

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.09.003

SMARCA5 在口腔鳞癌中的表达及其对 HSC4 细胞增殖、迁移和侵袭的影响^{*}

张 华^{1,2}, 蒋雅欣^{1,2}, 孙凌寒^{1,2}, 文 才³, 冯 浩^{2△}

(1. 西南医科大学口腔医学院, 四川泸州 646000; 2. 西南医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 四川泸州 646000; 3. 西南医科大学附属口腔医院种植科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨染色质 A5 的 SWI/SNF 相关基质关联肌动蛋白依赖调节因子(SMARCA5)在口腔鳞癌(OSCC)中的表达水平及其对人 OSCC 细胞系 HSC4 增殖、迁移和侵袭的影响。**方法** 从高通量基因表达(GEO)数据库中分析 OSCC 组织中 SMARCA5 mRNA 表达情况,并分析其与 OSCC 患者预后的关系。慢病毒 shRNA 沉默 HSC4 细胞中 SMARCA5 的表达,实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)验证沉默效果;将细胞分为 Control 组(不做转染处理,空白对照)、sh-NC 组(转染无序列质粒载体慢病毒,阴性对照)和 sh-SMARCA5 组(转染沉默 SMARCA5 质粒载体慢病毒),CCK-8 实验检测 HSC4 细胞增殖能力的变化,细胞划痕实验检测 HSC4 细胞迁移能力的变化,Transwell 实验检测 HSC4 细胞迁移和侵袭能力的变化。**结果** SMARCA5 在 OSCC 组织中的表达水平明显高于人正常口腔组织($P<0.05$);SMARCA5 高表达的患者总生存率低于低表达的患者($P<0.05$)。sh-SMARCA5 组 HSC4 细胞的增殖、迁移和侵袭能力较 sh-NC 组明显降低($P<0.05$)。**结论** SMARCA5 在 OSCC 中表达升高,并可促进人 OSCC 细胞系 HSC4 的增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌;SMARCA5;增殖;迁移;侵袭;shRNA

[中图法分类号] R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)09-1292-06

Expression of SMARCA5 in oral squamous cell carcinoma and its effect on proliferation, migration and invasion of HSC4 cells^{*}

ZHANG Hua^{1,2}, JIANG Yaxin^{1,2}, SUN Linghan^{1,2}, WEN Cai³, FENG Hao^{2△}

(1. School of Stomatological, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. Department of Dental Implantology, The Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression level of SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin A5 (SMARCA5) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its effect on the proliferation, migration and invasion of HSC4 cells. **Methods** The expression of SMARCA5 mRNA in OSCC tissue and its correlation with the patients with OSCC were analyzed from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. The expression of SMARCA5 in HSC4 cell line was reduced by lentivirus shRNA, and the silencing effect was verified by real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). The cells were divided into the control group (no transfection treatment, blank control), the sh-NC group (transfection with sequence-free plasmid vector lentivirus, negative control) and the sh-SMARCA5 group (transfection with silent SMARCA5 plasmid vector lentivirus). CCK-8 test was used to detect the change of proliferation ability of HSC4 cells. Cell scratch test was used to detect the change of migration ability of HSC4 cells. Transwell assay was used to detect the migration and invasion of HSC4 cells. **Results** The expression level of SMARCA5 in OSCC tissue was significantly higher than that in normal oral tissues ($P<0.05$). The

^{*} 基金项目:四川省泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目(2019LZXNYDJ15);西南医科大学校级科研项目(2019ZQN020)。
作者简介:张华(1996—),在读硕士研究生,主要从事口腔颌面外科学研究。 △ 通信作者,E-mail:pixar1991@163.com。

overall survival rate of patients with high expression of SMARCA5 was lower than that of patients with low expression ($P < 0.05$). The ability of proliferation, migration and invasion of HSC4 cells in the SMARCA5 group was significantly lower than that in the sh-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of SMARCA5 is increased in OSCC, and it can promote the proliferation, migration and invasion of human OSCC cell line HSC4.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; SMARCA5; proliferation; migration; invasion; shRNA

口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔中最常见的上皮恶性肿瘤,具有侵袭性强、转移率高和易复发的特点^[1-2]。OSCC 细胞的增殖、迁移与侵袭是导致 OSCC 预后较差的原因之一,目前影响其发生的机制尚未完全清楚,因此,本研究将探索其相关影响因素,为 OSCC 的治疗提供可能的新靶点。

染色质调控是 DNA 修复、复制和转录的一个重要环节,染色质重塑复合物在这一环节中起着重要作用。来自模式生物和哺乳动物的证据表明,染色质信号部分是通过模拟开关(imitation switch, ISWI)依赖三磷酸腺苷(ATP)的染色质重塑复合物实现的^[3]。染色质 A5 的 SWI/SNF 相关基质关联肌动蛋白依赖调节因子(SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin A5, SMARCA5)又称为人类蔗糖非发酵蛋白 2 同源物(human sucrose non-fermenting protein 2 homologue, hSNF2H),该基因位于染色体 4q31.21,是具有 ATP 酶活性的染色质重塑蛋白 ISWI 家族的重要成员^[4]。有报道指出,SMARCA5 在基因转录、DNA 修复和 DNA 复制中起着至关重要的作用^[5-6]。近年来,有多项研究表明 SMARCA5 在乳腺癌、胃癌、急性白血病、卵巢癌、非小细胞肺癌等癌症中异常高表达并能调控癌症的进展^[7-11]。而 SMARCA5 在 OSCC 中的表达情况及对 OSCC 细胞的影响尚未见确切报道。本研究利用高通量基因表达(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库探索 SMARCA5 在 OSCC 中的表达情况及其与患者预后的相关性,并利用体外实验检测 SMARCA5 对 OSCC 细胞系 HSC4 增殖、迁移和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与试剂

人 OSCC 细胞系 HSC4 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自以色列 BI 公司;0.25%胰蛋白酶溶液、双抗、结晶紫染液购自北京索莱宝科技有限公司;shRNA 干扰 SMARCA5(sh-SMARCA5)和 sh-NC(阴性对照)序列由元生物技术(上海)股份有限公司合成;SteadyPure 快速 RNA 提取试剂盒、Evo M-MLV 逆转录 Master Mix 试剂盒、SYBR Premix Pro TaqHS qPCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司;Transwell 小室购自美国

Corning 公司;Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司;6 孔板、24 孔板购自上海科进生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 GEO 数据库分析

GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)是一个由美国国立生物技术信息中心(NCBI)创建并维护的公共基因表达数据库。本研究利用该数据库分析了 OSCC 组织中 SMARCA5 mRNA 表达情况,并分析其与 OSCC 患者预后的相关性。

1.2.2 细胞培养及 SMARCA5 基因干扰转染与筛选

细胞培养:用含有 10% FBS 及 1% 双抗的 DMEM 培养基于 37 °C 和 5% CO₂ 条件下培养 HSC4 细胞,细胞汇合长满约 85% 后,胰酶消化细胞并传代培养。将细胞分为 3 组:(1)Control 组(空白对照),未经转染处理;(2)sh-NC 组(阴性对照),转染无序序列质粒载体慢病毒;(3)sh-SMARCA5 组,转染沉默 SMARCA5 质粒载体慢病毒。取对数生长期的 HSC4 细胞接种于 6 孔板,约 4×10^5 /孔,1 d 后加入 sh-NC 及 sh-SMARCA5 转染序列慢病毒,同时加入 5 mg/L Polybrene 提高转染效率,孵育 12~16 h 后更换培养基继续培养。48 h 后使用荧光显微镜观察荧光表达,确认感染成功后加入 2 mg/L 嘌呤霉素处理 4 d 以筛选稳定转染株。转染序列 sh-NC:5'-CCT AAG GTT AAG TCG CCC TCG-3';sh-SMARCA5:5'-CGA CTG CTG ATG TAG TAA TTT-3'。

1.2.3 实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)

SteadyPure 快速 RNA 提取试剂盒提取 HSC4 细胞 RNA,并使用 Evo M-MLV 逆转录 Master Mix 进行逆转录。按照制造商的说明,使用 SYBR Premix Pro TaqHS qPCR 试剂盒进行 RT-qPCR 检测。qPCR 循环条件:95 °C 30 s;95 °C 5 s,55 °C 10 s,72 °C 15 s,40 个循环;其中甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参。引物序列见表 1。

1.2.4 CCK-8 实验

将 HSC4 细胞制成密度 5×10^4 /mL 的细胞悬液,向 96 孔板中每孔加入 100 μ L 细胞悬液,即 5×10^3 /孔的密度,放入培养箱中培养。将细胞分别培养 1、2、3、4 d 后,向孔内加入 10 μ L CCK-8 检测液,培养箱中孵育 2 h。用酶标仪测定各孔 450 nm 处吸光度(A₄₅₀)值。

表 1 RT-qPCR 所需引物

基因	方向	引物序列(3′-5′)	产物大小(bp)
SMARCA5	正向	TGCAGGTTGGATGGTCAGACAC	131
	反向	GTCGCAAGATTGATGCCAAGACC	
GAPDH	正向	AATTCCACGGCACAGTCAAGGC	122
	反向	AACATACTCAGCACCAGCATCACC	

1.2.5 细胞划痕实验

将 HSC4 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中,细胞汇合至单层时,用 200 μ L 枪尖做细胞划痕,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗掉划下的细胞及细胞碎片,并重新加入不含 FBS 的 DMEM 培养基,放入培养箱中继续培养。于 0、36 h 显微镜下观察划痕区域并采图,使用 ImageJ 软件计算愈合的划痕面积。

1.2.6 Transwell 细胞迁移与侵袭实验

(1) 迁移实验:细胞在无血清 DMEM 中饥饿 16 h,将细胞制成密度为 5×10^5 /mL 的细胞悬液,取 Transwell 小室放于 24 孔板内,上腔室中加入 100 μ L HSC4 细胞悬液(5×10^4 个细胞),将含 20% FBS 的 DMEM 培养基加入下腔室中,孵育 36 h 后,4%多聚甲醛固定液固定 30 min,用 0.1%结晶紫染液染色,显微镜下观察并随机取 5 个视野拍照,计数迁移细胞平均数。(2) 侵袭实验:用预冷的无血清 DMEM 培养基稀释 Matrigel(稀释比例 1:8)。每个上腔室加入 100 μ L Matrigel 稀释液,放入孵育箱中,直至变为半固态。其余步骤同迁移实验,计数侵袭细胞平均数。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad9.0 软件进行统计分析并作图,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SMARCA5 在 OSCC 组织中高表达

对 GEO 数据库进行生物信息学分析发现,在 57 份 OSCC 组织和 22 份人正常口腔组织的表达信息中,OSCC 组织中 SMARCA5 mRNA 表达水平明显高于人正常口腔组织($P<0.05$),SMARCA5 mRNA 在 OSCC 组织中呈高表达,见图 1。

2.2 SMARCA5 表达与 OSCC 患者预后的关系

在 GEO 数据库中分析 SMARCA5 与 OSCC 患者预后的关系,从 GEO 数据库中下载相关数据集,包含 97 例 OSCC 患者的预后信息,将 97 例患者依据 SMARCA5 表达水平中位数划分为高表达和低表达两组。结果显示:在 OSCC 患者中,SMARCA5 高表达患者的总生存率明显低于低表达患者($P<0.05$),见图 2。

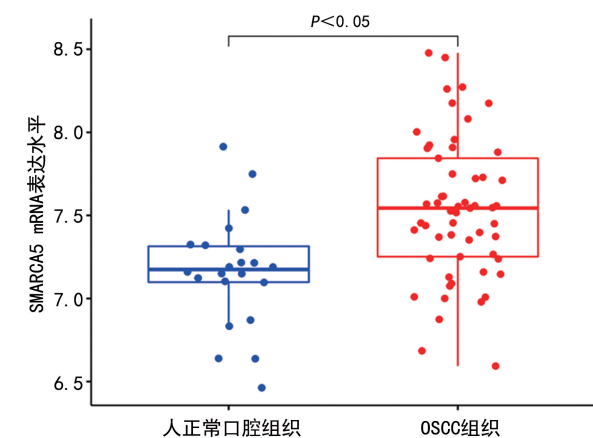


图 1 GEO 数据库中 OSCC 组织与人正常口腔组织中 SMARCA5 表达水平

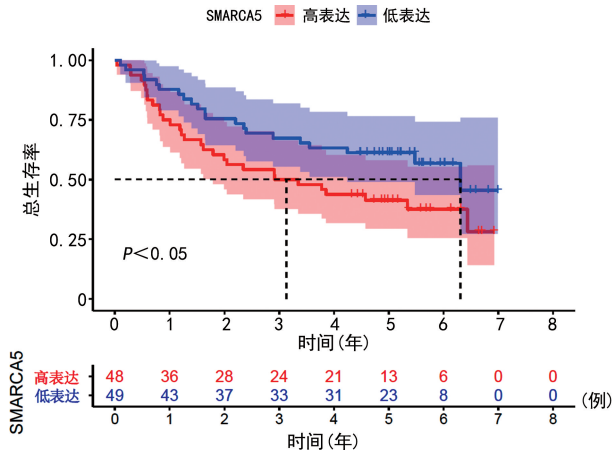


图 2 GEO 数据库中 SMARCA5 表达与 OSCC 患者预后的关系

2.3 sh-SMARCA5 转染效率检测

荧光显微镜观察结果显示:Control 组细胞无荧光,sh-NC 组、sh-SMARCA5 组有大量荧光,见图 3A。为了检测转染效果,用 RT-qPCR 检测 SMARCA5 mRNA 表达,结果显示:与 Control 组比较,sh-NC 组 SMARCA5 mRNA 表达水平无明显变化,sh-SMACRCA5 组 SMARCA5 mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$),见图 3B。因此,后期实验只设 sh-NC 组对照。

2.4 沉默 SMARCA5 使 HSC4 细胞的增殖能力变化

CCK-8 实验结果显示,与 sh-NC 组比较,sh-SMARCA5 组 A_{450} 值明显降低($P<0.05$),见图 4。

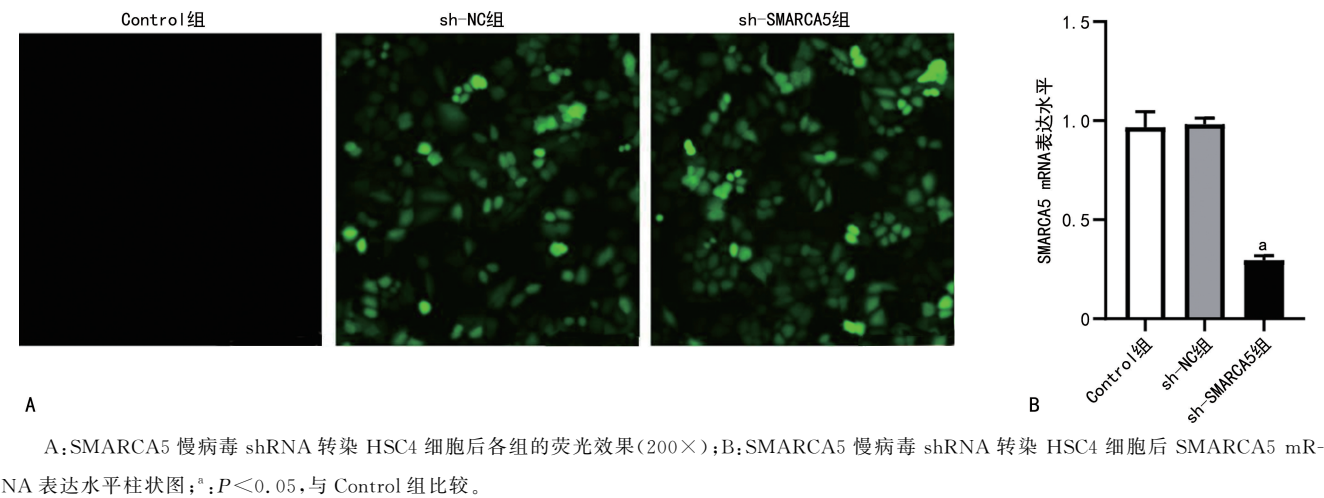


图 3 HSC4 细胞 shRNA 转染效率检测

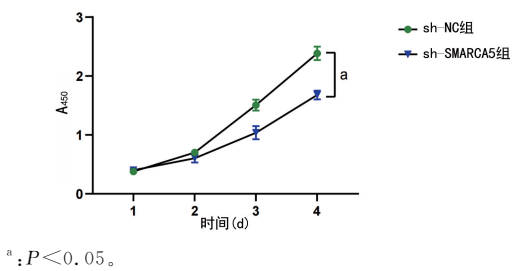
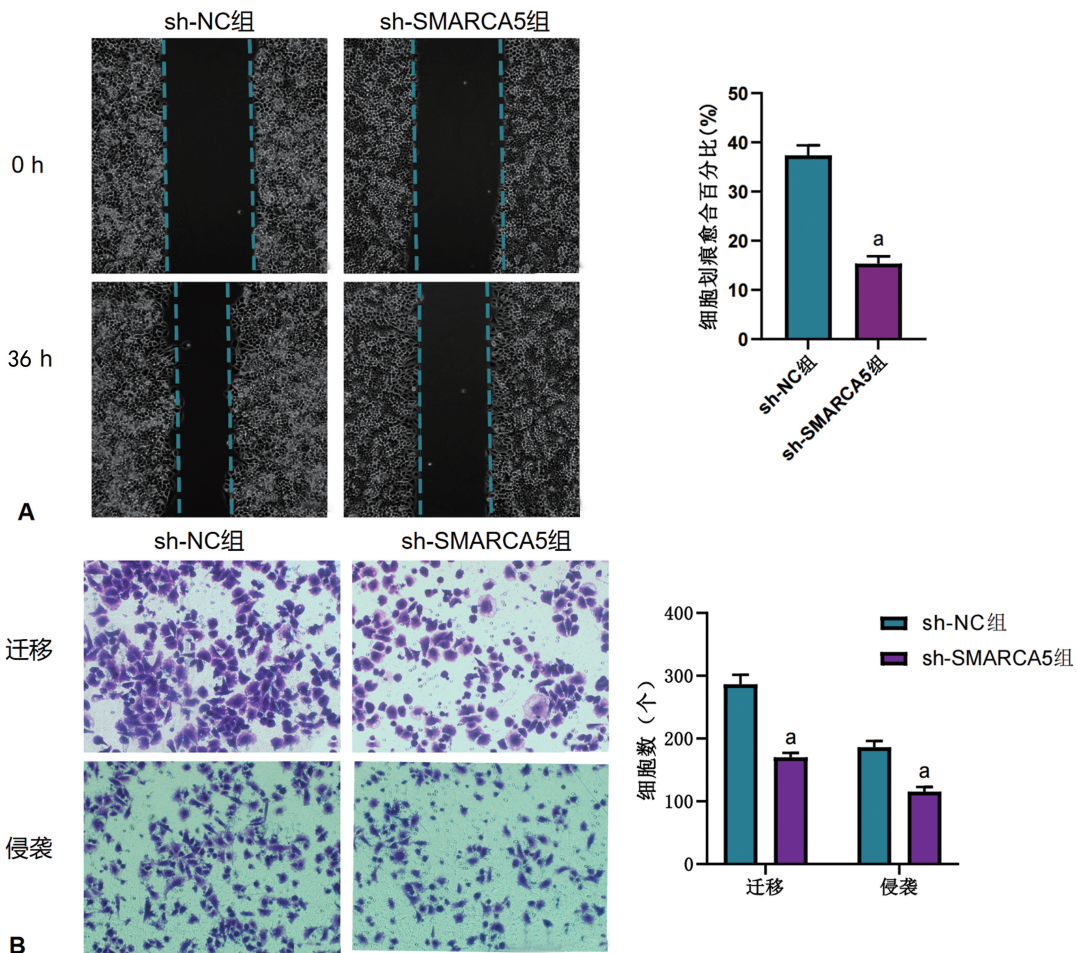


图 4 CCK8 检测 HSC4 细胞增殖能力

2.5 沉默 SMARCA5 基因能够抑制 HSC4 细胞的侵袭和迁移

细胞划痕实验结果显示,与 sh-NC 组比较,sh-SMARCA5 组细胞迁移能力明显降低($P < 0.05$); Transwell 迁移和侵袭实验结果显示,与 sh-NC 组比较,sh-SMARCA5 组细胞迁移能力和细胞侵袭能力均明显降低($P < 0.05$),见图 5。



A: 细胞划痕实验(100×); B: Transwell 实验(200×); ^a: $P < 0.05$, 与 sh-NC 组比较。

图 5 沉默 SMARCA5 基因能够抑制 HSC4 细胞的侵袭和迁移

3 讨 论

近年来,OSCC 的发病率不断上升,许多患者经治疗后仍有转移和复发的风险,5 年生存率改善不明显^[1,12]。有报道指出,即使在成功的治疗干预后,晚期肿瘤的潜在威胁及最终遍及整个上呼吸道/消化道广泛的多灶性疾病也会损害长期预后^[13]。探索影响肿瘤细胞转移的相关因子及机制,对于寻找治疗 OSCC 的新靶点提供了可能性。染色质重塑因子(remodeling and spacing factor,RSF)在多种生物过程中有着重要作用,据报道染色质重塑复合物的异常表达与许多疾病和癌症有关^[14]。

ZHANG 等^[15]研究指出,SMARCA5 在调节减数分裂细胞周期进程中起着关键作用,缺乏 SMARCA5 的卵母细胞无法恢复减数分裂^[15]。此前已有多项研究报道了 SMARCA5 对肿瘤细胞的影响,在乳腺癌、胃癌、急性白血病、卵巢癌、非小细胞肺癌等肿瘤组织中 SMARCA5 呈异常高表达,并能影响癌症进展^[7-11]。JIN 等^[7]研究表明,SMARCA5 在人类乳腺癌中过表达,并与不良预后相关。SMARCA5 有助于乳腺癌细胞的增殖和侵袭,敲低 SMARCA5 表达后,乳腺癌细胞的凋亡率升高。STOPKA 等^[9]发现,急性髓系白血病的早期造血祖细胞过表达 SMARCA5,其可能在白血病恶性造血过程中发挥重要的调节作用。这些研究表明,SMARCA5 在癌症进展中具有重要作用。ZHAO 等^[16]研究显示,SMARCA5 在人胶质瘤中表达升高,并能够和 RSF-1 协同作用,通过核因子- κ B 通路促进胶质瘤的增殖、侵袭和化疗耐药。各种证据证明,SMARCA5 与恶性肿瘤有着密切关联,并且与细胞的周期和增殖高度相关,在多数肿瘤中处于高表达状态,能够促进肿瘤进展。另外,有研究报道,与 SMARCA5 有协同作用的 RSF-1 在人 OSCC 中过表达,并且其表达水平与 OSCC 的发生、发展相关^[17-18]。但 SMARCA5 在 OSCC 中的表达情况和作用机制还未见确切报道,所以 SMARCA5 在 OSCC 中的研究对于寻找 OSCC 治疗新靶点是有意义的。

本研究旨在探究 SMARCA5 在 OSCC 组织和人正常口腔组织中的表达差异,并探索 SMARCA5 对 OSCC 细胞系 HSC4 增殖、迁移和侵袭的影响,为寻找 OSCC 治疗靶点提供科学资料。本研究结果显示:通过对 GEO 数据库的信息挖掘,发现 SMARCA5 在 OSCC 组织中高表达,并且高表达 OSCC 患者预后更差;此外,本研究利用 shRNA 慢病毒干扰技术沉默 HSC4 细胞系中 SMARCA5 的表达,利用 CCK-8 检测 HSC4 细胞的增殖能力,发现抑制 SMARCA5 表达的 OSCC 细胞其增殖能力较无意义干扰的 OSCC 细胞明显降低;并且,细胞划痕、Transwell 迁移和侵袭

实验结果证明,敲低 SMARCA5 表达可以降低 HSC4 细胞的迁移和侵袭能力。因此,SMARCA5 可以影响 HSC4 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。但 SMARCA5 是通过何种途径影响 OSCC 细胞增殖、迁移和侵袭的具体机制尚不清楚。

综上所述,本研究阐明了 SMARCA5 在 OSCC 组织中的表达情况及其对 OSCC 患者预后的影响,并通过体外细胞实验验证了 SMARCA5 对 OSCC 细胞(HSC4 细胞系)生物学行为的影响,为 OSCC 临床治疗寻找新靶点提供了可能的理论基础,对改善 OSCC 预后具有重要意义。

参考文献

[1] BRAY F,FERLAY J,SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin,68(6):394-424.

[2] BHATTACHARYA A,ROY R,SNIJDERS A M, et al. Two distinct routes to oral cancer differing in genome instability and risk for cervical node metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17 (22): 7024-7034.

[3] PÉPIN D,VANDERHYDEN B C,PICKETTS D J,et al. ISWI chromatin remodeling in ovarian somatic and germ cells: revenge of the NURFs[J]. Trends Endocrinol Metab,2007,18 (5):215-224.

[4] CHETTY R,SERRA S. SMARCA family of genes [J]. J Clin Pathol,2020,73(5):257-260.

[5] MOHAMED M A,GREIF P A,DIAMOND J, et al. Epigenetic events, remodelling enzymes and their relationship to chromatin organization in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma[J]. BJU Int, 2007, 99 (4): 908-915.

[6] STOPKA T,SKOULTCHI A I. The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100 (24):14097-14102.

[7] JIN Q,MAO X,LI B,et al. Overexpression of SMARCA5 correlates with cell proliferation and migration in breast cancer[J]. Tumour Biol,2015, 36(3):1895-1902.

[8] GIGEK C O,LISBOA L C,LEAL M F, et al. SMARCA5 methylation and expression in gas-

- tric cancer[J]. *Cancer Invest*, 2011, 29(2): 162-166.
- [9] STOPKA T, ZAKOVA D, FUCHS O, et al. Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia[J]. *Leukemia*, 2000, 14(7): 1247-1252.
- [10] SHEU J J, CHOI J H, YILDIZ I, et al. The roles of human sucrose nonfermenting protein 2 homologue in the tumor-promoting functions of Rsf-1[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4050-4057.
- [11] 谢玲玲, 金素芬, 贺佳妮, 等. hSNF2H 在非小细胞肺癌中存在过表达[J]. *中国医科大学学报*, 2015, 44(9): 833-836.
- [12] KIM J W, PARK Y, ROH J L, et al. Prognostic value of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein expression in oral cavity cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2016, 21(5): 883-889.
- [13] RANGANATHAN K, KAVITHA L. Oral epithelial dysplasia: classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders[J]. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2019, 23(1): 19-27.
- (上接第 1291 页)
- [18] BALCELLS C, BOTET F, GAYETE S, et al. Vertically transmitted cytomegalovirus infection in newborn preterm infants[J]. *J Perinat Med*, 2016, 44(5): 485-490.
- [19] 游雪琴, 应倩, 羊芸, 等. 冷冻母乳喂养与胎龄 < 32 周或出生体重 < 1 500 g 早产儿巨细胞病毒感染感染的关系[J]. *中华围产医学杂志*, 2021, 24(7): 518-524.
- [20] BARDANZELLU F, FANOS V, REALI A. Human breast milk-acquired cytomegalovirus infection: certainties, doubts and perspectives[J]. *Curr Pediatr Rev*, 2019, 15(1): 30-41.
- [21] OMARSDOTTIR S, CASPER C, NAVÉR L, et al. Cytomegalovirus infection and neonatal outcome in extremely preterm infants after freezing of maternal milk[J]. *Pediatric Infect Dis J*, 2015, 34(5): 482-489.
- [22] VOLDER C, WORK B J, HOEGH S V, et al. Transmission of cytomegalovirus in fresh and freeze-thawed mother's own milk to very preterm infants: a cohort study[J]. *J Perinatol*, 2021, 41(8): 1873-1878.
- [23] OSTERHOLM E A, SCHLEISS M R. Impact of breast milk-acquired cytomegalovirus infection in premature infants: pathogenesis, prevention, and clinical consequences? [J]. *Rev Med Virol*, 2020, 30(6): 1-11.
- [24] YOUSEFI J, AJALLOUEYAN M, AMIRSALARI S, et al. The specificity and sensitivity of transient otoacoustic emission in neonatal hearing screening compared with diagnostic test of auditory brain stem response in Tehran hospitals[J]. *Iran J Pediatr*, 2013, 23(2): 199-204.
- [25] O'CONNOR D L, GIBBINS S, KISS A, et al. Effect of supplemental donor human milk compared with preterm formula on neurodevelopment of very low-birth-weight infants at 18 months: a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2016, 316(18): 1897-1905.
- [26] WRIGHT C J, PERMAR S R. Preventing postnatal cytomegalovirus infection in the preterm infant: should it be done, can it be done, and at what cost? [J]. *J Pediatr*, 2015, 166(4): 795-798.

(收稿日期: 2022-06-25 修回日期: 2022-10-11)

(收稿日期: 2022-09-11 修回日期: 2022-12-26)