

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202625301

· 头颈肿瘤专栏 ·

LncRNA DSCAM-AS1 通过 miR-431-5p/EFNA1 调控 头颈部鳞状细胞癌细胞增殖、侵袭和凋亡

肖隆盛^{1,2}, 张剑喜³, 杜晓东^{1,2}

(1. 江南大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 江苏 无锡 214000; 2. 江南大学医学院, 江苏 无锡 214000; 3. 南昌大学, 江西 南昌 330000)

摘要: **目的** 探讨长链非编码 RNA (LncRNA) 唐氏综合征细胞黏附分子反义 1 (DSCAM-AS1) 通过调控微小 RNA-431-5p (miR-431-5p)/肝配蛋白 A1 (EFNA1) 轴对头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 细胞增殖、侵袭及凋亡的影响。**方法** 采用 qRT-PCR 检测江南大学附属医院 47 例 HNSCC 患者 (2024 年 1 月—2024 年 12 月) 癌组织及癌旁组织中 LncRNA DSCAM-AS1、miR-431-5p、EFNA1 mRNA 的表达水平。将 SCC1 和 FaDu 细胞分为 Ctrl 组、sh-NC 组、sh-DSCAM-AS1 组、sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组、sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组, qRT-PCR 检测各组细胞中 mRNA 表达; MTT 法检测细胞增殖; Transwell 实验检测细胞迁移与侵袭; 流式细胞术分析细胞凋亡; Western blot 检测细胞中蛋白表达; 双荧光素酶报告基因实验验证 LncRNA DSCAM-AS1 与 miR-431-5p、miR-431-5p 与 EFNA1 的靶向结合。**结果** HNSCC 组织中 LncRNA DSCAM-AS1 和 EFNA1 mRNA 表达显著升高, miR-431-5p 表达显著降低 ($P<0.001$)。sh-DSCAM-AS1 组 SCC1、FaDu 细胞中 A_{570} 值、迁移数、侵袭数、LncRNA DSCAM-AS1、EFNA1 mRNA 和蛋白、PCNA 表达低于 sh-NC 组、Ctrl 组, 凋亡率、miR-431-5p 表达高于 sh-NC 组、Ctrl 组 ($P<0.001$); sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组 SCC1、FaDu 细胞中 A_{570} 值、迁移数、侵袭数、EFNA1 mRNA 和蛋白、PCNA 表达高于 sh-DSCAM-AS1 组、sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组, 凋亡率、miR-431-5p 表达低于 sh-DSCAM-AS1 组、sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组 ($P<0.001$)。**结论** LncRNA DSCAM-AS1 可能通过靶向 miR-431-5p/EFNA1 促进 HNSCC 细胞增殖与侵袭, 并抑制细胞凋亡。

关键词: 头颈部鳞状细胞癌; 长链非编码 RNA; 唐氏综合征细胞黏附分子反义 1; 微小 RNA-431-5p; 肝配蛋白 A1; 增殖; 侵袭; 凋亡

中图分类号: R739.91

The effects of LncRNA DSCAM-AS1 on proliferation, apoptosis, and invasion of head and neck squamous cell carcinoma cells through miR-431-5p/EFNA1

XIAO Longsheng^{1,2}, ZHANG Jianxi³, DU Xiaodong^{1,2}

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214000, China; 2. School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214000, China; 3. Nanchang University, Nanchang 330000, China)

Abstract: **Objective** To discuss the effects of long non-coding RNA (LncRNA) Down syndrome cell adhesion molecule-antisense 1 (DSCAM-AS1) on the proliferation, invasion, and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells through microRNA-431-5p (miR-431-5p)/ephrin A1 (EFNA1). **Methods** The expression levels of LncRNA DSCAM-AS1, miR-431-5p, and EFNA1 mRNA in cancer tissues and adjacent tissues of 47 HNSCC patients from January 2024 to December 2024 in the Affiliated Hospital of Jiangnan University were detected by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). SCC1 and FaDu cells were assigned into Ctrl group, sh-NC group, sh-DSCAM-AS1 group, sh-DSCAM-AS1+anti-NC group, and sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p group. The mRNA expression in each group of cells was detected by qRT-PCR; cell proliferation was detected by MTT assay; cell migration and invasion were detected by Transwell assay; cell apoptosis was analyzed by flow cytometry; protein

expression in cells was detected by Western blot; dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the targeted binding of LncRNA DSCAM-AS1 to miR-431-5p and miR-431-5p to EFNA1. **Results** The expressions of LncRNA DSCAM-AS1 and EFNA1 mRNA in HNSCC tissues were significantly increased, while the expression of miR-431-5p was significantly decreased ($P<0.001$). The A570 value, migration number, invasion number, LncRNA DSCAM-AS1, EFNA1 mRNA and protein, and PCNA expression in SCC1 and FaDu cells of the sh-DSCAM-AS1 group were lower than those of the sh-NC group and Ctrl group, while the apoptosis rate and miR-431-5p expression were higher than those of the sh-NC group and Ctrl group ($P<0.001$); the A570 value, migration number, invasion number, EFNA1 mRNA and protein, and PCNA expression in SCC1 and FaDu cells of the sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p group were higher than those of the sh-DSCAM-AS1 group and sh-DSCAM-AS1+anti-NC group, while the apoptosis rate and miR-431-5p expression were lower than those of the sh-DSCAM-AS1 group and sh-DSCAM-AS1+anti-NC group ($P<0.001$). **Conclusions** LncRNA DSCAM-AS1 may promote the proliferation and invasion of HNSCC cells, and inhibit cell apoptosis by targeting miR-431-5p/EFNA1.

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma; Long non-coding RNA; Down syndrome cell adhesion molecule-antisense 1; MicroRNA-431-5p; Ephrin A1; Proliferation; Invasion; Apoptosis

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)是一种常见的恶性肿瘤,起源于口腔、咽部和喉部等头颈部上皮组织。主要是由于暴露于环境致癌物或人乳头状瘤病毒引起,每年有超过 80 万例发病率和超过 35 万例死亡^[1]。尽管 HNSCC 有多种治疗选择,包括手术、化疗、放疗、免疫治疗等,但 HNSCC 的预后仍然很差,5 年生存率为 40%~50%^[2]。这种高死亡率主要归因于晚期诊断、缺乏有效的预防性筛查、高转移率以及对治疗的耐药性等^[3]。然而,HNSCC 的发生和调节机制尚不明确,阐明其分子机制,寻找合适的分子靶点对于预防和治疗 HNSCC 至关重要。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是一类保守性较差的内源性 RNA,可以控制染色质修饰、染色体环、DNA 转录来发挥作用,越来越多的研究报道 LncRNA 可以通过调节 HNSCC 的增殖、转移及化疗耐药,进而调控 HNSCC 的疾病进展^[4]。唐氏综合征细胞黏附分子反义 1(Down syndrome cell adhesion molecule-antisense 1, DSCAM-AS1)位于 21q22.2 上,属于细胞黏附分子免疫球蛋白超家族,相关研究显示 LncRNA DSCAM-AS1 在非小细胞肺癌、肝细胞癌、结肠癌等多种癌症中高表达^[5]。微小 RNA(miRNA)可调节细胞生理学的各个方面,据报道 miRNA 在调控 HNSCC 细胞的生物学行为方面发挥重要作用^[6]。相关研究显示,miR-431-5p 在口腔癌、甲状腺癌、宫颈癌等多种癌症中低表达^[7]。肝配蛋白 A1(ephrin A1, EFNA1)是位于细胞表面的一类膜蛋白,已被证明可促进多种癌症的增殖和侵袭,包括宫颈癌、卵巢癌及胃食道癌等^[8]。此外,相关研究显示 LncRNA DSCAM-AS1 可能靶向 miR-431-5p 参与肝癌细胞的恶性进展^[9]。本研究前期

通过生物信息学预测发现,LncRNA DSCAM-AS1 与 miR-431-5p 以及 miR-431-5p 与 EFNA1 之间存在潜在的结合位点。据此推测 LncRNA DSCAM-AS1 可能靶向 miR-431-5p/EFNA1 调控 HNSCC 的恶性生物学行为,本研究据此进行探讨,报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本收集

2024 年 1 月—2024 年 12 月在江南大学附属医院采集 HNSCC 患者(病理学结果证实)癌组织和癌旁组织各 47 例,手术切除后,组织进行快速液氮冷冻,并在-80℃保存。本研究经本院伦理委员会批准(LS202401-23),所有患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

口腔鳞癌细胞 SCC1(货号:FH1342,上海富衡公司);下咽癌 FaDu 细胞(货号:SHC1162H,南京赛泓瑞生物公司);anti-miR-431-5p(货号:CIM0214,广州威佳公司);miR-431-5p mimic(货号:HY-R00997,Med Chem Express LLC);MTT 细胞增殖试剂盒(货号:YZ-S0606Q,上海远慕公司);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(货号:500D,武汉青木公司);实时定量逆转录聚合酶链反应(Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)(货号:F-430,北京美科美生公司);GAPDH、PCNA、EFNA1、HRP(货号:ab128915、ab265609、ab124911、ab7090,英国 Abcam 公司);qRT-PCR 仪(型号:Pangaea Super 8,苏州艾普拜公司);流式细胞仪(型号:Guava[®] easyCyte[™], Cytex Biosciences)。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR 法检测 HNSCC 组织中 mRNA 表达 用 TRIzol 试剂从组织分离总 RNA,用标准分光光度法测定其纯度,将 1 μ g 反转录为 cDNA,程序如下:94℃、5 min,94℃、10 s,56℃、30 s,72℃、30 s 共 35 个循环进行 qRT-PCR。据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 mRNA 表达,引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
LncRNA DSCAM-AS1	CCAGGAACCAATC-CTTACTC	CCCTAGGGATGTGAC-CGAAGGA
miR-431-5p	GCCGAGTGTCTTG-CAGGCCGT	CAGTGGCTGTCGTG-GAGT
EFNA1	CTACTACATCTC-CAAACCCATCC	CTGGGTCATCTGCTG-CAAGTC
U6	AGCGGGAAATCGT-GCGTGACA	GTGGACTFGGGAGAG-GACTGG
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCG-GAGTCA	AATGAAGGGGTCATT-GATGG

注:LncRNA(长链非编码 RNA);DSCAM-AS1(唐氏综合征细胞黏附分子反义 1);miR(微小 RNA);EFNA1(肝配蛋白 A1)。下同。

1.3.2 细胞分组 以 HNSCC 细胞系 SCC1、FaDu 为研究对象,构建 sh-NC、sh-DSCAM-AS1、sh-DSCAM-AS1 + anti-NC、sh-DSCAM-AS1 + anti-miR-431-5p 质粒,采用 Lipofectamine 3000 将上述质粒分别转染至融合度约为 60% 的 SCC1 和 FaDu 细胞中。转染后将细胞分为以下 4 组:sh-NC 组、sh-DSCAM-AS1 组、sh-DSCAM-AS1 + anti-NC 组、sh-DSCAM-AS1 + anti-miR-431-5p 组;另设未处理的正常培养细胞作为对照组(Ctrl 组)。采用 1.3.1 所述方法测定各 SCC1 和 FaDu 细胞中 mRNA 表达水平。

1.3.3 MTT 实验检测 SCC1、FaDu 细胞增殖 将转染后的细胞以每孔 100 μ L(含 5×10^3 个细胞)接种于 96 孔板中,37℃ 加 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后,加入 20 μ L MTT 溶液孵育 4 h,利用酶标仪测定 570 nm 处的光密度(A₅₇₀)。

1.3.4 Transwell 实验检测 SCC1、FaDu 细胞的迁移和侵袭 将不含 FBS 的细胞以 1×10^5 个/孔的密度重悬于无血清培养基中接种于上室,下室加入含 10% FBS 的培养基培养 24 h 后,下室细胞用 0.1% 结晶紫溶液染色 20 min,在显微镜下对染色的细胞进行观察并计数。上室预涂有 Matrigel 基质凝胶,用于检测细胞侵袭。

1.3.5 流式细胞仪检测 SCC1、FaDu 细胞的凋亡 将细胞(1×10^5 个/孔)接种到 6 孔板中,采用 Annexin

V-FITC/PI 双染后,在避光条件下孵育 15 min,随后用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.6 Western blot 检测 SCC1、FaDu 细胞中蛋白表达 用 RIPA 缓冲液从培养细胞中提取总蛋白,在 10% SDS-PAGE 中分离,随后转至 0.22 μ m PVDF 膜上,加入 GAPDH(1:10 000)、PCNA(1:1 000)、EFNA1(1:1 000)一抗孵育过夜,用二抗(1:2 000)孵育 1 h,使用 ECL 试剂盒进行可视化,并通过凝胶成像系统进行定量。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验 通过 ENCORI 预测 miR-431-5p 分别于 LncRNA DSCAM-AS1 和 EFNA1 的 3'-UTR 上的结合位点,合成含有预测结合位点(Wt)和突变位点(Mut)的 LncRNA DSCAM-AS1、EFNA1 片段,将其插入 pGL3 启动子载体中,用 Lipofectamine 3000 将上述载体和 miR-431-5p mimic 和 mimic NC 共转染 SCC1、FaDu 细胞中孵育 48 h,在裂解液中加入荧光素酶测定试剂,用酶标仪检测荧光素酶的强度。

1.4 统计学分析

数据用 SPSS 25.0 分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用独立样本 *t* 检验;多组比较采用单因素方差分析,两两比较行 SNK-*q* 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HNSCC 组织中 mRNA 表达

HNSCC 组织中 LncRNA DSCAM-AS1 和 EFNA1 mRNA 表达显著升高,而 miR-431-5p 表达显著降低,与癌旁组织比较差异具有统计学意义(*P* < 0.001)。具体结果见表 2。

表 2 mRNA 在不同组织中的表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 47$)

组织	LncRNA DSCAM-AS1	miR-431-5p	EFNA1
癌旁组织	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.14
HNSCC 组织	2.49 ± 0.28	0.29 ± 0.08	1.93 ± 0.21
<i>t</i>	33.089	45.790	25.262
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:HNSCC(头颈部鳞状细胞癌)。下同。

2.2 LncRNA DSCAM-AS1 敲低对 SCC1、FaDu 细胞中 mRNA 表达的影响

sh-DSCAM-AS1 组中,SCC1 和 FaDu 细胞的 LncRNA DSCAM-AS1 表达水平显著低于 Ctrl 组(*q* = 11.286、26.466, *P* 均 < 0.001)和 sh-NC 组(*q* = 11.457、28.427, *P* 均 < 0.001)。EFNA1 mRNA 表达

也显著降低,相较于 Ctrl 组($q=7.669, 12.669, P$ 均 <0.001)和 sh-NC 组($q=8.518, 11.965, P$ 均 <0.001)。相反,miR-431-5p 表达显著升高,与 Ctrl 组($q=12.326, 19.016, P$ 均 <0.001)及 sh-NC 组($q=12.537, 18.842, P$ 均 <0.001)相比差异具有统计学意义。在 sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组中,EFNA1 mRNA 表达较 sh-DSCAM-AS1 组($q=5.897, 10.205, P$ 均 <0.001)和 sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组($q=6.225, 9.150, P$ 均 <0.001)显著上调;而 miR-431-5p 表达则显著下调,与 sh-DSCAM-AS1 组($q=8.639, 13.459, P$ 均 <0.001)及 sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组($q=8.217, 13.893, P$ 均 <0.001)相比差异具有统计学意义。具体数据见表 3。

2.3 LncRNA DSCAM-AS1 敲低对 SCC1、FaDu 细胞增殖的影响

与 Ctrl 组和 sh-NC 组比较,sh-DSCAM-AS1 组 SCC1 和 FaDu 细胞中 A_{570} 值显著降低($q=11.082$ vs. 8.721 和 10.718 vs. $8.573, P$ 均 <0.001),sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组 SCC1、FaDu 细胞中 A_{570} 值(sh-DSCAM-AS1; $q=8.720, 7.539, P$ 均 <0.001 ; sh-DSCAM-AS1+anti-NC; $q=8.357, 6.947, P$ 均 <0.001)高于 sh-DSCAM-AS1 组、sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组($P<0.001$)。提示抑制 miR-431-5p 可部分逆转 DSCAM-AS1 敲低引起的增殖抑制效应。具体数据见表 4。

2.4 LncRNA DSCAM-AS1 敲低对 SCC1、FaDu 细胞迁移和侵袭的影响

sh-DSCAM-AS1 组 SCC1、FaDu 细胞迁移数(Ctrl; $q=10.814, 12.402, P$ 均 <0.001 ; sh-NC; $q=11.159, 12.234, P$ 均 <0.001)、侵袭数(Ctrl; $q=13.744, 11.879, P$ 均 <0.001 ; sh-NC; $q=14.035, 11.537, P$ 均 <0.001)低于 sh-NC 组、Ctrl 组($P<0.001$); sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组 SCC1、FaDu 细胞迁移数(sh-DSCAM-AS1; $q=8.089, 9.667, P$ 均 <0.001 ; sh-DSCAM-AS1+anti-NC; $q=8.191, 9.985, P$ 均 <0.001)、侵袭数(sh-DSCAM-AS1; $q=11.093, 9.047, P$ 均 <0.001 ; sh-DSCAM-AS1+anti-NC; $q=11.157, 9.427, P$ 均 <0.001)高于 sh-DSCAM-AS1 组、sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组($P<0.001$)。见图 1、表 5。

2.5 LncRNA DSCAM-AS1 敲低对 SCC1、FaDu 细胞凋亡的影响

sh-DSCAM-AS1 组 SCC1、FaDu 细胞凋亡率(Ctrl; $q=30.143, 31.298, P$ 均 <0.001 ; sh-NC; $q=30.216, 31.336, P$ 均 <0.001)高于 sh-NC 组、Ctrl 组; sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组 SCC1、FaDu 细胞凋亡率(sh-DSCAM-AS1; $q=19.642, 19.869, P$ 均 <0.01 ; sh-DSCAM-AS1+anti-NC; $q=19.110, 19.318, P$ 均 <0.001)低于 sh-DSCAM-AS1 组、sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组($P<0.001$)。见图 2、表 6。

表 3 各组 SCC1、FaDu 细胞中 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	SCC1			FaDu		
	LncRNA DSCAM-AS1	miR-431-5p	EFNA1 mRNA	LncRNA DSCAM-AS1	miR-431-5p	EFNA1 mRNA
Ctrl 组	1.00 $\pm$ 0.20	1.00 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.18	1.00 $\pm$ 0.16
sh-NC 组	1.01 $\pm$ 0.18	0.98 $\pm$ 0.19	1.05 $\pm$ 0.18	1.06 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.17	0.96 $\pm$ 0.18
sh-DSCAM-AS1 组	0.34 $\pm$ 0.11 ^{ab}	2.17 $\pm$ 0.27 ^{ab}	0.53 $\pm$ 0.13 ^{ab}	0.19 $\pm$ 0.06 ^{ab}	3.19 $\pm$ 0.34 ^{ab}	0.28 $\pm$ 0.08 ^{ab}
sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组	0.29 $\pm$ 0.09	2.13 $\pm$ 0.26	0.51 $\pm$ 0.12	0.20 $\pm$ 0.06	3.24 $\pm$ 0.37	0.34 $\pm$ 0.10
sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组	0.32 $\pm$ 0.10	1.35 $\pm$ 0.24 ^{cd}	0.89 $\pm$ 0.15 ^{cd}	0.22 $\pm$ 0.08	1.64 $\pm$ 0.29 ^{cd}	0.86 $\pm$ 0.15 ^{cd}
<i>F</i>	41.658	38.438	17.946	219.48	95.038	37.808
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a 与 Ctrl 组相比,^b 与 sh-NC 组相比,^c 与 sh-DSCAM-AS1 组相比,^d 与 sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组相比, $P<0.001$ 。下同。

表 4 各组 SCC1、FaDu 细胞中 A_{570} 值比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	A_{570} 值	
	SCC1	FaDu
Ctrl 组	0.87 $\pm$ 0.17	0.96 $\pm$ 0.20
sh-NC 组	0.85 $\pm$ 0.17	0.95 $\pm$ 0.19
sh-DSCAM-AS1 组	0.26 $\pm$ 0.09 ^{ab}	0.37 $\pm$ 0.12 ^{ab}
sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组	0.28 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.12
sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组	0.74 $\pm$ 0.13 ^{cd}	0.88 $\pm$ 0.18 ^{cd}
<i>F</i>	30.776	19.366
<i>P</i>	<0.001	<0.001

2.6 LncRNA DSCAM-AS1 敲低对 SCC1、FaDu 细胞中蛋白表达的影响

sh-DSCAM-AS1 组 SCC1、FaDu 细胞 PCNA (Ctrl; $q=7.004, 7.673, P$ 均 <0.001 ; sh-NC; $q=6.855, 7.388, P$ 均 <0.001)、EFNA1 (Ctrl; $q=8.064, 7.092, P$ 均 <0.001 ; sh-NC; $q=7.634, 6.427, P$ 均 <0.001)蛋白表达低于 sh-NC 组、Ctrl 组; sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组 PCNA (sh-DSCAM-AS1; $q=$

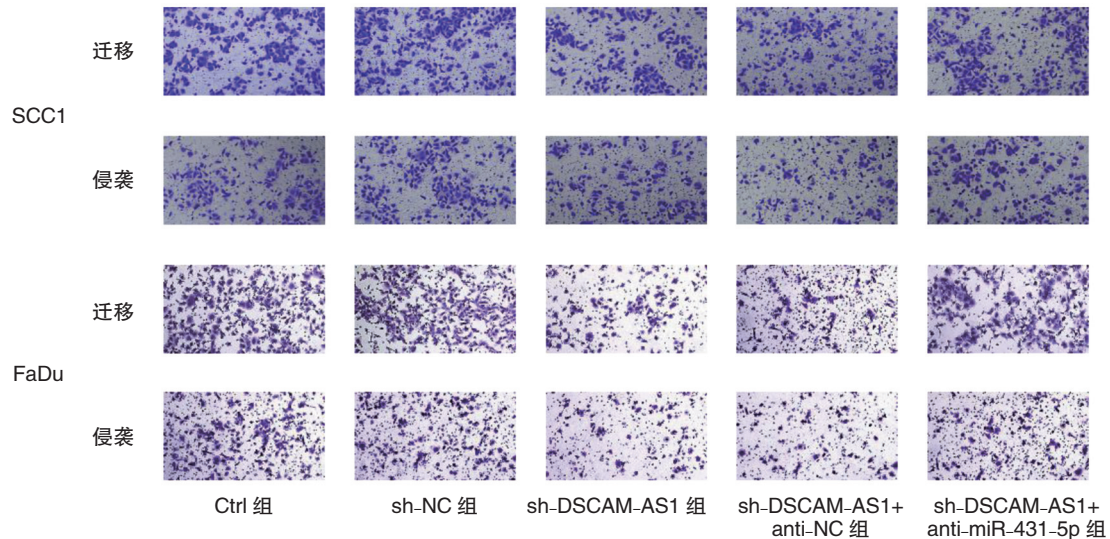


图 1 Transwell 实验检测 SCC1、FaDu 细胞迁移和侵袭 (结晶紫 $\times 200$)

表 5 各组 SCC1、FaDu 细胞迁移数、侵袭数比较 (个, $\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	SCC1		FaDu	
	迁移数	侵袭数	迁移数	侵袭数
Ctrl 组	107.53 $\pm$ 11.27	83.19 $\pm$ 8.76	134.29 $\pm$ 14.29	97.17 $\pm$ 10.93
sh-NC 组	108.94 $\pm$ 11.34	84.06 $\pm$ 8.62	133.47 $\pm$ 13.85	95.86 $\pm$ 10.71
sh-DSCAM-AS1 组	63.29 $\pm$ 8.46 ^{ab}	42.17 $\pm$ 5.37 ^{ab}	73.52 $\pm$ 9.04 ^{ab}	51.74 $\pm$ 7.43 ^{ab}
sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组	62.87 $\pm$ 8.32	41.98 $\pm$ 5.24	71.96 $\pm$ 8.96	50.29 $\pm$ 7.25
sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组	96.38 $\pm$ 10.28 ^{cd}	75.28 $\pm$ 7.74 ^{cd}	120.89 $\pm$ 12.74 ^{cd}	86.34 $\pm$ 9.84 ^{cd}
<i>F</i>	31.848	51.930	41.511	37.583
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

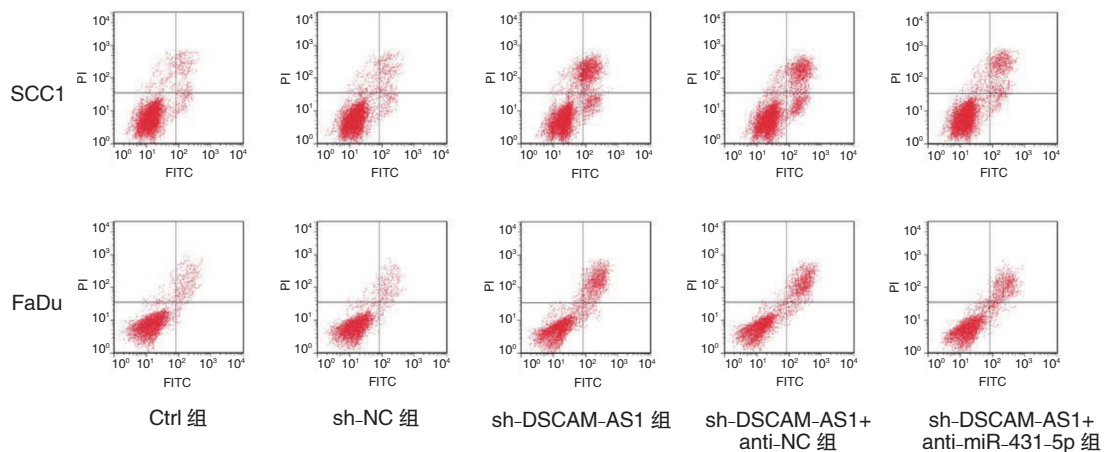


图 2 流式细胞仪检测 SCC1、FaDu 细胞的凋亡

4.918、6.536, P 均<0.001; sh-DSCAM-AS1+anti-NC; $q=5.514$ 、6.110, P 均<0.001)、EFNA1 (sh-DSCAM-AS1; $q=5.604$ 、3.989, P 均<0.001; sh-DSCAM-AS1+anti-NC; $q=6.014$ 、4.433, P 均<0.001) 蛋白表达高于 sh-DSCAM-AS1 组、sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组。见图 3、表 7。

2.7 LncRNA DSCAM-AS1 与 miR-431-5p、miR-431-5p 与 EFNA1 的靶向关系

LncRNA DSCAM-AS1 与 miR-431-5p、miR-431-5p 与 EFNA1 之间存在结合位点, 见图 4、5。在转染 DSCAM-AS1-Wt 和 EFNA1-Wt 的 SCC1、FaDu 细胞中, miR-431-5p mimic 组的荧光素酶活性 (DSCAM-

AS1-Wt; $t=12.059,9.206,P$ 均 <0.001 ;EFNA1-Wt; $t=8.530,6.911,P$ 均 <0.001)降低。见表 8、9。

表 6 各组 SCC1、FaDu 细胞凋亡率比较 ($\%,\bar{x}\pm s,n=6$)

分组	凋亡率	
	SCC1	FaDu
Ctrl 组	2.86 $\pm$ 0.81	1.73 $\pm$ 0.49
sh-NC 组	2.79 $\pm$ 0.79	1.68 $\pm$ 0.43
sh-DSCAM-AS1 组	31.48 $\pm$ 3.48 ^{ab}	42.57 $\pm$ 4.89 ^{ab}
sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组	30.97 $\pm$ 3.26	41.95 $\pm$ 4.56
sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组	12.83 $\pm$ 1.74 ^{cd}	16.68 $\pm$ 2.49 ^{cd}
F	227.606	244.259
P	<0.001	<0.001

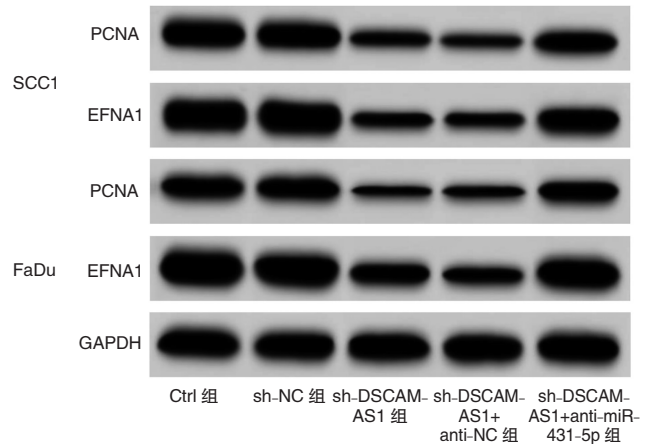


图 3 Western blot 检测 SCC1、FaDu 细胞中蛋白表达

表 7 各组 SCC1、FaDu 细胞中蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s,n=6$)

分组	SCC1		FaDu	
	PCNA	EFNA1	PCNA	EFNA1
Ctrl 组	0.99 $\pm$ 0.19	1.17 $\pm$ 0.22	0.83 $\pm$ 0.15	1.34 $\pm$ 0.26
sh-NC 组	0.98 $\pm$ 0.19	1.14 $\pm$ 0.21	0.81 $\pm$ 0.14	1.28 $\pm$ 0.25
sh-DSCAM-AS1 组	0.52 $\pm$ 0.14 ^{ab}	0.58 $\pm$ 0.14 ^{ab}	0.29 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.70 $\pm$ 0.18 ^{ab}
sh-DSCAM-AS1+anti-NC 组	0.48 $\pm$ 0.12	0.55 $\pm$ 0.14	0.32 $\pm$ 0.09	0.66 $\pm$ 0.17
sh-DSCAM-AS1+anti-miR-431-5p 组	0.85 $\pm$ 0.17 ^{cd}	0.99 $\pm$ 0.17 ^{cd}	0.75 $\pm$ 0.13 ^{cd}	1.06 $\pm$ 0.23 ^{cd}
F	13.619	16.930	18.838	12.368
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

miRNA	GeneID	GeneName	GeneType	TargetSite	Alignment
hsa-miR-431-5p	ENSG00000235123	DSCAM-AS1	lncRNA	chr21:40383305-40383323[+]	Target: 5' UGGUGAC--ACAGCAGACU 3' : : miRNA : 3' ACGUACUCCGACGUCUCU 5'

图 4 LncRNA DSCAM-AS1 与 miR-431-5p 的结合位点

Binding Site of hsa-miR-431-5p on EFNA1:					
Show	10	entries	Search:		
TargetRegion	Type	Alignment	TDMDScore	AgoExpNum	CleaveExpNum
chr1:155134546-155134564[+]	7mer-m8	Target: 5' AGCAG--CUCGACGACAC 3' : miRNA : 3' ACGUACUCCGACGUCUCU 5'	1.1847	16	0

图 5 miR-431-5p 与 EFNA1 的结合位点

表 8 SCC1 细胞中双荧光素酶活性比较 ($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	DSCAM-AS1-Wt	DSCAM-AS1-Mut	EFNA1-Wt	EFNA1-Mut
mimic-NC 组	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.18
miR-431-5p mimic 组	0.29 $\pm$ 0.08 ^a	1.04 $\pm$ 0.21	0.38 $\pm$ 0.11 ^a	1.02 $\pm$ 0.23
t	12.059	0.346	8.530	0.168
P	<0.001	0.737	<0.001	0.870

注:Wt(结合位点);Mut(突变位点)。下同。

表 9 FaDu 细胞中双荧光素酶活性比较 ($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	DSCAM-AS1-Wt	DSCAM-AS1-Mut	EFNA1-Wt	EFNA1-Mut
mimic-NC 组	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.19
miR-431-5p mimic 组	0.36 $\pm$ 0.11	0.96 $\pm$ 0.13	0.44 $\pm$ 0.13	1.03 $\pm$ 0.21
t	9.206	0.475	6.911	0.259
P	<0.001	0.645	<0.001	0.801

3 讨论

HNSCC 是全球第六大癌症,通常起源于头颈部黏膜表面的鳞状上皮细胞,由于其解剖位置相对隐

蔽,大多数 HNSCC 病例在确诊时已处于晚期^[10]。HNSCC 多见于男性,与女性的比例为 3:1,主要发生在 55 岁以后,与其发展有关的主要因素是饮酒和吸烟,影响程度与接触的强度成正比,此外通过口交传播的人乳头状瘤病毒感染、以及长时间的阳光照

射、胃食管反流病和咽喉反流病,均可能导致 HNSCC 的发展^[11]。HNSCC 侵袭性强,易发生颈部淋巴结转移,复发转移风险较高,尽管多模式疗法取得了进展,但死亡率仍然居高不下^[12]。因此,探讨 HNSCC 细胞恶性生物学行为的调节机制对于开发创新的治疗策略和改善患者的预后至关重要。

研究表明,LncRNAs 可通过 ceRNAs 或海绵化 miRNA 负调控 miRNA,参与癌症等多种疾病的进展^[13]。Li 等^[14]发现,LncRNA DSCAM-AS1 在结直肠癌组织和细胞中高表达,且与患者的预后不良相关,LncRNA DSCAM-AS1 通过海绵化 miR-384 在体外促进结直肠癌细胞的恶性生物学进展,在体内促进结直肠癌肿瘤的生长。Zhang 等^[15]利用癌症基因组图谱、ChIP-seq 数据库等分析发现,LncRNA DSCAM-AS1 在肺腺癌、乳腺癌、前列腺癌中高表达,且高表达患者预后差,LncRNA DSCAM-AS1 高表达可以促进肺腺癌、乳腺癌、前列腺癌的进展。Zhang 等^[16]发现,口腔鳞状细胞癌细胞系和组织中 LncRNA DSCAM-AS1 高表达,LncRNA DSCAM-AS1 可通过调节 miR-138-5p 信号通路,对口腔鳞状细胞癌发挥促癌基因的作用。本研究发现 LncRNA DSCAM-AS1 在 HNSCC 组织中高表达,敲低 LncRNA DSCAM-AS1 通过抑制 SCC1、FaDu 细胞的增殖、迁移侵袭,促进细胞凋亡,提示 LncRNA DSCAM-AS1 可能通过促进 HNSCC 细胞的恶性生物学行为,促进 HNSCC 的疾病进展。

miRNA 通过结合靶向 3'UTR 负调控基因表达,调控疾病的进展^[17]。Sun 等^[18]发现,miR-431-5p 在骨肉瘤组织中表达下调,且与淋巴结转移和 TNM 分期呈负相关,在骨肉瘤细胞中过表达 miR-431-5p,在体外抑制骨肉瘤细胞的恶性生物学行为,在体内抑制小鼠异植瘤的生长。Liu 等^[19]发现,miR-431-5p 在胃癌组织和血浆外泌体中均显著下调,其表达与淋巴结转移和不良预后呈负相关,miR-431-5p 高表达在体外阻碍胃癌血管生成、淋巴管生成和淋巴结转移,在体内抑制裸鼠瘤模型的膈窝淋巴结转移。Zhu 等^[20]发现,敲低 LINC01132 可通过调节 miR-431-5p/信号通路减轻上皮性卵巢癌的致癌性。相关研究显示,LncRNA DSCAM-AS1 可以海绵化 miR-431-5p,促进肝癌细胞的恶性进展^[9]。本研究发现 miR-431-5p 在 HNSCC 组织中高表达,在 SCC1、FaDu 细胞中 LncRNA DSCAM-AS1 可以靶向负调控 miR-431-5p,逆转敲低 LncRNA DSCAM-AS1,对 HNSCC 恶性生物学的作用可能是通过海绵化 miR-

431-5p 实现的。

EFNA1 是一种单链蛋白分子,可被缺氧诱导,参与血管生成、肿瘤发生、肿瘤转移,进而参与癌症的进展^[21]。Dong 等^[22]发现,EFNA1 在宫颈癌组织中高表达,并与患者生存率呈负相关,EFNA1 可通过磷酸化途径和上皮间质转化促进宫颈癌的发生与转移。Jiang 等^[23]发现,EFNA1 在食管癌中高表达,且与不良预后显著相关,EFNA1 通过激活 cMYC 调控的细胞增殖和抑制自噬,促进食管鳞状细胞癌的进展。Li 等^[24]发现,EFNA1 的激活可以促进胃癌细胞的上皮间质转化和转移。本研究发现 EFNA1 在 HNSCC 组织中高表达,在 SCC1、FaDu 细胞中敲低 LncRNA DSCAM-AS1 导致 miR-431-5p 低表达,而抑制 miR-431-5p 则上调 EFNA1 表达,提示 LncRNA DSCAM-AS1 可能通过海绵化 miR-431-5p 促进 EFNA1 表达,进而促进 HNSCC 细胞的恶性生物学行为。

综上所述,LncRNA DSCAM-AS1 可能通过靶向 miR-431-5p/EFNA1 促进 HNSCC 细胞增殖、侵袭,抑制细胞凋亡。但本研究只进行了细胞实验,且局限于 LncRNA DSCAM-AS1/miR-431-5p/EFNA1 通路,后续会关注更多信号通路并进行深入研究。

参考文献:

- [1] Wu YL, Liu W, Zhao T, et al. P4HA2 contributes to head and neck squamous cell carcinoma progression and EMT through PI3K/AKT signaling pathway[J]. Med Oncol, 2024, 41(6): 163.
- [2] 周勇森,李会政,孙子涵,等.尼妥珠单抗联合治疗对局部晚期头颈部鳞状细胞癌的疗效及安全性分析[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2025,31(4):15-20.
- [3] Miller ZA, Mueller A, Kim T, et al. Lidocaine induces apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma through activation of bitter taste receptor T2R14[J]. Cell Rep, 2023, 42(12): 113437.
- [4] Jiang M, Liu F, Yang AG, et al. The role of long non-coding RNAs in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 24:127-138.
- [5] Lu C, Xie T, Guo X, et al. LncRNA DSCAM-AS1 promotes colon cancer cells proliferation and migration via regulating the miR-204/SOX4 axis[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12:4347.
- [6] Kozłowska-Masłóń J, Guglas K, Kolenda T, et al. miRNA in head and neck squamous cell carcinomas: promising but still distant future of personalized oncology[J]. Rep Pract Oncol Radiother, 2023, 28(5):681-697.
- [7] Balakittnen J, Ekanayake Weeramange C, Wallace DF, et al. A novel saliva-based miRNA profile to diagnose and predict oral

- cancer[J]. *Int J Oral Sci*, 2024, 16(1):14.
- [8] Chu LY, Huang BL, Huang XC, et al. EFNA1 in gastrointestinal cancer: Expression, regulation and clinical significance [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2022, 14(5):973–988.
- [9] 陈志飞, 孙伟涛, 颜廷启, 等. LncRNA DSCAM-AS1 调节 miR-431-5p/PRDX1 信号轴对肝癌细胞恶性进展的影响[J]. *广东医学*, 2025, 46(2):167–175.
- [10] Liu W, Ding Z, Tao Y, et al. A positive feedback loop between PFKP and c-Myc drives head and neck squamous cell carcinoma progression[J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1):141.
- [11] 汪李琴, 陈海兵, 龚霄阳, 等. 新辅助抗 PD-1/PD-L1 在可手术切除的头颈部鳞状细胞癌中的疗效及安全性分析与评价[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2024, 30(3):23–33.
- [12] Wang Y, Wang S, Ren Y, et al. The role of lncRNA crosstalk in leading cancer metastasis of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2020, 10:561833.
- [13] Ye D, Deng Y, Shen Z. The role and mechanism of MALAT1 long non-coding rna in the diagnosis and treatment of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14:4127.
- [14] Li B, Sun H, Zhang J. LncRNA DSCAM-AS1 promotes colorectal cancer progression by acting as a molecular sponge of miR-384 to modulate AKT3 expression[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10):9781–9792.
- [15] Zhang Y, Huang YX, Wang DL, et al. LncRNA DSCAM-AS1 interacts with YBX1 to promote cancer progression by forming a positive feedback loop that activates FOXA1 transcription network [J]. *Theranostics*, 2020, 10(23):10823–10837.
- [16] Zhang Y, Wang X, Wang P, et al. LncRNA DS cell adhesion molecule antisense RNA 1 facilitates oral squamous cell carcinoma progression through the microRNA-138-5p/ enhancer of Zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit axis[J]. *Cell J*, 2022, 24(5):222–229.
- [17] Carron J, Torricelli C, Silva JK, et al. microRNAs deregulation in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Head Neck*, 2021, 43(2):645–667.
- [18] Sun S, Fu L, Wang G, et al. MicroRNA-431-5p inhibits the tumorigenesis of osteosarcoma through targeting PAX3[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12:8159–8169.
- [19] Liu P, Ding P, Yang J, et al. MicroRNA-431-5p inhibits angiogenesis, lymphangiogenesis, and lymph node metastasis by affecting TGF- β 1/SMAD2/3 signaling via ZEB1 in gastric cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2024, 63(7):1378–1391.
- [20] Zhu W, Xiao X, Chen J. Silencing of the long noncoding RNA LINC01132 alleviates the oncogenicity of epithelial ovarian cancer by regulating the microRNA-431-5p/SOX9 axis [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(2):151.
- [21] Hao YP, Wang WY, Qiao Q, et al. EFNA1 is a potential key gene that correlates with immune infiltration in low-grade glioma [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(22):e26188.
- [22] Dong X, Chen X, Xue M, et al. EFNA1 promotes the tumorigenesis and metastasis of cervical cancer by phosphorylation pathway and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Acta Histochem*, 2025, 127(2):152236.
- [23] Jiang H, Wang S, Liu Y, et al. Targeting EFNA1 suppresses tumor progression via the cMYC-modulated cell cycle and autophagy in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Discov Oncol*, 2023, 14(1):64.
- [24] Li S, Sun M, Cui Y, et al. Ephrin A1 functions as a ligand of EGFR to promote EMT and metastasis in gastric cancer[J]. *EMBO J*, 2025, 44(5):1464–1487.

(收稿日期:2025-07-11)

本文引用格式:肖隆盛,张剑喜,杜晓东. LncRNA DSCAM-AS1 通过 miR-431-5p/EFNA1 调控头颈部鳞状细胞癌细胞增殖、侵袭和凋亡[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2026, 32(1):16–23. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202524543

Cite this article as: XIAO Longsheng, ZHANG Jianxi, DU Xiaodong. The effects of LncRNA DSCAM-AS1 on proliferation, apoptosis, and invasion of head and neck squamous cell carcinoma cells through miR-431-5p/EFNA1[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2026, 32(1):16–23. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202524543