

微小 RNA-216a 调控 JAK2/STAT3 通路对鼻咽癌细胞增殖、侵袭、自噬及血管生成的影响

郑方静, 赖红华, 赖晓兰, 包伟晶, 富显果, 周素娟, 林益匡, 黄传钱, 武文娟

(宁德师范学院附属宁德市医院, 福建 宁德 352100)

摘要: [目的] 探究微小 RNA (microRNA, miR)-216a 靶向调控酪氨酸蛋白激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 (Janus protein tyrosine protein kinase 2/ signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3) 信号通路对鼻咽癌细胞增殖、侵袭、自噬及血管生成的影响。[方法] Target Scan Human 预测 miR-216a 与 JAK2 的结合位点, 双荧光素酶实验验证 miR-216a 与 JAK2 是否结合; 免疫组化染色检测正常鼻咽黏膜组织、鼻咽癌组织标本 p-JAK2、p-STAT3 的表达水平, 并分析 p-JAK2、p-STAT3 表达水平与患者临床病理参数的关系。采用 Lipofectamine™3000 将 miR-216a 模拟物双链小 RNA、阴性对照双链小 RNA 转染至 CNE-2 细胞构建过表达 miR-216a 细胞系, 细胞分为对照组、miR-NC 组、miR-216a 组。将抑制剂双链小 RNA、抑制剂对照双链小 RNA 转染至 CNE-2 细胞构建低表达 miR-216a 细胞系, 细胞分为对照组、抑制 miR-NC 组、抑制 miR-216a 组。采用 qRT-PCR 检测细胞 JAK2、STAT3 mRNA 表达水平; MTT 法、Transwell 小室、皮下种植瘤模型、小管形成实验、吖啶橙染色分别检测细胞增殖、侵袭、移植瘤生长、血管形成和自噬泡形成的能力; Western blot 检测 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、微管相关蛋白轻链 3-II (microtubule-associated protein light chain 3-II, CL3-II)、酵母自噬相关基因 6 的哺乳动物同源体 (autophagy related protein ATG6, Beclin1)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达水平。[结果] 双荧光素酶实验验证了 miR-216a 对 JAK2 的靶向调控作用。鼻咽癌组织 p-JAK2、p-STAT3 阳性表达率 (75.0%, 68.3%) 明显高于正常鼻咽黏膜组织 (10%, 13.3%) ($P < 0.05$)。p-JAK2、p-STAT3 表达越高, 浸润深度越严重, 越容易发生淋巴结和远处转移 (P 均 < 0.05)。细胞实验显示: 与 miR-NC 组相比, miR-216a 组细胞 24、48、72、96 h 吸光度值 (0.32 ± 0.03 vs 0.15 ± 0.04 , 0.58 ± 0.07 vs 0.24 ± 0.06 , 0.86 ± 0.10 vs 0.41 ± 0.06 , 1.48 ± 0.11 vs 0.75 ± 0.07)、细胞侵袭数目 (101.00 ± 11.00 vs 22.67 ± 5.77)、血管形成数目 (127.53 ± 10.61 vs 74.36 ± 8.48) 明显降低, 移植瘤体积 [$(1\ 545.21 \pm 70.71) \text{ mm}^3$ vs $(485.24 \pm 91.92) \text{ mm}^3$] 减小, JAK2、p-JAK2、p-STAT3、VEGF 蛋白表达量 (1.85 ± 0.07 vs 0.93 ± 0.11 , 1.03 ± 0.07 vs 0.32 ± 0.05 , 0.92 ± 0.09 vs 0.44 ± 0.08 , 1.17 ± 0.05 vs 0.55 ± 0.07) 明显减少 (P 均 < 0.05); 细胞自噬能力、Beclin1、CL3-II 蛋白表达量 (0.30 ± 0.08 vs 1.03 ± 0.11 , 0.38 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.08) 均显著性升高 ($P < 0.05$)。与抑制 miR-NC 组相比, 抑制 miR-216a 组 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达量 (1.35 ± 0.07 vs 1.93 ± 0.11 , 0.55 ± 0.07 vs 1.28 ± 0.11 , 0.45 ± 0.07 vs 1.23 ± 0.11) 明显升高 (P 均 < 0.05)。[结论] JAK2、STAT3 在鼻咽癌组织及细胞中表达量升高且发挥促癌作用, 其作用机制可能是 miR-216a 通过靶向调控 JAK2/STAT3 信号通路, 提高了细胞自噬水平, 抑制了增殖、迁移和血管形成能力, 对鼻咽癌患者的治疗和预后具有指导意义。

关键词: 微小 RNA-216a; 酪氨酸蛋白激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 信号通路; 鼻咽癌; 增殖; 侵袭; 自噬; 血管生成

中图分类号: R739.6 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2021)11-0905-10

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.11.B003

Effects of microRNA-216a on Proliferation, Invasion, Autophagy and Microangiogenesis in Nasopharyngeal Carcinoma Cells Through Regulation of JAK2/STAT3 Signaling Pathway

ZHENG Fang-jing, LAI Hong-hua, LAI Xiao-lan, BAO Wei-jing, FU Xian-guo, ZHOU Su-juan, LIN Yi-kuang, HUANG Chuan-qian, WU Wen-juan

(Ningde Municipal Hospital Affiliated to Ningde Normal University, Ningde 352100, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of microRNA-216a (miR-216a) on the proliferation, invasion, autophagy and angiogenesis of nasopharyngeal carcinoma cells and its relation with Janus protein tyrosine protein kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signal pathway. [Methods] TargetScan-Human was used to predict the binding site of miR-216a and JAK2, dual luciferase assay was used to verify whether miR-216a binds to JAK2, immunohistochemical staining was used to detect the expression levels of p-JAK2 and p-STAT3 in normal nasopharyngeal mucosal tissues and nasopharyngeal carcinoma tissue specimens, and the relationship between the expression levels of p-JAK2, p-STAT3 and the clinical pathological parameters of patients was analyzed. The miR-216a agomir and miR-NC agomir were transfected into CNE-2 cells with lipofectamine™3000; and the anti-miR-216a agomir and anti-miR-NC agomir were transfected into CNE-2 cells. MTT method, transwell test, subcutaneous tumor model, tubule formation assay and acridine orange staining were used

基金项目: 福建省科技厅自然科学基金面上项目 (2018J01222); 福建省卫生计生青年科研课题资助计划 (2018-1-99)

通信作者: 武文娟, 副主任医师, 硕士; 宁德师范学院附属宁德市医院放疗科, 福建省宁德市东侨经济技术开发区闽东东路 13 号 (352100); E-mail: 360899752@qq.com

收稿日期: 2021-08-18; 修回日期: 2021-10-15

to detect the ability of cell proliferation, invasion, tumor growth, angiogenesis and autophagic vesicle formation, respectively. Western blot was used to detect the expression level of p-JAK2, p-STAT3, microtubule-associated protein light chain 3-II (CL3-II), yeast autophagy-related gene 6 mammals homolog (autophagy related protein ATG6, Beclin1), vascular endothelial growth factor(VEGF). [Results] The dual luciferase assay verified the targeted regulation of miR-216a on JAK2. The positive expression rate of p-JAK2 and p-STAT3 in nasopharyngeal carcinoma tissues (75.0%, 68.3%) was significantly higher than that of normal nasopharyngeal mucosal tissues (10.0%, 13.3%)($P < 0.05$). And the expression of p-JAK2 and p-STAT3 was positively correlated with the depth of invasion, lymph node and distant metastasis(P all < 0.05). Compared with the miR-NC group, the absorbance value at 24, 48, 72, 96 h(0.32 ± 0.03 vs 0.15 ± 0.04 , 0.58 ± 0.07 vs 0.24 ± 0.06 , 0.86 ± 0.10 vs 0.41 ± 0.06 , 1.48 ± 0.11 vs 0.75 ± 0.07), number of cell invasion(101.00 ± 11.00 vs 22.67 ± 5.77), number of blood vessel formation(127.53 ± 10.61 vs 74.36 ± 8.48) and transplanted tumor volume(1545.21 ± 70.71 mm³ vs 485.24 ± 91.92 mm³) were significantly reduced in the miR-216a group. The expression of JAK2, p-JAK2, p-STAT3 and VEGF protein (1.85 ± 0.07 vs 0.93 ± 0.11 , 1.03 ± 0.07 vs 0.32 ± 0.05 , 0.92 ± 0.09 vs 0.44 ± 0.08 , 1.17 ± 0.05 vs 0.55 ± 0.07) was significantly reduced (P all < 0.05). The expression of Beclin1, CL3-II protein (0.30 ± 0.08 vs 1.03 ± 0.11 , 0.38 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.08) were significantly increased($P < 0.05$). Compared with the anti-miR-NC group, the expression of JAK2, p-JAK2 and p-STAT3 protein in the anti-miR-216a group (1.35 ± 0.07 vs 1.93 ± 0.11 , 0.55 ± 0.07 vs 1.28 ± 0.11 , 0.45 ± 0.07 vs 1.23 ± 0.11) was significantly increased(P all < 0.05). [Conclusion] The expression of JAK2 and STAT3 is up-regulated in nasopharyngeal carcinoma tissue and cells, which may play a cancer-promoting effect. The mechanism may be that miR-216a increases the level of autophagy and inhibits the ability of proliferation, migration and angiogenesis via regulating JAK2/STAT3 signaling pathway.

Subject words: microRNA-216a; tyrosine protein kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway; nasopharyngeal carcinoma; proliferation; invasion; autophagy; angiogenesis

鼻咽癌是一种源发于鼻咽部的头颈部恶性肿瘤,其起病隐匿,转移性强,大多数患者就诊时已属中晚期,且治疗后容易复发或远处转移^[1-2]。临床常用放疗联合化疗进行中晚期及远处转移患者的治疗,然而效果欠佳。因此,探寻鼻咽癌的分子靶向治疗极为重要。研究发现细胞自噬与肿瘤的发生、发展密切相关,是肿瘤细胞存活的关键因素之一^[3-4]。临床将自噬诱导剂作为一种化疗药物与放疗综合治疗鼻咽癌。肿瘤的生长、转移依赖于血管生成,新生的血管促进了肿瘤的侵袭和转移。因此,抑制肿瘤微血管生成是抑制肿瘤恶性进展的关键。微小RNA(microRNA, miR)是一种长度约为22个核苷酸的单链非编码RNA,能够与靶mRNA 3'非编码区(3'UTR)特异性结合,使转录后靶基因表达沉默。miR-216a是一种与肿瘤发生相关的功能性miRNA,参与多种肿瘤的发生、发展。Wang等^[5]发现miR-216a通过靶向调控微管相关蛋白1S的表达,抑制人结肠癌细胞自噬。Zhang等^[6]发现miR-216a-5p通过调节肿瘤蛋白翻译调节因子1的表达,抑制胰腺癌细胞自噬的发生。Wang等^[7]发现miR-216a通过抑制抗分化非编码RNA的表达,抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移和血管生成。Tao等^[8]发现miR-216a通过抑制酪氨酸蛋白激酶2/信号转导和转录激活因子3(Janus

protein tyrosine protein kinase 2/ signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3)信号通路抑制胃癌细胞的侵袭转移和上皮间质转化。关于miR-216a与鼻咽癌的关联以及对细胞自噬水平和血管形成可能的作用机制研究较少。本研究拟探讨miR-216a及其靶基因在鼻咽癌组织和细胞中的表达水平,以及是否通过调控JAK2/STAT3信号通路对细胞自噬水平和微血管形成产生影响,为治疗鼻咽癌提供理论和实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集宁德师范学院附属宁德市医院2019年2月至10月期间鼻咽癌患者60例的病历资料及鼻咽黏膜组织标本。采集的标本保存于液氮。一般临床资料包括年龄、性别、淋巴结转移、浸润深度、TNM分期等临床信息。纳入标准:①经病理确诊为鼻咽癌;②无其他部位恶性肿瘤。排除标准:①癌旁组织有明显的炎症细胞浸润;②其他恶性肿瘤;③妊娠或哺乳期女性。另外选取健康者30人鼻咽黏膜组织为对照组。患者均签署知情同意书。本研究已获得宁德师范学院附属宁德市医院伦理委员会批准(20170907)。

1.2 研究材料

人鼻咽癌细胞株 CNE-2、人脐静脉内皮细胞株 HUVECs(上海中科院细胞所)。裸鼠[斯贝福(北京)生物技术有限公司, 许可证号:SYXK(京)2019-0030]。miR-216a 模拟物双链小 RNA、阴性对照双链小 RNA、miR-216a 抑制剂双链小 RNA、抑制剂对照双链小 RNA(上海吉码制药技术有限公司);miR-216a、JAK2、STAT3 引物(上海生工生物工程有限公司);兔抗人 JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3、微管相关蛋白轻链 3-II (microtubule-associated protein light chain 3-II, CL3-II)、酵母自噬相关基因 6 的哺乳动物同源体 (autophagy related protein ATG6, Beclin1)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体(美国 Cell Signal Technology 公司);免疫组化 S-P 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);胎牛血清、RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);Trizol RNA 提取试剂盒、Lipofectamine™3000 脂质体、反转录试剂盒(大连宝生物技术有限公司);BCA 蛋白测定试剂盒(南京凯基生物技术有限公司);DYCZ 425D 型双垂直电泳仪(北京六一仪器厂);二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司);CKX41 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染及分组

将 CNE-2 细胞接种于 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 当细胞融合达到 80%时胰酶消化传代。以 1×10^5 个/孔的密度将细胞接种于 6 孔板, 采用 Lipofectamine™3000 将 miR-216a 模拟物双链小 RNA、阴性对照双链小 RNA 转染至 CNE-2 细胞构建过表达 miR-216a 细胞系, 细胞分为对照组、miR-NC 组、miR-216a 组。将 miR-216a 抑制剂双链小 RNA、抑制剂对照双链小 RNA 转染至 CNE-2 细胞构建低表达 miR-216a 细胞系, 细胞分为对照组、抑制 miR-NC 组、抑制 miR-216a 组。

1.3.2 靶基因预测及双荧光素酶实验

使用生物信息学数据库 Target Scan Human 预测 miR-216a 的相关靶基因, 发现 JAK2 基因可能是 miR-216a 的靶基因。以 JAK2 质粒为载体, 分别构建野生型 3'UTR (JAK2 3'UTR-WT) 和突变型 3'UTR (JAK2 3'UTR-MUT) 质粒。将两种质粒分别与 miR-216a 模拟物双链小 RNA、阴性对照双链小 RNA 混

合, 通过 Lipofectamine™3000 分别共转染至细胞, 转染 48 h 后, 收集各组细胞制备细胞裂解物, 按试剂盒要求检测荧光素酶活性。

1.3.3 免疫组化检测鼻咽癌患者 p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水平

取患者冻存的鼻咽黏膜组织, 经固定、包埋等步骤制作成 $3 \mu\text{m}$ 石蜡切片。经 60°C 熔蜡、二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱水、高压抗原修复后, 分别滴加 p-JAK2、p-STAT3 (1:200) 一抗孵育过夜, (辣根过氧化物酶标记) 二抗孵育 20 min, DAB 显色液显色, 苏木精复染, 乙醇梯度脱水、透明、封片, 镜检 ($\times 200$)。

染色结果判定: 随机选取 5 个视野, 根据染色面积及强度进行评分。染色面积: 1%~5% 为 0 分, 6%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~100% 为 3 分。染色强度: 未染色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。染色面积 $\times$ 染色强度为染色总分, 总分 ≥ 3 分为阳性表达, < 3 分为阴性表达。

1.3.4 qRT-PCR 检测各组细胞 JAK2、STAT3 mRNA 表达水平

采用 Trizol 法提取 CNE-2 细胞总 RNA。反转录成 cDNA 进行扩增, GAPDH 为内参。公式 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算 JAK2、STAT3 的相对表达水平。反应体系: 94°C 预变性 30 s, 94°C 5 s, 62°C 30 s, 40 个循环。PCR 引物序列: JAK2-F: 5'-TCTGTGGGAGATCTGCAGTG-3', JAK2-R: 5'-TTTCAGAGCTGTCATCCGTG-3'; STAT3-F: 5'-GACCCGCCAACAAATTAAG-3', STAT3-R: 5'-TG-GTGTCCAGTTTACCACGA-3'; GAPDH-F: 5'-TCAAGAGGTGGTGAAGCAGG-3', GAPDH-R: 5'-AGCG-TCAAAGGTGGAGGAGTG-3'。

1.3.5 MTT 法检测细胞增殖能力

细胞转染 24 h 后, 用胰酶消化细胞并制成细胞悬液, 以 1×10^3 个/孔的密度将细胞接种于 96 孔板, 每孔设 3 个复孔, 分别培养 24、48、72、96 h, 然后加入 MTT 溶液, 37°C 孵育 4 h, 离心去上清, 最后加入 DMSO 溶解紫色结晶, 使用酶标仪于 490 nm 波长处检测吸光度值。

1.3.6 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力

在 Transwell 小室平板平铺一层 Matrigel 基质胶 (约 $100 \mu\text{L}$), 并将以无血清培养基中的各组单细胞悬液加至上室, 在小室下室平铺含有 20%胎牛血清的 DMEM 培养基, 置入 37°C 、5% CO_2 培养箱中培

养 24 h, PBS 清洗后, 甲醛固定, 结晶紫染色后, 显微镜($\times 400$)下观察并计数穿过膜的细胞数。

1.3.7 裸鼠皮下种植瘤模型检测细胞体内生长能力

裸鼠分为对照组、miR-NC 组、miR-216a 组, 每组各 8 只。调整转染后 CNE-2 细胞浓度, 以 1×10^6 个/孔的密度将细胞接种于 24 孔板培养, 胰酶消化并收集细胞, 制成密度为 1×10^7 个/mL 的细胞悬液。裸鼠右肩背部皮下接种 0.2 mL, 每周接种 1 次, 7~10 d 形成肿瘤。4 周后拍照, 颈椎脱臼法处死裸鼠, 剥离瘤体并计算体积。

1.3.8 小管形成实验检测各组细胞的血管生成能力

HUMCEs 细胞转染实验同上, 在 96 孔培养板上平铺一层新鲜配制的 Matrigel 胶, 迅速转移进无菌培养箱设定 37°C , 待 Matrigel 溶胶凝固后, 将 HUMCEs 细胞以 1×10^4 个/mL 接种在 96 孔板中继续培养 48 h, 每孔设 3 个复孔, 于显微镜($\times 400$)下观察细胞的血管生成情况。

1.3.9 吖啶橙染色检测细胞自噬泡的形成

收集各组转染后细胞, 以 5×10^4 个/孔的密度将细胞接种于 24 孔板, 于培养箱中培养 48 h, 每孔设 3 个复孔, 用吖啶橙溶液(终浓度为 1 mg/L)避光染色 15 min, PBS 洗涤后置于倒置荧光显微镜($\times 400$)下观察并拍照。

1.3.10 Western blot 检测细胞 JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3、CL3-II、Beclin1、VEGF 蛋白表达水平

收集各组 CNE-2 细胞, 加入 RIPA 裂解液, 超声匀浆提取总蛋白, BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 电泳, 湿转至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂牛奶 TBST 封闭 2 h, 加入一抗(1:2 000) 4°C 孵育过夜, 加入二抗(1:10 000)室温孵育 2 h, 用 ECL 化学发光剂进行显影, 以 GAPDH 为内参校正, Image J 软件进行发光结果的灰度分析。

1.4 统计学处理

数据分析采用 SPSS16.0 软件, 作图工具采用 Graphpad 5.0, 计数资料采用 χ^2 检验; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-216a 靶向调控 JAK2 的表达

Target Scan Human 在线数据库预测结果显示,

miR-216a 与 JAK2 基因存在 1 个结合位点, 位于第 833~840 核苷酸位置。双荧光素酶报告基因结果显示, 转染 miR-216a 后, 与 miR-NC 组相比, 野生型 JAK2 的荧光素酶活性显著性降低 (0.93 ± 0.05 vs 0.41 ± 0.04) ($P < 0.05$); 而突变型 JAK2 荧光素酶活性无显著性差异 (0.98 ± 0.11 vs 0.94 ± 0.03) ($P > 0.05$) (Figure 1), 说明 miR-216a 与 JAK2 具有靶向调控关系。

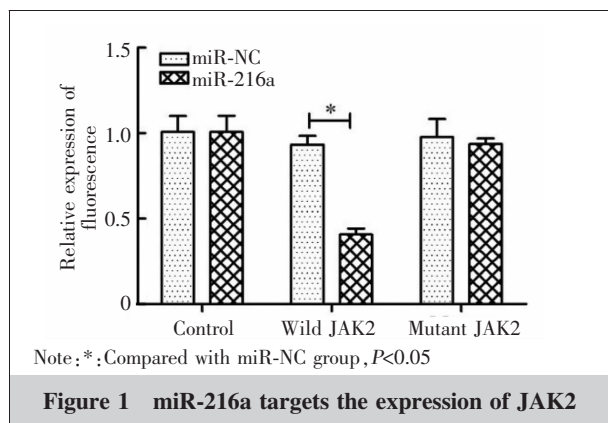


Figure 1 miR-216a targets the expression of JAK2

2.2 鼻咽癌患者 p-JAK2、p-STAT3 的表达

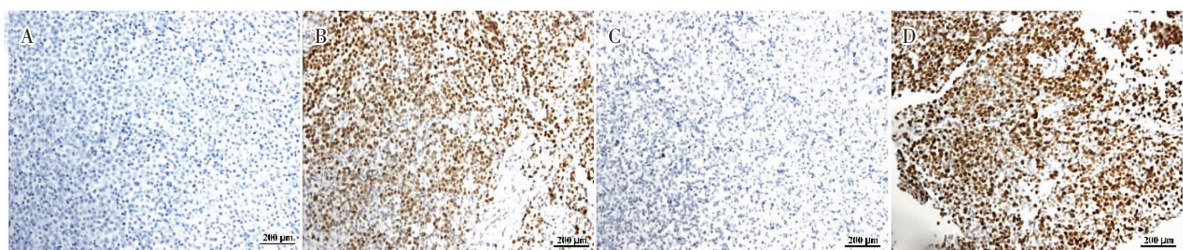
免疫组化染色结果显示, p-JAK2、p-STAT3 主要在鼻咽癌组织中呈阳性表达, 60 例患者中的阳性表达率分别为 75.0%、68.3%。30 人健康者阳性表达率分别为 10.0%、13.3%。鼻咽癌组织阳性表达率显著性高于正常鼻咽黏膜组织 (P 均 < 0.05) (Figure 2)。

2.3 p-JAK2、p-STAT3 表达与鼻咽癌患者临床病理特征之间的关系

将 60 例患者按照 p-JAK2、p-STAT3 相对表达量分为阳性组 (p-JAK2: 45 例; p-STAT3: 41 例)、阴性组 (p-JAK2: 15 例; p-STAT3: 19 例), 肿瘤局限在 $T_1 \sim T_2$ 期鼻咽癌组织的 p-JAK2、p-STAT3 阳性表达率明显低于肿瘤侵犯 $T_3 \sim T_4$ 期鼻咽癌组织 (P 均 < 0.05); 无淋巴结转移的鼻咽癌组织中 p-JAK2、p-STAT3 阳性表达率明显低于淋巴结转移的鼻咽癌组织 (P 均 < 0.05); 无远处转移的鼻咽癌组织中 p-JAK2、p-STAT3 阳性表达率明显低于有远处转移的鼻咽癌组织 (P 均 < 0.05)。p-JAK2、p-STAT3 在 I~II 期患者中的阳性表达率明显低于 III~IV 期患者 (P 均 < 0.05); p-JAK2、p-STAT3 表达与鼻咽癌患者年龄和性别无关 (Table 1)。

2.4 各组细胞 JAK2、STAT3 mRNA 表达水平比较

qRT-PCR 结果显示, 与对照组 (1.01 ± 0.05 、 1.01 ± 0.04) 和 miR-NC 组 (0.99 ± 0.05 、 1.00 ± 0.03) 相比,



Notes: A: p-JAK2 expression in normal nasopharyngeal mucosa tissue; B: p-JAK2 expression nasopharyngeal carcinoma tissue; C: p-STAT3 expression in normal nasopharyngeal mucosa tissue; D: p-STAT3 expression nasopharyngeal carcinoma tissue

Figure 2 The expression of p-JAK2 and p-STAT3 in nasopharyngeal tissues (×200)

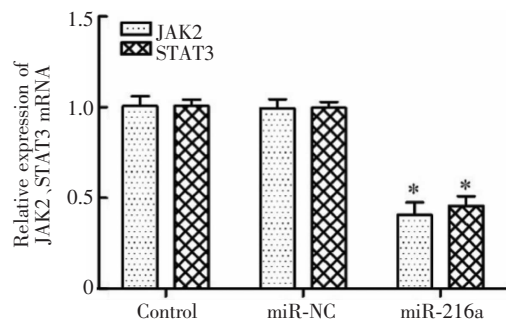
Table 1 The relationship between the expression of p-JAK2, p-STAT3 and the clinicopathological characteristics of patients with nasopharyngeal carcinoma [n(%)]

Clinical parameters	N	p-JAK2 expression				p-STAT3 expression			
		Positive (n=45)	Negative (n=15)	χ^2	P	Positive (n=41)	Negative (n=19)	χ^2	P
Age (years old)									
<65	36	26 (72.22)	10 (27.78)	0.370	0.543	27 (75.00)	9 (25.00)	1.849	0.174
≥65	24	19 (79.17)	5 (20.83)			14 (58.33)	10 (41.67)		
Gender									
Male	43	31 (72.09)	12 (27.91)	0.684	0.408	28 (65.12)	15 (34.88)	0.726	0.394
Female	17	14 (82.35)	3 (17.65)			13 (76.47)	4 (23.53)		
T stage									
T ₁ ~T ₂	32	18 (56.25)	14 (43.75)	12.857	<0.001	18 (56.25)	14 (43.75)	4.627	0.031
T ₃ ~T ₄	28	27 (96.43)	1 (3.57)			23 (82.14)	5 (17.86)		
N stage									
N ₀ ~N ₁	31	17 (54.84)	14 (45.16)	13.904	<0.001	17 (54.84)	14 (45.16)	5.398	0.020
N ₂ ~N ₃	29	28 (96.55)	1 (3.45)			24 (82.76)	5 (17.24)		
M stage									
M ₀	46	31 (67.39)	15 (32.61)	6.087	0.014	27 (58.70)	19 (41.30)	8.462	0.004
M ₁	14	14 (100.00)	0			14 (100.00)	0		
TNM stage									
I ~ II	6	2 (33.33)	4 (66.67)	12.826	0.002	2 (33.33)	4 (66.67)	12.189	0.002
III	29	19 (65.52)	10 (34.48)			16 (55.17)	13 (44.83)		
IV	25	24 (96.00)	1 (4.00)			23 (92.00)	2 (8.00)		

miR-216a 组的 JAK2、STAT3 mRNA 表达水平 (0.41 ± 0.07 , 0.46 ± 0.05) 明显降低 ($P < 0.05$); 而对照组与 miR-NC 组 JAK2、STAT3 mRNA 表达水平比较无统计学差异 ($P > 0.05$) (Figure 3)。

2.5 各组细胞增殖能力比较

MTT 检测结果显示, 对照组 24、48、72、96 h 的 OD 值分别为 0.36 ± 0.06 、 0.55 ± 0.07 、 0.89 ± 0.08 、 1.53 ± 0.11 , miR-NC 组分别为 0.32 ± 0.03 、 0.58 ± 0.07 、 0.86 ± 0.10 、 1.48 ± 0.11 , miR-216a 组分别为 0.15 ± 0.04 、 0.24 ± 0.06 、 0.41 ± 0.06 、 0.75 ± 0.07 。与对照组和 miR-NC 组相比, miR-216a 组 24、48、72、96 h OD 值显著性降低 (P 均 < 0.05); 而对照组和 miR-NC 组 24、48、72、96 h OD 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (Figure 4)。

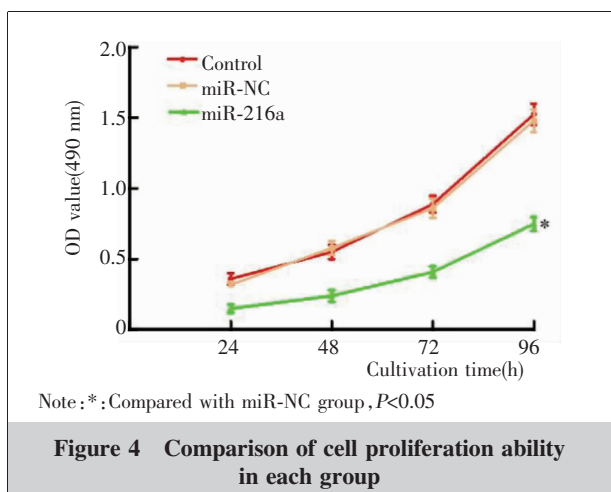


Note: *: Compared with the miR-NC group, $P < 0.05$

Figure 3 Comparison of the expression of JAK2 and STAT3 mRNA in the cells of each group

2.6 各组细胞侵袭能力比较

Transwell 小室实验显示,与对照组(109.33 ± 11.02)和 miR-NC 组(101.00 ± 11.00)相比,miR-216a 组细胞



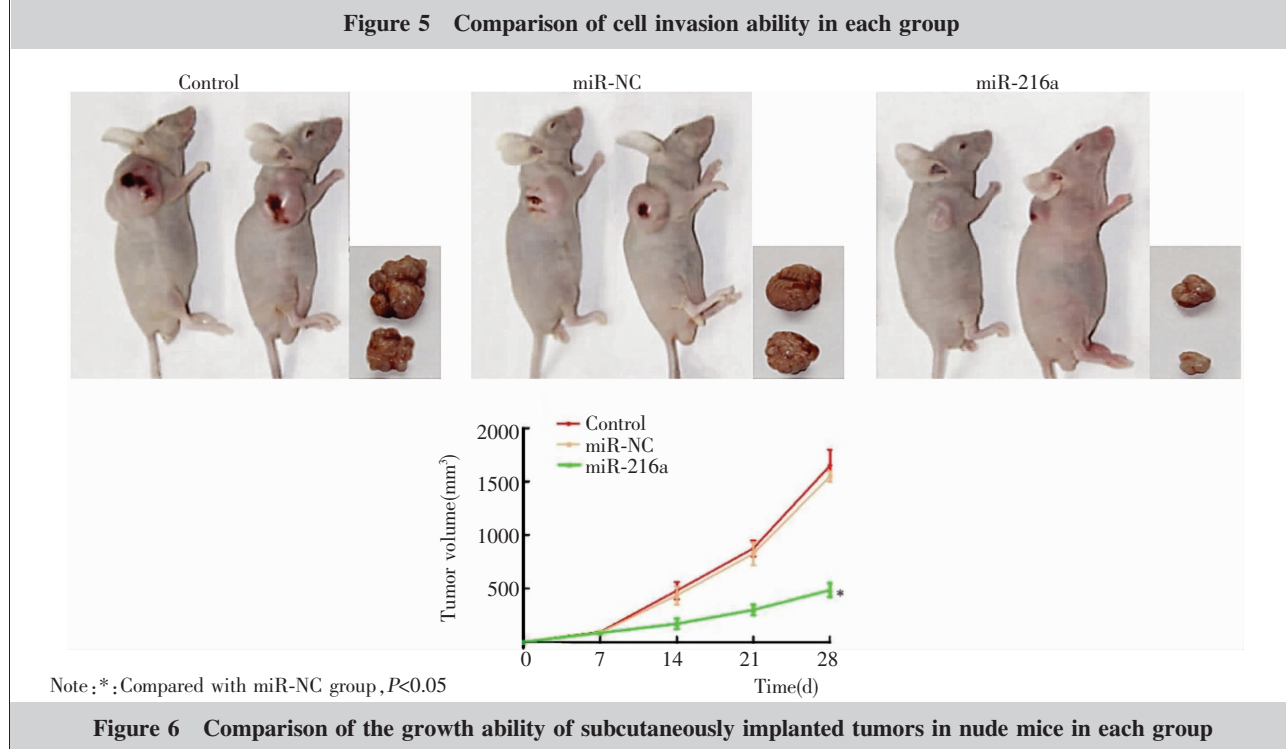
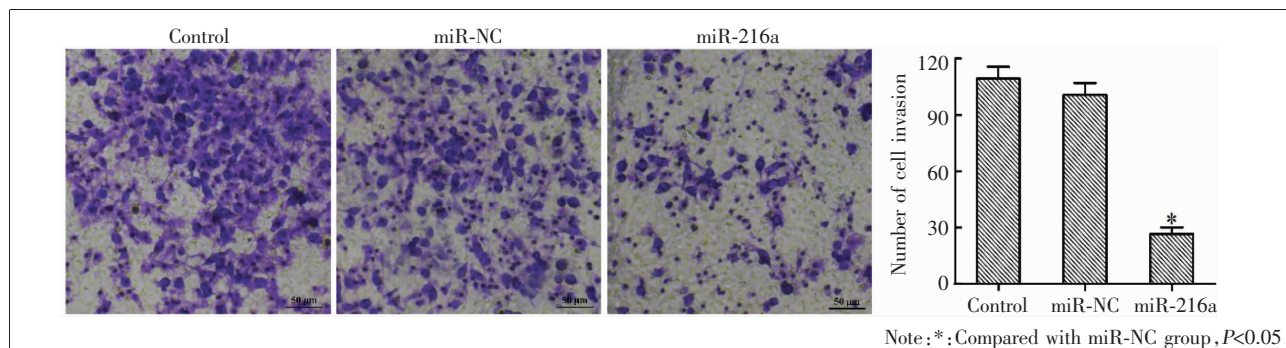
穿过 Matrigel 胶的数量 (22.67 ± 5.77) 明显减少 ($P < 0.05$);而对照组和 miR-NC 组细胞穿过 Matrigel 胶的数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (Figure 5)。

2.7 各组裸鼠皮下种植瘤体内生长能力比较

皮下种植瘤实验结果显示,与对照组 [$(1\ 650.42 \pm 212.13)\text{ mm}^3$] 和 miR-NC 组 [$(1\ 545.21 \pm 70.71)\text{ mm}^3$] 相比,4 周后,miR-216a 组裸鼠体内移植瘤的体积 [$(485.24 \pm 91.92)\text{ mm}^3$] 明显变小 ($P < 0.05$),而对照组和 miR-NC 组瘤体的体积差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (Figure 6)。

2.8 各组细胞血管生成能力比较

小管形成实验结果显示,与对照组(130.25 ± 14.14)和 miR-NC 组(127.53 ± 10.61)相比,miR-216a 组细胞小管生成的数量(74.36 ± 8.48)明显下降 ($P < 0.05$),而对照组和 miR-NC 组细胞小管形成数目的差异无统



计学意义($P>0.05$)(Figure 7)。

2.9 各组细胞内自噬溶酶体的表达比较

吖啶橙染色结果显示,细胞中酸性自噬泡产生红色荧光。对照组和 miR-NC 组细胞内荧光微弱,存在少量酸性自噬泡;miR-216a 组细胞内荧光强烈,存在大量酸性自噬泡(Figure 8)。

2.10 各组细胞 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Beclin1、CL3-Ⅱ、VEGF 蛋白表达水平比较

过表达 miR-216a 细胞株中,对照组 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Beclin1、CL3-Ⅱ、VEGF 蛋白表达水平分别为 1.93 ± 0.11 、 1.02 ± 0.09 、 1.75 ± 0.07 、 0.90 ± 0.07 、 0.32 ± 0.07 、 0.38 ± 0.04 和 1.15 ± 0.07 ,miR-NC 组分别为 1.85 ± 0.07 、 1.03 ± 0.07 、 1.78 ± 0.11 、 0.92 ± 0.09 、 0.30 ± 0.08 、 0.38 ± 0.04 和 1.17 ± 0.05 ,miR-216a 组分别为 0.93 ± 0.11 、 0.32 ± 0.05 、 1.73 ± 0.11 、 0.44 ± 0.08 、 1.03 ± 0.11 、 1.00 ± 0.08 和 0.55 ± 0.07 。与对照组和 miR-NC 组相比,miR-216a 组细胞 JAK2、p-JAK2、p-STAT3、VEGF 蛋白表达水平明显减少,Beclin1、CL3-Ⅱ蛋白表达水平明显增多(P 均 <0.05);而对照组和 miR-NC 组细胞各蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)(Figure 9)。

低表达 miR-216a 细胞株中,对照组 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平分别为 1.43 ± 0.11 、 0.49 ± 0.05 、 1.38 ± 0.11 和 0.53 ± 0.04 ;抑制 miR-NC 组分别为 1.35 ± 0.07 、 0.55 ± 0.07 、 1.35 ± 0.14 和 0.45 ± 0.07 ;抑制 miR-216a 组分别为 1.93 ± 0.11 、 1.28 ± 0.11 、 1.30 ± 0.14 和 1.23 ± 0.11 。与对照组和抑制 miR-NC 组相比,抑制 miR-216a 组细胞 JAK2、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达水平明显增多(P 均 <0.05);而对照组和抑制 miR-NC 组细胞各蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)(Figure 10)。

3 讨论

miRNA 作为靶基因的调控因子,对多种肿瘤的生长、侵袭、化疗耐药性、血管形成等生物学功能具有重要调控作用。miR-216a 在诸多恶性肿瘤组织中异常表达。Wu 等^[9]发现 miR-216a 在乳腺癌组织中低表达,并且与恶性预后相关。通过靶向调控长链非编码 RNA Opa 相互作用蛋白 5-反义 RNA1 抑制细胞的增殖、迁移和侵袭,在乳腺癌中充当肿瘤抑制性 miRNA。Wang 等^[10]发现在结直肠癌中 miR-216a 靶

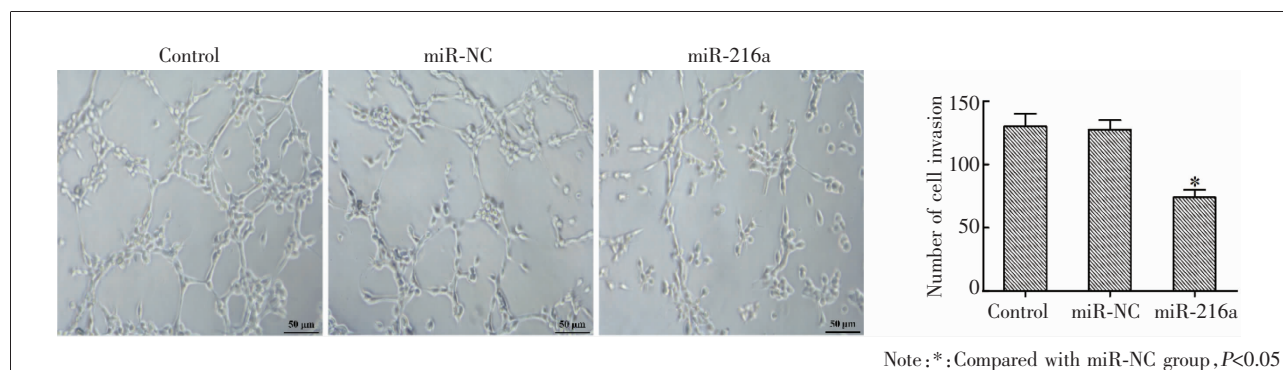


Figure 7 Comparison of cell angiogenesis ability in each group

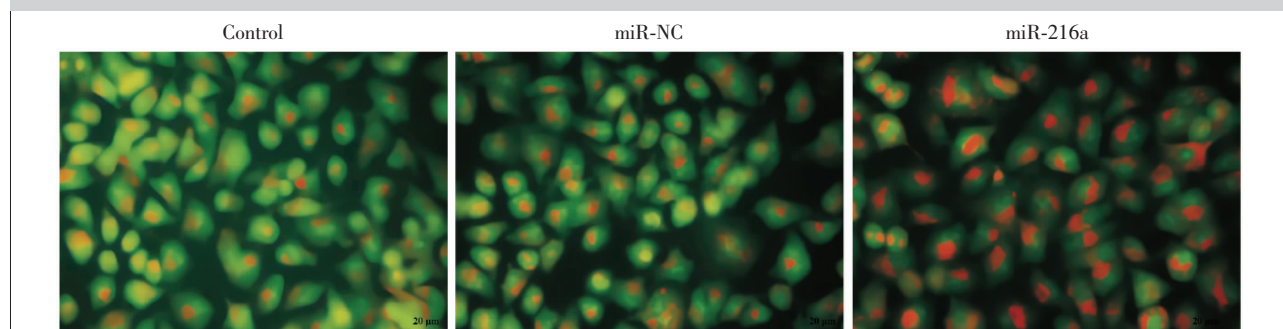


Figure 8 Comparison of autophagic lysosome expression in cells of each group (x400)

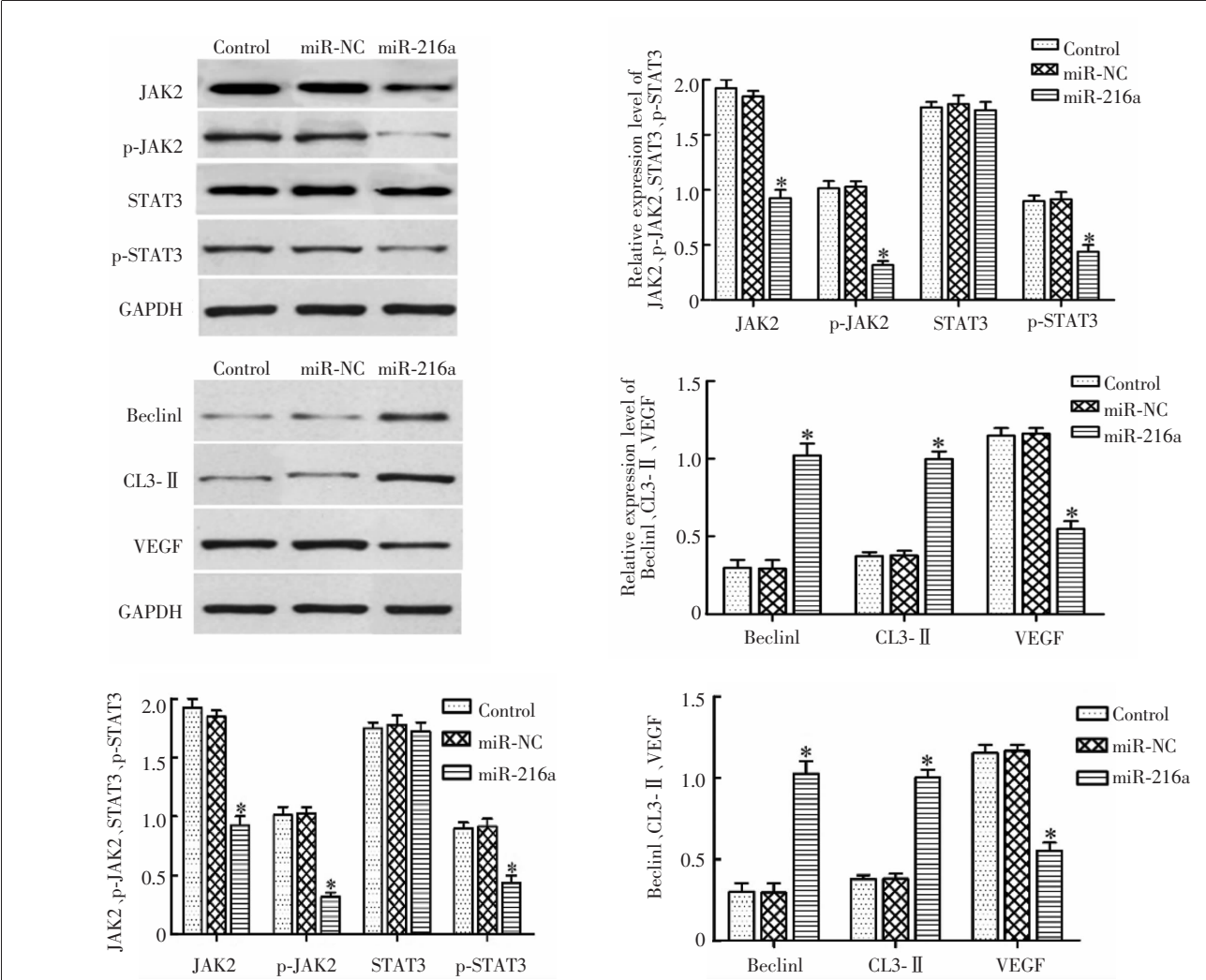


Figure 9 Comparison of JAK2,p-JAK2,STAT3,p-STAT3,Beclin1,CL3- II and VEGF protein expression levels after miR-216a overexpression in each group

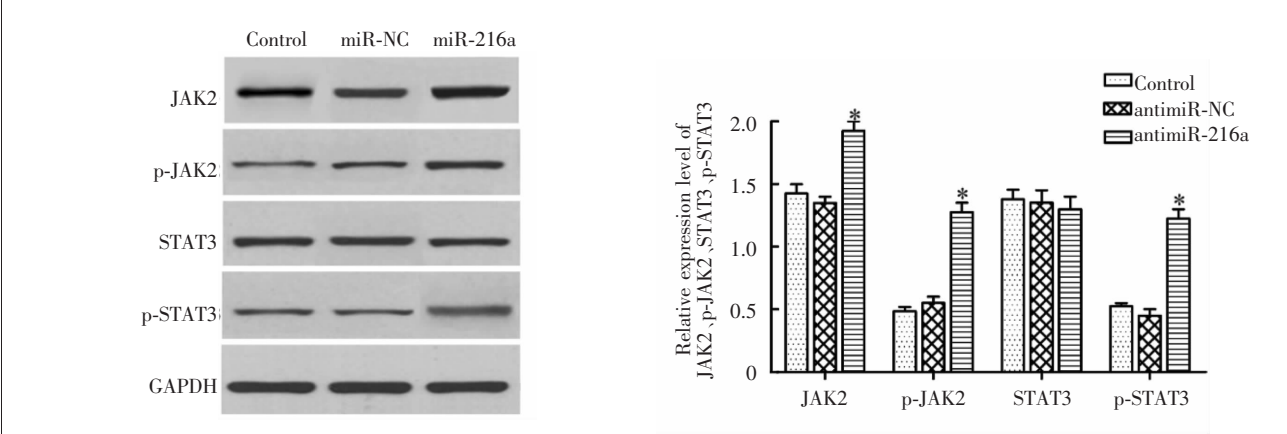


Figure 10 Comparison of JAK2,p-JAK2,STAT3,p-STAT3,Beclin1,CL3- II and VEGF protein expression levels after low expression of miR-216a in each group

向调控环氧合酶-2 和花生四烯酸 5-脂氧合酶的表达,过表达 miR-216a 可以降低结直肠癌细胞的增殖活性、抑制肿瘤的生长。Wang 等^[11]发现 miR-216a 通过抑制角蛋白 7 的表达,降低胰腺癌的增殖和侵袭能力。然而 Jin 等^[12]发现 miR-216a 在卵巢癌中表达上调,并且与卵巢癌中顺铂耐药性相关,抑制 miR-216a 的表达能够减轻卵巢癌顺铂耐药。本研究显示转染 miR-216a 模拟物双链小 RNA 后,CNE-2 细胞的增殖、侵袭、血管形成能力明显减弱,自噬能力明显增加,说明 miR-216a 在鼻咽癌中发挥抑癌作用。

JAK2 是一种非受体型酪氨酸激酶,能够诱导下游 STAT3 的磷酸化,游离的 p-STAT3 形成二聚体并迅速进入细胞核,进而调控下游靶基因的表达^[13]。在恶性肿瘤中 JAK2/STAT3 信号通路处于持续活化状态。Park 等^[14]发现 JAK2/STAT3 信号通路在结肠癌中被激活,通过限制细胞凋亡和增强克隆形成,在促进肿瘤发生和放射抗性等方面发挥重要作用。Liang 等^[15]发现安罗替尼在人肺癌细胞系中通过抑制 JAK2/STAT3/VEGFA 信号通路,降低细胞增殖、迁移侵袭能力,诱导细胞凋亡和自噬,增强抗血管生成能力。Chang 等^[16]发现乳腺癌中含有 WW 结构域的氧化还原酶表达缺失,过表达含有 WW 结构域的氧化还原酶能够抑制 JAK2/STAT3 信号通路,从而抑制乳腺癌细胞的增殖和转移。本研究采用 Target Scan Human 在线数据库预测 miR-216a 与 JAK2 具有结合位点,并且双荧光素酶基因报告实验结果显示 miR-216a 可靶向负调控 JAK2。同时观察到鼻咽癌组织中 p-JAK2、p-STAT3 的表达水平明显高于正常鼻咽黏膜组织,p-JAK2、p-STAT3 表达越高,肿瘤侵犯越严重,越容易发生淋巴结和远处转移,TNM 分期越高。当 miR-216a 模拟物双链小 RNA 转染 CNE-2 细胞后,与对照组和 miR-NC 组相比,miR-216a 组细胞 p-JAK2、p-STAT3 表达明显降低,提示 JAK2/STAT3 信号通路在鼻咽癌中发挥促癌作用,与 Zheng 等^[17]发现 Opa 相互作用蛋白 5 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路抑制鼻咽癌进展结果一致。

自噬是细胞能量代谢和自我更新的调节机制,广泛存在于正常细胞和恶性肿瘤细胞中,与肿瘤的发生、发展和转移密切相关^[18]。自噬过程需要多种自噬调节蛋白参与。*Beclin-1* 基因是诱导细胞发生自噬的关键基因,被广泛认为是一种抑癌基因。在许多

肿瘤细胞中表达下调,而过表达 *Beclin1* 则会抑制肿瘤生长^[19]。LC3 是自噬相关基因 8 的同源蛋白,以 LC3- I 和 LC3- II 两种形式存在,当自噬发生时,LC3- I 转化成 LC3- II,LC3- II 水平与自噬水平呈正相关。Lin 等^[20]发现血管紧张素-(1-7)通过提高 *Beclin1*、LC3- II 水平抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并抑制肿瘤生长。Zheng 等^[21]发现新型棉酚衍生物 Apo G₂ 通过抑制 CNE-2 细胞中 *Beclin1* 的表达,诱导细胞发生凋亡和自噬。Huang 等^[22]发现敲除胎盘特异性抗原 8 能够诱导鼻咽癌细胞自噬,进而抑制细胞增殖和上皮间充质转化,而敲低 *Beclin1* 的表达可逆转上述过程。本研究中与对照组和 miR-NC 组相比,miR-216a 组细胞 *Beclin1*、LC3- II 表达明显升高,p-JAK2、p-STAT3 表达明显降低;吖啶橙染色结果显示,miR-216a 组细胞内荧光强烈,有大量自噬泡形成,提示 miR-216a 通过阻断 JAK2/STAT3 信号通路促进细胞自噬水平,与上述研究结果一致。

血管新生是恶性肿瘤发生、发展的重要条件,不仅原发肿瘤依赖于血管形成,而且在肿瘤的生长和转移中也发挥重要作用^[23]。在血管生成过程中,需要多种细胞因子共同调节,VEGF 结合并激活血管内皮生长因子受体 1/2,通过加强血管通透性促进肿瘤基质形成和转移。所以,抑制 VEGF 表达可能是抗肿瘤血管生成的重要策略^[24-25]。陈月红等^[26]发现鼻咽癌组织中 VEGF 表达比鼻咽炎中明显升高,并且 VEGF 表达与肿瘤大小、淋巴结转移及临床分期有关。李俊等^[27]亦发现 VEGF 高表达的鼻咽癌患者 3 年生存率低于 VEGF 低表达的患者。任庆等^[28]发现壮观霉素 B₁ 能够明显降低抑制血管内皮生长因子受体 2 蛋白表达水平,进而抑制鼻咽癌的新生血管生成,发挥对鼻咽癌的生长抑制作用。本研究中,与对照组和 miR-NC 组相比,miR-216a 组细胞 VEGF 表达明显降低,小管形成数量明显减少,种植瘤体积明显减小,提示 miR-216a 能够抑制鼻咽癌血管形成能力。

综上所述,本研究探讨 JAK2、STAT3 在鼻咽癌中的表达及临床意义,证实了 JAK2、STAT3 在鼻咽癌中高表达且发挥促癌作用,其作用机制可能是 miR-216a 通过靶向调控 JAK2/STAT3 信号通路,提高了细胞自噬水平并抑制了增殖、迁移和血管形成能力,对鼻咽癌患者的治疗和预后具有指导意义。

参考文献:

- [1] Chen YP, Lv JW, Mao YP, et al. Unraveling tumour microenvironment heterogeneity in nasopharyngeal carcinoma identifies biologically distinct immune subtypes predicting prognosis and immunotherapy responses[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 14.
- [2] Zhu QW, Zhang QC, Gu M, et al. MIR106A-5p upregulation suppresses autophagy and accelerates malignant phenotype in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Autophagy*, 2021, 17(7): 1667–1683.
- [3] Lin LQ, Liu XL, Lv BT. Long non-coding RNA MEG3 promotes autophagy and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells via PTEN up-regulation by binding to microRNA-21[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(1): 61–72.
- [4] Liu HX, Zheng W, Chen QP, et al. lncRNA CASC19 contributes to radioresistance of nasopharyngeal carcinoma by promoting autophagy via AMPK-mTOR pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1407.
- [5] Wang YF, Zhang SY, Dang SW, et al. Overexpression of microRNA-216a inhibits autophagy by targeting regulated MAP1S in colorectal cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 4621–4629.
- [6] Zhang J, Gao SH, Zhang YD, et al. MiR-216a-5p inhibits tumorigenesis in pancreatic cancer by targeting TPT1/mTORC1 and is mediated by LINC01133[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2612–2627.
- [7] Wang W, Li YL, Ma QH, et al. Differentiation antagonizing non-protein coding RNA modulates the proliferation, migration, and angiogenesis of glioma cells by targeting the miR-216a/LGR5 axis and the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 2439–2449.
- [8] Tao YM, Yang SB, Wu YY, et al. MicroRNA-216a inhibits the metastasis of gastric cancer cells by targeting JAK2/STAT3-mediated EMT process[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(51): 88870–88881.
- [9] Wu ZZ, Liu YF, Wei LG, et al. lncRNA OIP5-AS1 promotes breast cancer progression by regulating miR-216a-5p/GLO1[J]. *J Surg Res*, 2021, 257: 501–510.
- [10] Wang DX, Li YC, Zhang C, et al. MiR-216a-3p inhibits colorectal cancer cell proliferation through direct targeting COX-2 and ALOX5[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 1755–1766.
- [11] Wang W, Wang J, Yang CX, et al. MicroRNA-216a targets WT1 expression and regulates KRT7 transcription to mediate the progression of pancreatic cancer—a transcriptome analysis[J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(6): 866–882.
- [12] Jin PF, Liu YJ, Wang RJ, et al. STAT3 regulated miR-216a promotes ovarian cancer proliferation and cisplatin resistance[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4): BSR20180547.
- [13] Li H, Bi QY, Cui HX, et al. Suppression of autophagy through JAK2/STAT3 contributes to the therapeutic action of rhynchophylline on asthma[J]. 2021, 21(1): 21.
- [14] Park SY, Lee CJ, Choi JH, et al. The JAK2/STAT3/CCND2 axis promotes colorectal cancer stem cell persistence and radioresistance[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 399.
- [15] Liang LJ, Hui KY, Hu CX, et al. Autophagy inhibition potentiates the anti-angiogenic property of multikinase inhibitor anlotinib through JAK2/STAT3/VEGFA signaling in non-small cell lung cancer cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 71.
- [16] Chang RX, Song LL, Xu Y, et al. Loss of Wwox drives metastasis in triple-negative breast cancer by JAK2/STAT3 axis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3486.
- [17] Zheng YQ, Cui YR, Yang S, et al. Opa interacting protein 5 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by promoting EMT via modulation of JAK2/STAT3 signal[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(2): 613–621.
- [18] Sheng JQ, Wang MR, Fang D, et al. lncRNA NBR2 inhibits tumorigenesis by regulating autophagy in hepatocellular carcinoma[J]. 2021, 133: 111023.
- [19] Liang L, Yang Z, Deng Q, et al. Expression and mechanism of autophagy gene Beclin1 in tumor microenvironment of renal cell carcinoma[J]. *Minerva Med*, 2021, Jan 13. [Online ahead of print]
- [20] Lin YT, Wang HC, Chuang HC, et al. Pre-treatment with angiotensin-(1-7) inhibits tumor growth via autophagy by downregulating PI3K/Akt/mTOR signaling in human nasopharyngeal carcinoma xenografts[J]. *J Mol Med(Berl)*, 2018, 96(12): 1407–1418.
- [21] Zheng RN, Chen KX, Zhang Y, et al. Apogossypolone induces apoptosis and autophagy in nasopharyngeal carcinoma cells in an in vitro and in vivo study[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(1): 751–757.
- [22] Huang ML, Qi CL, Zou Y, et al. Plac8-mediated autophagy regulates nasopharyngeal carcinoma cell function via AKT/mTOR pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(14): 7778–7788.
- [23] Matsumoto K, Noda T, Kobayashi S. Inhibition of glycolytic activator PFKFB3 suppresses tumor growth and induces tumor vessel normalization in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2021, 500: 29–40.
- [24] Sorokin M, Poddubskaya E, Baranova M, et al. RNA sequencing profiles and diagnostic signatures linked with response to ramucirumab in gastric cancer[J]. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2020, 6(2): a004945.
- [25] Deng XP, Li ZL, Xiong RD, et al. FS-7 inhibits MGC-803 cells growth in vitro and in vivo via down-regulating glycolysis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1659–1669.
- [26] 陈月红, 刘家佳, 彭韬, 等. TrkB 与 VEGF 在鼻咽癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2020, 26(5): 491–496.
Chen YH, Liu JJ, Peng T, et al. Expression and clinical significance of TrkB, VEGF in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chinese Journal of Otorhinolaryngology-skull Base Surgery*, 2020, 26(5): 491–496.
- [27] 李俊. 鼻咽癌患者肿瘤组织中 VEGF、COX-2 与 PIK3CA 表达量的相关性分析[J]. *实用癌症杂志*, 2019, 34(3): 385–388.
Li J. Analysis of the expression of VEGF, COX-2 and PIK3CA in the tumor tissue of patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. *The Practical Journal of Cancer*, 2019, 34(3): 385–388.
- [28] 任庆, 张春艳, 马晓芳, 等. 壮观霉素 B1 诱导 VEGFR2 去 SUMO 化修饰抑制鼻咽癌血管生成[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2019, 33(12): 1181–1184.
Ren Q, Zhang CY, Ma XF, et al. Spectomycin B1 induces VEGFR2 de-SUMO modification to inhibit angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 2019, 33(12): 1181–1184.