

• 论 著 •

LncRNA MAGI2-AS3 导致鼻咽癌细胞放疗抵抗的作用机制研究*

戴润芝, 徐 莲, 彭先兵[△]

湖北省十堰市人民医院/湖北医药学院附属人民医院耳鼻咽喉科, 湖北十堰 442000

摘 要:目的 研究长链非编码 RNA 含有 WW 和 PDZ 结构域 2 的膜相关鸟苷酸激酶反义 RNA 3(LncRNA MAGI2-AS3)在鼻咽癌组织中的表达及与患者放射治疗(放疗)敏感性的关系,并探讨 LncRNA MAGI2-AS3 对鼻咽癌细胞放疗抵抗的影响及作用机制。方法 采用反转录荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 LncRNA MAGI2-AS3 在鼻咽癌组织中的表达水平,分析 LncRNA MAGI2-AS3 与鼻咽癌患者放疗敏感性的关系。常规培养鼻咽癌细胞 CNE2,转染 LncRNA MAGI2-AS3 小干扰 RNA(siRNA),根据是否转染 siRNA 分为 si-NC 组和 si-LncRNA MAGI2-AS3 组。采用 CCK8 实验检测各组细胞的放疗敏感性;放射处理后,采用平板克隆实验、流式细胞实验、裸鼠实验分别检测各组细胞克隆形成能力、细胞周期、凋亡情况和细胞体内生长能力;采用 Western blot 试验检测各组细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)、凋亡蛋白活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)3、caspase9 表达。结果 RT-qPCR 检测结果显示,LncRNA MAGI2-AS3 在鼻咽癌组织中表达上调($P<0.05$)。LncRNA MAGI2-AS3 高表达与患者放疗抵抗有关($P<0.05$)。与 si-NC 组相比,si-LncRNA MAGI2-AS3 组鼻咽癌细胞中 LncRNA MAGI2-AS3 表达减少、对放疗敏感性增加($P<0.05$)。放射处理后,si-LncRNA MAGI2-AS3 组鼻咽癌细胞克隆形成能力降低($P<0.05$),细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期($P<0.05$),细胞凋亡增加($P<0.05$),细胞体内生长能力显著降低($P<0.05$),cyclin D1、CDK4 表达降低,caspase3、caspase9 表达增加($P<0.05$)。结论 LncRNA MAGI2-AS3 通过调控细胞周期和凋亡促进鼻咽癌细胞放疗抵抗,是逆转鼻咽癌放疗抵抗的潜在分子靶点。

关键词:鼻咽癌; 长链非编码 RNA 含有 WW 和 PDZ 结构域 2 的膜相关鸟苷酸激酶反义 RNA3; 放疗抵抗; 增殖; 凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.18.012

中图法分类号:R739.62

文章编号:1673-4130(2022)18-2232-06

文献标志码:A

Effect and mechanism of LncRNA MAGI2-AS3 for causing radiotherapeutic resistance of nasopharyngeal carcinoma cells*

DAI Runzhi, XU Lian, PENG Xianbing[△]

Department of ENT, Shiyan Municipal People's Hospital/Affiliated People's Hospital of Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China

Abstract:Objective To study the expression of long chain noncoding RNA membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing 2 antisense RNA 3 (LncRNA MAGI2-AS3) in nasopharyngeal carcinoma tissues and its relationship with the radiotherapeutic sensitivity of the patients, and to investigate the effect of LncRNA MAGI2-AS3 on nasopharyngeal carcinoma cell radiotherapeutic resistance and its action mechanism. **Methods** The reverse transcription fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression level of LncRNA MAGI2-AS3 in nasopharyngeal carcinoma tissues, and the relationship between the expression of LncRNA MAGI2-AS3 and the radiotherapeutic sensitivity in the patients with nasopharyngeal carcinoma. The nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells were routinely cultured, transfected with LncRNA MAGI2-AS3 siRNA, and divided into the si-NC group and si-LncRNA MAGI2-AS3 group according to whether transfecting siRNA. The CCK8 experiment was used to detect the effect of cells in each group on the sensitivity of radiotherapy; after radiation treatment, the plate cloning experiment, flow cytometry experiment and nude mouse experiment were used to detect the cloning ability, cell cycle, apoptosis and growth ability of cells in vivo in each group; Western blot was used to detect the expression levels of cell cycle-related proteins D1 (cyclin D1), CDK4, apoptosis-related proteins activated caspase3 and

* 基金项目:湖北省卫生健康委员会联合基金项目(WJ2019H437)。

作者简介:戴润芝,女,副主任医师,主要从事鼻咽癌诊疗研究。 [△] 通信作者, E-mail:971737307@qq.com。

caspase9 in each group. **Results** The RT-qPCR detection results showed that the LncRNA MAGI2-AS3 expression was up-regulated in nasopharyngeal carcinoma tissues ($P < 0.05$). The high expression of LncRNA MAGI2-AS3 was related with the radiotherapeutic resistance in the patients ($P < 0.05$). Compared with the si-NC group, the expression level of LncRNA MAGI2-AS3 in nasopharyngeal carcinoma cells in the si-LncRNA MAGI2-AS3 group was decreased ($P < 0.05$), and the radiotherapeutic sensitivity was increased ($P < 0.05$). After radiation treatment, nasopharyngeal carcinoma cell clone formation ability in the si-LncRNA MAGI2-AS3 group was decreased ($P < 0.05$), the cell cycle was arrest in G_0/G_1 phase ($P < 0.05$), cell apoptosis was increased ($P < 0.05$), the cell growth ability in vivo was significantly reduced ($P < 0.05$); the expressions of cyclin D1 and CDK4 were decreased, and the expressions of caspase3 and caspase9 were increased ($P < 0.05$). **Conclusion** LncRNA MAGI2-AS3 regulates the cell cycle and apoptosis, promotes the radiotherapeutic resistance of nasopharyngeal carcinoma cells, which is a potential molecular target point for reversing the radiotherapeutic resistance of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; long chain noncoding RNA membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing 2 antisense RNA 3; radiotherapeutic resistance; proliferation; apoptosis

鼻咽癌占有头颈部恶性肿瘤的 50%，全世界每年报告的鼻咽癌新病例约为 8 万例。同时，鼻咽癌是一种具有独特地理分布特征的恶性肿瘤，主要分布在中国南方、东南亚和北非^[1]。一部分鼻咽癌患者在诊断时就有颈部和(或)远处器官的转移，再加上鼻咽局部解剖的局限性、肿瘤侵袭性生长特性，使得放射治疗(放疗)成为鼻咽癌治疗的首选方式。鼻咽癌细胞对放疗相对敏感，大部分鼻咽癌患者可以通过放疗实现临床治愈，然而仍有部分患者在放疗过程中会发生放疗抵抗。放疗抵抗是鼻咽癌患者复发的主要原因，复发患者的 5 年生存率仅为 25%~35%，预后极差^[2]。然而，人们对放疗抵抗的机制尚未完全了解。长链非编码 RNA 含有 WW 和 PDZ 结构域 2 的膜相关鸟苷酸激酶反义 RNA3(LncRNA MAGI2-AS3)是近年来新发现的长链非编码 RNA 之一，与肿瘤的发生、发展密切相关，调控肿瘤的增殖、凋亡、侵袭、转移和耐药等恶性生物学行为^[3-5]。研究显示，LncRNA MAGI2-AS3 在胃癌和结直肠癌等恶性肿瘤中发挥促癌作用^[6-7]，在非小细胞肺癌和乳腺癌中发挥抑癌作用^[8-9]，表明 LncRNA MAGI2-AS3 在不同肿瘤中发挥不同的作用。CAO 等^[5]报道发现，LncRNA MAGI2-AS3 在鼻咽癌中促进顺铂耐药性。但 LncRNA MAGI2-AS3 在鼻咽癌放疗抵抗中的作用未知，因此本文对此进行了研究，为逆转鼻咽癌放疗抵抗提供新的方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从本院获得 70 例鼻咽癌组织和与其配对的癌旁组织，其中放疗敏感鼻咽癌组织及癌旁组织各 32 例，放疗抵抗鼻咽癌组织及癌旁组织各 38 例。所有鼻咽癌组织均经两位及以上的病理学专家确诊。放疗敏感及抵抗的评价根据国际标准进行^[10]，所有患者在放疗结束后 3 个月进行鼻内窥镜和鼻咽 CT 检查：肿瘤消失，鼻咽软组织恢复为完全缓解

(CR)；肿瘤消失 50%以上，鼻咽结构大部分恢复正常为部分缓解(PR)；肿瘤体积缩小<50%，大部分鼻咽结构未恢复正常为病情稳定(SD)；肿瘤体积增大为疾病进展(PD)。CR 和 PR 患者被认为是临床放疗敏感患者，SD 和 PD 患者被认为是临床放疗抵抗患者。本研究获得医院伦理委员会批准，并获得患者知情同意。

1.2 主要试剂与材料 Trizol 试剂和二奎啉甲酸法(BCA)蛋白质检测试剂盒购自美国 Thermo 试剂公司；反转录荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂盒购自美国 Grand Island 生物技术公司；鼻咽癌细胞 CNE2 购自美国 ATCC 细胞库；RPMI1640 培养基、胎牛血清(FBS)、胰酶、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素溶液和磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国 Gibco 公司；LncRNA MAGI2-AS3 小干扰 RNA(siRNA)购自上海生工生物工程技术服务有限公司；Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 试剂公司；CCK8 试剂购自美国 Sigma 试剂公司；细胞周期检测试剂盒购自中国上海碧云天生物试剂有限公司；细胞凋亡检测试剂盒购自中国南京凯基生物试剂有限公司；甲醇溶液、结晶紫染色液购自北京索莱宝试剂公司；放射免疫沉淀(RIPA)裂解液购自上海申能博采生物科技有限公司；聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自美国 Promega 公司；细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)、凋亡蛋白活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)3、caspase9、GAPDH 一抗、辣根过氧化物酶(HRP)偶联的羊抗兔、羊抗鼠二抗购自英国 Abcam 公司。BALB/c-nu 雄性裸鼠(鼠龄：3~5 周；体质量：20~28 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 RT-qPCR Trizol 用于从鼻咽癌组织及癌旁组织和细胞中提取总 RNA。检测 RNA 样品的纯度

与水平, A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0 时表明样品合格。按照 RT-qPCR 试剂盒说明书, 将 5 μg 总 RNA 反转录为 cDNA, 并以 cDNA 作为模板进行扩增反应。反应体系为 300 ng cDNA 2.0 μL , $1\times$ PCR 缓冲液 5.0 μL , 200 $\mu\text{mol/L}$ 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs) 4.0 μL , 80 pmol/L PCR 正向引物 0.4 μL , 80 pmol/L PCR 反向引物 0.4 μL , Taq 酶 1.0 μL , 用 DEPC 水补足体积至 25.0 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸, 共 30 个循环。然后在 2 $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸 10 min。每个样品包括 3 个重复孔。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算 LncRNA MAGI2-AS3 的相对表达水平。Ct 指实时荧光强度达到设定阈值且扩增呈对数增长时的扩增循环数。所用引物序列: LncRNA MAGI2-AS3 正向引物为 5'-TGGGTCTGTGCAGTTAGA-3', 反向引物为 5'-AGGGAGTCTAGGCCCTTCT-3'; GAPDH 正向引物为 5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3', 反向引物为 5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3'。

1.3.2 细胞培养、分组及转染 鼻咽癌细胞 CNE2 采用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素溶液的 RPMI1640 培养基培养, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中。24 h 后更换培养基, 72 h 后传代。取对数生长期的细胞以 3×10^5 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板中, 根据是否转染 si-RNA 分为 si-NC 组和 si-LncRNA MAGI2-AS3 组。当细胞密度为 30%~50% 时, 使用 Lipofectamine2000 试剂盒进行细胞转染。无血清培养基用于稀释 100 pmol LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 和 NC siRNA, 使得终浓度为 50 nmol/L, 然后混合并在室温下孵育 5 min。与 Lipofectamine 2000 溶液混合, 室温孵育 20 min, 加入细胞中。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿培养箱中孵育 6~8 h 后, 更换新鲜培养基进一步培养 48 h 用于以下实验。采用 RT-qPCR 检测 LncRNA MAGI2-AS3 的表达, 比较 si-NC 组和 si-LncRNA MAGI2-AS3 组细胞转染效果。

1.3.3 CCK8 实验检测细胞放疗敏感性 将 si-NC 组和 si-LncRNA MAGI2-AS3 组细胞以 1×10^4 个/孔接种到 96 孔板中, 每组包括 6 个重复孔, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿培养箱中培养。细胞贴壁后, 分别采用 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 Gy 的放射剂量辐射各组细胞。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿培养箱中继续培养 48 h 后, 各细胞孔中加入 10.0 μL CCK8 试剂, 在培养箱中孵育 1 h 后, 通过酶标仪在 450 nm 的激发波长下测量每个孔的 A 值。

1.3.4 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力 将 si-NC 组和 si-LncRNA MAGI2-AS3 组细胞以 500 个/孔接种到 6 孔板中, 每组包括 3 个重复孔, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿培养箱中培养。细胞贴壁后, 采

用 2.0 Gy 的放射剂量辐射各组细胞, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿培养箱中继续培养, 并每隔 48 小时更换 1 次新鲜培养基。培养 48 h, 肉眼可见细胞克隆团形成时, 终止细胞培养, PBS 洗 3 次后, 加入甲醇溶液固定 10 min, 弃掉甲醇溶液, 加入结晶紫染色 20 min, 双蒸水清洗干燥后, 扫描并计数各组细胞克隆团形成数目。

1.3.5 流式细胞术检测细胞周期 将 si-NC 组和 si-LncRNA MAGI2-AS3 组细胞以 2×10^5 个/孔接种到 6 孔板中, 每组包括 3 个重复孔, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿培养箱中培养。细胞贴壁后, 采用 2.0 Gy 的放射剂量辐射各组细胞, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿培养箱中继续培养 48 h, 终止细胞培养, 采用胰酶消化、收集各组细胞, PBS 洗 3 次后, 加入细胞周期检测缓冲液 500.0 μL 重悬细胞, 并加入 50.0 μL 的 PI 染液、12.5 μL 的 RNase A 试剂, 混匀后, 放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育 30 min, 采用流式细胞仪检测各组细胞周期。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将 si-NC 组和 si-LncRNA MAGI2-AS3 组细胞以 2×10^5 个/孔接种到 6 孔板中, 每组包括 3 个重复孔, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿培养箱中培养。细胞贴壁后, 采用 2.0 Gy 的放射剂量辐射各组细胞, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿培养箱中继续培养 48 h, 终止细胞培养, 采用无 EDTA 的胰酶消化、收集各组细胞, PBS 洗 3 次后, 加入细胞凋亡检测缓冲液 500.0 μL 重悬细胞, 并加入 5.0 μL Annexin V-FITC 试剂和 10.0 μL PI 染液, 混匀后放置室温中孵育 30 min, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

1.3.7 裸鼠成瘤实验检测细胞体内生长能力 BALB/c-nu 雄性裸鼠分为鼠 si-NC 组和鼠 si-LncRNA MAGI2-AS3 组, 每组 6 只。胰酶消化收集鼠 si-NC 组和鼠 si-LncRNA MAGI2-AS3 组细胞, PBS 洗 3 次后, 以 5×10^6 个/只接种到裸鼠皮下。使用游标卡尺每周测量 1 次小鼠肿瘤的最大径(a)和最小径(b), 按以下公式计算肿瘤体积: 体积=(a $\times$ b)/2。当肿瘤体积约为 50 mm^3 时, 在连续 5 d 内以每天 2.0 Gy 的剂量向肿瘤施加总剂量为 10.0 Gy 的放射线。继续饲养并测量肿瘤的体积, 4 周左右处死小鼠, 将肿瘤解剖并称质量。

1.3.8 Western blot 试验检测细胞周期和凋亡蛋白表达 采用 RIPA 裂解液提取 si-NC 组和 si-LncRNA MAGI2-AS3 组细胞蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白定量。将蛋白煮沸进行变性处理, 将处理后的蛋白加入加样孔中, 在 10% 分离凝胶中进行 SDS-PAGE 电泳约 2 h, 分离蛋白, 以电湿转的方式将蛋白转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜在室温下封闭 1 h。洗膜后, 加入兔 cyclin D1 单克隆抗体(稀释比例为 1:1 000, ab16663)、兔 CDK4 单克隆抗体(稀释比例为 1:1 000, ab108357)、兔活化的 caspase3 单克隆抗体孵

育(稀释比例为 1 : 500, ab32150)、兔活化的 caspase9 单克隆抗体(稀释比例为 1 : 500, ab79202), 于 4 ℃ 条件下孵育过夜。将膜洗涤并与 HRP 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG) 的二抗(稀释比例为 1 : 2 000, ab6721)在 37 ℃ 下孵育 2 h。以 GAPDH 作为内参蛋白。由增强型化学发光系统检测, 然后由凝胶成像系统处理和分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行统计分析。对所有纳入的数据进行了正态性检验, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

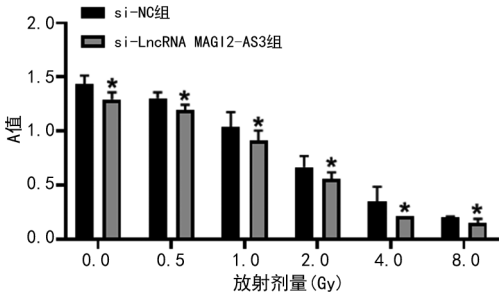
2 结果

2.1 LncRNA MAGI2-AS3 在鼻咽癌组织中表达上调 RT-qPCR 结果显示, LncRNA MAGI2-AS3 在鼻咽癌组织中的表达为 1.39 ± 0.58 , 高于在癌旁组织中的表达 (0.98 ± 0.53), 差异有统计学意义 ($t = 4.298, P < 0.001$)。

2.2 LncRNA MAGI2-AS3 表达与鼻咽癌患者放疗敏感性的关系 RT-qPCR 结果显示, LncRNA MAGI2-AS3 在放疗抵抗患者鼻咽癌组织中的表达为 1.52 ± 0.61 , 高于在放疗敏感患者鼻咽癌组织中的表达 (1.23 ± 0.51), 差异有统计学意义 ($t = 2.164, P = 0.034$)。

2.3 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 转染鼻咽癌细胞的效果 RT-qPCR 检测 LncRNA MAGI2-AS3 在 si-LncRNA MAGI2-AS3 组鼻咽癌 CNE2 细胞中的相对表达量为 0.45 ± 0.06 , 低于其在 si-NC 组鼻咽癌 CNE2 细胞中的相对表达量 (1.00 ± 0.04), 差异有统计学意义 ($t = 12.626, P < 0.001$)。

2.4 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞放疗敏感性的影响 CCK8 实验检测结果显示, 与 si-NC 组相比, si-LncRNA MAGI2-AS3 组鼻咽癌 CNE2 细胞放疗敏感性增加 ($P < 0.05$)。见图 1。



注: 与 si-NC 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 CCK8 实验检测鼻咽癌细胞放疗敏感性

2.5 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞克隆形成能力的影响 经放射处理后, 平板克隆实验检测结果显示, 与 si-NC 组鼻咽癌 CNE2 细胞[克隆形成数 (42.33 ± 6.25) 个]相比, si-LncRNA MAGI2-AS3 组鼻咽癌 CNE2 细胞[克隆形成数 (19.67 ± 4.97) 个]克隆形成能力降低 ($t = 4.915, P = 0.004$)。

见图 2。

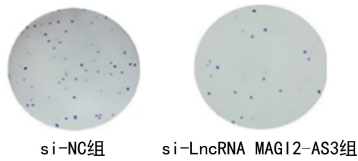
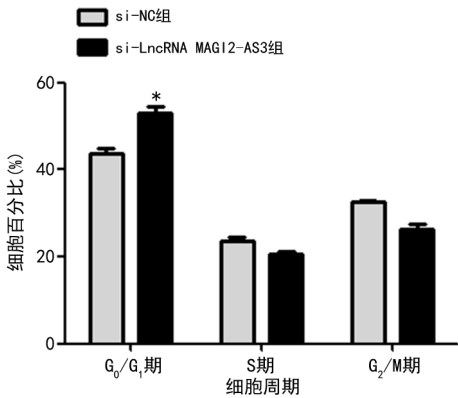


图 2 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞克隆形成能力的影响

2.6 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞周期的影响 经放射处理后, 流式细胞实验检测结果显示, 与 si-NC 组鼻咽癌 CNE2 细胞 (G_0/G_1 期细胞百分比为 $43.68\% \pm 2.16\%$) 相比, si-LncRNA MAGI2-AS3 组鼻咽癌 CNE2 细胞 (G_0/G_1 期细胞百分比为 $53.11\% \pm 2.52\%$) 周期阻滞在 G_0/G_1 期 ($t = 4.921, P = 0.004$)。见图 3。



注: 与 si-NC 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞周期的影响

2.7 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞凋亡的影响 经放射处理后, 流式细胞术检测结果显示, 与 si-NC 组鼻咽癌 CNE2 细胞(细胞凋亡率为 $3.45\% \pm 1.53\%$) 相比, si-LncRNA MAGI2-AS3 组鼻咽癌 CNE2 细胞凋亡增加(细胞凋亡率为 $23.34\% \pm 4.67\%$), 差异有统计学意义 ($t = 7.012, P = 0.001$)。见图 4。

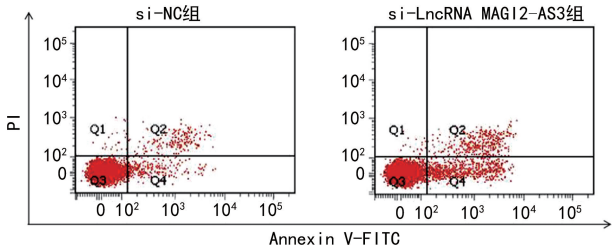
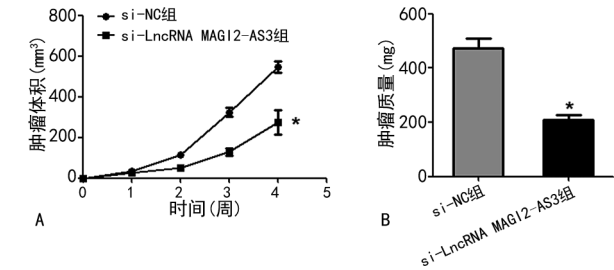


图 4 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞凋亡的影响

2.8 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞体内生长能力的影响 经放射处理后, 裸鼠成瘤实验检测结果显示, 与鼠 si-NC 组鼻咽癌 CNE2 细胞相比, 鼠 si-LncRNA MAGI2-AS3 组鼻咽癌 CNE2 细胞成瘤体积减小 ($P < 0.05$)。见图 5A。与鼠 si-NC 组鼻

咽癌 CNE2 细胞成瘤体质量 $[(0.53 \pm 0.06) \text{mg}]$ 相比,鼠 si-LncRNA MAGI2-AS3 组鼻咽癌 CNE2 细胞成瘤体质量减少 $[(0.29 \pm 0.02) \text{mg}]$,差异有统计学意义($t=6.362, P=0.003$)。见图 5B。



注:A 为成瘤体积比较;B 为成瘤体质量比较;与 si-NC 组相比,* $P<0.05$ 。

图 5 裸鼠成瘤实验中 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞体内生长能力的影响

2.9 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞周期蛋白和凋亡蛋白表达的影响 Western blot 试验检测结果显示,与 si-NC 组相比,si-LncRNA MAGI2-AS3 组 cyclin D1、CDK4 表达降低($P<0.05$),促进凋亡蛋白活化的 caspase3、caspase9 表达增加($P<0.05$)。见图 6。

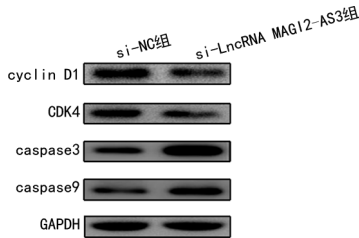


图 6 LncRNA MAGI2-AS3 siRNA 对鼻咽癌细胞周期和凋亡蛋白表达的影响

3 讨论

LncRNA 为长度大于 200 nt 的非蛋白编码转录物,没有编码蛋白的能力,最初 LncRNA 被认为是转录过程中产生的无用序列,没有任何功能。然而,研究发现 LncRNA 在包括细胞凋亡、分化、侵袭等多种过程的调控中发挥作用,并且它们存在异质性,发挥的功能不同^[11]。最近,LncRNA 被鉴定为肿瘤发生和进展的关键因素,LncRNA 在肿瘤中表达异常,并影响肿瘤细胞的恶性进展过程,包括上皮间质转化(EMT)、细胞侵袭、细胞生长、细胞耐药等,LncRNA 可作为肿瘤生物标志物和抗肿瘤治疗的重要分子靶标^[12]。

LncRNA 在鼻咽癌发生、发展中的作用已被广泛研究,并可作为鼻咽癌检测和预后判断的生物标志物,以及抗肿瘤治疗靶点^[13]。LncRNA MAGI2-AS3 在鼻咽癌中表达升高,并通过调节甘油磷酸酯二酯酶域 5(GDPD5)导致鼻咽癌的进展和顺铂耐药性,以及通过调节 SEC61 易位 Alpha1 亚基(SEC61A1)促进鼻咽癌细胞的增殖和迁移能力提升^[8]。LncRNA MAGI2-AS3 在胃癌、结直肠癌、非小细胞肺癌、食管

癌等常见的恶性肿瘤中均有报道^[6-8,14],其中 LncRNA MAGI2-AS3 在食管癌组织和细胞中低表达,LncRNA MAGI2-AS3 与 Zeste 同源 2(EZH2)相互作用,下调 HOXB7,从而促进细胞凋亡并抑制细胞增殖和放疗抵抗。鼻咽癌对电离辐射高度敏感,因此放疗是鼻咽癌患者治疗的重要手段,但是放疗抵抗是导致鼻咽癌患者预后不良的主要原因^[2]。本研究首先检测鼻咽癌组织中 LncRNA MAGI2-AS3 的表达,结果显示 LncRNA MAGI2-AS3 在鼻咽癌组织中表达上调,与 CAO 等^[5]的研究结果一致。同时本研究发现,LncRNA MAGI2-AS3 与鼻咽癌患者放疗抵抗有关,在放疗抵抗的鼻咽癌组织中 LncRNA MAGI2-AS3 的表达增加。而由于本研究收集的鼻咽癌样本量不多,后续会扩大样本量,分析 LncRNA MAGI2-AS3 的表达与鼻咽癌患者临床分期的关系。

本研究在细胞水平研究 LncRNA MAGI2-AS3 对鼻咽癌细胞放疗敏感性的影响,干扰 LncRNA MAGI2-AS3 的表达后,CCK8 实验显示鼻咽癌细胞对放疗的敏感性增加,并且在放射线的作用下,干扰 LncRNA MAGI2-AS3 表达的鼻咽癌细胞克隆形成能力降低,以及裸鼠成瘤能力降低。这表明 LncRNA MAGI2-AS3 在鼻咽癌放疗抵抗中发挥了重要作用,其作用机制还需进一步探讨。已经观察到干扰 LncRNA MAGI2-AS3 表达后,经放疗处理的鼻咽癌细胞的克隆形成能力,即单个细胞增殖能力降低。细胞周期失控的表现细胞恶性增殖,在干预条件下诱导细胞周期阻滞,会导致细胞增殖能力降低,这也是放疗的重要机制^[15]。本研究发现,在放疗作用下抑制 LncRNA MAGI2-AS3 的表达,细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期。放疗治疗恶性肿瘤的另一重要机制是诱导靶细胞凋亡。细胞凋亡是一种生理现象,通过凋亡将不需要的细胞、受损细胞和衰老细胞处理掉,而对放疗抵抗的肿瘤细胞可能会出现细胞凋亡缺陷^[16]。本研究发现,在放疗作用下抑制 LncRNA MAGI2-AS3 的表达,细胞凋亡增加。这提示 LncRNA MAGI2-AS3 可能通过调控细胞周期和凋亡促使鼻咽癌放疗抵抗。进一步检测发现,在放疗作用下,抑制 LncRNA MAGI2-AS3 的表达,鼻咽癌细胞中 G₀/G₁ 期相关蛋白 cyclin D1、CDK4^[16] 表达降低,促进凋亡蛋白活化的 caspase3、caspase9^[17] 表达增加,表明 LncRNA MAGI2-AS3 可能通过调控细胞周期相关蛋白和凋亡蛋白促使鼻咽癌细胞放疗抵抗。

综上所述,LncRNA MAGI2-AS3 在鼻咽癌组织中表达增加,与放疗抵抗有关,抑制 LncRNA MAGI2-AS3 的表达后鼻咽癌细胞对放疗的敏感性增加,其可能是通过调控细胞周期蛋白和凋亡蛋白发挥作用的。

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):394-424.
- [2] FRIKHA M, AUPERIN A, TAO Y, et al. A randomized trial of induction docetaxel-cisplatin-5FU followed by concomitant cisplatin-RT versus concomitant cisplatin-RT in nasopharyngeal carcinoma (GORTEC 2006-02) [J]. Ann Oncol, 2018, 29(3):731-736.
- [3] 李会政, 刘琳, 崔玲, 等. 长链非编码 RNA MAGI2-AS3 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 癌症进展, 2019, 17(6):650-654.
- [4] CHANG H, ZHANG X, LI B, et al. MAGI2-AS3 suppresses MYC signaling to inhibit cell proliferation and migration in ovarian cancer through targeting miR-525-5p/MXD1 axis[J]. Cancer Med, 2020, 9(17):6377-6386.
- [5] CAO C, ZHOU S, HU J. Long noncoding RNA MAGI2-AS3/miR-218-5p/GDPD5/SEC61A1 axis drives cellular proliferation and migration and confers cisplatin resistance in nasopharyngeal carcinoma[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2020, 10(8):1012-1023.
- [6] LI D, WANG J, ZHANG M, et al. LncRNA MAGI2-AS3 is regulated by brd4 and promotes gastric cancer progression via maintaining ZEB1 overexpression by sponging miR-141/200a[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19:109-123.
- [7] REN H, LI Z, TANG Z, et al. Long noncoding MAGI2-AS3 promotes colorectal cancer progression through regulating miR-3163/TMEM106B axis [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(5):4824-4833.
- [8] 王冰, 苏崇玉, 刘志东. LncRNA MAGI2-AS3 在非小细胞肺癌组织中的表达及生物学作用[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(19):3385-3389.
- [9] DU S, HU W, ZHAO Y, et al. Long non-coding RNA MAGI2-AS3 inhibits breast cancer cell migration and invasion via sponging microRNA-374a [J]. Cancer Biomark, 2019, 24(3):269-277.
- [10] LIAOL, YAN W J, TIAN C M, et al. Knockdown of Annexin A1 enhances radioresistance and inhibits apoptosis in nasopharyngeal carcinoma [J]. Technol Cancer Res Treat, 2018, 17:1533034617750309.
- [11] 杨万斌, 徐燕, 卓士铨, 等. 长链非编码 RNA 相关表观遗传修饰在癌症中的进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(8):59-66.
- [12] WU J, HANN S S. Functions and roles of long-non-coding RNAs in human nasopharyngeal carcinoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(3):1191-1204.
- [13] CHENG W, SHI X, LIN M, et al. LncRNA MAGI2-AS3 overexpression sensitizes esophageal cancer cells to irradiation through down-regulation of HOXB7 via EZH2 [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8:552822.
- [14] 吴丽芷, 陈始明. 鼻咽癌放疗抵抗机制的研究进展[J]. 山东医药, 2020, 60(12):102-105.
- [15] MA F, GU X, LIU J Q, et al. Inhibition of livin overcomes radioresistance in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. PLoS One, 2020, 15(3):e0229272.
- [16] XUE Z, LUI V W Y, LI Y, et al. Therapeutic evaluation of palbociclib and its compatibility with other chemotherapies for primary and recurrent nasopharyngeal carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1):262.
- [17] ZHAO W, TANG L, GAO S, et al. Junduqing extractive promotes the apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells through down-regulating Mcl-1 and Bcl-xL and up-regulating Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1):3904-3912.
- (收稿日期:2021-12-11 修回日期:2022-04-21)
- (上接第 2231 页)
- [12] 刘雅菲, 陈林, 周小桢, 等. 肺脏超声对新生儿呼吸窘迫综合征的诊断价值及肺超声评分的评估价值分析[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(9):1770-1773.
- [13] 万娟, 曾洪琳, 钟晓梅. 新生儿呼吸窘迫综合征血清 IL-6、TNF- α 及 Th1/Th2 水平变化及其临床意义[J]. 实用医院临床杂志, 2019, 16(2):147-150.
- [14] 王翔, 王新华, 张新. 新生儿呼吸窘迫综合征患儿 Th1/Th2 失衡与呼吸机相关性肺炎发生的相关性[J]. 中国实用医刊, 2020, 47(23):42-45.
- [15] 尚彪, 刘娟, 张鸿, 等. 新生儿呼吸窘迫综合征与感染性肺炎患儿血清炎症因子和甲状腺激素的变化及相关性分析[J]. 西部医学, 2019, 31(6):900-903.
- [16] CHEN F, HUANG F, ZHAN F. Correlation between serum transforming growth factor β 1, interleukin-6 and neonatal respiratory distress syndrome [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(1):671-677.
- [17] 王莹莹, 魏爽, 刘德香. 呼吸窘迫综合征患儿血清 HMGB1、IL-6、NGAL 的表达水平及临床意义[J]. 现代医学, 2019, 47(3):308-312.
- [18] 张林娇, 张明, 于思筠. HMGB1 水平与重症肺炎伴 ARDS 的相关性分析[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(2):276-278.
- [19] 熊伶俐. 高容量血液滤过联合前列地尔治疗新生儿感染性休克合并急性呼吸窘迫综合征的效果[J]. 中国医药导报, 2020, 17(2):76-80.
- [20] WANG L P, MAO Q H, YANG L. Effect of pulmonary surfactant combined with mechanical ventilation on oxygenation functions and expressions of serum transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) and bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) of neonatal respiratory distress syndrome [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(19):4357-4361.
- [21] 李兴朝, 李涛, 谢集建, 等. 枸橼酸咖啡因联合肺泡表面活性物质治疗新生儿呼吸窘迫综合征的疗效及对血清 BMP-7、CC16、SF 水平的影响[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(15):2953-2965.
- (收稿日期:2021-12-10 修回日期:2022-04-23)