

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230506

· 论 著 ·

长链非编码 RNA-ROR 介导上皮-间质转化对鼻咽癌细胞放疗抵抗作用的体外研究

薛晓成^{1△}, 张 雪^{2△}, 黄水仙¹, 张 焱¹, 鲁 丹¹, 陈晓平^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)附属公利医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200135

2. 海军军医大学(第二军医大学)附属公利医院、上海市卫生健康委员会炎症与慢病管理人工智能重点实验室, 上海 200135

[摘要] **目的** 探讨 lncRNA-ROR 介导上皮-间质转化在鼻咽癌细胞放疗抵抗中的作用。**方法** 将鼻咽癌细胞 CNE2 分为空白组、阴性对照组、lncRNA-ROR 沉默组, 进行相应的处理。将 CNE2 细胞分为空白组、放疗组、放疗+阴性对照组、放疗+lncRNA-ROR 过表达组(放疗处理为 6 Gy 射线照射 24 h), 进行相应的处理。用 CCK-8 法检测 CNE2 增殖能力, 通过细胞划痕实验和 Transwell 细胞迁移实验检测细胞迁移能力, 用流式细胞术检测细胞凋亡的情况, 用蛋白印迹法检测凋亡相关蛋白和上皮-间质转化相关蛋白的表达。**结果** 与空白组、阴性对照组相比, 抑制 lncRNA-ROR 表达 48、72 h 后鼻咽癌细胞 CNE2 的增殖能力均减弱(均 $P<0.05$)。抑制 lncRNA-ROR 表达后鼻咽癌细胞 CNE2 的迁移率低于阴性对照组($P<0.05$), 而放疗+lncRNA-ROR 过表达组 CNE2 细胞的迁移能力高于放疗组与放疗+阴性对照组(均 $P<0.05$)。与放疗组、放疗+阴性对照组相比, 放疗+lncRNA-ROR 过表达组 CNE2 细胞的凋亡率均降低(均 $P<0.05$)。抑制 lncRNA-ROR 后, 活化的 caspase 3、caspase 9 蛋白表达均较空白组和阴性对照组升高(均 $P<0.05$); 而放疗+lncRNA-ROR 过表达组活化的 caspase 3、caspase 9 蛋白表达均较放疗组和放疗+阴性对照组下降(均 $P<0.05$)。抑制 lncRNA-ROR 可导致上皮标志蛋白(E-钙黏蛋白、 β -连环蛋白)表达升高, 间质标志蛋白(N-钙黏蛋白、波形蛋白)表达下降(均 $P<0.05$); 而与放疗组和放疗+阴性对照组相比, 放疗+lncRNA-ROR 过表达组 CNE2 细胞的上皮标志蛋白表达下降、间质标志蛋白表达升高(均 $P<0.05$)。**结论** lncRNA-ROR 可通过调控鼻咽癌细胞增殖、迁移、凋亡及上皮-间质转化影响其放疗抵抗, 是逆转鼻咽癌细胞放疗抵抗的潜在靶点。

[关键词] 鼻咽肿瘤; 放疗抵抗; 上皮-间质转化; 长链非编码 RNA-ROR**[引用本文]** 薛晓成, 张雪, 黄水仙, 等. 长链非编码 RNA-ROR 介导上皮-间质转化对鼻咽癌细胞放疗抵抗作用的体外研究[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(10): 1218-1225. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230506.

Effect of long non-coding RNA-ROR mediating epithelial-mesenchymal transformation on radiotherapy resistance of nasopharyngeal carcinoma cells *in vitro*

XUE Xiaocheng^{1△}, ZHANG Xue^{2△}, HUANG Shuixian¹, ZHANG Yi¹, LU Dan¹, CHEN Xiaoping^{1*}

1. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Gongli Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200135, China

2. Key Laboratory of Artificial Intelligence for Inflammation and Chronic Disease Management, Shanghai Municipal Health Commission, Gongli Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200135, China

[Abstract] **Objective** To investigate the role of long non-coding RNA (lncRNA)-ROR in mediating epithelial-mesenchymal transformation (EMT) and its impact on radiotherapy resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** Nasopharyngeal carcinoma cells CNE2 were divided into blank group, negative control (NC) group and lncRNA-ROR silencing group; or were divided into blank group, radiotherapy group, radiotherapy+NC group, and radiotherapy+lncRNA-ROR overexpression group (radiotherapy treated with 6 Gy radiation for 24 h). The CNE2

[收稿日期] 2023-09-05 [接受日期] 2023-10-10

[基金项目] 上海市浦东新区卫生系统优秀青年医学人才培养计划(PWRq-2020-63), 上海市卫生健康委员会青年项目(20204Y0144), 上海市浦东新区重点亚专科项目(PWZy2020-06), 上海市浦东新区临床特色专科项目(PWYts2021-15). Supported by Outstanding Young Medical Talent Cultivation Project of Shanghai Pudong New Area Health System (PWRq-2020-63), Youth Project of Shanghai Municipal Health Commission (20204Y0144), Shanghai Pudong New Area Key Subspecialty Project (PWZy2020-06), and Clinical Specialty Discipline Project of Shanghai Pudong New Area (PWYts2021-15).**[作者简介]** 薛晓成, 硕士, 主治医师. E-mail: lugong132910@163.com; 张 雪, 硕士, 主管技师. E-mail: 13524805404@139.com[△]共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-58858730, E-mail: chen_xp2000@163.com

proliferation was detected by cell counting kit 8 method. The cell migration was detected by cell scratch test and Transwell cell migration test. The apoptosis ratio was detected by flow cytometry, and the apoptosis-related proteins and epithelial-mesenchymal transition proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with the blank group and NC group, the proliferation ability of nasopharyngeal carcinoma cells CNE2 was decreased after inhibition of lncRNA-ROR expression for 48 and 72 h (all $P < 0.05$). The mobility of CNE2 cells after lncRNA-ROR expression inhibition was lower than that in the NC group ($P < 0.05$). The migration ability of CNE2 cells in the radiotherapy+lncRNA-ROR overexpression group was higher than that in the radiotherapy group and radiotherapy+NC group (both $P < 0.05$). Compared with the radiotherapy group and radiotherapy+NC group, the apoptosis rates of CNE2 cells in the radiotherapy+lncRNA-ROR overexpression group was decreased (both $P < 0.05$). After lncRNA-ROR inhibition, the expression of activated caspase 3 and caspase 9 proteins was increased (both $P < 0.05$), while the expression of activated caspase 3 and caspase 9 proteins was decreased in the radiotherapy+overexpressed lncRNA-ROR group (both $P < 0.05$). Inhibition of lncRNA-ROR increased the expression of epithelial marker proteins (E-cadherin, β -catenin), and decreased the expression of interstitial marker proteins (N-cadherin, vimentin). The epithelial marker protein expression was decreased and interstitial marker protein expression was increased in CNE2 cells in the radiotherapy+lncRNA-ROR overexpression group compared with the radiotherapy group and radiotherapy+NC group (all $P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA-ROR can affect the radiotherapy resistance of nasopharyngeal carcinoma cells by regulating their proliferation, migration, apoptosis and EMT, and it is a potential target for reversing the radiotherapy resistance of nasopharyngeal carcinoma cells.

[**Key words**] nasopharyngeal neoplasms; radiotherapy resistance; epithelial-mesenchymal transformation; long non-coding RNA-ROR

[**Citation**] XUE X, ZHANG X, HUANG S, et al. Effect of long non-coding RNA-ROR mediating epithelial-mesenchymal transformation on radiotherapy resistance of nasopharyngeal carcinoma cells *in vitro*[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(10): 1218-1225. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20230506.

鼻咽癌是一种具有独特地理分布特征的恶性肿瘤。全球癌症统计数据显示,全球鼻咽癌发病 120 416 例,在所有新诊断的癌症中排名第 23 位,死亡 73 476 例,在癌症归因死亡总数中排名第 21 位;亚洲鼻咽癌发病率占全球的 83.3% (100 298 例),死亡例数 (61 442 例) 占全球的 83.6%^[1]。在中国,鼻咽癌发病率占头颈部肿瘤首位,呈南高北低趋势^[2]。鼻咽癌的解剖学特点、特殊的生物学行为及其对放射线的敏感性决定了放射治疗 (以下简称放疗) 为其主要治疗方式。大部分鼻咽癌患者可以通过放疗实现临床治愈,但仍有部分患者在放疗过程中会发生放疗抵抗。放疗抵抗是部分鼻咽癌患者治疗效果差的主要原因^[3]。

上皮-间质转化指上皮细胞到间质细胞的转化,它赋予细胞迁移和入侵的能力,参与组织愈合、器官纤维化和癌症发生等过程^[4]。研究表明,上皮-间质转化在肿瘤放疗抵抗过程中扮演重要角色^[5]。lncRNA 的异常表达与恶性肿瘤的发生有密切关系,失调的 lncRNA 可通过多种途径调节 DNA 甲基化、组蛋白修饰及染色质重构^[6-8]。越来越多的研究证实, lncRNA 是导致上皮-间质转化的重要调控者,而上皮-间质转化又是导致肿瘤放疗抵抗的主要原因之一^[9]。lncRNA-ROR 首次被发现于诱导的多能干细胞中。多项研究证实, lncRNA-

ROR 在前列腺癌、乳腺癌、肾癌等多种肿瘤异常表达^[10-12]。在肿瘤发生、发展中, lncRNA-ROR 与癌细胞的增殖、迁移、上皮-间质转化密切相关^[13]。本研究旨在探讨 lncRNA-ROR 在鼻咽癌放疗抵抗中对上皮-间质转化的调控作用,为寻找鼻咽癌治疗的潜在分子干预靶点提供参考。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂 人鼻咽癌细胞 CNE2 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞生物研究所细胞库,使用 DMEM 添加 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。E-钙黏蛋白、 β -联蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白、caspase 9、caspase 3、GADPH 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司,鼠源、兔源二抗均购自上海碧云天生物技术有限公司。CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;结晶紫染色液购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;流式细胞凋亡检测试剂盒购于上海优宁维生物科技股份有限公司;Transwell 小室 (NC 27712) 购于美国 Corning 公司;siRNA-Mate 转染试剂、siRNA 转染序列、lncRNA-ROR 过表达序列及对照序列均购于上海吉玛基因公司;Lipopectamine 3000 转染试剂购于美

国 ThermoFisher Scientific 公司;蛋白质印迹法检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 lncRNA-ROR 沉默和过表达转染细胞系构建 将 CNE2 细胞种于 6 孔板中,置于 30 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,将合成的 lncRNA-ROR 沉默和过表达转染序列转染,48 h 后换液,进行后续实验。siRNA-lncRNA-ROR 序列正义链为 5'-CTCCAGCTATGCAGACCACTC-3'、反义链为 5'-GTGACGCCTGACCTGTTGAC-3',对照 siRNA 序列正义链为 5'-CACAUUGGUGAAGA-GAAGUAUCCUA-3'、反义链为 5'-UAGGAUACUUCUCUUCACCAAUGUG-3';过表达 lncRNA-ROR 序列正义链为 5'-CAAACACATCGCGCCTCTGC-3'、反义链为 5'-AGGAGTCCTGAGAAGGTGCT-3',过表达 lncRNA-ROR 对照序列正义链为 5'-CACGUUAGUGAGGAGAAGUAUCCUA-3'、反义链为 5'-UCGGAUACGGCUCAUCACCAAUGUG-3'。

1.3 qPCR 检测 使用总 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA,进行反转录反应合成 cDNA。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒(货号 FSQ-301,日本 Toyobo 公司)使用说明进行 qPCR 检测。qPCR 及数据采集均使用 ABI PRISM 7900HT 序列检测系统, GAPDH 作为内参。lncRNA-ROR 上游引物序列为 5'-CAAACACATCGCCACTCTGC-3',下游引物序列为 5'-AGGAGTCAGGAGAAGGTGCT-3'; GAPDH 上游引物序列为 5'-CCTGTTTCGACAGT-CAGCCG-3',下游引物序列为 GAGAACAGTGA-GCGCCTAGT-3'。

1.4 细胞照射 在细胞转染的同时进行放射线照射。放射线照射的细胞培养板用封口膜封闭防止污染,使用 Siemens PRIMuS 直线加速器进行照射,照射能量为 6 Gy、吸收剂量率 300 cGy/min、源皮距 100 cm,细胞培养板上覆盖一层厚 1.5 cm 的补偿胶,照射 24 h 后继续进行后续操作。

1.5 CCK-8 法 细胞按 25%~30% 的密度铺于 96 孔板,分为空白组、阴性对照组、lncRNA-ROR 沉默组。待 24 h 细胞贴壁后进行 siRNA 转染,完成转染后分别在 0、12、24、48、72 h 时加入 CCK-8 试剂,用酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度值,绘制细胞增殖曲线。每组实验重复 3 次。

1.6 细胞划痕实验 将 CNE2 细胞分别分为空白组、阴性对照组、lncRNA-ROR 沉默组及空白组、

放疗组、放疗+阴性对照组、放疗+lncRNA-ROR 过表达组,进行相应的处理后,在对数生长期按照 1×10^5 /孔的密度铺于细胞划痕小室中,24 h 待细胞贴壁后移去小室,拍照。将细胞放入培养箱继续培养 24 h,取出细胞拍照记录,根据细胞划痕宽度变化分析细胞迁移能力。

1.7 Transwell 细胞迁移实验 将 CNE2 细胞分为空白组、放疗组、放疗+阴性对照组、放疗+lncRNA-ROR 过表达组,进行相应处理后,在 8.0 μm 的细胞小室中加入 200 μL 无 FBS 细胞培养基,将细胞接种到细胞小室的上室中;每孔 5×10^4 个细胞,随后在下室加入 800 μL 含有 15% FBS 的培养基。培养 24 h 后在室温下用 4% 多聚甲醛溶液处理细胞 20 min,用 0.1% 结晶紫染色液在室温下染色 30 min,最后用 PBS 洗涤细胞。在光学显微镜下对染色细胞进行计数和图像采集。

1.8 细胞凋亡检测实验 将 CNE2 细胞铺于 12 孔板中,分为空白组、放疗组、放疗+阴性对照组、放疗+lncRNA-ROR 过表达组。24 h 后消化细胞,采用膜联蛋白 V 和 PI 染色,根据试剂说明书进行操作,用流式细胞仪检测,最后用 FlowJo 10.0.7 软件分析。

1.9 蛋白质印迹法 用蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。配 10% 分离胶进行电泳,转膜后孵育一抗(1:1 000 稀释)4 ℃ 过夜,用 PBST 清洗 3 次后,加入二抗(1:2 000 稀释)室温孵育 2 h,用 PBST 清洗 3 次。加入 ECL 发光液显色。用凝胶图像处理系统分析目的条带灰度值并计算相对表达量。

1.10 统计学处理 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 沉默 lncRNA-ROR 对鼻咽癌细胞增殖的影响 qPCR 检测结果显示,用 siRNA 能抑制 lncRNA-ROR 的含量(图 1A)。CCK-8 实验结果(图 1B)显示,与空白组、阴性对照组相比,抑制 lncRNA-ROR 表达 48、72 h 后鼻咽癌细胞 CNE2 的增殖能力均减弱(均 $P < 0.05$)。

2.2 lncRNA-ROR 对放疗后鼻咽癌细胞迁移能力的影响 细胞划痕实验结果(图 2)显示, lncRNA-ROR 沉默组鼻咽癌细胞 CNE2 迁移率

[(44.0±1.3)%] 低于阴性对照组 [(80.0±1.0)%] ($P<0.05$), 放疗+IncRNA-ROR 过表达组 CNE2 细胞迁移率 [(82.0±1.5)%] 高于空白组 [(73.0±0.6)%]、放疗组 [(37.0±0.1)%] 及放疗+阴性对

照组 [(32.0±0.7)%] (均 $P<0.05$)。Transwell 细胞迁移实验结果 (图 3) 也显示, 放疗+IncRNA-ROR 过表达组 CNE2 细胞的迁移能力高于放疗组与放疗+阴性对照组 (均 $P<0.05$)。

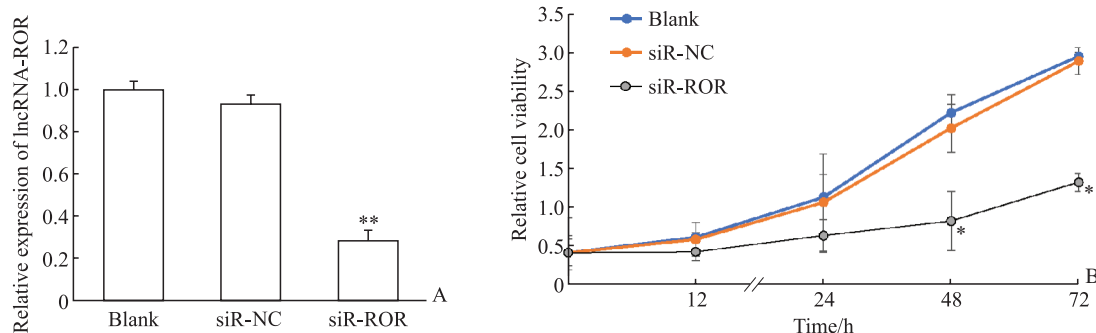


图 1 沉默 IncRNA-ROR 对鼻咽癌细胞 CNE2 增殖的影响

Fig 1 Effect of IncRNA-ROR silencing on proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells CNE2

A: Test results of real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; B: Test results of cell counting kit-8. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs blank group and siR-NC group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. IncRNA: Long non-coding RNA; siR-NC: Negative control small interfering RNA; siR-ROR: Small interfering RNA targeting IncRNA-ROR.

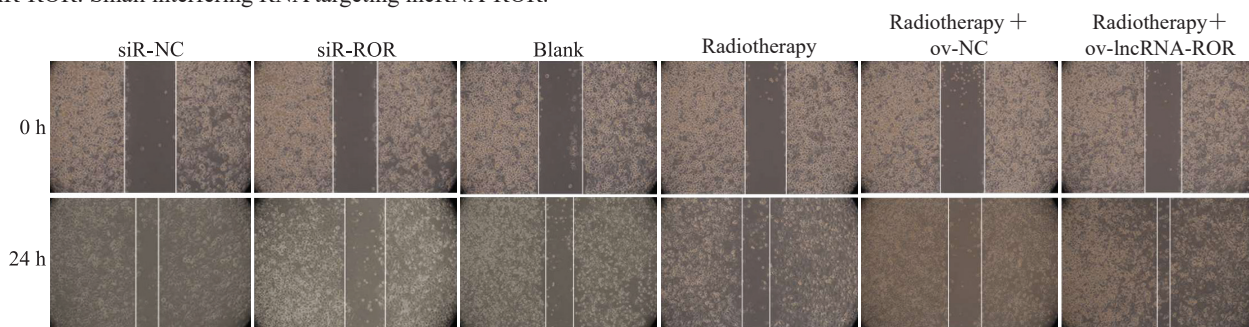


图 2 细胞划痕实验检测 IncRNA-ROR 对放疗后鼻咽癌细胞 CNE2 迁移能力的影响 (400×)

Fig 2 Effect of IncRNA-ROR on migration ability of nasopharyngeal carcinoma cells CNE2 after radiotherapy detected by cell scratch test (400×)

IncRNA: Long non-coding RNA; siR-NC: Negative control small interfering RNA; siR-ROR: Small interfering RNA targeting IncRNA-ROR; ov-NC: Overexpression negative control; ov-IncRNA-ROR: Overexpression IncRNA-ROR.

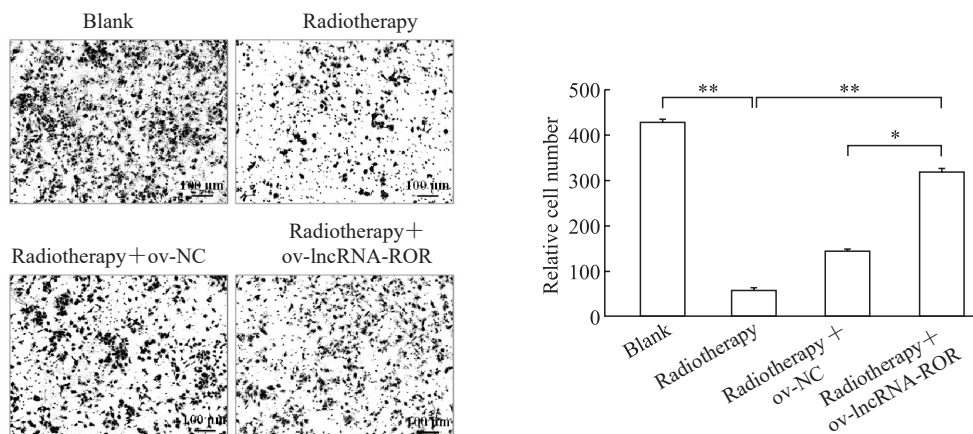


图 3 Transwell 实验检测 IncRNA-ROR 对放疗后鼻咽癌细胞 CNE2 迁移能力的影响

Fig 3 Effect of IncRNA-ROR on migration ability of nasopharyngeal carcinoma cells CNE2 after radiotherapy detected by Transwell test

* $P<0.05$, ** $P<0.01$. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. IncRNA-ROR: Long non-coding RNA; ov-NC: Overexpression negative control; ov-IncRNA-ROR: Overexpression IncRNA-ROR.

2.3 lncRNA-ROR 对放疗后鼻咽癌细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果显示,与放疗+阴性对照组相比,放疗+lncRNA-ROR 过表达组 CNE2 细胞的凋亡率降低 ($P<0.05$, 图 4A)。蛋白质印迹法检测结果显示,抑制 lncRNA-ROR 表达后,活化的 caspase 3、

caspase 9 蛋白表达升高,与空白组、阴性对照组相比差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$, 图 4B); 而放疗+lncRNA-ROR 过表达组活化的 caspase 3、caspase 9 蛋白表达较放疗+阴性对照组下降 (均 $P<0.05$, 图 4C)。

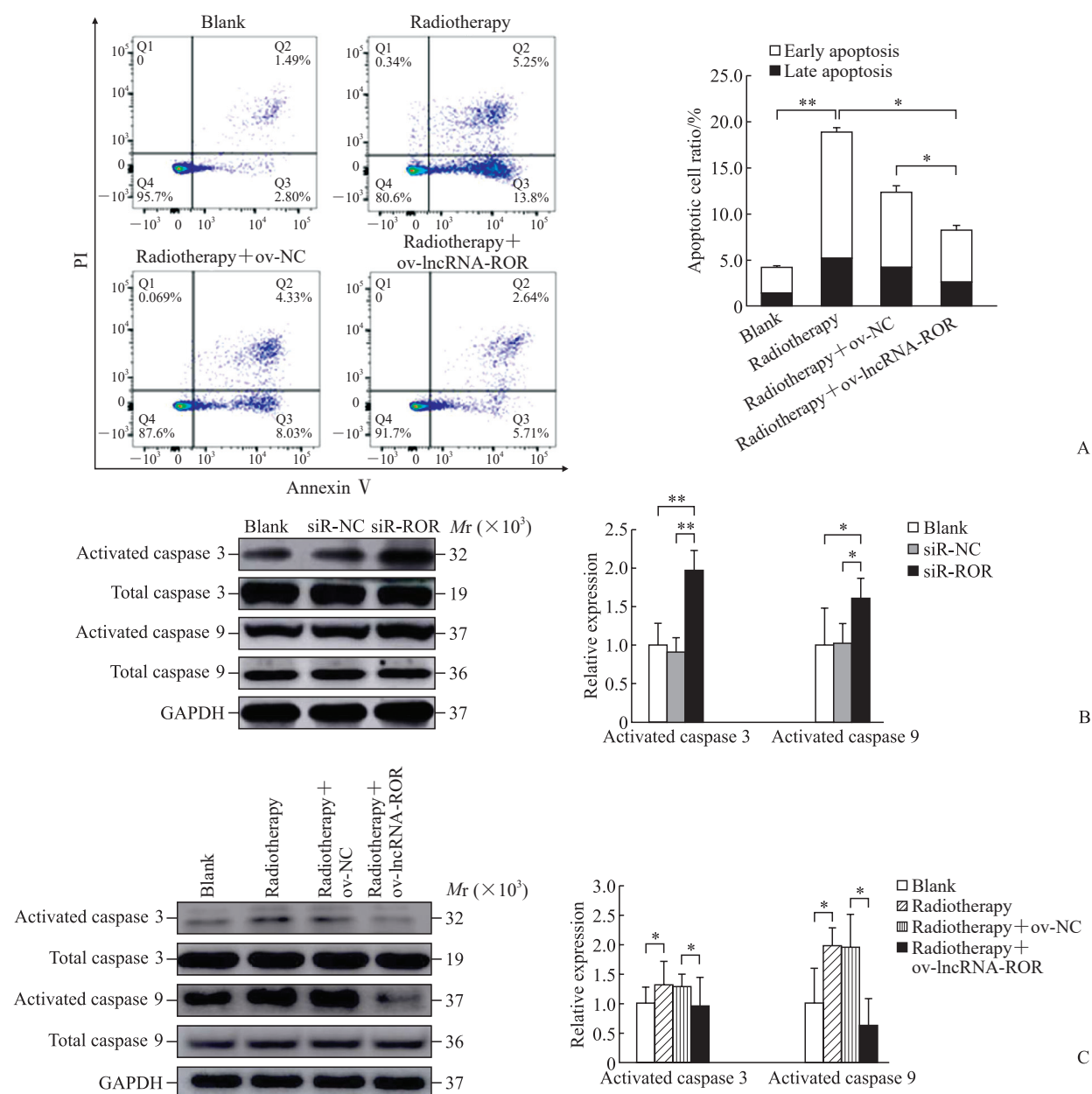


图 4 lncRNA-ROR 对放疗后鼻咽癌细胞凋亡的影响

Fig 4 Effect of lncRNA-ROR on apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells after radiotherapy

A: The percentage of apoptotic cells detected by flow cytometry; B: Effect of inhibition of lncRNA-ROR on apoptosis proteins in CNE2 cells detected by Western blotting; C: Effect of lncRNA-ROR overexpression on apoptosis proteins in CNE2 cells after radiotherapy detected by Western blotting. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. lncRNA: Long non-coding RNA; PI: Propidium iodide; ov-NC: Overexpression negative control; ov-lncRNA-ROR: Overexpression lncRNA-ROR; siR-NC: Negative control small interfering RNA; siR-ROR: Small interfering RNA targeting lncRNA-ROR; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

2.4 lncRNA-ROR 对鼻咽癌细胞上皮-间质转化的影响 与空白对照组、阴性对照组相比,抑制

lncRNA-ROR 表达可以导致上皮标志蛋白 (E- 钙黏蛋白、 β - 联蛋白) 表达升高 (均 $P<0.01$), 间

质标志蛋白 (N-钙黏蛋白、波形蛋白) 表达下降 (均 $P < 0.05$, 图 5A)。与放疗组、放疗+阴性对照组相比, 放疗+*lncRNA-ROR* 过表达组 E-钙黏蛋白、 β -联蛋白表达下降, N-钙黏蛋白、波形蛋

白表达升高 (均 $P < 0.05$, 图 5B)。以上结果表明 *lncRNA-ROR* 的表达可调控鼻咽癌细胞的上皮-间质转化导致放疗抵抗。

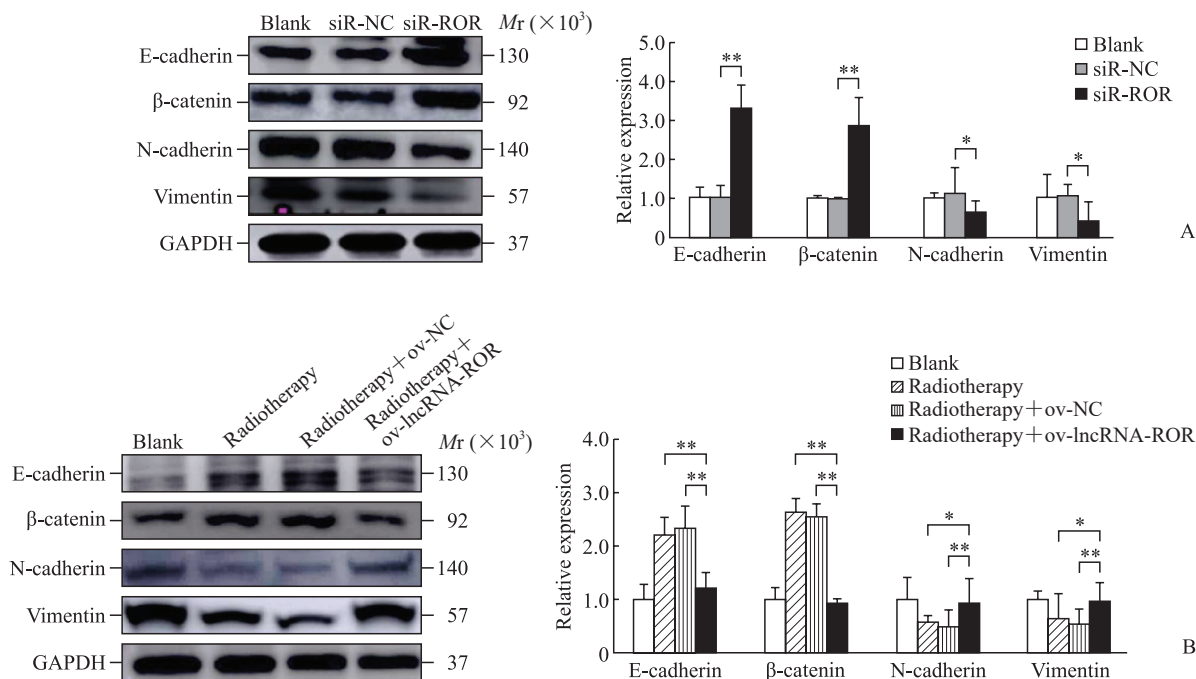


图 5 蛋白质印迹法检测 *lncRNA-ROR* 对放疗后鼻咽癌细胞上皮-间质转化的影响

Fig 5 Effect of *lncRNA-ROR* on epithelial-mesenchymal transformation of nasopharyngeal carcinoma cells after radiotherapy detected by Western blotting

A: Effect of inhibition of *lncRNA-ROR* on epithelial-mesenchymal transition proteins in CNE2 cells; B: Effect of *lncRNA-ROR* overexpression on epithelial-mesenchymal transition proteins in CNE2 cells after radiotherapy. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *lncRNA*: Long non-coding RNA; siR-NC: Negative control small interfering RNA; siR-ROR: Small interfering RNA targeting *lncRNA-ROR*; ov-NC: Overexpression negative control; ov-*lncRNA-ROR*: Overexpression *lncRNA-ROR*; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

3 讨论

越来越多的证据表明, 真核生物转录组和基因组并不像以前认为的那样是蛋白质编码基因转录的简单底物, 而是表现出广泛的 *lncRNA* 表达^[14]。近年来, 大量 *lncRNA* 的相关研究极大地改变了人们对包括癌症在内的复杂疾病生物学的理解, *lncRNA* 在癌症生物学中扮演着重要角色, 可能作为癌基因或肿瘤抑制因子发挥作用。

Hou 等^[15] 的研究表明, *lncRNA-ROR* 在乳腺癌中的表达水平高于周围正常组织, 并通过促进上皮-间质转化提高乳腺肿瘤细胞的增殖及侵袭能力。类似的研究结果在肝癌和胶质瘤中也得到证实^[16-17]。另外, *lncRNA-ROR* 也已被证明与鼻

咽癌的发生、进展和转移有关^[18]。本课题组前期采用 qPCR 检测鼻咽癌组织及慢性鼻咽炎组织中 *lncRNA-ROR* 的表达情况, 结果显示 *lncRNA-ROR* 在鼻咽癌组织中的表达明显高于慢性鼻咽炎组织, 初步表明 *lncRNA-ROR* 的表达可能与鼻咽癌的发生、发展有一定的相关性; 在 4 种鼻咽低分化鳞状细胞癌细胞株 CNE2、HNE1、HONE-1、SUNE-1 中用 qPCR 检测 *lncRNA-ROR* 的表达, 结果显示在 CNE2 中 *lncRNA-ROR* 高于其他 3 种鼻咽癌细胞株^[19], 所以本研究选择 CNE2 作为后续 *lncRNA-ROR* 的作用机制研究对象。本研究结果显示, 抑制 *lncRNA-ROR* 表达后 CNE2 的增殖能力减弱, 迁移受到抑制, 凋亡相关蛋白表达升高, 再次印证了 *lncRNA-ROR* 与鼻咽癌细胞的增殖、迁移相关。

上皮-间质转化是肿瘤浸润和转移的关键步骤,是许多类型癌症转移的关键机制。众所周知,E-钙黏蛋白是上皮-间质转化形成的主要标志物,主要介导上皮细胞间黏附^[20],在上皮-间质转化中起重要作用。E-钙黏蛋白的缺失会使上皮细胞连接丢失,细胞极性、细胞活动性增加,导致癌细胞穿过基底膜入侵周围组织^[21]。E-钙黏蛋白表达下降,而间质标志物波形蛋白、N-钙黏蛋白的表达升高,使细胞获得间质细胞特性,进而向间充质样细胞转变,最终发生上皮-间质转化。多篇文献中指出,在膀胱癌和乳腺癌中 lncRNA-ROR 通过抑制 E-钙黏蛋白的表达、增强 N-钙黏蛋白的活性促进上皮-间质转化,使肿瘤发生原位浸润、复发或转移^[22-23]。本实验在鼻咽癌细胞 CNE2 中抑制 lncRNA-ROR 表达,蛋白质印迹法检测结果表明 CNE2 中 E-钙黏蛋白、 β -联蛋白表达升高,而 N-钙黏蛋白、波形蛋白表达下降,表明 lncRNA-ROR 表达可促进鼻咽癌细胞上皮-间质转化的发生,使鼻咽癌细胞增殖、迁移能力增强。

鼻咽癌独特的临床和病理特征导致其对放疗高度敏感。但部分鼻咽癌患者经放疗后出现局部复发和/或远处转移,放疗抵抗可能是导致这类患者治疗失败的主要原因,严重制约了患者的预后及生活质量。引起放疗抵抗的因素繁杂,包括 DNA 损伤和修复通路中重要的基因突变及细胞周期调控紊乱、细胞凋亡受到抑制等。研究表明, lncRNA-ROR 在许多癌症中参与各种细胞事件,如促进细胞增殖和放疗抵抗^[24]。Chen 等^[25]研究发现 lncRNA-ROR 在放疗抵抗的肝癌细胞系中过表达。另有研究表明 X 线照射可提高人结肠癌 LS174T 和 HCT116 细胞中 lncRNA-ROR 的表达,敲除 lncRNA-ROR 后可促进细胞凋亡并增加 p53 和 miRNA-145 的表达,表明 lncRNA-ROR 通过负调控 p53/miRNA-145 通路参与了肿瘤细胞的放疗抵抗^[24]。本研究结果显示, X 线照射的同时上调 lncRNA-ROR 的表达,可使 CNE2 的侵袭能力增强、凋亡减弱,上皮标志蛋白(E-钙黏蛋白、 β -联蛋白)表达下降,间质标志蛋白(N-钙黏蛋白、波形蛋白)表达升高,表明 lncRNA-ROR 可调控鼻咽癌细胞的上皮-间质转化,与鼻咽癌的放疗抵抗相关。

综上所述,本研究发现 lncRNA-ROR 在调节鼻

咽癌细胞的增殖、迁移、凋亡、上皮-间质转化和放疗抵抗中具有一定的作用。但 lncRNA-ROR 通过何种途径和机制调控上皮-间质转化导致放疗抵抗尚需深入研究,以进一步明确 lncRNA-ROR 能否成为鼻咽癌放疗抵抗患者的治疗靶点,进而改善鼻咽癌患者预后,提高其生活质量。

[参考文献]

- [1] SU Z Y, SIAK P Y, LWIN Y Y, et al. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma: current insights and future outlook[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2024, 43(3): 919-939. DOI: 10.1007/s10555-024-10176-9.
- [2] CHEN Y P, CHAN A T C, LE Q T, et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. *Lancet*, 2019, 394(10192): 64-80. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)30956-0.
- [3] FRIKHA M, AUPERIN A, TAO Y, et al. A randomized trial of induction docetaxel-cisplatin-5FU followed by concomitant cisplatin-RT versus concomitant cisplatin-RT in nasopharyngeal carcinoma (GORTEC 2006-02)[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(3): 731-736. DOI: 10.1093/annonc/mdx770.
- [4] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(2): 69-84. DOI: 10.1038/s41580-018-0080-4.
- [5] CHI H C, TSAI C Y, TSAI M M, et al. Roles of long noncoding RNAs in recurrence and metastasis of radiotherapy-resistant cancer stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1903. DOI: 10.3390/ijms18091903.
- [6] SUI F, JI M, HOU P. Long non-coding RNAs in thyroid cancer: biological functions and clinical significance[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 469: 11-22. DOI: 10.1016/j.mce.2017.07.020.
- [7] LI J K, CHEN C, LIU J Y, et al. Long noncoding RNA MRCCAT1 promotes metastasis of clear cell renal cell carcinoma via inhibiting NPR3 and activating p38-MAPK signaling[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 111. DOI: 10.1186/s12943-017-0681-0.
- [8] RICHTIG G, EHALL B, RICHTIG E, et al. Function and clinical implications of long non-coding RNAs in melanoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): E715. DOI: 10.3390/ijms18040715.
- [9] GUO Z, WANG Y H, XU H, et al. LncRNA linc00312 suppresses radiotherapy resistance by targeting DNA-PKcs and impairing DNA damage repair in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 69. DOI: 10.1038/s41419-020-03302-2.
- [10] ZHAI X Q, MENG F M, HU S F, et al. Mechanism of lncRNA ROR promoting prostate cancer by regulating

- Akt[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(5): 2155. DOI: 10.26355/eurrev_202103_25195.
- [11] PENG W X, HUANG J G, YANG L, et al. Linc-RoR promotes MAPK/ERK signaling and confers estrogen-independent growth of breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 161. DOI: 10.1186/s12943-017-0727-3.
- [12] SHI J, ZHANG D, ZHONG Z, et al. lncRNA ROR promotes the progression of renal cell carcinoma through the miR-206/VEGF axis[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3782-3792. DOI: 10.3892/mmr.2019.10636.
- [13] LIU M, ZHANG M, YIN H. Linc-ROR promotes invasion and metastasis of gastric cancer by activating epithelial-mesenchymal transition[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2022, 65(3): 545-550. DOI: 10.4103/ijpm.ijpm_696_21.
- [14] WILUSZ J E, SUNWOO H, SPECTOR D L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(13): 1494-1504. DOI: 10.1101/gad.1800909.
- [15] HOU P, ZHAO Y, LI Z, et al. LincRNA-ROR induces epithelial-to-mesenchymal transition and contributes to breast cancer tumorigenesis and metastasis[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(6): e1287. DOI: 10.1038/cddis.2014.249.
- [16] FENG S, YAO J, CHEN Y, et al. Expression and functional role of reprogramming-related long noncoding RNA (lincRNA-ROR) in glioma[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(3): 623-630. DOI: 10.1007/s12031-014-0488-z.
- [17] TAKAHASHI K, YAN I K, HAGA H, et al. Modulation of hypoxia-signaling pathways by extracellular linc-RoR[J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 7): 1585-1594. DOI: 10.1242/jcs.141069.
- [18] LI L, GU M, YOU B, et al. Long non-coding RNA ROR promotes proliferation, migration and chemoresistance of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(9): 1215-1222. DOI: 10.1111/cas.12989.
- [19] 张雪, 薛晓成, 陈晓平, 等. LncROR 在促进鼻咽癌细胞增殖及上皮-间质转化作用中的研究[J]. *中国中西医结合耳鼻喉科杂志*, 2019, 27(1): 5-10. DOI: 10.16542/j.cnki.issn.1007-4856.2019.01.002.
- [20] WALLECH M, PACHOW D, BLÜCHER C, et al. Altered expression of E-cadherin-related transcription factors indicates partial epithelial-mesenchymal transition in aggressive meningiomas[J]. *J Neurol Sci*, 2017, 380: 112-121. DOI: 10.1016/j.jns.2017.07.009.
- [21] NA T Y, SCHECTERSON L, MENDONSA A M, et al. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(11): 5931-5937. DOI: 10.1073/pnas.1918167117.
- [22] CHEN Y, PENG Y, XU Z, et al. LncROR promotes bladder cancer cell proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(6): 2399-2410. DOI: 10.1159/000475910.
- [23] ZHANG H Y, LIANG F, ZHANG J W, et al. Effects of long noncoding RNA-ROR on tamoxifen resistance of breast cancer cells by regulating microRNA-205[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79(2): 327-337. DOI: 10.1007/s00280-016-3208-2.
- [24] YANG P, YANG Y, AN W, et al. The long noncoding RNA-ROR promotes the resistance of radiotherapy for human colorectal cancer cells by targeting the p53/miR-145 pathway[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 32(4): 837-845. DOI: 10.1111/jgh.13606.
- [25] CHEN Y, SHEN Z, ZHI Y, et al. Long non-coding RNA ROR promotes radioresistance in hepatocellular carcinoma cells by acting as a ceRNA for microRNA-145 to regulate RAD18 expression[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 645: 117-125. DOI: 10.1016/j.abb.2018.03.018.

[本文编辑] 尹 茶