

• 论著 •

# miR-98 靶向 EZH2 调控下咽癌细胞转移及其上皮-间充质转化的作用机制研究<sup>\*</sup>

阿布利克木·依明<sup>1</sup> 艾力根·阿不都热依木<sup>1</sup> 唐亮<sup>1</sup> 巴图<sup>2</sup> 卢旦丹<sup>1</sup>

(新疆维吾尔自治区人民医院 1. 耳鼻喉诊疗中心; 2. 病理科, 新疆 乌鲁木齐 830001)

**【摘要】 目的** 探讨 miR-98 在下咽癌 Fadu 细胞中的表达及其调控癌细胞转移及其上皮-间充质转化(EMT)的作用机制。**方法** 收集我院 2016 年 10 月~2021 年 1 月临床确诊下咽癌患者的 35 例下咽癌组织及其 28 例癌旁正常组织,利用实时荧光定量 PCR 检测 miR-98、EZH2 其 mRNA 表达。通过转染技术下调 miR-98 表达,分别利用 CCK-8 法、Transwell 和 Western blot 实验检测入下咽癌 Fadu 细胞的增殖、侵袭和上皮-间质转化能力。通过生物信息学软件 TargetScan 分析 miR-98 的下游调控靶点,双荧光素酶报告基因实验进一步检测 miR-98 和 EZH2 之间的关系。通过转染技术下调 EZH2 表达,分析下调 EZH2 对 Fadu 细胞增殖、侵袭和 EMT 的影响。同时上调 miR-98 与 EZH2 表达,检测过表达 miR-98 通过 EZH2 对 Fadu 细胞转移及 EMT 的影响。下调或过表达 EZH2 后,Western blot 检测 Fadu 细胞内 JAK、p-JAK、STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达量。利用抑制剂 AG490 作用 Fadu 细胞,通过转染技术上调 EZH2 表达,检测 Fadu 细胞增殖、侵袭和 EMT 能力。**结果** 与癌旁正常组织相比,下咽癌组织中 miR-98 表达明显降低( $P < 0.01$ ),EZH2 表达明显上升( $P < 0.01$ )。下调 miR-98 促进了 Fadu 细胞的增殖、侵袭与 EMT;miR-98 靶向 EZH2,和 EZH2 具有负调控关系;上调 miR-98 通过 EZH2 抑制了 Fadu 细胞的增殖、侵袭与 EMT;下调 EZH2 抑制了 Fadu 细胞转移和 EMT;上调 EZH2 激活了 Fadu 细胞内 JAK/STAT3 通路,且抑制剂 AG490 作用 Fadu 细胞能明显抑制过表达 EZH2 对 Fadu 细胞增殖、侵袭和 EMT 的上调作用。**结论** miR-98 靶向 EZH2 激活 JAK/STAT3 通路调控下咽癌细胞转移及其上皮-间充质转化。

**【关键词】** miR-98; EZH2; JAK/STAT3; 下咽癌; 转移**【中图分类号】** R329.2<sup>+</sup>5; R739.63 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 04. 002

## The mechanism of miR-98 targeting EZH2 regulating the metastasis and epithelial mesenchymal transformation of hypopharyngeal cancer cells

ABULIKEMU·Yiming<sup>1</sup>, AILIGEN·Abudureyimu<sup>1</sup>, TANG Liang<sup>1</sup>, BA Tu<sup>2</sup>, LU Dandan<sup>1</sup>(1. Otolaryngology Diagnosis and Treatment Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China;  
2. Department of Pathology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of miRNA-98 in hypopharyngeal carcinoma Fadu cells and the mechanism of its regulation on metastasis and epithelial mesenchymal transformation. **Methods** Real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA expression of miR-98 and EZH2 in 35 hypopharyngeal carcinoma tissues and 28 adjacent normal tissues. The expression of miR-98 was down-regulated by transfection technique. The proliferation, invasion and epithelial mesenchymal transformation ability of Fadu cells were detected by CCK-8 assay, Transwell assay and Western blot assay, respectively. The downstream regulatory targets of miR-98 were analyzed by TargetScan, and the relationship between miR-98 and EZH2 was further detected by dual luciferase reporter assay. The expression of EZH2 was down-regulated by transfection technique, and the effects of down-regulation of EZH2 on proliferation, invasion and EMT of Fadu cells were analyzed. At the same time, the expression of miR-98 and EZH2 were up-regulated, and the

**基金项目:**国家自然科学基金(81760023); EZH2 与 lncRNA NEAT1 调控下咽癌上皮间质转化的机制研究(2021DOI1C188)**通信作者:**艾力根·阿不都热依木,医学博士,副主任医师,副教授,硕士生导师, E-mail: wx131360@sina.com**引用本文:**阿布利克木·依明,艾力根·阿不都热依木,唐亮,等. miR-98 靶向 EZH2 调控下咽癌细胞转移及其上皮-间充质转化的作用机制研究[J].

西部医学, 2022, 34(4): 475-481. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 04. 002

effects of over-expression of miR-98 on Fadu cell metastasis and EMT through EZH2 were detected. After the down-regulation or overexpression of EZH2, the protein expressions of JAK, p-JAK, STAT3 and p-STAT3 in FADU cells were detected by Western blot. Fadu cells were treated with the inhibitor AG490, and the expression of EZH2 was up-regulated by transfection technology to detect the proliferation, invasion and EMT ability of Fadu cells. **Results** Compared with adjacent normal tissues, miR-98 expression was significantly reduced in hypopharyngeal carcinoma tissues ( $P < 0.01$ ), the expression of EZH2 was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Downregulation of miR-98 promoted proliferation, invasion and EMT of Fadu cells. miR-98 targeted EZH2 and had a negative regulatory relationship with EZH2. The up-regulation of miR-98 inhibited the proliferation, invasion and EMT of Fadu cells by EZH2. Downregulation of EZH2 inhibited Fadu cell metastasis and EMT. The up-regulation of EZH2 activated the JAK/STAT3 pathway in Fadu cells, and AG490 can significantly inhibit the up-regulation of EZH2 overexpression on proliferation, invasion and EMT of Fadu cells. **Conclusion** miRNA-98 targeting EZH2 activates the JAK/STAT3 pathway to regulate hypopharyngeal cancer cell metastasis and epithelial-mesenchymal transformation.

**【Key words】** miR-98; EZH2; JAK/STAT3; Hypopharyngeal cancer; Metastasis

下咽癌是最常见的头颈部鳞状细胞癌之一,是一种相对罕见的异质性恶性肿瘤,预后较差<sup>[1-3]</sup>。器官-保护化疗应用于早期阶段的下咽癌患者,手术切除和重建主要针对下咽癌晚期和复发肿瘤患者<sup>[4]</sup>。尽管最近手术和化疗等治疗方式不断进步,但下咽癌患者的 5 年生存率并无明显改善<sup>[5]</sup>。之前的研究<sup>[6-10]</sup>表明,小分子核糖核酸(microRNA, miRNA)是一大群短非编码 RNA,在包括下咽癌在内的广泛的人类肿瘤中起着重要作用。近些年研究发现很多异常表达的 miRNA 与下咽癌发生有关:如 Xu 等<sup>[11]</sup>研究表明 miRNA 4451 的过表达与下咽癌术后放疗患者的生存期较差相关;Kikkawa 等<sup>[12]</sup>发现 miRNA-504 通过靶向 CDK6 抑制下咽鳞状细胞癌的癌细胞增殖;另有研究<sup>[13]</sup>发现 miR98/PTEN/AKT 通路通过 MT-DH 抑制下咽癌细胞增殖和恶性进展。研究<sup>[14]</sup>表明 miR-98 与肝癌增殖、胶质瘤侵袭和肺癌发展等有关。但是有关 miR-98 调控下咽癌细胞转移及其上皮间质转化的作用机制仍不清楚。因此,本研究主要揭示 miR-98 调控下咽癌 Fadu 细胞增殖和恶性转移的机制,为进一步探讨下咽癌的发病和转移机制。

## 1 材料与方法

1.1 主要材料 35 例下咽癌组织及其 28 例癌旁正常组织来自于我院 2016 年 10 月~2021 年 1 月临床确诊的下咽癌患者。所有患者术前均未接受放、化疗处理,均经病理证实,于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。采集标本及其实验过程均经过患者和家属的同意,并获得了本院伦理委员会的批准。人下咽癌细胞(Fadu 细胞)购自中国科学院上海细胞库,反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,DMEM(Dulbecco's-modified Eagle's medium)培养基、胰蛋白酶购自 Gibco 公司,E-cadherin(ab212059, 1 : 1000)、N-cadherin(ab76011, 1 : 5000)、p-JAK (ab138005, 1 : 1000) 和 p-STAT3 (ab267373, 1 : 1000) 抗体购自 Abcam, miR-98 模拟

物和抑制剂来自 GenePharma 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 Fadu 细胞培养 将冻存的 Fadu 细胞离心后,重悬细胞并置于提前加入 10% FBS、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养液中,悬浮的细胞在  $37^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度和 5%  $\text{CO}_2$  培养箱环境中沉淀并贴壁生长。

1.2.2 Fadu 细胞转染 将培养皿中处于对数期的 Fadu 细胞稀释并铺于 12 孔板进行转染,转染前替换培养液为不含 FBS 的培养基,细胞融合在 75% 左右,细胞分为 ① inhibitor NC 组、miR-98 inhibitor 组、mimics NC 组、miR-98 mimics 组。② mimics NC + EZH2 wt 组、miR-98 mimics + EZH2 wt 组、mimics NC + EZH2 mut 组、miR-98 mimics + EZH2 mut 组。③ siRNA NC 组、EZH2 siRNA 组、pcDNA-3.1 (+) 组、pcDNA-EZH2 组、pcDNA-EZH2 + AG490 组。④ mimics NC + pcDNA-3.1 (+) 组、pcDNA-EZH2 + mimics NC 组、miR-98 mimics + pcDNA-3.1 (+) 组、pcDNA-EZH2 + miR-98 mimics 组。通过 Turbofect 将实现所需的重组质粒和对照质粒转染至 12 孔板中的细胞内,继续培养箱孵育至 48 h,细胞样品采集后立即实验分析。

1.2.3 细胞增殖测定 将培养皿中用 Turbofect 转染成功且状态良好的 Fadu 细胞稀释后接种在 96 孔板,细胞在适宜生长条件下孵育 48 h,每孔用 100  $\mu\text{L}$  PBS 清洗细胞,再缓慢将 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 液体加至每孔细胞,3 h 后取出培养板分析 450 nm 处细胞的吸光值。

1.2.4 双荧光素酶报告基因活性检测 我们先利用 TargetScan 预测分析 miR-98 的作用靶基因,选取 EZH2 后并通过构建 EZH2 wt 和 EZH2 mut 载体进行验证,取 EZH2 wt、EZH2 mut 质粒再分别与 miR-98 mimics、mimics NC 共同按照说明书转染到 12 孔板中融合度为 70%~75% 的 Fadu 细胞,48 h 后进一步利用双荧光素酶报告基因盒检测荧光素酶活性。

1.2.5 细胞侵袭实验 取 Matrigel 100  $\mu\text{L}$  基质加入 Transwell 上室并使其干燥,将 1 mL 胰酶(每孔细胞)加入用 Turbofect 试剂转染 48 h 的 Fadu 细胞中,消化适合后用新鲜培养基重新细胞并制成细胞悬液,取  $1 \times 10^5$  个细胞悬液加入上室,下室用 500  $\mu\text{L}$  含 10% FBS DMEM 培养基覆盖,培养 24 h,4% 多聚甲醛固定 15 min,0.1% 结晶紫染色 20 min,显微镜下随机选取不同视野观察并计数。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达水平 细胞总 RNA 的提取利用 Trizol 法按照说明书进行,提取的 RNA 测定浓度和纯度,参照说明书完成反转录,反转得到的 cDNA 稀释 10 倍并以其为模板进行 RT-qPCR,设置 3 个重复孔,反应完成后使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算基因的相对的表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

| 引物       | 序列(5'-3')               |
|----------|-------------------------|
| miR-98-F | UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU  |
| miR-98-R | AACAAUACAACUACUACCUC    |
| EZH2-F   | AATCAGAGTACATGCGACTGAGA |
| EZH2-R   | GCTGTATCCTTCGCTGTTTCC   |
| GAPDH-F  | CAAGGACCTCTACGCCAACAC   |
| GAPDH-R  | TGGAGGCGCGATGATCTT      |

1.2.7 Western blot 检测蛋白水平 细胞蛋白样品

中加入裂解液提取总蛋白,检测蛋白浓度后每个泳道加入定量蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,按大小不同分离后的蛋白湿转到 PVDF 膜,再置于 5% 的脱脂奶粉配置的封闭液中过夜孵育,PVDF 膜置于一抗稀释液中[E-cadherin(1 : 1000)、N-cadherin(1 : 5000)、p-JAK(1 : 1000)和 p-STAT3(1 : 1000)]过夜反应,TBST 洗 PVDF 膜 5 次,加入二抗稀释液在室温反应 2 h,TBST 洗 PVDF 膜 5 次,PVDF 膜上均匀滴加 ECL 试剂再进行蛋白曝光。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 miR-98 inhibitor 促进 Fadu 细胞增殖、侵袭和 EMT miR-98 在下咽癌组织中表达量显著低于癌旁组织( $P < 0.01$ ),见图 1A。miR-98 抑制剂下调 miR-98 表达使细胞增殖能力显著上升( $P < 0.05$ ),见图 1B。与 inhibitor NC 组相比,miR-98 inhibitor 组 Fadu 细胞侵袭数目明显增加( $P < 0.01$ ),见图 1C、D。miR-98 抑制剂下调 miR-98 表达使 N-cadherin/GAPDH 比值上升( $P < 0.01$ ),E-cadherin/GAPDH 比值下降( $P < 0.01$ ),见图 1E、F。说明 miR-98 inhibitor 促进了 Fadu 细胞的增殖、侵袭和 EMT。

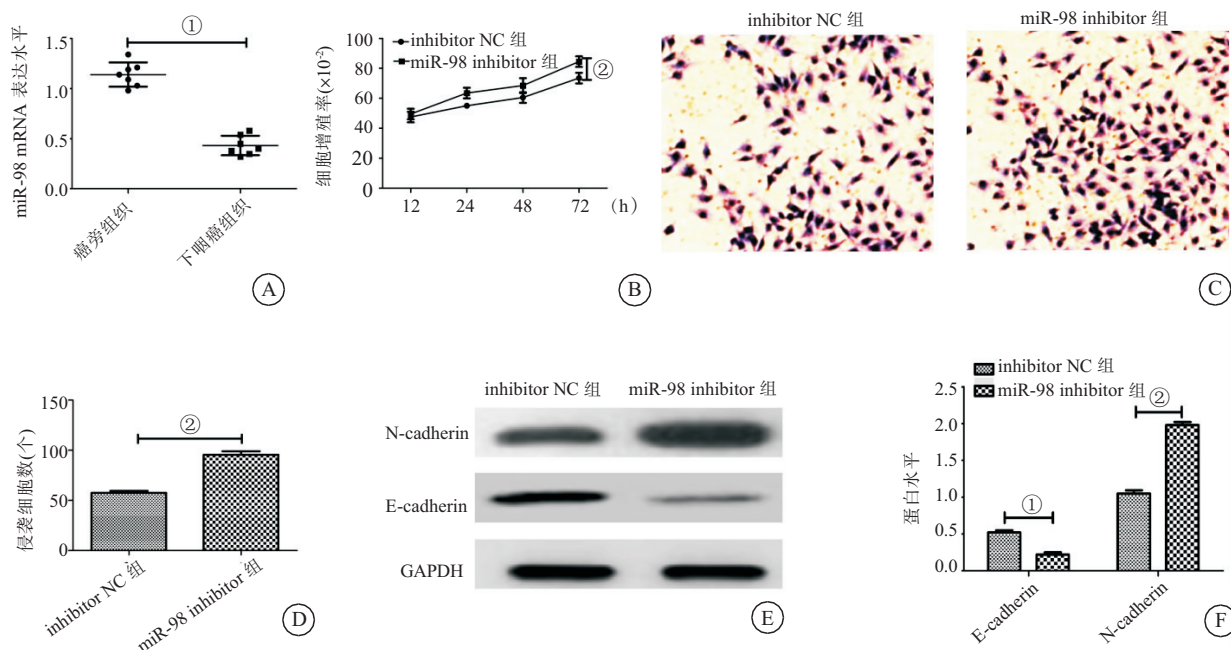


图 1 miR-98 抑制剂下调 miR-98 表达后分析 Fadu 细胞增殖、侵袭和 EMT 能力

Figure 1 Analysis of proliferation, invasion and EMT ability of Fadu cells after down-regulation of miR-98 expression by miR-98 inhibitor

注:A. miR-98 在癌旁组织和下咽癌组织中的 mRNA 表达;B. miR-98 抑制剂下调 miR-98 表达后 Fadu 细胞增殖活力;C. miR-98 抑制剂下调 miR-98 表达后 Fadu 细胞侵袭情况;D. Fadu 细胞侵袭数目;E. miR-98 抑制剂下调 miR-98 表达后 Fadu 细胞 EMT 情况;F. 下调 miR-98 后 E-cadherin 与 N-cadherin 相对表达。与癌旁组织比较,① $P < 0.05$ ;与 inhibitor NC 组比较,② $P < 0.05$

## 2.2 miR-98 与 EZH2 的靶向及其负调控关系

TargetScan 预测 miR-98 和 EZH2 之间的结合位点, 见图 2A。与 mimics NC+EZH2 wt 组相比, miR-98 mimics+EZH2 wt 组荧光素酶活性显著降低 ( $P < 0.01$ ), 与 mimics NC+EZH2 mut 组相比, miR-98 mimics+EZH2 mut 组荧光素酶活性无变化 ( $P > 0.05$ ), 见图 2B。miR-98 模拟物上调 miR-98 表达显著降低 EZH2 mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ); miR-98 抑制剂下调 miR-98 表达显著提升 EZH2 mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ), 见图 2C。说明 miR-98 靶向 EZH2 后进一步负调控 EZH2 在 Fadu 细胞中的表达。

## 2.3 EZH2 siRNA 抑制 Fadu 细胞增殖、侵袭和 EMT

EZH2 在下咽癌组织中 mRNA 表达量显著高于癌旁组织, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 3A。siRNA 技术显著降低 EZH2 表达使细胞增殖活力明显下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 3B。siRNA 技术显著降低 EZH2 表达进一步减少了 Fadu 细胞侵袭数目 ( $P < 0.01$ ), 见图 3C、D。siRNA 技术显著降低 EZH2 表达提高了 E-cadherin/GAPDH 比值 ( $P < 0.01$ ), 降低 N-cadherin/GAPDH 比值 ( $P < 0.01$ ), 见图 3E、F。表明 EZH2 siRNA 抑制了 Fadu 细胞的增殖、侵袭和 EMT。

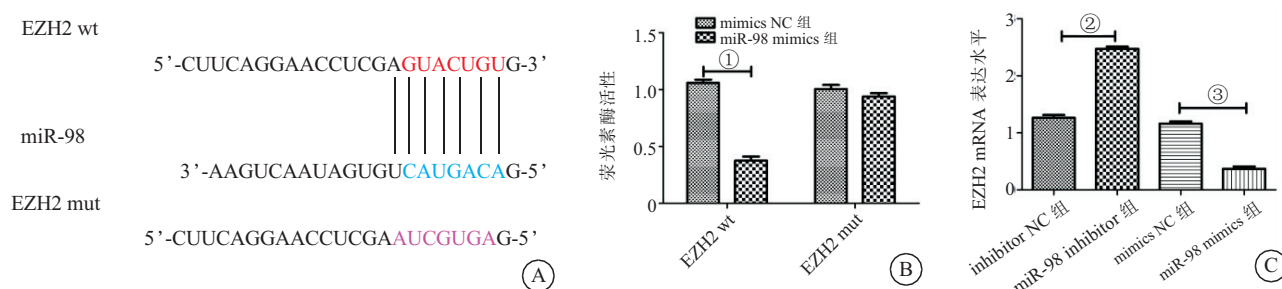


图 2 miR-98 与 EZH2 在 Fadu 细胞中的靶向及负调控关系

Figure 2 Targeting and negative regulation of miR-98 and EZH2 in Fadu cells

注: A. TargetScan 显示 miR-98 与 EZH2 的潜在结合位点; B. 分析双荧光素酶报告基因活性; C. miR-98 模拟物或抑制剂转入 Fadu 细胞后检测 EZH2 表达。与 EZH2+mimics 组相比, ①  $P < 0.05$ ; 与 inhibitor NC 组比较, ②  $P < 0.05$ ; 与 mimics NC 组比较, ③  $P < 0.05$

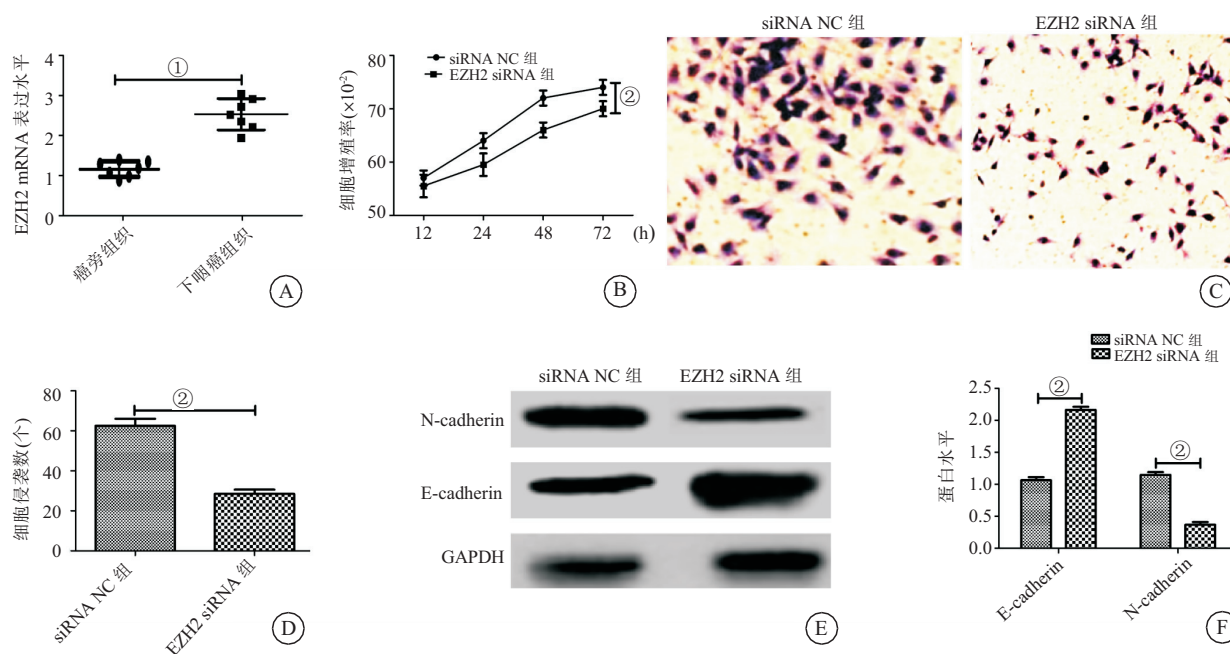


图 3 siRNA 技术显著降低 EZH2 表达抑制 Fadu 细胞增殖、侵袭和 EMT

Figure 3 SiRNA technology significantly reduced EZH2 expression and inhibited proliferation, invasion and EMT of Fadu cells

注: A. 分析 EZH2 在癌旁组织和下咽癌组织中的 mRNA 表达; B. EZH2 siRNA 转染后 Fadu 细胞中 EZH2 的 mRNA 水平; C. siRNA 技术显著降低 EZH2 表达后检测 Fadu 细胞活力; D. siRNA 技术显著降低 EZH2 表达后检测 Fadu 细胞侵袭; E. Fadu 细胞侵袭数目; F. siRNA 技术显著降低 EZH2 表达后检测 Fadu 细胞 EMT; G. EZH2 siRNA 转染后 Fadu 细胞中 E-cadherin、N-cadherin 相对表达。与癌旁组织相比, ①  $P < 0.05$ ; 与 siRNA NC 组比较, ②  $P < 0.05$

2.4 miR-98 mimics 通过 EZH2 抑制 Fadu 细胞增殖、侵袭和 EMT 与 mimics NC 组相比, miR-98 mimics 组的 miR-98 表达量明显升高 ( $P < 0.01$ ), 与 pcDNA-3.1(+) 组相比, pcDNA-EZH2 组的 EZH2 表达量明显升高 ( $P < 0.01$ ), 见图 4A。与 mimics NC+pcDNA-3.1(+) 组相比, pcDNA-EZH2+ mimics NC 组的细胞增殖活力明显升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞侵袭数目明显增加 ( $P < 0.01$ ), N-cadherin/GAPDH 比值明显显著上调 ( $P < 0.01$ ), E-cadherin/GAPDH 比值明显降低 ( $P < 0.01$ ); miR-98 mimics+pcDNA-3.1(+) 组

的细胞增殖活力明显降低 ( $P < 0.01$ ), 细胞侵袭数目明显减少 ( $P < 0.01$ ), E-cadherin/GAPDH 比值明显上升 ( $P < 0.01$ ), N-cadherin/GAPDH 比值降低 ( $P < 0.01$ ); 与 miR-98 mimics+pcDNA-3.1(+) 组相比, pcDNA-EZH2+ miR-98 mimics 组的细胞增殖活力明显升高 ( $P < 0.01$ ), 细胞侵袭数目明显增加 ( $P < 0.01$ ), N-cadherin/GAPDH 比值上调 ( $P < 0.01$ ), E-cadherin/GAPDH 比值下降 ( $P < 0.01$ ), 见图 4B~F。表明 miR-98 mimics 通过 EZH2 抑制了 Fadu 细胞的增殖、侵袭和 EMT。

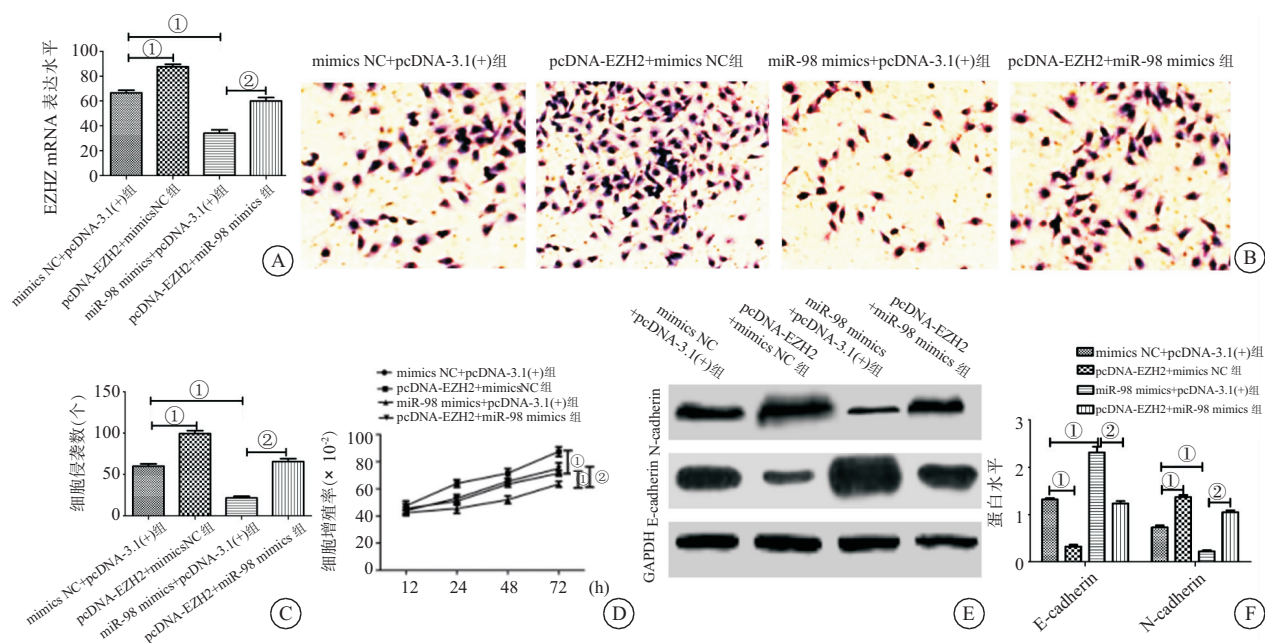


图 4 miR-98mimics 通过 EZH2 抑制 Fadu 细胞增殖、侵袭和 EMT

Figure 4 miR-98mimics inhibited proliferation, invasion and EMT of Fadu cells by EZH2

注: A. miR-98 mimics、pcDNA-EZH2 转染 Fadu 细胞后分析细胞活力; B. miR-98 mimics、pcDNA-EZH2 转染 Fadu 细胞后分析细胞侵袭; C. Fadu 细胞侵袭数目; D. miR-98 mimics、pcDNA-EZH2 转染 Fadu 细胞后分析细胞 EMT; E. E-cadherin/GAPDH 及其 N-cadherin/GAPDH 比值。与 mimics NC+pcDNA-3.1(+) 组相比, ①  $P < 0.05$ ; 与 miR-98 mimics+pcDNA-3.1(+) 组相比, ②  $P < 0.05$

2.5 pcDNA-EZH2 通过 JAK/STAT3 通路促进 Fadu 细胞的增殖、侵袭和 EMT 过表达 EZH2 组显著提高 Fadu 细胞内 p-JAK/JAK 和 p-STAT3/STAT3 比值 ( $P < 0.01$ ), 下调 EZH2 显著降低细胞内 p-JAK/JAK 和 p-STAT3/STAT3 比值 ( $P < 0.01$ )。表明过表达 EZH2 能够激活 Fadu 细胞内 JAK/STAT3 信号通路, 见图 5A、B。AG490 作用细胞后 JAK 磷酸化水平明显低于空白组 ( $P < 0.01$ ), 见图 5C。上调 EZH2 表达促使细胞增殖活力提升 ( $P < 0.05$ ), 明显增加细胞侵袭数目 ( $P < 0.01$ ), 显著降低 E-cadherin/GAPDH 比值 ( $P < 0.01$ ), 提高 N-cadherin/GAPDH 比值 ( $P < 0.01$ ); 与 pcDNA-EZH2 组相比, pcDNA-EZH2+AG490 降低细胞增殖活力 ( $P <$

0.05) 和细胞侵袭数目 ( $P < 0.01$ ), 提升了 E-cadherin 表达 ( $P < 0.01$ ), 并降低了 N-cadherin 表达 ( $P < 0.01$ ), 见图 5D~H。表明 pcDNA-EZH2 通过 JAK/STAT3 通路促进 Fadu 细胞的增殖、侵袭和 EMT。

### 3 讨论

尽管许多下咽癌患者在最终的放化疗后进行了手术切除, 但由于围手术期并发症, 其预后往往不令人满意。因此, 研究其他可行的治疗策略来预防下咽癌是至关重要的。microRNAs 是一类非编码的、高度保守的单链 RNA<sup>[15-17]</sup>, 通过作为肿瘤抑制基因或癌基因来解除基因表达调控和改变人类癌症的转录后基因沉默<sup>[18-19]</sup>。miRNA-98 在肿瘤生物学的多个方面发挥重要作用, 与肿瘤的发生发展密切相关。例

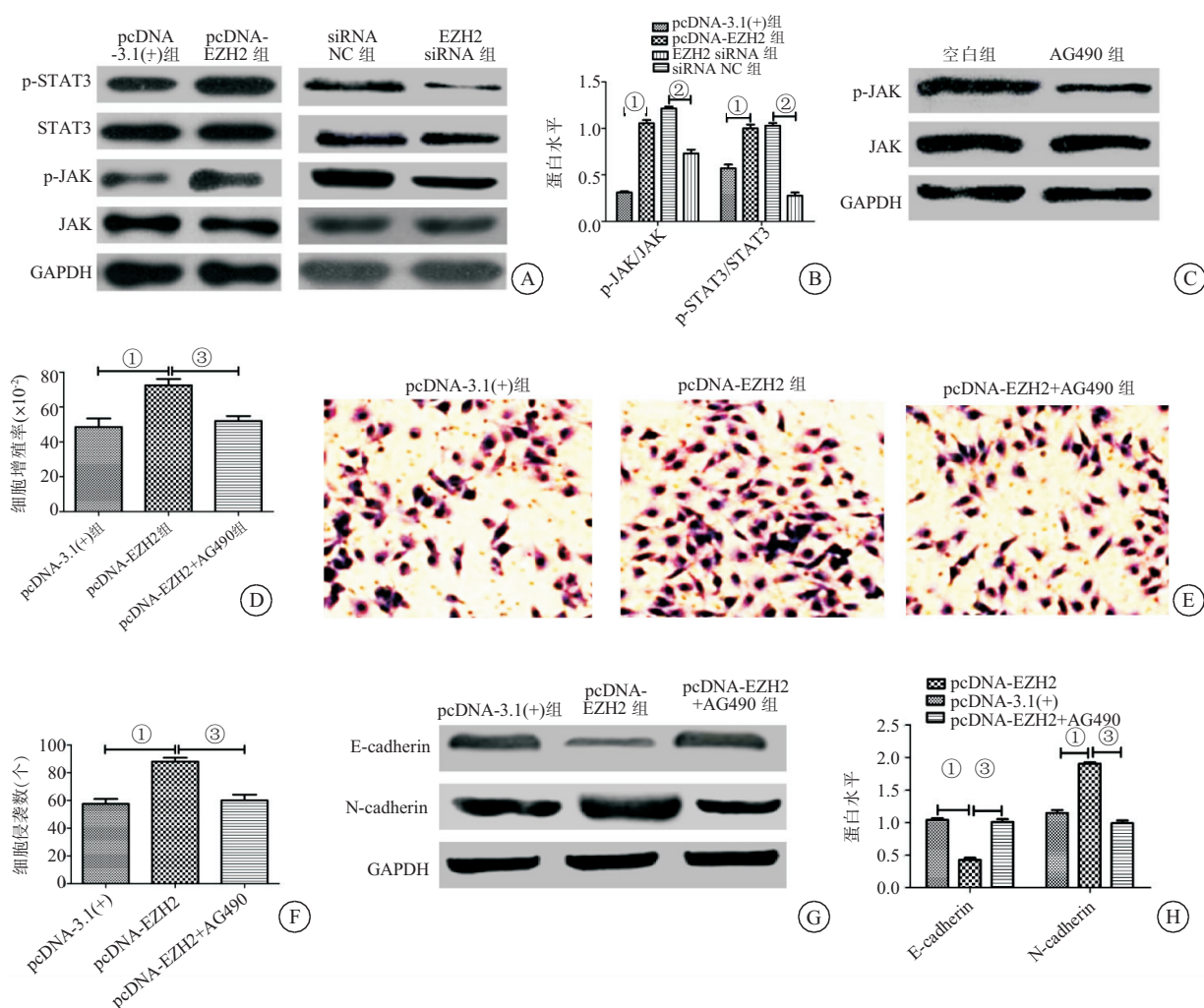


图 5 pcDNA-EZH2 通过 JAK/STAT3 通路调控 Fadu 细胞的增殖和 EMT

Figure 5 pcDNA-EZH2 regulated proliferation and EMT of Fadu cells through the JAK/STAT3 pathway

注: A. 过表达或下调 EZH2 在 Fadu 细胞中的表达后分析 JAK/STAT3 通路表达; B. p-JAK/JAK 和 p-STAT3/STAT3 比值; C. AG490 作用细胞后检测 JAK 磷酸水平; D. pcDNA-EZH2、AG490 作用 Fadu 细胞后分析细胞增殖能力; E. pcDNA-EZH2、AG490 作用 Fadu 细胞后分析细胞侵袭能力; F. Fadu 细胞侵袭数目; G. pcDNA-EZH2、AG490 作用 Fadu 细胞后分析细胞 EMT 能力; H. E-cadherin、N-cadherin 与 GAPDH 的比值。与 pcDNA-3.1(+) 组相比, ①  $P < 0.05$ ; 与 siRNA NC 组相比, ②  $P < 0.05$ ; 与 pcDNA-EZH2 组相比, ③  $P < 0.05$

如, Yang 等<sup>[20]</sup>研究发现 miR-98 通过靶向 PAK1 抑制非小细胞癌肺癌的细胞增殖和侵袭。Fan 等<sup>[21]</sup>认为过表达 miR-98 可通过下调 IKK $\epsilon$  抑制胶质瘤细胞系的细胞侵袭。Siragam 等<sup>[22]</sup>发现 miR-98 通过靶向激活素受体样激酶-4 和基质金属蛋白酶-11 抑制肿瘤血管生成和侵袭。在本研究中, 我们发现 miR-98 在下咽癌组织和细胞系中表达显著降低。进一步的实验表明, 下调 miR-98 可促进下咽癌细胞增殖、侵袭及其 EMT 进程, 提示 miR-98 在下咽癌进展过程中发挥了重要的生物学作用。

Zeste 基因增强子同源物 2 (Enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 是 Polycomb group (PcG) 蛋白家族的成员。EZH2 基因位于染色体 7q35 上, 包含 20

个外显子和 19 个内含子。EZH2 是 PRC2 的催化亚基, 包含一个 SET 结构域, 通过影响组蛋白和 DNA 甲基化在表观遗传水平上修饰转录<sup>[23-24]</sup>。有证据表明 EZH2 作为致癌基因参与了癌变。例如, Huang 等<sup>[25]</sup>报道 EZH2 在喉鳞癌中过表达, 增强了 AMC-HN-8 细胞的干细胞样特性。Ko 等<sup>[26]</sup>研究表明, GSK3b 失活可促进 EZH2 的致癌功能, 并增强人类乳腺癌中 H3K27 的甲基化。Zhu 等<sup>[27]</sup>发现 miR-138 通过靶向 EZH2 作为肿瘤抑制因子, 增强了顺铂诱导的骨肉瘤细胞的凋亡。本研究通过 TargetScan 预测发现 miR-98 直接靶向 EZH2 且负调控其表达。本研究通过下调 EZH2 表达进一步检测细胞增殖和转移的机制, 结果表明, 下调 EZH2 抑制了下咽癌细胞增

殖、侵袭及其 EMT 进程。越来越多的研究表明 JAK/STAT3 通路参与了癌症的发生发展过程<sup>[28]</sup>。本研究结果显示,过表达 EZH2 可以挽救 miR-98 模拟物产生的表型,上调 EZH2 激活了 Fadu 细胞内 JAK/STAT3 通路。而我们在后续研究过程中发现过表达 EZH2 通过 JAK/STAT3 通路在 Fadu 细胞增殖、侵袭和 EMT 过程中发挥促进作用。

#### 4 结论

本研究表明 miR-98 在下咽癌细胞中发挥抑癌作用,而 EZH2 是 miR-98 的作用靶点。进一步研究表明,miRNA-98 靶向 EZH2 激活 JAK/STAT3 通路调控下咽癌细胞转移及其上皮间质转化。因此,这些研究结果表明 miR-98 可以作为下咽癌治疗的靶点。

#### 【参考文献】

- [1] 田霖丽,李亮,张佳蕊,等. 硬质支撑弯喉镜在下咽部检查及部分早期下咽癌手术中的应用体会[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2020,55(12):1137-1142.
- [2] 李武杰,李勇强,张樊苹,等. Claudin-1 与 cyclinB1 在下咽鳞状细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2020,26(5):537-543.
- [3] 路铁,李振东,李树春,等. 321 例下咽癌患者临床特征及两种治疗方式疗效分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2019,479(3):88-92.
- [4] 杨梦雪,文忠. 激光微创手术在下咽癌中的应用研究进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2019(3):327-332.
- [5] 陶磊,周梁,吴海涛,等. 154 例 cN0/cN1 下咽鳞状细胞癌颈淋巴清扫效果及预后分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2019,54(4):272-279.
- [6] JUNMI L, YUTING Z, JUAN F, *et al.* MicroRNAs associated with therapy of non-small cell lung cancer[J]. International Journal of Biological Sciences, 2018, 14(4):390-397.
- [7] DONG Y, LIU Y, JIANG A, *et al.* MicroRNA-335 suppresses the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells by targeting EphA4[J]. Mol Cell Biochem, 2018, 439(1-2):95-104.
- [8] 王龙飞,彭洪,苏强,等. miRNA-301a-3p 调控结直肠癌对 5-氟尿嘧啶敏感性的机制研究[J]. 西部医学, 2019, 31(8):1165-1169.
- [9] 朱泽民,徐涛. miR-34 在肿瘤中的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2019, 39(11):2525-2531.
- [10] 姜安祺,张明辉,张锐,等. MicroRNA 在肺癌耐药中的作用[J]. 肿瘤学杂志, 2020, 212(5):78-81.
- [11] XU X, LIU H, NEIL G, *et al.* Overexpression of miRNA-4451 is Associated With a Poor Survival of Patients With Hypopharyngeal Cancer After Surgery With Postoperative Radiotherapy[J]. Translational Oncology, 2018, 11(5):1244-1250.
- [12] KIKKAWA N, KINOSHITA T, NOHATA N, *et al.* microRNA-504 inhibits cancer cell proliferation via targeting CDK6 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. International Journal of Oncology, 2014, 44(6):2085-2092.
- [13] WANG Q W, TAN L J, LIU J T, *et al.* MicroRNA-98/PTEN/AKT pathway inhibits cell proliferation and malignant progression of hypopharyngeal carcinoma by MTDH[J]. Oncology Reports, 2018, 41(2):863-874.
- [14] GAN H Z, LIN L, HU N J, *et al.* Aspirin ameliorates lung cancer by targeting the miR-98/WNT1 axis[J]. Thoracic Cancer, 2019, 10(4):744-750.
- [15] 李玉军. microRNAs 在肿瘤病理学研究中的进展[J]. 实用检验医师杂志, 2014, (1):1-5.
- [16] 唐德平,邢梦洁,宋文涛,等. microRNA 治疗在癌症及其他疾病中的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(11):64-73.
- [17] 梁文丽,刘植华. miRNA 在宫颈癌中的研究进展[J]. 深圳中西医结合杂志, 2020, 274(21):200-202.
- [18] YAZDANI M, BEIKI Z, JAHANIAN A. RNA secondary structured logic gates for profiling the microRNA cancer biomarkers[J]. IET Nanobiotechnology, 2020, 14(3):181-190.
- [19] TANG X, YANG M, WANG Z, *et al.* MicroRNA-23a promotes colorectal cancer cell migration and proliferation by targeting at MARK1[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2019, 51(7):661-668.
- [20] YANG G, ZHANG X, SHI J. MiR-98 inhibits cell proliferation and invasion of non-small cell carcinoma lung cancer by targeting PAK1[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11):20135-20145.
- [21] FAN Y H, YE M H, WU L, *et al.* Overexpression of miR-98 inhibits cell invasion in glioma cell lines via downregulation of IKK $\epsilon$ [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(19):3593-604.
- [22] SIRAGAM V, RUTNAM Z J, YANG W, *et al.* MicroRNA miR-98 inhibits tumor angiogenesis and invasion by targeting activin receptor-like kinase-4 and matrix metalloproteinase-11[J]. Oncotarget, 2012, 3(11):1370-1385.
- [23] KARANTANOS T, CHISTOFIDES A, BARHDAN K, *et al.* Regulation of T Cell Differentiation and Function by EZH2[J]. Front Immunol, 2016, 3(7):172-178.
- [24] 王静,薛华,范丽霞,等. EZH2 的基因沉默在血液系统疾病中作用的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 275(17):168-171.
- [25] HUANG J, ZHOU L, CHEN H, *et al.* EZH2 is overexpressed in laryngeal squamous cell carcinoma and enhances the stem-like properties of AMC-HN-8 cells[J]. Oncol Lett, 2016, 12(2):837-846.
- [26] KO H W, LEE H H, HUO L, *et al.* GSK3 $\beta$  inactivation promotes the oncogenic functions of EZH2 and enhances methylation of H3K27 in human breast cancers[J]. Oncotarget, 2016, 7(35):57131-57144.
- [27] ZHU Z, TANG J, WANG J, *et al.* MiR-138 Acts as a Tumor Suppressor by Targeting EZH2 and Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cells[J]. Plos One, 2016, 11(3):e0150026.
- [28] KIM M S, LEE H S, KIM Y J, *et al.* MEST induces Twist1-mediated EMT through STAT3 activation in breast cancers[J]. Cell Death Differ, 2019, 26(12):2594-2606.

(收稿日期:2021-04-26;修回日期:2022-01-29;编辑:黎仕娟)