

网络出版时间:2025-12-02 15:47:59 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251202.1642.032>

c-Myc 调控 LINC01578 影响口腔鳞状细胞癌代谢的实验研究

杜俊怡^{1,2}, 李向阳^{1,2}, 朱友明^{1,2}

(¹安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032; ²口腔疾病研究安徽省重点实验室, 合肥 230032)

摘要 目的 研究长链非编码 RNA LINC01578 与致癌转录因子 c-Myc 的调控关系, 探讨 LINC01578 对口腔鳞状细胞癌(OSCC)代谢过程的影响。**方法** 在 OSCC 细胞系 CAL27 中敲低 c-Myc, 通过高通量测序技术鉴定出 1 个受 c-Myc 正向调控的长链非编码 RNA——LINC01578。使用 qRT-PCR 检测 c-Myc 和 LINC01578 在 OSCC 组织及其癌旁组织中的表达关系。在 CAL27、HN6 细胞中过表达 c-Myc 或敲低 c-Myc, 使用 qRT-PCR 检测 LINC01578 的表达情况, 验证与测序结果是否一致。双荧光素酶报告实验验证 c-Myc 与 LINC01578 启动子的结合作用。Seahorse、ATP 生成和乳酸生成实验探讨 c-Myc 通过 LINC01578 对 OSCC 糖代谢的影响。克隆形成实验检测 OSCC 细胞系的增殖能力。**结果** qRT-PCR 结果显示 c-Myc 和 LINC01578 在 OSCC 组织中的表达高于癌旁组织(均 $P < 0.05$), 并且 c-Myc 正向调节 LINC01578 的表达。与测序结果一致, 过表达 c-Myc 上调 LINC01578($P < 0.001$); 敲低 c-Myc 下调 LINC01578 水平($P < 0.0001$)。双荧光素酶报告基因显示 c-Myc 可靶向调控 LINC01578, c-Myc 可以转录增强 LINC01578($P < 0.001$)。Seahorse 实验说明 c-Myc 通过调控 LINC01578 促进 OSCC 糖酵解(均 $P < 0.05$)。克隆形成实验表明, 过表达 LINC01578 可促进 OSCC 细胞增殖, 而敲低 LINC01578 可抑制 OSCC 细胞增殖。**结论** c-Myc 通过转录上调 LINC01578, 从而调控 OSCC 中的糖酵解, 促进细胞增殖。

关键词 口腔鳞状细胞癌;c-Myc;LINC01578;代谢;糖酵解;细胞增殖

中图分类号 R 739.86

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)12-2281-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.12.011

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是常见的头颈部癌症, 占全球癌症死亡人数的 3%~10%。其生长迅速, 易发生淋巴结转移, 5 年生存率约为 54%^[1]。OSCC 与烟草、乙醇和槟榔使用相关, 这些因素会破坏细胞内环境、代谢和遗传^[2]。了解这些机制对发现新治疗靶点和改进治疗策略至关重要。

c-Myc 作为一种关键的原癌基因, 在恶性肿瘤发生发展中发挥多维度致癌驱动作用。这种广泛的转录调控网络涉及细胞周期调控、凋亡抑制、代谢重编程以及表观遗传修饰等多个关键通路^[3]。c-Myc 在多种癌症中过表达, 尤其在 OSCC 中影响细胞增殖和凋亡^[4]。c-Myc 过表达或异位表达可以加速细胞周期的进程, 这在肿瘤组织中尤为明显, 并且与患者的不良预后密切相关^[5]。长链非编码 RNA 通过

转录调控、表观遗传修饰及蛋白质互作影响生理过程, 在许多癌症中异常表达, 可能成为 OSCC 的治疗靶点^[6]。如在 OSCC 中, SNHG16 与 c-Myc 正相关, 其上调促进 OSCC 进展; 而下调 lncRNA HOTTIP 可抑制 OSCC 的增殖、迁移和侵袭^[7-8]。该研究通过在 CAL27 细胞中敲低 c-Myc, 结合高通量测序技术发现受 c-Myc 正调控的 LINC01578 表达差异显著, 并进一步验证其在 OSCC 细胞和组织中的作用, 分析 c-Myc 与 LINC01578 在 OSCC 细胞中的调控关系及其对代谢的影响, 以确定预防和治疗 OSCC 的新分子靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 患者组织样本 本研究所用的 10 对组织样本来源于安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科手术中切除的 OSCC 组织及其癌旁组织。所有患者在参与研究前均未接受放疗或化疗, 并已通过病理学检查确认诊断。所有患者手术切除的组织样本被立即置入冻存管内, 并迅速转移至液氮罐中进行保存。本研究在获得患者知情同意后进行样本收集, 且已获得安徽医科大学附属口腔医院伦理委员会批准(批准号:K2024008), 符合相关伦理法规

2025-08-07 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号:31970677); 安徽省自然科学基金青年项目(编号:2308085Y23)

作者简介: 杜俊怡, 女, 硕士研究生;

朱友明, 男, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: 95640021@qq.com;

李向阳, 男, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: hlxian-gyang@163.com

表 1 敲低 RNA 的引物序列

Tab. 1 The primer sequence of the knockdown RNA

Name	Sequences(5'-3')
plko. 1-shLINC01578-1	F:CCGGGCCTCGGACCCGGTGACTCTCGAGAGAGTCCGAGCGCTTTTG R:AATTCAAAAGCGCTCGGACCCGGTGACTCTCGCAGAGAGTCACCGGGTCCGAGCGC
plko. 1-shLINC01578-2	F:CCGGCGGTGACTTAAGAGATTAACCGAGTTAACCTCTTAAGTCACCGTTTTTG R:AATTCAAAACGGTGACTTAAGAGATATACTCGAGTTAACCTCTTAAGTCACC

要求。

1.1.2 主要材料 人胚胎肾细胞(293T)、人OSCC细胞(HN6、CAL27)、人口腔角质形成细胞(HOK)、大肠杆菌DH5 α 保存于安徽省医学院口腔医学实验室,慢病毒包装质粒pGag、pRev、pVsvg、pMD2.G、psPAX2,c-Myc过表达质粒、c-Myc敲低质粒,双荧光素酶报告实验使用的pGL3-basic质粒和renilla质粒均由安徽省口腔疾病研究重点实验室提供。过表达质粒pcdh-lnc-OE(LINC01578 over-expression)、敲低质粒shLINC01578-1、shLINC01578-2、LINC01578野生型质粒(pGL3-LINC01578-WT)和突变型质粒(pGL3-LINC01578-Mut)均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供合成。DMEM高糖培养基(货号:319005227)购自维森特生物技术有限公司,胎牛血清(货号:A511-001)购自双泗生物技术有限公司,0.25%胰蛋白酶(货号:C100C1)购自新赛美生物科技有限公司,青-链霉素(货号:C0222)购自上海碧云天生物技术有限公司,转染试剂lipofectamine2000(货号:11668027)购自美国Invitrogen公司,qRT-PCR相关试剂:ROX染料(货号:AG11710)、SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(货号:AG11701)购自艾科瑞生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用含有10%胎牛血清和1%青-链霉素的高糖DMEM培养基对HN6、CAL27以及293T细胞进行常规培养,置于5%CO₂、37℃培养箱中。当细胞汇合度达到80%时进行传代,传代时使用0.25%胰蛋白酶进行消化。

1.2.2 慢病毒包装与转染 CAL27/HN6 细胞 从UCSC数据库中查找LINC01578的基因序列,根据plko. 1-puro载体的敲低骨架特征设计shRNA oligos,获得扩增基因后,将其插入pLKO. 1-puro载体的EcoR I和Age I酶切位点,成功构建敲低质粒,命名为plko. 1-shLINC01578-1、plko. 1-shLINC01578-2。随后,将构建的敲低质粒(plko. 1-shLINC)和慢病毒包装质粒(pGag、pRev和pVsvg)

按2:2:2:1的比例共转染293T细胞。293T细胞最初在无血清DMEM培养基中培养,培养8 h后,将培养基替换为含有10%胎牛血清的正常DMEM培养基。36 h后收集病毒上清液,通过0.45 μm PVDF滤器过滤。将过滤后的上清液滴入密度为60%~70%的CAL27/HN6细胞,加入与上清液等体积的培养基,摇匀后再加入聚凝胺,使其最终浓度为7×10⁻⁶ mol/L。细胞在含5%CO₂的37℃培养箱中再孵育48 h,随后加入终浓度为1×10⁻⁶ mol/L的嘌呤霉素进行7~14 d的筛选。shRNA序列见表1。

1.2.3 qRT-PCR 检测 收集转染48 h后的OSCC细胞各5组(转染+c-Myc、shc-Myc、shLINC01578-1、shLINC01578-2及其各对照组),采用TRIzol法提取各细胞组总RNA,逆转录生成cDNA模板。cDNA模板放在-20℃保存备用。PCR反应制备20 μL反应混合物,其中:正向引物0.4 μL,反向引物0.4 μL,2×SYBR Green 10.0 μL,ROX染料0.4 μL,cDNA模板2.0 μL,无菌蒸馏水6.8 μL。进行PCR扩增的条件如下:95℃初始变性2 min,然后95℃变性5 s,60℃退火15 s,72℃延长20 s。反应结束后读取各组结果,以β-actin作为分子内参,采用2^{-ΔΔCt}算法方法分析比较各组LINC01578的表达水平。具体引物序列见表2。

表 2 实时定量聚合酶链反应的引物序列

Tab. 2 Primer sequences for real-time quantitative polymerase chain reaction

Name	Sequences (5'-3')
LINC01578	F: GCTCGGACCCGGTGACTTA R: CTCTTCAAGCTGACTGGGTG
c-Myc	F: AGGAGCAGCAGAGAAAGGGAGAG R: AGAGAGCCCAGATGAATTAACTACCG
β-actin	F: CTCCATCCTGGCCTCGCTGT R: GCTGTCACCTCACCGTTCC

1.2.4 双荧光素酶报告基因检测 将野生型pGL3-LINC01578-WT和突变型pGL3-LINC01578-Mut及其各自的c-Myc对照组共转染。48 h后,在

每个样本中加入 100 μL 细胞裂解缓冲液,冰上裂解 5 min。将裂解液转移到新的 EP 管中,12 000 r/min 离心 2 min,收集上清液。使用 Promega 荧光检测器测定背景荧光(L_0)。在 20 μL 上清液中加入 10 μL 荧光素酶底物,轻轻混合,测定萤火虫荧光素酶荧光强度(L_1)。再加入 10 μL Renilla 底物工作液,快速混合,测定 Renilla 荧光素酶荧光强度(R_1)。采用公式 $(L_1 - L_0)/(R_1 - L_0)$ 计算结果,并以柱状图表示。

1.2.5 细胞外酸化速率(ECAR)测量 设计两组实验,分别是实验组为敲低组(shLINC01578-1 组、shLINC01578-2 组)及其对照组(shCtrl 组)和 c-Myc 组(c-Myc 组)、敲低 LINC01578 组(shLINC01578-1 组)、c-Myc + 敲低 LINC01578 组(c-Myc + shLINC01578-1 组)及对照组(Ctrl 组)。将实验组和对照组的细胞分别接种到海马 XFp 96 孔细胞培养微孔板中,使用海马 XF 分析仪进行 ECAR 分析。每孔细胞培养液中加入 $(1 \sim 2) \times 10^{-4}$ 个细胞,孵育 24 h 后进行检测。ECAR 测量使用 XF96 分析仪,在 XF 基础培养基(pH 7.4)中添加 1 mmol/L 谷氨酰胺,随后依次添加 10 mmol/L 葡萄糖,1 $\mu\text{mol/L}$ 寡霉素和 50 mmol/L 2-脱氧葡萄糖。使用 Seahorse XF 糖酵解压力测试报告生成器分析数据,使用 Countstar 生物技术自动细胞计数仪对结果进行标准化。

1.2.6 总 ATP 和乳酸测定 根据制造商的说明,分别使用 ATP 测定法和乳酸盐生成测定法测量细胞 ATP 和细胞外乳酸水平。

1.2.7 集落形成试验 将实验组和对照组的 CAL27 细胞接种于 6 孔板中,密度为每孔 1 000 个细胞,每种条件下重复 3 次。每孔加入 2 mL 培养

基。经过 16 d 的孵育期后,将细胞用 4% 多聚甲醛在室温下固定 30 min,1% 结晶紫染色 4 h,洗涤、干燥后观察并拍照。

1.3 统计学处理 采用 Microsoft Excel 和 GraphPad Prism 9.0 进行统计学分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异采用 *t* 检验,多组间差异采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OSCC 测序结果 本研究在 CAL27 细胞中敲低 c-Myc,结合高通量测序技术筛选出一个受 c-Myc 正向调控的表达差异显著的长链非编码 RNA—LINC01578。c-Myc 敲低后的 LINC01578 检测结果,见表 3。

表 3 c-Myc 敲低后的 LINC01578 检测结果

Tab. 3 LINC01578 assay results after c-Myc knockdown

Genetic parameters	Test results
Id	NR_037600.1
Fold change	0.008 760 881
Log ₂ Fold change	-6.834 708 352
P value	7.01e-09
Gene name	LINC01578
Gene type	lncRNA
Direction	sense
Type	intergenic

2.2 c-Myc 和 LINC01578 在 OSCC 组织中的表达 为了验证生物信息学分析结果,本研究使用 10 对 OSCC 组织及其癌旁组织样本进行比较。与癌旁组织相比,癌组织中的 c-Myc 水平升高(均 $P < 0.05$),见图 1A。此外,LINC01578 在 OSCC 组织中表现出高表达水平(均 $P < 0.01$),见图 1B。

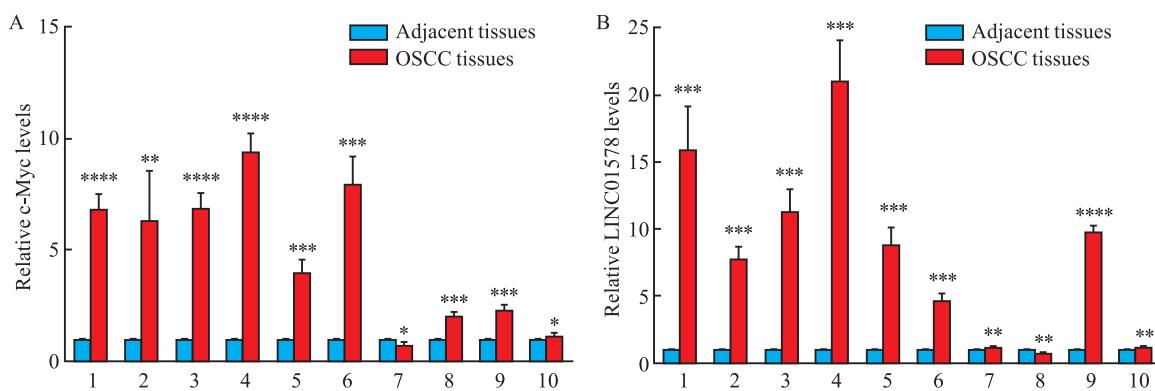


Fig. 1 c-Myc and LINC01578 expression in OSCC tissues

A: The expression level of c-Myc in 10 pairs of OSCC tissues and adjacent tissues; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Adjacent tissues.

2.3 c-Myc 在 OSCC 细胞系中正向调节 LINC01578 的表达 为了探讨 c-Myc 对 LINC01578 的调控作用,本研究用过表达 c-Myc (+c-Myc) 或敲低 c-Myc (shc-Myc) 转染 CAL27 和 HN6 细胞系。随后,再利用 qRT-PCR 检测 c-Myc 过表达和敲低的效率以及 LINC01578 表达水平的变化。结果显示, c-Myc 过表达时,HN6 和 CAL27 细胞中 LINC01578 的表达显著上调 ($t = 34.61, P < 0.0001$; $t = 20.49, P < 0.001$), 见图 2A。与这测序结果一致,c-Myc 敲低后,HN6 和 CAL27 细胞 LINC01578 的表达显著降低 ($t = 129.10, P < 0.0001$; $t = 39.88, P < 0.0001$), 见图 2B。

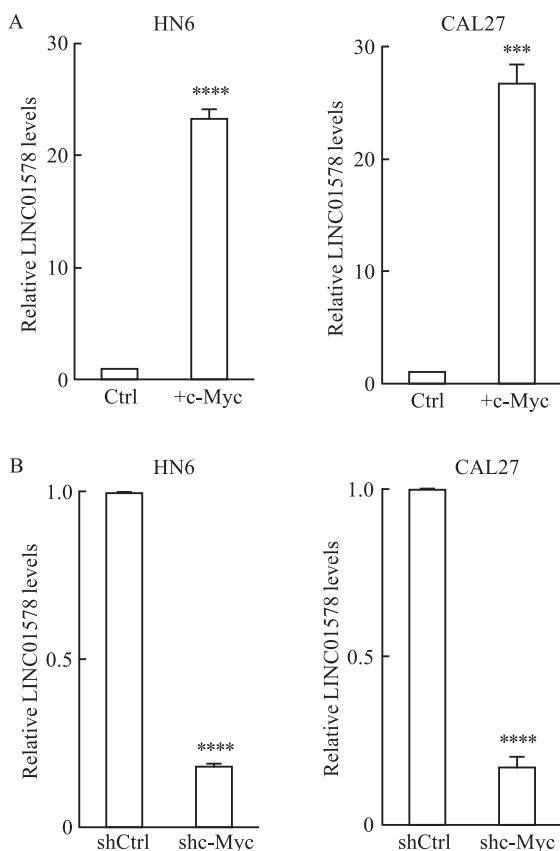


图 2 c-Myc 过表达或敲低后 LINC01578 相对表达量

Fig. 2 Relative expression of LINC01578 after c-Myc overexpression or knockdown

A: c-Myc overexpression efficiency and the corresponding relative expression level of LINC01578 determined by qRT-PCR; B: c-Myc knockdown efficiency and the corresponding relative expression of LINC01578 determined by qRT-PCR; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compared between two groups.

2.4 LINC01578 启动子区域的 c-Myc 相互作用

本研究利用 UCSC 和 JASPAR 数据库进行生物信息学预测,确定了 LINC01578 基因启动子区域内 c-

Myc 的推定结合位点,见图 3A。为了验证这一相互作用,使用双荧光素酶报告基因检测。结果表明,与对照组相比,pGL3-LINC01578-WT 和 c-Myc 共转染的细胞荧光信号强度显著升高 ($t = 8.77, P < 0.001$),见图 3B。相反,共转染 pGL3-LINC01578-Mut 和 c-Myc 的细胞与对照组的荧光信号强度无显著差异。此外,还验证了 c-Myc 在 CAL27 细胞中的过表达效率 ($t = 12.12, P < 0.001$),见图 3C。本研究证实了 c-Myc 与 LINC01578 启动子区 (-157 ~ -166) 之间的相互作用。

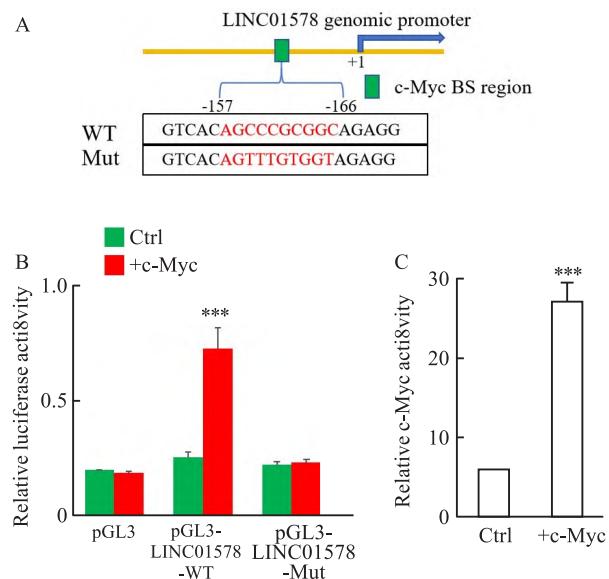


图 3 双荧光素酶报告基因检测结果

Fig. 3 Results of dual luciferase reporter assay

A: The sequence of LINC01578 promoter region, c-Myc binding site and mutation site; B: Dual-luciferase reporter assay was used to detect the relative luciferase activity of plasmids carrying wild-type and mutant c-Myc binding sites; C: c-Myc was transfected into 293T cells, and its overexpression efficiency was detected; *** $P < 0.001$ vs Ctrl group.

2.5 LINC01578 的敲低对糖酵解的影响 Seahorse 检测结果显示,与 shCtrl 组比较,shLINC01578 组糖酵解下调(图 4A),ATP 和乳酸生成均显著减少(均 $P < 0.001$, 图 4B、4C),并且敲低组的 LINC01578 表达效率也降低(均 $P < 0.0001$, 图 4D)。此外,敲低 LINC01578 所导致的 ECAR、ATP 和乳酸生成的降低,可以通过 + LINC01578 组进行恢复(均 $P < 0.05$, 图 4E)。这些数据表明敲低 LINC01578 后可抑制 OSCC 糖酵解,并降低细胞内 ATP 及乳酸含量。

2.6 c-Myc 通过 LINC01578 调节 OSCC 中的糖酵解 基于之前的实验研究,课题组发现 c-Myc 在

OSCC 细胞系中正向调节 LINC01578 的表达,为了从功能上验证这一点,通过检测了 c-Myc + 敲低 LINC01578 后的 ECAR 以及 ATP 生成量和乳酸水平。首先观察到 c-Myc 组引发的糖酵解上调以及 ATP 和乳酸生成增加。相反,敲低 LINC01578 显著消除了部分由 c-Myc 组引发的 ECAR、ATP 和乳酸生成的增加(均 $P < 0.05$,图 5)。综上所述,这些发

现表明 c-Myc 通过 LINC01578 调节 OSCC 中的糖酵解活性。

2.7 LINC01578 对 OSCC 增殖的影响 课题组用敲低和过表达了 LINC01578 的 CAL27 细胞来铺板做克隆形成,培养 16 d 后,结晶紫染色显示,LINC01578 下调后的 OSCC 细胞的增殖速率与对照细胞相比明显变慢,见图 6A,而 LINC01578 过表达

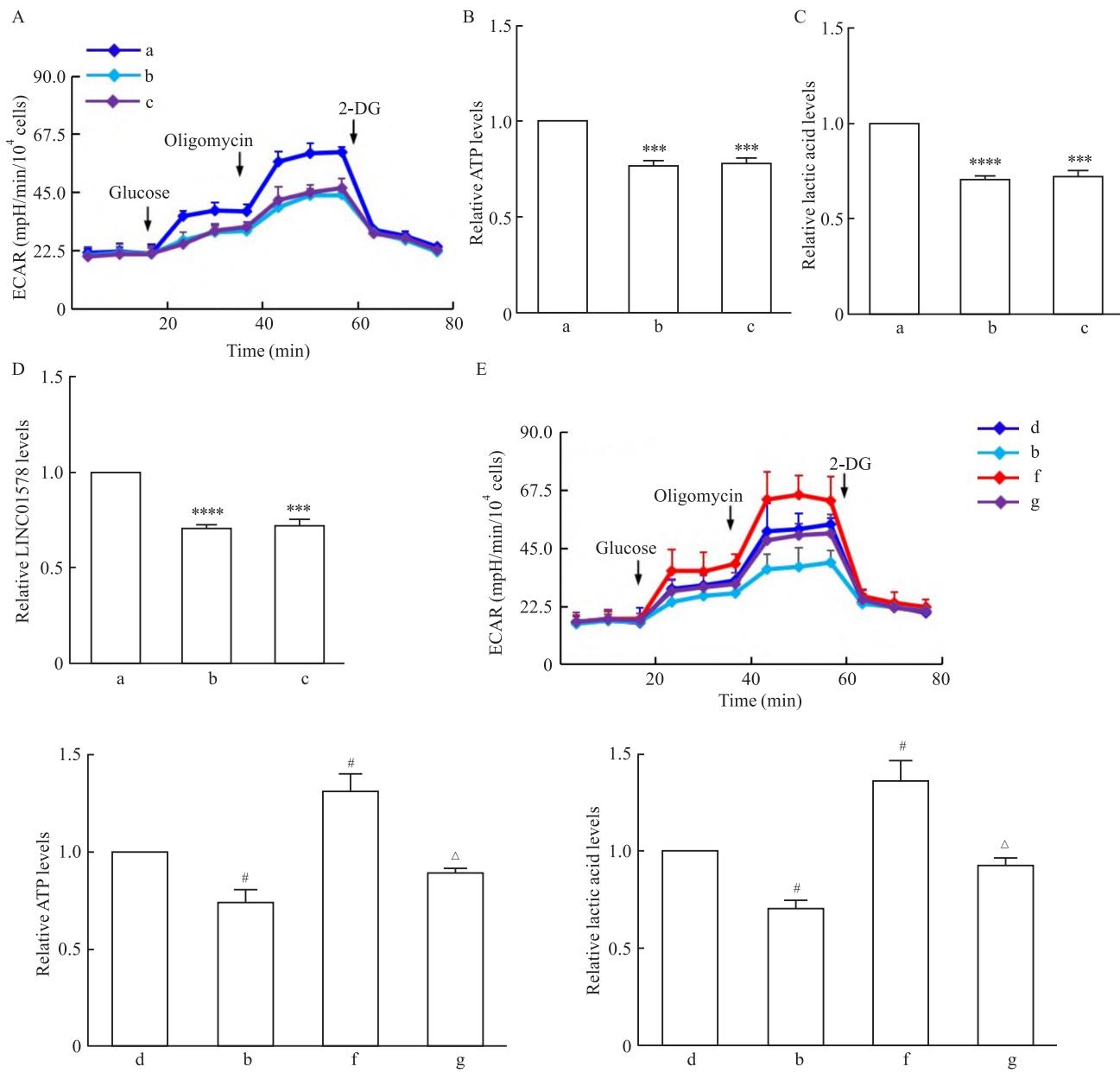


图 4 LINC01578 的敲低对细胞糖酵解过程的影响

Fig. 4 The effects of LINC01578 knockdown on cellular glycolysis

A: The effects of LINC01578 knockdown on glycolytic capacity; B: The relative ATP production was detected by knocking down LINC01578; C: The relative lactate production was detected by knocking down LINC01578; D: The relative expression of LINC01578 was detected after knocking down LINC01578; E: Rescue experiments with LINC01578; a: shCtrl; b: shLINC01578-1; c: shLINC01578-2; d: Ctrl; e: LINC01578; f: shLINC01578-1 + LINC01578; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs shCtrl group; # $P < 0.05$ vs Ctrl group; Δ $P < 0.05$ vs shLINC01578-1 group.

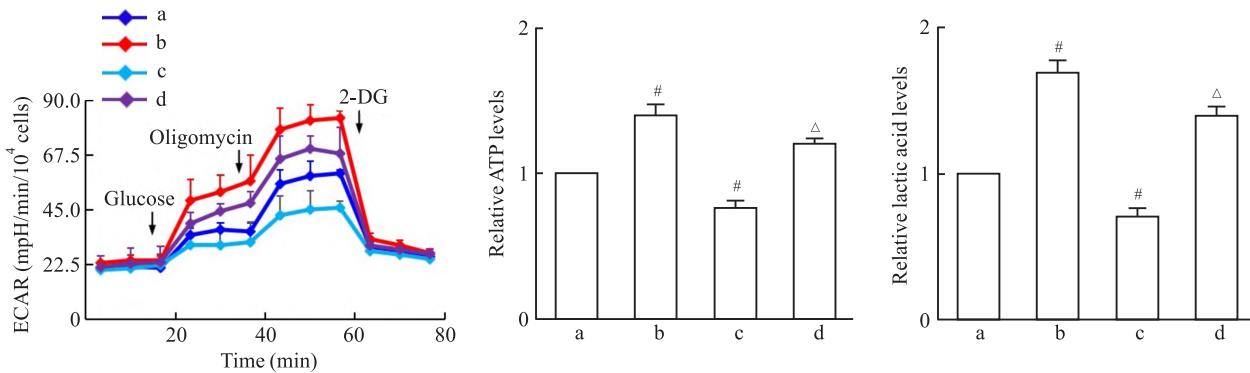


图 5 c-Myc 通过 LINC01578 影响细胞糖酵解能力及 ATP 和乳酸产量

Fig. 5 c-Myc affected cell glycolysis and ATP and lactate production through LINC01578

a: Ctrl; b: c-Myc; c: shLINC01578-1; d: c-Myc + shLINC01578-1; *P < 0.05 vs Control group; △P < 0.05 vs c-Myc group.

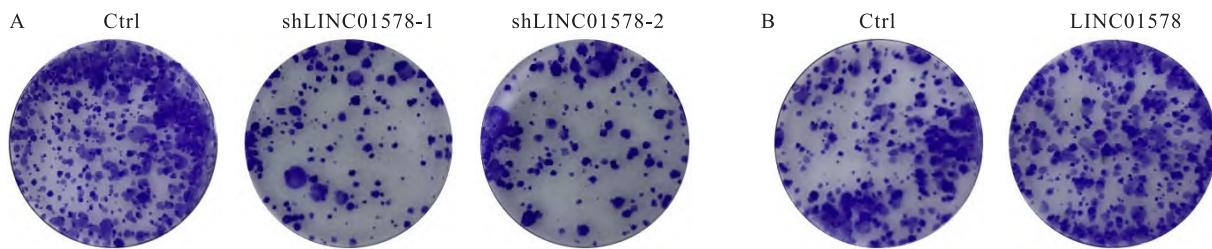


图 6 集落形成试验

Fig. 6 Colony formation assay

A: Colony formation Results 16 days after LINC01578 knockdown; B: Colony formation results 16 days after LINC01578 overexpression.

的 OSCC 细胞的增殖速率明显变快, 见图 6B。

3 讨论

根据全球癌症观察站数据显示, 2020 年全球报告了 377 713 例 OSCC 病例, 大多数发生在亚洲^[9]。目前, OSCC 的主要临床治疗包括手术干预、化疗、放疗或其他联合治疗。然而, 由于 OSCC 对化疗药物的固有耐药性, 常用药物如顺铂和 5-氟尿嘧啶的疗效不理想^[10]。并且化疗还可能引发一系列副作用, 如骨髓抑制、肝肾毒性等, 严重影响患者的生活质量。而手术治疗同样面临挑战, 尽管外科手术可以切除可见的肿瘤组织, 但残留的微小肿瘤细胞可能引发肿瘤的再次发生, 而且手术治疗可能会对患者的口腔功能及面部外观造成影响, 给患者带来心理和生理上的双重负担。因此, 迫切需要深入研究 OSCC 的发病机制, 寻找新的治疗方法和预后标志物, 提高患者的整体治疗效果。未来的研究方向可能包括开发更为敏感的早期诊断技术、探索新型抗癌药物、优化现有治疗方案的组合方式, 如免疫疗法、基因疗法、仿生疗法、光动力疗法和光热治疗等。

只有通过多学科的协同努力, 才能为 OSCC 患者带来更多的希望和更好的生活质量。

由于 OSCC 存在广泛的基因变异和多层次的异质性, 靶向治疗有望在 OSCC 治疗中占据重要地位^[11]。例如, Roxyl-ZR 已被证明通过抑制 JAK1/STAT3 信号通路, 有效抑制 OSCC 细胞的代谢活性、克隆形成、增殖、迁移和侵袭^[12]。在肺癌中, 长链非编码 RNA AFAP1-AS1 和 SNIP1 相互作用导致 c-Myc 上调, 从而增强细胞迁移和侵袭能力^[13]。MicroRNA-1294 通过靶向 c-Myc 对 OSCC 的生长产生抑制作用^[14]。此外, c-Myc 诱导 CAL27 细胞中 SNHG16 的上调, 促进 OSCC 的增殖、迁移和侵袭^[15]。本研究分析了 c-Myc 与 LINC01578 在 OSCC 中的调控关系, 以及对 OSCC 发展的影响。

人类基因组中已鉴定出超过 10 万个长链非编码 RNA, 通过多层次、多维度的调控网络 深刻影响着细胞命运决定和疾病进程^[16]。长链非编码 RNA 在转录、转录后和翻译水平的多种生物学过程中发挥重要的调控作用。本研究在 OSCC 细胞系 CAL27 中敲除 c-Myc, 结合高通量测序技术筛选出长链非

编码 RNA——LINC01578。数据分析显示,相比 OSCC 癌旁组织,c-Myc 和 LINC01578 在 OSCC 组织中过表达,表明其致癌潜力。基于此,课题组深入探究 c-Myc 和 LINC01578 之间的调控关系,通过在 OSCC 细胞系 HN6 和 CAL27 中过表达或者敲低 c-Myc,发现 LINC01578 在 c-Myc 过表达组中上调,在 c-Myc 敲低组中下调,这证明 LINC01578 和 c-Myc 在 OSCC 中可能存在协同作用。并且本研究还表明,c-Myc 通过结合 LINC01578 的启动子调节其在 CAL27 细胞中的转录活性,正向调控 LINC01578。还利用 Seahorse 实验检测敲低 LINC01578 后的 ECAR 以及 ATP 生成量和乳酸水平,证明 LINC01578 的敲低抑制 OSCC 糖酵解过程。又从功能上验证 c-Myc 通过 LINC01578 调控 OSCC 中的糖酵解过程。并且在 CAL27 细胞中进行克隆形成实验,发现 LINC01578 对 OSCC 细胞增殖有影响。因此,LINC01578 作为新发现的基因,在 OSCC 的发生和发展过程中扮演着关键角色,有望成为潜在的治疗靶点。本研究结果不仅增强了对 LINC01578 功能的理解,而且揭示了 c-Myc 通过上调 LINC01578 促进 OSCC 发展的新机制。然而,目前的研究仍处于早期阶段,多数结果集中在分子水平,缺乏临床相关证据。因此,在后续实验中将在分子水平上补充迁移和侵袭实验,并且利用 RNA pulldown 等方法识别与 LINC01578 结合的分子,进行蛋白验证和机制检验,并在动物模型中验证实验的结论。同时,本课题组计划收集更多临床组织数据,开展大规模队列验证,以确认 LINC01578 在 OSCC 中的临床价值。

综上所述,c-Myc 通过靶向调控 LINC01578 的表达影响 OSCC 细胞的代谢过程,进一步完善了 LINC01578 在 OSCC 中的调控网络。本研究为深入解析 OSCC 的发病机制及探索新的治疗靶点提供了坚实的分子生物学基础。随着分子靶向治疗的发展,将其与化疗、放疗等传统治疗手段相结合,有望改善 OSCC 患者的预后。

参考文献

- [1] Notarstefano V, Belloni A, Sabbatini S, et al. Cytotoxic effects of 5-azacytidine on primary tumour cells and cancer stem cells from oral squamous cell carcinoma: an *in vitro* FTIRM analysis [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2127. doi:10.3390/cells10082127.
- [2] Ko A M, Lee C H, Ko Y C. Betel quid-associated cancer: prevention strategies and targeted treatment [J]. *Cancer Lett*, 2020, 477: 60–9. doi:10.1016/j.canlet.2020.02.030.
- [3] Li M, Gao F, Zhao Q, et al. Tanshinone IIA inhibits oral squamous cell carcinoma *via* reducing Akt-c-Myc signaling-mediated aerobic glycolysis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 381. doi:10.1038/s41419-020-2579-9.
- [4] Sabit H, Tombuloglu H, Cevik E, et al. Knockdown of c-MYC controls the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells *in vitro* *via* dynamic regulation of key apoptotic marker genes [J]. *Int J Mol Cell Med*, 2021, 10(1): 45–55. doi:10.22088/IJMCM.BUMS.10.1.45.
- [5] Leng F, Miu Y Y, Zhang Y, et al. A micro-peptide encoded by HOXB-AS3 promotes the proliferation and viability of oral squamous cell carcinoma cell lines by directly binding with IGF2BP2 to stabilize c-Myc [J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(4): 697. doi:10.3892/ol.2021.12958.
- [6] Batista P J, Chang H Y. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease [J]. *Cell*, 2013, 152(6): 1298–307. doi:10.1016/j.cell.2013.02.012.
- [7] Xiong L, Tang Y, Tang J, et al. Downregulation of lncRNA HOT-TIP suppresses the proliferation, migration, and invasion of oral tongue squamous cell carcinoma by regulation of HMGA2-mediated Wnt/β-catenin pathway [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, 35(9): 720–30. doi:10.1089/cbr.2019.3017.
- [8] Yin X, Yang W, Xie J, et al. HOTTIP functions as a key candidate biomarker in head and neck squamous cell carcinoma by integrated bioinformatic analysis [J]. *Bio Med Res Int*, 2019, 2019: 5450617. doi:10.1155/2019/5450617.
- [9] Safi A F, Kauke M, Grandoch A, et al. Clinicopathological parameters affecting nodal yields in patients with oral squamous cell carcinoma receiving selective neck dissection [J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2017, 45(12): 2092–6. doi:10.1016/j.jcms.2017.08.020.
- [10] Gou Q, Zheng L L, Huang H. Unravelling the roles of autophagy in OSCC: a renewed perspective from mechanisms to potential applications [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 994643. doi:10.3389/fphar.2022.994643.
- [11] Jiang M, Li B. STAT3 and its targeting inhibitors in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cells*, 2022, 11(19): 3131. doi:10.3390/cells11193131.
- [12] Zhao B, Huang Z, Qin Z, et al. Enhancement of histone deacetylase inhibitor sensitivity in combination with cyclin-dependent kinase inhibition for the treatment of oral squamous cell carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 53(1): 141–56. doi:10.33594/000000126.
- [13] Zhong Y, Yang L, Xiong F, et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1 accelerates lung cancer cells migration and invasion by interacting with SNIP1 to upregulate c-Myc [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 240. doi:10.1038/s41392-021-00562-y.
- [14] Wang Z, Yan J, Zou T, Gao H. MicroRNA-1294 inhibited oral squamous cell carcinoma growth by targeting c-Myc [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(2): 2243–50. doi:10.3892/ol.2018.8967.
- [15] Li S, Zhang S, Chen J. C-Myc induced upregulation of long non-coding RNA SNHG16 enhances progression and carcinogenesis in

- oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2019, 26 (11–12): 400–10. doi:10.1038/s41417-018-0072-8.
- [16] McCabe E M, Rasmussen T P. lncRNA involvement in cancer stem cell function and epithelial-mesenchymal transitions [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 75: 38–48. doi:10.1016/j.semancer. 2020.12.012.

Experimental study of c-Myc affecting the metabolism of oral squamous cell carcinoma by regulating LINC01578

Du Junyi^{1,2}, Li Xiangyang^{1,2}, Zhu Youming^{1,2}

(¹School of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the regulatory relationship between long non-coding RNA LINC01578 and c-Myc, and to explore the effect of LINC01578 on the metabolic process of oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Methods After c-Myc was knocked down in OSCC cell line CAL27, LINC01578, a long non-coding RNA that is positively regulated by c-Myc, was identified by high-throughput sequencing technology. qRT-PCR was employed to measure the expression levels of c-Myc and LINC01578 in OSCC tissues and adjacent normal tissues. Following overexpression or knockdown of c-Myc in CAL27 and HN6 cells, qRT-PCR was conducted to validate the consistency with sequencing results. The binding of c-Myc to the LINC01578 promoter was confirmed using a dual luciferase reporter assay. Seahorse, ATP production and lactate production assays were utilized to examine the impact of c-Myc on glucose metabolism in OSCC via LINC01578. Colony formation assays assessed the proliferative capacity of OSCC cell lines. **Results** qRT-PCR analysis revealed significantly higher expression levels of c-Myc and LINC01578 in OSCC tissues compared to adjacent tissues ($P < 0.05$), confirming that c-Myc positively regulates LINC01578 expression. Consistent with sequencing data, c-Myc overexpression markedly upregulated LINC01578 ($P < 0.001$), while c-Myc knockdown led to a significant decrease in LINC01578 levels ($P < 0.0001$). Dual luciferase reporter gene assays demonstrated that c-Myc directly targets and transcriptionally enhanced LINC01578 expression ($P < 0.001$). Seahorse experiments indicated that c-Myc promoted glucose metabolism in OSCC through LINC01578 regulation ($P < 0.05$). Colony formation assays showed that LINC01578 overexpression enhanced OSCC cell proliferation, whereas LINC01578 knockdown inhibited it. **Conclusion** c-Myc upregulates LINC01578 expression in OSCC cells, thereby modulating glycolysis and promoting cell proliferation.

Key words oral squamous cell carcinoma; c-Myc; LINC01578; metabolism; glycolysis; proliferation of cells

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 31970677); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2308085Y23)

Corresponding authors Zhu Youming, E-mail: 95640021@ qq. com; Li Xiangyang, E-mail: hlxiangyang@163. com