

miR-106a-5p 对鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

张立杰¹, 姜思远², 涂巧铃¹, 张宁¹, 彭军¹, 李玉凤^{3*}

(1.河北省唐山市人民医院耳鼻喉科, 河北唐山 063000; 2.华北理工大学研究生院, 河北唐山 063000;
3.河北省唐山市人民医院中心实验室, 河北省分子肿瘤重点实验室, 河北唐山 063000)

[摘要] 目的 探讨 miR-106a-5p/程序性死亡配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 轴对鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 细胞恶性生物学行为的影响及分子机制。方法 通过实时荧光定量 PCR 检测 NPC 细胞系 HNE1 及永生化正常鼻咽上皮细胞 NP69 中 miR-106a-5p 和 PD-L1 mRNA 的表达水平; Western blot 检测 PD-L1 蛋白表达; 双荧光素酶报告实验验证 miR-106a-5p 与 PD-L1 之间的靶向调控关系; miR-106a-5p mimics 及 inhibitor、si-PD-L1 及 PD-L1 转染 HNE1 细胞; 细胞计数试剂盒 8 检测细胞增殖能力; 划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力。结果 NPC 细胞中 miR-106a-5p 和 PD-L1 的表达水平显著高于正常鼻咽上皮细胞 (miR-106a-5p: $P=0.001$, PD-L1-mRNA: $P=0.012$, PD-L1-蛋白: $P=0.008$)。双荧光素酶报告实验表明 PD-L1 是 miR-106a-5p 的直接靶点。miR-106a-5p mimics 显著上调 PD-L1 的 mRNA 和蛋白水平 ($P=0.010$; $P=0.037$), 而 miR-106a-5p inhibitor 显著抑制 PD-L1 的表达 ($P<0.001$)。PD-L1 过表达导致 miR-106a-5p 水平显著升高 ($P<0.05$), 敲低 PD-L1 导致 miR-106a-5p 水平显著降低 ($P<0.05$)。过表达 miR-106a-5p 或 PD-L1 均可显著增强 HNE1 细胞增殖、侵袭和迁移能力 (均 $P<0.05$), 同时敲低 PD-L1 或 miR-106a-5p 均可逆转这一效应 (均 $P<0.05$)。相反, 敲低 miR-106a-5p 或 PD-L1 均显著抑制细胞增殖、侵袭和迁移能力, 同时过表达 PD-L1 或 miR-106a-5p 能够逆转该抑制作用 (均 $P<0.05$)。结论 miR-106a-5p 与 PD-L1 间存在正反馈调控, 促进 NPC 细胞的增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 鼻咽癌; 细胞增殖; 迁移和侵袭 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2025.08.003

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)08-0881-09

Effects of miR-106a-5p on proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells

ZHANG Li-jie¹, JIANG Si-yuan², TU Qiao-ling¹, ZHANG Ning¹, PENG Jun¹, LI Yu-feng^{3*}

(1. Department of Otolaryngology, People's Hospital of Tangshan City, Hebei Province, Tangshan 063000, China; 2. Graduate School, North China University of Science and Technology, Hebei Province, Tangshan 063000, China; 3. Department of Central Laboratory, People's Hospital of Tangshan City, Key Laboratory of Molecular Oncology of Hebei Province, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the impact of the miR-106a-5p/programmed death-ligand 1 (PD-L1) axis on the malignant biological behavior of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells and its molecular mechanism. **Methods** The expression levels of miR-106a-5p and PD-L1 mRNA in the NPC cell line HNE1 and immortalized normal nasopharyngeal epithelial cell line NP69 were measured using quantitative real-time PCR (RT-qPCR), and PD-L1 protein expression was assessed by Western blotting. A dual-luciferase reporter assay was performed to

[收稿日期] 2024-10-11

[基金项目] 河北省分子肿瘤学重点实验室项目 (SZX2020043)

[作者简介] 张立杰 (1975-), 女, 河北唐山人, 河北省唐山

市人民医院副主任医师, 医学学士, 从事耳鼻咽喉头颈外科研究。

* 通信作者。E-mail: yufeng_li@tsrmyy.cn

verify the direct regulatory relationship between miR-106a-5p and PD-L1. HNE1 cells were transfected with miR-106a-5p mimics, inhibitors, si-PD-L1, or PD-L1 overexpression plasmids. Cell proliferation was evaluated by the CCK-8 assay, while cell migration and invasion were assessed using scratch assays and Transwell assays, respectively. **Results** The expression levels of miR-106a-5p and PD-L1 were significantly higher in NPC cells than in normal nasopharyngeal epithelial cells (miR-106a-5p: $P=0.001$, PD-L1-mRNA: $P=0.012$, PD-L1-protein: $P=0.008$). The dual-luciferase reporter assay confirmed that PD-L1 was a direct target of miR-106a-5p. miR-106a-5p significantly increased the mRNA and protein levels of PD-L1 ($P=0.010$; $P=0.037$), whereas the miR-106a-5p inhibitor markedly suppressed PD-L1 expression ($P<0.001$). Overexpression of PD-L1 led to a significant upregulation of miR-106a-5p ($P<0.05$), and knockdown of PD-L1 significantly reduced miR-106a-5p levels ($P<0.05$). Overexpression of either miR-106a-5p or PD-L1 significantly enhanced the proliferation, invasion and migration of HNE1 cells (both $P<0.05$), while knockdown of either PD-L1 or miR-106a-5p reversed these effects (both $P<0.05$). Conversely, knockdown of miR-106a-5p or PD-L1 significantly inhibited cell proliferation, invasion and migration, and overexpression of either PD-L1 or miR-106a-5p could reverse this inhibition (both $P<0.05$). **Conclusion** There is a positive feedback regulation between miR-106a-5p and PD-L1, which promotes the proliferation, migration, and invasion of NPC cells.

[Key words] nasopharyngeal carcinoma; cell proliferation; migration and invasion

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种起源于鼻咽上皮的鳞状细胞癌,是头颈部最常见的肿瘤类型之一。由于NPC的解剖位置特殊、临床表现不典型以及对其认识不足,大多数患者在确诊时已处于晚期,导致预后较差^[1]。因此,进一步阐明NPC发生发展的机制,可为临床诊疗提供新思路。程序性细胞死亡配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)是程序性细胞死亡蛋白(programmed cell death-1, PD-1)的配体,是一种由肿瘤细胞特异性表达的重要免疫检查点分子,在多种肿瘤中呈高表达^[2]。在癌细胞中,PD-L1的高表达可发生于基因表达调控的不同阶段,包括转录、转录后修饰、翻译后修饰以及通过外泌体的转运^[3]。除了促进肿瘤免疫逃逸,PD-L1还可在肿瘤细胞中激活内在信号通路,从而防止细胞凋亡,或以非免疫依赖性途径促进肿瘤的进展^[4]。尽管抗PD-1/PD-L1抗体在黑色素瘤、非小细胞肺癌的治疗中可取得很好的疗效,但抗PD-1/PD-L1抗体在复发或转移NPC患者中的三个临床试验报告的客观缓解率仅在20.5%~34.1%之间^[5]。因此进一步了解PD-L1在鼻咽癌中的作用及调控机制,可以为晚期鼻咽癌患者提供更加个体化的治疗方案来提升疗效以及减少治疗相关不良反应。microRNA(miRNA)是一类在转录后水平上调控基因表达的非编码RNA,它们通过与靶基因的3'非翻译区(3' untranslated

Regions, 3'UTR)互补结合,抑制mRNA的翻译或诱导其降解。最近的研究表明,miRNAs可以通过直接或间接靶向PD-L1的3'UTR以及相关信号分子,调节PD-L1的表达^[6]。但NPC中miRNA对PD-L1的转录后调控尚未见报道。本研究旨在探讨NPC细胞中miRNA对PD-L1表达的调控及对NPC细胞增殖、侵袭以及转移的影响。

1 材料与 方法

1.1 试剂与仪器 实验仪器:高速冷冻离心机HC-3018R(安徽中科中佳科学仪器有限公司),酶标仪,紫外线分光光度计Nanodrop 2000,定性PCR仪,实时荧光定量PCR仪PIKO REAL 96(美国ThermoFisher公司),手掌型离心机LX-100(江苏其林贝尔仪器制造有限公司),细胞培养箱(美国Forma公司),超纯水机Milli Q(美国Merck Millipore公司),琼脂糖凝胶电泳仪(日本Mupid公司),凝胶成像分析系统ChampGel 5000(北京赛智创业科技有限公司),快速混匀器(常州市伟嘉仪器制造有限公司),光学显微镜(日本Nikon公司),倒置相差显微镜(日本Plympus公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人永生正常鼻咽上皮细胞系NP69购自河南北纳生物公司,人鼻咽低分化鳞状细胞癌细胞系HNE1购自中南大学高等研究中心。

两种细胞系分别由河南北纳生物公司和天津中科迪生科技发展公司进行细胞遗传质量鉴定检测,均系STR鉴定正确,由唐山市人民医院中心实验室扩增并保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱和液氮罐,细胞培养于含有10% FBS,1%青霉素-链霉素的RPMI 1640完全培养基中置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中常规传代培养。

1.2.2 靶基因预测 基于生物信息学数据库(miRWalk、miRDB、TargetScan、miRDIP、TarBase),筛选同时在五个数据库中预测到的靶向PD-L1的潜在miRNA:miR-377-3p、miR-4496、miR-106a-5p、miR-93-5p。根据数据库预测的评分等级,交叉筛选出在五个数据库中评分均较高的miR-106a-5p作为目标miRNA。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 提取细胞中总RNA,逆转录为cDNA,U6及GAPDH为内参,上机检测,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算结果。U6上游引物:ATTGGAACGATACAGAGAAGATT,下游引物:GGAACGCTTCACGAATTTG;GAPDH上游引物:CATGAGAAGTATGACAACAGCCT,下游引物:AGTCCTTCCACGATACCAAAGT;miR-106a-5p上游引物:GATGCTCAAAAAGTGCTT-ACAGTGCA,下游引物:TATGGTTGTTCTGCTCTCTGTCTC;PD-L1上游引物:GGCATTTCG-TGAACGCAT,下游引物:CAATTAGTGCAGC-CAGGT。

1.2.4 细胞培养与转染 人永生化正常鼻咽上皮细胞系NP69购自河南北纳生物公司,人鼻咽低分化鳞状细胞癌细胞系HNE1购自中南大学高等研究中心。两种细胞系分别由河南北纳生物公司和天津中科迪生科技发展公司进行细胞遗传质量鉴定检测,均系STR鉴定正确,由唐山市人民医院中心实验室扩增并保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱和液氮罐。NP69细胞使用含有100 mL/L FBS的DMEM高糖培养基,HNE1细胞使用含有100 mL/L FBS的RPMI1640培养基,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 恒温箱培养。细胞分组:①con/HNE1组:转染miR-106a-5p模拟物的对照序列;②miR-106a-5p mimics/HNE1组:转染miR-106a-5p模拟物;③miR-106a-5p mimics+PD-L1/HNE1组:共转染过表达PD-L1质粒和miR-106a-5p模拟物;采用Lipofectamine 2000试剂盒按照说明书进行转染,

收集各组细胞用于后续实验。

1.2.5 细胞划痕实验 将转染后的各组HNE1细胞转移到6孔板中培养24 h,当细胞汇合度达到70%~80%,用1 mL枪头划在单层壁细胞的中间部分。PBS洗涤3次,洗去未贴壁细胞,换入含1% FBS培养基,0 h、24 h、48 h镜下拍照记录。

1.2.6 Transwell 迁移实验 小室下室加入含10%胎牛血清的培养液,小室上室加入无血清培养基重悬的细胞悬液,培养箱继续培养24 h。培养完成后甲醇固定20 min,PBS清洗,Giemsa染料染色35 min,洗涤液洗净小室。小室晾干,拍照计数。

1.2.7 双荧光素酶实验 HEK293T细胞接种到6孔板中常规培养24 h,然后将mimics NC、miR-106a-5p mimics、ASO-NC和ASO-miR-106a-5p共转染至293T细胞内。转染后等待24 h,根据双荧光素酶测定试剂盒检测荧光强度。

1.2.8 蛋白质印迹实验 将处于对数生长期的细胞经乙二胺四乙酸消化和PBS清洗后收集到1.5 mL EP管中,加入预冷的蛋白裂解液冰上裂解15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心10 min,收集上清,加入 $5\times$ 加样缓冲液, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温加热5 min,蛋白样品 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。分别用7.5%和15% SDS聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,将目的蛋白转移到PVDF膜上,质量分数为5%脱脂奶粉封闭1 h,洗涤后PD-L1(1:1 000), β -actin抗体(1:7 000)一抗孵育过夜,洗涤后二抗(1:6 000)孵育。最后,将PVDF膜置于ECL发光液2 min后,凝胶成像系统显影。采用Image J软件进行灰度分析。

1.3 统计学方法 应用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,采用Image J进行WB条带半定量分析,使用Graphpad Prism 8软件进行绘图。计量资料采用单因素方差分析、SNK- q 检验、重复测量的方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生物信息学预测 PD-L1 是 miR-106a-5p 的靶基因 通过生物信息学网站(miRWalk、miRDB、TargetScan、miRDIP、TarBase)预测靶向PD-L1的潜在miRNAs(图1A),TargetScan数据库也显示miR-106a-5p的种子序列和PD-L1基因存在一个7碱基结合位点,提示PD-L1为miR-106a-5p的潜在靶基因(图1B)。

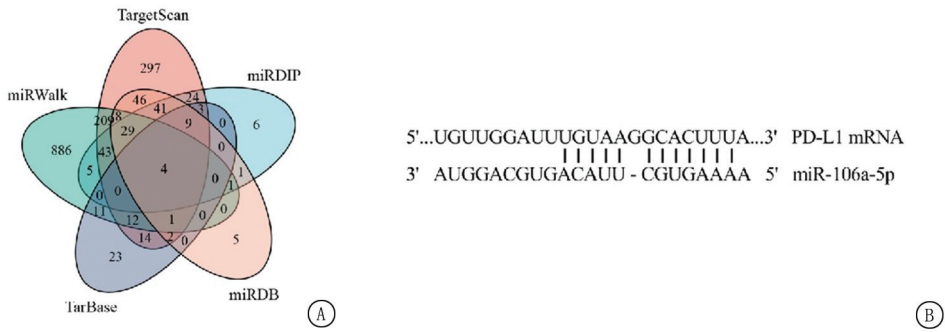


图 1 miR-106a-5p 与 PD-L1 的靶向关系

A. 生物信息筛选出靶向 PD-L1 的 miRNAs; B. TargetScan 数据库预测 miR-106a-5p 与 PD-L1 的直接结合位点。

Figure 1 Targeting relationship between miR-106a-5p and PD-L1

2.2 miR-106a-5p 在 HNE1 细胞中显著高表达 RT-qPCR 与 WB 实验显示正常鼻咽上皮细胞 NP69 和鼻咽癌细胞 HNE1 中 PD-L1 和 miR-106a-5p 的表达水平呈高表达。(PD-L1 mRNA: $t = 4.358, P = 0.012$; PD-L1: $t = 4.838, P = 0.008$; miR-106a-5p: $t = 9.013, P = 0.001$) (图 2)。

2.3 miR-106a-5p 直接与 PD-L1 mRNA 的 3'UTR 区结合 为进一步验证 miR-106a-5p 是否直接靶向 PD-L1, 构建了 PD-L1 3'UTR 野生型质粒 (PD-L1-WT), 以及 3'UTR 突变型质粒 (PD-L1-MUT), 将构建好的重组质粒分别与 mimics NC、miR-106a-5p mimics、ASO-NC 和 ASO-miR-106a-5p 共转染至 293T 细胞内, 行双荧光素酶报告基因实验。结果表

明, miR-106a-5p 能够直接与 PD-L1 mRNA 的 3'UTR 区结合, 见表 1。

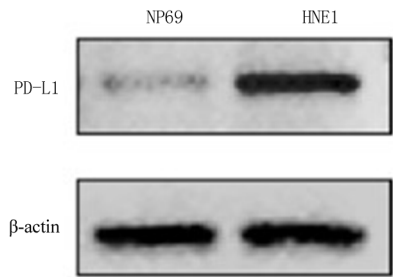


图 2 WB 检测 PD-L1 蛋白的表达水平

Figure 2 The expression level of PD-L1 protein detected by WB

表 1 荧光素酶报告结果

Table 1 Results of luciferase report

($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	荧光强度	组别	荧光强度
mimics NC+CD274-3'UTR-WT	21.25 ± 4.19	mimics NC+ CD274-3'UTR-mut	22.22 ± 2.13
has-miR-106a-5p mimics+CD274-3'UTR-WT	9.49 ± 4.23 *	has-miR-106a-5p mimics+CD274-3'UTR-mut	20.21 ± 4.24
ASO-NC+CD274-3'UTR-WT	20.41 ± 1.38	ASO-NC+CD274-3'UTR-mut	22.71 ± 2.13
has-miR-106a-5p ASO+CD274-3'UTR-WT	30.10 ± 1.04 *	has-miR-106a-5p ASO+CD274-3'UTR-mut	23.70 ± 4.24
F 值	52.600	F 值	3.044
P 值	0.002	P 值	0.389

* P 值 < 0.05 与 mimics NC+CD274-3'UTR-WT 组比较 (SNK- q 检验)

2.4 HNE1 细胞中 miR-106a-5p 正向调控 PD-L1 的表达 miR-106a-5p mimics 转染 HNE1 细胞 24 h 后, 通过 RT-qPCR 实验证实 miR-106a-5p mimics 有效。miR-106a-5p mimics 组 PD-L1 mRNA 和蛋白水平均显著高于 mimics NC 组。RT-qPCR 实验证实 miR-106a-5p inhibitor 组的 miR-106a-5p mRNA 水平显著低于 inhibitor NC 组, 表明 miR-106a-5p inhibitor 转染有效。miR-106a-5p inhibitor 组 PD-L1 mRNA 和蛋白水平均明显低于 inhibitor NC 组。以上结果表明, 在 HNE1 细胞中 miR-106a-5p 正向调控 PD-L1 的表

达。见图 3。

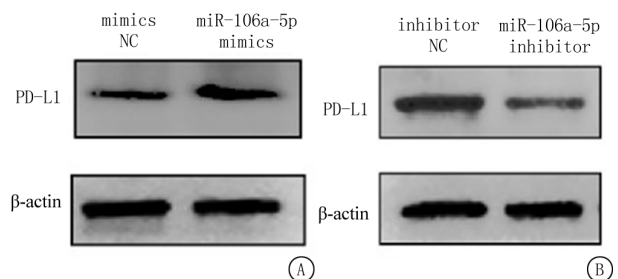


图 3 HNE1 细胞中 miR-106a-5p 对 PD-L1 表达的影响

A. HNE1 细胞分别转染 mimics NC 及 miR-106a-5p mimics 后, WB 法检测两组细胞中 PD-L1 蛋白的表达量; B. HNE1

细胞分别转染 inhibitor NC 及 miR-106a-5p inhibitor 后, WB 法检测两组细胞中 PD-L1 蛋白的表达量

Figure 3 Impact of miR-106a-5p on PD-L1 expression in HNE1 cells

2.5 PD-L1 的质粒构建 为研究 PD-L1 表达改变对 HNE1 细胞的影响, 构建了 PD-L1 过表达质粒 pcDNA3.1(+)/PD-L1。双酶切及测序结果证实 pcDNA3.1(+)/PD-L1 质粒构建成功(图 4A, 4B)。分别在 HNE1 细胞中转染 pcDNA3.1(+)/空载体

(PC 组) 及 pcDNA3.1(+)/PD-L1 质粒 (PD-L1 组)、si-NC(NC 组) 及 si-PD-L1 (si-PD-L1 组), 通过 RT-qPCR 法和 WB 法检测 4 组细胞中 PD-L1 的表达。结果显示, PD-L1 组中 PD-L1 mRNA 和蛋白相对表达量均显著高于 PC 组(图 4C), 而 si-PD-L1 组的 PD-L1 mRNA 和蛋白水平均显著低于 NC 组(图 4D)。以上结果表明 PD-L1 过表达质粒及 si-PD-L1 有效, 可用于后续实验。

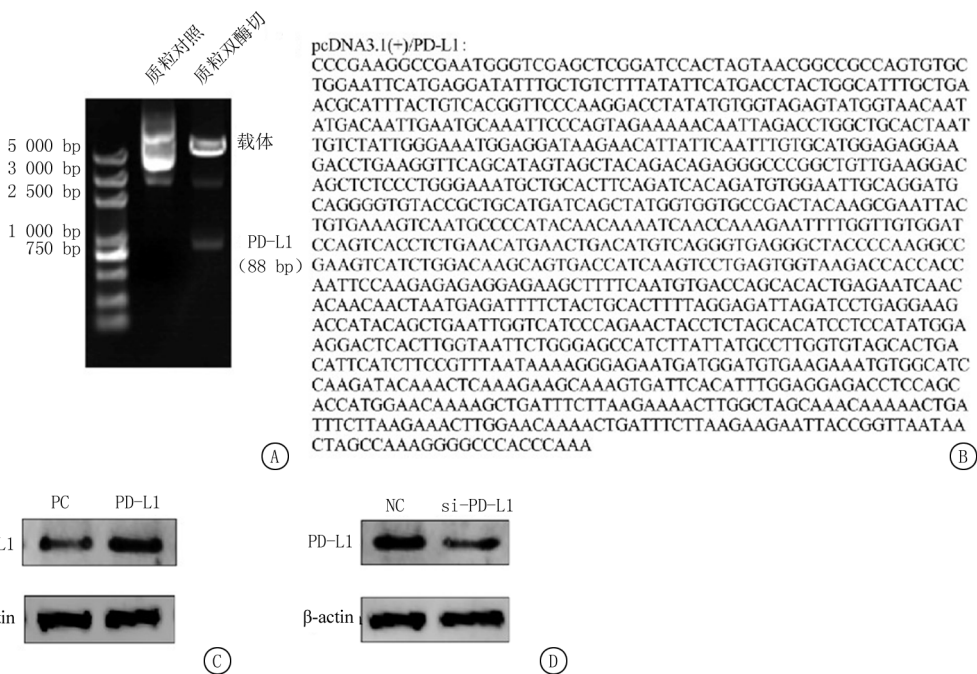


图 4 HNE1 细胞中 PD-L1 对 miR-106a-5p 表达的影响

A. 琼脂糖凝胶电泳鉴定重组质粒; B. 采用 T7 引物对质粒进行测序; C. RT-qPCR 检测转染 pcDNA3.1(+)/空载体 (PC 组) 及 pcDNA3.1(+)/PD-L1 质粒后 PD-L1 mRNA 的表达量; D. WB 检测 PD-L1 蛋白的表达水平

Figure 4 Effect of PD-L1 on miR-106a-5p expression in HNE1 cells

2.6 HNE1 细胞中 PD-L1 正向调控 miR-106a-5p 的表达 在 HNE1 细胞中分别转染 PC 质粒及 PD-L1 质粒、si-NC 及 si-PD-L1, 然后通过 RT-qPCR 实验检测 miR-106a-5p 的相对表达量。结果显示, PD-L1 组细胞中 miR-106a-5p 的相对表达量高于 PC 组, 而 si-PD-L1 组细胞中 miR-106a-5p 的相对表达量低于 NC 组。以上结果表明, 鼻咽癌细胞 HNE1 中 PD-L1 正向调控 miR-106a-5p 的表达。

2.7 miR-106a-5p/PD-L1 正反馈环正向调控 HNE1 细胞的增殖 分别用 mimics NC、miR-106a-5p mimics、miR-106a-5p mimics + si-PD-L1、inhibitor NC、miR-106a-5p inhibitor 及 miR-106a-5p inhibitor+PD-L1 处理 HNE1 细胞后, CCK-8 法检测细胞活力。统计分析显示: 在 mimics NC、miR-106a-5p mimics 及 miR-106a-5p mimics + si-PD-L1 处理后, 组间、时点间、组间·时点间交互

作用差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。inhibitor NC 组、miR-106a-5p inhibitor 组及 miR-106a-5p inhibitor+PD-L1 在组间、时点间、组间·时点间交互作用差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.8 miR-106a-5p/PD-L1 正反馈环正向调控 HNE1 细胞的迁移 分别用 mimics NC、miR-106a-5p mimics 及 miR-106a-5p mimics + si-PD-L1、inhibitor NC、miR-106a-5p inhibitor 及 miR-106a-5p inhibitor+PD-L1 处理 HNE1 细胞后, 划痕实验结果显示, 前 3 组细胞在 24 h、48 h 的划痕愈合率差异有统计学意义。miR-106a-5p mimics 组细胞的迁移能力显著高于 mimics NC 组; miR-106a-5p mimics + si-PD-L1 组细胞的迁移能力显著低于同时期 miR-106a-5p mimics 组, 但显著高于同时期 mimics NC 组(图 5A)。以上结果表明, 过表达 miR-106a-5p 可以促进 HNE1 细胞的迁移, 但其对

细胞迁移的促进效果可部分被 PD-L1 下调逆转。后 3 组细胞在 24 h、48 h 的划痕愈合率差异有统计学意义 miR-106a-5p inhibitor 组细胞的迁移能力显著低于 inhibitor NC 组；而 miR-106a-5p inhibitor+

PD-L1 组细胞的迁移能力显著高于 miR-106a-5p inhibitor 组，但低于 inhibitor NC 组(图 5B)。见表 3。

表 2 各组 HNE1 细胞的 OD 值

Table 2 OD values of HNE1 cells in each group

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值			组别	OD 值		
	24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h
inhibitor NC	0.56±0.01	0.68±0.00	0.67±0.00	mimics NC	0.31±0.01	0.61±0.00	0.67±0.00
miR-106a-5p inhibitor	0.31±0.01	0.41±0.01	0.48±0.01	miR-106a-5p mimics	0.52±0.00	0.98±0.01	1.13±0.00
miR-106a-5p inhibitor+PD-L1	0.49±0.00	0.54±0.01	0.60±0.00	miR-106a-5p mimics+siPD-L1	0.41±0.01	0.78±0.01	0.94±0.01
组间	F 值=890.100		P 值<0.001	组间	F 值=3 039.000		P 值<0.001
时点间	F 值=722.500		P 值<0.001	时点间	F 值=10 697.000		P 值<0.001
组间·时点间	F 值=39.100		P 值<0.001	组间·时点间	F 值=236.900		P 值<0.001

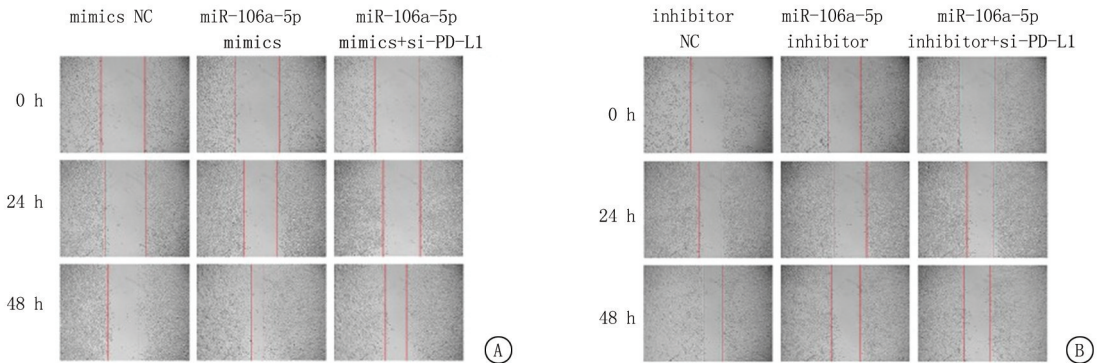


图 5 miR-106a-5p/PD-L1 正反馈环对 HNE1 细胞迁移的影响

A. 划痕实验检测 mimics NC、miR-106a-5p mimics 及 miR-106a-5p mimics+si-PD-L1 对 HNE1 细胞迁移能力的影响；B. 划痕实验检测 inhibitor NC、miR-106a-5p inhibitor 及 miR-106a-5p inhibitor+PD-L1 对 HNE1 细胞迁移能力的影响

Figure 5 Effects of miR-106a-5p/PD-L1 positive feedback loop on migration ability of HNE1 cells

表 3 各组细胞的划痕闭合率

Table 3 Scratch closure rates of cells in each group

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	划痕愈合率		组别	划痕愈合率	
	24 h	48 h		24 h	48 h
inhibitor NC	0.24±0.01	0.34±0.01	mimics NC	0.17±0.01	0.22±0.01
miR-106a-5p inhibitor	0.18±0.00*	0.27±0.01*	miR-106a-5p mimics	0.22±0.00*	0.30±0.01*
miR-106a-5p inhibitor+PD-L1	0.14±0.01*#	0.22±0.01*#	miR-106a-5p mimics+siPD-L1	0.27±0.00*#	0.37±0.01*#
F 值	69.250	179.100	F 值	76.410	106.700
P 值	<0.001	<0.001	P 值	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与 inhibitor NC/mimics NC 组比较 # P 值<0.05 与 miR-106a-5p inhibitor/miR-106a-5p mimics 组比较(SNK-q 检验)

2.9 miR-106a-5p/PD-L1 正反馈环正向调控 HNE1 细胞的侵袭 Transwell 实验显示出相似结果前三组细胞穿过基底膜(无基质胶)的细胞数有差异,miR-106a-5p inhibitor 组细胞的迁移和侵袭能力显著低于 inhibitor NC 组,而 miR-106a-5p inhibitor+PD-L1 组细胞的迁移和侵袭能力明显高于 miR-106a-5pinhibitor 组,低于 inhibitorNC 组(图 6A)。后 3 组细胞穿过基底膜(无基质胶)的细

胞数差异有统计学意义。miR-106a-5p mimics 组细胞的迁移和侵袭能力显著高于 mimics NC 组；miR-106a-5p mimics+si-PD-L1 组细胞的迁移能力显著低于同时期的 miR-106a-5p mimics 组,但显著高于 mimics NC 组(图 6B)。以上结果表明,过表达 miR-106a-5p 可以显著促进 HNE1 细胞的增殖、迁移和侵袭,但其对增殖、迁移和侵袭的促进效果可部分被 PD-L1 下调逆转。见表 4。

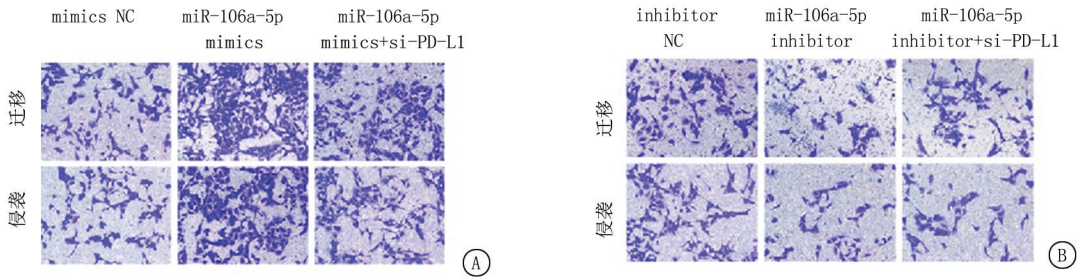


图6 miR-106a-5p/PD-L1正反馈环对HNE1细胞侵袭能力的影响

A. Transwell实验检测 mimics NC、miR-106a-5p mimics及 miR-106a-5p mimics+ si-PD-L1对 HNE1细胞迁移和侵袭能力的影响; B. Transwell实验检测 inhibitor NC、miR-106a-5p inhibitor及 miR-106a-5p inhibitor+ PD-L1对 HNE1细胞迁移和侵袭能力的影响

Figure 6 Effects of miR-106a-5p/PD-L1 positive feedback loop on invasion ability of HNE1 cells

表4 各组细胞的迁移侵袭率

Table 4 Migration and invasion rates of cells in each group

($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	迁移细胞率	侵袭细胞率	组别	迁移细胞率	侵袭细胞率
inhibitor NC	144.67±4.92	153.00±5.72	mimics NC	145.00±5.10	156.00±2.94
miR-106a-5p inhibitor	76.33±4.64*	62.67±5.31*	miR-106a-5p mimics	302.33±10.50*	189.67±2.49*
miR-106a-5p inhibitor+PD-L1	113.67±8.73*#	83.33±1.70*#	miR-106a-5p mimics+siPD-L1	198.33±7.72*#	175.33±6.60*#
F值	57.580	210.700	F值	192.600	29.300
P值	<0.001	<0.001	P值	<0.001	<0.001

* P值<0.05与inhibitor NC/mimics NC组比较 # P值<0.05与miR-106a-5p inhibitor/miR-106a-5p mimics组比较(SNK-q检验)

3 讨论

在本研究中,鼻咽癌细胞 HNE1 中 miR-106a-5p 和 PD-L1 均呈高表达。鼻咽癌细胞中 miR-106a-5p 正向调控 PD-L1 的表达,而 PD-L1 反过来促进 miR-106a-5p 的表达。此外,鼻咽癌细胞中高表达 miR-106a-5p 通过正向调控 PD-L1 的表达促进鼻咽癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

非编码 RNA 作为 PD-L1/PD-1 轴的上游调节因子,可以通过影响其他信号传导途径(如 STAT、自噬、PI3K、Akt 等)来调控鼻咽癌的进展^[7-8]。本研究重点分析了表观遗传调控因子 miRNA 对 PD-L1 的影响。通过筛选五个生物信息数据库,选取能够预测靶向 PD-L1 的 miRNA,并根据评分选定 miR-106a-5p 作为研究目标。实验结果显示,miR-106a-5p 在鼻咽癌细胞中高表达,通过上调或下调 miR-106a-5p 的水平,可以促进或抑制 PD-L1 的表达,从而影响鼻咽癌细胞的增殖、迁移和侵袭。这与 Zhu 等^[9]的研究一致,后者利用 GEO 数据集(GSE70970)发现 miR-106a-5p 在鼻咽癌组织和细胞中高表达,并在临床 IV 期患者中显著升高,且与复发相关,提示 miR-106a-5p 可作为预测晚期或复发鼻咽癌的生物标志物。该研究还指出,miR-106a-5p 作为促癌基因,通过靶向 BTG3 直接调控自噬,促

进鼻咽癌的恶性表型。这说明 miR-106a-5p 可能通过不同靶基因发挥生物学功能。然而,另一项研究显示,miR-106a-5p 在鼻咽癌中具有抑癌作用。研究表^[10]明,鼻咽癌细胞中 miR-106a-5p 水平降低,通过靶向调控长链非编码 RNASMAD5 的表达,促进了细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转化过程。这些相反的结果可能与 NPC 肿瘤异质性及使用的检测方法不同有关。前者从多个维度分析 miR-106a-5p 的表达,而后者仅检测细胞中的表达水平。此外,miRNA 作为表观遗传学分子,可能受到外界因素的影响,如培养条件、传代次数或应激,导致不同结果。因此,miR-106a-5p 在鼻咽癌中的具体作用及机制尚需进一步研究。

PD-L1 被认为是一种免疫抑制分子,通过与肿瘤杀伤性 T 细胞表面的 PD-1 受体结合,抑制 T 细胞的活性和功能,从而形成免疫抑制的肿瘤微环境,使肿瘤细胞能够逃避免疫系统的识别和攻击,最终促进肿瘤的进展。基于这一机制,PD-L1/PD-1 免疫检查点抑制疗法迅速成为肿瘤治疗的一个重要方向,特别是在晚期和复发/转移性鼻咽癌的治疗中,已成为一个活跃的研究领域^[11]。目前,针对 PD-L1/PD-1 通路的多种抑制剂正在局部晚期或复发/转移性鼻咽癌患者中进行临床评估。然而,已完成的临床试验结果显示,PD-L1/PD-1 抑制剂的抗肿

瘤反应率并不显著^[12]。因此,深入研究 PD-L1/PD-1 表达调控的分子机制,对于提高 PD-L1/PD-1 抑制剂在 NPC 免疫治疗中的疗效具有重要意义。已有研究显示,PD-L1/PD-1 轴对免疫细胞的作用主要通过抑制 PI3K/Akt 信号通路,导致 T 细胞增殖减少,刺激凋亡,促进 T 细胞耗竭;以及通过抑制 ERK 信号轴,抑制 T 细胞的增殖和分化^[13-14]。此外,癌细胞内源性 PD-L1 的表达可影响多种信号通路,这些信号通路与肿瘤的生长、存活、转移、代谢、分化、干性以及治疗耐药性等过程密切相关^[4]。研究表明,癌细胞内源性 PD-L1 驱动的非免疫依赖性机制可促进 B16 黑色素瘤的转移^[15]。

在本研究中,通过双荧光素酶报告基因实验,证实 miR-106a-5p 可以直接结合 PD-L1 基因,推测其通过与 PD-L1 mRNA 的 3'UTR 结合抑制 PD-L1 蛋白合成。然而,细胞实验却显示 miR-106a-5p 正向调控 PD-L1 的表达。分析 miR-106a-5p 正向调控 PD-L1 的表达的原因可能有:① miR-106a-5p 可能入核参与 PD-L1 的转录调控。通常情况下,miRNA 通过种子区序列与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合直接介导细胞质中的转录后基因沉默^[16]。然而,有研究^[17-18]表明,miRNA 也可以通过其他机制调控基因表达,如在核内 miRNA 可以诱导转录基因的激活或沉默。② 存在竞争性内源性 RNA(ccRNA),与 miRNA 结合后抑制其与靶基因 mRNA 结合,从而上调靶基因表达^[19]。③ miR-106a-5p 可能通过其他信号通路上调 PD-L1 表达^[20]。此外,在多发性骨髓瘤及肺癌中,外泌体 miR-106a-5p 与干扰素 γ 应答正相关,而干扰素 γ /JAK1/STAT1 轴可以诱导 PD-L1 的表达^[21-22]。推测在鼻咽癌中 miR-106a-p 也可能通过干扰素 γ /JAK1/STAT1 来促进 PD-L1 的表达,这些机制需要体内外实验进一步验证。虽然有研究表明一些 miRNA 通过与 5'UTR 结合正向调控基因表达,但我们发现 miR-106a-5p 与 PD-L1 的 5'UTR 没有足够的结合位点。因此,认为在鼻咽癌细胞系 HNE1 中,miR-106a-5p 对 PD-L1 转录的正向调控可能大于对其转录后的抑制作用,需要在其他细胞系中进一步验证。

此外,本研究还发现 PD-L1 能正向调控鼻咽癌细胞中 miR-106a-5p 的表达,miR-106a-5p 与 PD-L1 间存在正反馈环路,进一步增强鼻咽癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,其具体机制尚不明确。但之前有研究表明,PD-L1 除了在细胞表面发挥免疫抑制作用,还可以通过结合内源性 PD-1 激活黑色素瘤

细胞及膀胱癌中的雷帕霉素复合体 1(mammalian target of rapamycin complex 1,mTORC1)信号通路,并促进癌细胞的增殖,发挥促癌作用^[15,23-24]。这种促进作用可能源于 mTORC1 介导的细胞增殖,也可能与上皮-间质转化的激活有关。因此,推测 NPC 中 PD-L1 可能通过类似途径激活某些信号通路,促进 miR-106a-5p 的转录,需要进一步实验验证 PD-L1 的核定位及其是否与 miR-106a-5p 的启动子区结合。了解 PD-L1 在鼻咽癌中的作用机制为中晚期鼻咽癌的免疫治疗提供了更多的思路。

综上所述,本研究表明,miR-106a-5p/PD-L1/miR-106a-5p 正反馈环在鼻咽癌中具有促癌作用。miR-106a-5p 抑制剂可减少 PD-L1 在鼻咽癌细胞中的表达,抑制鼻咽癌的进展。这些发现为未来鼻咽癌患者使用 miR-106a-5p 和 PD-L1 的双靶点抑制剂提供了潜在的治疗靶点,并为晚期和复发/转移性患者的分子靶向治疗提供了新的思路。进一步研究 miR-106a-5p 调控 PD-L1 及 PD-L1 调控 miR-106a-5p 的具体分子机制,将是下一步的研究重点。

[参考文献]

- [1] Su ZY, Siak PY, Lwin YY, et al. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma: Current insights and future outlook[J]. *Cancer Metastasis Rev*,2024,43(3):919-939.
- [2] Zhou YJ, Li G, Wang J, et al. PD-L1: expression regulation [J]. *Blood Sci*.2023,5(2):77-91.
- [3] Lin X, Kang K, Chen P, et al. Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers[J]. *Mol Cancer*,2024,23(1):108.
- [4] Kornepati A, Vadlamudi RK, Curiel TJ. Programmed death ligand 1 signals in cancer cells[J]. *Nat Rev Cancer*,2022,22(3):174-189.
- [5] Li W, Duan X, Chen X, et al. Immunotherapeutic approaches in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma [J]. *Front Immunol*,2022,13:1079515.
- [6] Wang Q, Lin W, Tang X, et al. The Roles of microRNAs in regulating the expression of PD-1/PD-L1 immune checkpoint [J]. *Int J Mol Sci*,2017,18(12):2540
- [7] Ge J, Wang J, Xiong F, et al. Epstein-barr virus-encoded circular RNA circBART2.2 promotes immune escape of nasopharyngeal carcinoma by regulating PD-L1 [J]. *Cancer Res*,2021,81(19):5074-5088.
- [8] Wang S, You H, Yu S. Long non-coding RNA HOXA-AS2 promotes the expression levels of hypoxia-inducible factor-1 α and programmed death-ligand 1, and regulates nasopharyngeal carcinoma progression via miR-519[J]. *Oncol Lett*,2020,20(5):245.
- [9] Zhu Q, Zhang Q, Gu M, et al. MIR106A-5p upregulation suppresses autophagy and accelerates malignant phenotype in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Autophagy*,2021,17(7):1667-

- 1683.
- [10] Zheng YJ, Zhao JY, Liang TS, et al. Long noncoding RNA SMAD5-AS1 acts as a microRNA-106a-5p sponge to promote epithelial mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma[J]. *FASEB J*, 2019, 33(11):12915-12928.
- [11] Johnson D, Ma B. Targeting the PD-1/ PD-L1 interaction in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2021, 113:105127.
- [12] Wang S, Chen S, Zhong Q, et al. Immunotherapy for the treatment of advanced nasopharyngeal carcinoma; A promising new era[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(5):2071-2079.
- [13] Zhao R, Song Y, Wang Y, et al. PD-1/PD-L1 blockade rescue exhausted CD8⁺ T cells in gastrointestinal stromal tumours via the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(3):e12571.
- [14] Piao W, Li L, Saxena V, et al. PD-L1 signaling selectively regulates T cell lymphatic transendothelial migration[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):2176.
- [15] Clark CA, Gupta HB, Sareddy G, et al. Tumor-intrinsic PD-L1 signals regulate cell growth, pathogenesis, and autophagy in ovarian cancer and Melanoma[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(23):6964-6974.
- [16] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2):215-233.
- [17] Miao L, Yao H, Li C, et al. A dual inhibition; MicroRNA-552 suppresses both transcription and translation of cytochrome P450 2E1[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(4):650-662.
- [18] Xiao M, Li J, Li W, et al. MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(10):1326-1334.
- [19] Hill M, Tran N. miRNA interplay: Mechanisms and consequences in cancer[J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14(4):dmm047662.
- [20] Mizuhara K, Shimura Y, Tsukamoto T, et al. Tumour-derived exosomes promote the induction of monocytic myeloid-derived suppressor cells from peripheral blood mononuclear cells by delivering miR-106a-5p and miR-146a-5p in multiple myeloma[J]. *Br J Haematol*, 2023, 203(3):426-438.
- [21] Knopf P, Stowbur D, Hoffmann S, et al. Acidosis-mediated increase in IFN-gamma-induced PD-L1 expression on cancer cells as an immune escape mechanism in solid tumors[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1):207.
- [22] 徐真谛, 李润芝, 李元宽, 等. IFN- γ 诱导 A549 细胞表达 PD-L1 的机制研究[J]. *河北医药*, 2021, 43(3):335-339.
- [23] Kleffel S, Posch C, Barthel SR, et al. Melanoma cell-intrinsic PD-1 receptor functions promote tumor growth[J]. *Cell*, 2015, 162(6):1242-1256.
- [24] Zhang D, Reyes RM, Osta E, et al. Bladder cancer cell-intrinsic PD-L1 signals promote mTOR and autophagy activation that can be inhibited to improve cytotoxic chemotherapy[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(6):2137-2152.

(本文编辑:刘斯静)