

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.202440243

· 基础研究 ·

RAD54L在口腔鳞状细胞癌中的表达及功能研究

曹显¹, 陈佳琳², 张锐³, 过新民²

1. 暨南大学附属广州红十字会医院口腔科, 广东 广州(510220); 2. 暨南大学附属广州红十字会医院超声医学科, 广东 广州(510220); 3. 暨南大学附属广州红十字会医院急诊医学科, 广东 广州(510220)

【摘要】 目的 探讨DNA修复重组RAD54样蛋白(RAD54-like protein, RAD54L)在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)中的表达及功能作用。方法 利用癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中OSCC相关数据,通过Mann-Whitney U检验分析RAD54L在OSCC与对照样本中的表达差异,并采用受试者工作特征曲线评估RAD54L在OSCC诊断中的潜在价值。通过卡方检验分析RAD54L mRNA表达水平与OSCC患者临床病理数据之间的关系。将OSCC样本根据RAD54L mRNA表达中位值分为高低表达两组后,采用Cox回归分析比较两组的预后差异;采用DESeq2软件包筛选组间的差异表达基因,并利用clusterProfiler包进行KEGG通路富集分析。采用Spearman相关性分析展示RAD54L与同源重组修复途径中基因表达的相关性。在明确RAD54L的生物信息学意义后,在人OSCC细胞株HSC-3中进行RAD54L基因敲低实验,并通过qRT-PCR验证敲低效率。转染后,通过CCK-8、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)染色、细胞划痕、细胞凋亡及细胞周期实验,评估HSC-3细胞增殖、迁移、凋亡及周期的变化。结果 生物信息学分析结果显示,RAD54L mRNA在OSCC中的表达高于正常对照组($P < 0.001$),且对预后不良的预测具有较高价值($AUC = 0.927$)。RAD54L高表达组男性患者比例增加($P = 0.032$),具有更高的T分期($P = 0.040$)、临床分期($P = 0.027$)及病理学分级($P = 0.013$)。以RAD54L mRNA表达中位值将OSCC样本分为高低表达两组后,RAD54L高表达组的预后较较低表达组差($P = 0.049$);RAD54L高低表达两组间的差异表达基因主要富集于神经活性配体与受体的相互作用、细胞因子-细胞因子受体相互作用、钙信号通路、细胞周期、胃癌、细胞外基质受体相互作用、化学致癌-DNA加合物、DNA复制、同源重组和错配修复途径($P < 0.05$),在同源重组修复途径中RAD54L的表达与BRCA1、BLM、EME1、XRCC2、POLD1、TOPBP1、RAD51、BRIP1、RAD54B、BRCA2和SYCP3的表达呈正相关($P < 0.05$),其中与BRCA1、BLM和EME1的表达呈强正相关($R > 0.8, P < 0.05$)。体外实验结果表明,RAD54L在HSC-3细胞中的表达被敲低至约25%($P < 0.001$),与对照组相比,RAD54L敲低组的增殖率降低($P < 0.05$),EdU阳性细胞比例下降($P < 0.001$),划痕闭合比例降低($P < 0.001$),G1期细胞比例增加($P < 0.001$),S期细胞比例降低($P < 0.001$),细胞凋亡比例增加($P < 0.001$)。结论 RAD54L在OSCC中高表达且与不良预后相关。下调RAD54L表达可抑制HSC-3细胞的增殖和迁移,促进细胞凋亡,并阻碍细胞周期进程。

【关键词】 同源重组修复基因; RAD54L; 口腔鳞状细胞癌; 预后; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期; 生物信息学分析

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2024)11-0853-10

【引用著录格式】 曹显, 陈佳琳, 张锐, 等. RAD54L在口腔鳞状细胞癌中的表达及功能研究[J]. 口腔疾病防治, 2024, 32(11): 853-862. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.202440243.

Study on the expression and function of RAD54L in oral squamous cell carcinoma CAO Xian¹, CHEN Jialin², ZHANG Rui³, GUO Xinmin². 1. Department of Stomatology, Guangzhou Red Cross Hospital of Jinan University, Guangzhou 510220, China; 2. Department of Ultrasound Medicine, Guangzhou Red Cross Hospital of Jinan University, Guangzhou 510220, China; 3. Department of Emergency Medicine, Guangzhou Red Cross Hospital of Jinan University, Guangzhou 510220, China



微信公众号

【收稿日期】 2024-07-01; **【修回日期】** 2024-09-03

【基金项目】 广东省自然科学基金项目(2020A1515010816);广州市市校(院)企联合资助基础与应用基础研究项目(2024A03J0676)

【作者简介】 曹显, 主治医师, 硕士, Email: caoxian2244@hotmail.com

【通信作者】 过新民, 主任医师, 博士, Email: guo8186@126.com, Tel: 86-20-61883602

versity, Guangzhou 510220, China.

Corresponding author: GUO Xinmin, Email: guo8186@126.com, Tel: 86-20-61883602

【Abstract】 Objective To investigate the expression and role of the DNA repair and recombination protein RAD54-like (RAD54L) in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** Using OSCC-related data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, the difference in RAD54L expression between OSCC and control samples was analysed using the Mann-Whitney rank sum test, and the potential value of RAD54L mRNA in OSCC diagnosis was assessed using the receiver operator characteristic curve. The correlation between RAD54L expression levels and clinicopathological data of OSCC patients was analysed using the chi-square test. Once OSCC samples were divided into two groups of high and low expression based on the median value of RAD54L mRNA expression, Cox regression analysis was used to compare the prognostic differences between the two groups. The differentially expressed genes between the groups were subsequently screened using the DESeq2 package, and KEGG pathway enrichment analysis was performed using the clusterProfiler package. The correlation between RAD54L mRNA and gene expression in the homologous recombination repair pathway was demonstrated by Spearman correlation analysis. After clarifying the bioinformatics significance of RAD54L, RAD54L knockdown experiments were performed in human oral squamous carcinoma cell line HSC-3, and the knockdown efficiency was verified through real-time quantitative polymerase chain reaction. After transfection, the changes in proliferation, migration, apoptosis, and cycle of HSC-3 cells were assessed by CCK-8, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining, wound healing, apoptosis, and cell cycle assays. **Results** Bioinformatics analysis showed that the expression of RAD54L mRNA was higher in OSCC than in normal controls ($P < 0.001$) and had a high value in predicting poor prognosis ($AUC = 0.927$). The high RAD54L expression group was associated with an increased proportion of male patients ($P = 0.032$), having a higher T-stage ($P = 0.040$), clinical stage ($P = 0.027$), and pathological grading ($P = 0.013$). Once OSCC samples were divided into two groups of high and low expression using the median value of RAD54L mRNA expression, the prognosis of the group with high expression of RAD54L was poorer than that of the group with low expression ($P = 0.049$). The differentially expressed genes between the high and low RAD54L expression groups two groups were mainly enriched in neuroactive ligand-receptor interactions, cytokine-cytokine receptor interactions, calcium signaling pathway, cell cycle, gastric cancer, extracellular matrix receptor interactions, chemical carcinogenesis-DNA adducts, DNA replication, homologous recombination, and mismatch repair pathways ($P < 0.05$). In the homologous recombination repair pathway, the expression of RAD54L was positively correlated with the expression of BRCA1, BLM, EME1, XRCC2, POLD1, TOPBP1, RAD51, BRIP1, RAD54B, BRCA2, and SYCP3 ($P < 0.05$), and was strongly positively correlated with the expression of BRCA1, BLM, and EME1 ($R > 0.8$, $P < 0.05$). The results of *in vitro* experiments showed that RAD54L expression was knocked down to approximately 25% in HSC-3 cells ($P < 0.001$). Compared with the control group, the RAD54L knockdown group showed a lower proliferation rate ($P < 0.05$), a lower proportion of EdU-positive cells ($P < 0.001$), a lower proportion of wound closure ($P < 0.001$), a higher proportion of G1-phase cells ($P < 0.001$), a lower proportion of S-phase cells ($P < 0.001$), and a higher proportion of apoptotic cells ($P < 0.001$). **Conclusion** RAD54L is highly expressed in OSCC and correlates with poor prognosis. Down-regulation of RAD54L expression inhibits the proliferation and migration of HSC-3 cells, promotes apoptosis, and impedes cell cycle progression.

【Key words】 homologous recombination repair gene; RAD54L; oral squamous cell carcinoma; prognosis; cell proliferation; cell apoptosis; cell cycle; bioinformatics analysis

J Prev Treat Stomatol Dis, 2024, 32(11): 853-862.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2020A1515010816); Basic and Applied Basic Research Project Funded by Guangzhou Municipal Schools (Institutes) (No. 2024A03J0676)

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)患者的长期生存率和临床预后不容乐观^[1-2]。尽管近年来诊疗技术不断进步,但OSCC的5年生存率仍未显著改善,突显了探索新的分子机

制和治疗靶点的迫切需求。OSCC的主要危险因素包括烟草、酒精、槟榔以及人乳头瘤病毒感染等,这些因素中大部分都可导致口腔黏膜细胞的DNA受损^[3-4]。近年的研究发现与DNA损伤反应

(DNA damage response, DDR)相关的基因在肿瘤细胞中常发生突变和失调^[5],并且随着肿瘤细胞中DNA修复能力的降低以及DNA损伤水平的不断增加,可导致癌基因激活或肿瘤抑制因子丢失,最终促进肿瘤的进展^[6]。为了应对DNA损伤,细胞通常依赖于两种主要的修复途径,即非同源末端连接和同源重组(homologous recombination, HR)^[7]。同源重组修复(homologous recombination repair, HRR)通过利用完整的姐妹染色单体作为修复模板来准确修复DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DSBs)。然而,HRR中关键基因功能错误的出现可能导致基因组不稳定性的增加,进而引发突变积累、细胞死亡和肿瘤发生^[8]。因此,深入研究HRR通路中的关键基因在OSCC中的表达和功能,不仅有助于理解OSCC的发病机制,还可能为开发新的诊断标志物和治疗靶点提供重要线索。

DNA修复重组RAD54样蛋白(RAD54-like protein, RAD54L)属于DNA依赖性ATP酶SWI/SNF染色质重塑复合物2家族成员,是HRR途径中的关键基因,与DNA修复蛋白RAD51一起构成了HRR机制的重要组成部分,通过形成联合分子来挽救折叠的复制叉,确保了单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)间隙的正确密封^[9]。RAD54L的这一功能对于维持基因组稳定性和细胞周期进程至关重要,暗示其可能在肿瘤发生和进展中扮演关键角色。除了参与HRR外,RAD54L还在多种肿瘤的发生和进展中发挥重要作用。在肝癌中RAD54L的高表达与肿瘤分期升高和不良总体生存率相关,并促进肝癌细胞的增殖和转移^[10]。在肺腺癌中RAD54L的表达显著升高,高表达与较差的总生存期相关^[11]。在膀胱癌中RAD54L的高表达同样与患者预后不良相关,并通过改变细胞周期和细胞衰老促进异常的膀胱肿瘤细胞增殖^[12]。这些研究结果表明,RAD54L可能是一个潜在的泛癌症生物标志物和治疗靶点。然而,RAD54L在OSCC发生或进展中的具体作用尚未明确。因此,本研究旨在利用TCGA数据库中OSCC样本的RAD54L表达数据和临床信息进行深入分析,并通过体外实验探讨RAD54L在OSCC细胞中的潜在作用。期望初步揭示RAD54L在OSCC中的潜在生物学功能,为未来深入研究和开发相关治疗策略提供重要的实验基础。

1 资料和方法

1.1 主要试剂与仪器

人OSCC细胞株HSC-3(上海语纯生物科技有限公司,中国);胎牛血清(10270106, Gibco, 美国);青霉素-链霉素溶液(15140-122, Gibco, 美国);DEME高糖培养基(12100046, Gibco, 美国);Lipofectamine 2000(11668019, Invitrogen, 美国);Trizol试剂(15596026, Invitrogen, 美国);HiScript II Reverse Transcriptase(R201-01/0, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 中国);SYBR Green Master Mix试剂盒(SR111, 北京索莱宝科技有限公司, 中国);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)(C004, 上海碧云天生物技术有限公司, 中国);RNase(R012, 上海碧云天生物技术有限公司, 中国)、PI(ST51, 上海碧云天生物技术有限公司, 中国);5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)溶液(C1031, 广州锐博生物科技有限公司, 中国);AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(KGA1102-10, 江苏凯基生物科技股份有限公司, 中国);细胞培养箱(3111, Thermo Fisher, 美国);Real-Time PCR仪(4376357, Applied Biosystems, 美国);酶标仪(MK3, Labsystems, 芬兰);显微镜(IX71-A12FL/PH, OLYMPUS, 日本);流式细胞仪(CytoFLEX, BECKMAN, 美国)。

1.2 RAD54L在OSCC中的表达、预后和临床相关性以及调控通路的生物信息学分析

从TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>)下载并整理TCGA-OSCC项目STAR流程、TPM格式的RNAseq数据,最终纳入正常对照样本32例,OSCC样本330例。通过R语言stats和car包,采用Mann-Whitney U检验对RAD54L在不同组中的表达进行差异分析。通过pROC包,采用受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic, ROC)同时分析曲线下的面积(area under curve, AUC),评估RAD54L对OSCC的预后判断价值。

从330例OSCC样本中提取患者的临床病理信息,其中记录有T分期的患者305例、N分期的患者276例、临床分期的患者320例、病理学分级的患者322例,有性别记录的患者330例、年龄记录的患者329例、吸烟史记录的患者324例和饮酒史记录的患者322例。通过stats包,采用卡方检验分析RAD54L mRNA表达水平与OSCC患者临床病理数据间的关系。删除1例预后数据缺失的样本后,根据RAD54L mRNA表达中位值将329例

OSCC样本分为高低表达两组。采用Cox回归分析RAD54L高低表达两组间的预后差异并绘制生存曲线。

同样根据RAD54L mRNA表达中位值将330例OSCC样本分为高低表达两组后,采用DESeq2包筛选两组间的差异表达基因,筛选条件为 $|\log_2FC| > 0.58$ 并 $P < 0.05$ 的编码基因。采用org.Hs.eg.db包转换为Entrez ID后,通过clusterProfiler包进行KEGG通路富集分析。提取富集于HR通路的差异表达基因,采用Spearman相关性分析展示RAD54L与富集到该通路中其他基因的表达相关性。此部分结果的可视化均通过ggplot2包完成。

1.3 转染实验敲低HSC-3细胞中RAD54L的表达

人OSCC细胞HSC-3接种于含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的DEME高糖培养基中,置于37℃、5%CO₂的培养箱中培养。将处于对数生长期、生长状态良好的HSC-3细胞接种于6孔板,于培养箱中培养过夜。当细胞达到40%~50%汇合度时,使用Lipofectamine 2000试剂将si-RAD54L(#1、#2、#3)和阴性对照si-NC转染到HSC-3细胞中。对于每个转染样品,均按以下方法制备:于转染前2 h将6孔板中的培养基换成无血清无双抗的DEME培养基;用90 μL无血清无双抗的DEME培养基稀释10 μL siRNA (20 μmol/L),室温下静置5 min;取5 μL Lipofectamine 2000稀释在145 μL无血清无双抗的DEME培养基中,室温下静置5 min;将以上两种稀释液轻轻混匀并在室温下静置20 min;每孔分别加入混合液250 μL,前后轻轻摇动细胞培养板使混合液与培养板中培养液混匀;于培养箱中培养,与转染混合物孵育5~6 h后去除转染溶液,更换为完全培养基。转染24~48 h进行后续实验。si-RAD54L#1的序列:5'-CGCTAAAGAAGCTTTGTAATC-3'; si-RAD54L#2的序列:5'-CCGTAGCAGTGACAAAGTAGT-3'; si-RAD54L#3的序列:5'-AGAAGACTTGCTATATCTACC-3';阴性对照si-NC的序列:5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG-3'。

1.4 qRT-PCR检测RAD54L的表达水平

使用Trizol试剂提取细胞中的总RNA。cDNA的合成采用HiScript II Reverse Transcriptase完成。以cDNA为模板使用SYBR Green Master Mix试剂盒进行扩增。GAPDH作为内部参照。相对表达量通过2^{-ΔΔCt}法计算。引物均由上海生工股份有限公司合成,序列如下:RAD54L-F:5'-TTACGCCAGAGTCCAGACTGC-3', RAD54L-R:5'-TCCTCCCTCCGA

GCCATTT-3'; GAPDH-F:5'-CATATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', GAPDH-R:5'-GAATTCTTACTCCTTGGAGGCCATGTGG-3'。

1.5 CCK-8检测细胞增殖能力

将细胞以3×10³个/孔接种到96孔板中,置于培养箱中分别培养24 h、48 h和72 h。每孔加入10 μL CCK-8溶液,在培养箱中再孵育2 h后使用酶标仪在450 nm处检测每孔的光密度(optical density, OD)值。

1.6 EdU染色试验检测细胞增殖能力

将细胞以1×10⁵个/孔接种到6孔板中培养过夜。加入50 μmol/L EdU溶液后在37℃孵育2 h。使用4%多聚甲醛溶液固定细胞15 min,0.5% Triton X-100透化细胞20 min,避光与Click Additive Solution反应30 min,细胞核用DAPI复染15 min。荧光显微镜下观察细胞并记录图像。

1.7 细胞划痕实验测定检测细胞迁移能力

将细胞以1×10⁵个/孔接种到6孔板中并培养至90%汇合。用移液器吸头笔直划伤细胞,PBS清洗2次。在划伤后0 h和48 h使用光学显微镜记录图像。测定期间细胞处于血清饥饿状态。划痕闭合率=(0 h宽度-48 h宽度)/0 h宽度×100%。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡

收获转染细胞后PBS润洗、离心。使用AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。加入500 μL 1×Binding Buffer重悬细胞,加入5 μL AnnexinV-FITC混匀后,加入5 μL PI再次混匀,室温避光反应15 min。使用流式细胞仪检测。

1.9 流式细胞仪检测细胞周期

收获转染细胞后PBS润洗、离心。70%预冷乙醇4℃固定4 h,预冷PBS清洗后加入10 μL RNase 37℃孵育30 min,加入10 μL PI 4℃避光染色30 min。使用流式细胞仪检测。

1.10 统计学分析

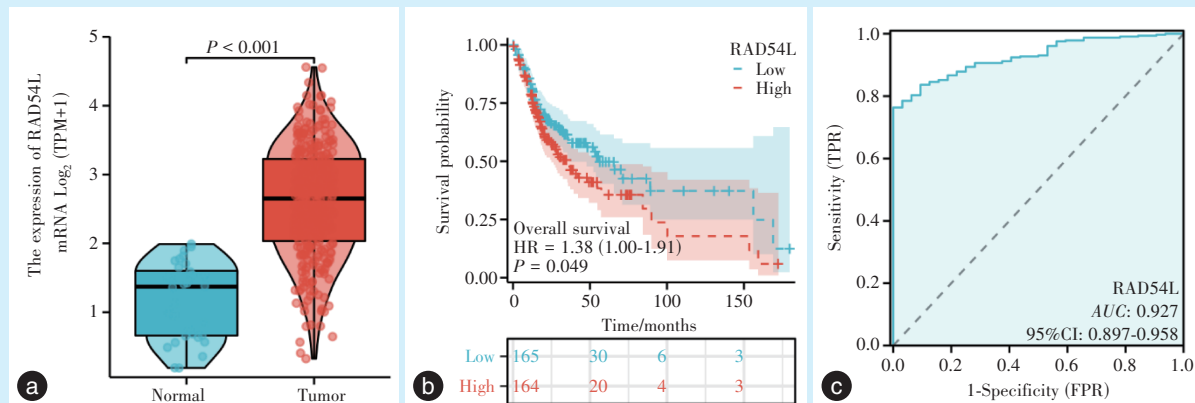
生物信息学分析使用R语言4.3.1完成:Mann-Whitney U检验分析组间表达差异,Cox回归分析比较组间预后差异,ROC曲线评估诊断预后价值,卡方检验分析与临床病理数据间的差异,clusterProfiler包行KEGG通路富集分析,Spearman相关性分析展示与HR途径中基因表达的相关性。体外实验部分:所有实验独立重复3次,数据以平均值±标准差表示。使用GraphPad Prism 9.0进行统计分析。转染后的多组间qRT-PCR数据满足正态分

布,采用单因素方差分析。EdU、细胞划痕和细胞凋亡的两组间数据满足正态分布,采用 t 检验分析。CCK-8、细胞周期的两组间实验数据采用双因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RAD54L 在 OSCC 中高表达,与预后不良相关

Mann-Whitney U 检验结果表明(图 1a, $Z = 1.460$, $P < 0.001$), OSCC 组 RAD54L mRNA 的表达水平(2.606 ± 0.799)高于正常对照组(1.167 ± 0.553)。Cox 回归分析结果表明(图 1b, $HR = 1.38$, $95\%CI = 1.00 \sim 1.91$, $P = 0.049$), RAD54L 高表达组的预后差于低表达组。ROC 曲线分析中的 AUC 值为 0.927(图 1c, $95\%CI = 0.897 \sim 0.958$)。



a: the expression level of RAD54L mRNA in OSCC samples (330 cases) was higher than that in normal controls (32 cases), $P < 0.001$. b: the median value of RAD54L mRNA expression; one sample with missing prognostic data was deleted, a total of 329 OSCC samples were divided into two groups (high and low expression), and the prognosis of the group with high expression of RAD54L was worse than that of the group with low expression, $P = 0.049$. c: the receiver operator characteristic curve analysis of subjects with RAD54L in 32 normal control samples and 330 OSCC samples confirmed the high diagnostic value of RAD54L, $AUC = 0.927$. HR: risk ratio; TPR: true positive rate; FPR: false positive rate; OSCC: oral squamous cell carcinoma; RAD54L: RAD54-like protein

Figure 1 Analysis of RAD54L expression, prognosis and diagnosis in OSCC

图 1 RAD54L 在 OSCC 中的表达、预后和诊断分析

2.2 RAD54L mRNA 表达水平与 OSCC 患者临床病理特征的关系

以 330 例 OSCC 样本中 RAD54L mRNA 的表达中位值 2.654 将样本分为高低表达两组。RAD54L 的高表达组具有更多的男性患者($\chi^2 = 4.598$, $P = 0.032$),更高的 T 分期($\chi^2 = 4.224$, $P = 0.040$)、临床分期($\chi^2 = 4.900$, $P = 0.027$)和病理学分级($\chi^2 = 6.170$, $P = 0.013$)。而 RAD54L 高表达组与低表达组间的 N 分期($\chi^2 = 0.059$, $P = 0.808$)、年龄($\chi^2 = 0.244$, $P = 0.621$)、吸烟史($\chi^2 = 0.998$, $P = 0.318$)和饮酒史($\chi^2 = 0.193$, $P = 0.660$)差异无统计学意义,见表 1。

2.3 RAD54L 可能通过同源重组修复途径影响 OSCC 进展

DESeq2 包以 $|\log_2FC| > 0.58$ 并 $P < 0.05$ 的编码基因为筛选条件,从 RAD54L 高低表达两组间共筛选出 2 455 个基因。采用 org.Hs.eg.db 包成功转成 2 407 个 Entrez ID 用于富集分析。KEGG 通路富集

分析结果表明,两组间的差异基因多富集于神经活性配体与受体的相互作用、细胞因子-细胞因子受体相互作用、钙信号通路、细胞周期、胃癌、细胞外基质受体相互作用、化学致癌-DNA 加合物、DNA 复制、同源重组、错配修复(均 $P < 0.05$)(图 2a)。其中富集于同源重组修复途径的差异表达基因,包括:乳腺癌易感基因 1(breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1)、RAD51、聚合酶(DNA) δ 1 催化亚基[polymerase(DNA) delta 1 catalytic subunit, POLD1]、RAD54L、BRCA1 相互作用解旋酶 1(BRCA1 interacting helicase 1, BRIP1)、突触复合蛋白 3(synaptonemal complex protein 3, SYCP3)、乳腺癌易感基因 2(breast cancer susceptibility gene 2, BRCA2)、必需减数分裂结构特异性核酸内切酶 1(essential meiotic structure-specific endonuclease 1, EME1)、拓扑异构酶 II 结合蛋白 1(topoisomerase II binding protein 1, TOPBP1)、X 射线修复交叉互补 2(X-ray repair cross complementing 2, XRCC2)、

表1 OSCC中RAD54L mRNA的表达水平与临床病理数据的关系

Table 1 Relationship between RAD54L mRNA expression levels and clinicopathological data in OSCC *n*

Variable	RAD54L low expression group	RAD54L high expression group	χ^2	<i>P</i>
T-stage				
T1&T2	74 (24.3%)	55 (18%)	4.224	0.040
T3&T4	80 (26.2%)	96 (31.5%)		
N-stage				
N0	60 (21.7%)	58 (21%)	0.059	0.808
N1&N2&N3	78 (28.3%)	80 (29%)		
Clinical stage				
Stage I & Stage II	55 (17.2%)	36 (11.2%)	4.900	0.027
Stage III & Stage IV	107 (33.4%)	122 (38.1%)		
Pathological grade				
G1&G2	138 (42.9%)	115 (35.7%)	6.170	0.013
G3&G4	26 (8.1%)	43 (13.4%)		
Gender				
Female	60 (18.2%)	42 (12.7%)	4.598	0.032
Male	105 (31.8%)	123 (37.3%)		
Age				
≤ 60	76 (23.1%)	80 (24.3%)	0.244	0.621
> 60	89 (27.1%)	84 (25.5%)		
Smoking history				
No	48 (14.8%)	40 (12.3%)	0.998	0.318
Yes	114 (35.2%)	122 (37.7%)		
Alcohol history				
No	55 (17.1%)	50 (15.5%)	0.193	0.660
Yes	108 (33.5%)	109 (33.9%)		

The median RAD54L mRNA expression value of 2.654 in 330 OSCC samples was used to categorize the samples into two groups of high and low expression. OSCC: oral squamous cell carcinoma; RAD54L: RAD54-like protein

RAD54同源物B(RAD54 homolog B, RAD54B)、布卢姆综合症解旋酶(Bloom's Syndrome helicase, BLM)。Spearman相关性分析结果表明,OSCC中RAD54L的表达与BRCA1、BLM和EME1的表达呈强正相关($R > 0.8, P < 0.05$),与XRCC2、POLD1、TOPBP1、RAD51、BRIP1、RAD54B和BRCA2的表达呈中等正相关($R = 0.5 \sim 0.8, P < 0.05$),与SYCP3的表达呈弱相关($R = 0.3 \sim 0.5, P < 0.05$)(图2b)。进一步可视化了与RAD54L表达强相关的3个基因(BRCA1、BLM和EME1)(图2c)。

2.4 RAD54L表达下调抑制HSC-3细胞增殖和迁移,促进细胞凋亡

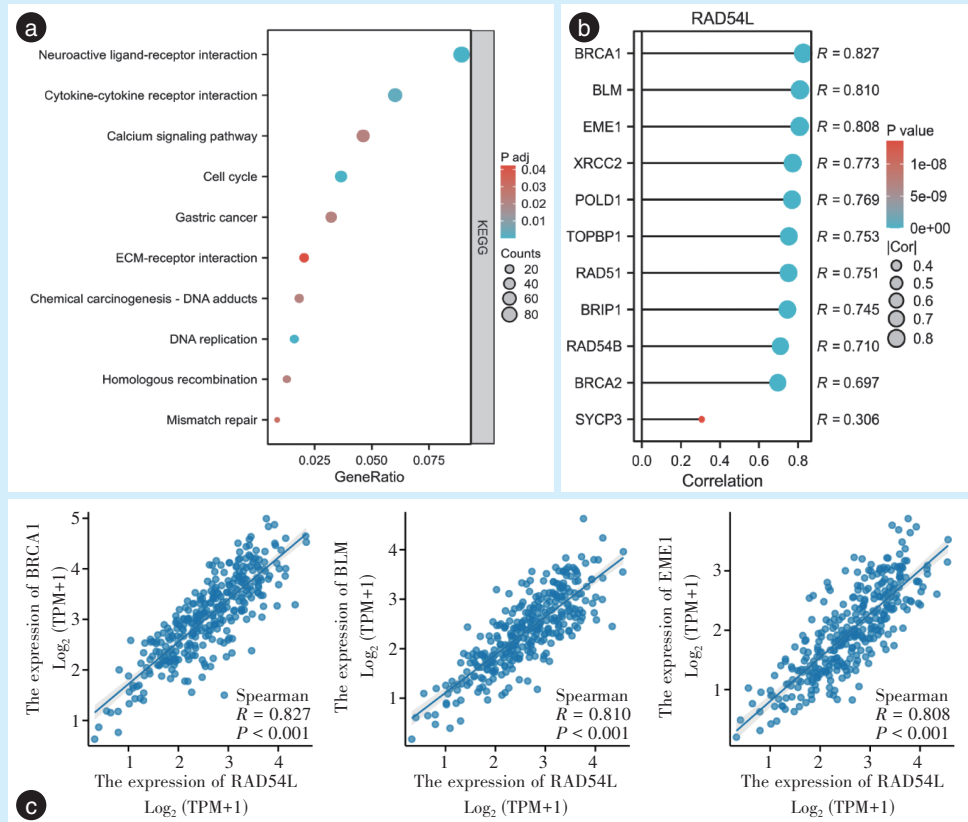
转染24 h后的qRT-PCR结果表明(图3),与RAD54L组(空白组)和si-NC组相比,si-RAD54L

(#1、#2、#3)组RAD54L mRNA表达均降低($P < 0.001$),其中si-RAD54L#3组RAD54L mRNA表达降低最为显著。因此,选择si-RAD54L#3组进行后续实验。

CCK-8实验结果表明(图4a),与si-NC组相比,si-RAD54L#3组在24 h($t = 2.926, P = 0.025$)、48 h($t = 5.644, P < 0.001$)、72 h($t = 11.720, P < 0.001$)时增值率的降低具有统计学差异。EdU实验结果表明(图4b),与si-NC组相比,si-RAD54L#3组阳性细胞比例的降低具有统计学差异($t = 11.01, P < 0.001$)。细胞划痕实验表明(图4c),与si-NC组相比,si-RAD54L#3组伤口闭合比例的降低具有统计学差异($t = 19.75, P < 0.001$)。细胞周期实验结果表明(图4d),与si-NC组相比,si-RAD54L#3组细胞在G1期的比例增加($t = 15.50, P < 0.001$),S期的比例降低($t = 12.79, P < 0.001$),在G2/M期比例变化的差异不具有统计学意义($t = 2.72, P = 0.055$)。细胞凋亡实验结果表明(图4e),与si-NC组相比,si-RAD54L#3组细胞凋亡比例增加,差异具有统计学意义($t = 32.60, P < 0.001$)。

3 讨论

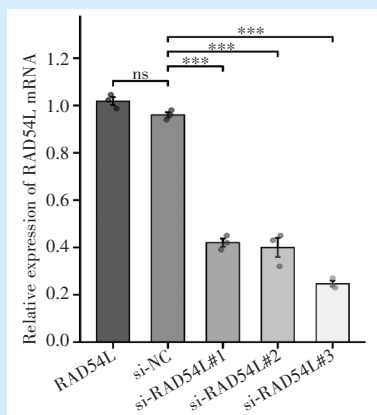
癌症是一种复杂性的疾病,其发生和发展牵涉到多个细胞生物学过程的紊乱,其中DNA损伤是一种常见现象^[13]。DSBs是最为有害和极端的DNA损伤形式之一,DSBs若未得到及时修复可导致细胞产生毒性,甚至可能导致癌变,对生物体造成严重损害^[14]。在OSCC中,DNA损伤和修复异常已被证实与其发生、进展和治疗耐受性密切相关。因此,细胞在进化过程中发展出了DNA损伤反应机制。在DNA损伤发生时,相关蛋白质会识别并结合到受损位点,以触发修复酶或因因子招募到受损位点^[15]。重要的是这一过程还能启动信号级联,激活各种细胞通路,阻滞细胞周期为DNA修复争取时间^[16]。HRR作为DNA损伤反应的主要方式之一,通过从姐妹染色单体中复制无损信息的模板DNA,执行对DSBs或单链DNA间隙的修复^[17]。在OSCC中,HRR途径的异常活化或抑制都可能导致基因组不稳定,进而影响疾病的进展和预后。这个复杂而高度调控的过程确保了DNA损伤的准确修复,为维护基因组的稳定性和完整性提供了支持。显然,HRR在细胞生物学中扮演着不可或缺的角色,一旦其功能发生障碍可导致遗传不稳定、染色体畸变甚至癌变^[18]。因此,深入研究参与



a: KEGG pathway enrichment analysis found that RAD54L was enriched in the homologous recombination pathway, $P < 0.05$. b: the expression level of RAD54L correlated with that of differentially expressed genes enriched in the homologous recombination pathway, $P < 0.05$. c: the expression level of RAD54L was strongly and positively correlated with the expression levels of BRCA1, BLM, and EME1 in the homologous recombination pathway, $R > 0.8$, $P < 0.05$. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; RAD54L: RAD54-like protein; BRCA1: breast cancer 1; RAD51: DNA repair protein RAD51 homolog 1; POLD1: polymerase (DNA) delta 1 catalytic subunit; BRIP1: BRCA1 interacting helicase 1; SYCP3: synaptonemal complex protein 3; BRCA2: BRCA2 DNA repair associated; EME1: essential meiotic structure-specific endonuclease 1; TOPBP1: DNA topoisomerase II binding protein 1; XRCC2: X-ray repair cross complementing 2; RAD54B: RAD54 homolog B; BLM: Bloom's Syndrome helicase

Figure 2 KEGG enrichment analysis and co-expression analysis of RAD54L

图2 RAD54L的KEGG富集分析和共表达分析



Compared with the RAD54L group (blank group) and si-NC group, the si-RAD54L (#1, #2, #3) groups all had reduced expression, with the most significant reduction in the si-RAD54L#3 group, *** $P < 0.001$; ns: no statistical difference. RAD54L group: blank group; si-NC group: negative control group; si-RAD54L (#1, #2, #3) group: knock-down group; RAD54L: RAD54-like protein

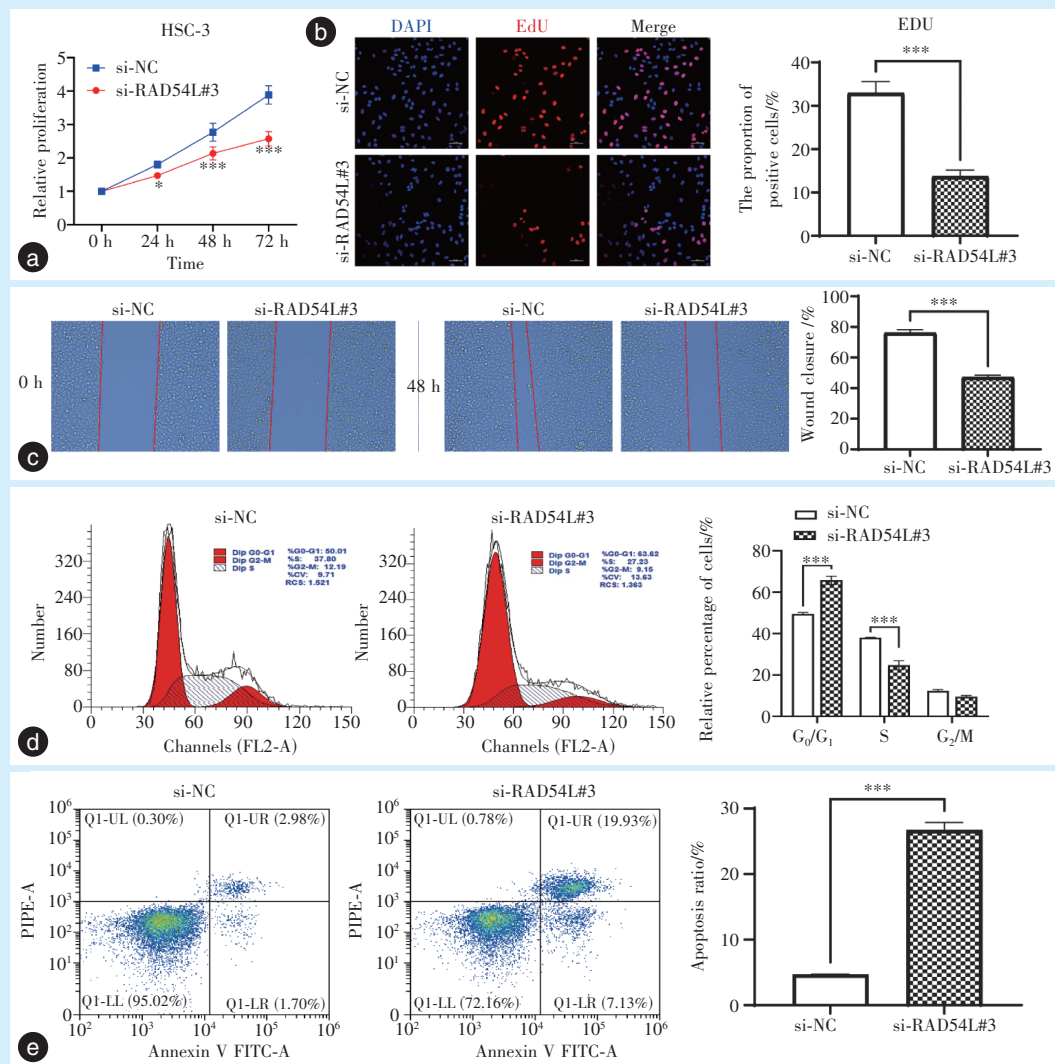
Figure 3 Transfection experiment knocked down the expression of RAD54L in HSC-3 cells

图3 转染实验敲低HSC-3细胞中RAD54L的表达

HRR 过程的关键基因,如本研究中的 RAD54L,对于理解 OSCC 的分子病理机制和开发新的治疗策略具有重要意义。

RAD54L 是 HRR 中的关键基因。在 T1 期肺腺癌肿瘤组织中 RAD54L 的高表达与较差的总生存

期相关^[11]。根据 RAD54L 在膀胱癌患者中的表达进行分层, RAD54L 高表达与患者预后不良相关^[12]。研究发现沉默 RAD54L 可显著抑制多发性骨髓瘤细胞的生长,促进细胞凋亡并阻滞细胞周期,提示 RAD54L 可能是潜在的治疗靶点^[19]。这些



a: in CCK-8 experiments, the proliferation rates at 24 h, 48 h, and 72 h were lower in the si-RAD54L#3 group compared to the si-NC group. b: in EdU experiments, the proportion of EdU-positive cells was lower in the si-RAD54L#3 group compared with the si-NC group. c: in the wound healing experiment, the proportion of wound closure was lower in the si-RAD54L#3 group compared with the si-NC group. d: in the cell cycle experiment, the proportion of S-phase cells was lower and the proportion of G₁-phase cells was higher in the si-RAD54L#3 group compared with the si-NC group. e: in cell apoptosis experiments, the proportion of apoptotic cells was higher in the si-RAD54L#3 group compared with the si-NC group. si-NC group: negative control group; si-RAD54L#3 group: knockdown group; EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; RAD54L: RAD54-like protein. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

Figure 4 Cell function experiment after down-regulating RAD54L expression

图4 下调RAD54L表达后的细胞功能实验

研究表明,RAD54L在不同癌症中的作用机制可能有所不同,但其在癌症发展中的重要性不可忽视。值得注意的是,尽管RAD54L在多种癌症中均表现出致癌潜力,但其在OSCC中的具体作用此前鲜有报道。本研究首次系统地探讨了RAD54L在OSCC中的表达特征及功能,为理解OSCC的分子病理机制提供了新的视角。本研究表明,RAD54L在区分肿瘤患者方面表现出高敏感性和特异性,KEGG富集分析发现RAD54L高低表达两组间的差异表达

基因可富集于HRR途径。RAD54L的缺失可导致BRCA1/2缺失细胞中的受损复制叉被限制,从而减少了受到羟基脲诱导的DNA损伤,这提示RAD54L的功能缺陷可影响BRCA1/2缺失型肿瘤对复制应激诱导化疗的响应^[20]。这一发现对OSCC的治疗策略选择具有重要启示。例如,对于RAD54L高表达的OSCC患者,可能需要考虑调整化疗方案或探索新的治疗组合,以克服潜在的治疗耐受性。作为RAD51的辅助因子,RAD54L可通过其双链DNA

依赖型ATP酶活性稳定RAD51-ssDNA核蛋白丝并促进DNA合成,这是HRR的重要过程,表明RAD54L与RAD51在处理DNA损伤和复制应激中共同发挥作用,以维持基因组完整性和预防癌症的发生^[21]。在HRR过程中BLM的作用是动态变化的,在HRR的早期阶段BLM通过增强RAD54的ATP酶活性来协助RAD54进行染色质重塑,但在后期阶段BLM可与RAD51相互作用并破坏RAD51纤维,从而发挥抑制同源重组的作用^[22]。本研究同样发现OSCC中RAD54L的表达水平与HRR途径中BRCA1、BLM、EME1、XRCC2、POLD1、TOPBP1、RAD51、BRIP1、RAD54B、BRCA2和SYCP3的表达呈正相关,其中与BRCA1、BLM和EME1的表达呈强正相关,可见RAD54L的表达失调可影响HRR途径的调控。这种广泛的相关性暗示RAD54L可能在OSCC的DNA损伤修复网络中扮演核心调控角色。未来研究可进一步探索RAD54L是否通过协调多个HRR相关基因的表达来影响OSCC的发生发展。这一发现也与之之前对RAD54L功能的理解相一致,提示RAD54L在包括OSCC在内的多种癌症类型中可能都具有相似的生物学功能。此外,这也为RAD54L在OSCC的诊疗或预后评估中的潜在价值提供了重要依据,特别是在针对HRR的靶向治疗方面。

本研究继续深入探讨了RAD54L对OSCC细胞表型的调控作用。通过下调RAD54L的表达,观察到HSC-3细胞的增殖和迁移受到抑制,同时促进细胞凋亡。细胞增殖是癌症发展的核心过程,而RAD54L的干预调节了肿瘤细胞对增殖和迁移信号的过度反应,以及对凋亡信号的抵抗。这一发现不仅验证了RAD54L在OSCC发展中的关键作用,还为其作为潜在治疗靶点提供了直接的实验证据。DNA基因损伤修复与肿瘤发展和耐药性高度相关^[23],RAD54L对细胞凋亡的抑制提示了其可能与OSCC患者对治疗的耐药性相关。这对于指导和优化临床治疗策略的选择,尤其是在个体化治疗中进行药物敏感性评估方面具有重要指导意义。未来研究可考虑探索RAD54L表达水平与OSCC患者对不同治疗方案反应之间的关系,为临床决策提供更精确的分子指标。此外,本研究还发现下调RAD54L的表达导致HSC-3细胞在S期的减少。细胞周期的紊乱是癌症发展的常见特征之一,而RAD54L可通过影响细胞周期进程,特别是对S期的调控,推动细胞向增殖有利的状态转变以

促进OSCC的发展。这与HRR途径主要在细胞周期S期发挥作用相符,因为细胞周期调控与DNA损伤修复密切相关^[24]。这一发现揭示了RAD54L在OSCC细胞周期调控中的双重作用:一方面参与DNA修复,另一方面促进细胞周期进展。这种双重功能可能解释了RAD54L高表达的OSCC细胞为何具有更强的增殖能力和治疗抵抗性。这为深入理解RAD54L在细胞周期调控中的分子机制提供了基础,也为探索针对细胞周期的治疗策略提供了新的思路。今后的研究可以考虑结合RAD54L抑制剂与细胞周期调控药物,探索更有效的联合治疗策略,以达到协同抑制OSCC生长的目的。

本研究的发现为未来OSCC的研究和临床实践提供了新的思路 and 方向。在基础研究方面,未来可着重探索RAD54L与其他DNA修复基因的相互作用网络,以及其在OSCC发生发展过程中的动态变化。同时,可进一步研究RAD54L在不同OSCC亚型中的表达模式及其对治疗反应的影响。在临床应用方面,RAD54L有望成为OSCC诊断和预后评估的新型生物标志物。鉴于其在HRR途径中的重要作用,RAD54L可能成为开发新型靶向治疗药物的潜在靶点。此外,RAD54L的表达水平可能与OSCC对某些DNA损伤药物的敏感性相关,这为个体化治疗方案的制定提供了新的参考依据。未来的研究还应探讨RAD54L抑制剂与现有治疗方法(如放疗、化疗)的协同作用,以期开发出更有效的联合治疗策略。

综上所述,本研究分析了RAD54L在OSCC中的作用,揭示了其通过HRR途径调控OSCC的进展。下调RAD54L的表达能够抑制HSC-3细胞的增殖和迁移,促进细胞凋亡,并阻碍细胞周期。这些发现不仅为解析RAD54L在OSCC发展中的分子机制提供了关键线索,还为口腔癌治疗的靶向策略和预后评估提供了参考。

【Author contributions】 Cao X designed the study, performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. Chen JL and Zhang R analyzed the data and wrote the article. Guo XM designed the study and reviewed the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Chamoli A, Gosavi AS, Shirwadkar UP, et al. Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: risk factors, mechanisms, and diagnostics[J]. *Oral Oncol*, 2021, 121: 105451. doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105451.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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. doi: 10.3322/caac.21660.
- [3] 翦新春, 高兴. 口腔黏膜下纤维性变的病因、致病机理、诊断与治疗[J]. *口腔疾病防治*, 2021, 29(4): 217-225. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.04.001.
- Jian XC, Gao X. Etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment of oral submucous fibrosis[J]. *J Prev Treat Stomatol Dis*, 2021, 29(4): 217-225. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.04.001.
- [4] 陈永菊, 黄子贤, 陈睿, 等. 人类乳头瘤病毒阳性口咽癌对放疗敏感的研究进展[J]. *口腔疾病防治*, 2021, 29(1): 65-68. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.01.011.
- Chen YJ, Huang ZX, Chen R, et al. Research progress on HPV-positive oropharyngeal carcinoma sensitive to radiation therapy[J]. *J Prev Treat Stomatol Dis*, 2021, 29(1): 65-68. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.01.011.
- [5] Pomella S, Cassandri M, Melaiu O, et al. DNA damage response gene signature as potential treatment markers for oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2673. doi: 10.3390/ijms24032673.
- [6] Ui A, Chiba N, Yasui A. Relationship among DNA double-strand break (DSB), DSB repair, and transcription prevents genome instability and cancer[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(5): 1443-1451. doi: 10.1111/cas.14404.
- [7] Liu HL, Nan H, Zhao WW, et al. Phase separation in DNA double-strand break response[J]. *Nucleus*, 2024, 15(1): 2296243. doi: 10.1080/19491034.2023.2296243.
- [8] Alhegaili AS. Role of DNA repair deficiency in cancer development[J]. *Pak J Biol Sci*, 2023, 26(1): 15-22. doi: 10.3923/pjbs.2023.15.22.
- [9] Mazina OM, Mazin AV. Branch migration activity of Rad54 protein[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2153: 145-167. doi: 10.1007/978-1-0716-0644-5_11.
- [10] Zhou Y, Qiu C, Fu Q, et al. Pan-cancer analysis of oncogenic role of RAD54L and experimental validation in hepatocellular carcinoma[J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 3997-4017. doi: 10.2147/JIR.S426558.
- [11] Zheng S, Yao L, Li F, et al. Homologous recombination repair pathway and RAD54L in early-stage lung adenocarcinoma[J]. *PeerJ*, 2021, 9: e10680. doi: 10.7717/peerj.10680.
- [12] Wang Y, Zhou T, Chen H, et al. Rad54L promotes bladder cancer progression by regulating cell cycle and cell senescence[J]. *Med Oncol*, 2022, 39(12): 185. doi: 10.1007/s12032-022-01751-7.
- [13] 王安训, 周万航, 曹琮沅. 头颈部恶性肿瘤研究模型的演化[J]. *口腔疾病防治*, 2024, 32(9): 653-663. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.202440135.
- Wang AX, Zhou WH, Cao CY. Evolution of research models for malignant head and neck tumors[J]. *J Prev Treat Stomatol Dis*, 2024, 32(9): 653-663. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.202440135.
- [14] Averbek S, Jakob B, Durante M, et al. O-GlcNAcylation affects the pathway choice of DNA double-strand break repair[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5715. doi: 10.3390/ijms22115715.
- [15] Gartner A, Engebrecht J. DNA repair, recombination, and damage signaling[J]. *Genetics*, 2022, 220(2): iyab178. doi: 10.1093/genetics/iyab178.
- [16] Carusillo A, Mussolino C. DNA damage: from threat to treatment[J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1665. doi: 10.3390/cells9071665.
- [17] Wright WD, Shah SS, Heyer WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(27): 10524-10535. doi: 10.1074/jbc.TM118.000372.
- [18] Doig KD, Fellowes AP, Fox SB. Homologous recombination repair deficiency: an overview for pathologists[J]. *Mod Pathol*, 2023, 36(3): 100049. doi: 10.1016/j.modpat.2022.100049.
- [19] Bong IPN, Ng CC, Othman N, et al. Gene expression profiling and in vitro functional studies reveal RAD54L as a potential therapeutic target in multiple myeloma[J]. *Genes Genomics*, 2022, 44(8): 957-966. doi: 10.1007/s13258-022-01272-7.
- [20] Uhrig ME, Sharma N, Maxwell P, et al. Disparate requirements for RAD54L in replication fork reversal[J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(4): gkae828. doi: 10.1093/nar/gkae828.
- [21] Choi EH, Yoon S, Hahn Y, et al. Cellular dynamics of Rad51 and Rad54 in response to postreplicative stress and DNA damage in HeLa cells[J]. *Mol Cells*, 2017, 40(2): 143-150. doi: 10.14348/molcells.2017.2275.
- [22] Srivastava V, Modi P, Tripathi V, et al. BLM helicase stimulates the ATPase and chromatin-remodeling activities of RAD54[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 17): 3093-3103. doi: 10.1242/jcs.051813.
- [23] Fox M, Roberts JJ. Drug resistance and DNA repair[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1987, 6(3): 261-281. doi: 10.1007/BF00144267.
- [24] Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 179-204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019.

(编辑 罗燕鸿,李思敏)



Open Access

This article is licensed under a Creative Commons

Attribution 4.0 International License.

Copyright © 2024 by Editorial Department of Journal of Prevention and Treatment for Stomatological Diseases



官网