

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.06.06

· 基础研究 ·

INHBA-AS1通过c-Myc/SCD通路调控宫颈癌HeLa细胞的鸟氨酸代谢和EMT进程

黄桓, 李春, 宋玉, 徐元萍, 黄红丽, 鲁晶泉, 杨一(武汉市第三医院 妇科, 湖北 武汉 430074)

[摘要] **目的:**探讨抑制素 β 亚基A反义RNA1(INHBA-AS1)对宫颈癌HeLa细胞EMT和鸟氨酸代谢途径的影响及其机制。**方法:**体外常规培养HeLa细胞,实验分为10组:对照组、阴性对照(NC)组、sh-INHBA-AS1组、PluriSin 1[硬脂酰辅酶A去饱和酶(stearyl CoA desaturase, SCD)抑制剂]组、NC+PluriSin 1组、sh-INHBA-AS1+PluriSin 1组、10058-F4(c-Myc抑制剂)组、NC+10058-F4组、sh-INHBA-AS1+10058-F4组、sh-INHBA-AS1+OE-c-Myc组。平板克隆实验检测各组细胞的增殖能力,FCM检测各组细胞的凋亡情况,Transwell小室实验检测各组细胞的侵袭、迁移能力,qPCR法检测各组细胞中INHBA-AS1、c-Myc、SCD和EMT相关基因(N-cadherin、TGF- β 、ZEB1)mRNA的表达,WB法检测各组细胞中c-Myc、SCD、EMT相关(N-cadherin、TGF- β 、ZEB1)、S-腺苷-甲硫氨酸脱羧酶(SAMDC)和亚精胺/精胺N¹-乙酰转移酶(SSAT)蛋白的表达,ELISA检测各组细胞上清液中鸟氨酸脱羧酶(ODC)的含量。**结果:**敲减INHBA-AS1表达使HeLa细胞的增殖、侵袭和迁移能力显著降低(均 $P<0.05$)而细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),qPCR、WB法检测结果显示,敲减INHBA-AS1均可显著抑制HeLa细胞中c-Myc、SCD、N-cadherin、TGF- β 、ZEB1和SAMDC的表达(均 $P<0.05$),而促进SSAT的表达($P<0.05$),并降低HeLa细胞上清液中ODC的含量($P<0.05$)。与c-Myc抑制剂和SCD抑制剂单独处理相比,其联合敲减INHBA-AS1后上述作用更加显著(均 $P<0.05$);与sh-INHBA-AS1组相比,进一步过表达c-Myc后HeLa细胞的增殖能力显著升高($P<0.05$)、SCD和N-cadherin蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)、细胞上清液中ODC含量显著升高($P<0.05$)。**结论:**INHBA-AS1可通过c-Myc调控SCD的表达,从而影响HeLa细胞鸟氨酸代谢和EMT进程,进而促进HeLa细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

[关键词] 宫颈癌;HeLa细胞;抑制素 β 亚基A反义RNA1;硬脂酰辅酶A去饱和酶;c-Myc;上皮-间质转化;鸟氨酸代谢
[中图分类号] R737.33;R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)06-0497-08

INHBA-AS1 affects ornithine metabolism and EMT process of cervical cancer HeLa cells through c-Myc/SCD pathway

HUANG Huan, LI Chun, SONG Yu, XU Yuanping, HUANG Hongli, LU Jingquan, YANG Yi (Department of Gynaecology, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430074, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of inhibin subunit beta A antisense RNA 1 (INHBA-AS1) on epithelial-interstitial transformation (EMT) and ornithine metabolic pathway of cervical cancer cells and its mechanism. **Methods:** Cervical cancer HeLa cells were routinely cultured *in vitro* and the experiment was divided into 10 groups: control group, negative control (NC) group, sh-INHBA-AS1 group, PluriSin 1 [stearyl CoA desaturase (SCD) inhibitor] group, NC+PluriSin 1 group, sh-INHBA-AS1+PluriSin 1 Group, 10058-F4 (c-Myc inhibitor) group, NC+10058-F4 group, sh-INHBA-AS1+10058-F4 group, sh-INHBA-AS1+OE-c-Myc group. The proliferation ability of cells in each group was detected by plate cloning assay; the apoptosis of cells in each group was detected by flow cytometry; the invasion and migration abilities of cells in each group were detected by Transwell assay; the expressions of INHBA-AS1, c-Myc, SCD and EMT-related genes (N-cadherin, TGF- β and ZEB1) in cells of each group were detected by qPCR; the expressions of c-Myc, SCD, EMT-associated (N-cadherin, TGF- β and ZEB1), S-adenosine-methionine decarboxylase (SAMDC) and spermidine/spermine N¹ acetyltransferase (SSAT) proteins in each group were detected by WB method, and the content of ornithine decarboxylase (ODC) in cell supernatant was detected by ELISA. **Results:** The proliferation, invasion and migration abilities of HeLa cells were significantly decreased after INHBA-AS1 expression was knocked down (all $P<0.05$). The apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$). The results of qPCR and WB assay showed that knockdown of INHBA-AS1 could significantly inhibit the expressions of c-Myc, SCD, N-cadherin, TGF- β , ZEB1, and SAMDC in HeLa cells by (all $P<0.05$), promote the expression of SSAT ($P<0.05$) and decrease the content of ODC in HeLa cell supernatant ($P<0.05$). These

[基金项目] 武汉市卫健委医学科科研项目(No. WX21C22)

[作者简介] 黄桓(1971—),男,学士,副主任医师,主要从事妇科肿瘤基础与临床的研究,E-mail:hhtj99@hotmail.com

[通信作者] 李春,E-mail:huanghuan0033@sina.com

effects were more significant after further knockdown of INHBA-AS1 compared with c-Myc inhibitor and SCD inhibitor treatments (all $P < 0.05$). Compared with sh-INHBA-AS1 group, further over-expression of c-Myc significantly increased HeLa cell proliferation ($P < 0.05$), SCD and N-cadherin protein expression levels ($P < 0.05$), and the content of ODC in cell supernatant ($P < 0.05$). **Conclusion:** INHBA-AS1 can regulate the expression of SCD through c-Myc, participate in the ornithine metabolism and EMT process of HeLa cells, and promote the proliferation, invasion, and migration of HeLa cells.

[Key words] cervical cancer; HeLa cell; inhibin subunit beta A antisense RNA 1 (INHBA-AS1); stearyl CoA desaturase (SCD); c-Myc; epithelial-mesenchymal transition (EMT); ornithine metabolism

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(6): 497-504. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.06.006]

宫颈癌是全球第三大常见癌症,也是女性癌症相关死亡的第二大原因^[1]。转移是宫颈癌治疗面临的主要挑战,研究宫颈癌的转移机制和调控因素对于改善宫颈癌的治疗效果具有重要意义^[2]。肿瘤代谢能力的改变是肿瘤发生发展所必需的,近年来,鸟氨酸代谢重编程引起了抗肿瘤学者的广泛关注^[3-4]。最新研究^[5-6]表明,鸟氨酸代谢在肿瘤细胞中的活性较正常细胞明显增加,鸟氨酸代谢活性增加会引起多胺类物质大量聚集,从而促进肿瘤的转移,但鸟氨酸代谢和多胺在宫颈癌转移中的作用机制仍不明确。抑制素 β 亚基A反义RNA 1 (inhibin subunit beta A antisense RNA 1, INHBA-AS1)是一种新型的lncRNA分子,本课题组预试验结果发现INHBA-AS1在宫颈癌细胞和组织中呈高表达,且能够促进宫颈癌细胞的增殖、侵袭和转移。此外,INHBA-AS1还可促进多胺的形成,从而导致鸟氨酸代谢重编程,但其机制仍不清楚。硬脂酰辅酶A去饱和酶(stearoyl-CoA desaturase, SCD)是参与鸟氨酸循环代谢中的重要酶^[7],荧光素酶实验发现INHBA-AS1可促进SCD mRNA的转录,而JSPAR数据库证实SCD启动子区上存在转录因子c-Myc的结合位点,提示INHBA-AS1可能是通过c-Myc促进SCD mRNA的转录,从而影响鸟氨酸代谢重编程,最终促进宫颈癌的转移。本研究以宫颈癌细胞HeLa为研究对象,构建INHBA-AS1敲减和c-Myc过表达质粒,结合使用c-Myc和SCD的抑制剂,探讨INHBA-AS1对宫颈癌HeLa细胞鸟氨酸代谢途径的影响及其机制,为宫颈癌的治疗提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人宫颈癌细胞HeLa购自中国科学院上海细胞库,PluriSIn 1(SCD抑制剂,纯度99.64%)、10058-F4(c-Myc抑制剂,纯度99.77%)均购自MCE公司,DMEM培养基购自Hyclone公司,胎牛血清购自Gibco公司,Lipofectamine™2000购自Invitrogen公司,SYBR Master Mix购自KAPA Biosystems公司,反转录试剂盒购自TaKaRa公司,瑞氏-吉姆萨复合染

液、结晶紫、细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自Solarbio公司,凋亡检测试剂盒、Matrigel基质胶购自BD公司,PVDF转移膜购自Millipore公司,人鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)ELISA试剂盒、WB法所用兔抗c-Myc、SCD、N-cadherin、TGF- β 、E盒结合锌指蛋白1(zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1)、S-腺苷-甲硫氨酸脱羧酶(S-adenosine-methionine decarboxylase, SAMDC)、亚精胺/精胺N¹-乙酰转移酶(spermidine/spermine N¹-acetyltransferase, SSAT)、GAPDH一抗和HRP标记的山羊抗兔二抗均购自Bioswamp公司,过表达和敲减质粒由武汉华联科生物技术有限公司设计并制备。

1.2 细胞培养、转染与分组

HeLa细胞接种于含10%胎牛血清的DMEM培养基,37℃、5% CO₂的培养箱内培养。显微镜下观察细胞汇合度达到90%以上时,用0.25%胰酶消化细胞,1:2传代培养,取对数生长期的细胞进行实验。

利用Lipofectamine™2000将INHBA-AS1敲减质粒(3条)、c-Myc过表达质粒及其NC质粒转染至HeLa细胞。将细胞分组:对照组、NC组、sh-INHBA-AS1(1~3)组、PluriSIn 1组、NC+PluriSIn 1组、sh-INHBA-AS1+PluriSIn 1组、10058-F4组、NC+10058-F4组、sh-INHBA-AS1+10058-F4组、sh-INHBA-AS1+OE-c-Myc组。对照组不作处理,正常培养;PluriSIn 1组用20 μ mol/L(10 mg溶于234 μ L DMSO,制备成200 mmol/L的母液)的PluriSIn 1处理48 h^[8];10058-F4组用60 μ mol/L(10 mg溶于334 μ L DMSO,制备成120 mmol/L的母液)的10058-F4处理48 h^[9];NC组和sh-INHBA-AS1组分别转染相应质粒;其余组先分别用PluriSIn 1和10058-F4处理48 h,完成后再转染相应质粒。

1.3 平板克隆实验检测敲减INHBA-AS1对HeLa细胞增殖能力的影响

调整各组HeLa细胞悬液密度,接种于6孔板,每孔 2×10^3 个细胞,设置3个平行孔,使细胞均匀分散,置于培养箱中培养,观察到培养板中出现克隆时,终止培养,弃上清液,PBS洗涤2次,4%多聚甲醛4℃固定15 min,去固定液,加入瑞氏-吉姆萨复合染液染

色20 min,流水洗去染色液,干燥后将平皿倒置并拍照,计数并计算克隆形成率。克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.4 FCM检测敲减INHBA-AS1对HeLa细胞凋亡的影响

收集按照不同分组完成转染的细胞,培养基重悬细胞,弃上清,PBS洗涤重悬细胞,加入Annexin V-FITC和PI各10 μ L,混匀,4 $^{\circ}$ C避光处理30 min,加入PBS,行FCM检测。

1.5 Transwell小室实验检测敲减INHBA-AS1对HeLa细胞侵袭和迁移能力的影响

Transwell小室预铺基质胶检测细胞侵袭能力,不预铺基质胶检测细胞迁移能力。将HeLa细胞悬液接种至Transwell小室,加入(2×10^5 个细胞)细胞悬液,下层24孔板中加入含10%胎牛血清的培养液,置于培养箱中培养24 h。PBS洗涤,4%甲醛室温固定20 min,结晶紫染色,显微镜下观察并计数。

1.6 qPCR法检测敲减INHBA-AS1对HeLa细胞中INHBA-AS1、c-Myc、SCD和EMT相关基因表达的影响

提取各组转染后细胞中的总RNA,反转录合成cDNA,cDNA产物置于4 $^{\circ}$ C保存备用。将制备好的cDNA进行PCR扩增。采用SYBR Master Mix试剂盒进行qPCR,PCR参数:95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s,40个循环。以 β -actin为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达水平。

1.7 WB法检测敲减INHBA-AS1对HeLa细胞中c-Myc、SCD、EMT和多胺代谢相关蛋白表达的影响

使用裂解液充分裂解各组转染后细胞,取上清进行蛋白质定量,置于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。制备SDS-PAGE胶,每孔20 μ g蛋白,上样、电泳、转膜、脱脂奶粉封闭过夜,加入一抗(稀释比例为1:1 000~1:2 000),室温下处理2 h,洗膜后加入二抗(1:5 000),室温下处理1 h,洗膜后,ECL曝光显影。

1.8 ELISA检测敲减INHBA-AS1对HeLa细胞上清液中ODC含量的影响

收集各组转染后细胞,取细胞上清液,严格按照试剂盒说明书步骤操作,结束后以标准物光密度(D)值为横坐标,浓度为纵坐标,计算出标准曲线的二次回归方程式,将样品 D 值代入方程式,计算所得数据即为细胞上清液中ODC的实际浓度。

1.9 过表达c-Myc对HeLa细胞增殖、EMT进程和鸟氨酸代谢的影响

将HeLa细胞分成3组:NC组、sh-INHBA-AS1组、sh-INHBA-AS1+OE-c-Myc组,分别转染相应质粒。平板克隆实验检测敲减INHBA-AS1对HeLa细胞增殖能力的影响,WB法检测HeLa细胞中SCD和N-cadherin的表达,ELISA检测HeLa细胞上清液中ODC含量。

1.10 统计学处理

用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析。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,多组间两两比较采用LSD检验,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 敲减INHBA-AS1能进一步促进SCD及c-Myc抑制剂对HeLa细胞增殖的抑制和凋亡的促进作用

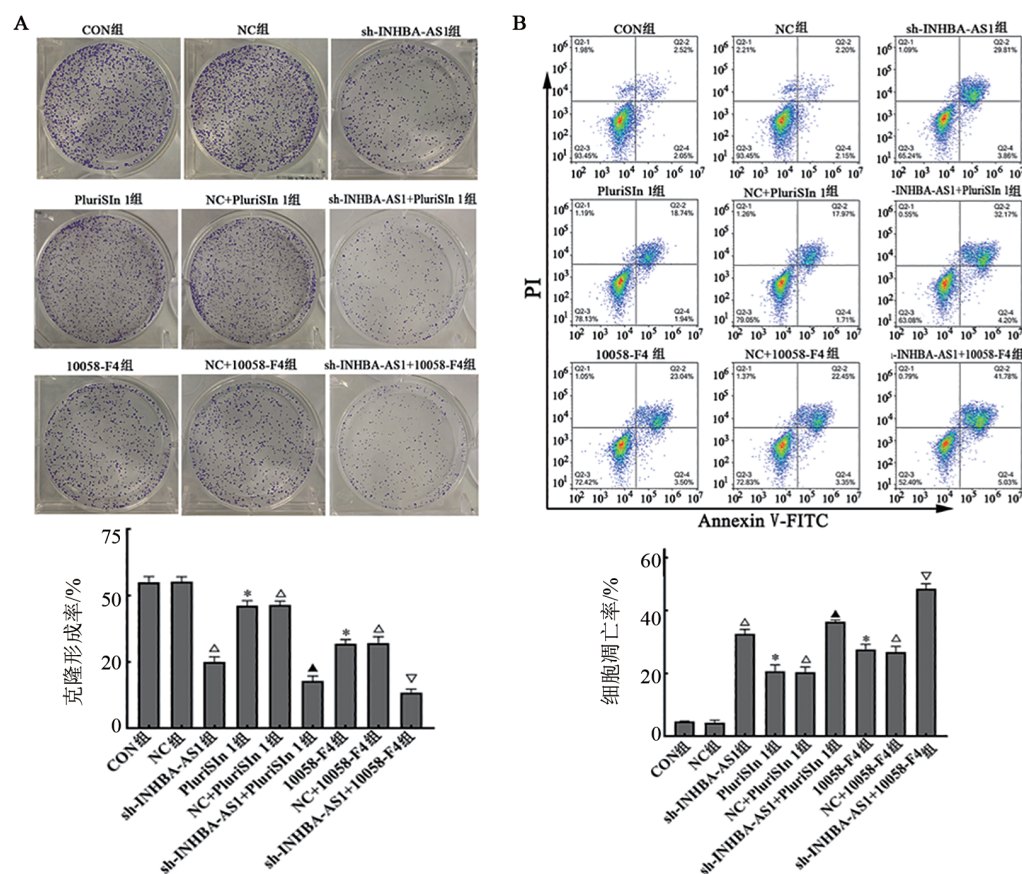
平板克隆实验结果如图1A所示,SCD抑制剂PluriSIn 1、c-Myc抑制剂10058-F4、敲减INHBA-AS1均能显著降低HeLa细胞的克隆形成率(均 $P<0.05$),促进HeLa细胞的凋亡(均 $P<0.05$);与NC+PluriSIn 1组和NC+10058-F4组相比,sh-INHBA-AS1+PluriSIn 1组、sh-INHBA-AS1+10058-F4组的克隆形成率进一步降低(均 $P<0.05$),细胞凋亡数进一步增加(均 $P<0.05$)。实验结果说明,c-Myc抑制剂、SCD抑制剂和敲减INHBA-AS1均可显著抑制HeLa细胞增殖而促进HeLa细胞凋亡,敲减INHBA-AS1能够进一步促进c-Myc抑制剂和SCD抑制剂对HeLa细胞增殖和凋亡的影响。

2.2 敲减INHBA-AS1可进一步增强SCD及c-Myc抑制剂对HeLa细胞侵袭、迁移能力的抑制

Transwell小室实验检测结果(图2)显示,PluriSIn 1、10058-F4、敲减INHBA-AS1均能显著抑制HeLa细胞的迁移、侵袭能力(均 $P<0.05$);与NC+PluriSIn 1组和NC+10058-F4组相比,sh-INHBA-AS1+PluriSIn 1组、sh-INHBA-AS1+10058-F4组细胞迁移、侵袭能力进一步降低(均 $P<0.05$)。实验结果说明,c-Myc抑制剂、SCD抑制剂和敲减INHBA-AS1均可显著抑制HeLa细胞的迁移、侵袭能力,敲减INHBA-AS1能够进一步促进c-Myc抑制剂和SCD抑制剂对HeLa细胞迁移、侵袭能力的作用。

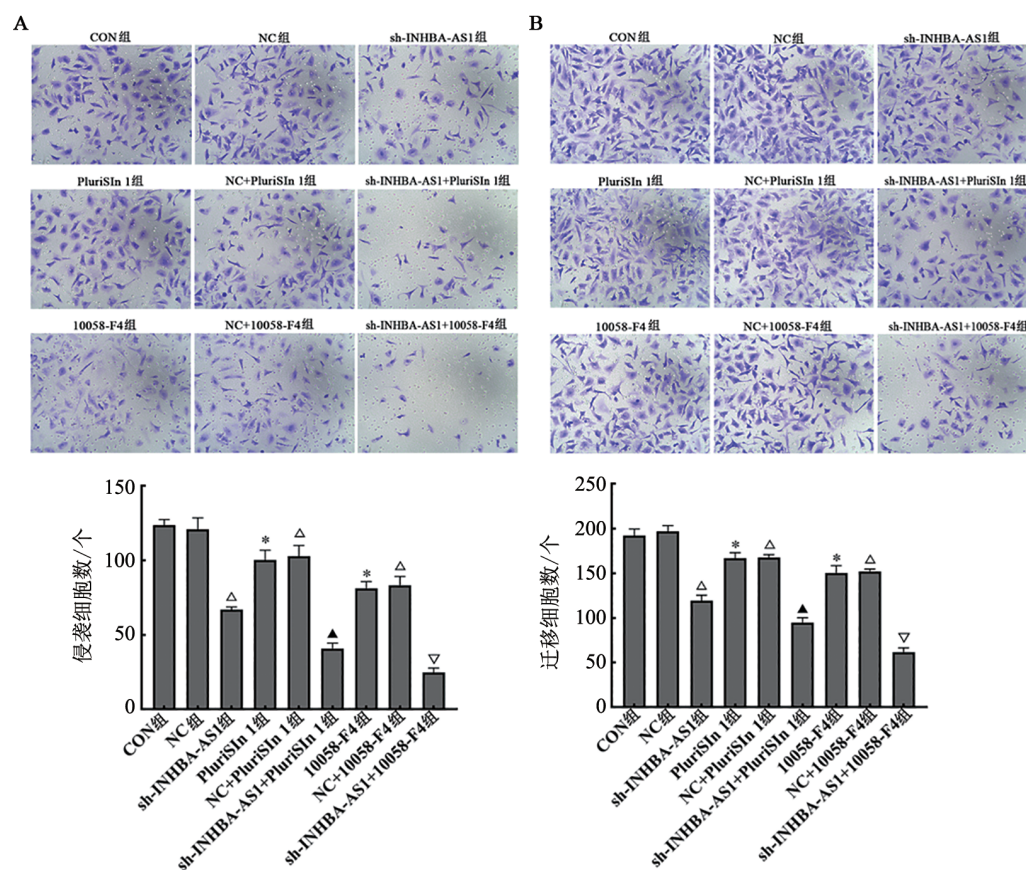
2.3 敲减INHBA-AS1可进一步增强对HeLa细胞中INHBA-AS1、c-Myc、SCD和EMT相关mRNA表达的抑制

qPCR法检测结果(图3)显示,PluriSIn 1、10058-F4、敲减INHBA-AS1均能显著抑制HeLa细胞中INHBA-AS1、c-Myc、SCD和EMT相关基因mRNA的表达(均 $P<0.05$);与NC+PluriSIn 1组和NC+10058-F4组相比,sh-INHBA-AS1+PluriSIn 1组、sh-INHBA-AS1+10058-F4组HeLa细胞中上述基因mRNA的表达进一步被抑制(均 $P<0.05$)。实验结果说明,c-Myc抑制剂、SCD抑制剂和敲减INHBA-AS1均可显著抑制HeLa细胞中INHBA-AS1、c-Myc、SCD和EMT相关基因mRNA的表达,敲减INHBA-AS1能够进一步促进c-Myc抑制剂和SCD抑制剂对HeLa细胞中上述基因表达的抑制作用。



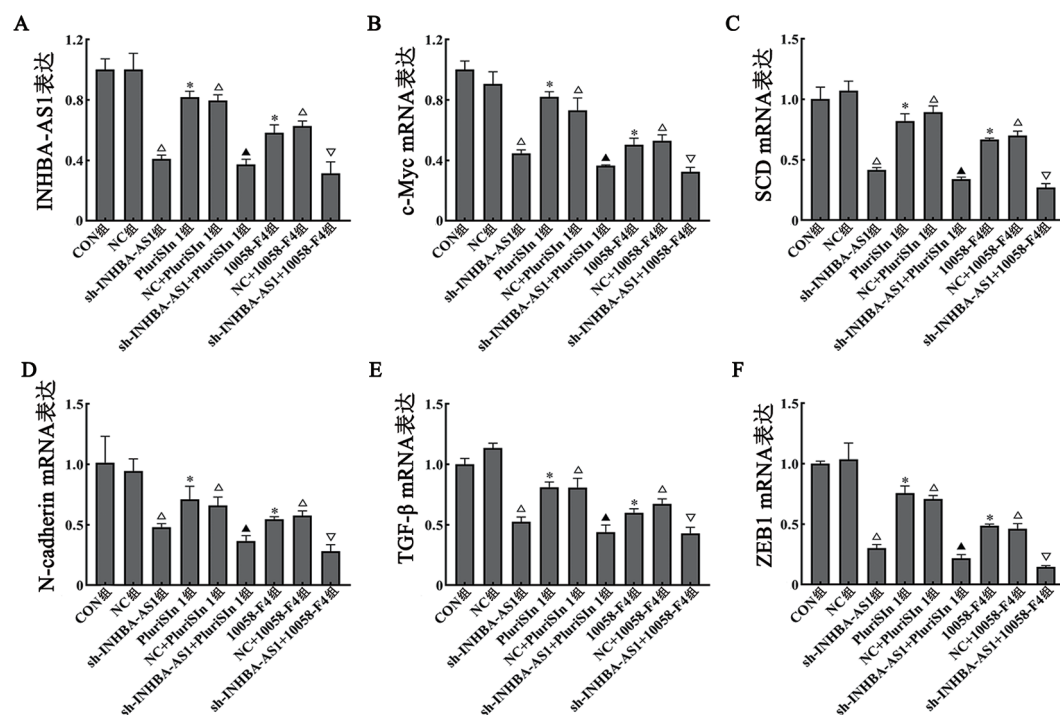
与CON组相比,* $P<0.05$;与NC组相比,[△] $P<0.05$;与NC+PluriSIn 1组相比,[▲] $P<0.05$;与NC+10058-F4组相比,[▽] $P<0.05$ 。

图1 各组转染后细胞克隆形成率(A)和细胞凋亡率(B)的比较



与CON组相比,* $P<0.05$;与NC组相比,[△] $P<0.05$;与NC+PluriSIn 1组相比,[▲] $P<0.05$;与NC+10058-F4组相比,[▽] $P<0.05$ 。

图2 各组转染后侵袭(A,×200)和迁移(B,×200)细胞数的比较



A~F: 各组 HeLa 细胞中 INHBA-AS1 (A)、c-Myc (B)、SCD (C)、N-cadherin (D)、TGF- β (E) 及 ZEB1 (F) mRNA 的表达。与 CON 组相比, * $P < 0.05$; 与 NC 组相比, $\Delta P < 0.05$; 与 NC+PluriSIn 1 组相比, $\blacktriangle P < 0.05$; 与 NC+10058-F4 组相比, $\nabla P < 0.05$ 。

图3 转染后各组 HeLa 细胞中 INHBA-AS1、c-Myc、SCD 和 EMT 相关基因 mRNA 表达水平的比较

2.4 敲减 INHBA-AS1 可进一步增强 SCD 及 c-Myc 抑制剂对 HeLa 细胞中 c-Myc、SCD、EMT 和多胺代谢相关蛋白表达的调控作用

WB 法检测结果 (图 4) 显示, PluriSIn 1、10058-F4、敲减 INHBA-AS1 均能显著抑制 HeLa 细胞中 c-Myc、SCD、N-cadherin、TGF- β 、ZEB1 和 SAMDC 蛋白的表达 (均 $P < 0.05$), 促进 SSAT 蛋白的表达 ($P < 0.05$); 与 NC+PluriSIn 1 组或 NC+10058-F4 组相比, sh-INHBA-AS1+PluriSIn 1 组、sh-INHBA-AS1+10058-F4 组 HeLa 细胞中上述 c-Myc、SCD、N-cadherin、TGF- β 、ZEB1 和 SAMDC 蛋白的表达进一步被抑制 (均 $P < 0.05$), SSAT 蛋白的表达进一步升高 ($P < 0.05$)。实验结果说明, c-Myc 抑制剂、SCD 抑制剂和敲减 INHBA-AS1 均可显著抑制 HeLa 细胞中 c-Myc、SCD、N-cadherin、TGF- β 、ZEB1 和 SAMDC 蛋白的表达, 促进 SSAT 蛋白的表达, 敲减 INHBA-AS1 能够进一步促进 c-Myc 抑制剂和 SCD 抑制剂对 HeLa 细胞中上述蛋白表达的作用。

2.5 敲减 INHBA-AS1 可进一步促进 SCD 及 c-Myc 抑制剂导致的 HeLa 细胞上清中 ODC 含量降低

ELISA 检测结果 (图 5) 显示, PluriSIn 1、10058-F4、敲减 INHBA-AS1 均能显著降低 HeLa 细胞上清液中 ODC 含量 (均 $P < 0.05$); 与 NC+PluriSIn 1 组或 NC+10058-F4 组相比, sh-INHBA-AS1+PluriSIn 1 组、sh-INHBA-AS1+10058-F4 组 HeLa 细胞上清液中 ODC 含量进一步降低 (均 $P < 0.05$)。实验结果说明, c-Myc

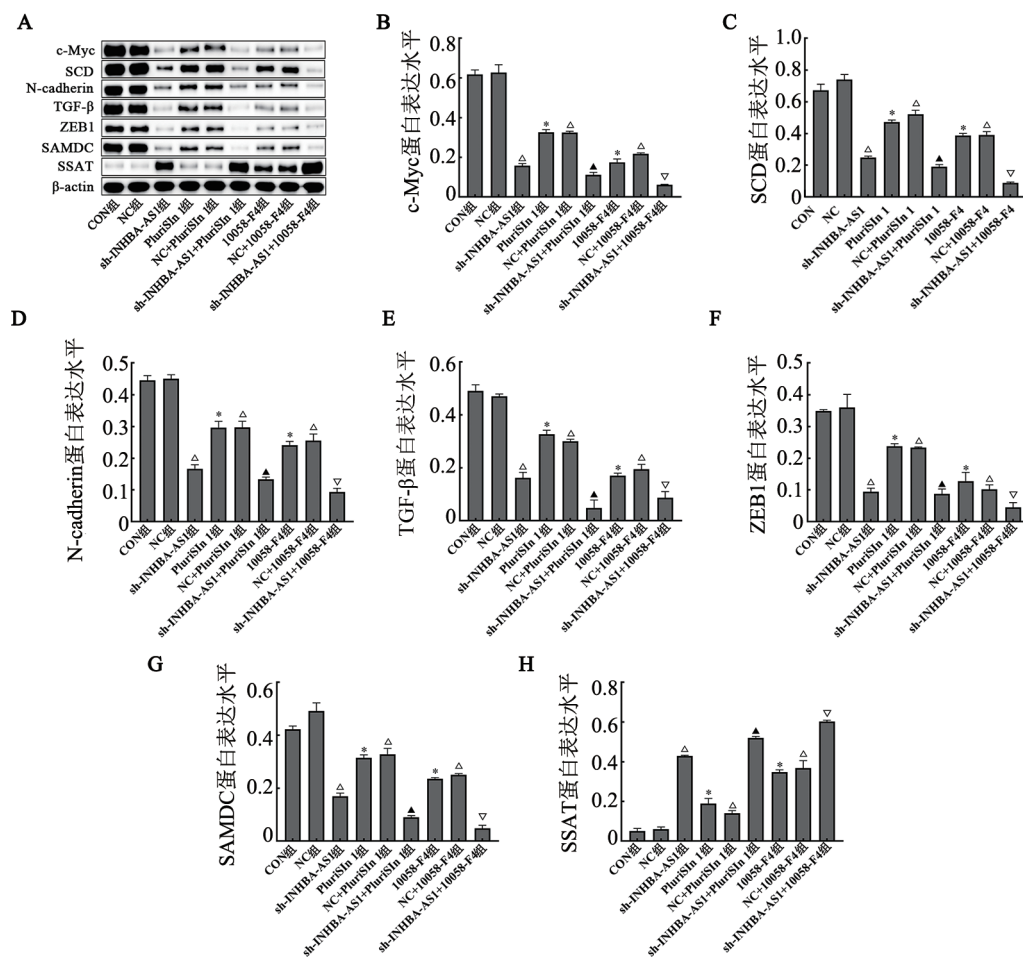
抑制剂、SCD 抑制剂和敲减 INHBA-AS1 均可显著降低 HeLa 细胞上清液中 ODC 含量, 敲减 INHBA-AS1 能够进一步促进 c-Myc 抑制剂和 SCD 抑制剂导致的 HeLa 细胞上清液中 ODC 含量降低。

2.6 敲减 INHBA-AS1 通过调控 c-Myc 抑制 SCD 来影响 HeLa 细胞增殖、EMT 过程和鸟氨酸代谢

细胞克隆形成实验、WB 法及 ELISA 检测结果 (图 6A) 显示, 与 NC 组比较, sh-INHBA-AS1 组 HeLa 细胞的克隆形成率、SCD 及 N-cadherin 蛋白表达水平、细胞上清液中 ODC 含量均显著降低 (均 $P < 0.05$); 与 sh-INHBA-AS1 组比较, sh-INHBA-AS1+OE-c-Myc 组 HeLa 细胞的克隆形成率、SCD 及 N-cadherin 蛋白表达水平、细胞上清液中 ODC 含量均显著升高 (均 $P < 0.05$)。实验结果说明, 敲减 INHBA-AS1 通过调控 c-Myc 抑制 SCD 的表达, 进而影响 HeLa 细胞的增殖、EMT 过程和鸟氨酸代谢。

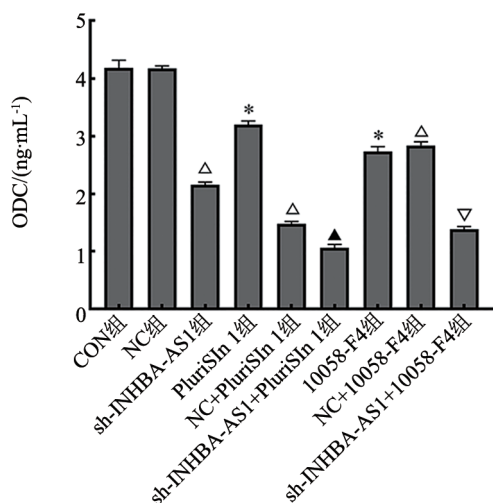
3 讨论

研究^[10-11]表明, INHBA-AS1 可促进口腔鳞状细胞癌和结直肠癌等多种肿瘤的发生发展, 但关于 INHBA-AS1 在宫颈癌中作用的研究较少。本研究结果显示, 敲减 INHBA-AS1 能够抑制宫颈癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 并促进凋亡, 这与前人研究结果一致, 提示 INHBA-AS1 对宫颈癌也具有促进作用, 但其机制仍需进一步研究。



A: 各组 HeLa 细胞蛋白样本中 c-Myc、SCD、EMT 和多胺代谢相关蛋白的条带; B~H: c-Myc(B)、SCD(C)、N-cadherin(D)、TGF-β(E)、ZEB1(F)、SAMDC(G)和 SSAT(H)的表达数据的统计。与 CON 组相比, * $P<0.05$; 与 NC 组相比, $\Delta P<0.05$; 与 NC+PluriSn 1 组相比, $\nabla P<0.05$ 。

图4 WB法检测各组转染后 HeLa 细胞中 c-Myc、SCD、EMT 和多胺代谢相关蛋白表达水平



与 CON 组相比, * $P<0.05$; 与 NC 组相比, $\Delta P<0.05$; 与 NC+PluriSn 1 组相比, $\nabla P<0.05$; 与 NC+10058-F4 组相比, $\nabla P<0.05$ 。

图5 各组转染后细胞上清中 ODC 含量的比较

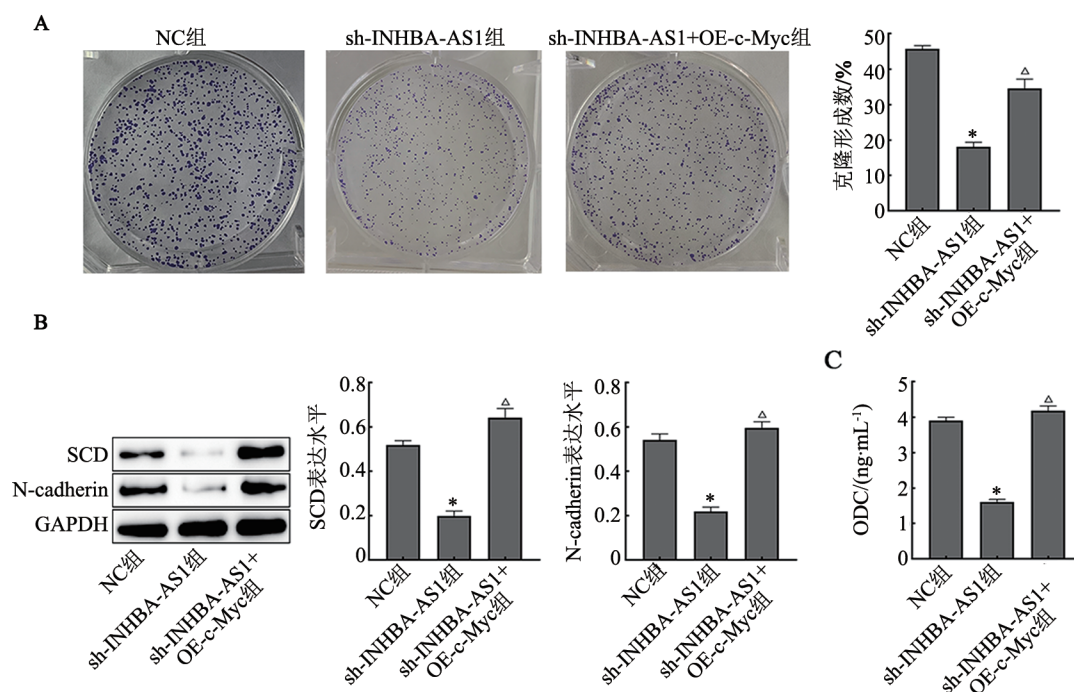
研究^[12-14]表明, SCD 在多种恶性肿瘤如肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、食管癌、膀胱癌和肝癌等中过表

达, 且与肿瘤的进展和转移密切相关, 但 SCD 促癌的确切机制目前尚不清楚。本研究结果显示, 敲减 INHBA-AS1 可下调 SCD 的表达, 表明 INHBA-AS1 能够调控 SCD 的表达。此外, 敲减 INHBA-AS1 可下调 c-Myc 和 SCD 的表达, c-Myc 抑制剂和 SCD 抑制剂处理也均能下调 INHBA-AS1、c-Myc 和 SCD 的表达; 与 c-Myc 抑制剂和 SCD 抑制剂单独处理相比, 联合敲减 INHBA-AS1 后宫颈癌细胞中 INHBA-AS1、c-Myc 和 SCD 的水平进一步降低; 而与敲减 INHBA-AS1 相比, 进一步过表达 c-Myc 能够促进 SCD 的表达。结果提示 INHBA-AS1 可通过 c-Myc 调控 SCD 的表达, INHBA-AS1-c-Myc-SCD 轴可能成为宫颈癌的治疗靶点。

远处转移是宫颈癌预后不良的主要因素。越来越多的证据^[15]表明, EMT 在宫颈癌转移中发挥关键作用。EMT 进程涉及多种因子如 E-cadherin、N-cadherin、TGF-β 和 ZEB1 等的变化^[16]。在肿瘤 EMT 进程中, N-cadherin 上调、E-cadherin 下调, ZEB1 能够与上皮标志物 E-cadherin 启动子结合, 从转录水平抑制

E-cadherin 的表达, 而 TGF- β 作为肿瘤促进因子可刺激肿瘤细胞发生 EMT^[17-18]。研究^[19]表明, SCD 能够通过上调食管癌细胞中的 TGF- β 信号通路诱导 EMT, 提示 SCD 可能通过促进 EMT 参与宫颈癌进展。因此, 本研究检测了 EMT 相关因子 N-cadherin、TGF- β 和 ZEB1 的表达, 结果显示, 敲减 INHBA-AS1 可明显抑制宫颈癌细胞中

EMT 相关因子的表达, 且与 c-Myc 和 SCD 抑制剂单独处理相比, 敲减 INHBA-AS1 会进一步抑制 EMT 相关因子的表达, 而与敲减 INHBA-AS1 相比, 进一步过表达 c-Myc 能够上调 N-cadherin 的表达, 提示 INHBA-AS1 可通过 c-Myc 调控 SCD 的表达进而参与调控宫颈癌细胞的 EMT 进程, 从而促进肿瘤的发展。



A: 平板克隆实验检测转染各组 HeLa 细胞增殖; B: WB 法检测转染各组 HeLa 细胞中 SCD 和 N-cadherin 蛋白的表达; C: ELISA 检测转染各组 HeLa 细胞上清液中 ODC 含量。与 NC 组比较, * $P < 0.05$; 与 sh-INHBA-AS1 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

图6 同时敲减 INHBA-AS1 和过表达 c-Myc 对 HeLa 细胞的增殖、EMT 相关蛋白和 ODC 蛋白表达的影响

近年来, 代谢重编程在肿瘤进展中的作用受到越来越多的关注, 其中鸟氨酸代谢对于肿瘤的生长具有重要作用^[20]。鸟氨酸代谢失调可引起腐胺、精胺和亚精胺等多胺的过量合成, 进而促进肿瘤的转移^[21]。多胺可促进 DNA 和 RNA 的合成, 参与细胞生长的调节, 多胺稳态对于维持体内细胞的生长至关重要^[22]。研究^[23]表明, 多胺代谢在肿瘤细胞中往往会出现异常, 多胺水平的升高会促进肿瘤的发生, 靶向多胺代谢过程中的关键酶将成为临床治疗肿瘤的潜在靶点。多胺合成途径涉及多个关键酶, 如 ODC、SAMDC 和 SSAT 等^[24]。其中 ODC 是多胺合成途径的第一个限速酶, 可催化鸟氨酸脱羧生成腐胺; SAMDC 是多胺合成途径的第二个限速酶, 可催化甲硫氨酸脱羧; SSAT 是多胺分解代谢过程中的限速酶^[25]。研究表明, 肿瘤细胞中 ODC 和 SAMDC 的活性较正常细胞明显升高^[26], 沉默 SAMDC 可抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭^[27], 这提示多胺合成途径异常参与肿瘤的发生发展。SCD 是参与鸟氨酸循环过程的酶, 为明确

INHBA-AS1/c-Myc/SCD 对宫颈癌细胞鸟氨酸代谢途径的影响, 本研究检测了 ODC 含量和 SAMDC、SSAT 蛋白表达水平, 结果显示, 敲减 INHBA-AS1 可降低 ODC 含量和 SAMDC 蛋白表达水平, 升高 SSAT 蛋白表达水平, 且与 c-Myc 抑制剂和 SCD 抑制剂单独处理相比, 联合干扰 INHBA-AS1 后 ODC 含量和 SAMDC 蛋白表达水平进一步降低, SSAT 蛋白表达水平进一步升高, 而与干扰 INHBA-AS1 相比, 进一步过表达 c-Myc 后 ODC 含量显著升高, 表明 INHBA-AS1 能够通过 c-Myc 调节 SCD 的表达, 参与宫颈癌的鸟氨酸代谢重编程, 即 INHBA-AS1-c-Myc-SCD 轴可通过调节鸟氨酸代谢途径, 促进多胺合成, 影响宫颈癌的发生和发展。

综上所述, INHBA-AS1 可通过 c-Myc 调控 SCD 的表达, 参与宫颈癌细胞鸟氨酸代谢重编程和 EMT 进程, 促进宫颈癌细胞的增殖, 侵袭和迁移, INHBA-AS1/c-Myc/SCD 通路可能成为宫颈癌的治疗靶点, 对改善宫颈癌的疗效具有重要意义。

[参考文献]

- [1] LI Q, ZHOU Z W, DUAN W, *et al.* Inhibiting the redox function of APE1 suppresses cervical cancer metastasis *via* disengagement of ZEB1 from E-cadherin in EMT[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 220[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34210327/>. DOI: 10.1186/s13046-021-02006-5.
- [2] JOHNSON C A, JAMES D, MARZAN A, *et al.* Cervical cancer: an overview of pathophysiology and management[J]. *Semin Oncol Nurs*, 2019, 35(2): 166-174. DOI: 10.1016/j.soncn.2019.02.003.
- [3] MARTÍNEZ-REYES I, CHANDEL N S. Cancer metabolism: looking forward[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(10): 669-680. DOI: 10.1038/s41568-021-00378-6.
- [4] CHEN X, CHEN S W, YU D S. Metabolic reprogramming of chemoresistant cancer cells and the potential significance of metabolic regulation in the reversal of cancer chemoresistance[J/OL]. *Metabolites*, 2020, 10(7): 289[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7408410/>. DOI: 10.3390/metabo10070289.
- [5] HAN W, SHI J, CAO J, *et al.* Emerging roles and therapeutic interventions of aerobic glycolysis in glioma[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 6937-6955. DOI: 10.2147/ott.s260376.
- [6] HUANG Y, PLEDGIE A, CASERO R A Jr, *et al.* Molecular mechanisms of polyamine analogs in cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2005, 16(3): 229-241. DOI: 10.1097/00001813-200503000-00002.
- [7] KIKUCHI K, TSUKAMOTO H. Stearoyl-CoA desaturase and tumorigenesis[J/OL]. *Chem Biol Interact*, 2020, 316: 108917[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6952240/>. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.108917.
- [8] CHO S M, PARK J S, MIN B, *et al.* Rapid generation of secondary fibroblasts through teratoma formation[J]. *BioTechniques*, 2015, 59(1): 34-41. DOI: 10.2144/000114309.
- [9] YOON J W, GALLANT M, LAMM M L G, *et al.* Noncanonical regulation of the Hedgehog mediator GLI1 by c-MYC in Burkitt lymphoma[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(6): 604-615. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0441.
- [10] MA W Q, CHEN J, FANG W, *et al.* LncRNA INHBA-AS1 promotes cell growth, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma by sponging miR-143-3p[J/OL]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(18): 9240[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33015761/>. DOI: 10.26355/eurev_202009_23000.
- [11] LIN H, HONG Y G, ZHOU J D, *et al.* LncRNA INHBA-AS1 promotes colorectal cancer cell proliferation by sponging miR-422a to increase AKT1 axis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(19): 9940-9948. DOI: 10.26355/eurev_202010_23206.
- [12] ASCENZI F, DE VITIS C, MAUGERI-SACCÀ M, *et al.* SCD1, autophagy and cancer: implications for therapy[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 265[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC8383407/>. DOI: 10.1186/s13046-021-02067-6.
- [13] TESFAY L, PAUL B T, KONSTORUM A, *et al.* Stearoyl-CoA desaturase 1 protects ovarian cancer cells from ferroptotic cell death[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(20): 5355-5366. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0369.
- [14] PICCININ E, CARIELLO M, MOSCHETTA A. Lipid metabolism in colon cancer: role of Liver X Receptor (LXR) and Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1)[J/OL]. *Mol Aspects Med*, 2021, 78: 100933[2023-02-10]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2020.100933>. DOI: 10.1016/j.mam.2020.100933.
- [15] XU Y C, PAN S Y, CHEN H, *et al.* MEX3A suppresses proliferation and EMT *via* inhibiting Akt signaling pathway in cervical cancer[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(4): 1446-1462[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33948367/>.
- [16] SHENG W W, SHI X Y, LIN Y H, *et al.* Musashi2 promotes EGF-induced EMT in pancreatic cancer *via* ZEB1-ERK/MAPK signaling[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 16[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6967093/>. DOI: 10.1186/s13046-020-1521-4.
- [17] FELDKER N, FERRAZZI F, SCHUHWERK H, *et al.* Genome-wide cooperation of EMT transcription factor ZEB1 with YAP and AP-1 in breast cancer[J/OL]. *EMBO J*, 2020, 39(17): e103209[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32692442/>. DOI: 10.15252/embj.2019103209.
- [18] HAO Y, BAKER D, TEN DIJKE P. TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2767[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31195692/>. DOI: 10.3390/ijms20112767.
- [19] HESTERBERG R S, CLEVELAND J L, EPLING-BURNETTE P K. Role of polyamines in immune cell functions[J/OL]. *Med Sci (Basel)*, 2018, 6(1): 22[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29517999/>. DOI: 10.3390/medsci6010022.
- [20] SIVASHANMUGAM M, JAIDEV J, UMASHANKAR V, *et al.* Ornithine and its role in metabolic diseases: an appraisal[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 86: 185-194. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.12.024.
- [21] ZHANG T, HU L, TANG J F, *et al.* Metformin inhibits the urea cycle and reduces putrescine generation in colorectal cancer cell lines[J/OL]. *Molecules*, 2021, 26(7): 1990[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33915902/>. DOI: 10.3390/molecules26071990.
- [22] NOVITA SARI I, SETIAWAN T, SEOCK KIM K, *et al.* Metabolism and function of polyamines in cancer progression[J]. *Cancer Lett*, 2021, 519: 91-104. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.06.020.
- [23] LI L, MAO Y X, ZHAO L N, *et al.* p53 regulation of ammonia metabolism through urea cycle controls polyamine biosynthesis[J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 253-256. DOI: 10.1038/s41586-019-0996-7.
- [24] DAI F J, YU W B, SONG J, *et al.* Extracellular polyamines-induced proliferation and migration of cancer cells by ODC, SSAT, and Akt1-mediated pathway[J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(4): 457-464. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000465.
- [25] MURRAY-STEWART T, DUNWORTH M, LUI Y, *et al.* Curcumin mediates polyamine metabolism and sensitizes gastrointestinal cancer cells to antitumor polyamine-targeted therapies[J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202677[2023-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6107220/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0202677.
- [26] CASERO R A, MURRAY STEWART T, PEGG A E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(11): 681-695. DOI: 10.1038/s41568-018-0050-3.
- [27] 辛佳璇, 陈世敏, 王伟, 等. S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因沉默抑制乳腺癌MCF-7细胞生长的研究[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2009, 47(12): 66-69, 73. DOI: 1671-7554(2009)12-0066-04.

[收稿日期] 2023-04-07

[修回日期] 2023-05-22

[本文编辑] 向正华, 沈志超