

[文章编号] 1671-587X(2024)04-1035-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.202404018

PLOD1在口腔鳞状细胞癌组织和细胞中的表达及其意义

郭超杰, 张佳佳, 曾洁, 王晖予, 艾尔法提·艾麦尔, 徐江
(石河子大学第一附属医院口腔科, 新疆 石河子 832000)

[摘要] **目的:** 探讨前胶原赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双加氧酶 1 (PLOD1) 在口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 组织和细胞中的表达及其对 OSCC 细胞生物学行为的影响, 阐明 PLOD1 作为 OSCC 预后标志物的潜力。**方法:** 采用肿瘤免疫评价资源 (TIMER) 数据库、基因表达谱交互分析 (GEPIA) 数据库和 Kaplan-Meier Plotter 数据库分析头颈部鳞状细胞癌 (HNSC) 组织中 PLOD1 mRNA 表达水平及其与 HNSC 患者生存期的关联。免疫组织化学法检测 110 例 OSCC 组织和 64 例癌旁组织中 PLOD1 蛋白表达情况, 分析其与 OSCC 患者临床病理特征和预后的关系。采用受试者工作特征 (ROC) 曲线下面积 (AUC) 评估 PLOD1 在 OSCC 诊断中的价值。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blotting 法检测人正常口腔上皮 HOK 细胞和 OSCC SCC15 和 CAL27 细胞中 PLOD1 mRNA 和蛋白表达水平。利用脂质体法将小干扰 RNA (siRNA) 片段转染至 SCC15 细胞, 分为 si-NC 组 (转染阴性对照 si-NC) 和 si-PLOD1 组 (转染 si-PLOD1), 采用 CCK-8 法、细胞划痕愈合实验和 Transwell 小室实验分别检测 2 组细胞增殖活性、划痕愈合率和侵袭细胞数。**结果:** 公共数据库分析, HNSC 组织中 PLOD1 mRNA 表达水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$); 与 PLOD1 低表达组比较, PLOD1 高表达组 HNSC 患者生存期较短 ($HR = 1.41$, $P = 0.018$)。PLOD1 蛋白主要表达于 OSCC 细胞的细胞质中, OSCC 组织中 PLOD1 表达强度高于癌旁组织 ($P < 0.01$), 并与 OSCC 患者 T 分期和 TNM 分期有关 ($P = 0.021$, $P = 0.004$)。PLOD1 诊断 OSCC 的 AUC 为 0.811, 特异度和灵敏度分别 63.64% 和 90.63%。Kaplan-Meier 生存分析, 与 PLOD1 低表达组比较, PLOD1 高表达组 OSCC 患者生存率降低 ($P < 0.01$); COX 回归分析, PLOD1 高表达是影响 OSCC 预后的独立危险因素 ($P = 0.012$)。OSCC 细胞中 PLOD1 mRNA 和蛋白表达水平高于 HOK 细胞 ($P < 0.05$)。与 si-NC 组比较, si-PLOD1 组细胞增殖活性和划痕愈合率降低 ($P < 0.05$), 侵袭细胞数减少 ($P < 0.01$)。**结论:** PLOD1 在 OSCC 组织和细胞中高表达, 沉默 PLOD1 表达可抑制 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭。PLOD1 可能是 OSCC 新的治疗靶点和预后标志物。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 前胶原赖氨酸, 2-酮戊二酸 5-双加氧酶 1; 细胞增殖; 细胞侵袭; 预后
[中图分类号] R739.8 **[文献标志码]** A

Expressions of PLOD1 in oral squamous cell carcinoma tissue and cells and their significances

GUO Chaojie, ZHANG Jiajia, ZENG Jie, WANG Huiyu, AIERFATI·Aimaier, XU Jiang
(Department of Stomatology, First Affiliated Hospital, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss the expressions of procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 (PLOD1) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) tissue and OSCC cells and its effect on the biological

[收稿日期] 2023-10-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82160572)

[作者简介] 郭超杰 (1997-), 女, 河南省周口市人, 在读硕士研究生, 主要从事颌面部肿瘤基础和临床方面的研究。

[通信作者] 徐江, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: 1437759520@qq.com)

behavior of the OSCC cells, and to clarify the potential of PLOD1 as a prognostic biomarker for OSCC. **Methods:** The expression level of PLOD1 mRNA in head and neck squamous cell carcinoma (HNSC) tissue and its correlation with the survival of the HNSC patients were analyzed by Tumor Immune Estimation Resource (TIMER), Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA), and Kaplan-Meier Plotter databases. Immunohistochemistry method was used to detect the expression level of PLOD1 protein in 110 OSCC tissue and 64 adjacent tissue, and its association with clinicopathological characteristics and prognosis of the OSCC patients were analyzed; the diagnostic value of PLOD1 in OSCC was detected by area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC). The expression levels of PLOD1 mRNA and protein in the human normal oral epithelial HOK cells and OSCC SCC15 and CAL27 cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods. The small interfering RNA (siRNA) fragments were transfected into the SCC15 cells by liposome method and the cells were dividing into si-NC group (transfected with negative control si-NC) and si-PLOD1 group (transfected with si-PLOD1); the proliferation activities, scratch healing rates, and numbers of invasion cells in two groups were detected by CCK-8 method, wound healing assay, and Transwell chamber assay, respectively. **Results:** The public database analysis results showed that the expression level of PLOD1 mRNA in HNSC tissue was higher than that in adjacent tissue ($P < 0.05$); compared with low expression of PLOD1 group, the survival period of the HNSC patients in high expression of PLOD1 group was shorter ($HR = 1.41$, $P = 0.018$). The PLOD1 protein was mainly expressed in cytoplasm of the OSCC cells, and the expression intensity of PLOD1 in OSCC tissue was higher than that in adjacent tissue ($P < 0.01$), and it was related to T stage and TNM stage of the OSCC patients ($P = 0.021$, $P = 0.004$). The AUC of PLOD1 for diagnosing OSCC was 0.811, and the specificity was 63.64% and the sensitivity was 90.63%. The Kaplan-Meier survival analysis results showed that compared with low expression of PLOD1 group, the survival rate of the OSCC patients in high expression of PLOD1 group was decreased ($P < 0.01$). The COX regression analysis results showed that high expression of PLOD1 was an independent risk factor for the prognosis of OSCC ($P = 0.012$). The expression levels of PLOD1 mRNA and protein in the OSCC cells were higher than those in HOK cells ($P < 0.05$). Compared with si-NC group, the proliferation activity and scratch healing rate of the cells in si-PLOD1 group were decreased ($P < 0.05$), and the number of invasion cells was decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** PLOD1 is highly expressed in the OSCC tissue and cells, and silencing of PLOD1 expression can inhibit the proliferation, migration, and invasion of the OSCC cells. PLOD1 may be a new therapeutic target and prognostic biomarker for OSCC.

KEYWORDS Oral squamous cell carcinoma; Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1; Cell proliferation; Cell invasion; Prognosis

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)约占头颈部肿瘤的90%,尽管近年来综合治疗(手术、放疗、化疗和分子靶向治疗)取得重大进展,但由于早期诊断和预后指标的不足,OSCC患者5年生存率仅为55%^[1-3]。因此寻找新的有效的OSCC生物标志物和治疗靶点具有重要意义。前胶原赖氨酸,2-酮戊二酸5-双加氧酶(procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase, PLOD)1是负责赖氨酸羟化的PLOD蛋白家族成员之一,位于染色体1p36.2-36.3上,作为端肽赖氨酸羟化酶,PLOD1对分子间沉积和交联的稳

定性具有重要作用^[4]。PLOD1基因突变可导致Ehlers-Danlos综合征^[5]。近年来,许多研究^[6-8]报道了PLOD1在多种实体肿瘤中具有促进肿瘤进展的作用,但在OSCC发生发展中的作用尚不明确。本研究首先基于生物信息学方法初步预测PLOD1在头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSC)中的表达情况及其与HNSC患者预后的关系,进一步利用免疫组织化学法、Western blotting法和实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法分析PLOD1在OSCC组织和细胞中的表达情况,评估

其诊断和预后价值, 同时利用细胞表型实验检测其对 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 为寻找 OSCC 新的有效的治疗靶点和预后标志物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人正常口腔角质 HOK 细胞购自河北北纳生物科技有限公司, OSCC SCC15 和 CAL27 细胞购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。免疫组织化学试剂盒和 PLOD1 多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, β -actin 单克隆抗体、HRP-羊抗鼠抗体和 HRP-羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, PLOD1 引物序列购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, PLOD1-小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 序列 (si-PLOD1) 及阴性对照序列 (si-NC) 购自上海吉玛制药技术有限公司。细胞培养箱、超净工作台和 -80°C 冰箱购于美国赛默飞世尔科技有限公司, 电泳仪、湿转膜仪和多功能酶标仪购于美国 Bio-rad 公司, 荧光定量 PCR 仪购于美国 Agilent 公司。

1.2 组织标本来源 收集石河子大学第一附属医院 2008—2020 年确诊为原发性 OSCC 的石蜡标本, 获得 110 例 OSCC 组织标本和 64 例癌旁组织 (距离癌组织 2 cm 以上), 参照美国癌症联合会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 标准第 8 版对 OSCC 患者进行 TNM 分期。收集 OSCC 患者临床病理特征参数, 包括年龄、性别、分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期等。后期通过医院病历、电话或其他方法进行随访 (至 2023 年 7 月或死亡日期)。本研究经石河子大学第一附属医院伦理委员会批准 (编号: KJX2022-072-01)。

1.3 生物信息学方法分析 HNSC 组织中 PLOD1 mRNA 表达水平 采用肿瘤免疫评价资源 (Tumor Immune Estimation Resource, TIMER) 数据库和基因表达谱交互分析 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA) 数据库分析 HNSC 组织和正常组织中 PLOD1 mRNA 表达水平, 采用 Kaplan-Meier Plotter 数据库评估 PLOD1 表达与 HNSC 患者预后的关系。

TIMER 数据库^[9] (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>) 主要用于系统分析不同类型癌症的免疫浸润情况, 并通过 Wilcoxon 检验进行统计学分析。

GEPIA 数据库^[10] (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 是一种新的交互式网络服务器, 使用标准处理流程分析来自 TCGA 和 GTEx 项目的 9 736 个肿瘤样本和 8 587 个正常样本的 RNA 测序表达数据。Kaplan-Meier Plotter 数据库^[11] (<https://kmplot.com/analysis/>) 用于分析基因表达与患者存活率之间的相关性, 通过 Cox 比例风险回归和错误发现率发现和验证新的生存生物标志物。

1.4 免疫组织化学染色检测 OSCC 组织中 PLOD1 蛋白表达强度 所有组织标本经病理科切片后低温保存, 切片经 EnVision 两步法进行染色。由 2 名高年资的病理科医师采用双盲法对染色结果进行评定。染色强度: 0 分 (无着色), 1 分 (黄色), 2 分 (浅褐色), 3 分 (深褐色); 阳性细胞范围: 1 分 (阳性细胞范围 0%~25%), 2 分 (阳性细胞范围 26%~50%), 3 分 (阳性细胞范围 51%~75%), 4 分 (阳性细胞范围 76%~100%)。结果判定: 表达强度 = 阳性细胞范围 \times 染色强度, 其中 0~1 分为阴性 (-), 2~4 分为弱阳性 (+), 5~7 分为阳性 (++) , 8~12 分为强阳性 (+++); “-” 和 “+” 为低表达组, “++” 和 “+++” 为高表达组。根据 PLOD1 表达强度得分, 绘制受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线并计算 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC), 评估 PLOD1 在 OSCC 诊断中的价值。

1.5 细胞培养和转染 所有细胞在含 1% 青-链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中静置培养。按每孔 5×10^4 个细胞的密度将 SCC15 细胞铺于 6 孔细胞培养板中, 待细胞融合度达到 70%~80% 时进行转染。实验分为 si-NC 组和 si-PLOD1 组, 按照 LipofectamineTM 2000 转染试剂盒说明分别转染 si-NC 和 si-PLOD1, 培养 24 h 后采用 RT-qPCR 法和 Western blotting 法检测转染效果, 并收集细胞用于后续实验。

1.6 RT-qPCR 法检测 OSCC 细胞中 PLOD1 mRNA 表达水平 采用 TRIzol 法提取各组细胞中总 RNA, 利用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 采用 RT-qPCR 试剂盒进行 mRNA 定量分析。引物序列: PLOD1, 正向引物 5'-GTCCTGGTCGGCGTGTTCATC-3', 反向引物 5'-TTGTTGGTGCTGCTCGTGGTTG-3'; β -actin, 正向引物 5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3', 反向引

物5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3'。反应条件: 95℃、120 s; 95℃、5 s, 60℃、35 s, 40个循环。以 β -actin为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中PLOD1 mRNA表达水平。

1.7 Western blotting法检测OSCC细胞中PLOD1蛋白表达水平 提取各组细胞中总蛋白, 定量后进行SDS-PAGE电泳转膜, 5% BSA室温封闭1 h, 分别滴加PLOD1抗体(1:3 000)和 β -actin抗体(1:5 000) 4℃孵育过夜, 加入HRP标记的IgG抗体(1:20 000)室温孵育2 h, ECL化学发光仪显色拍照, 以 β -actin作为内参蛋白, 采用Image J软件分析各蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.8 CCK-8法检测2组SCC15细胞增殖活性 细胞分组见“1.5”。转染24 h后, 胰酶消化2组细胞, 以每孔5 000个细胞的密度接种于96孔培养板中, 继续常规培养3 d, 每隔24 h(即种板后的第0、1、2和3天)取出后避光加入10 μ L CCK-8溶液。采用酶标仪检测2组细胞在450 nm波长处吸光度(A)值, 以A值代表各组细胞增殖活性。每组设置5个复孔, 实验重复3次。

1.9 细胞划痕愈合实验检测2组SCC15细胞划痕愈合率 细胞分组见“1.5”。转染24 h后, 细胞单层铺满孔底时, 用100 μ L移液器枪头划3条平行线, PBS缓冲液清洗3次, 在0、24和48 h时间点观测并拍照相同划痕位置。采用Image J软件分析划痕面积并计算划痕愈合率, 以划痕愈合率代表细胞迁移能力。细胞划痕愈合率=(0 h划痕面积-24 h或48 h划痕面积)/0 h划痕面积 \times 100%。

1.10 Transwell小室实验检测2组SCC15细胞中侵袭细胞数 细胞分组见“1.5”。收集转染后2组细胞, 制备单细胞悬液并调整细胞密度为 5×10^4 mL⁻¹。上室加入60 μ L稀释基质胶后置于37℃培养箱中培养2 h, 使基质胶完全凝固; 吸弃上室中残余液体, 并加入100 μ L无血清培养基, 培养箱中静置水化30 min; 上室弃去残液后加入200 μ L细胞悬液, 下室加入600 μ L完全培养基, 置于细胞培养箱中培养36 h, 冰甲醇固定20 min, 结晶紫染色10 min, 流动水冲洗, 棉签擦净上室内细胞及染料。随机选取3个以上视野, 显微镜下观察拍照并计数侵袭细胞。

1.11 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.5和

SPSS 26.0统计软件进行统计学分析。OSCC组织和癌旁组织中PLOD1蛋白表达强度比较采用Fisher's确切概率法; 不同临床病理特征OSCC患者癌组织中PLOD1蛋白表达强度比较采用 χ^2 检验。按照随访信息中患者是否存活进行二分类(0为死亡, 1为存活), 采用Kaplan-Meier法(Log-rank检验)进行生存分析, 对影响预后的因素进行COX回归分析。各组细胞中PLOD1 mRNA和蛋白表达水平、细胞增殖活性、划痕愈合率及侵袭细胞数均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 2组间样本均数比较采用独立样本 t 检验, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

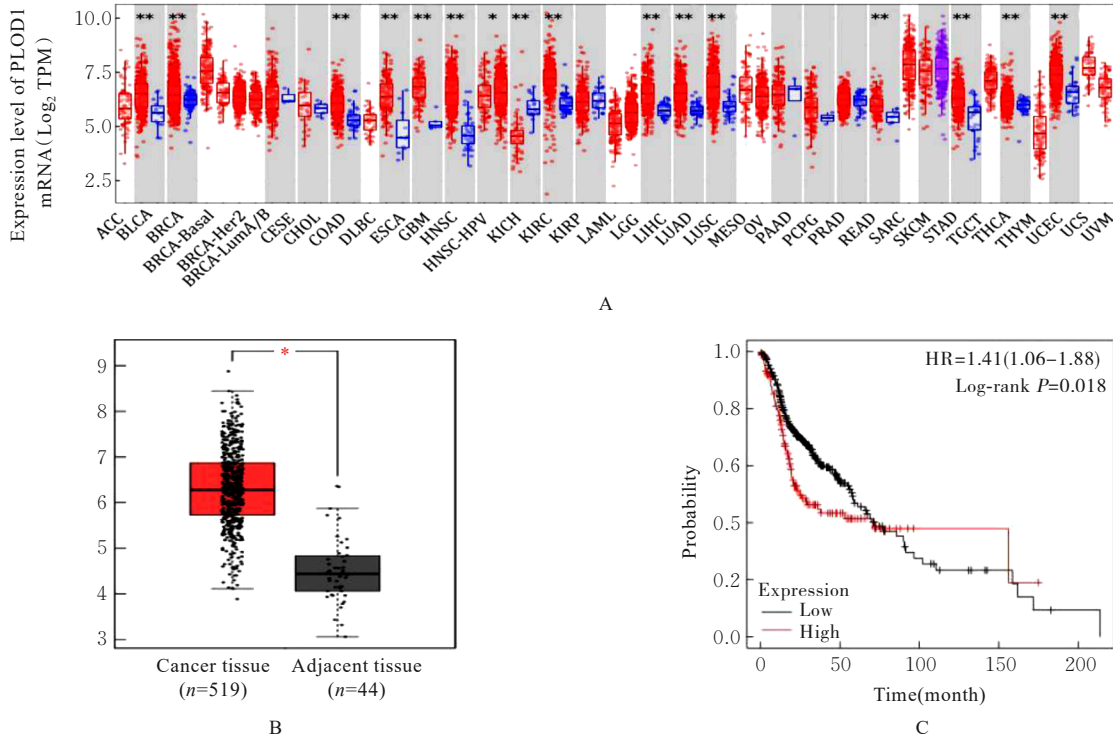
2.1 生物信息学方法分析结果 TIMER和GEPIA数据库均显示: HNSC组织中PLOD1 mRNA表达水平明显高于癌旁组织($P<0.05$); 生存分析结果显示: 与PLOD1低表达组比较, PLOD1高表达组HNSC患者生存期较短(HR=1.41, $P=0.018$)。见图1。

2.2 OSCC患者癌旁组织和癌组织中PLOD1蛋白表达强度 免疫组织化学染色结果显示: PLOD1蛋白主要分布于细胞质, 其在癌旁组织中多为低表达, 而在OSCC组织中多呈高表达。见图2。与癌旁组织比较, OSCC患者癌组织中PLOD1蛋白表达强度升高($P<0.01$)。见表1。癌旁组织和OSCC患者癌组织PLOD1蛋白表达评分等级比较差异有统计学意义($P<0.01$)。见表2。

2.3 不同临床病理特征OSCC患者癌组织中PLOD1蛋白表达强度 PLOD1蛋白表达强度与OSCC患者不同T分期和TNM分期有关联($P=0.021$, $P=0.004$), 与患者年龄、性别、分化程度和淋巴结转移无关联($P>0.05$)。见表3。

2.4 ROC曲线评估PLOD1在OSCC诊断中的价值 ROC曲线显示: AUC值为0.811(95% CI: 0.750~0.873), 采用PLOD1临界值诊断OSCC的特异度和灵敏度分别为63.64%和90.63%。见图3A。

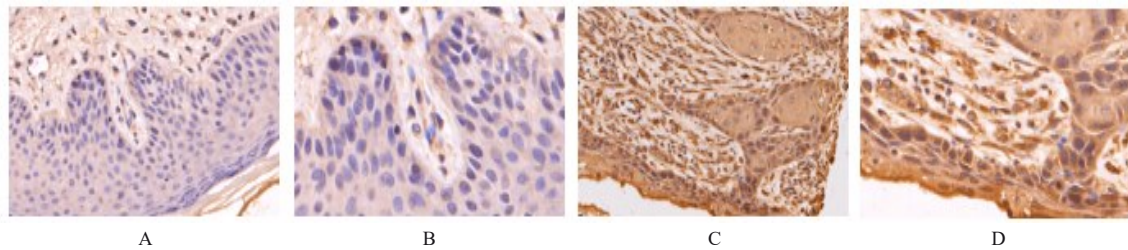
2.5 Kaplan-Meier生存曲线评估PLOD1在OSCC预后评价中的价值 Kaplan-Meier生存曲线显示: 与PLOD1低表达组比较, PLOD1高表达组患者生存率降低($P<0.01$)。见图3B。单因素和多因素COX回归分析显示: PLOD1高表达(HR=



A: TIMER; C: GEPIA; C: Kaplan-Meier curve. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with adjacent tissue.

图1 HNSC患者癌旁组织和癌组织中PLOD1 mRNA表达水平和Kaplan-Meier曲线分析

Fig. 1 Expression levels of PLOD1 in adjacent tissue and cancer tissue of HNSC patients and Kaplan-Meier curve analysis



A, B: Low expression of PLOD1 in adjacent tissue; C, D: High expression of PLOD1 in cancer tissue; A, C: $\times 200$; B, D: $\times 400$.

图2 免疫组织化学染色法检测OSCC患者癌旁组织和癌组织中PLOD1蛋白表达情况

Fig. 2 Expressions of PLOD1 protein in adjacent tissue and cancer tissue of OSCC patients detected by immunohistochemistry staining method

表1 OSCC患者癌旁组织和癌组织中PLOD1蛋白表达强度
Tab. 1 Expression intensities of PLOD1 protein in adjacent tissue and cancer tissue of OSCC patients

Group	n	PLOD1		χ^2	P
		High expression	Low expression		
Adjacent tissue	64	6	58	15.15	<0.01
Cancer tissue	110	70	40		

表2 OSCC患者癌旁组织和癌组织中PLOD1蛋白表达评分等级
Tab. 2 Expression score scales of PLOD1 protein in adjacent tissue and cancer tissue of OSCC patients

Tab. 2 Expression score scales of PLOD1 protein in adjacent tissue and cancer tissue of OSCC patients

Group	n	PLOD1			P
		-	+	++/+++	
Adjacent tissue	64	19 (29.68)	39 (60.94)	6 (9.38)	<0.01
Cancer tissue	110	9 (8.18)	31 (28.18)	70 (63.64)	

3.695, $P=0.012$) 可作为OSCC患者预后的独立危险因素。见表4。

2.6 不同细胞中 PLOD1 mRNA 和蛋白表达水平 RT-qPCR 法检测结果显示：与 HOK 细胞

表3 不同临床病理特征 OSCC 患者癌组织中 PLOD1 蛋白表达强度

Tab. 3 Expression intensities of PLOD1 protein in cancer tissue of OSCC patients with different clinicopathological characteristics

Clinicopathological characteristic	n	PLOD1		χ^2	P
		High expression	Low expression		
Gender					
Male	54	34	20	0.429	0.512
Female	56	36	20		
Age(year)					
<65	34	22	12	0.024	0.876
≥65	76	48	28		
Differentiation					
Well	90	53	37	3.756	0.053
Moderate/Poor	20	17	3		
T stage					
T1-T2	64	35	29	5.296	0.021
T3-T4	46	35	11		
Node					
N0	94	57	37	1.699	0.173
N1-N2	16	13	3		
TNM stage					
I - II	63	33	30	8.072	0.004
III - IV	47	37	10		

(1.00 ± 0.14) 比较, SCC15 细胞和 CAL27 细胞中 PLOD1 mRNA 表达水平 (2.60 ± 0.24 和 2.11 ± 0.22) 升高 ($P < 0.01$)。Western blotting 法检测结果显示: 与 HOK 细胞 (1.00 ± 0.03) 比较,

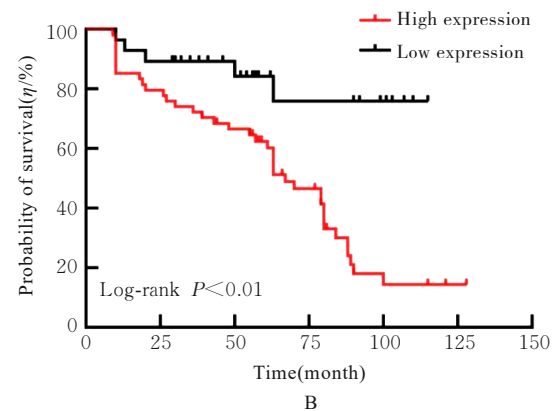
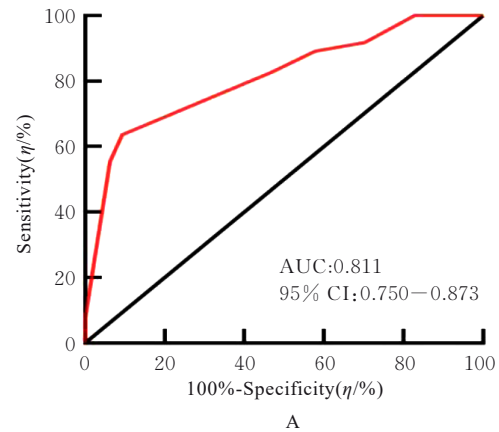


图3 OSCC 患者的 ROC 曲线(A)和 Kaplan-Meier 生存曲线(B)

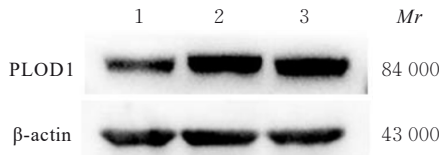
Fig. 3 ROC curve(A) and Kaplan-Meier survival curve (B) of OSCC patients

SCC15 细胞和 CAL27 细胞中 PLOD1 蛋白表达水平 (1.58 ± 0.20 和 1.57 ± 0.23) 升高 ($P < 0.05$)。见图 4。

表4 OSCC 患者的单因素和多因素分析

Tab. 4 Univariate and multivariate survival analysis in OSCC patients

Clinicopathological characteristic	HR	95% CI	P
Univariate analysis			
Gender (female vs male)	0.615	0.335-1.128	0.116
Age (≥65 years old vs <65 years old)	0.807	0.435-1.500	0.498
Differentiation (moderate/poor vs well)	0.555	0.278-1.110	0.096
Lymph node metastasis (positive vs negative)	1.587	0.781-3.226	0.202
T stage (T3-T4 vs T1-T2)	1.890	1.037-3.445	0.038
TNM stage (III - IV vs I - II)	2.184	1.193-3.998	0.011
PLOD1 (high expression vs low expression)	4.357	1.706-11.129	0.002
Multivariate analysis			
T stage (T3-T4 vs T1-T2)	0.307	0.069-1.370	0.122
TNM stage (III - IV vs I - II)	4.108	0.893-18.902	0.070
PLOD1 (high expression vs low expression)	3.695	1.340-10.189	0.012

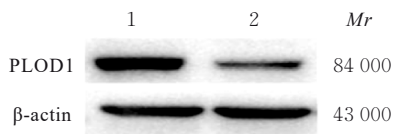


Lane 1: HOK cells; Lane 2: SCC15 cells; Lane 3: CAL27 cells.

图4 不同细胞中PLOD1蛋白表达电泳图

Fig. 4 Electrophoregram of expressions of PLOD1 protein in different cells

2.7 SCC15细胞中si-PLOD1转染效果 RT-qPCR法和Western blotting法检测,与si-NC组(1.00 ± 0.25 和 1.00 ± 0.03)比较,si-PLOD1组SCC15细胞中PLOD1 mRNA和蛋白表达水平(0.15 ± 0.01 和 0.45 ± 0.02)降低($P < 0.01$),表明si-PLOD1转染成功。见图5。



Lane 1: Si-NC group; Lane 2: Si-PLOD1 group.

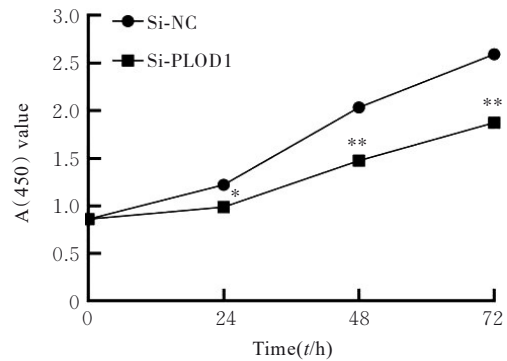
图5 Western blotting法检测2组SCC15细胞中PLOD1蛋白表达电泳图

Fig. 5 Electrophoregram of expressions of PLOD1 protein in SCC15 cells in two groups detected by Western blotting method

2.8 2组SCC15细胞增殖活性 CCK-8作用24、48和72 h后,与si-NC组比较,si-PLOD1组细胞增殖活性明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图6。

2.9 2组SCC15细胞划痕愈合率 划痕24和48 h后,与si-NC组($55.49\% \pm 0.57\%$ 和 $89.91\% \pm 2.77\%$)比较,si-PLOD1组SCC15细胞划痕愈合率($28.75\% \pm 2.80\%$ 和 $74.87\% \pm 1.39\%$)降低($P < 0.01$)。见图7。

2.10 2组SCC15细胞中侵袭细胞数 与si-NC组



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with si-NC group.

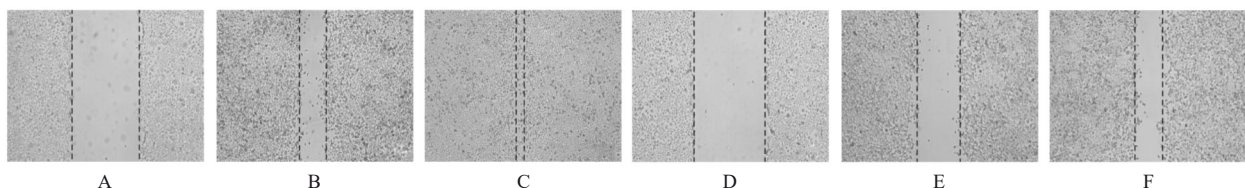
图6 CCK-8法检测不同时间点2组SCC15细胞增殖活性

Fig. 6 Proliferation activities of SCC15 cells in two groups at different time points detected by CCK-8 assay

(230.00 个 ± 14.12 个)比较,si-PLOD1组细胞中侵袭细胞数(121.60 个 ± 17.44 个)减少($P < 0.01$)。见图8。

3 讨论

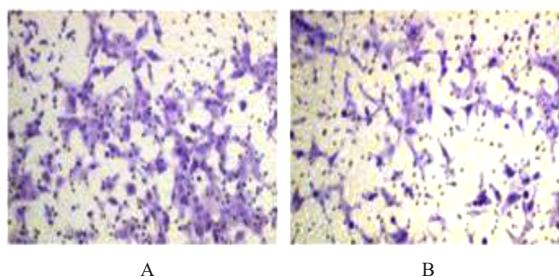
PLOD1异常表达改变了细胞外基质中胶原纤维的形态,有助于形成肿瘤转移的“高速公路”。此外,PLOD1可驱动肿瘤发生和血管生成,为癌细胞的增殖、迁移和侵袭提供了必要的生化和物理支持^[12-14]。目前,已有研究^[8,15]证实:PLOD1在多种恶性肿瘤中异常表达且与肿瘤进展有密切关联;PLOD1在小鼠的卵巢癌组织中表达上调;在胰腺癌组织中PLOD1高表达,并与胰腺癌患者的T分期、组织学和病理学分级有密切关联。本研究基于公共数据库初步探索显示:PLOD1在HNSC组织中高表达,是HNSC患者预后不良的危险因素,而HNSC中OSCC占90%,因此推测PLOD1在OSCC组织中同样呈现高表达。在此基础上,本研究中免疫组织化学方法检测结果显示:PLOD1蛋白在OSCC组织中高表达,其蛋白表达强度与OSCC患者T分期和TNM分期有关联,提示



A—C: Si-NC group; D—F: Si-PLOD1 group; A, D: 0 h; B, E: 24 h; C, F: 48 h.

图7 细胞划痕愈合实验检测2组SCC15细胞划痕愈合情况($\times 40$)

Fig. 7 Scratch healing of SCC15 cells in two groups detected by cell scratch healing assay($\times 40$)



A: Si-NC group; B: Si-PLOD1 group.

图8 Transwell小室实验检测2组 SCC15细胞侵袭情况(结晶紫, $\times 200$)

Fig. 8 Invasion of SCC15 cells in two groups detected by Transwell chamber assay(Crystal violet, $\times 200$)

PLOD1高表达与OSCC患者较高的肿瘤侵袭性有关。一般认为当 $AUC > 0.5$ 时就具有一定诊断预测能力, 本研究中ROC曲线分析结果显示: AUC值为0.811, PLOD1对OSCC患者具有良好的诊断效力; 生存分析显示: PLOD1高表达患者生存率更低, 提示预后不佳。CHEN等^[16]研究发现: 膀胱癌组织中PLOD1表达水平越高, 膀胱癌患者的生存率越低。本研究中COX多因素回归分析显示: PLOD1表达是OSCC患者独立预后指标, 进一步证明PLOD1与OSCC患者预后有关联。同时, 本研究结果显示: 在OSCC细胞中PLOD1 mRNA和蛋白表达水平均升高, 以上结果与既往研究结果和生物信息学分析结果相一致, 充分证实PLOD1高表达可能是促进OSCC进展的重要因素, 可作为OSCC诊断和预后判断的新指标。

增殖、转移和侵袭是肿瘤恶变的重要特征, 其过程受多种机制的调控^[17]。已有研究^[18]证实: 低氧诱导因子1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)可激活胶质瘤细胞中PLOD1转录, 进而上调PLOD1的表达, 增加肿瘤细胞的迁移能力。YAMADA等^[19]发现: miR-140-5p可直接调控膀胱癌细胞中PLOD1的表达, PLOD1抑制剂可明显降低膀胱癌细胞的恶性表型。为进一步分析PLOD1对OSCC细胞生物学行为的影响, 本研究利用siRNA技术沉默SCC15细胞中PLOD1的表达后发现: 转染si-PLOD1后SCC15细胞增殖能力减弱, 迁移和侵袭能力下降。本研究结果与XU等^[20]有关肾细胞癌的研究结果一致, 提示敲低PLOD1的表达, 可以降低OSCC细胞的恶性表型, 间接表明PLOD1可能作为促癌基因参与OSCC的发展, 靶向PLOD1是一种潜在的治疗策略, 但其具体分子机制仍有待进一步研究。

研究^[21-23]证实: 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)信号通路在癌症(包括OSCC)中普遍存在过度激活, 其通过一系列信号调节细胞的生长、分化、存活、代谢和细胞骨架重组。研究^[24]结果显示: PLOD1可以通过激活PI3K/Akt信号传导促进胃癌细胞的增殖和转移, 推测本研究中OSCC细胞增殖、迁移和侵袭能力的降低可能与PI3K/AKT通路受到抑制有关。

综上所述, PLOD1在OSCC组织和细胞中高表达, 与OSCC患者预后不良有关, 是OSCC患者独立预后指标。沉默PLOD1能抑制OSCC细胞的增殖、迁移和侵袭, PLOD1可能是OSCC潜在的治疗靶点和预后标志物。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

郭超杰参与论文选题、实验设计、数据整理和论文撰写, 张佳佳和曾洁参与数据收集, 王晖予和艾尔法提·艾麦尔参与数据整理和分析, 徐江参与论文审校。

[参考文献]

- [1] BUGSHAN A, FAROOQ I. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis[J]. F1000Res, 2020, 9: 229.
- [2] AUPÉRIN A. Epidemiology of head and neck cancers: an update[J]. Curr Opin Oncol, 2020, 32(3): 178-186.
- [3] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [4] QI Y F, XU R. Roles of PLODs in collagen synthesis and cancer progression[J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6: 66.
- [5] FOY M, MÉTAY C, FRANK M, et al. A severe case of PLOD1-related kyphoscoliotic Ehlers-Danlos syndrome associated with several arterial and venous complications: a case report[J]. Clin Case Rep, 2023, 11(2): e6760.
- [6] QI Q, HUANG W H, ZHANG H, et al. Bioinformatic analysis of PLOD family member expression and prognostic value in non-small cell lung cancer[J]. Transl Cancer Res, 2021, 10(6): 2707-2724.

- [7] 何平, 何成彦, 郑岩, 等. PLOD1在结直肠癌组织中的表达及意义[J]. 中国实验诊断学, 2023, 27(3): 273-275.
- [8] ZHANG J, TIAN Y Z, MO S J, et al. Overexpressing PLOD family genes predict poor prognosis in pancreatic cancer[J]. *Int J Gen Med*, 2022, 15: 3077-3096.
- [9] LI T, FAN J, WANG B, et al. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): e108-e110.
- [10] LI C W, TANG Z F, ZHANG W J, et al. GEPIA2021: integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W242-W246.
- [11] NAGY Á, MUNKÁCSY G, GYÓRFFY B. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 6047.
- [12] CHEN Y L, GUO H F, TERAJIMA M, et al. Lysyl hydroxylase 2 is secreted by tumor cells and can modify collagen in the extracellular space [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(50): 25799-25808.
- [13] SUN Y W, WANG S, ZHANG X W, et al. Identification and validation of PLOD2 as an adverse prognostic biomarker for oral squamous cell carcinoma[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(12): 1842.
- [14] 邝新红, 卫晓慧, 孙立, 等. 胶原翻译后修饰酶与肿瘤关系的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(12): 1085-1089.
- [15] GUO T, GU C, LI B, et al. PLODs are overexpressed in ovarian cancer and are associated with gap junctions via connexin 43[J]. *Lab Invest*, 2021, 101(5): 564-569.
- [16] CHEN R, JIANG M, HU B, et al. Comprehensive analysis of the expression, prognosis, and biological significance of PLOD family in bladder cancer[J]. *Int J Gen Med*, 2023, 16: 707-722.
- [17] 田堰鑫, 李娜, 高雷, 等. 肿瘤微环境与肝癌干细胞相互作用对肝细胞癌发生发展的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(3): 684-692.
- [18] WANG Z L, SHI Y P, YING C T, et al. Hypoxia-induced PLOD1 overexpression contributes to the malignant phenotype of glioblastoma via NF- κ B signaling[J]. *Oncogene*, 2021, 40(8): 1458-1475.
- [19] YAMADA Y, KATO M, ARAI T, et al. Aberrantly expressed PLOD1 promotes cancer aggressiveness in bladder cancer: a potential prognostic marker and therapeutic target[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(9): 1898-1912.
- [20] XU F S, GUAN Y B, XUE L, et al. The effect of a novel glycolysis-related gene signature on progression, prognosis and immune microenvironment of renal cell carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 1207.
- [21] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANIE, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer[J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.
- [22] AOKI M, FUJISHITA T. Oncogenic roles of the PI3K/AKT/mTOR axis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 407: 153-189.
- [23] 符良斌, 廖天安, 王鸿, 等. TGF- β 1对人舌鳞状细胞癌上皮-间质转化的诱导作用及其对PI3K/AKT信号通路的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(4): 790-793.
- [24] ZHANG Y X, WU Y J, SU X B. PLOD1 promotes cell growth and aerobic glycolysis by regulating the SOX9/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in gastric cancer[J]. *Front Biosci*, 2021, 26(8): 322-334.