

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2023.06.003

· 基础研究 ·

体外沉默ICMT基因对人唾液腺腺样囊性癌细胞侵袭和迁移的影响

陆洲¹, 宫文红², 许晓², 陈正岗²

1. 潍坊医学院口腔医学院, 山东 潍坊(261021); 2. 青岛大学附属青岛市市立医院口腔医学中心, 山东 青岛(266071)

【摘要】 目的 探讨异戊二烯基半胱氨酸羧基甲基转移酶(isoprene cysteine carboxymethyl transferase, ICMT)基因对唾液腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)细胞迁移和侵袭的影响及相关机制,为SACC的分子靶向治疗提供实验依据。**方法** 体外培养腺样囊性癌细胞SACC-LM和SACC-83,采用脂质体载体瞬时转染的方法,将ICMT siRNA转染至人SACC-LM和SACC-83细胞中(实验组),并分别设置空白对照组和阴性对照组(转染NC-siRNA)。通过qRT-PCR检测转染后各组细胞中ICMT和RhoA的mRNA表达并明确沉默效率;Western blot检测各组的ICMT、膜RhoA、总RhoA、Rho关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶1(Rho associations contain curly helical binding protein kinase 1, ROCK1)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)蛋白表达;通过CCK-8实验检测SACC细胞的增殖能力;通过比较细胞划痕实验的相对愈合面积和Transwell实验细胞穿膜数目,分别检测SACC细胞的迁移和侵袭能力。**结果** SACC-LM和SACC-83细胞转染ICMT-siRNA后,实验组相较于空白对照组和阴性对照组,ICMT mRNA和蛋白表达显著下降($P < 0.05$),但RhoA mRNA和RhoA总蛋白表达均无显著性差异($P > 0.05$);膜RhoA、ROCK1、MMP-2、MMP-9的蛋白表达显著下降($P < 0.05$),细胞增殖能力明显下降($P < 0.05$),迁移和侵袭能力明显降低($P < 0.05$)。**结论** 体外沉默ICMT基因可有效抑制人SACC-LM和SACC-83细胞迁移及侵袭能力,其机制可能与RhoA-ROCK信号通路有关。

【关键词】 腺样囊性癌; RhoA; 异戊二烯基半胱氨酸羧基甲基转移酶; 小干扰RNA; 侵袭; 迁移; Rho关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶1; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-9; RhoA-ROCK信号通路

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2023)06-0400-08

【引用著录格式】 陆洲, 宫文红, 许晓, 等. 体外沉默ICMT基因对人唾液腺腺样囊性癌细胞侵袭和迁移的影响[J]. 口腔疾病防治, 2023, 31(6): 400-407. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2023.06.003.

Effects of ICMT gene silencing on the invasion and migration of human salivary adenoid cystic carcinoma cells *in vitro* LU Zhou¹, GONG Wenhong², XU Xiao², CHEN Zhenggang². 1. College of Stomatology, Weifang Medical University, Weifang 261021, China; 2. Department of Stomatology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Qingdao 266071, China

Corresponding author: CHEN Zhenggang, Email: chenzhg1973@163.com, Tel: 86-532-88905341

【Abstract】 Objective To investigate the effect of isoprene cysteine carboxymethyltransferase (ICMT) gene on the migration and invasion of salivary adenoid cystic cancer cells (SACC) and the related mechanism, to provide experimental evidence for molecular targeted therapy of SACC. **Methods** Adenoid cystic cancer cells SACC-LM and SACC-83 were cultured *in vitro*, and siRNA was transfected into human SACC-LM and SACC-83 cells (experimental group) by transient transfection of a liposome vector. A blank control group and negative control group were set up respectively



微信公众号

【收稿日期】 2022-10-26; **【修回日期】** 2022-12-13

【基金项目】 山东省自然科学基金青年项目(ZR2022QC034)

【作者简介】 陆洲, 住院医师, 硕士, Email: 1362542305@qq.com

【通信作者】 陈正岗, 主任医师, 博士, Email: chenzhg1973@163.com, Tel: 86-532-88905341

(transfected NC-siRNA). qRT-PCR was performed to measure the mRNA expression of ICMT and RhoA in each group after transfection and to determine the silencing efficiency. The expression of ICMT, membrane RhoA, total RhoA, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and Rho associated with coiled helical binding protein kinase 1 (ROCK1) in each group was detected by Western blot. The proliferation abilities of SACC cells was detected by CCK-8 assay. The migration and invasion ability of SACC cells were detected by comparing the relative healing area of cell scratch assay and the number of Transwell assay cells. **Results** After transfection of ICMT-siRNA into SACC-LM and SACC-83 cells, the expression of ICMT gene and protein in the experimental group was significantly decreased compared with the negative control group and blank control group ($P < 0.05$), but there were no significant differences in the expression of RhoA gene and total protein among all groups ($P > 0.05$). The expression of RhoA membrane proteins, ROCK1, MMP-2, MMP-9 in the experimental group was significantly decreased compared with that in the negative control group and blank control group ($P < 0.05$). Cell proliferation ability was significantly decreased ($P < 0.05$). The migration and invasion abilities were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *In vitro* silencing of ICMT gene can effectively inhibit the migration and invasion of human SACC-LM and SACC-83 cells, and the mechanism may be related to RhoA-ROCK signaling pathway.

【Key words】 adenoid cystic carcinoma; RhoA; isoprene cysteine carboxymethyl transferase; small interfering RNA; invade; transfer; Rho associations contain curly helical binding protein kinase 1; matrix metalloproteinase-2; matrix metalloproteinase-9; RhoA-ROCK signaling pathway

J Prev Treat Stomatol Dis, 2023, 31(6): 400-407.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2022QC034).

唾液腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)常见于小唾液腺,还可发生于下颌下腺和腮腺,发生率约为唾液腺恶性肿瘤的10%,其特点为生长缓慢、广泛侵袭周围组织,早期可侵袭血管和神经,远处转移率可高达40%,其中肺转移最为多见,发生肺转移的患者平均生存时间短、预后差,是其致死的主要原因。目前,临床上主要通过综合治疗的方法,即手术、化疗、放疗相结合,进行SACC治疗。随着基础医学的发展,分子靶向治疗成为SACC的新兴治疗手段。

RhoA是Rho家族中最活跃的蛋白之一,其在多种肿瘤细胞中都有表达。研究发现RhoA在口腔癌、肺癌、结肠癌、胃癌、肝癌等高表达^[1-3]。激活的RhoA通过与下游的效应分子结合从而促进肿瘤细胞的信息传导、能量转换、增殖、凋亡等多种功能^[4]。异戊二烯基半胱氨酸羧基甲基转移酶(isoprene cysteine carboxymethyl transferase, ICMT)通过参与RhoA蛋白的翻译后修饰,即催化异戊烯基半胱氨酸的羧基甲基化,调节RhoA的活性和正确的膜定位^[5-6]。有文献报道,沉默ICMT介导的甲基化有效地抑制了体外舌鳞癌细胞的增殖,并减少了体内肿瘤的生长^[7]。此外,ICMT siRNA可减弱CAL-27和SCC-4细胞的迁移和侵袭能力。ICMT缺乏显著降低了RhoA膜靶向定位,导致CAL-27

和SCC-4细胞中RhoA介导的下游信号传导受到抑制^[7-8]。目前有关ICMT基因于SACC侵袭迁移的研究仍然较少。本研究通过小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)技术体外沉默SACC-LM和SACC-83的ICMT基因的表达,探讨对SACC细胞侵袭和迁移的影响及相关机制,为SACC的分子靶向治疗提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

SACC-LM和SACC-83细胞系由青岛大学附属医院口腔科提供,RPMI-1640培养基(武汉益普公司),胰蛋白酶(武汉益普公司,中国),抗生素(武汉益普公司,中国),10%胎牛血清(武汉益普公司,中国),TB Green Premix Ex Taq™试剂盒(TAKARA公司,日本),ICMT基因PCR引物(Proteintech公司,美国),RhoA(Proteintech公司,美国),GAPDH合成(Proteintech公司,美国),ICMT siRNA(广州锐博生物科技有限公司,中国)。兔抗人多克隆抗体ICMT(Abcam公司,英国),RhoA(Abcam公司,英国),Rho关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶1(Rho associations contain curly helical binding protein kinases, ROCK1)(Abcam公司,英国),基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)(Abcam公司,

英国),基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)(Abcam公司,英国),GAPDH抗体(Abcam公司,英国),羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)二抗(Abcam公司,英国),Transwell小室(Abcam公司,英国),细胞膜蛋白、细胞浆蛋白抽提试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。CCK-8试剂盒(MCE公司,美国),恒温孵育箱(Thermo Forma 311, ThermoForma公司,美国),-80℃冰箱(MDF-193,山东博科生物产业有限公司,中国),高速离心机(Megafuge 1.0 R, Heraeus公司,美国),超净实验台(VD-650垂直,上海昆成实验室设备有限公司,中国),实时荧光定量PCR仪(ABI公司,ABI-PRISM 7000,美国)。

1.2 细胞培养和 siRNA 的转染

使用 4 mL RPMI-1640 完全培养基分别培养人 SACC-LM 和 SACC-83 细胞,于 37℃、5% 体积分数 CO₂ 恒温孵育箱中培养。待细胞长至培养瓶底约 80% 后进行胰蛋白酶消化 3 min,加入等量的含血清培养基终止消化,吹打至细胞悬液。将细胞悬液离心后加入 12 mL RPMI-1640 完全培养,继续吹打,使细胞均匀分布于培养基中,按 1:3 的比例传代。针对 ICMT 基因序列设计三条特异性 ICMT-siRNA(表 1),分别为 ICMT-siRNA-1 组、ICMT-siRNA-2 组、ICMT-siRNA-3 组和一条阴性对照序列 NC-siRNA。6 孔板中分别接种人 SACC-LM 和 SACC-83 细胞,密度达到 30%~50% 时进行转染。实验分组为实验组(转染 ICMT-siRNA)、阴性对照组(转染 NC-siRNA)和空白对照组。转染 48 h 后,检测转染效率。

表 1 针对 ICMT 基因序列设计 3 条 ICMTsiRNA

Table 1 Three ICMT siRNA sequences designed for ICMT

| gene | | |
|-------------|------------------------|---------------------|
| Product ID | Product name | Sequences (5'-3') |
| stB0010313A | genOFFTM st-h-ICMT-001 | GAAGAAGAAATCTCACTAA |
| stB0010313B | genOFFTM st-h-ICMT-002 | GTTAGAGTTACACCTTGAA |
| stB0010313C | genOFFTM st-h-ICMT-003 | CTTCCGCGATCGAACAGAA |

1.3 qRT-PCR 检测各组 ICMT、RhoA 的 mRNA 表达

在超净工作台上分别提取实验组、阴性对照组和空白对照组的 RNA,并检测 RNA 的浓度和纯度,遵循 TAKARA 试剂盒说明书的要求合成 cDNA,以 cDNA 为模板行 qRT-PCR 反应。ICMT 引物序列:上游 5'-CGGCATCCTTCTTACGTCGG-3',下游 5'-CCACACTGTCAGGGCATAGC-3'。RhoA 引物序

列:上游 5'-TGTGGCAGATATCGAGGTGGATGG-3',下游 5'-GGCCTCAGGCGATCATAATCTTCC-3'。内参 GAPDH 引物序列:上游 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游 5'-TGTTGAAGACGC-CAGTGGGA-3'。每组均设 3 个副孔。将 ABI-PRISM 7000 实时荧光定量 PCR 仪提前设置好反应步骤(95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s,共 40 个循环)进行 qRT-PCR 检测,根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分别计算实验组、阴性对照组和空白对照组的 ICMT 和 RhoA mRNA 的相对表达量,实验组选择 RNA 表达量最低的一组进行后续实验。实验重复 3 次。

1.4 Western blot 检测各组 ICMT、膜 RhoA、总 RhoA、MMP-2、MMP-9、ROCK1 蛋白表达

在超净工作台上分别提取实验组、阴性对照组和空白对照组的细胞总蛋白和膜蛋白。遵循说明书要求用磷酸盐缓冲溶液稀释。将 96 孔板每相应的孔中加入 2 μL 样品,使用酶标仪测定 A562 的吸光度,测算蛋白质浓度。配胶,上样,连接电泳装置进行电泳,当蛋白质在电极的作用下移动到凝胶底部时结束电泳。选取大小合适的 PVDF 膜,在 4℃、100 V 的条件下开始转膜。转膜结束后将 PVDF 膜取出,放入配制好的 5% 的脱脂奶粉中,将容器放到室温下封闭震荡摇床 1 h,加入一抗(ICMT, 1:1 000; RhoA, 1:5 000; ROCK1, 1:1 000; MMP-2, 1:1 000; MMP-9, 1:1 000; GAPDH, 1:5 000),4℃ 孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次。室温下摇床上孵育二抗(1:50 000)1 h。0.1% 三羟甲基氨基甲烷缓冲液洗膜 3 次。配制 ECL 溶液,加到 PVDF 膜上,进行显色反应。分别检测 ICMT、膜 RhoA、总 RhoA、MMP-2、MMP-9、ROCK1 蛋白的表达。使用 Image J 软件进行条带的灰度值分析。

1.5 CCK-8 细胞增殖实验

分别将空白对照组、阴性对照组和沉默效率最高实验组细胞以每孔 2×10^3 个细胞密度接种于 96 孔板当中,待细胞生长至 30% 时进行转染。转染后放置孵育箱中进行培养,分别将转染 0、24、48、72 h 后的 96 孔板取出,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,放于孵育箱中培养 2 h。使用酶标仪检测波长 450 nm 的光密度值。实验重复 3 次。

1.6 细胞划痕实验

将空白对照组、阴性对照组和沉默效率最高实验组细胞分别接种于 6 孔板中,待细胞铺满 6 孔板 80%~90% 时,使用无菌枪头沿直尺在 6 孔板中央画直线,用磷酸盐缓冲液冲去划下的细胞,加

入无血清培养基显微镜下观察0 h划痕面积,再置于培养箱中培养24 h,观察24 h划痕面积。使用Image J软件进行分析。测量相对愈合面积=(划痕面积_{0h}-划痕面积_{24h})/划痕面积_{0h}。实验重复3次。

1.7 Transwell侵袭实验

将24孔板中的Transwell小室铺好基质胶,分别于上下室加入500 μL无血清培养基,37℃培养箱中水化2 h。空白对照组、阴性对照组和沉默效率最高的实验组使用无血清培养基将细胞重悬。Transwell上室中加入吹打均匀的细胞悬液(2×10⁵个/mL),下室中加入750 μL含10%胎牛血清的1640培养液。将24孔板放入孵育箱中,细胞侵袭48 h后,使用磷酸盐缓冲溶液冲洗,消毒棉签轻轻擦去上室未侵袭细胞,多聚甲醛固定细胞30 min,将小室放入结晶紫中染色30 min,磷酸盐缓冲溶液轻轻洗去多余结晶紫,注意不能把染色细胞洗掉。显微镜下观察癌细胞的穿膜数目并记

录。实验重复3次。

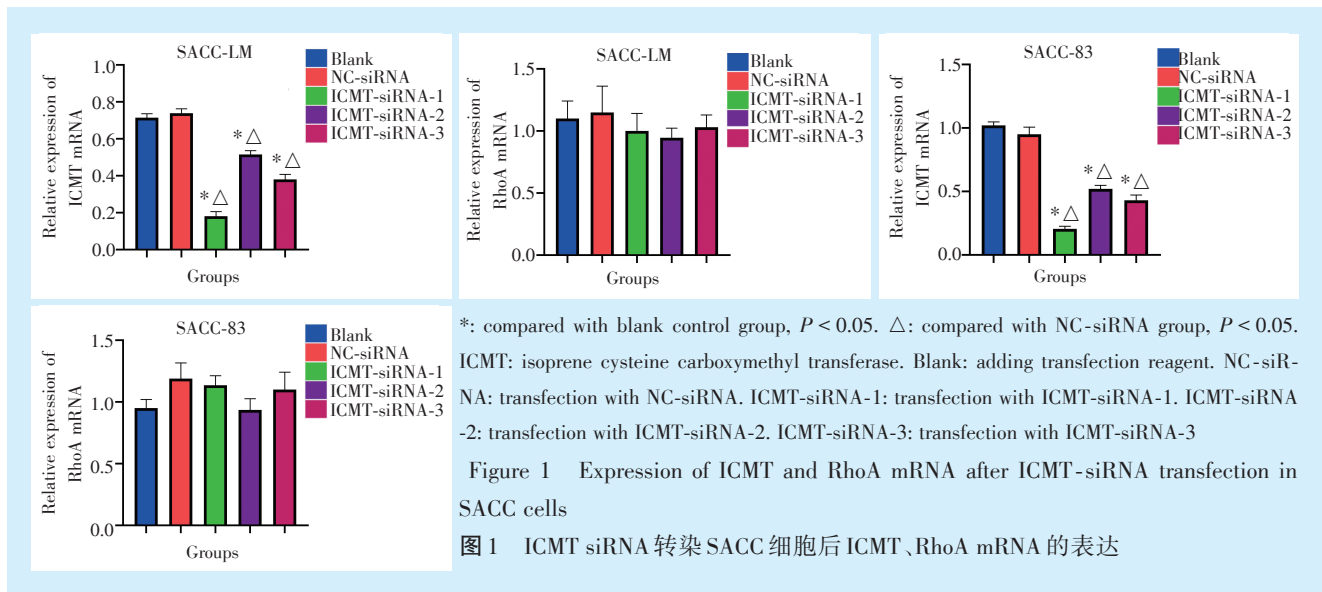
1.8 统计学分析

采用SPSS 25.0对实验结果进行数据分析。计量资料的组间比较用*t*检验,多组间比较用单因素方差分析,以*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染ICMT siRNA后各组ICMT和RhoA的mRNA表达水平

qRT-PCR结果显示,相较于空白对照组和阴性对照组,实验组ICMT的mRNA表达量明显下降($F_{LM} = 739.0, F_{83} = 842.0, P < 0.05$)。其中ICMT-siRNA-1组的ICMT mRNA沉默效率高于ICMT-siRNA-2组和ICMT-siRNA-3组,选择ICMT-siRNA-1组作为后续实验组研究的对象。相较于空白对照组和阴性对照组,实验组RhoA的mRNA表达量无明显差异($F_{LM} = 34.0, F_{83} = 23.0, P > 0.05$)(图1)。



2.2 转染ICMT siRNA后各组侵袭迁移相关蛋白的表达水平

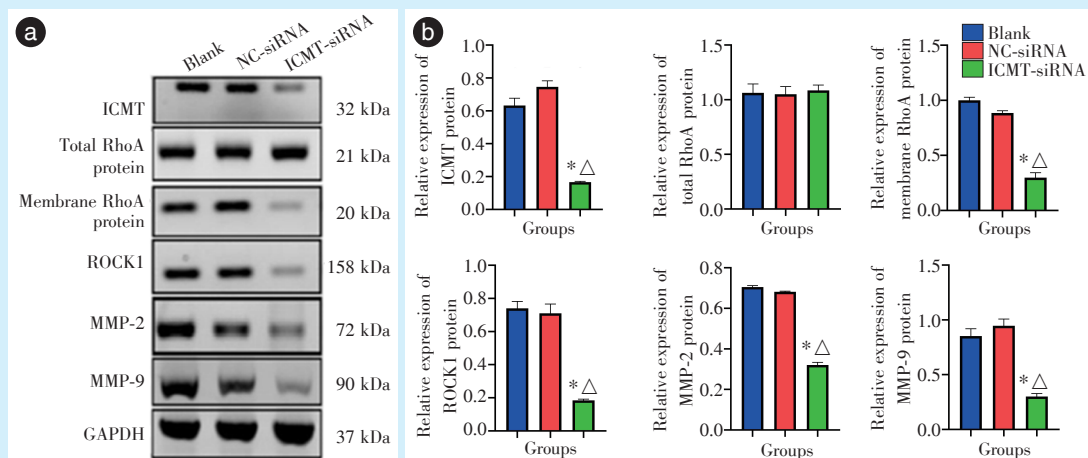
Western blot实验结果显示,相较于空白对照组和阴性对照组,实验组ICMT蛋白、RhoA膜蛋白、ROCK1蛋白、MMP-2、MMP-9的表达水平明显下降($F_{LM-ICMT} = 126.4, F_{LM-RhoA膜蛋白} = 266.4, F_{LM-ROCK1} = 130.6, F_{LM-MMP-2} = 562.5, F_{LM-MMP-9} = 244.8; F_{83-ICMT} = 133.4, F_{83-RhoA膜蛋白} = 279.5, F_{83-ROCK1} = 130.6, F_{83-MMP-2} = 556.6, F_{LM-MMP-9} = 256.5, P < 0.05$), RhoA总蛋白各组表达水平无明显改变($F_{LM-RhoA总蛋白} = 656.4; F_{LM-RhoA总蛋白} = 665.5, P > 0.05$)(图2、图3)。

2.3 转染ICMT siRNA对SACC-LM和SACC-83细胞增殖能力的影响

细胞增殖实验显示(图4),转染0、24、48、72 h后,相较于空白对照组和阴性对照组,实验组细胞增殖能力明显下降,差异有统计学意义($F_{LM} = 337.0; F_{83} = 298.7, P < 0.05$),表明细胞增殖能力降低。

2.4 转染ICMT siRNA对SACC-LM和SACC-83细胞迁移能力的影响

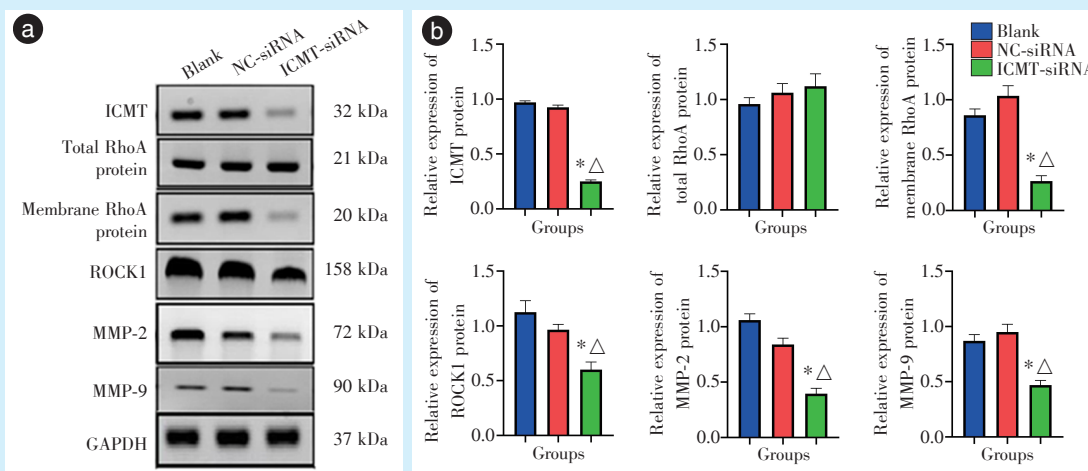
细胞划痕实验显示(图5),相较于空白对照组和阴性对照组,实验组24 h相对愈合面积均明显下降,差异有统计学意义($F_{LM} = 664.0; F_{83} = 689.0$,



a: the electrophoretic graph of ICMT, total RhoA, membrane RhoA, ROCK1, MMP-2 and MMP-9 proteins detected by Western blot. b: the relative expression levels of ICMT, total RhoA and membrane RhoA proteins. *: compared with blank control group, $P < 0.05$. Δ : compared with NC-siRNA group, $P < 0.05$. SACC: salivary adenoid cystic carcinoma. ICMT: isoprene cysteine carboxymethyl transferase. RhoA: Ras homolog gene family, member A. ROCK1: Rho associations contain curly helical binding protein kinase 1. MMP: matrix metalloproteinase. Blank: adding transfection reagent. NC-siRNA: transfection with NC-siRNA. ICMT-siRNA: transfection with ICMT-siRNA-1

Figure 2 The expression of invasion and migration related proteins after ICMT siRNA transfection in SACC-LM cells

图2 ICMT siRNA 转染 SACC-LM 细胞后的侵袭、迁移相关蛋白表达



a: the electrophoretic graph of ICMT, total RhoA, membrane RhoA, ROCK1, MMP-2 and MMP-9 proteins detected by Western blot. b: the relative expression levels of ICMT, total RhoA and membrane RhoA proteins. *: compared with blank control group, $P < 0.05$. Δ : compared with NC-siRNA group, $P < 0.05$. SACC: salivary adenoid cystic carcinoma. ICMT: isoprene cysteine carboxymethyl transferase. RhoA: Ras homolog gene family, member A. ROCK1: Rho associations contain curly helical binding protein kinase 1. MMP: matrix metalloproteinase. ICMT: isoprene cysteine carboxymethyl transferase. Blank: adding transfection reagent. NC-siRNA: transfection with NC-siRNA. ICMT-siRNA: transfection with ICMT-siRNA-1

Figure 3 The expression of invasion and migration proteins after ICMT-siRNA transfection in SACC-83 cells

图3 ICMT siRNA 转染 SACC-83 细胞后的侵袭、迁移相关蛋白表达

$P < 0.05$), 表明转染 ICMT-siRNA 后癌细胞的迁移能力下降。

2.5 转染 ICMT siRNA 对 SACC-LM 和 SACC-83 细胞侵袭能力的影响

Transwell 细胞侵袭实验显示(图 6), 转染 48 h

后, 相较于空白对照组和阴性对照组, 实验组侵袭细胞数明显下降, 差异有统计学意义 ($F_{LM} = 939.0, F_{83} = 1\ 002.0, P < 0.05$), 表明细胞侵袭能力降低。

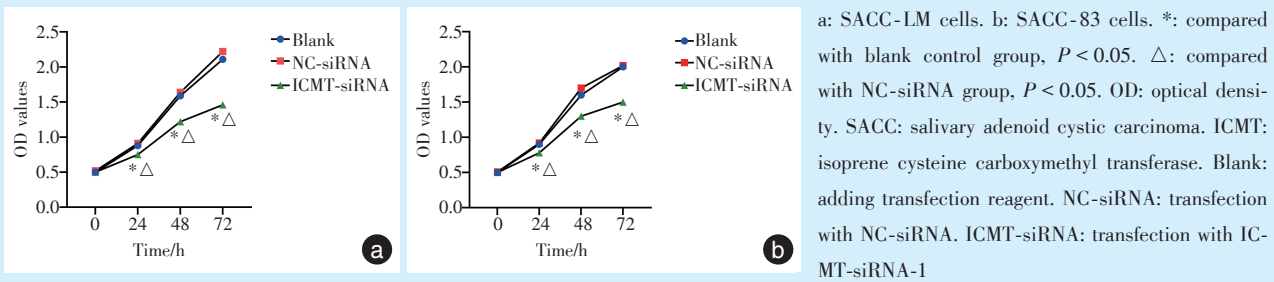


Figure 4 Effect of ICMT-siRNA transfection on SACC cell proliferation capacity

图4 ICMT siRNA 转染对 SACC 细胞增殖能力的影响

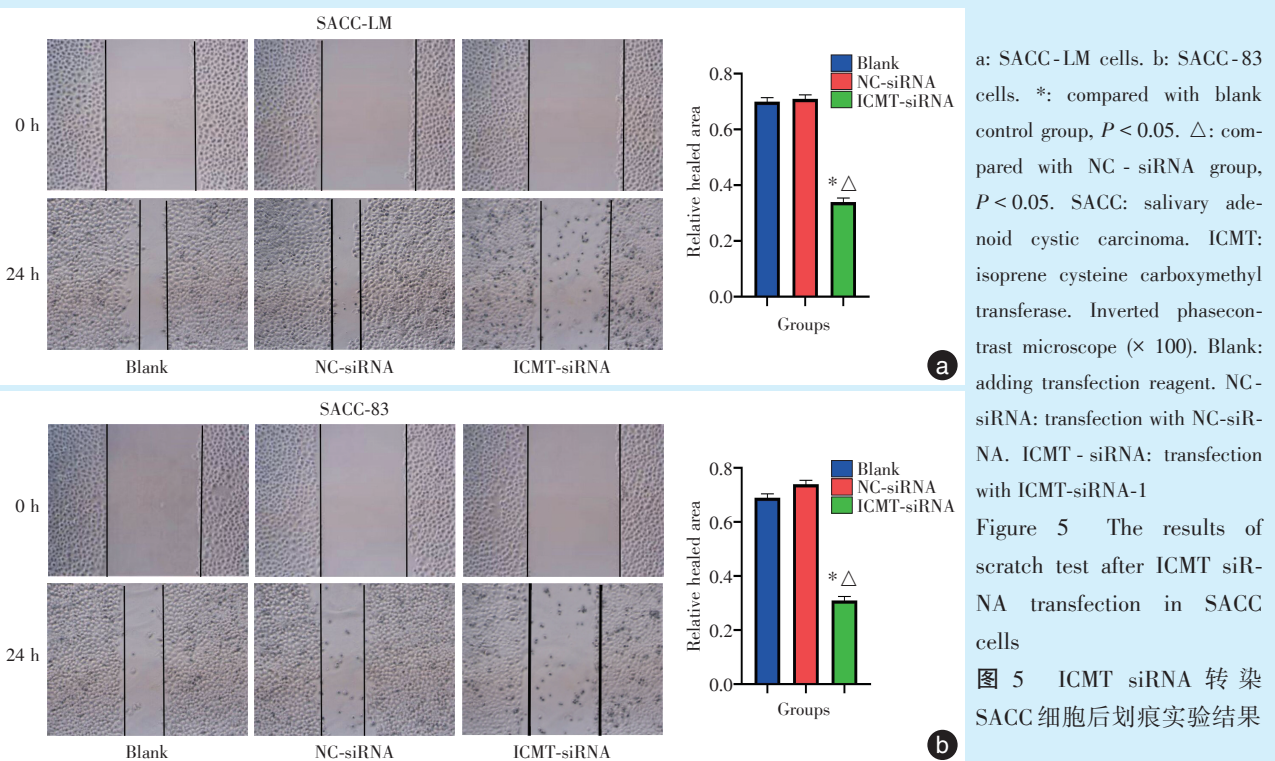


Figure 5 The results of scratch test after ICMT siRNA transfection in SACC cells

图5 ICMT siRNA 转染 SACC 细胞后划痕实验结果

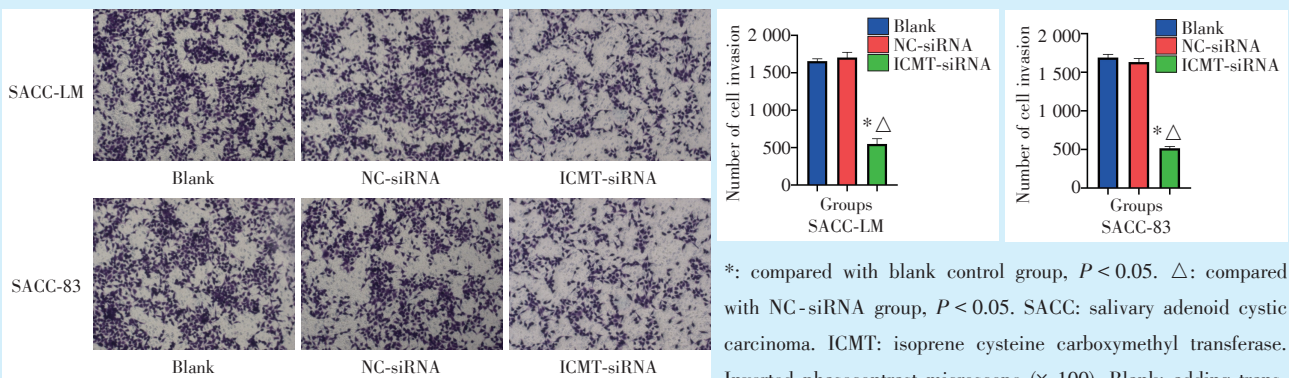


Figure 6 The results of Transwell invasion assay after ICMT siRNA transfection in SACC cells

图6 ICMT siRNA 转染 SACC 细胞后 Transwell 侵袭实验结果

3 讨论

研究显示, ICMT与恶性肿瘤的生物学行为密切相关。抑制ICMT的蛋白表达可能会诱导细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的生长增殖功能^[9]。沉默ICMT基因后,肿瘤细胞中线粒体氧化磷酸化的功能受到抑制,从而使肿瘤细胞的生长减慢^[10]。ICMT受到抑制后,乳腺癌细胞的迁移能力显著降低^[11]。

ICMT基因是一种翻译后修饰的蛋白,可以修饰带有-CAAX残基的蛋白质^[12],如Ras蛋白和Rho蛋白。Rho蛋白在行使功能时要经过一系列步骤的修饰,其中异戊烯化和甲基化是至关重要的一步。通过修饰产生疏水性羟基末端,蛋白质可以定位在细胞膜上^[13]。ICMT活性降低,会影响Rho蛋白的甲基化,从而抑制了Rho蛋白介导的生物学行为^[14]。RhoA是Rho家族中的一员,RhoA蛋白末端含有-CAAX残基,RhoA激活后与胞膜稳定结合,可影响癌细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移等多种生物学行为,但RhoA在细胞内合成后必须依赖于ICMT等翻译蛋白修饰才能获得与细胞膜的稳定结合进而发挥生物活性作用^[7]。

本实验将ICMT-siRNA转染至SACC-LM和SACC-83细胞中沉默ICMT基因,从而降低了ICMT蛋白的表达。实验组和对照组相比,RhoA mRNA的表达量和RhoA总蛋白均无明显差异,但RhoA膜蛋白表达降低。因此推测在SACC细胞中,ICMT的降低只影响RhoA定位在细胞膜上而不影响RhoA总蛋白的表达。

细胞增殖是其侵袭迁移的基础。细胞线粒体中的脱氢酶可以将CCK-8试剂氧化为黄色甲臞产物(Formazan),生成的甲臞产物具有水溶性并且活细胞数量越多生成的甲臞产物数量越多。使用酶标仪检测波长450 nm的光密度值,可以间接反应活细胞的数量。本研究CCK-8细胞增殖实验结果显示,实验组相比于空白对照组和阴性对照组,细胞增殖能力明显下降。通过比较细胞划痕实验的相对愈合面积和Transwell实验细胞穿膜数目,本研究结果显示,SACC细胞的迁移和侵袭能力均有明显下降。因此推测,通过降低ICMT的活性从而降低了RhoA蛋白的甲基化和其正确的膜定位,使其无法正确与细胞膜稳定结合,进一步影响了RhoA参与的生物学行为。推测ICMT可能影响SACC细胞的侵袭、迁移。

Rho关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶(ROCK)是RhoA最直接的下游效应分子,分为ROCK1和ROCK2两种亚型,ROCK1在几乎所有组织中普遍表达。研究证实,ROCK的激活可能影响细胞骨架的变化,导致细胞迁移和细胞-细胞或细胞-基质黏附等细胞事件的改变,肿瘤细胞的侵袭转移和恶性程度往往与ROCK1蛋白的高表达密切相关^[15-16]。本研究结果显示,降低ICMT的表达后,实验组相较于对照组的RhoA下游的ROCK1、MMP-2和MMP-9蛋白表达也显著下降。文献报道^[17],Rho GTP酶可影响ROCK1蛋白介导的细胞骨架重排,从而改变细胞的生物学行为。RhoA能够与下游的效应分子ROCK结合,从而激活RhoA-ROCK信号通路,诱导肿瘤血管的生成,并且可以提高肿瘤细胞穿过血管内皮向远处转移的几率。研究显示,RhoA参与RhoA-ROCK1信号通路,可使肌动蛋白中的应力纤维结构更强^[18]。本研究中,实验组肿瘤细胞的迁移侵袭能力下降,推测可能是通过抑制ICMT蛋白的表达,从而降低了RhoA蛋白的甲基化和膜定位,降低了RhoA的活性,影响RhoA-ROCK信号通路,从而改变SACC细胞的迁移、侵袭能力。

肿瘤细胞通过再塑细胞外基质和改变细胞和细胞基质的黏附来完成侵袭迁移。MMPs是一种重要的蛋白酶家族,其在肿瘤的发生、转移和侵袭中均发挥关键作用^[19],它可以降解细胞外基质和细胞基底膜,尤其是MMP-2和MMP-9。MMP-2和MMP-9存在于细胞内和细胞膜上,属于锌(Zn^{2+})依赖性内肽酶,它可以消减一系列生物蛋白,与多种恶性疾病都有关,并且对SACC的侵袭和转移发挥关键作用^[20]。本研究中,抑制ICMT基因表达后,实验组相较于对照组MMP-2和MMP-9的表达均有明显降低,因此可以推断ICMT基因可能与SACC细胞的迁移、侵袭呈正相关。

综上所述,沉默ICMT后,实验组与对照组相比,RhoA总蛋白无明显差异,但RhoA膜蛋白、ROCK1、MMP-2和MMP-9表达量均有明显降低。可以推测ICMT与SACC细胞的迁移及侵袭密切相关,其机制可能是通过阻止RhoA甲基化和膜定位,从而抑制RhoA-ROCK1信号通路。

【Author contributions】 Lu Z processed the research and wrote the article. Gong WH, Xu X analyzed the data. Chen ZG designed the study, reviewed the article. All authors read and approved the final man-

uscript as submitted.

参考文献

- [1] Chen Y, Ma D, Wang X, et al. Calnexin impairs the antitumor immunity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(1): 123-135. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0124.
- [2] Yang X, Zheng F, Zhang S, et al. Loss of RhoA expression prevents proliferation and metastasis of SPCA1 lung cancer cells *in vitro*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 69: 361-366. doi: 10.1016/j.biopha.2014.12.004.
- [3] Yao J, Gao P, Xu Y, et al. α -TEA inhibits the growth and motility of human colon cancer cells *via* targeting RhoA/ROCK signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2534-2540. doi: 10.3892/mmr.2016.5525.
- [4] Cox AD, Der CJ, Philips MR. Targeting RAS membrane association: back to the future for anti-RAS drug discovery?[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(8): 1819-1827. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3214.
- [5] Humphries B, Wang Z, Yang C. Rho GTPases: big players in breast cancer initiation, metastasis and therapeutic responses[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2167. doi: 10.3390/cells9102167.
- [6] Kim JG, Islam R, Cho JY, et al. Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6381-6392. doi: 10.1002/jcp.26487.
- [7] Wang S, Wang W, Zhang S, et al. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase promotes the progression of tongue squamous cell carcinoma *via* the K-Ras and RhoA signaling pathways[J]. *Arch Oral Biol*, 2022, 134: 105320. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105320.
- [8] Chai TF, Manu KA, Casey PJ, et al. Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase is required for the impact of mutant KRAS on TAZ protein level and cancer cell self-renewal[J]. *Oncogene*, 2020, 39(31): 5373-5389. doi: 10.1038/s41388-020-1364-7.
- [9] Kramer K, Harrington EO, Lu Q, et al. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase activity modulates endothelial cell apoptosis[J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(3): 848-857. doi: 10.1091/mbc.e02-07-0390.
- [10] Teh JT, Zhu WL, Ilkayeva OR, et al. Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase regulates mitochondrial respiration and cancer cell metabolism[J]. *Oncogene*, 2015, 34(25): 3296-3304. doi: 10.1038/onc.2014.260.
- [11] Buchanan MS, Carroll AR, Fechner GA, et al. Small-molecule inhibitors of the cancer target, isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase, from *Hovea parvicalyx*[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(9): 1886-1889. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.04.011.
- [12] Svensson AW, Casey PJ, Young SG, et al. Genetic and pharmacologic analyses of the role of Icmt in ras membrane association and function[J]. *Methods Enzymol*, 2006, 407: 144-159. doi: 10.1016/S0076-6879(05)07013-8.
- [13] Choy E, Chiu VK, Silletti J, et al. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi[J]. *Cell*, 1999, 98(1): 69-80. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80607-8.
- [14] Lu Q, Harrington EO, Hai CM, et al. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase modulates endothelial monolayer permeability: involvement of RhoA carboxyl methylation[J]. *Circ Res*, 2004, 94(3): 306-315. doi: 10.1161/01.RES.0000113923.85084.C1.
- [15] Dopeso H, Rodrigues P, Bilic J, et al. Mechanisms of inactivation of the tumour suppressor gene *RHOA* in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2018, 118(1): 106-116. doi: 10.1038/bjc.2017.420.
- [16] Tanaka K, Matsumoto Y, Ishikawa H, et al. Impact of RhoA overexpression on clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma treated with concurrent chemoradiotherapy[J]. *J Radiat Res*, 2019, 61(1): 221-230. doi: 10.1093/jrr/rrz093.
- [17] Ros M, Nguyen AT, Chia J, et al. ER-resident oxidoreductases are glycosylated and trafficked to the cell surface to promote matrix degradation by tumour cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(11): 1371-1381. doi: 10.1038/s41556-020-00590-w.
- [18] Piquet L, Robbe T, Neaud V, et al. Rnd3/RhoE expression is regulated by G-actin through MKL1-SRF signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 370(2): 227-236. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.06.023.
- [19] Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147: 1-73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.
- [20] Grzelczyk WL, Szemraj J, Józefowicz-Korczyńska M. The matrix metalloproteinase in larynx cancer[J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2016, 70(10): 1190-1197.

(编辑 张琳,曾曙光)



官网