

• 论 著 •

# lncRNA HOTAIR 通过 miR-126/ADAMTS-4 轴抑制 口腔鳞状细胞癌细胞增殖与侵袭的机制研究<sup>\*</sup>

邱乐宏, 邓 伟, 王 涛<sup>△</sup>

海南省人民医院/海南医学院附属海南医院口腔科, 海南海口 570311

**摘 要:**目的 检测长链非编码 RNA HOTAIR(lncRNA HOTAIR)对口腔鳞状细胞癌增殖与侵袭的影响并探讨潜在的作用机制。方法 收集该院临床确诊的口腔鳞状细胞癌患者组织标本和癌旁正常组织标本,并培养 TSCCA、Tca8113 和 HOK 细胞,实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 lncRNA HOTAIR、miR-126 和 ADAMTS-4 的表达。取对数生长期的 Tca8113 细胞,将 HOTAIR siRNA、ADAMTS-4 siRNA 转染细胞,并设置 siRNA NC 对照组,采用 CCK-8 法分析细胞活力,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率,采用 Transwell 试验检测细胞侵袭数目。预测 HOTAIR、miR-126 潜在的靶基因,双荧光素酶试验评估 lncRNA HOTAIR 与 miR-126、miR-126 与 ADAMTS-4 之间的关系。检测上调 lncRNA HOTAIR 靶向 miR-126 对 Tca8113 细胞生物学功能的影响。结果 与癌旁组织比较,口腔鳞状癌组织 lncRNA HOTAIR、ADAMTS-4 表达上调,miR-126 表达下调( $P<0.01$ );与 HOK 细胞比较,TSCCA、Tca8113 细胞中 lncRNA HOTAIR、ADAMTS-4 表达上调,miR-126 表达下调( $P<0.01$ )。软件预测与双荧光素酶试验结果验证了 lncRNA HOTAIR 与 miR-126、miR-126 与 ADAMTS-4 具有结合位点。敲减 HOTAIR 或 ADAMTS-4 表达,Tca8113 细胞增殖活力与侵袭能力降低,细胞凋亡率上升( $P<0.05$ )。敲减 miR-126 表达,Tca8113 细胞增殖活力与侵袭能力升高,细胞凋亡率降低( $P<0.05$ ),过表达 miR-126 能够部分逆转上调 HOTAIR 对 Tca8113 细胞增殖与侵袭的促进作用。结论 下调 lncRNA HOTAIR 通过 miR-126/ADAMTS-4 轴抑制了 Tca8113 细胞增殖及侵袭。

**关键词:**长链非编码 RNA HOTAIR; miR-126; ADAMTS-4; 口腔鳞状细胞癌; 增殖

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2022.09.001

**中图法分类号:**R446.8

**文章编号:**1673-4130(2022)09-1025-08

**文献标志码:**A

## Mechanism of lncRNA HOTAIR inhibiting the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma through miR-126/ADAMTS-4 axis<sup>\*</sup>

QIU Lehong, DENG Wei, WANG Tao<sup>△</sup>

Department of Stomatology, Hainan Provincial People's Hospital/Hainan Hospital  
Affiliated to Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570311, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of lncRNA HOTAIR on the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma and explore the potential mechanism. **Methods** Tissue samples and paracancer specimens were collected from clinically confirmed oral squamous cell carcinoma patients in our hospital, and TSCCA, Tca8113, HOK cells were cultured, the expressions of lncRNA HOTAIR, miR-126 and ADAMTS-4 were detected by RT-qPCR. Tca8113 cells in logarithmic growth phase were transfected with HOTAIR siRNA and ADAMTS-4 siRNA, and siRNA NC control group was set up. Cell viability was analyzed by CCK-8, cell apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the number of cell invasion was detected by Transwell assay. The potential target genes of HOTAIR and miR-126 were predicted, and the relationships between lncRNA HOTAIR and miR-126, miR-126 and ADAMTS-4 were evaluated by dual luciferase assay. The effects of upregulation of lncRNA HOTAIR targeting miR-126 on the biological function of Tca8113 cells was detected. **Results** The expression of lncRNA HOTAIR and ADAMTS-4 was up-regulated and the expression of

<sup>\*</sup> 基金项目:国家自然科学基金项目(81960199)。

作者简介:邱乐宏,男,主治医师,主要从事口腔医学方向的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail:1293379391@qq.com。

本文引用格式:邱乐宏,邓伟,王涛. lncRNA HOTAIR 通过 miR-126/ADAMTS-4 轴抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖与侵袭的机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(9): 1025-1032.

miR-126 was down-regulated in oral squamous carcinoma tissues compared with adjacent tissues ( $P<0.01$ ). Compared with HOK cells, the expression of lncRNA HOTAIR and ADAMTS-4 was up-regulated and the expression of miR-126 was down-regulated in TSCCA and Tca8113 cells ( $P<0.01$ ). The software prediction and dual luciferase results verified that lncRNA HOTAIR had binding sites with miR-126 and miR-126 with ADAMTS-4. Knockdown of HOTAIR or ADAMTS-4 decreased the proliferation activity and invasion ability of Tca8113 cells, and increased the apoptosis rate ( $P<0.05$ ). Knockdown of miR-126 expression increased the proliferation activity and invasion ability of Tca8113 cells, and decreased the apoptosis rate ( $P<0.05$ ). Over-expression of miR-126 could partially reverse the promotion effect of up-regulated HOTAIR on the proliferation and invasion of Tca8113 cells. **Conclusion** Down-regulation of lncRNA HOTAIR inhibited proliferation and invasion of Tca8113 cells through miR-126 /ADAMTS-4 axis.

**Key words:** lncRNA HOTAIR; miR-126; ADAMTS-4; oral squamous cell carcinoma; proliferation

口腔鳞状细胞癌(OSCC)是常见的口腔癌,每年大约有 50 万人死于口腔癌。目前仍有超过 60% 的 OSCC 病例直到晚期才被确诊。研究表明,OSCC 的病因与原癌基因的激活和过表达相关<sup>[1-2]</sup>。长链非编码 RNA(lncRNA)是一种非蛋白编码 RNA 转录本,其失调被认为是恶性肿瘤的潜在诊断靶点<sup>[3]</sup>。CAO 等<sup>[4]</sup>发现,上调 lncRNA-RMRP 可促进膀胱癌转移。lncRNA CDKN2BAS 通过 miR-153-5p 促进肝癌转移<sup>[5]</sup>。lncRNA HOTAIR(HOX 反义基因间 RNA)定位于第 12 条染色体,转录自 HOXC 位点的反义链。ZHAO 等<sup>[6]</sup>发现,lncRNA HOTAIR 异常表达与癌症进展密切相关,lncRNA HOTAIR 通过 miR-20a-5p/HMGA2 轴影响乳腺癌细胞的生长、迁移、侵袭和凋亡。此外,lncRNA HOTAIR 通过下调 miR-NA-34a 促进结肠癌的发生<sup>[7]</sup>。但 lncRNA HOTAIR 调控口腔癌进展的具体机制尚不明确。本研究主要分析了 lncRNA HOTAIR 在 OSCC 中的表达和调控 OSCC 进展的作用机制。

1 材料与方法

**1.1 标本来源** 2020 年 10 月至 2021 年 6 月本院行手术切除的患者提供 OSCC 组织标本 36 份,经组织病理诊断为 OSCC,20 份相邻癌旁正常组织标本。所有病例术前均未进行放射治疗和化疗。本研究经本院医学伦理委员会批准,且所有患者知情同意,所取标本立即在冰箱中快速冷冻。

1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及其细胞转染** 人 OSCC 细胞系(TSCCA、Tca8113)和人口腔角质形成细胞(HOK)从中国科学院(中国上海)获得。细胞株在添加 10% 胎牛血清(美国 Life Technologies 公司)、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 mg/mL)的 DMEM/F12 培养基中培养,在 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿空气中生长。由 GenePharma (中国上海)合成并获得干扰对照质

粒(siRNA NC)、HOTAIR 干扰质粒(HOTAIR siRNA)、ADAMTS-4 干扰质粒(ADAMTS-4 siRNA)、过表达对照质粒[pcDNA-3.1(+)]和 HOTAIR 过表达质粒(pcDNA-HOTAIR)及模拟物对照(mimics NC)、miR-126 模拟物(miR-126 mimics)、抑制剂对照(inhibitor NC)、miR-126 抑制剂(miR-126 inhibitor)。用 Lipofectamine 2000(美国 Life Technologies 公司)进行细胞转染。48 h 后,收集细胞进行后续试验。

**1.2.2 双荧光素酶试验** 利用靶基因预测软件(TargetScan 和 miRcode)预测靶基因。该位点的 DNA 片段在体外合成,序列插入到 psi-CHECKTM-2 载体下游,构建 lncRNA HOTAIR 野生型质粒(HOTAIR wt)和 ADAMTS 野生型质粒(ADAMTS-4 wt)。设计引物对与 lncRNA HOTAIR、ADAMTS-4 3'UTR 结合的种子序列区域进行突变,构建 lncRNA HOTAIR 突变型质粒(HOTAIR mut)和 ADAMTS-4 突变型质粒(ADAMTS-4 mut)。转染的细胞分为两大组,每组分为 4 小组,(1)A 组:lncRNA HOTAIR wt + mimics NC; B 组:lncRNA HOTAIR wt + miR-126 mimics; C 组:lncRNA HOTAIR mut + mimics NC; D 组:lncRNA HOTAIR mut + miR-126 mimics。(2)A 组:ADAMTS-4 wt + mimics NC; B 组:ADAMTS-4 wt + miR-126 mimics; C 组:ADAMTS-4 mut + mimics NC; D 组:ADAMTS-4 mut + miR-126 mimics。分别转染至细胞中,采用双荧光素酶检测试剂盒(E1910, Promega, Madison, WI)检测肾细胞荧光素酶活性,萤火虫荧光素酶活性作为内参。

**1.2.3 CCK-8 法检测 TCA8113 细胞活力** 为明确 lncRNA HOTAIR、miR-126 和 ADAMTS-4 对 Tca8113 细胞增殖活力的影响,转染的细胞分为以下 3 大组,(1) 1 组分为 3 小组:A 为 siRNA NC; B 为 HOTAIR siR-

NA;C 为 ADAMTS-4 siRNA;(2)2 组分为两小组:A 为 inhibitor NC;B 为 miR-126 inhibitor;(3)3 组分为 4 小组:A 为 pcDNA-3.1(+)+mimics NC;B 为 pcDNA-HOTAIR+mimics NC;C 为 pcDNA-3.1(+)+miR-126 mimics;D 为 pcDNA-HOTAIR+miR-126 mimics。转染成功后,将细胞( $2\times 10^3$ )置于 96 孔板中培养 48 h,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液。细胞在 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度,试验均为 3 个重复。

**1.2.4 Transwell 试验检测细胞侵袭** 取出基质在冰上融化,用不完全的 DMEM 培养基(1:8)稀释。50  $\mu$ L 基质上室在细胞培养箱中培养 4 h。各组细胞用无血清 DMEM 培养基洗涤 2 次。为明确 lncRNA HOTAIR、miR-126 和 ADAMTS-4 对 Tca8113 细胞侵袭的影响,将转染的细胞分为以下 3 大组,(1)1 组分为 3 小组:A 为 siRNA NC;B 为 HOTAIR siRNA;C 为 ADAMTS-4 siRNA;(2)2 组分为两小组:A 为 inhibitor NC;B 为 miR-126 inhibitor;(3)3 组分为 4 小组:A 为 pcDNA-3.1(+)+mimics NC;B 为 pcDNA-HOTAIR+mimics NC;C 为 pcDNA-3.1(+)+miR-126 mimics;D 为 pcDNA-HOTAIR+miR-126 mimics,并进行相应质粒转染。48 h 后将细胞密度调整至  $1\times 10^5$ /L;将 100  $\mu$ L 的细胞接种到 Transwell 室中,将含 10%胎牛血清的 500  $\mu$ L DMEM 作为趋化因子加入 24 孔培养板的下室。8 h 后取出腔体。用棉签拭除顶部残留的细胞,固定 15 min,用 0.1%结晶紫染色 15 min,在光镜下计数。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)** 培养 Tca8113 细胞,将转染的细胞分为以下 4 组:A 为 pcDNA-3.1(+)+mimics NC;B 为 pcDNA-HOTAIR+mimics NC;C 为 pcDNA-3.1(+)+miR-126 mimics;D 为 pcDNA-HOTAIR+miR-126 mimics,进行相应质粒转染,转染成功后收取细胞 RNA 样。使用 Trizol 试剂(美国 Life Technologies 公司)从 OSCC 组织和细胞系中提取总 RNA。RNA 的浓度和质量由 NanoDrop 2000(美国 Quawell 公司)测定。采用 Super Script<sup>TM</sup> III 反转录酶试剂盒(美国 Life Technologies 公司)进行反转录。采用 TaqMan Universal Master Mix II 进行 RT-qPCR 检测,循环次数记录为 Ct。RT-qPCR:95  $^{\circ}$ C 处理 15 s,60  $^{\circ}$ C 处理 30 s,74  $^{\circ}$ C 处理 30 min(40 个循环),采用 GAPDH 作为内部控制。结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行分析。引物:lncRNA HOTAIR F(5'-3'):CAG TGG GGA ACT CTG ACT CG;R(5'-3'):GTG CCT GGT GCT CTC TTA CC。miR-126 F(5'-3'):GGC TCG TAC CGT

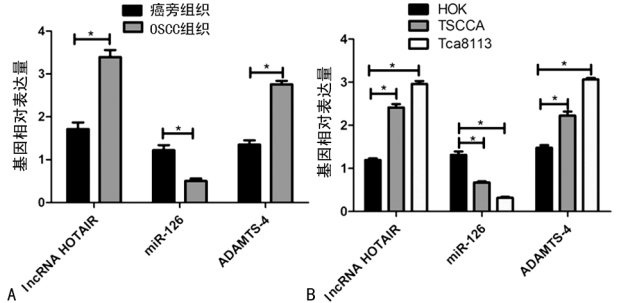
GAG TAA T;R(5'-3'):GTG CAG GGT CCG AGG T。ADAMTS-4 F(5'-3'):CCC AAG CAT CCG CAA TCC 3';R(5'-3'):CAG GTC CTG ACG GGT AAA CA。GAPDH F(5'-3'):GAA GGT GAA GGT CGG AGT C;R(5'-3'):GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC。

**1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡** 本研究使用凋亡检测试剂盒(中国南京凯基生物科技有限公司)。细胞培养与上述相同。为明确 lncRNA HOTAIR、miR-126 和 ADAMTS-4 对 Tca8113 细胞凋亡的影响,同 1.2.3 进行细胞转染。将细胞培养液吸收到适当的离心管中,用 PBS 冲洗贴壁细胞一次。细胞经适量胰酶(含 EDTA)消化后移至离心管。用 200  $\mu$ L Annexin V-FITC 结合缓冲液重悬细胞,加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC,室温黑暗孵育 10 min。100  $\mu$ L Annexin V-FITC 结合缓冲液再固定细胞,加入 10  $\mu$ L PI,轻轻混匀,置于 4  $^{\circ}$ C 黑暗中。流式细胞术检测 30~60 min。Annexin V-FITC 为绿色荧光,PI 为红色荧光。

**1.3 统计学处理** 采用 GraphPad Prism7.0 软件进行数据统计及统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,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 lncRNA HOTAIR、miR-126 和 ADAMTS-4 在 OSCC 中的差异表达** 与癌旁组织比较,OSCC 组织中 lncRNA HOTAIR、ADAMTS-4 基因表达明显上调( $P<0.05$ ),miR-126 表达明显降低( $P<0.05$ );与 HOK 细胞比较,TSCCA、Tca8113 细胞中 lncRNA HOTAIR、ADAMTS-4 基因表达明显上调( $P<0.05$ ),miR-126 表达明显降低( $P<0.05$ )。见图 1。



注:A 为 lncRNA HOTAIR、miR-126 和 ADAMTS-4 在 OSCC 组织和癌旁组织的基因表达;B 为 lncRNA HOTAIR、miR-126 和 ADAMTS-4 在 HOK、TSCCA、Tca8113 细胞中的基因表达;\*  $P<0.05$ 。

图 1 lncRNA HOTAIR、miR-126 和 ADAMTS-4 在 OSCC 中的差异表达

**2.2 HOTAIR siRNA 对 Tca8113 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响** lncRNA HOTAIR siRNA 组 Tca8113 细胞内 lncRNA HOTAIR 基因表达明显低于 siRNA

NC 组( $P<0.01$ )。与 siRNA NC 组比较, HOTAIR siRNA 组 Tca8113 细胞活力下调( $P<0.01$ ), 细胞凋

亡率上升( $P<0.01$ ), 细胞侵袭数目减少( $P<0.05$ )。见图 2、表 1。

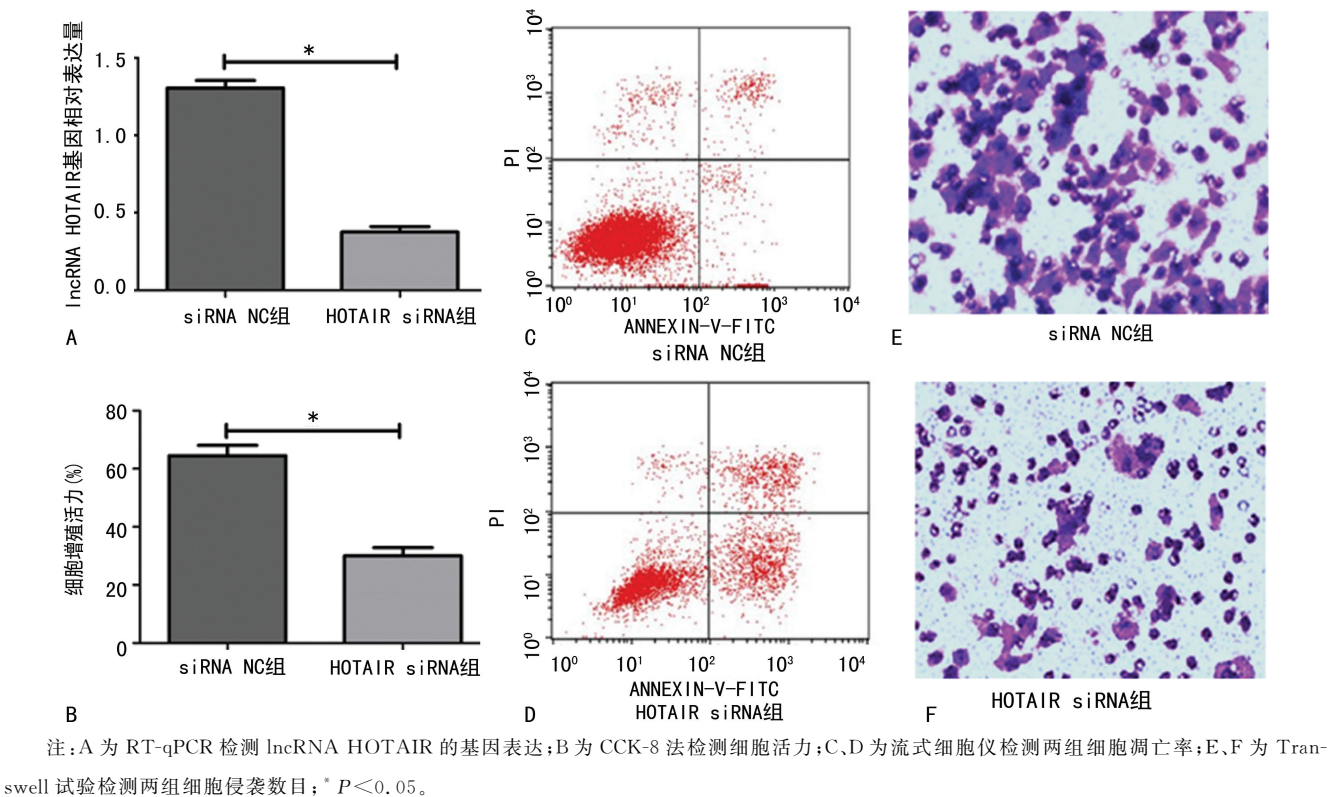


图 2 HOTAIR siRNA 对 Tca8113 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

| 表 1 HOTAIR siRNA 对 Tca8113 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响( $\bar{x}\pm s$ ) |                    |                    |                    |
|------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 组别                                                         | 细胞增殖活力 (%)         | 细胞凋亡率 (%)          | 细胞侵袭数目 (个)         |
| siRNA NC 组                                                 | 60.54 $\pm$ 7.93   | 8.73 $\pm$ 3.24    | 76.98 $\pm$ 10.25  |
| HOTAIR siRNA 组                                             | 31.65 $\pm$ 8.24 * | 23.68 $\pm$ 9.23 * | 43.68 $\pm$ 8.73 * |

注: 与 siRNA NC 组比较, \*  $P<0.05$ 。

**2.3 lncRNA HOTAIR 与 miR-126 的关系分析** 结果显示, lncRNA HOTAIR 3' UTR 和 miR-126 之间具有结合位点, 见图 3A。与 HOTAIR wt+mimics NC 组比较, HOTAIR wt+miR-126 mimics 组细胞荧光素酶活性下调( $P<0.01$ ); 与 HOTAIR mut+mimics NC 组比较, HOTAIR mut+miR-126 mimics 组细胞荧光素酶活性差异无统计学意义( $P>0.05$ ), 见图 3B。

**2.4 miR-126 inhibitor 对 Tca8113 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响** miR-126 inhibitor 组 Tca8113 细胞内 miR-126 表达低于 inhibitor NC 组( $P<0.01$ )。与 inhibitor NC 组比较, miR-126 inhibitor 组 Tca8113 细胞活力上调( $P<0.01$ ), 细胞凋亡率降低( $P<0.01$ ), 细胞侵袭数目增加( $P<0.01$ ), 见图 4、表 2。

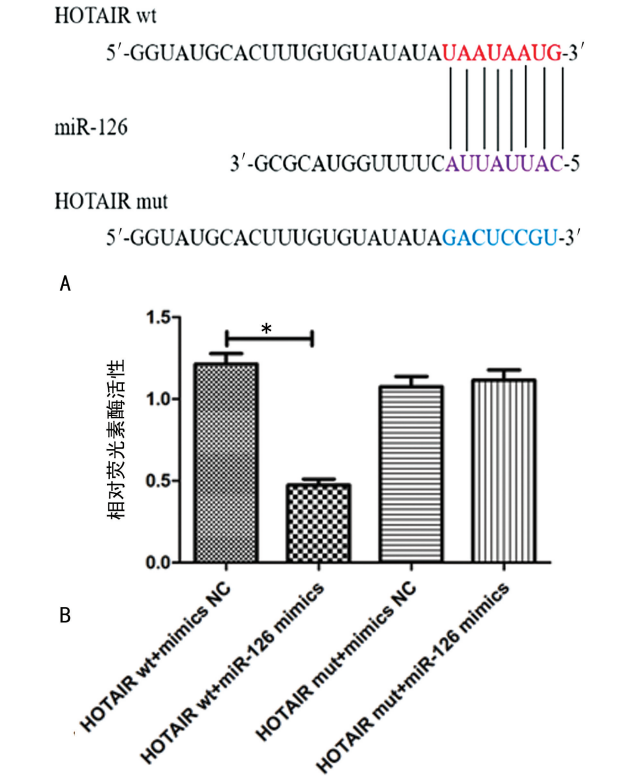


图 3 lncRNA HOTAIR 与 miR-126 的关系分析

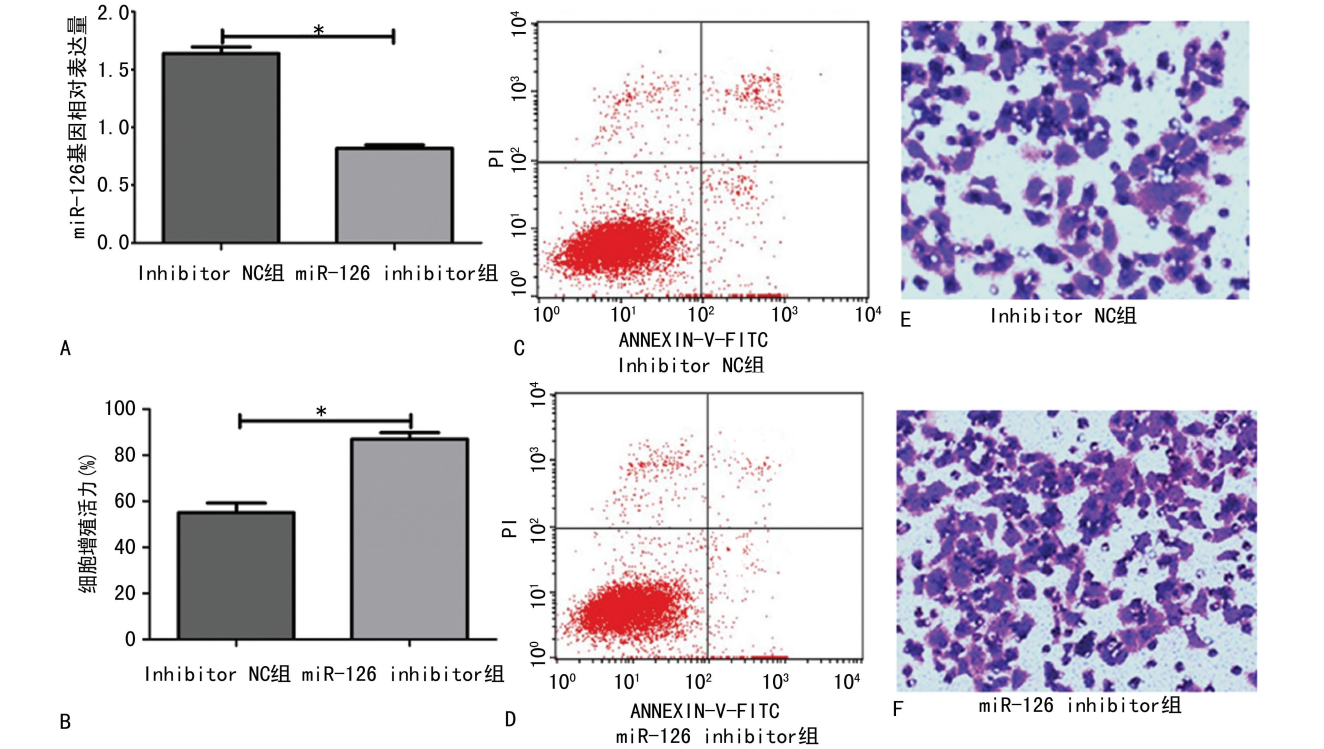


图 4 miR-126 inhibitor 对 Tca8113 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

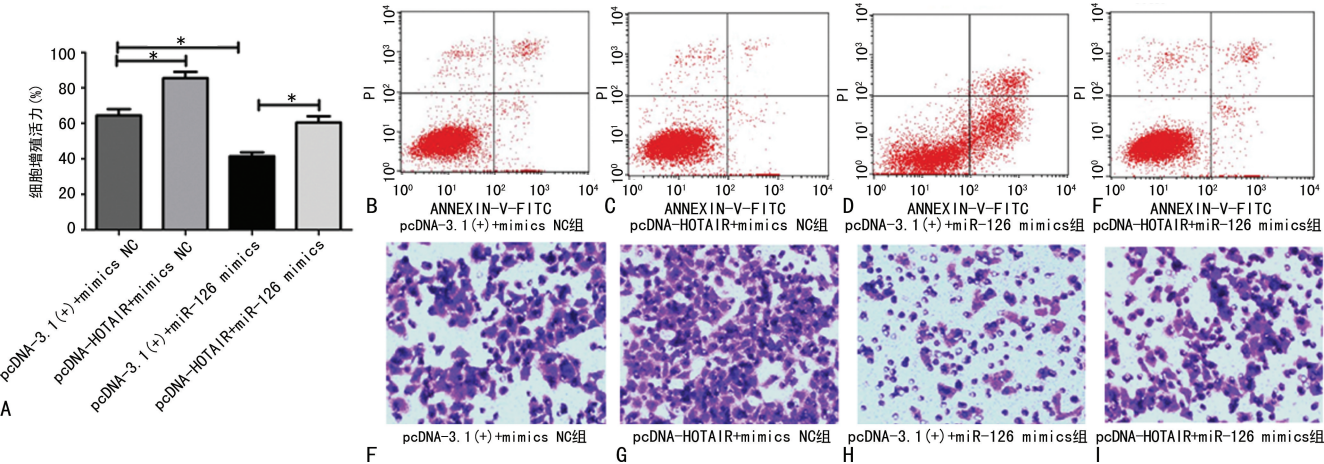
表 2 miR-126 inhibitor 对 Tca8113 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                  | 细胞增殖活力 (%)   | 细胞凋亡率 (%)  | 细胞侵袭数目 (个)    |
|---------------------|--------------|------------|---------------|
| inhibitor NC 组      | 50.26±8.56   | 8.65±2.15  | 80.58±9.26    |
| miR-126 inhibitor 组 | 85.38±10.25* | 5.35±2.13* | 120.83±15.84* |

注：与 inhibitor NC 组比较，\*  $P<0.05$ 。

**2.5 lncRNA HOTAIR 靶向 miR-126 对 Tca8113 细胞的增殖、凋亡和侵袭的影响** 与 pcDNA-3.1(+) + mimics NC 组比较，pcDNA-HOTAIR + mimics NC

组细胞增殖活力上升 ( $P<0.05$ )，细胞凋亡率降低 ( $P<0.01$ )，细胞侵袭数目增加 ( $P<0.01$ )；与 pcDNA-3.1(+) + mimics NC 组比较 pcDNA-3.1(+) + miR-126 mimics 组细胞增殖活力下调 ( $P<0.05$ )，细胞凋亡率上升 ( $P<0.01$ )，细胞侵袭数目减少 ( $P<0.01$ )；与 pcDNA-3.1(+) + miR-126 mimics 组比较，pcDNA-HOTAIR + miR-126 mimics 组细胞增殖活力上升 ( $P<0.05$ )，细胞凋亡率降低 ( $P<0.01$ )，细胞侵袭数目增加 ( $P<0.01$ )，见图 5、表 3。



注：A 为 CCK-8 法检测细胞活力；B~E 为流式细胞仪检测 4 组细胞凋亡率；F~I 为 Transwell 试验检测 4 组细胞侵袭数目；\*  $P<0.05$ 。

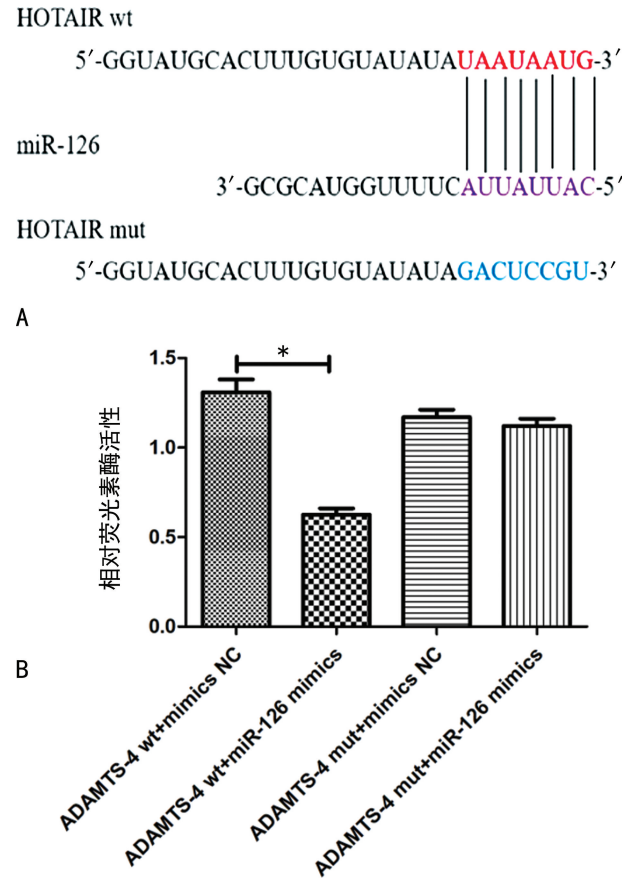
图 5 lncRNA HOTAIR 靶向 iR-126 对 Tca8113 细胞的增殖、凋亡和侵袭的影响

表 3 lncRNA HOTAIR 靶向 miR-126 对 Tca8113 细胞的增殖、凋亡和侵袭的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                            | 细胞增殖活力(%)               | 细胞凋亡率(%)                | 细胞侵袭数目(个)                 |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组      | 62.34±8.54              | 8.04±2.14               | 70.85±9.86                |
| pcDNA-HOTAIR+mimics NC 组      | 82.76±7.93 <sup>*</sup> | 4.65±2.17 <sup>*</sup>  | 130.47±12.54 <sup>*</sup> |
| pcDNA-3.1(+)+miR-126 mimics 组 | 40.21±5.63 <sup>*</sup> | 20.15±8.85 <sup>*</sup> | 25.46±7.58 <sup>*</sup>   |
| pcDNA-HOTAIR+miR-126 mimics 组 | 60.54±6.89 <sup>#</sup> | 9.13±2.35 <sup>#</sup>  | 68.34±6.69 <sup>#</sup>   |

注:与 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与 pcDNA-3.1(+)+miR-126 mimics 组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。

**2.6 miR-126 与 ADAMTS-4 的关系分析** 结果显示,ADAMTS-4 3'UTR 和 miR-126 之间具有结合位点,见图 6A。与 ADAMTS-4 wt+mimics NC 组比较,ADAMTS-4 wt+miR-126 mimics 组细胞荧光素酶活性下调( $P<0.01$ );与 ADAMTS-4 mut+mimics NC 组比较,ADAMTS-4 mut+miR-126 mimics 组细胞荧光素酶活性差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 6B。

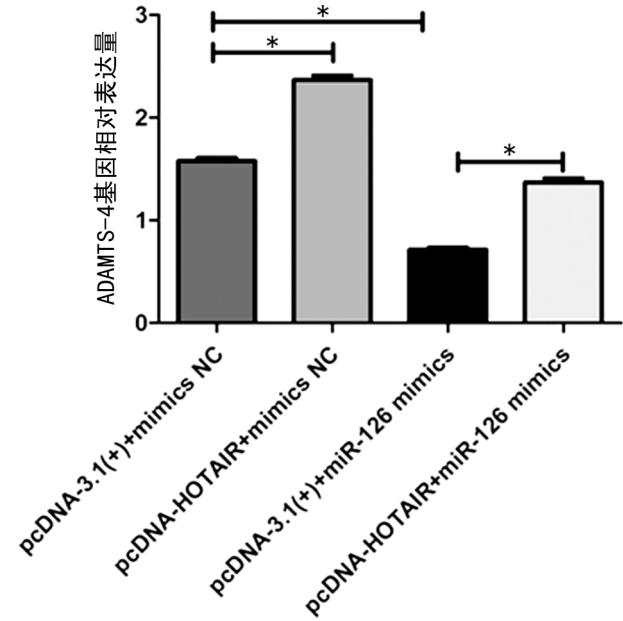


注:A为预测 miR-126 与 ADAMTS-4 的结合位点;B为检测荧光素酶活性;<sup>\*</sup> $P<0.05$ 。

图 6 miR-126 与 ADAMTS-4 的关系分析

**2.7 lncRNA HOTAIR 靶向 miR-126 对 ADAMTS-4 表达的影响** 与 pcDNA-3.1(+)+mimics NC 组比较,pcDNA-HOTAIR+mimics NC 组细胞内 ADAMTS-4 表达明显上调( $P<0.01$ ),pcDNA-3.1(+)+miR-126

mimics 组细胞内 ADAMTS-4 表达明显下调( $P<0.01$ );与 pcDNA-3.1(+)+miR-126 mimics 组比较,pcDNA-HOTAIR+miR-126 mimics 组细胞内 ADAMTS-4 表达明显上调( $P<0.01$ ),见图 7。



注:<sup>\*</sup> $P<0.05$ 。

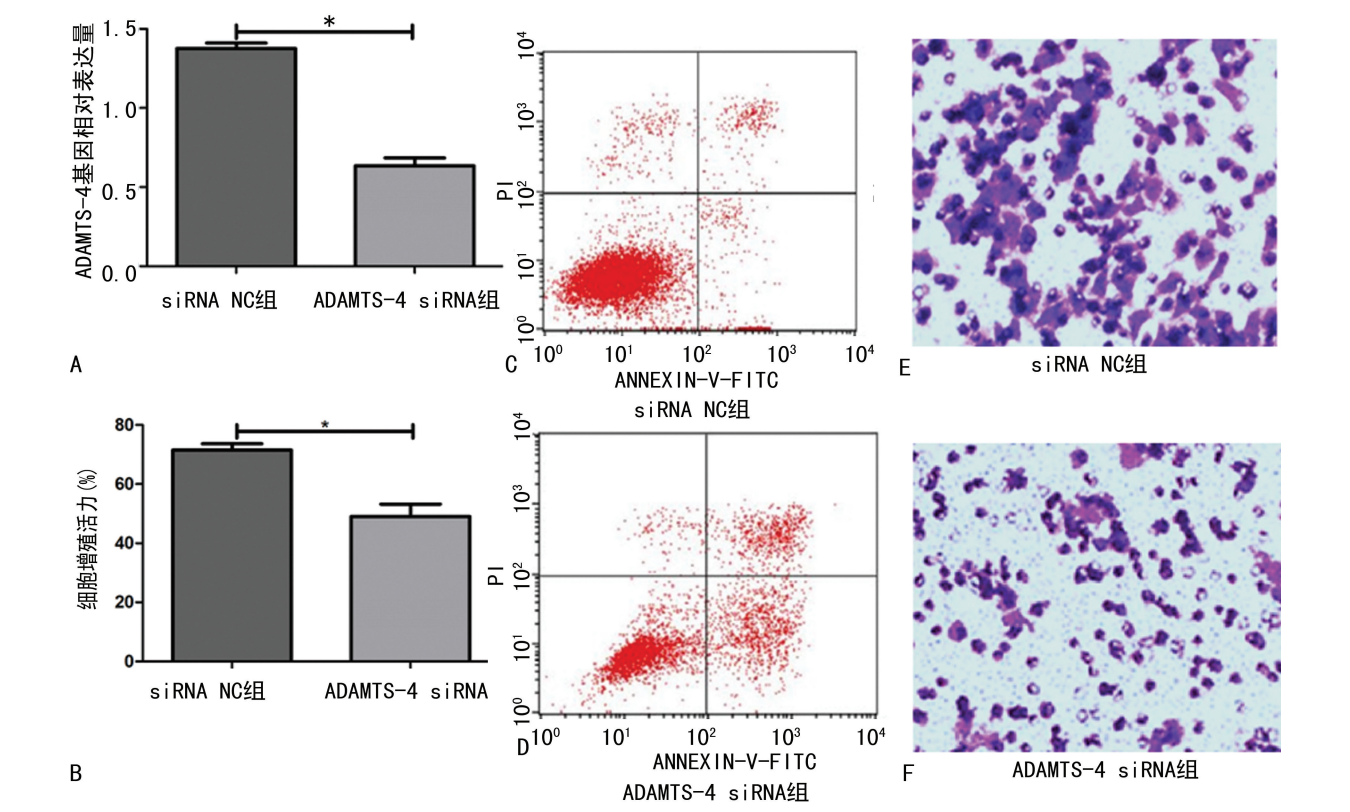
图 7 lncRNA HOTAIR 靶向 miR-126 对 ADAMTS-4 表达的影响

**2.8 ADAMTS-4 siRNA 对 Tca8113 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响** ADAMTS-4 siRNA 组 Tca8113 细胞内 ADAMTS-4 基因表达明显低于 siRNA NC 组( $P<0.01$ )。与 siRNA NC 组比较,ADAMTS-4 siRNA 组 Tca8113 细胞活力下调( $P<0.05$ ),细胞凋亡率上升( $P<0.01$ ),细胞侵袭数目减少( $P<0.05$ )。见图 8、表 4。

表 4 ADAMTS-4 siRNA 对 Tca8113 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别               | 细胞增殖活力(%)               | 细胞凋亡率(%)                | 细胞侵袭数目(个)               |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| siRNA NC 组       | 66.84±9.82              | 8.73±3.24               | 76.98±10.25             |
| ADAMTS-4 siRNA 组 | 45.62±7.66 <sup>*</sup> | 20.37±8.72 <sup>*</sup> | 40.23±9.51 <sup>*</sup> |

注:与 siRNA NC 组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ 。



注:A为RT-qPCR检测ADAMTS-4的基因表达;B为CCK-8法检测细胞活力;C、D为流式细胞仪检测两组细胞凋亡率;E、F为Transwell试验检测两组细胞侵袭数目;\* $P<0.05$ 。

图8 ADAMTS-4 siRNA对Tca8113细胞增殖、凋亡和侵袭的影响

### 3 讨论

发现新的、有效的用于OSCC诊断和预后的生物标志物将有助于改善患者的临床预后。有研究表明,lncRNA在肿瘤发生中发挥着关键作用,其被认为是OSCC等肿瘤诊断和判断预后的标志物<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,lncRNA HOTAIR和ADAMTS-4在OSCC组织和细胞中明显上调,miR-126明显下调。lncRNA HOTAIR和ADAMTS-4沉默可抑制Tca8113细胞的增殖和侵袭,促进细胞凋亡。笔者还发现,lncRNA HOTAIR在OSCC组织中发挥致癌作用,并通过miR-126调节其靶蛋白ADAMTS-4的表达。

有研究表明,lncRNA的异常表达和功能障碍与OSCC等疾病的发生、发展密切相关<sup>[8]</sup>。JIANG等<sup>[9]</sup>发现,lncRNA HOTAIR下调可通过microRNA-130a降低胰岛素样生长因子1的表达,从而缓解大鼠多囊卵巢综合征。MA等<sup>[10]</sup>研究表明,lncRNA HOTAIR通过上调FASN参与鼻咽癌的发生。JIANG等<sup>[11]</sup>研究发现,lncRNA HOTAIR可通过调控STAT3/Cyclin D1轴抑制胃癌生长。另外还有研究发现,lncRNA UCA1通过抑制miR-184的表达促进OSCC细胞的增殖和顺铂耐药<sup>[12]</sup>。过表达ln-

cRNA JPX通过miR-944/CDH2轴促进OSCC恶性发展<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,lncRNA HOTAIR在OSCC组织中表达上调,敲减HOTAIR表达后,Tca8113细胞的增殖和侵袭能力明显受到抑制,细胞凋亡率明显升高,但lncRNA HOTAIR在Tca8113细胞中的作用及其分子机制尚需进一步研究。

HU等<sup>[14]</sup>研究表明,lncRNA TMPO-AS1通过海绵miR-126-5p加速胃癌进展和血管生成。WANG等<sup>[15]</sup>发现,lncRNA HOTAIR通过海绵miR-216和靶向ZEB1促进骨肉瘤的发展。LI等<sup>[16]</sup>研究表明,miR-126通过抑制癌细胞凋亡和自噬促进食管鳞癌的发生,提示miR-126在癌细胞增殖、迁移和侵袭发展过程中发挥了关键作用。本研究结果表明,miR-126与lncRNA HOTAIR具有结合位点,在OSCC细胞系中,lncRNA HOTAIR能够直接靶向结合miR-126。为了进一步探讨miR-126对OSCC组织Tca8113细胞发展的影响,笔者将miR-126 inhibitor转染Tca8113细胞并检测了细胞增殖、凋亡和侵袭情况,结果显示,下调miR-126表达明显促进了Tca8113细胞增殖与侵袭,抑制癌细胞凋亡,提示miR-126在OSCC细胞发展过程中具有明显的抑癌作用。本研究结果还表明,上调lncRNA HOTAIR

表达能够通过海绵 miR-126 促进 Tca8113 细胞增殖和侵袭,抑制细胞凋亡,更进一步阐明了 lncRNA HOTAIR 的作用机制。然而,miR-126 调控的靶基因尚不清楚。此外,本研究结果显示,miR-126 与 ADAMTS-4 具有结合位点。敲减 ADAMTS-4 表达后,Tca8113 细胞增殖和侵袭能力下降,细胞凋亡率上升。有研究表明,ADAMTS-4 在人类肿瘤组织中普遍表达上调,在肿瘤发生过程中发挥致癌作用<sup>[17]</sup>。闫栋等<sup>[17]</sup>发现,浸润性乳腺癌组织中 ADAMTS-4 表达上调且癌细胞活性明显增强。本研究结果提示,ADAMTS-4 可能通过 lncRNA HOTAIR/miR-126 整合通路调控,其异常表达参与了 OSCC 的恶性发展进程,这可能为 OSCC 的治疗提供新的思路。

综上所述,本研究结果表明,lncRNA HOTAIR 在 OSCC 组织中表达上调,lncRNA HOTAIR 基因敲除可抑制 OSCC 细胞的生长和转移,并通过 miR-126/ADAMTS-4 轴在 OSCC 细胞中发挥促癌作用,这些数据为 OSCC 发病机制的复杂调控网络提供了新的见解。虽然 HOTAIR 已被确定为癌基因,但 lncRNA HOTAIR 在 OSCC 组织中发挥致癌作用的可能机制仍有待进一步探索。

参考文献

[1] 孙雪娇. MAGE-A 相关研究及其在口腔癌与癌前病变中的研究现状[J]. 临床口腔医学杂志, 2019, 35(8): 509-511.

[2] 陈雨蒙, 徐晓薇, 刘欣辰, 等. 肿瘤间质细胞对口腔癌作用的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(7): 552-556.

[3] 黄天臣, 冯留顺, 肖建安, 等. 进展期口腔癌患者循环肿瘤细胞水平及其与患者临床特征和预后的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(12): 2314-2317.

[4] CAO H L, LIU Z J, HUANG P L, et al. lncRNA-RMRP promotes proliferation, migration and invasion of bladder cancer via miR-206 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 1012-1021.

[5] CHEN J, HUANG X, WANG W, et al. LncRNA CDKN 2BAS predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma and promotes metastasis via the miR-153-5p/ARHGAP18 signaling axis[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(11): 3371-3381.

[6] ZHAO W, GENG D, LI S, et al. LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer[J]. Cancer

Med, 2018, 7(3): 842-855.

[7] PENG W X, KOIRALA P, MO Y Y. lncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer[J]. Oncogene, 2017, 36(41): 5661-5667.

[8] LI T, LIU D, LI C, et al. Silencing of LncRNA AFAP1-AS1 inhibits cell proliferation in oral squamous cancer by suppressing CCNA2 [J]. Cancer Manag Res, 2021, 15(13): 7897-7908.

[9] JIANG B, XUE M, XU D, et al. Down-regulated lncRNA HOTAIR alleviates polycystic ovaries syndrome in rats by reducing expression of insulin-like growth factor 1 via microRNA-130a[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 451-464.

[10] MA D D, YUAN L L, LIN L Q. lncRNA HOTAIR contributes to the tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma via up-regulating FASN[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(22): 5143-5152.

[11] JIANG D, LI H, XIANG H, et al. Long chain non-coding RNA (lncRNA) HOTAIR knockdown increases miR-454-3p to suppress gastric cancer growth by targeting STAT3/Cyclin D1 [J]. Med Sci Monit, 2019, 27(25): 1537-1548.

[12] FANG Z, ZHAO J, XIE W, et al. lncRNA UCA1 promotes proliferation and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma by sunppressing miR-184 expression [J]. Cancer Med, 2017, 6(12): 2897-2908.

[13] YAO Y, CHEN S, LU N, et al. lncRNA JPX overexpressed in oral squamous cell carcinoma drives malignancy via miR-944/CDH2 axis[J]. Oral Dis, 2021, 27(4): 924-933.

[14] HU Y, ZHANG Y, DING M, et al. Long noncoding RNA TMPO-AS1/miR-126-5p/BRCC3 axis accelerates gastric cancer progression and angiogenesis via activating PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2021, 36(7): 1877-1888.

[15] WANG Y, SUN G, WANG C, et al. miR-126 inhibits cell migration and invasion in bladder cancer by targeting E2F3[J]. J BUON, 2018, 23(5): 1492-1499.

[16] LI M, MENG X, LI M. miR-126 promotes esophageal squamous cell carcinoma via inhibition of apoptosis and autophagy [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(12): 12107-12118.

[17] 闫栋, 闫新峰, 常晓天. 浸润性乳腺癌组织中 ADAMTS-4 及 ARGxx 的表达变化[J]. 山东医药, 2011, 51(22): 28-29.