

王晓堂,肖兰飞,高继萍,等. 中国地鼠口腔鳞状细胞癌相关的长链非编码 RNA 差异表达谱建立及应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 7-15.

Wang XT, Xiao LF, Gao JP, et al. Establishment and application of differential expression profiles of long non-coding RNA associated with oral squamous cell carcinoma in Chinese hamster [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 7-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 002

中国地鼠口腔鳞状细胞癌相关的长链非编码 RNA 差异表达谱建立及应用

王晓堂,肖兰飞,高继萍,梁宇翔,轩瑞晶,闫晓如,高 莉,宋国华*

(山西医科大学实验动物中心,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001)

【摘要】 目的 筛选中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本中具有差异表达的长链非编码 RNA(long non-coding RNA,LncRNA),预测其靶基因,探究靶基因的生物学功能及富集的信号通路。**方法** 采用二甲苯并蒽涂抹法建立中国地鼠口腔鳞状细胞癌模型,高通量测序技术构建 LncRNA 差异表达谱,生物信息学技术筛选差异表达的 LncRNA 并进行靶基因预测,GO 与 KEGG 富集分析分别预测靶基因的生物学功能及富集的信号通路。**结果** 与正常组织样本相比,口腔鳞状细胞癌组织样本中筛选出 54 个显著差异表达 LncRNA(31 个上调,23 个下调)。功能性分析表明:与口腔癌相关的 GO 条目 73 条;KEGG 富集的信号通路 25 条。**结论** 中国地鼠口腔鳞状细胞癌样本中差异表达的 LncRNA 可能通过靶向调控其靶基因参与调控多种生物学功能及口腔癌相关的信号通路,在口腔鳞状细胞癌形成过程中可能发挥重要作用。

【关键词】 中国地鼠;口腔鳞状细胞癌;长链非编码 RNA

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0007-09

Establishment and application of differential expression profiles of long non-coding RNA associated with oral squamous cell carcinoma in Chinese hamster

WANG Xiaotang, XIAO Lanfei, GAO Jiping, LIANG Yuxiang, XUAN Ruijing, YAN Xiaoru, GAO Li, SONG Guohua*
(Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University; Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Models, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective To screen for differentially expressed long non-coding RNA (LncRNA) in oral squamous cell carcinoma tissue samples from Chinese hamsters and predict their target genes, and explore the biological functions and enrichment signaling pathways of these target genes. **Methods** The squamous cell carcinoma model was established in Chinese hamsters by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene smear method. The profile of differentially expressed LncRNA was constructed by high-throughput sequencing technology. Differentially expressed LncRNAs were screened by biosignal technology and target genes were predicted. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were used to predict the biological function of differentially expressed genes and enriched signaling pathways, respectively. **Results** Compared with normal tissue samples, 54 differentially expressed LncRNAs were

[基金项目] 国家自然科学基金(31772551,31970513);山西医科大学博士后基金(3C572018001)。

[作者简介] 王晓堂(1997—),女,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: 2432137746@qq.com

[通信作者] 宋国华(1973—),女,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: ykdsgh@163.com

screened from squamous cell carcinoma tissue samples, of which 31 were upregulated and 23 were downregulated. Functional analysis identified 73 GO entries associated with oral cancer, and 25 enriched KEGG signaling pathways.

Conclusions Differentially expressed LncRNA in Chinese hamster oral squamous cell carcinoma samples likely play a role in regulating various biological functions and oral cancer-related signaling pathways by targeting numerous genes, and may play an important role in the development of oral squamous cell carcinoma.

【Keywords】 Chinese hamster; oral squamous cell carcinoma; long non-coding RNA(LncRNA)

口腔癌作为近年来频发的肿瘤,在全身恶性肿瘤中约占 3%~5%,是全球范围内常见的第 11 位癌症,具有转移性高、手术切除难度大、术后易复发等特点^[1]。口腔鳞状细胞癌(Oral squamous cell carcinoma, OSCC)的发病率约占口腔恶性肿瘤的 90%,且发病率较高、恶化程度极强,患者 5 年存活率在 50%左右^[2]。已有证据指出,口腔鳞状细胞癌的形成与患者的多种不良生活习惯有关。此外,遗传因素、慢性炎症及病毒感染也是该病的诱因^[3]。世界卫生组织预计,未来几十年口腔癌的发病率将持续上升,成为一种严重的世界公共卫生问题^[4]。因此,需进一步研究口腔鳞状细胞癌发病进程中的相关机制,以便更好地进行癌前诊断与预后治疗。

近年来,大量研究表明长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)在多层次调控生物体的基因表达,参与生物体内多种重要的生物学过程^[5]。最新研究指出, LncRNA 具有复杂的生物学功能与作用调控机制,通过介导基因表达、转录、翻译以及组织分化等途径调控基因表达,引起细胞功能紊乱、代谢失调,导致多种疾病和癌症的形成^[6-7]。目前,有研究指出 LncRNA 在多种肿瘤发生过程中异常表达,参与调控肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭与凋亡过程,在肿瘤发生发展中发挥致癌或抑癌作用,是肿瘤发生的重要因素之一^[8-10]。但是, LncRNA 在口腔鳞状细胞癌中作用机制的研究相对较少,局限于未能获得足够的临床样本。因此,建立与人类口腔鳞状细胞癌相似的疾病动物模型模拟 OSCC 的发生发展过程,深入研究其发病机制至关重要。

中国地鼠(*Cricetulus barabensis griseus*)具有独特的颊囊组织结构,口腔黏膜与人类的相似性较高,可用其构建口腔癌实验动物模型,模拟人类口腔癌癌变过程^[11-13]。本课题组在前期研究中已成功建立中国地鼠口腔鳞状细胞癌动物模型,本文将高通量 LncRNA 测序技术与生物信息学技术相结合,筛选中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常组织样本中显著差异表达的 LncRNA,对其进行靶

基因预测,并对靶基因进行 GO 功能分析与 KEGG 信号通路分析,预测差异表达的 LncRNA 可能具有的功能,深入探讨其对中国地鼠口腔鳞状细胞癌发生发展的调控机制,为口腔鳞状细胞癌的临床研究提供数据与理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级中国地鼠 60 只,雄性,8~10 周龄,体重(20 ± 2)g,购自山西医科大学实验动物中心[SCXK(晋)2015-0001]。中国地鼠饲养于山西医科大学实验动物中心屏障环境[SYXK(晋)2015-0001],温度 25℃,湿度 40%~70%,光暗循环 12 h/12 h)。严格按照山西医科大学实验动物管理委员会的要求进行全部动物实验[IACUC 号:2017016],所有实验均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

RNA 提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司),普通 PCR 与荧光定量 PCR 相关试剂(日本 Takara 公司),Nanodrop 微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司),Qubit 荧光定量仪(美国 Thermo Fisher 公司),Agilent 2100 生物芯片分析系统(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 组织样本中 RNA 提取

本课题组前期采用二甲基苯并葱涂抹的方式成功制备口腔鳞状细胞癌动物模型^[12-15]。在课题组前期制备的中国地鼠口腔鳞状细胞癌模型组与正常组中分别随机选取 3 只动物,取适量的颊囊组织样本用液氮充分研磨,采用 RNA 提取试剂盒提取不同组织中的总 RNA。

1.3.2 高通量 LncRNA 测序

RNA 提取完成后,对其进行质检。首先,采用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性、降解程度以及是否被污染。RNA 纯度采用 Nanodrop 微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)进行检测,浓度采用 Qubit 荧光定量仪(美国 Thermo Fisher 公司)进行精

确定量。采用 Agilent 2100 生物芯片分析系统(美国 Thermo Fisher 公司)精确检测 RNA 的纯度与完整性。完成质检后,对质检合格的 RNA 进行片段化、反转录成 cDNA、末端修复、加接头、PCR 扩增等一系列操作后完成 cDNA 文库构建^[16-17]。筛选片段大小为 200 bp 左右的 cDNA 文库,按有效浓度及目标上机数据量的需求进行 Illumina 测序^[17]。

1.3.3 测序数据处理

测序获得的原始序列中存在低质量数据,本研究采用 FASTQC 软件^[18]处理原始数据并进行质量控制后得到高质量数据。质控完成后,使用 RSEM 比对软件^[19]将高质量数据比对到中国地鼠参考基因组上进行序列联配。RSEM 比对软件使用自身脚本对联配的结果进行表达量提取,生成基因的读数、FPKM 和 TPM 表达矩阵^[20-21]。最后,筛掉低表达量的基因(平均数值>5),分离 mRNA 和 LncRNA 对应的基因。

1.3.4 差异表达 LncRNA 筛选及靶基因预测

首先,将 RSEM 估算得到的各个 LncRNA 的读数作为输入数据输入到 DESeq2 软件^[20-21]进行差异鉴定,软件通过自行标准化与模型拟合,通过 Wald 检验^[22-23]鉴定两组样本间基因的差异显著性。其次,采用生物统计学与生物信息学相结合的方法筛选与 OSCC 密切相关的显著差异表达的 LncRNA,以 $\log_2(\text{差异倍数}) \geq 1$ ($|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$), $P < 0.05$ 为筛选条件。本研究通过表达量相关性分析的方法预测差异表达 LncRNA 的反式作用靶基因,选取 $P < 0.05$ 的基因作为反式作用候选基因。

1.3.5 GO 功能富集分析与 KEGG 信号通路分析

差异表达 LncRNA 的靶基因富集分析包括 GO 功能(Gene Ontology)分析与 KEGG 信号通路(Kyoto

Encyclopedia of Genes and Genomes pathway)分析^[24]。本研究采用 GO 功能注释对中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本中差异表达的 LncRNA 的靶基因进行功能分析,使用生物统计学方法筛选差异表达基因富集的生物学功能,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义的功能条目。采用 KEGG 信号通路富集分析,以达到对差异表达 LncRNA 的靶基因生物通路注释的目的,筛选出与 OSCC 相关的信号调控网络,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义的信号通路条目。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 22.0 软件分析,结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

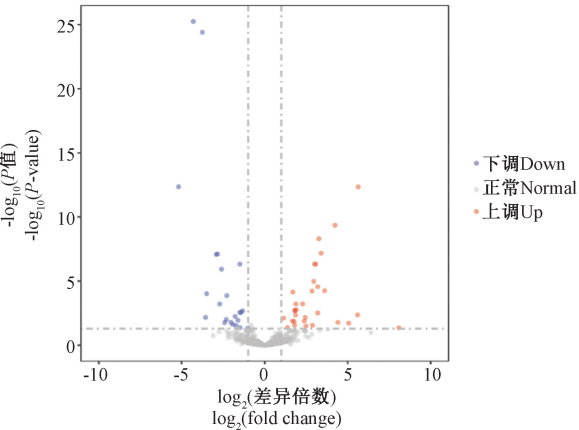
2 结果

2.1 中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常组织样本差异表达基因

采用高通量 LncRNA 测序技术对组织样本进行测序分析,结果表明与中国地鼠正常颊囊组织样本相比口腔鳞状细胞癌组织样本中共筛选出 54 个显著差异表达的 LncRNA($P < 0.05$, $|\log_2(\text{差异倍数})| > 1$),31 个基因表达上调,23 个基因表达下调,并绘制了显著差异表达的 LncRNA 的火山图(图 1)。进一步采用 t 检验分析实验数据,筛选出 10 个差异具有极显著统计学意义的 LncRNA($P < 0.01$, $|\log_2(\text{差异倍数})| > 3$),分别为 LOC100754872、LOC103160606、LOC107978163、LOC103163417、LOC103162225、LOC103161306、LOC107979530、LOC103161117、LOC103164378、LOC103161380。其中 7 个基因表达上调,3 个基因表达下调(表 1)。

表 1 两组组织样本中显著差异表达前十的 LncRNA

Table 1 Top ten LncRNAs expressed in normal and squamous cell carcinoma tissue samples with significant differences					
基因序列号 Gene ID	基因名称 Gene name	平均读数 Mean count	$\log_2(\text{差异倍数})$ $\log_2(\text{fold change})$	P 值 P -value	上调/下调 Up/Down
100754872	LOC100754872	14. 018248	8. 082393121	0. 0036	上调 Up
103160606	LOC103160606	49. 86007826	5. 632877073	0. 0000	上调 Up
107978163	LOC107978163	4. 842724695	5. 59249855	0. 0002	上调 Up
103163417	LOC103163417	63. 35730283	-5. 192842783	0. 0000	下调 Down
103162225	LOC103162225	27. 95139454	5. 060953151	0. 0013	上调 Up
103161306	LOC103161306	6. 533238171	4. 410781992	0. 0010	上调 Up
107979530	LOC107979530	134. 7442638	-4. 303270636	0. 0000	下调 Down
103161117	LOC103161117	56. 58531583	4. 236843984	0. 0000	上调 Up
103164378	LOC103164378	241. 3621748	-3. 75770965	0. 0000	下调 Down
103161380	LOC103161380	27. 80938113	3. 608525397	0. 0000	上调 Up



注:X 轴代表差异表达倍数的 $\log_2$ 值,纵坐标代表各个基因的经过标准化后的 P 值。显著上调的基因 ($|\log_2(\text{差异倍数})| > 1$) 为红色标识,显著下调的基因为蓝色标识,表达量没有变化的基因为灰色标识。

图 1 正常组与鳞癌组中差异表达 LncRNA 火山图
Note. X-axis represents $\log_2$ value of differential expression multiple, while the ordinate represents the normalized P -value of each gene. Significantly upregulated genes ($|\log_2(\text{fold change})| > 1$) are indicated in red, significantly downregulated genes are indicated in blue, and genes with no change in expression are indicated in gray.

Figure 1 Volcano maps of differentially expressed LncRNA in normal and squamous cell carcinoma groups

2.2 中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常组织样本差异表达的 LncRNA 靶基因预测

采用靶基因预测软件预测显著差异表达的 54 个 LncRNA 反式作用靶基因。本研究对极显著差异表达 ($P < 0.01$) 的 10 个 LncRNA 预测的靶基因数目进行统计,不同 LncRNA 位于染色体上不同位置,发挥不同生物学功能,因此预测的靶基因数目不同(表 2)。进一步使用生物统计学方法分别统计了极显著差异表达的 LncRNA 相关性最高的前 5 个靶基

因(表 2)(相关性 > 0.85 , $P < 0.01$)。推测组织样本中极显著差异表达的 LncRNA 可能通过与其靶基因之间相互调控发挥作用,从而调控口腔鳞状细胞癌的发生进程。

2.3 中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常组织样本差异表达 LncRNA 的靶基因 GO 分析

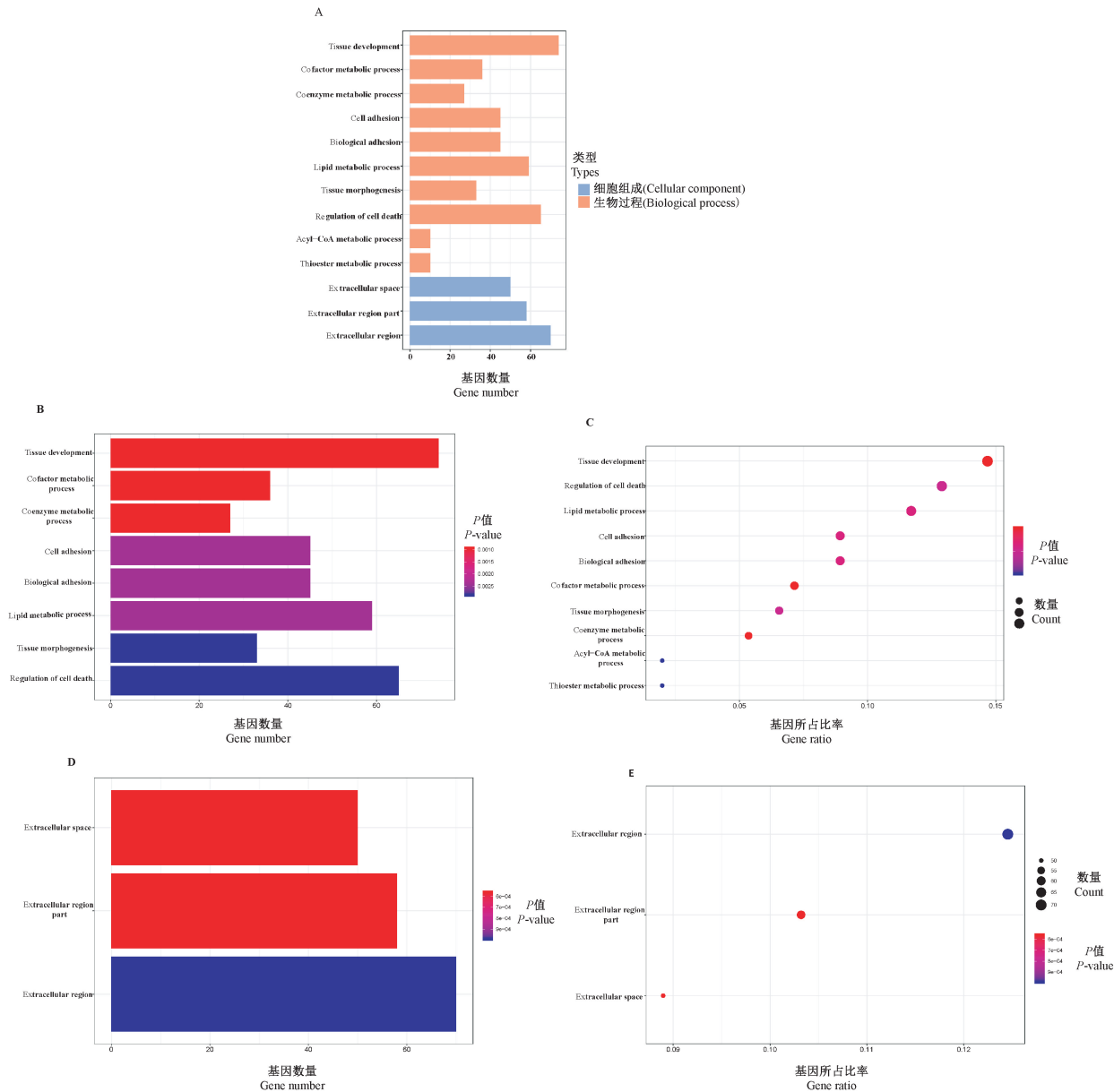
采用 GO 功能注释方法分析 54 个显著差异表达的 LncRNA 的靶基因富集的生物学功能。GO 注释结果中共获得 73 个条目,70 条与生物过程相关,3 条与细胞位置相关,未发现与分子功能相关的条目。采用生物统计学方法筛选显著富集的 GO 条目 ($P < 0.05$),其中 10 条与生物过程相关,3 条与细胞位置相关,该结果表明差异表达基因的靶基因主要分布在细胞外区域,参与调控硫酸酯、酰基辅酶 A、辅酶、辅因子、脂质代谢过程,调节细胞死亡、细胞黏附、组织发育及组织形态发生等过程(图 2A)。以 $P < 0.01$ 为筛选条件,筛选出极显著富集的 GO 条目,8 条与生物过程相关(图 2B、2C),3 条与细胞位置相关(图 2D、2E)。推测以上生物学功能的紊乱或异常可能引起口腔鳞状细胞癌的恶化。

2.4 中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常组织样本差异表达 LncRNA 的靶基因 KEGG 分析

KEGG 通路富集分析结果表明,差异表达的 LncRNA 的靶基因共富集了 25 条信号通路 ($P < 0.05$)。采用生物统计学方法,筛选极显著富集的信号通路 ($P < 0.01$),共筛出 12 条极显著的信号通路(图 3A、3B,表 3)。主要包括细胞因子-细胞因子受体相互作用信号通路(cge04060)、粘着力信号通路(cge04510)、轴突指导信号通路(cge04360)、钙信号通路(cge04020)与 TNF 信号通路(cge04668),这些通路多与肿瘤的发生发展密切相关。此外,差异表达的 LncRNA 的靶基因还参与调控 ARVC 信号通

表 2 显著差异表达 LncRNA 靶基因预测结果统计
Table 2 Significant differentially expressed LncRNA target gene-prediction results and statistics

基因名称 Gene name	预测的靶基因数量 Numbers of predicted targets	差异表达的靶基因名称 Differentially expressed target genes name
LOC100754872	2954	Odam; Kif26b; Clstn2; Vill; Wdr86
LOC103160606	3533	Tlpi2; Gprc5a; Orl1; Gpr68; Tnn
LOC107978163	3472	Fam19a2; Stra6; Cxcl3; Scg2; Mmp10
LOC103163417	1431	Tcp11l2; Cldn1; Cln8; Mboat2; Il18
LOC103162225	1454	Pou2af1; Pik3ap1; Galnt3; Rpn1; Aldh8a1
LOC103161306	2435	Wdr86; Odam; Csn3; Adgre3; Pcdh10
LOC107979530	3302	Ptk6; Acox2; Dgat2; Adgrf2; Ppp1r3a
LOC103161117	3489	Stra6; Fam19a2; Cxcl3; Scg2; Mmp10
LOC103164378	2216	Ndufv2; Smco1; Cln2; Ca11; Coq3
LOC103161380	3853	Gpr176; Gpr176; Cx3er1; Sle2a3; Gpr68



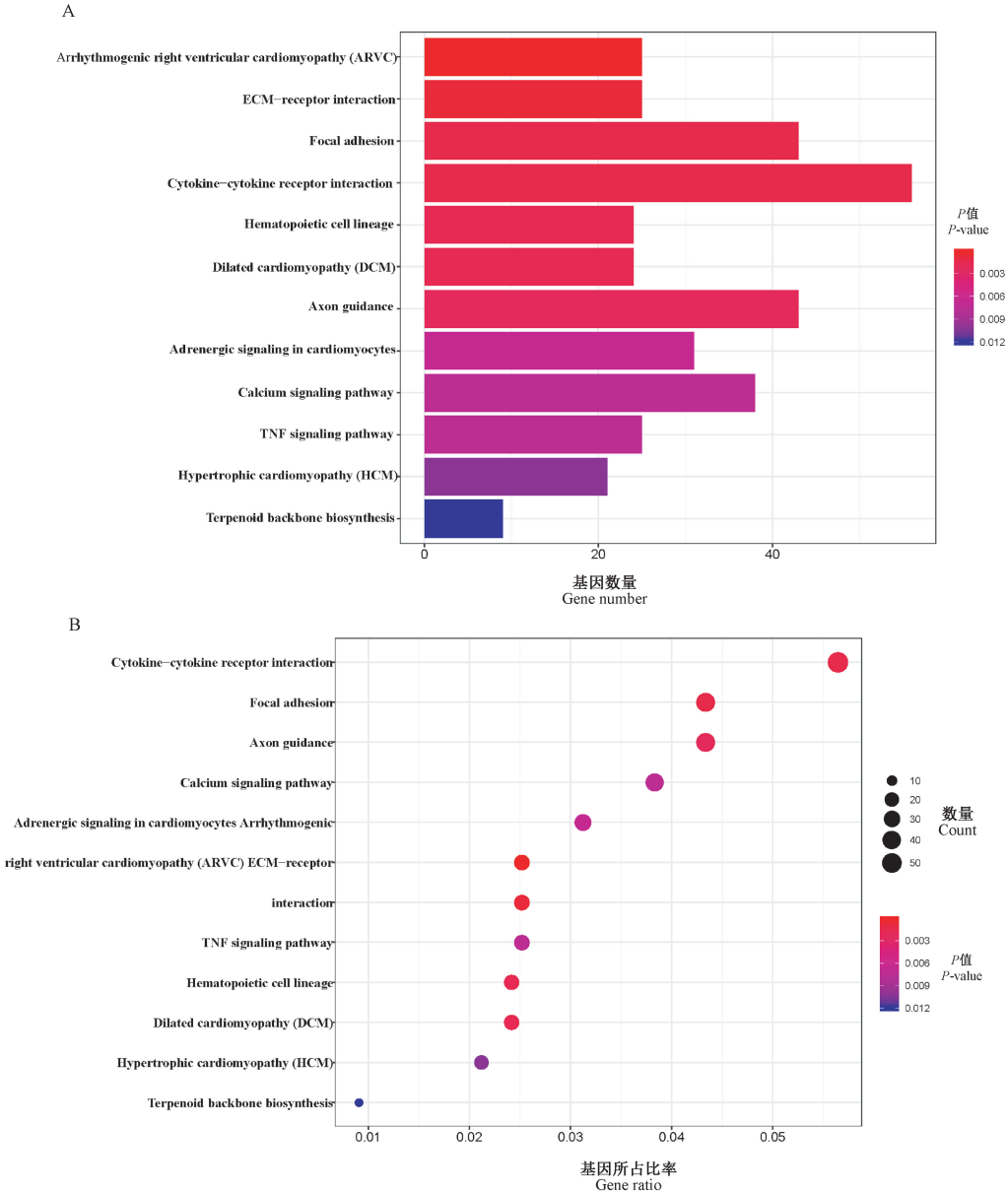
注:A:GO 分类所有条目柱状图,横坐标为富集的基因数量,纵坐标为 GO 条目,不同的颜色代表不同的 GO 分类。B:生物过程相关的 GO 条目的柱状图。C:生物过程相关的 GO 条目的气泡图。D:细胞组成相关的 GO 条目的柱状图。E:细胞组成相关的 GO 条目的气泡图。

图 2 正常组与鳞癌组中显著差异表达 LncRNA 的靶基因富集的总 GO 条目、生物过程与细胞组成条目
Note. A, GO classification histograms of all entries where the abscissa is the number of enriched genes, the ordinate is the GO entry, and different colors represent different GO classifications. B, Histogram of biological process-related GO entries. C, Bubble chart of biological process-related GO entries. D, Histogram of cellular component-related GO entries. E, Bubble chart of cellular component-related GO entries.

Figure 2 Total GO entries, and biological process and cellular component entries for significant differentially expressed LncRNA target genes in normal and squamous cell carcinoma groups

路(cge05412)、DCM 信号通路(cge05414)、HCM 信号通路(cge05410)、心肌细胞的肾上腺素信号传导通路(cge04261)、造血细胞谱系信号通路(cge04640)、萜类骨架的生物合成(cge00900)及

ECM-受体相互作用通路(cge04512),这些通路大多与心脏疾病密切相关。推测在口腔鳞状细胞癌中这些信号通路在不同程度上发挥调控作用,影响口腔鳞状细胞癌的发生发展。



注:A:KEGG 信号通路柱状图。B:KEGG 信号通路气泡图。

图3 正常组与鳞癌组中显著差异表达 LncRNA 的靶基因 KEGG 信号通路富集图
Note. A, KEGG signal path histogram. B, Bubble map of KEGG signal path.

Figure 3 Enrichment of KEGG signaling pathways in target genes with significant differential expression of LncRNA in normal and squamous cell carcinoma groups

3 讨论

口腔癌是经过一系列组织病理学发展进程演变而来,病损因轻到重,最后发展为原位癌或口腔鳞状细胞癌^[25-26]。近年来,口腔鳞状细胞癌的发病者趋于年轻化,发病率不断上升^[27]。由于缺少针对性的早期筛查方法,就诊患者大多为晚期病人。因

此,寻找口腔鳞状细胞癌早期筛查与诊断预后的生物标记物成为近年来临床研究热点。长链非编码 RNA 是长度大于 200 bp 的非编码 RNA,不编码蛋白质,在生物体生长发育、生殖分化过程中发挥重要作用,是目前生物学与医学的热点研究领域^[28-29]。大量研究报道,LncRNA 在表观遗传与基因表达过程中扮演重要角色,参与细胞增殖、分化、

表 3 极显著差异 KEGG pathway 统计表
Table 3 KEGG pathway statistics of significant differences

KEGG 信号通路序列号 KEGG pathway ID	KEGG 信号通路名称 KEGG pathway name	P 值 P-value	靶基因富集数目 Target gene enrichment count
cge05412	ARVC 信号通路 Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	0. 0000	25
cge04512	ECM-受体相互作用通路 ECM-receptor interaction	0. 0000	25
cge04510	粘着力信号通路 Focal adhesion	0. 0000	43
cge04060	细胞因子-细胞因子受体相互作用信号通路 Cytokine-cytokine receptor interaction	0. 0000	56
cge04640	造血细胞谱系信号通路 Hematopoietic cell lineage	0. 0000	24
cge05414	DCM 信号通路 Dilated cardiomyopathy (DCM)	0. 0000	24
cge04360	轴突指导信号通路 Axon guidance	0. 0000	43
cge04261	心肌细胞的肾上腺素信号传导通路 Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0. 0002	31
cge04020	钙信号通路 Calcium signaling pathway	0. 0003	38
cge04668	TNF 信号通路 TNF signaling pathway	0. 0003	25
cge05410	HCM 信号通路 Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	0. 0005	21
cge00900	萜类骨架的生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	0. 0006	9

凋亡进程^[30-32]。LncRNA 与其靶 mRNA 的 3' 非翻译区部分序列通过互补配对的方式结合,调控靶 mRNA 的表达,导致多种肿瘤的发生,在一定程度上影响肿瘤细胞增殖,参与调控细胞病变与癌症恶化过程,在肿瘤增生及患者生存期不同的病理生理特点中发挥作用,表明 LncRNA 可能作为潜在的癌症诊断标记物^[33-34]。高通量 LncRNA 测序技术能在较短的时间内对大量 LncRNA 基因组信息进行分析,预测其可能具有的生物学功能,有利于加速新的肿瘤标记物的产生,推动肿瘤的临床研究与治疗。

大量临床数据表明,口腔癌患者体内异常表达的 LncRNA 参与调控肿瘤的发生发展^[35-36]。有研究者对人类第一个口腔黏膜及其癌前病变的 LncRNA 表达谱进行研究,结果表明在癌组织中超过 60% 的异常表达的 LncRNA 与口腔癌相关^[37]。孔祥盼等^[38] 研究指出 LncRNA *FOXCUT* 在口腔癌组织及鳞癌细胞中呈高表达状态,其表达下调后会抑制口腔鳞状细胞癌细胞的增殖、克隆与迁移。付丛等^[39] 研究表明,LncRNA *AFAP1-AS1* 在口腔鳞癌组织中相对表达水平是正常组织的 5.16 倍,并与肿瘤临床分期、分化与转移相关。刘速等^[40] 研究指出 LncRNA *MALAT1* 敲低表达后抑制癌细胞的迁移、侵

袭能力。Tang 等^[41] 检测了口腔鳞状细胞癌中 6 种常见的 LncRNA 的表达情况,结果表明癌组织与正常组织相比 *MALAT-1*、*HOTAIR*、*NEAT-1*、*HULC*、*UCA1* 的表达显著升高,*MEG-3* 表达水平显著降低。基于已有研究,推测 LncRNA 在口腔鳞状细胞癌的病变过程中发挥重要作用。因此,阐明新发现的 LncRNA 与已知的 LncRNA 在肿瘤形成过程中具有的生物学功能,将有助于癌症的早期诊断和预后治疗。目前,口腔鳞状细胞癌患者的组织样本较难获取,且耗时很长,严重阻碍了对其发病机制的研究。基于以上原因,本课题组在前期研究中采用化学诱导法成功建立中国地鼠口腔鳞状细胞癌动物模型,模拟人类口腔鳞状细胞癌发生的病变过程^[12-15]。该动物模型的建立可以在较短的时间内获得实验所需的口腔鳞状细胞癌组织样本,以弥补临床样本的不足。大量临床研究采用基因芯片技术对肿瘤组织样本中差异表达基因进行筛选,本研究则选用高通量 LncRNA 测序技术进行研究。与基因芯片技术相比,采用高通量测序技术筛选模型动物组织样本中 LncRNA 差异表达谱可发现一些新的 LncRNA,为揭示更多新发现的 LncRNA 在疾病中的作用调控机制提供数据基础。

本实验采用高通量 LncRNA 测序技术对中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常样本进行测序分析,揭示了 LncRNA 在两种组织样本中的差异表达,成功建立了中国地鼠口腔鳞状细胞癌相关的长链非编码 RNA 差异表达谱。采用聚类分析的方法对实验组与对照组差异表达基因进行研究,共筛选出 54 个显著差异表达的 LncRNA ($P < 0.05$)。对显著差异表达 LncRNA 的靶基因进行功能性分析发现,OSCC 相关的 GO 条目有 73 条,以 $P < 0.01$ 为条件,筛选出极显著富集的 GO 条目,8 条与生物过程相关,3 条与细胞位置相关。GO 功能分析表明,差异表达 LncRNA 的靶基因主要位于细胞外区域,参与调控参与调控硫酸酯、酰基辅酶 A、辅酶、辅因子、脂质代谢过程,调节细胞死亡、细胞黏附、组织发育及组织形态发生过程。此结果与先前的研究报道一致^[42-44]。KEGG 信号通路富集分析结果指出,差异表达 LncRNA 的靶基因主要参与调控 25 条信号通路 ($P < 0.05$),其中极显著富集的信号通路 12 条 ($P < 0.01$)。主要包括细胞因子-细胞因子受体相互作用信号通路、粘着力信号通路、轴突指导信号通路、钙信号通路和 TNF 信号通路。这些信号通路在其他癌症发生发展中的作用机制已有报道,但其在口腔鳞状细胞癌中的报道相对较少^[45-47]。因此,深入研究口腔鳞状细胞癌发生进程中的生物学功能变化与相关信号通路的作用机制,有利于更好的揭示口腔鳞状细胞癌的发病机制。

综上所述,本研究以中国地鼠为实验动物,利用其独特优势成功构建成功构建了符合口腔鳞状细胞癌病理生理过程的中国地鼠模型,实验操作简单,造模成功率高。应用此模型对口腔鳞状细胞癌进行基础研究,可为其临床治疗提供新思路。此外,本实验主要基于生物信息学技术对动物模型中差异表达 LncRNA 进行筛选,对其靶基因的功能进行预测,并未进行大量的实验验证,在接下来的研究中还有许多问题有待解决。因此,在下一步的研究中,将深入探讨测序结果筛选出的极显著差异表达 LncRNA 参与调控口腔鳞状细胞癌发生发展的具体调控机制,阐明其与靶基因的相互关系以及在口腔鳞状细胞癌相关的信号通路中发挥的作用,以期能为口腔鳞状细胞癌的癌前诊断与预后治疗提供新的肿瘤标记物。

注:中国地鼠 (*Cricetulus barabensis griseus*) 是仓鼠科仓鼠亚科动物,在公开出版物中使用仓鼠作为名称更为科学。

但鉴于目前我国实验动物国家标准中提到的动物的种类都是地鼠,作为专业人员能够清楚该物种在动物分类中地位,并不妨碍科学研究的成果和使用。中文名称后面的拉丁文不会对该研究的主体产生歧义,故本文在发表时仍沿用“中国地鼠”,待国标修订后再统一命名为“仓鼠”。

参考文献:

- [1] Zhang SK, Zheng R, Chen Q, et al. Oral cancer incidence and mortality in China, 2011 [J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 44-51.
- [2] Jornet PL, Garcia FG, Berdugo ML, et al. Mouth self-examination in a population at risk of oral cancer [J]. Aust Dent J, 2015, 60(1): 59-64.
- [3] Mortazavi H, Baharvand M, Mehdipour M. Oral Potentially Malignant Disorders: An Overview of More than 20 Entities [J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2014, 8(1): 6-14.
- [4] Adami GR, Adami AJ. Looking in the mouth for noninvasive gene expression-based methods to detect oral, oropharyngeal, and systemic cancer [J]. ISRN Oncol., 2013, 2012(7): 931301.
- [5] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions [J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3): 155-159.
- [6] Clark MB, Mattick JS. Long noncoding RNAs in cell biology [J]. Semin Cell Dev Biol, 2011, 22(4): 366-376.
- [7] Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world [J]. Genes Dev, 2009, 23(13): 1494-1504.
- [8] Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy [J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(5): 272-287.
- [9] 杨倩, 黄宏斌, 龚朝建, 等. lncRNAs 参与基因表达调控机制的研究进展 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2014, 39(1): 91-95.
- [10] 李琪儿, 叶国梁, 郭俊明. LncRNA: 肿瘤分子诊断中的一颗新星 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(3): 233-240.
- [11] 薄家璐. 近交系中国地鼠的建立及应用 [J]. 医学研究通讯, 1994, 23(11): 20-21.
- [12] 皇甫冰, 庞文彪, 张锐虎, 等. 中国地鼠口腔颊囊黏膜癌模型的建立及癌变的动态观察 [J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(1): 56-59, 65.
- [13] 皇甫冰. 基于高通量测序的中国地鼠颊囊鳞癌转录组差异表达研究 [D]. 山西医科大学, 2016.
- [14] 李莉红. 中国地鼠口腔颊囊癌中 microRNA 差异表达谱建立及其调控网络研究 [D]. 山西医科大学, 2018.
- [15] 李莉红, 庞文彪, 常凯, 等. 中国地鼠口腔颊囊癌中 miRNA 与 mRNA 表达谱的关联分析 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(02): 158-164.
- [16] 黄鑫, 古文鹏, 黎晓慧, 等. 基于 16S rRNA 测序对树鼩肠道菌群特征与高级别肉瘤的相关性分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 11-16.
- [17] 徐锡文. 基于高通量测序的玉米基因组组装和水稻长非编码

- RNA 识别与分析 [D]. 华中农业大学, 2017.
- [18] Shizuka U. High-Throughput Methods to Detect Long Non-Coding RNAs [J]. High Throughput, 2017, 6(3): 12.
- [19] Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. BMC bioinformatics, 2011, 12(1): 323.
- [20] Anders S, McCarthy DJ, Chen Y, et al. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor [J]. Nat Protoc, 2013, 8(9): 1765–1786.
- [21] Marconi M, Rodriguez-Romero J, Sesma A, et al. Bioinformatics Tools for Next-Generation RNA Sequencing Analysis [M]. Fungal RNA Biology, 2014, 371–391.
- [22] 张伟伟, 吴志强. 校正肿瘤纯度影响的差异表达基因分析 [J]. 东华理工大学学报 (自然科学版), 2018, 41(03): 297–301.
- [23] Lee S, Suh Y. Lord's Wald Test for Detecting DIF in Multidimensional IRT Models: A Comparison of Two Estimation Approaches [J]. J Educ Meas, 2018, 55(2): 328–353.
- [24] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284–287.
- [25] Messadi DV. Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions [J]. Int J Oral Sci, 2013, 5(2): 59–65.
- [26] Wang X, Li F, Zhou X. miR-204-5p regulates cell proliferation and metastasis through inhibiting CXCR4 expression in OSCC [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 82: 202–207.
- [27] 王倩, 侯大为. 口腔鳞状细胞癌发病及转移机制研究进展 [J]. 口腔医学研究, 2018, 34(11): 21–24.
- [28] Yin Q, Wu A, Liu M. Plasma Long Non-Coding RNA (lncRNA) GAS5 is a New Biomarker for Coronary Artery Disease [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 6042–6048.
- [29] 谭楠, 李莉红, 白璐, 等. 非小细胞肺癌血清中 Lnc RNA HOTAIR 的表达及临床意义 [J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20(6): 402–406.
- [30] 胡洪林, 杨兰, 邓颖, 等. 非小细胞肺癌组织 LncRNA RP11-164P12.4 表达及其临床意义 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(16): 1148–1152.
- [31] 曾丽, 杨濡溪, 王佳, 等. 小细胞肺癌组织中 LncRNA EXOC7 的表达及其与预后的关系 [J]. 肿瘤, 2017, 37(03): 269–274.
- [32] Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription [J]. Science, 2007, 316(5830): 1484–1488.
- [33] Nishiyama K, Maruyama R, Niinuma T, et al. Screening for long noncoding RNAs associated with oral squamous cell carcinoma reveals the potentially oncogenic actions of DLEU1 [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(8): 826.
- [34] 谢兆辉. 长非编码 RNA 在基因表达调节中的作用 [J]. 生命的化学, 2010, 30(3): 345–349.
- [35] 陈新, 徐文华, 周健, 等. 口腔鳞状细胞癌现状 [J]. 口腔医学, 2017, 37(5): 462–465.
- [36] King M, Chatelain K, Farris D, et al. Oral squamous cell carcinoma proliferative phenotype is modulated by proanthocyanidins: a potential prevention and treatment alternative for oral cancer [J]. BMC Complement Altern Med, 2007, 19(7): 22.
- [37] Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, et al. Functional demarcation of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60770 full-length cDNAs [J]. Nature, 2002, 420(6915): 563–567.
- [38] 孔祥盼, 韩正学, 李华, 等. LncRNA FOXCUT 在口腔鳞状细胞癌中的表达及功能研究 [J]. 北京口腔医学, 2016, 24(5): 246–249.
- [39] 付丛, 张行炜. 长链非编码 RNA-AFAP1-AS1 在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义 [J]. 口腔医学研究, 2016, 32(9): 983–986.
- [40] 刘速, 周旋, 王晓非, 等. 长链非编码 RNA MALAT1 影响口腔鳞状细胞癌侵袭的实验研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(9): 460–465.
- [41] Tang H, Wu Z, Zhang J, et al. Salivary lncRNA as a potential marker for oral squamous cell carcinoma diagnosis [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(3): 761–766.
- [42] 姜朋涛, 胡志芳, 高兴春, 等. p53 在调控 DNA 损伤所致 MDA-MB-231 细胞死亡中的作用及其机制 [J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(05): 349–353.
- [43] 俞殷珏, 赵林丰, 李荣. 中链酰基辅酶 A 脱氢酶增强乳腺癌细胞的侵袭和转移能力 [J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(06): 650–656.
- [44] 邵胜利, 杨熹, 徐丰. PIK3R3 通过 PPARA 调节肝癌细胞脂质代谢及增殖 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2019, 48(02): 129–136.
- [45] 张筱茵. 胃癌病人体内肿瘤-机体免疫系统相互作用的实验研究-肿瘤局部细胞因子表达及 T 细胞受体池分析 [D]. 第四军医大学, 2001.
- [46] Stafman LL, Williams AP, Marayati R, et al. Focal Adhesion Kinase Inhibition Contributes to Tumor Cell Survival and Motility in Neuroblastoma Patient-Derived Xenografts [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 13259.
- [47] Li X, Darby J, Lyons AB, et al. TNF May Negatively Regulate Phagocytosis of Devil Facial Tumour Disease Cells by Activated Macrophages [J]. Immunol Invest, 2019, 48(7): 1–13.

[收稿日期] 2019-09-17