

刘茂林,王晓堂,宋晓娜,等. Gli2 调控 Hedgehog 通路活化对 Tca8113 细胞增殖、转移和上皮间充质转化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 1-9.

Liu ML, Wang XT, Song XN, et al. Gli2 regulates the activation of Hedgehog pathway in proliferation, metastasis, and epithelial mesenchymal transformation of Tca8113 cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.001

Gli2 调控 Hedgehog 通路活化对 Tca8113 细胞增殖、转移和上皮间充质转化的影响

刘茂林^{1#}, 王晓堂^{2#}, 宋晓娜², 马云辉², 常潇琪², 宋国华^{2*}

(1.山西医科大学资产管理部,太原 030001;2.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 本研究通过在细胞水平检测 Gli2 对口腔癌细胞 Tca8113 增殖、生长、迁移和侵袭的影响,明确 Gli2 调控口腔癌细胞迁移和侵袭的分子机制。**方法** 本研究利用 siRNA 抑制 Tca8113 细胞中 Gli2 的表达,通过 CCK-8、平板克隆以及 transwell 小室实验分别检测 Gli2 对 Tca8113 细胞增殖、生长、迁移与侵袭的影响。进一步利用 qRT-PCR 与 Western blot 实验探究 Gli2 调控 Tca8113 细胞恶性增殖和转移机制。**结果** 口腔癌细胞 Tca8113 中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达升高。干扰 Gli2 表达可抑制 Tca8113 细胞增殖、生长、迁移及侵袭。进一步研究发现干扰 Gli2 表达可抑制 Hedgehog (Hh) 通路关键因子的 mRNA 与蛋白表达。此外,干扰 Gli2 表达可显著影响上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)通路关键因子的 mRNA 与蛋白表达。**结论** 口腔癌病变过程中 Gli2 被异常激活,干扰 Gli2 表达显著抑制口腔癌细胞的增殖、生长、迁移和侵袭。Gli2 通过调控 Hh 通路 EMT 通路,进而影响口腔癌细胞的迁移和侵袭。本研究为阐明口腔癌的发病机制提供新思路,并为口腔癌的临床治疗提供新视角。

【关键词】 Tca8113 细胞;口腔癌;Gli2;细胞迁移;细胞侵袭;Hedgehog 通路;上皮间充质转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0001-09

Gli2 regulates the activation of Hedgehog pathway in proliferation, metastasis, and epithelial mesenchymal transformation of Tca8113 cells

LIU Maolin^{1#}, WANG Xiaotang^{2#}, SONG Xiaona², MA Yunhui², CHANG Xiaoqi², SONG Gouhua^{2*}

(1. Asset Management Department, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.

2. Shanxi Key Laboratory of Laboratory Animals and Animal Models of Human Disease,
Center for Laboratory Animals, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Gli2 on the proliferation, growth, migration, and invasion of oral cancer cells (Tca8113) at the cellular level, and to clarify the molecular mechanism of how Gli2 regulation affects the migration and invasion of oral cancer cells. **Methods** Small interfering (si) RNA was used to inhibit Gli2 expression in Tca8113 cells. The effects of Gli2 on the proliferation, growth, migration, and invasion of Tca8113 cells were examined by

【基金项目】国家自然科学基金(31970513);山西省中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2022A060);山西省回国留学人员科研项目(2021-086);山西省科技创新人才团队项目(202204051002032)。

【作者简介】刘茂林(1975—),男,实验师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:571143392@qq.com

王晓堂(1997—),女,博士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:2432137746@qq.com [#]共同第一作者

【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:ykdsg@163.com

CCK-8, plate cloning, and transwell chamber assay. Further qRT-PCR and Western blot assays were used to explore the mechanism of how Gli2 regulation effects the malignant proliferation and metastasis of Tca8113 cells. **Results** The mRNA and protein expression of Gli2 in oral cancer cells (Tca8113) increased. Interference of Gli2 expression inhibited the proliferation, growth, migration, and invasion of Tca8113 cells. Further experiments showed that interfering with Gli2 expression inhibited the mRNA and protein expression of key factors in the Hedgehog (Hh) pathway. In addition, interference of Gli2 expression significantly affected the mRNA and protein expression of key factors in epithelial mesenchymal transformation (EMT) pathways. **Conclusions** Gli2 is abnormally activated during oral cancer, and interference of Gli2 expression significantly inhibits the proliferation, growth, migration, and invasion of oral cancer cells. Gli2 influences the migration and invasion of oral cancer cells by regulating the Hh and EMT pathways. This study has provided a new way to elucidate the pathogenesis of oral cancer and new perspectives on the clinical treatment of oral cancer.

【Keywords】 Tca8113 cells; oral cancer; Gli2; cell migration; cell invasion; Hedgehog pathway; EMT

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肿瘤的发病率与死亡率的增长尚未得到有效控制,俨然成为 21 世纪全世界的负担和亟待解决的问题。恶性肿瘤作为一个被低估的公共卫生问题,对患者的身心健康造成一定影响。口腔癌是世界范围内严重威胁人类生命健康的常见多发性恶性肿瘤之一。全球每年有超过 45 万患者被诊断为口腔癌,其 5 年生存率低于 50%^[1]。口腔鳞状细胞癌是口腔癌的主要形式,占口腔癌发病率的 90% 以上,其具有高恶性、易转移、易复发等特点,大部分患者预后较差且术后生活质量显著下降,甚至影响患者的日常人际交往^[2]。因此,阐明口腔癌的发病机制,寻找新型的诊治靶点,对患者的生存预后至关重要。

基因靶向治疗是近年来肿瘤学的研究热点,在肿瘤相关信号通路上筛选治疗肿瘤的最佳药物靶点将有利于提高患者的临床治疗效果^[3]。随着对口腔癌发病机制的深入研究,越来越多的分子靶点被发现。作为众多致癌信号通路的汇聚点,Hedgehog(Hh)通路在调节肿瘤发生发展的过程中发挥重要作用^[4-5]。大量文献报道,该通路在胚胎时期的细胞分化、组织发育及器官形成中起重要作用,且在多种肿瘤组织中均存在 Hh 通路的异常激活,其异常激活与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、血管新生、侵袭转移等细胞生物学功能密切相关,提示异常激活的 Hh 通路在肿瘤发生发展中起重要作用^[6-8]。

Gli2 是 Hh 通路的关键转录因子,在该通路中起连接作用,可将胞外信号转导至细胞核,激活靶基因转录,进而在多种肿瘤的发展进程中发挥关键作用^[9]。目前,Gli2 被认为是新的癌基因,具有促进肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间充质转化

(epithelial mesenchymal transformation, EMT) 的作用^[10]。He 等^[11]研究发现, circZNF609 通过调控 miR-15a-5p/15b-5p 和 Gli2 的表达激活 Hh 通路,增强肝癌细胞的增殖和转移能力及肿瘤干性。Huang 等^[12]研究发现 Gli2 通过转录激活 ARHGEF16 促进人胶质瘤细胞的增殖和迁移。Zhang 等^[13]研究发现 FGF19/Gli2 信号轴通过诱导 EMT 进而促进肺鳞状细胞癌转移。值得一提的是,有研究发现口腔癌患者中 Gli2 的表达显著升高,且 Gli2 的表达和口腔癌患者的较差预后密切相关^[14]。

综上所述,Gli2 可能在口腔癌发生发展过程中发挥重要作用,但其潜在作用机制仍有待揭示。因此,本研究将在细胞水平检测 Gli2 对口腔癌细胞 Tca8113 增殖、生长、迁移和侵袭的影响,明确 Gli2 调控口腔癌细胞迁移和侵袭的分子机制,为阐明口腔癌的发病机制提供新思路,并为口腔癌的临床治疗提供新视角。

1 材料和方法

1.1 细胞

人类口腔癌细胞 Tca8113 购买于 BOSTER 公司,正常上皮角质细胞 HOK 由山西医科大学口腔医学院重点实验室惠赠。

1.2 主要试剂与仪器

TRIzol(日本,TaKaRa 公司);异丙醇(中国,博迪化工有限公司);氯仿(中国,博迪化工有限公司);Prime Script™ RT reagent kit 试剂盒(日本,TaKaRa 公司)蛋白 RIPA 裂解液(中国,BOSTER 公司);PMSF(中国,BOSTER 公司);广谱磷酸酶抑制剂(中国,BOSTER 公司);BCA 蛋白检测试剂盒(中国,BOSTER 公司);5×蛋白上样缓冲液(中国,

BOSTER 公司);NC 膜(中国,BOSTER 公司);蛋白干粉(中国,BOSTER 公司);ECL 发光液(中国,BOSTER 公司); β -actin 抗体(中国,ABclonal 公司);Shh 抗体(中国,ABclonal 公司);Ptch1 抗体(中国,ABclonal 公司);Gli1 抗体(中国,ABclonal 公司);Gli2 抗体(中国,ABclonal 公司)。超低温冰箱(日本,三洋电器株式会社);高速冷冻离心机(美国,Sigma 公司);倒置显微镜(日本,OLYMPUS 公司);酶标仪(日本,Biotek 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国,AB 公司);逆转录 PCR 仪(美国,Bio-Rad 公司);垂直电泳仪(美国,Bio-Rad 公司);转印电泳仪(美国,Bio-Rad 公司);转移脱色摇床(中国,麒麟医用仪器厂公司);化学发光成像仪(英国,Syngene 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

HOK 细胞培养于含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基, Tca8113 细胞培养于含有 10% FBS 的 DEME 培养基。上述细胞均培养于 37 ℃ 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中。

1.3.2 qRT-PCR 实验

细胞样本利用 TRIzol 法提取样本的总 RNA,利用酶标仪检测 RNA 样本的纯度与浓度,并保存于 -80 ℃。采用 Prime Script™ RT reagent Kit 试剂盒将细胞样本的总 RNA 反转录为 cDNA。通过实时荧光定量 PCR 验证细胞样本中不同基因的表达量。本研究所需的基因引物序列见表 1。

1.3.3 Western blot 实验

采用 RIPA 裂解液(蛋白酶抑制剂 1%,磷酸酶

抑制剂 1%)提取细胞样本中的总蛋白,采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。将蛋白煮沸后于 -80 ℃ 保存。采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,浓缩胶电压 80 V(30 min),分离胶电压 120 V(90 min)。采用湿法转膜,转膜条件 100 V(80 min)。转膜完成后用 5%的蛋白干粉在室温下封闭 NC 膜。封闭完成后,将其置于一抗稀释液中 4 ℃ 孵育过夜。次日,利用 TBST 清洗后,在二抗稀释液中室温孵育 60 min。TBST 清洗后利用 ECT 发光液在凝胶成像仪中进行化学显影。

1.3.4 细胞转染

根据 Gli2 靶点设计并合成 siRNA 与无关干扰序列。按照说明书的步骤将上述引物配制成 20 μ mol/L 的母液。提前将细胞接种于细胞培养板,待 Tca8113 细胞生长密度在 80% 左右,按照说明书要求采用 siRNA-Mate 进行细胞转染。转染后 4 h 进行细胞换液,根据不同实验需求进行下一步实验。本研究所需的引物序列见表 2。

1.3.5 细胞增殖实验

利用 CCK-8 试剂盒检测干扰 Gli2 表达对 Tca8113 细胞增殖的影响。将实验分为 5 组(完全培养基组、control 组、si-control 组、siRNA1 组、siRNA2 组),每组设置 5 个复孔。将 Tca8113 细胞接种于 96 孔板中,待贴壁细胞密度接近 80%时按上述分组处理细胞。分别于细胞处理后的 0 h、24 h、48 h 与 72 h 后,分别向每孔细胞加 10 μ L 的 CCK-8 试剂,孵育 2 h 后,采用酶标仪检测细胞光密度值。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
Shh	5'-CTTTAGCCTACAAGCAGTTTATCC-3'	5'-CTCCGGTGTTTTCTTCATCCT-3'
Ptch1	5'-CAACCCTGTGCTAGTATGAAATGT-3'	5'-CACGAAGAAAAGATATCCTGACG-3'
Gli1	5'-GCCAATAGGGCTTCACATAGG-3'	5'-TCATCCAGAATAGCCACAAAAGTC-3'
Gli2	5'-TGGCCGCTTCAGATGACAGATGTTG-3'	5'-CGTTAGCCGAATGTCAGCCGTGAAG-3'
GAPDH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

表 2 Gli2 基因 siRNA 引物序列(5'-3')
Table 2 Gli2 gene siRNA primer sequence(5'-3')

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
siRNA1	GUGGCCUACAUCAACAACUTT	AGUUGUUGAUGUAGGCCACTT
siRNA2	GGGAGAAGAAGGAGUUUGUTT	ACAAACUCCUUCUUCUCCCTT
si-control	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.3.6 平板克隆实验

采用平板克隆实验检测干扰 Gli2 表达对 Tca8113 细胞生长的影响。实验分组如 1.3.5 所述。将 Tca8113 细胞接种于 24 孔板中,待贴壁细胞密度接近 80%时按上述分组处理细胞。待细胞转染 48 h 后收集各组细胞,将其重悬后,按 2000/孔将其接种于 6 孔板,于培养箱中培养 15 d,用 4%的多聚甲醛固定细胞,用 0.1%的结晶紫进行染色。利用光学显微镜进行拍照,并统计集落形成数。

1.3.7 细胞迁移实验

采用 transwell 小室实验检测干扰 Gli2 表达对 Tca8113 细胞迁移的影响。实验分组如 1.3.5 所述。将 Tca8113 细胞接种于 24 孔板中,待贴壁细胞密度接近 80%时按上述分组处理细胞。待细胞转染 48 h 后收集各组细胞,将其重悬后,向 transwell 小室的上室分别加入 1×10^4 个细胞,下室中分别加入 600 μ L 含 20% FBS 的完全培养基。培养 48 h 后倒掉培养液,用棉签擦去小室的上层细胞,PBS 清洗后,用 4%的多聚甲醛固定细胞,用 0.1%的结晶紫进行染色。利用光学显微镜进行拍照,并统计发生细胞迁移数。

1.3.8 细胞侵袭实验

采用基质胶侵袭实验检测干扰 Gli2 表达对 Tca8113 细胞侵袭的影响。实验分组如 1.3.5 所述。向 transwell 小室的上室中分别加入 100 μ L 的基质胶。将 Tca8113 细胞接种于 24 孔板中,待贴壁细胞密度接近 80%时按上述分组处理细胞。待细胞转染 48 h 后收集各组细胞,将其重悬后,向含有基质胶的 transwell 小室的上室分别加入 1×10^4 个细胞,下室中分别加入 600 μ L 含 20% FBS 的完全培养基。培养 48 h 后倒掉培养液,用棉签擦去小室的上层细胞,PBS 清洗后,用 4%的多聚甲醛固定细胞,用 0.1%的结晶紫进行染色。利用光学显微镜进行拍照,并统计细胞侵袭数。

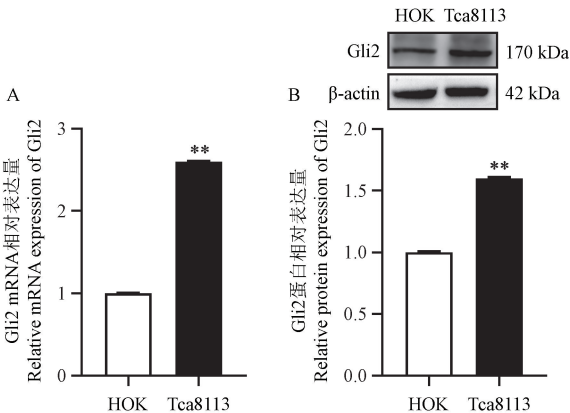
1.4 统计学方法

本研究通过 SPSS Statistics 20.0 版本分析实验数据结果,组间比较采用 LSD-*t* 检验法,所用实验数据结果通过平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 表示差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 口腔癌细胞中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达

本研究以 HOK 细胞为对照,检测 Tca8113 中 Gli2 的表达情况。图 1 结果表明与 HOK 细胞相比,



注:A:Tca8113 中 Gli2 的 mRNA 表达;B:Tca8113 中 Gli2 的蛋白表达。与 HOK 相比, ** $P<0.01$ 。

图 1 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达($n=3$)

Note. A, mRNA expression of Gli2 in Tca8113. B, Protein expression of Gli2 in Tca8113. Compared with HOK, ** $P<0.01$.

Figure 1 mRNA and protein expression of Gli2 in Tca8113 cell

Tca8113 中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达均极显著提高($P<0.01$),这表明在口腔癌细胞中 Gli2 被异常激活。

2.2 口腔癌细胞中 Gli2 的干扰效率

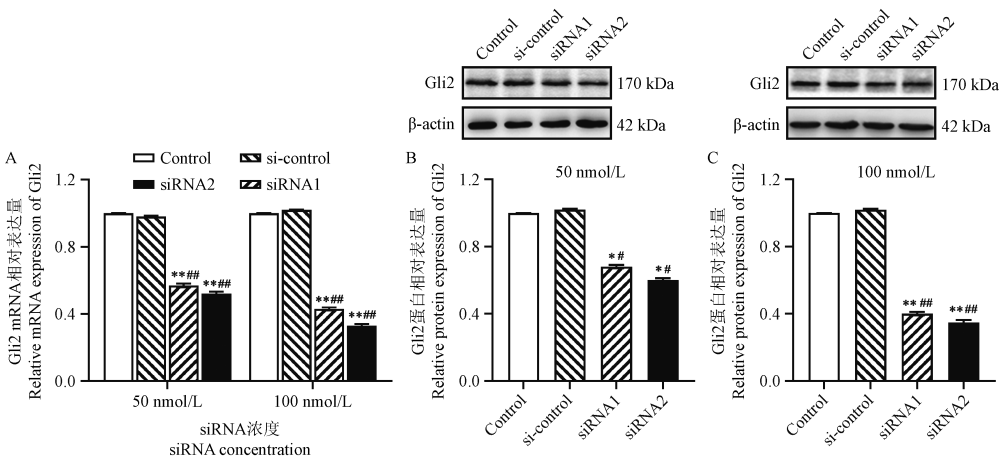
前期研究证实 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 与蛋白表达显著升高,表明其在口腔癌的癌变过程中发挥重要作用。本研究利用 siRNA 干扰 Gli2 表达,并对其转染效率进行检测。图 2 结果表明与 control 组相比,si-control 组中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达无明显差异($P>0.05$)。而与 control 组和 si-control 组相比,采用 siRNA1 与 siRNA2 干扰 Gli2 表达后显著抑制 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 与蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。此外,与 50 nmol/L 的转染浓度相比,100 nmol/L 的转染效果更佳。因此,本研究以 100 nmol/L 作为后续实验的转染浓度。

2.3 干扰 Gli2 对口腔癌细胞增殖和生长的影响

图 3 所示,细胞增殖实验结果表明,与 control 组和 si-control 组相比,Tca8113 细胞转染 24 h 后对其增殖能力无明显影响,而将转染时间延长至 48 h、72 h 后发现,干扰 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞增殖($P<0.01$)。平板克隆实验结果表明,与 control 组和 si-control 组相比,干扰 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞集落形成。上述结果表明 Gli2 在 Tca8113 细胞增殖和生长过程中发挥关键作用,干扰该基因表达可抑制 Tca8113 细胞增殖和生长。

2.4 干扰 Gli2 对口腔癌细胞迁移和侵袭的影响

图 4 所示,细胞迁移实验结果表明,与 control

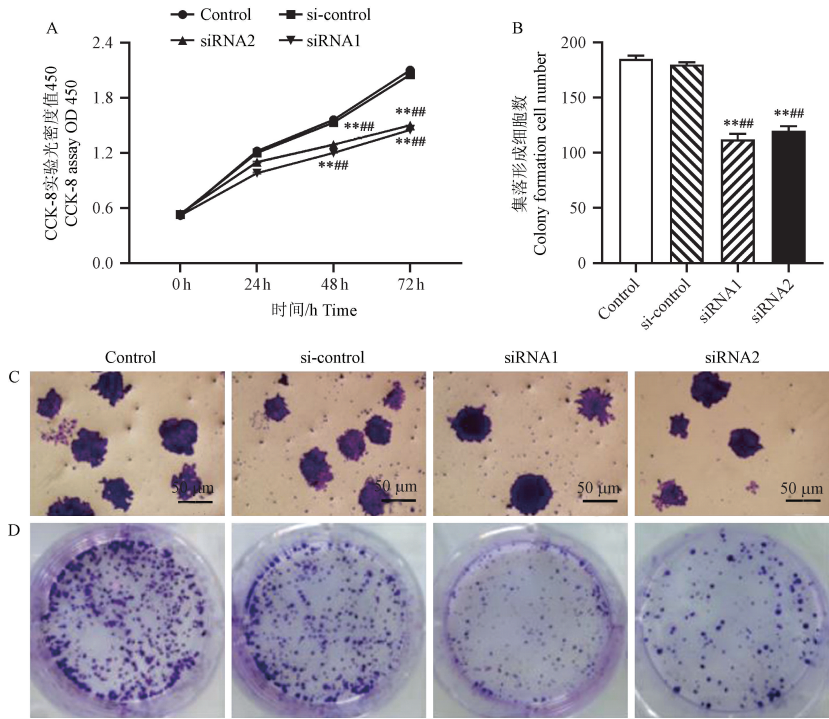


注:A:干扰 Gli2 表达后 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 表达;B:干扰 Gli2 表达后 Tca8113 细胞中 Gli2 的蛋白表达(药物处理浓度 50 nmol/L);C:干扰 Gli2 表达后 Tca8113 细胞中 Gli2 的蛋白表达(药物处理浓度 100 nmol/L)。与 control 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 si-control 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 2 干扰 Gli2 表达后 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 与蛋白表达

Note. A, mRNA expression of Gli2 in Tca8113 cells after interference with Gli2 expression. B, Protein expression of Gli2 in Tca8113 cells after interference with Gli2 expression (the drug treatment concentration is 50 nmol/L). C, Protein expression of Gli2 in Tca8113 cells after interference with Gli2 expression (the drug treatment concentration is 100 nmol/L). Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with si-control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 2 mRNA and protein expression of Gli2 in Tca8113 cells after interference with Gli2 expression



注:A:Tca8113 细胞 CCK-8 增殖实验;B:Tca8113 细胞集落形成细胞数量;C:光镜下 Tca8113 细胞集落形成;D:相机拍摄 Tca8113 细胞集落形成。与 control 组相比, ** $P<0.01$;与 si-control 组相比, ## $P<0.01$ 。

图 3 干扰 Gli2 对口腔癌细胞增殖和生长的影响

Note. A, Tca8113 cell CCK-8 proliferation experiment. B, Tca8113 cell colony formation cell number. C, Tca8113 cell colony formation under light microscope. D, Tca8113 cell colony formation cell number taken by camera. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with si-control group, ## $P<0.01$.

Figure 3 Effect of interference with Gli2 on proliferation and growth of oral cancer cell

组和 si-control 组相比,Tca8113 细胞转染 24 h 后对其增殖能力无明显影响,干扰 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞迁移($P<0.01$)。细胞侵袭实验结果同样证实,与 control 组和 si-control 组相比,干扰 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞侵袭($P<0.01$)。以上研究表明 Gli2 在 OSCC 细胞的迁移和侵袭过程中发挥重要作用,干扰 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞迁移和侵袭。

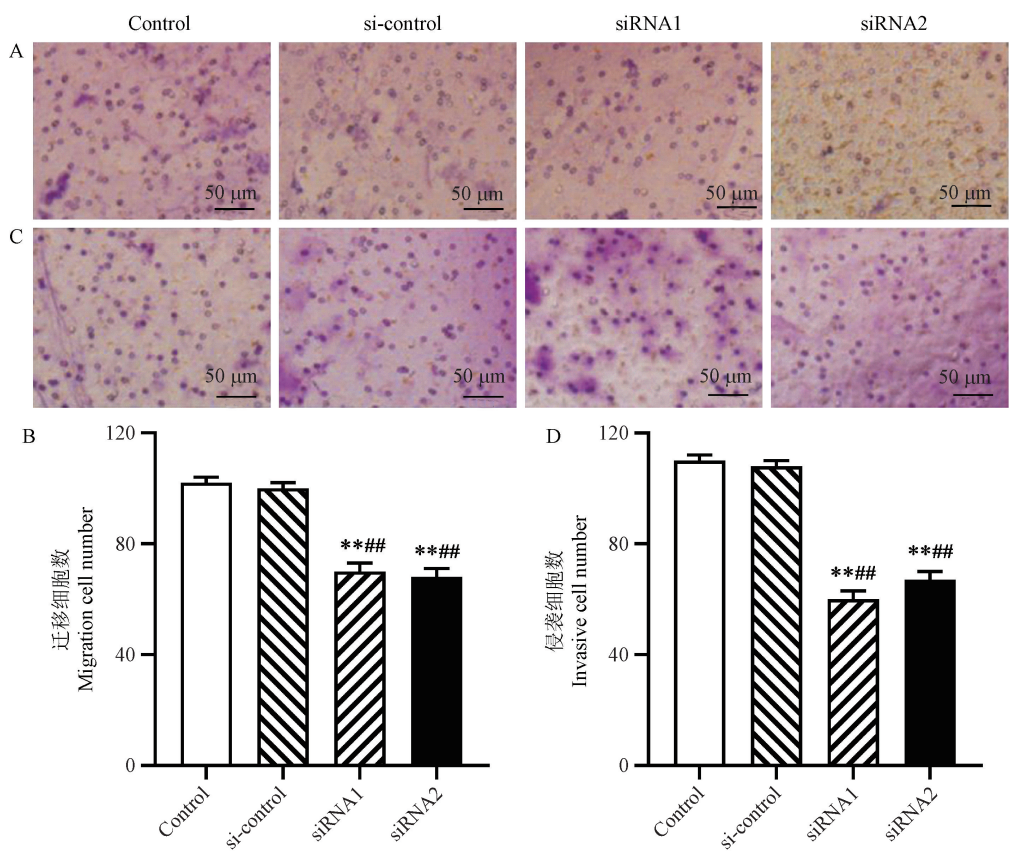
2.5 干扰 Gli2 对口腔癌细胞中 Hh 通路的影响

为验证 Gli2 在调控 Tca8113 细胞恶性增殖转移的潜在机制。干扰 Tca8113 细胞中 Gli2 表达后检测其对 Hh 通路相关基因的表达影响。图 5 结果表明,与 control 组和 si-control 组相比,干扰 Gli2 表达显著抑制 Tca8113 细胞中 Hh 通路关键因子 Ptch1、Gli1 与 Gli2 的 mRNA 表达($P<0.05$, $P<0.01$)。进一步通过 Western blot 检测干扰 Gli2 表达对 Hh 通路关键因子的蛋白表达影响,发现干扰 Gli2 表达也

可显著抑制 Shh、Ptch1、Gli1 与 Gli2 的蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。qRT-PCR 检测与 Western blot 结果保持一致,这表明 Gli2 在 Hh 通路活化中起重要作用。干扰 Gli2 表达可以抑制 Hh 通路关键因子的表达,从而有效阻止 Hh 通路持续活化,进而影响 Tca8113 细胞的生物学功能。

2.6 干扰 Gli2 对口腔癌细胞中 EMT 通路的影响

为进一步揭示 Gli2 调控 Tca8113 细胞恶性增殖转移的分子机制。本研究进一步通过干扰 Tca8113 细胞中 Gli2 表达,检测其对 EMT 通路关键因子 MMP2、MMP9、E-Cadherin 与 Vimentin 的 mRNA 与蛋白表达。图 6 结果表明,与 control 组和 si-control 组相比,干扰 Gli2 表达显著抑制 Tca8113 细胞中 MMP2、MMP9 与 Vimentin 的 mRNA 与蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$),但同时促进 E-Cadherin 的 mRNA 与蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。

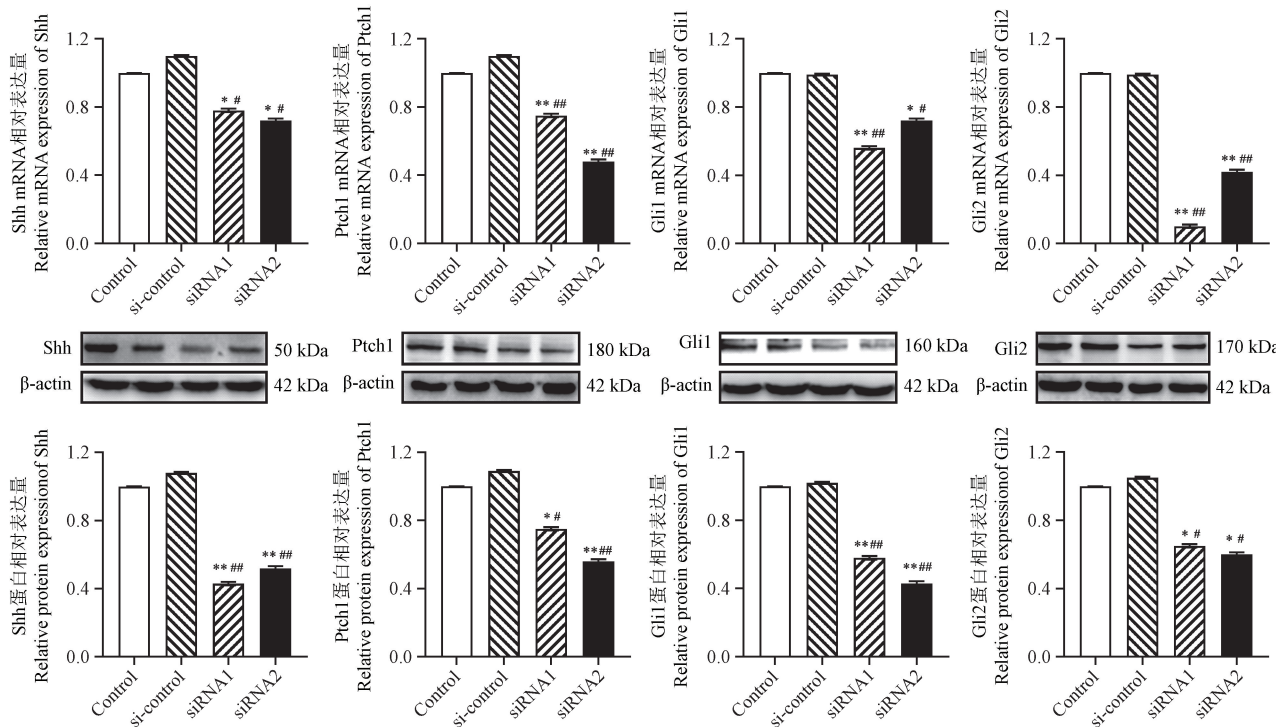


注:A/B:Tca8113 细胞迁移;C/D:Tca8113 细胞侵袭。与 control 组相比, ** $P<0.01$;与 si-control 组相比, ## $P<0.01$ 。

图 4 干扰 Gli2 对口腔癌细胞迁移和侵袭的影响($n=3$)

Note. A/B, Tca8113 cell migration. C/D, Tca8113 cell invasion. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with si-control group, ## $P<0.01$.

Figure 4 Effect of interference with Gli2 on migration and invasion of oral cancer cell

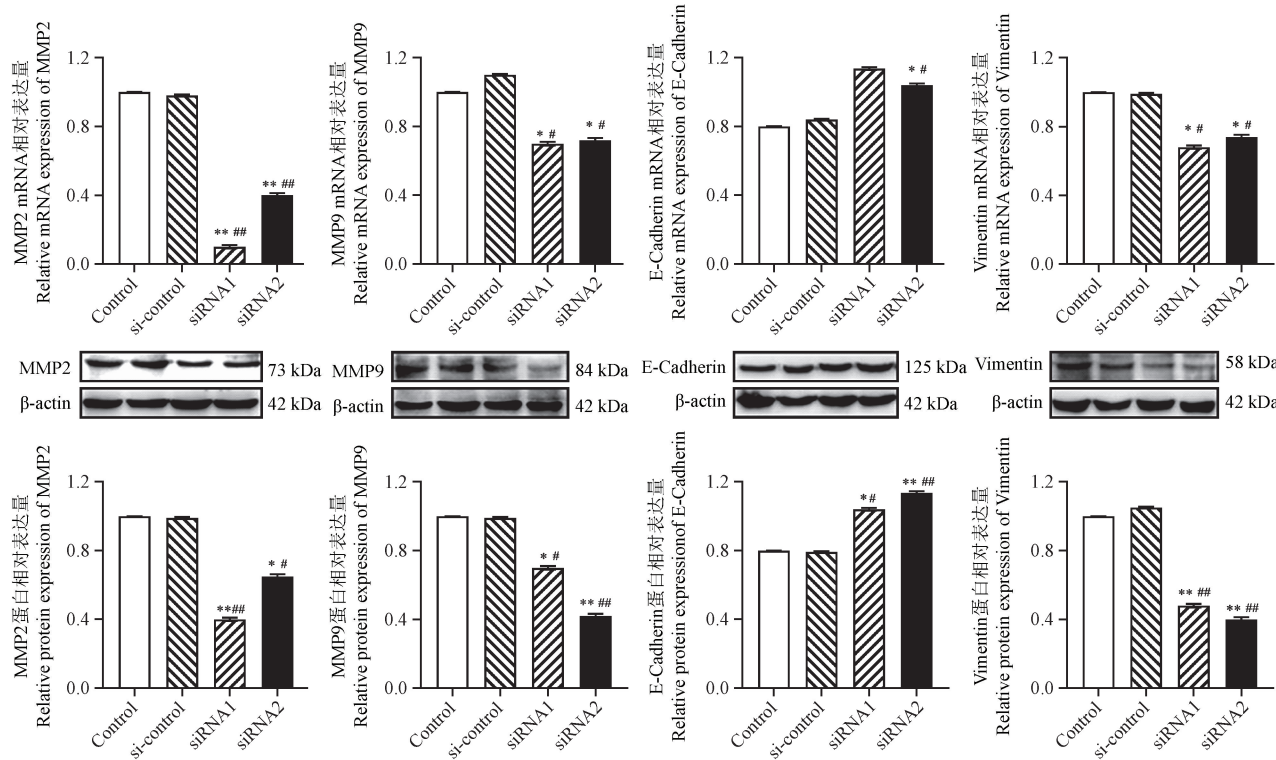


注:与 control 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 si-control 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 5 干扰 Gli2 对口腔癌细胞中 Hh 通路关键因子的表达影响

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with si-control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Influence of Gli2 interference on the expression of key factors of Hh pathway in oral cancer cell



注:与 control 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 si-control 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 6 干扰 Gli2 对口腔癌细胞中 EMT 通路关键因子的表达影响

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with si-control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Influence of Gli2 interference on the expression of key factors of EMT pathway in oral cancer cell

3 讨论

口腔是一种全球性疾病,尽管目前针对口腔癌的临床治疗已取得一定进展,但由于该病发病位置特殊,以及公众对口腔癌的重视度相对较低,导致多数患者就诊时已处于中晚期,这无疑增大了治疗难度^[15]。若能有效阻碍口腔癌早期迁移、侵袭及其他恶性生物学行为,将有望降低患者的死亡率。因此,迫切需要筛选口腔癌早期诊断与预后治疗标志物,为口腔癌临床治疗提供新思路。

Gli2 是 Hh 通路最重要的终末效应分子,其表达水平可直接反映 Hh 通路的激活状态^[16]。Gli2 可将细胞外信号传递到细胞内,直接作用于下游靶标,参与调控多种肿瘤的增殖、迁移、侵袭和 EMT 过程^[17]。本研究发现 Tca8113 细胞中 Gli2 的 mRNA 和蛋白表达显著升高,这表明在口腔癌细胞中 Gli2 被异常激活。采用 siRNA 干扰 Gli2 表达后发现,抑制 Gli2 表达可显著抑制 Tca8113 细胞的增殖、生长、迁移和侵袭。鉴于 Gli2 在 Hh 通路中发挥重要作用,推测 Gli2 可能通过调控 Tca8113 细胞中 Hh 通路的活化,进而影响细胞的增殖生长和迁移侵袭。因此,我们进一步检测了干扰 Gli2 表达对 Hh 通路关键因子表达的影响,发现干扰 Gli2 表达也可显著抑制 Shh、Ptc1、Gli1 与 Gli2 的 mRNA 与蛋白表达。这表明干扰 Gli2 表达可抑制 Hh 通路关键因子的表达,可有效阻止 Hh 通路持续活化,进而影响 Tca8113 细胞的生物学功能。

肿瘤细胞过度增殖及侵袭迁移能力增强与肿瘤细胞的 EMT 密切相关^[18]。EMT 是指经特定程序转化后的上皮细胞转变为间质表型细胞的过程,此过程极其复杂,涉及细胞之间黏附能力改变,细胞外基质的降解以及细胞运动能力的改变等^[19-20]。研究表明,EMT 可促进肿瘤细胞的转移和浸润,并增强肿瘤细胞对药物治疗及临床放化疗的耐受性,在肿瘤的恶化过程中起关键作用^[21-22]。E-钙粘蛋白(E-Cadherin)与波形蛋白(Vimentin)是上皮间质转化相关蛋白,基质金属蛋白酶(MMPs)家族关键成员 MMP2 和 MMP9 被认为是肿瘤侵袭转移的潜在生物标志物,也是 EMT 通路中的关键调控因子^[23-24]。为阐明 Hh/Gli2 通路调控口腔癌细胞恶性增殖转移的具体机制,进一步检测了干扰 Gli2 表达对 EMT 通路关键因子表达的影响,发现干扰 Gli2 表达显著抑制 Tca8113 细胞中 MMP2、MMP9 与

Vimentin 的 mRNA 与蛋白表达,但同时促进 E-Cadherin 的 mRNA 与蛋白表达。

综上所述,Gli2 作为癌基因参与调控 Tca8113 细胞的发生发展,抑制 Gli2 表达能够有效阻碍 Hh 通路的持续异常激活,并影响 EMT 通路关键组分的表达,进而抑制 Tca8113 细胞的增殖、生长、迁移和侵袭,其有望作为临床治疗口腔癌的新型靶点。但本研究仅仅在细胞水平探究 Gli2 对口腔癌细胞发生发展的影响,因体内外肿瘤细胞生活的环境存在差异,仅通过体外细胞实验获得的结果存在一定局限性。因此,下一步计划进行体内原位瘤实验深入揭示口腔癌发生发展中 Gli2 的作用机制。同时,筛选针对 Gli2 位点的靶向治疗药物。为口腔癌临床治疗提供有效的早期诊断治疗标志物及临床干预治疗靶点。

参考文献:

- [1] HAMILTON K L, SHEEHAN S A, RETZBACH E P, et al. Effects of *Maackia amurensis* seed lectin (MASL) on oral squamous cell carcinoma (OSCC) gene expression and transcriptional signaling pathways [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2021, 147(2): 445-457.
- [2] PITUSKIN E. Cancer as a new chronic disease: Oncology nursing in the 21st Century [J]. Can Oncol Nurs J, 2022, 32(1): 87-92.
- [3] GOVINDARASU M, PRATHAP L, GOVINDASAMY R. Histone deacetylase inhibitors regulate the oral cancer via PI3K/AKT signaling pathway [J]. Oral Oncol, 2022, 135: 106221.
- [4] SKODA A M, SIMOVIC D, KARIN V, et al. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2018, 18(1): 8-20.
- [5] BRECHBIEL J, MILLER-MOSLIN K, ADJEI A A. Crosstalk between hedgehog and other signaling pathways as a basis for combination therapies in cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(6): 750-759.
- [6] FAROOQI A, SHU C W, HUANG H W, et al. TRAIL, Wnt, sonic hedgehog, TGF β , and miRNA signalings are potential targets for oral cancer therapy [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): 1523.
- [7] SALARITABAR A, BERINDAN - NEAGOE I, DARVISH B, et al. Targeting Hedgehog signaling pathway: paving the road for cancer therapy [J]. Pharmacol Res, 2019, 141: 466-480.
- [8] JIANG J. Hedgehog signaling mechanism and role in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 107-122.
- [9] YANG H L, YAN L, SUN K, et al. lncRNA BCAR4 increases viability, invasion, and migration of non-small cell lung cancer cells by targeting glioma-associated oncogene 2 (GLI2) [J]. Oncol Res, 2019, 27(3): 359-369.
- [10] MA J, ZHOU C, CHEN X. miR-636 inhibits EMT, cell

- proliferation and cell cycle of ovarian cancer by directly targeting transcription factor Gli2 involved in Hedgehog pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 64.
- [11] HE Y, HUANG H, JIN L, et al. CircZNF609 enhances hepatocellular carcinoma cell proliferation, metastasis, and stemness by activating the Hedgehog pathway through the regulation of miR-15a-5p/15b-5p and GLI2 expressions [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 358.
- [12] HUANG D, WANG Y, XU L, et al. GLI2 promotes cell proliferation and migration through transcriptional activation of ARHGEF16 in human glioma cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 247.
- [13] ZHANG Y, WU T, WANG Y, et al. Reciprocal FGF19-GLI2 signaling induces epithelial-to-mesenchymal transition to promote lung squamous cell carcinoma metastasis [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2023, 46(2): 437–450.
- [14] YAN M, WANG L, ZUO H, et al. HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2011, 47(6): 504–509.
- [15] LI R, XIAO L, GONG T, et al. Role of oral microbiome in oral oncogenesis, tumor progression, and metastasis [J]. *Mol Oral Microbiol*, 2023, 38(1): 9–22.
- [16] WANG Q, WEI X, HU L, et al. Hedgehog-Gli2 signaling promotes chemoresistance in ovarian cancer cells by regulating MDRI [J]. *Front Oncol*, 2022, 11: 794959.
- [17] PANTAZI E, GEMENETZIDIS E, TEH M T, et al. GLI2 is a regulator of β -catenin and is associated with loss of E-cadherin, cell invasiveness, and long-term epidermal regeneration [J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(8): 1719–1730.
- [18] SCHEAU C, BADARAU I, COSTACHE R, et al. The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2019, 2019: 9423907.
- [19] BAKIR B, CHIARELLA A M, PITARRESI J R, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10): 764–776.
- [20] SHI Q, JI T, TANG X, et al. The role of tumor-platelet interplay and micro tumor thrombi during hematogenous tumor metastasis [J]. *Cell Oncol*, 2023, 46(3): 521–532.
- [21] 柳森森, 毛玉宁, 张彩勤, 等. MMP2 在肿瘤侵袭和转移中的调控机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(3): 123–128.
- LIU S S, MAO Y N, ZHANG C Q, et al. The role of MMP2 in tumor invasion and metastasis [J]. *Chin J Comp Med*, 2022, 32(3): 123–128.
- [22] LING Z, CHENG B, TAO X. Epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: challenges and opportunities [J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(7): 1548–1561.
- [23] NILAND S, RISCANEVO A X, EBLE J A. Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 146.
- [24] 肖兰飞, 高继萍, 闫晓如, 等. 槲皮素对口腔癌 Tca-8113 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及 PI3K/AKT 信号通路的调控作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(6): 30–34.
- XIAO L F, GAO J P, YAN X R, et al. Effect of quercetin on cell proliferation, migration, and invasion and PI3K/AKT signaling pathway regulation in the oral cancer cell line Tca-8113 [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(6): 30–34.

[收稿日期]2023-06-26