

文章编号 1006-8147(2020)05-0445-06

论著

长链非编码 RNA-FENDRR 在膀胱癌组织中的表达及临床意义

王玉杰, 沈冲, 高深, 达拉, 胡海龙

(天津医科大学第二医院泌尿外科, 天津市泌尿外科研究所, 天津 300211)

摘要 目的:探究长链非编码 RNA-FENDRR 在膀胱癌组织中的表达情况及其与膀胱癌患者临床预后的关系。方法:收集 50 例(对)膀胱癌组织,用 qRT-PCR 检测 FENDRR 的表达量;同样在 T24、5637、EJ 和 253J-BV 等 4 种膀胱癌细胞系中验证其表达水平。用 χ^2 检验分析 FENDRR 和患者临床特征的相关性,用 Kaplan-Meier 生存曲线分析不同表达组患者的生存状况,用 Log-rank 检验两组患者的肿瘤特异性生存率差异。结果:LncRNA-FENDRR 在膀胱癌组织中明显下调($t=7.222, P<0.0001$),细胞系中验证结果一致,其中膀胱癌细胞系 5637 中表达量最低($P<0.0001$)。相关性分析发现 FENDRR 表达水平与患者浸润深度有关($\chi^2=4.612, P<0.05$)。生存分析发现,LncRNA-FENDRR 低表达组患者的肿瘤特异性生存率显著低于高表达组($HR=3.17, 95\% CI:1.37\sim7.32, P<0.05$)。结论:LncRNA-FENDRR 在膀胱癌组织中显著下调,其低表达与膀胱癌患者的不良预后有关。

关键词 膀胱癌;长链非编码 RNA;FENDRR

中图分类号 R737.14

文献标志码 A

Expression of long non-coding RNA FENDRR in human bladder cancer tissues and Clinical significance

WANG Yu-jie, SHEN Chong, GAO Shen, DA La, HU Hai-long

(Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To investigate the expression of long non-coding RNA-FENDRR (FOXF1 adjacent non-coding developmental regulatory RNA) in bladder cancer (BCa) tissues and its relationship with prognosis of patients with BCa. **Methods:** A total of 50 bladder cancer tissues were collected and qRT-PCR assay was performed to detect the expression of lncRNA-FENDRR, and its expression levels were also verified in four bladder cancer cell lines including T24, 5637, EJ and 253J-BV. Chi-square test was performed to evaluate the correlation between FENDRR expression and clinicopathological features of patients with BCa. Kaplan-Meier method and Log-rank test were performed to determine the correlation between FENDRR expression and prognosis of BCa patients. **Results:** LncRNA-FENDRR was significantly down-regulated in bladder cancer tissues ($t=7.222, P<0.0001$). The results were consistent in bladder cancer cell lines, among which the expression of lncRNA-FENDRR in cell line 5637 was the lowest ($P<0.0001$). Correlation analysis showed that expression levels of lncRNA-FENDRR were associated with the depth of invasion in patients ($\chi^2=4.612, P<0.05$). Survival analysis revealed that the tumor-specific survival rate of patients with low expression of lncRNA-FENDRR was significantly lower than that with high expression of lncRNA-FENDRR ($HR=3.17, 95\% CI:1.37\sim7.32, P<0.05$). **Conclusion:** LncRNA-FENDRR is significantly down-regulated in bladder cancer tissues and is associated with poor prognosis of bladder cancer patients.

Key words bladder cancer; long noncoding RNA; FENDRR

膀胱癌 (bladder cancer, BCa) 是全球第十大最常见肿瘤,我国第七大男性恶性肿瘤,2018 年全球预计约 549 000 新发病例,200 000 死亡病例,欧美国家或地区膀胱癌发病率呈逐年上升趋势,国内情况也类似,国家癌症中心最新数据显示我国膀胱癌年发病人数 62 000 人,发病率 8.83/10 万^[1-2]。膀胱癌有高复发率和容易进展等流行病学特征,因此需

要长期监测与随访,但目前尚未找到理想的肿瘤抗原相关的瘤标,所以有必要进一步研究膀胱癌的发病机制,探索对膀胱癌早期诊断、治疗与预后评价更敏感更有效的生物标志物^[3-4]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一种长度大于 200 个核苷酸的转录本^[5],在表观遗传^[6]、转录^[7]及转录后^[8]多个水平调控基因表达,通过多种方式激活促癌基因或沉默抑癌基因,参与肿瘤的发生、进展及转移等过程。LncRNA-FENDRR, 全称是 FOXF1 邻近非编码发育调控 RNA,是一种新颖的长链非编码 RNA,来源于 16 号染色体,转录本长度为 960 nt。

基金项目 天津市自然科学基金项目 (18PTLCSY00010);天津市卫生行业重点攻关项目 (16KG119)

作者简介 王玉杰 (1992-),男,硕士在读,研究方向:泌尿外科;通信作者:胡海龙, E-mail: hhllove2004@163.com。

近年来的研究证实 lncRNA-FENDRR 在肺癌^[9]、乳腺癌^[10]、胃癌^[11]、肝癌^[12]和胆管癌^[13]等多种肿瘤中异常表达,广泛涉及细胞增殖、侵袭、转移、凋亡或耐药等多方面调控。在泌尿生殖肿瘤中,目前已有研究报道 lncRNA-FENDRR 低表达与肾细胞癌^[14]和前列腺癌^[15]患者预后不良相关;在前列腺癌中通过 lncRNA-FENDRR/miR-18a-5p/RUNX1 轴调节细胞增殖和凋亡等生物过程^[5]。综上说明 lncRNA-FENDRR 可能是很有前景的新型生物标志物,或有望成为癌症治疗的新靶点。但是目前只有很少研究报道 lncRNA-FENDRR 在膀胱癌中的临床及预后意义,所以本研究将对膀胱癌中 lncRNA-FENDRR 的表达水平及其与临床特征及患者预后情况等相关性进行研究,为膀胱癌诊断与治疗提供新的方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 3 月—2019 年 5 月在天津医科大学第二医院泌尿外科治疗并进行手术切除的 50 例膀胱尿路上皮癌患者的癌组织及其癌旁正常组织标本,其中男 44 例,女 6 例;年龄 49~85 岁,平均 67.4 岁;分期 Ta~T1 24 例,T2~T4 26 例,淋巴转移阳性 23 例;肿瘤直径 0.5~5.5 cm,中位数 2.65 cm;吸烟者 29 例。所有入组患者术前均未接受放化疗等辅助治疗,术中取距离肿瘤边缘>5 cm 的膀胱正常黏膜作为癌旁正常组织为对照组,术后均经病理学检查证实。癌及癌旁组织采集后立即浸入液氮快速降温,储存于-80℃冰箱中以备用。记录入选患者的性别、年龄、分期、分级、肿瘤数目及大小等临床病理特征。本研究经天津医科大学第二医院伦理委员会审核并批准,所有入组患者或其直系亲属术前均已同意并签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 人膀胱上皮永生化细胞株 SV-HUC-1 购自上海酶研生物科技有限公司,膀胱癌细胞系中 T24、5637 和 EJ 由天津市泌尿外科研究所提供,253J-BV 由西安交通大学第一附属医院泌尿外科李磊教授馈赠。RNA 提取试剂 Trizol 购买自美国 Invitrogen 公司,组织总 RNA 提取试剂盒购买自美国 Omega bio-tek 公司,cDNA 合成试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂购买自瑞士 Roche 公司。lncRNA-FENDRR 以及内参 GAPDH 引物均通过 Primer Premier 6.0 引物设计软件设计,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。lncRNA-FENDRR 上游引物:5'-ACTGTCAAAACCAGCTCTGCC-3',下游引物:5'-TGGCCTCTTGCCCTGGTTTTT-3';GAPDH 上游引物:5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTC-3',下游引物:5'-TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC-3'。

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取、文库制备以及全转录组高通量测序 选取 5 例 T2 期及以上的膀胱癌及癌旁正常组织标本进行全转录组高通量测序(上海云序生物科技有限公司提供技术服务)。采用 Trizol 法提取组织标本的总 RNA,NanoDrop ND-1000 仪(Thermo Fisher Scientific,美国)测定 RNA 浓度、纯度(A_{260}/A_{280}),后者在 1.8~2.0 之间合格;变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性以及有无 gDNA 污染。构建去 rRNA 链的特异性文库,用 BioAnalyzer 2100 仪器(Agilent Technologies,美国)进行质控和定量后,用 Illumina HiSeq 4000(PE150)上机测序。

1.3.2 生物信息学分析 经过测序获得双端 reads,利用 Q30 进行质控,用 cutadapt 软件(v1.9.3)去掉低质量 reads,获得高质量 reads,将后者与人类参考基因组(UCSC HG19)对比。在 gtf 基因注释文件指导下,使用 cufflinks 软件(v2.2.1)获得 mRNA 和 lncRNA 的 FPKM 值,计算两组样品间的 fold change 和 P 值。fold change>2 或<-2,且 $P<0.05$ 被认为是 lncRNA 的表达有显著差异。根据临近关系,预测 lncRNA 的靶基因,进行 GO 和 KEGG 通路分析。

1.3.3 细胞培养 4 种膀胱癌细胞系均在含 10%胎牛血清、青霉素-链霉素的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱孵育;SV-HUC-1 细胞用 F-12K 培养基培养,其他条件同前;处于对数生长期的细胞用于下游实验。

1.3.4 细胞和组织的 RNA 提取 qRT-PCR 按照组织总 RNA 提纯试剂盒说明书步骤操作,采用过柱法提纯组织和细胞总 RNA,经超微量可见分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 视为纯度合格。采用两步法将总 RNA 逆转录为 cDNA,条件设置为 65℃ 10 min 预变性;25℃ 10 min,55℃ 30 min,85℃ 5 min,-20℃保存。qRT-PCR 采用 3 步法,扩增参数:95℃ 5min 预热;95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 30 s,扩增 45 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 lncRNA 表达的相对定量,每例组织或每种细胞设置 3 个复孔,求均值。

1.3.5 随访 本研究中对入选患者进行定期随访,至少每 3 个月随访 1 次,主要包括院内复查、电话或短信等方式。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 6.0 对本实验所有数据进行分析及作图,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数资料比较使用 χ^2 检验,两组比较使用 t 检验。lncRNA-FENDRR 表达水平与患者临床病理特征的相关性采用 χ^2 检验或 Fisher 精

确概率计算法(双侧)。*Kaplan-Meier* 法绘制不同亚组的术后生存曲线,用 *Log-rank* 检验比较两组之间的生存率有无差异。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 差异 lncRNA 表达谱及其生物信息学分析 以 $P<0.05$ 、变化倍数 >2.0 为标准,共筛选出 103 个差异表达 lncRNA,其中上调 36 个,下调 67 个(图 1)。分别列举上调和下调的前 10 个(表 1)。对差异 lncRNA 进行 GO 功能分析,上调部分集中于组蛋白多种表观遗传修饰、细胞凋亡过程的调控等生物过程,常染色质等细胞组分和组蛋白结合等分子功能;下调部分集中于 cAMP 介导的信号转导、mRNA 剪接点选择、调控 G 蛋白耦联受体信号通路、Ras 信号通路、p53 介导的内在凋亡信号通路等多条信号通路、黏附连接等细胞组分和泛素蛋白连接酶活性、蛋白激酶结合等分子功能。对差异 lncRNA 进行 KEGG 通路分析,结果主要集中在化学性致癌作用和黏附连接等。

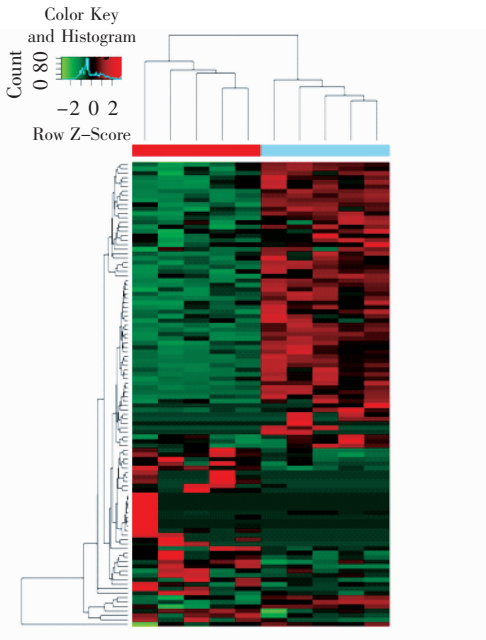


图 1 差异表达 lncRNA 的聚类分析图
Fig 1 The heatmap of differentially expressed lncRNAs

表 1 膀胱癌中差异表达 lncRNA 的 TOP10

Tab 1 Top10 of differentially expressed lncRNAs in bladder cancer

lncRNA	表达水平	定位	变化倍数	P
TCONS_I2_00005321	上调	chr11:65184125-65213011	2.72×10 ⁴⁴	0.013 0
TCONS_00001651	上调	chr1:121484056-121485434	33.75	0.000 3
uc001ycm.1	上调	chr14:94571181-94583033	13.02	0.032 8
ENST00000429829	上调	chrX:73012039-73072588	11.90	0.011 9
ENST00000562848	上调	chr12:54375292-54449814	10.50	0.045 1
TCONS_I2_00027748	上调	chr8:49277961-49337122	8.99	0.047 5
ENST00000525217	上调	chr11:287304-288987	8.11	0.024 5
ENST00000587187	上调	chr19:4903091-4962165	8.06	0.007 8
ENST00000448587	上调	chr19:5558177-5581226	6.74	0.010 5
ENST00000605886	上调	chr1:156611181-156631216	5.55	0.023 2
GU228573	下调	chr7:55086713-55324313	-4.92×10 ¹²	0.028 7
uc021xrd.1	下调	chr4:119809995-119982402	-43.54	0.009 8
ENST00000474768	下调	chr3:64501332-64997143	-37.71	0.018 4
ENST00000433310	下调	chr21:29811666-30047170	-34.52	0.000 1
ENST00000460833	下调	chr3:64501332-64997143	-34.29	0.006 3
ENST00000481312	下调	chr3:64501332-64997143	-33.96	0.028 7
ENST00000555383	下调	chr14:96671015-96735304	-27.83	0.009 4
ENST00000515734	下调	chr5:58264864-59843484	-27.24	0.035 7
ENST00000593604	下调	chr16:86508134-86542705	-23.21	0.027 8
ENST00000598996	下调	chr16:86508134-86542705	-23.07	0.047 1

2.2 lncRNA 靶标筛选与验证 从差异 lncRNA 表达谱中选择了明显上调 (miR205HG) 和显著下调 (FENDRR、CARMN、PART1、MEG3) 的共 5 个 lncRNA 作为靶标,在预实验中,笔者在 24 例 BCa 组织验证上述靶标的表达水平(图 2),结果发现 PART1

和 MEG3 组织验证结果与测序结果相悖,针对剩余 3 个靶标进行文献复习,发现 FENDRR 是一个比较新颖的长链非编码 RNA,在膀胱癌中鲜有研究,综合考虑后,本研究选择 lncRNA-FENDRR 作为研究对象。

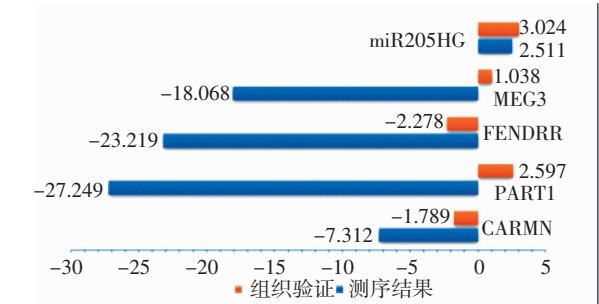


图 2 靶标组织验证结果

Fig 2 The expression level of targets in BCa tissues

2.3 lncRNA-FENDRR 在膀胱癌组织和细胞中表达水平 在 50 例膀胱癌组织中验证 lncRNA-FENDRR 表达水平,总体水平上 lncRNA-FENDRR 在膀胱癌组织中明显下调(图 3A);lncRNA-FENDRR 在癌组织中的相对表达量为 0.431 ± 0.564 ,显著低于癌旁组织 1.007 ± 0.014 ,差异有统计学意义($t=7.222$, $P<0.0001$)(图 3B)。与 SV-HUC-1 相比,在 T24、EJ、5637 和 253J-BV 等膀胱癌细胞系中 lncRNA-FENDRR 显著下调,其中 5637 相对表达量最低,差异有统计学意义($P<0.0001$)(图 3C)。

2.4 lncRNA-FENDRR 与患者临床特征的相关性 以膀胱癌组织中 lncRNA-FENDRR 相对表达量的上四分位数 (P_{75}) 为截断值,将 lncRNA-FENDRR 表达量分为高表达组(12 例)和低表达组(38 例)。相关性分析发现,lncRNA-FENDRR 表达水平与肿瘤浸润深度相关($P=0.0475$),而与其他临床特征无关(表 2)。

表 2 lncRNA-FENDRR 表达水平与膀胱癌患者临床病理特征的相关性

Tab 2 The relationship between expression level of lncRNA-FENDRR and clinical characteristics of patients with BCa

临床特征	分组	lncRNA FENDRR 表达水平[n(%)]		合计	χ^2	P
		低表达(n=38)	高表达(n=12)			
性别	男	35(79.55)	9(20.45)	44	2.527 0	0.140 6
	女	3(50.00)	3(50.00)	6		
年龄(岁)	<60	8(66.67)	4(33.33)	12	0.754 1	0.447 6
	≥ 60	30(78.95)	8(21.05)	38		
吸烟史	有	15(71.43)	6(28.57)	21	0.414 8	0.738 4
	无	23(79.31)	6(20.69)	29		
肿瘤数目	单发	19(73.08)	7(26.92)	26	0.253 7	0.744 7
	多发	19(79.17)	5(20.83)	24		
肿瘤直径(cm)	<3	19(67.86)	9(32.14)	28	2.313 0	0.186 3
	≥ 3	19(86.36)	3(13.64)	22		
浸润深度	Ta~T1	15(62.50)	9(37.50)	24	4.612 0	0.047 5
	T2~T4	23(88.46)	3(11.54)	26		
病理分级	低级别	14(63.64)	8(36.36)	22	3.292 0	0.098 6
	高级别	24(85.71)	4(14.29)	28		
淋巴浸润	Nx~N0	18(66.67)	9(33.33)	27	2.803 0	0.111 9
	N1~N3	20(86.96)	3(13.04)	23		

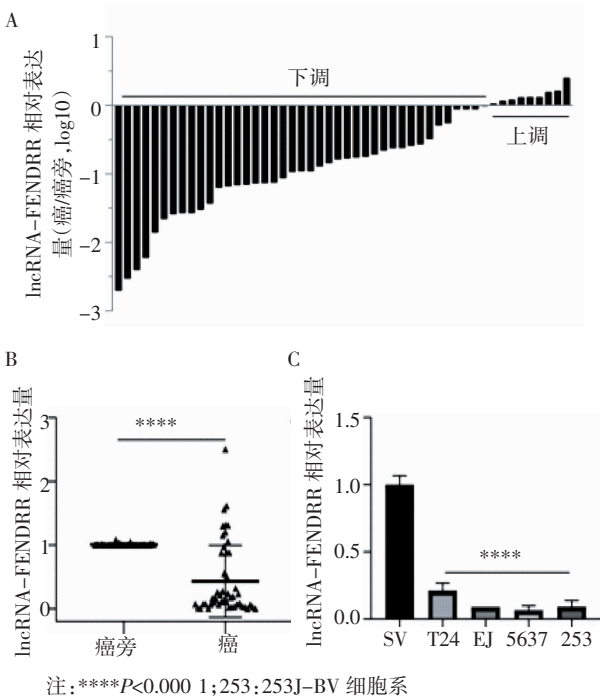


图 3 lncRNA-FENDRR 在组织和细胞系的表达水平

Fig 3 The expression level of lncRNA-FENDRR in BCa tissues and cell lines

2.5 lncRNA-FENDRR 与膀胱癌患者临床预后的关系 定义入组患者因膀胱癌死亡为主要终点事件,入组患者最长随访时间为 21.8 个月,中位随访时间 10.3 个月。Kaplan-Meier 生存曲线显示,lncRNA-FENDRR 低表达组肿瘤特异性生存率(tumor specific survival rate,TSS)低于高表达组($HR=3.17$, $95\%CI:1.37\sim 7.32$),亚组之间 TSS 差异具有统计学意义(Log-rank

$P=0.0308$)(图4)。

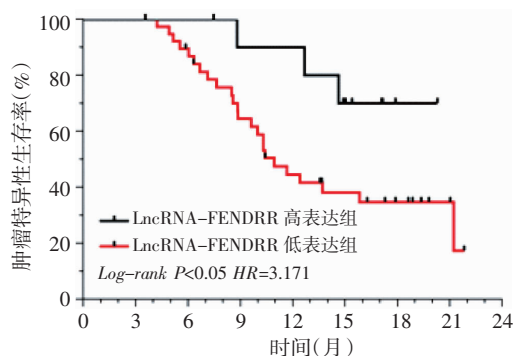


图4 lncRNA-FENDRR 不同表达组的肿瘤特异性生存率

Fig 4 The TSS of the patients with low and high expression of lncRNA-FENDRR

3 讨论

迄今为止,膀胱癌患者治疗策略的制定与预后的评估是基于其临床和病理指标,但这些方法的主要缺点是在某些情况下肿瘤呈现相似的组织学特征,但是对相同治疗方案的反应也不同,患者的预后情况也不尽一致^[16-17]。因此,应将常规方法和分子生物标志物相结合,可改善这些患者的临床结局^[18]。随着癌症基因组学的发展,揭示了 lncRNA 不仅可以作为肿瘤的新治疗靶点,还可以作为早期诊断与复发和预测肿瘤患者预后的生物标志物。研究发现,在非肌层浸润性膀胱癌中,HOTAIR^[19]、UNMIBC^[20]与肿瘤复发和患者不良预后相关;Li 等^[21]发现 MALAT1 表达上调与患者不良预后有关,表明 MALAT1 可能是预测膀胱癌患者预后的独立生物标志物。

本研究前期通过测序获得膀胱癌组织中 lncRNA 差异表达谱,从中选择了显著上调或下调的 5 个 lncRNA 作为候选靶标,经预实验中组织验证,最终选择 lncRNA-FENDRR 作为研究对象。近年来研究发现,lncRNA-FENDRR 在多种癌症中均显著下调。本研究在 50 例膀胱癌组织中验证发现(图 3A、3B),总体水平上,lncRNA-FENDRR 在 BCa 组织中也是显著下调的;同时在 4 种膀胱癌细胞系中验证,结果一致。研究表明,在非小细胞性肺癌^[9]和胃癌^[11]中 lncRNA-FENDRR 表达水平与浸润深度显著相关;而且在胃癌^[11]、肾细胞癌^[14]和前列腺癌^[15]中也证实,lncRNA-FENDRR 的低表达与患者不良预后相关。本研究以膀胱癌组织中 lncRNA-FENDRR 表达量的上四分位数为截断值,将其分为低表达组和高表达组,通过 χ^2 检验对患者临床资料进行相关性分析(表 2),结果发现 lncRNA-FENDRR 表达水平与浸润深度显著相关,提示 lncRNA-FENDRR 可能参与膀胱癌从低分期到高分期的进展过程。经过随访,

结果发现 lncRNA-FENDRR 低表达组 BCa 患者的 TSS 明显低于高表达组患者,差异具有统计学意义,提示在膀胱癌中 lncRNA-FENDRR 低表达预示着 BCa 患者的预后不良。但本研究的局限性在于纳入病例不足,随访时间较短,这对结果有一定的影响。综上所述,提示 lncRNA-FENDRR 可能参与膀胱癌进展过程,而且 lncRNA-FENDRR 低表达与 BCa 患者不良预后有关,但是否是膀胱癌预后的独立预测因子需要更多研究证实。

lncRNA-FENDRR 在膀胱癌组织和细胞系中均显著下调;lncRNA-FENDRR 表达水平与浸润深度有关;随访发现 lncRNA-FENDRR 低表达组患者的 TSS 更低,即 lncRNA-FENDRR 低表达与患者不良预后相关,lncRNA-FENDRR 可能是预测膀胱癌预后的潜在生物标志物,有待更多研究证实。

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, 2018, 68(6): 394
- [2] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等.2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19
- [3] Kim Y J, Kim W J. Can we use methylation markers as diagnostic and prognostic indicators for bladder cancer[J]. Investig Clin Urol, 2016, 57(Suppl 1): S77
- [4] Kamat A M, Hegarty P K, Gee J R, et al. ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012: screening, diagnosis, and molecular markers[J]. Eur Urol, 2013, 63(1): 4
- [5] Ponting C P, Oliver P L, Reik W. Evolution and functions of long non-coding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 629
- [6] Mercer T R, Mattick J S. Structure and function of long Noncoding RNAs in epigenetic regulation[J]. Nat Struct Mol Biol, 2013, 20(3): 300
- [7] Bonasio R, Shiekhattar R. Regulation of transcription by long non-coding RNAs[J]. Annu Rev Genet, 2014, 48: 433
- [8] Yoon J H, Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA[J]. J Mol Biol, 2013, 425(19): 3723
- [9] 徐然,尚超,石文君.长链非编码 RNA FENDRR 对非小细胞肺癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(17): 2667
- [10] 张玮,沈艳艳,王晓慧,等.长链非编码 RNA-FOXF1 相邻非编码 RNA 在乳腺癌组织的表达及其对阿霉素敏感性的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36: 1459
- [11] Xu T P, Huang M D, Xia R, et al. Decreased expression of the long non-coding RNA FENDRR is associated with poor prognosis in gastric cancer and FENDRR regulates gastric cancer cell metastasis by affecting fibronectin1 expression [J]. J Hematol Oncol, 2014, 7: 63
- [12] Yu Z, Zhao H, Feng X, et al. Long Non-coding RNA FENDRR acts as a miR-423-5p sponge to suppress the treg-mediated immune escape of hepatocellular carcinoma cells[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 17: 516
- [13] Qin X, Lu M, Zhou Y, et al. lncRNA FENDRR represses proliferation, migration and invasion through suppression of survivin in cholangio-

(下转第 465 页)

实验结果显示,pH 值分别为 2.5、3.0、3.5 的 3 种磷酸溶液对组织蛋白酶 K 均有激活作用,组织蛋白酶 K 的活性随磷酸溶液 pH 值的升高酶活性逐渐加强。在 pH3.0 和 pH3.5 时,磷酸和柠檬酸对组织蛋白酶 K 的作用相当。研究发现,组织蛋白酶 K 在环境 pH 值为 4.0~5.5 时,随着环境 pH 值的上升,酶的活性逐渐增强,其发挥活性的最佳 pH 值为 5.5^[17-18]。因此,推测在摄入含有磷酸的饮料后,口腔环境 pH 值迅速降低,会使暴露于口腔不同组织中组织蛋白酶 K 活性增加,并发挥降解胶原基质的作用。伴随唾液的缓冲作用,口腔环境中 pH 值逐渐升高,组织蛋白酶 K 活性会更强,直到口腔环境 pH 恢复至 5.5 以上时,组织蛋白酶对胶原的破坏作用才逐渐减弱。

综上所述,可口可乐和汇源橙汁及其所含的饮料酸均能使组织蛋白酶 K 活性增强,pH<3.0 的柠檬酸对组织蛋白酶 K 活性的增强作用尤为显著。因此,摄入酸蚀性强的饮料尤其是含有柠檬酸的饮料,可能促进组织蛋白酶 K 介导的牙本质及牙周组织胶原纤维降解,加速龋病、牙周炎、种植体周围炎的进展。

参考文献:

- [1] Zhao Q, Jia Y, Xiao Y. Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009,380(4):721
- [2] Li Z, Hou W S, Escalante-Torres C R, et al. Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32): 28669
- [3] Tersariol I L, Geraldini S, Minciotti C L, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex[J]. *J Endod*, 2010, 36(3): 475
- [4] Nascimento F D, Minciotti C L, Geraldini S, et al. Cysteine cathepsins in human carious dentin[J]. *J Dent Res*, 2011,90(4): 506
- [5] Garg G, Pradeep A R, Thorat M K. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid levels of Cathepsin K in periodontitis[J]. *Arch Oral Biol*, 2009, 54(11):1046
- [6] Tjaderhane L, Nascimento F D, Breschi L, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins[J]. *Dent Mater*, 2013, 29(1):116
- [7] Dubin G. Proteinaceous cysteine protease inhibitors[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(6): 653
- [8] Zhang W, Yang W, Wu S, et al. Effects of acid etching and adhesive treatments on host-derived cysteine cathepsin activity in dentin[J]. *J Adhes Dent*, 2014,16(5):415
- [9] Turk B, Bieth J G, Bjork I, et al. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins[J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1995, 376(4):225
- [10] Millward A, Shaw L, Harrington E, et al. Continuous monitoring of salivary flow rate and pH at the surface of the dentition following consumption of acidic beverages[J]. *Caries Res*, 1997,31(1): 44
- [11] Reddy A, Norris D F, Momeni S S, et al. The pH of beverages in the United States[J]. *J Am Dent Assoc*,2016,147(4): 255
- [12] 袁牧,张清,高学军. 可口可乐对牙釉质早期脱矿后表面显微硬度的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2016, 51(6): 357
- [13] Venediktova A A, Falameeva O V, Kolosova N G, et al. Cathepsin K and matrix metalloproteinases activity in the bone tissue of OXYS rats with developing osteoporosis [J]. *Biomed Khim*, 2010, 56(2): 274
- [14] Kafienah W, Bromme D, Buttler D J, et al. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix[J]. *Biochem J*, 1998,331 (Pt 3): 727
- [15] Mogi M, Otagoto J. Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis[J]. *Arch Oral Biol*, 2007, 52(9): 894
- [16] Strbac G D, Monov G, Cei S, et al. Cathepsin K levels in the crevicular fluid of dental implants: a pilot study[J]. *J Clin Periodontol*, 2006, 33(4):302
- [17] Bromme D, Okamoto K, Wang B B, et al. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(4):2126
- [18] Tezvergil-Mutluay A, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix[J]. *J Dent Res*, 2013,92(1): 87
- [14] He W, Zhong G, Wang P, et al. Downregulation of long noncoding RNA FENDRR predicts poor prognosis in renal cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2019,17(1):103
- [15] Zhang G, Han G, Zhang X, et al. Long non-coding RNA FENDRR reduces prostate cancer malignancy by competitively binding miR-18a-5p with RUNX1[J]. *Biomarkers*, 2018,23(5): 435
- [16] Jacobs B L, Lee C T, Montie J E. Bladder cancer in 2010: how far have we come[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010,60(4): 244
- [17] Roupret M, Huperran V, Yates D R, et al. A comparison of the performance of microsatellite and methylation urine analysis for predicting the recurrence of urothelial cell carcinoma, and definition of a set of markers by Bayesian network analysis[J]. *BJU Int*, 2008,101(11):1448
- [18] Ye F, Wang L, Castillo-Martin M, et al. Biomarkers for bladder cancer management: present and future[J]. *Am J Clin Exp Urol*, 2014,2(1):1
- [19] Martínez-Fernández M, Feber A, Dueñas M, et al. Analysis of the polycomb-related lncRNAs HOTAIR and ANRIL in bladder cancer[J]. *Clin Epigenetics*, 2015, 7: 109
- [20] Zhang S, Zhong G, He W, et al. LncRNA Up-Regulated in nonmuscle invasive bladder cancer facilitates tumor growth and acts as a negative prognostic factor of recurrence[J]. *J Urol*, 2016,196(4): 1270
- [21] Li C, Cui Y, Liu L F, et al. High expression of long noncoding RNA MALAT1 indicates a poor prognosis and promotes clinical progression and metastasis in bladder cancer[J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2017,15(5): 570

(2020-03-27 收稿)

(2019-12-04 收稿)

(上接第 449 页)

carcinoma cells[J]. *Cell Cycle*, 2019,18(8): 889