC对SACC增殖的影响

CCK-8实验结果显示: 在SACC-LM和SACC-83中, 接种0 h后, 实验组的OD值与空白对照组和阴性对照组的OD值相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 接种24、48、72 h后, 实验组的OD值

均显著低于空白对照组和阴性对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 表2)。同时空白对照组和阴性对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表2)。由此说明, 沉默RhoC可显著抑制SACC的增殖能力。

表2 转染后CCK-8实验结果

Tab 2 CCK-8 results after transfection

| 项目 | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | |
|---------|-------|-----------|-------------|-------------|-------------|
| SACC-LM | 空白对照组 | 0.59±0.08 | 0.83±0.06 | 1.54±0.22 | 1.73±0.14 |
| | 阴性对照组 | 0.60±0.11 | 0.78±0.08 | 1.46±0.16 | 1.66±0.13 |
| | 实验组 | 0.55±0.10 | 0.69±0.10*# | 1.14±0.23*# | 1.38±0.19*# |
| SACC-83 | 空白对照组 | 0.50±0.04 | 0.66±0.06 | 1.37±0.10 | 1.49±0.10 |
| | 阴性对照组 | 0.52±0.05 | 0.63±0.08 | 1.40±0.10 | 1.53±0.13 |
| | 实验组 | 0.49±0.06 | 0.56±0.11*# | 1.08±0.11*# | 1.24±0.10*# |

注: *为实验组与空白对照组比较, $P < 0.05$; #为实验组与阴性对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 沉默RhoC对SACC凋亡的影响

Annexin FITC/PI染色结果显示: 在SACC-LM中, 转染后实验组的细胞凋亡率 (11.30%±0.87%) 显著高于空白对照组 (4.40%±0.21%) 和阴性对照组 (5.22%±0.82%), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图6); 在SACC-83中, 转染后实验组的细胞凋亡率 (11.45%±0.78%) 显著高于空白对照组 (5.25%±1.01%) 和阴性对照组 (5.43%±

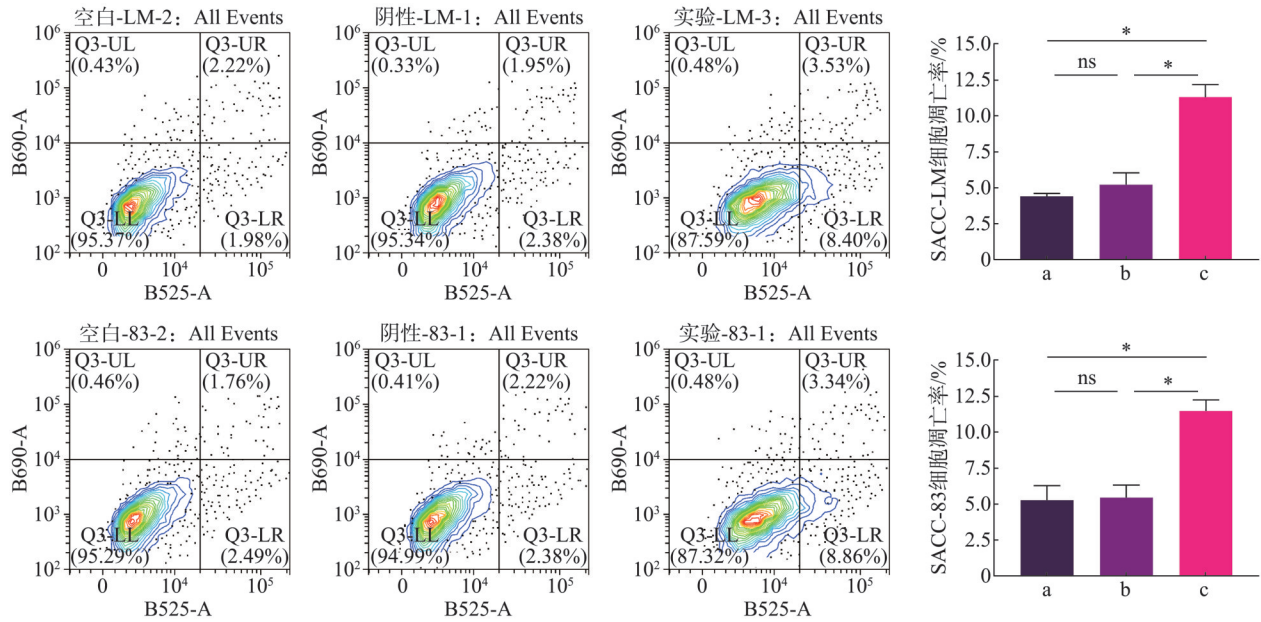
0.88%), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图6)。同时空白对照组和阴性对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图6)。由此说明, 沉默RhoC可显著促进SACC的凋亡。

2.7 沉默RhoC对SACC侵袭的影响

Transwell实验结果显示: 在SACC-LM中, 转染后实验组的穿膜细胞数量 (348.73±39.00) 显著低于空白对照组 (797.07±36.58) 和阴性对照组

(766.67±49.89)，差异具有统计学意义 ($P<0.05$ ，图7)；在SACC-83中，转染后实验组的穿膜细胞数量(266.60±43.32)显著低于空白对照组(512.20±45.37)和阴性对照组(524.40±38.08)，差异具有

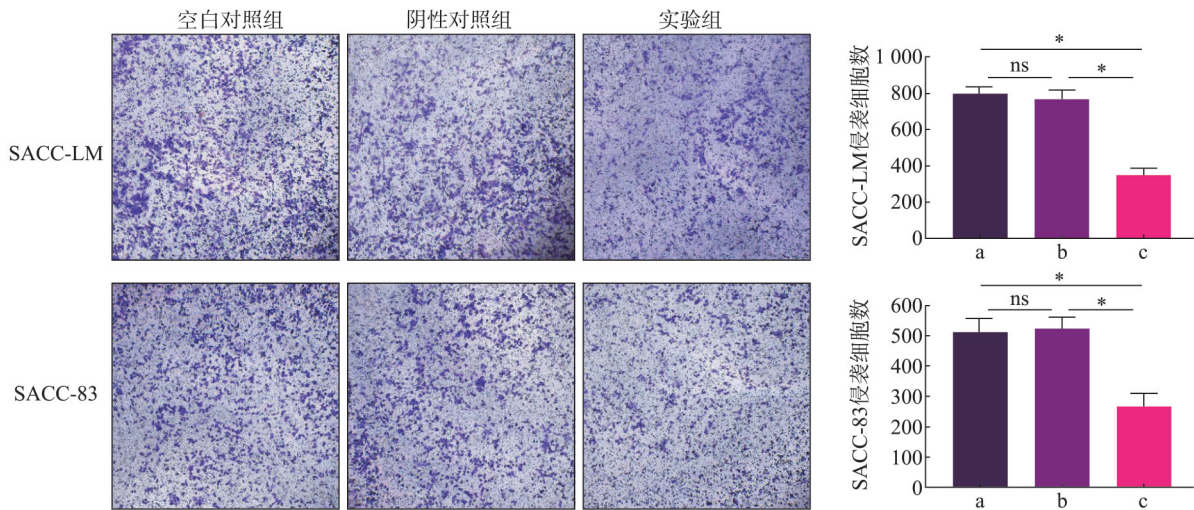
统计学意义 ($P<0.05$ ，图7)。同时空白对照组和阴性对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$ ，图7)。由此说明，沉默RhoC可显著抑制SACC的侵袭能力。



上：SACC-LM；下：SACC-83；左：依次为空白对照组、阴性对照组和实验组的实验结果；右：定量分析，a、b、c分别为空白对照组、阴性对照组、实验组。ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$ 。

图6 转染后SACC细胞凋亡率

Fig 6 Apoptosis rate of SACC cells after transfection



左：实验结果 结晶紫染色 ×100；右：定量分析，a、b、c分别为空白对照组、阴性对照组、实验组。ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$ 。

图7 转染后SACC侵袭细胞数量

Fig 7 Number of SACC invasive cells after transfection

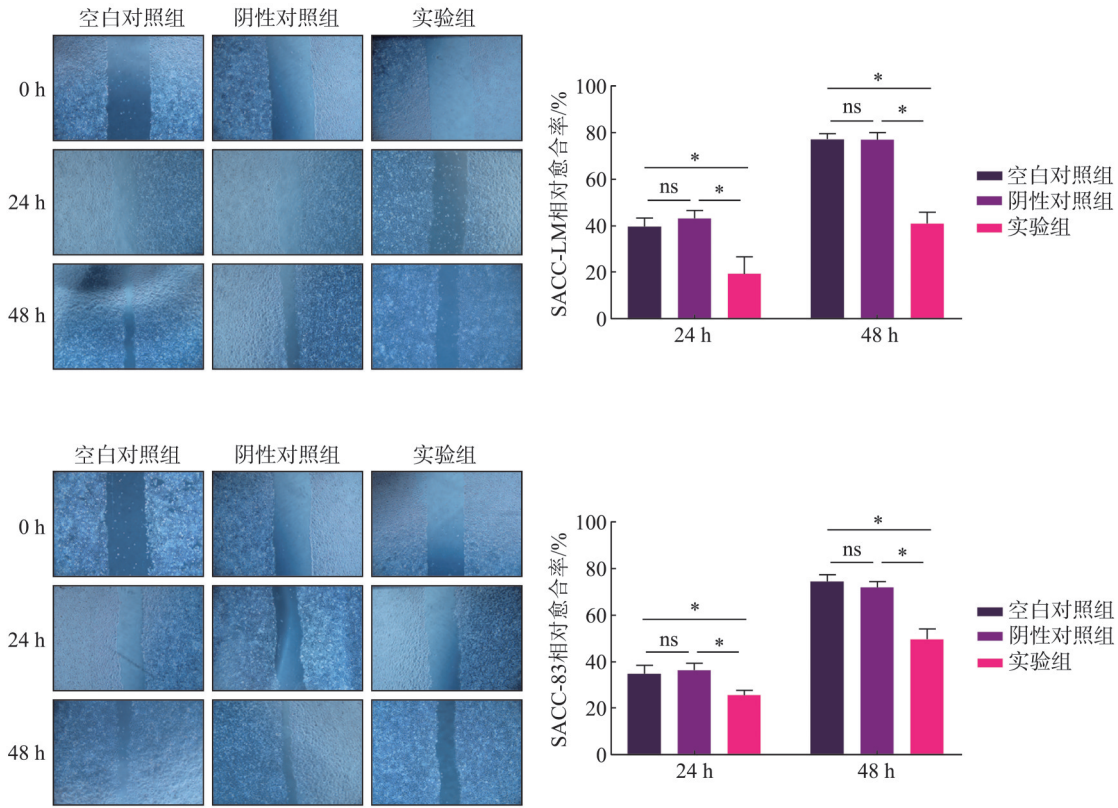
2.8 沉默RhoC对SACC迁移的影响

伤口愈合实验结果显示：在SACC-LM中，处理后24 h实验组的相对愈合率(19.38%±7.15%)，显著低于空白对照组(39.55%±3.75%)和阴性对照组(43.08%±3.42%)，差异具有统计学意义 ($P<0.05$ ，图8)；处理后48 h实验组的相对愈合率

(40.82%±5.14%)显著低于空白对照组(77.06%±2.46%)和阴性对照组(77.05%±2.82%)，差异具有统计学意义 ($P<0.05$ ，图8)。在SACC-83中，处理后24 h实验组的相对愈合率(25.65%±1.99%)显著低于空白对照组(34.82%±3.57%)和阴性对照组(36.28%±3.03%)，差异具有统计学意义 ($P<$

0.05, 图8); 处理后48 h实验组的相对愈合率(49.69%±4.27%)显著低于空白对照组(74.51%±2.89%) 和阴性对照组(72.00%±2.44%), 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图8)。同时空白对照组

和阴性对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$, 图8)。由此说明, 沉默RhoC可显著抑制SACC的迁移能力。



上: SACC-LM; 下: SACC-83。ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$ 。

图8 转染后SACC相对愈合率

Fig 8 Relative healing rate of SACC after transfection

2.9 RhoC与上游靶点miR-138-5p存在结合位点

ENCORI、miRmap、GSE59700和GSE117275数据分析结果显示, miR-17、miR-31、miR-93、miR-138-5p、miR-9、miR-150、miR-106b、miR-331、miR-486和miR-455共10种miRNA可能与RhoC存在结合位点(图9)。其中miR-138-5p的可能性最强(miRmap score=88.51), 且在SACC中表达显著降低, 差异具有统计学意义(logFC=-2.41, $P < 0.05$, 图10)。ENCORI分析显示RhoC与miR-138-5p可能存在结合位点(图11)。双荧光素酶报告基因实验结果显示: miR-138-5p mimic可以显著下调转染RhoC野生型质粒的293T细胞的荧光素酶活性, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而对转染RhoC突变型质粒的293T细胞的荧光素酶活性没有影响($P > 0.05$), 且miR-138-5p mimic对照对转染RhoC野生型及突变型质粒的293T细胞的荧光素酶活性均无影响($P > 0.05$)。由此说明, miR-138-5p可靶向结合RhoC, 可能成为后者

的调控靶点(图12)。

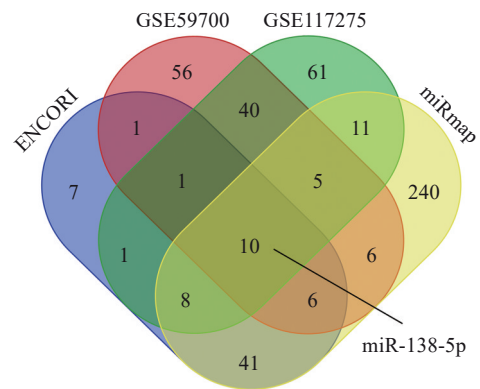


图9 miR-138-5p韦恩图

Fig 9 Venn diagram of miR-138-5p

3 讨论

SACC是一种兼具嗜神经生长、极易复发和远处转移等恶性生物学行为的唾液腺上皮肿瘤, 手

术、放化疗等疗法对治疗其效果不佳，且国际上关于复发性或转移性SACC尚无获批的靶向药物，上述多种原因导致SACC死亡率高、预后较差^[1,8-9]。因此，研究SACC的病因及其分子机制，积极探索高特异性治疗靶点，对于提高其临床诊疗水平具有关键意义。

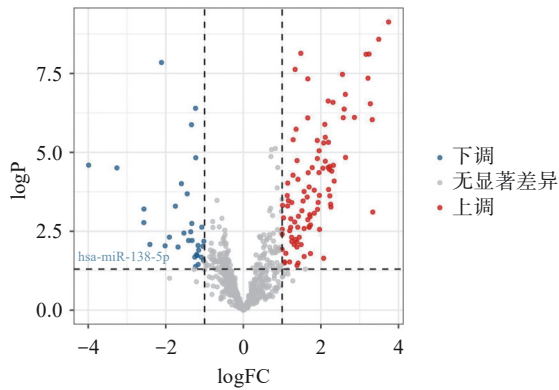


图 10 miR-138-5p 火山图

Fig 10 Volcano diagram of miR-138-5p

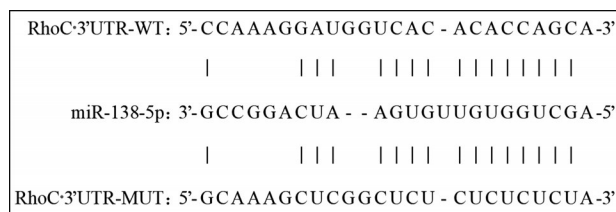


图 11 RhoC 与 miR-138-5p 结合位点预测

Fig 11 Prediction of binding site between RhoC and miR-138-5p

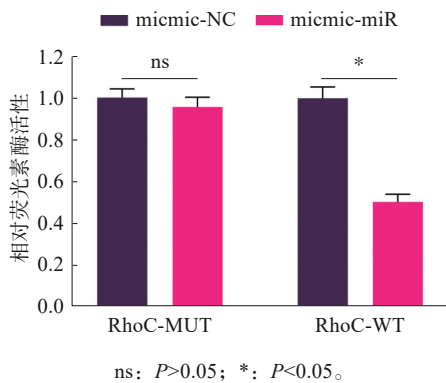


图 12 miR-138-5p 和 RhoC 共转染后 293T 细胞的荧光素酶活性

Fig 12 Luciferase activity of 293T cells after co-transfection with miR-138-5p and RhoC

Rho 家族属于 RAS 超家族，该家族成员由 20 个小信号转导 G 蛋白组成，与癌症的恶性进展密切相关。Rho 家族蛋白具有结合 GDP 和 GTP 的特性，定位于细胞膜时可被鸟嘌呤核苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factors, GEF) 激活为 GTP 结合态，随后充当“分子开关”激活下游效应蛋白如 p21 活化激酶 (p21-activated kinases,

PAK) 和 ROCK，影响细胞生长、迁移和外渗，进而调控恶性肿瘤的增殖、侵袭和转移^[10-12]。作为 Rho 家族中最常见的一种异构体，RhoC 已被证实存在于胰腺癌、肝癌、乳腺癌等恶性肿瘤中过表达，并促进其发生发展^[4]。而在本研究中，RhoC 在 SACC 中同样高表达，提示该基因可能促进 SACC 的恶性生物学行为。

ROCK1 是一种属于 AGC 超家族的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶，也是作用于 Rho 家族蛋白下游的关键因子，在多种癌症中表达显著升高。该蛋白可通过 Rho 蛋白依赖性的方式被激活，诱导下游信号如肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC) 和磷脂酰肌醇受体磷酸化，刺激 Ca²⁺ 内流，从而促进细胞迁移；而抑制该蛋白可降低肌动蛋白收缩性和调节其细胞骨架，使细胞形态变为长而不规则的扁平态，这种变化会抑制肿瘤细胞的集落形成并诱导其凋亡^[13-14]。本研究中，沉默 RhoC 后 ROCK1 的表达显著下降，同时细胞增殖、迁移能力下降，凋亡率上升。说明沉默 RhoC 可能通过抑制 ROCK1 的 Rho 依赖性激活，继而对 SACC 的恶性行为起负向调控作用。

p38MAPK 属于丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) 家族，与多种癌症密切相关。该蛋白能将细胞外信号与细胞内信号相联系，从而调控细胞增殖、凋亡和分化等多种生物过程^[15]。p38MAPK 的激活由激酶级联介导，即 MAP3K 激活 MAP2K，后者又激活 p38-MAPK，p38MAPK 上具有能结合特定底物的激活基序，能与多种底物如脂质运载蛋白 2 (Lipoprotein 2, LCN2) 上的特异性对接结构域结合，影响癌细胞的形成、侵袭和转移等多种恶性行为^[15-16]。有研究^[16-17]表明，Rho 家族蛋白中细胞分裂周期蛋白 42 (cell division cycle 42, Cdc42) 可与丝裂原活化蛋白激酶激酶 1 (mitogen-activated protein kinase kinase 1, MEK1) 结合，MEK1 可作为 MAP3K 的上游激活物达到激活 p38MAPK 的目的。在本研究中，沉默 RhoC 后 ROCK1 与 p38MAPK 的表达同时下降，提示 RhoC 的低表达可能抑制 ROCK1 级联介导的 p38MAPK 激活，继而起到抑制 SACC 的作用。

TWIST1 是碱性螺旋-环-螺旋转录因子家族的成员，该家族蛋白拥有一段碱性氨基酸的 E-box 结合域，在上皮细胞的间充质转化中发挥重要作用，通过体内外研究^[18-19]证明敲除 TWIST1 可显著抑制乳腺癌的恶性行为。在肿瘤形成过程中，凋亡主

要由ARF/p53信号通路触发,而TWIST1不仅与p53启动子的有效反式激活剂HOXA5发生相互作用并抑制其活性,还能抑制ADP核糖基化因子(ADP-ribosylation factors, ARF)的表达及稳定性从而阻止其翻译后修饰,继而抑制细胞凋亡^[19]。EMT是指极化、不易运动的上皮细胞经一系列复杂生化过程,如细胞骨架重组,转变为非极化、易运动的间充质细胞,同时获得高侵袭性和抗凋亡能力的过程^[20]。TWIST1已被证实可诱导E-cadherin下调,并增加间质标记物如Vimentin和N-cadherin的表达^[21],其主要机制是通过与E-cadherin启动子中的多个E-box结合域结合从而抑制其转录^[22]。本研究中,沉默RhoC后p-p38-MAPK、TWIST1、N-cadherin和Vimentin的表达均下降,E-cadherin的表达显著上升,同时SACC侵袭能力减弱,凋亡率上升。由此推测,沉默RhoC可能会阻止p38MAPK与底物TWIST1上特异性对接结构域的结合,减弱后者对ARF/p53等下游通路的抑制作用以及与EMT相关蛋白上E-box结合域的结合能力,最终促进SACC的凋亡,抑制其侵袭和EMT。

近年来,随着竞争性内源RNA假说的提出和大量实验验证,学者们愈发重视lncRNA-miRNA-mRNA三者互作在癌症中的重要调控作用,该理论认为miRNA可以与多个靶基因的mRNA上3'UTR区域结合并将其沉默,抑制单个miRNA可能导致多个致癌基因的表达下调,从而发挥显著的抗癌作用^[23]。由于SACC的罕见性,国内对其miRNA-mRNA互作的研究甚少。本研究在观察RhoC及其下游信号对SACC的影响之外,利用生物信息学方法预测了RhoC的上游miRNA,以期作为SACC的分子靶向治疗提供新思路。

综上所述,本研究利用siRNA沉默SACC-LM和SACC-83中的RhoC基因,观察到其下游信号通路ROCK1/p38MAPK/TWIST1及EMT相关蛋白的表达显著降低,SACC的恶性生物学行为显著减弱。由此推测,沉默RhoC后ROCK1的Rho依赖性激活减少,使得下游p38MAPK的激酶级联激活受到抑制,p38MAPK无法与TWIST1的特异性对接结构域结合,导致后者与细胞凋亡及EMT相关蛋白上E-box结合域的结合减弱,最终起到抑制SACC增殖、侵袭、迁移和EMT的作用。本研究在分析RhoC下游信号的同时预测其上游信号,为其成为SACC靶向治疗的重要位点提供了依据,而有关RhoC在SACC中的具体作用机制仍待进一步

研究。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Saleh E, Ukwes A. Adenoid cystic carcinoma of salivary glands: a ten-year review and an assessment of the current management, surgery, radiotherapy, and chemotherapy[J]. *Int J Otolaryngol*, 2023, 2023: 7401458.
- [2] Fang Y, Peng Z, Wang Y, et al. Current opinions on diagnosis and treatment of adenoid cystic carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2022, 130: 105945.
- [3] Thomas P, Pranatharthi A, Ross C, et al. RhoC: a fascinating journey from a cytoskeletal organizer to a cancer stem cell therapeutic target[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 328.
- [4] Lou Y, Jiang Y, Liang Z, et al. Role of RhoC in cancer cell migration[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 527.
- [5] Hu Y, Liu H, Zhu Z, et al. LACTB suppresses migration and invasion of glioblastoma via downregulating RHOA/Cofilin signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 629: 17-25.
- [6] Ghafouri-Fard S, Noroozi R, Abak A, et al. Emerging role of lncRNAs in the regulation of Rho GTPase pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140: 111731.
- [7] 迟增鹏,周建华,李文健,等. 沉默RhoA基因对腺样囊性癌细胞迁移和侵袭的影响[J]. *口腔疾病防治*, 2022, 30(4): 237-244.
- [8] Chi ZP, Zhou JH, Li WJ, et al. Effects of RhoA silencing on the migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma[J]. *J Prevent Treat Stomatol Dis*, 2022, 30(4): 237-244.
- [9] da Silva FJ, Carvalho de Azevedo J Jr, Ralph ACL, et al. Salivary glands adenoid cystic carcinoma: a molecular profile update and potential implications[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1191218.
- [10] Hoch CC, Stögbauer F, Wollenberg B. Unraveling the role of epithelial-mesenchymal transition in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a comprehensive review[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(11): 2886.
- [11] Smithers CC, Overduin M. Structural mechanisms and drug discovery prospects of Rho GTPases[J]. *Cells*, 2016, 5(2): 26.
- [12] Rodenburg WS, van Buul JD. Rho GTPase signalling networks in cancer cell transendothelial migration[J]. *Va-*

- sc Biol, 2021, 3(1): 77-95.
- [12] Clark EA, Golub TR, Lander ES, et al. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC[J]. *Nature*, 2000, 406(6795): 532-535.
- [13] Morgan-Fisher M, Wewer UM, Yoneda A. Regulation of ROCK activity in cancer[J]. *J Histochem Cytochem*, 2013, 61(3): 185-198.
- [14] Kim S, Kim SA, Han J, et al. Rho-Kinase as a target for cancer therapy and its immunotherapeutic potential[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12916.
- [15] Roche O, Fernández-Aroca DM, Arconada-Luque E, et al. p38 β and cancer: the beginning of the road[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7524.
- [16] Han J, Wu J, Silke J. An overview of mammalian p38 mitogen-activated protein kinases, central regulators of cell stress and receptor signaling[J]. *F1000Res*, 2020, 9: 653.
- [17] Bagrodia S, Dérijard B, Davis RJ, et al. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(47): 27995-27998.
- [18] Razzaque MS, Atfi A. Regulatory role of the transcription factor Twist1 in cancer-associated muscle cachexia[J]. *Front Physiol*, 2020, 23, 11: 662.
- [19] Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(1): 13-17.
- [20] Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications[J]. *Mol Cancer*, 2016, 15: 18.
- [21] Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis[J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939.
- [22] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6): 442-454.
- [23] Tang YF, Wu WJ, Zhang JY, et al. Reconstruction and analysis of the aberrant lncRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland[J]. *Transl Cancer Res*, 2021, 10(12): 5133-5149.

(本文编辑 杜冰)

《儿童口腔临床影像学指南：设备、技术及临床注意事项》出版发行

书籍名称：儿童口腔临床影像学指南：设备、技术及临床注意事项

主编：约翰·阿普斯（比利时）

主译：汪鹭，高艳霞

出版日期：2024年7月

出版社：辽宁科学技术出版社

内容简介：

《儿童口腔临床影像学指南：设备、技术及临床注意事项》是一本有关儿童口腔颌面部成像的全面指南，适用于全科口腔医生和儿童口腔医生。书中涵盖放射防护、辐射剂量和电离辐射的潜在风险等内容，在临床实践中遇到相关问题时，可为口腔医生提供适当的信息。书中还包括了一些（儿童）口腔医生应该了解的X线机相关的信息（从口内仪器到医用计算机断层扫描仪）以及不同数字影像接收器之间的差异等，有助于口腔医生理解为什么使用某些曝光设置以及不同机器和影像接收器的优缺点。本书也阐述了非电离辐射技术（例如，磁共振成像和超声成像）及其在口腔颌面部放射学领域的应用，并随文分享了大量临床照片。所有内容均用专业影像学知识加以说明，让读者了解在真正评估口腔颌面部影像时需要关注哪些問題。

