doi:10.11659/jjssx.01E023012

·基础研究·

# lncRNA RMRP通过JAK/STAT信号通路在子宫内膜癌细胞增殖和凋亡中的作用研究

方秋满,邓青春,周小飞,黄从妹 (海南医学院第二附属医院妇科,海南 海口 570311)

[摘 要] **目的** 探讨长链非编码RNA RMRP(lncRNA RMRP)在子宫内膜癌中的生物学功能及主要分子机制。**方法** 收集在我院接受手术治疗的30例子宫内膜癌患者的癌组织和癌旁组织标本,RT-qPCR法检测lncRNA RMRP在子宫内膜癌组织和癌旁组织、HESC细胞和HEC-1-A细胞中的表达。体外培养子宫内膜癌细胞系HEC-1-A,将空载体、pcDNA-RMRP、NC-siRNA、RMRP-siRNA、NC mimic、miR-580-3p mimic、pcDNA-RMRP+NC mimic、pcDNA-RMRP+miR-580-3p mimic、RMRP-siRNA+空载体、RMRP-siRNA+pcDNA-JAK2、NC inhibitor、miR-580-3p inhibitor分别转染至HEC-1-A细胞中,作为空载体组、pcDNA-RMRP组、NC-siRNA组、RMRP-siRNA组、NC mimic组、miR-580-3p mimic组、pcDNA-RMRP+NC mimic组、pcDNA-RMRP+miR-580-3p mimic组、RMRP-siRNA+空载体组、RMRP-siRNA+pcDNA-JAK2组、NC inhibitor组、miR-580-3p inhibitor组。RT-qPCR检测lncRNA RMRP、miR-580-3p在细胞中的表达;CCK-8法检测细胞增殖率;流式细胞术检测细胞凋亡率;生物信息学软件和双荧光素酶报告基因实验分别预测和验证miR-580-3p与lncRNA RMRP、JAK2的靶向互作关系;Western blot检测JAK/STAT信号通路蛋白表达。**结果** 与癌旁组织相比,lncRNA RMRP在子宫内膜癌组织中均显著高表达($P<0.05$)。与HESC细胞比较,lncRNA RMRP在HEC-1-A细胞中的表达显著升高($P<0.05$)。pcDNA-RMRP可显著促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,而RMRP-siRNA可显著抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,差异均有统计学意义($P<0.05$)。miR-580-3p是lncRNA RMRP的下游靶miRNA,lncRNA RMRP可负向调控miR-580-3p的表达。JAK2是miR-580-3p的下游靶基因,miR-580-3p可负向调控JAK2蛋白的表达。pcDNA-RMRP可显著增加细胞中JAK2、p-JAK2和p-STAT3蛋白水平,而pcDNA-RMRP与miR-580-3p mimic共转染后,细胞中JAK2、p-JAK2、p-STAT3蛋白水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。RMRP-siRNA可显著降低细胞中JAK2、p-JAK2、p-STAT3蛋白水平,而RMRP-siRNA与pcDNA-JAK2共转染后,细胞中JAK2、p-JAK2、p-STAT3蛋白水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。此外,RMRP-siRNA与pcDNA-JAK2共转染后,细胞增殖率升高,细胞凋亡率降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 敲低lncRNA RMRP通过调控JAK2/STAT3信号通路抑制子宫内膜癌细胞增殖,促进细胞凋亡,可能成为子宫内膜癌潜在的治疗靶点。

[关键词] 长链非编码RNA RMRP;子宫内膜癌;增殖;凋亡;JAK/STAT信号通路

[中图分类号] R737.33 [文献标志码] A [收稿日期] 2023-01-03

[基金项目] 海南省科协青年科技英才创新计划项目(QCXM202018)

[26] Choi RH, Tatum SM, Symons JD, et al. Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(10):701-711. doi:10.1038/s41569-021-00536-1.

[27] Chaurasia B, Summers SA. Ceramides-lipotoxic inducers of metabolic disorders[J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(10):538-550. doi:10.1016/j.tem.2015.07.006.

[28] Xia JY, Holland WL, Kusminski C, et al. Targeted induction of ceramide degradation leads to improved systemic metabolism and reduced hepatic steatosis[J]. Cell Meta, 2015, 22(2):266-278. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.007.

[29] Paul B, Lewinska M, Andersen JB. Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer[J]. JHEP Rep, 2022, 4(6):100479. doi:10.1016/j.jhepr.2022.100479.

[30] Naughton SS, Mathai ML, Hryciw D, et al. Linoleic acid and the pathogenesis of obesity[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2016, 125:90-99. doi:10.1016/j.prostaglandins.2016.06.003.

[31] Maciejewska D, Drozd A, Skonieczna-Żydecka K, et al. Eicosanoids in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) progression. Do serum eicosanoids profile correspond with liver eicosanoids content during NAFLD development and progression[J]. Molecules, 2020, 25(9):2026. doi:10.3390/molecules25092026.

[32] Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, et al. Arachidonic acid metabolites in cardiovascular and metabolic diseases[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11):3285. doi:10.3390/ijms19113285.

[33] Prentki M, Madiraju SR. Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease[J]. Endocr Rev, 2008, 29(6):647-676. doi:10.1210/er.2008-0007.

(编辑:刘 艺)

# Role of lncRNA RMRP in the proliferation and apoptosis of endometrial carcinoma cells through JAK/STAT signaling pathway

FANG Qiu-man, DENG Qing-chun, ZHOU Xiao-fei, HUANG Cong-mei (Department of Gynecology, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou Hainan 570311, China)

**Abstract: Objective** To investigate the biological function and main molecular mechanism of long noncoding RNA RMRP (lncRNA RMRP) in endometrial carcinoma. **Methods** The specimens of carcinoma tissues and adjacent tissues of 30 patients with endometrial carcinoma who received surgical treatment in our hospital were collected. RT-qPCR was used to detect the expression of lncRNA RMRP in endometrial carcinoma tissues and adjacent tissues, and HESC cells and HEC-1-A cells. The endometrial carcinoma cell line HEC-1-A was cultured in vitro, and the Vector, pcDNA-RMRP, NC-siRNA, RMRP-siRNA, NC mimic, miR-580-3p mimic, pcDNA-RMRP+NC mimic, pcDNA-RMRP+miR-580-3p mimic, RMRP-siRNA+Vector, RMRP-siRNA+pcDNA-JAK2, NC inhibitor, and miR-580-3p inhibitor were transfected into HEC-1-A cells as the Vector group, the pcDNA-RMRP group, the NC-siRNA group, the RMRP-siRNA group, the NC mimic group, the miR-580-3p mimic group, the pcDNA-RMRP+NC mimic group, the pcDNA-RMRP+miR-580-3p mimic group, the RMRP siRNA+Vector group, the RMRP-siRNA+pcDNA-JAK2 group, the NC inhibitor group, and the miR-580-3p inhibitor group respectively. RT-qPCR was used to detect the expression of lncRNA RMRP and miR-580-3p in cells. CCK-8 was used to detect cell proliferation rate. The apoptosis rate was detected by flow cytometry analysis. Bioinformatics software and dual luciferase reporter gene experiment were used to predict and verify the targeted relationships between miR-580-3p and lncRNA RMRP, as well as miR-580-3p and JAK2. Western blot was used to detect the protein expression of JAK/STAT signaling pathway. **Results** Compared with adjacent tissues, lncRNA RMRP was highly expressed in endometrial carcinoma tissues ($P<0.05$). Compared with HESC cells, the expression of lncRNA RMRP in HEC-1-A cells was significantly increased ($P<0.05$). pcDNA-RMRP significantly promoted cell proliferation and inhibited cell apoptosis, while RMRP-siRNA significantly inhibited cell proliferation and promoted cell apoptosis, with statistically significant diferences ($P<0.05$). miR-580-3p was the downstream target miRNA of lncRNA RMRP, and lncRNA RMRP could negatively regulate the expression of miR-580-3p. JAK2 was the downstream target gene of miR-580-3p, and miR-580-3p could negatively regulate the expression of JAK2 protein. pcDNA-RMRP significantly increased the protein levels of JAK2, p-JAK2 and p-STAT3 in the cells, while co-transfection of pcDNA-RMRP and miR-580-3p mimic significantly decreased the protein levels of JAK2, p-JAK2 and p-STAT3, with statistically significant diferences ($P<0.05$). RMRP-siRNA could significantly reduce the protein levels of JAK2, p-JAK2 and p-STAT3 in cells. After co-transfection of RMRP-siRNA and pcDNA-JAK2, the protein levels of JAK2, p-JAK2 and p-STAT3 were significantly increased, with statistically significant diferences ($P<0.05$). In addition, co-transfection of RMRP-siRNA and pcDNA-JAK2 increased cell proliferation and decreased cell apoptosis, with statistically significant diferences ($P<0.05$). **Conclusion** Knockdown of lncRNA RMRP could inhibit endometrial carcinoma cell proliferation and promote cell apoptosis by regulating JAK2/STAT3 signaling pathway, which might be a potential therapeutic target for endometrial carcinoma.

**Keywords:** long noncoding RNA RMRP; endometrial carcinoma; proliferation; apoptosis; JAK/STAT signaling pathway

子宫内膜癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤，近年来发病率呈上升趋势。目前，由于治疗技术的不断进步，早期子宫内膜癌患者的预后良好。然而，许多子宫内膜癌患者在确诊时已是晚期，而现有的治疗措施对此类患者无效，导致5年生存率较低[1]。因此，探索子宫内膜癌的分子发病机制并寻找更有效的治疗靶点，对改善子宫内膜癌的治疗效果具有重要意义。随着分子生物学和基因诊断技术的快速发展，越来越多的证据表明，长链非编码RNA（long noncoding RNA，lncRNA）与癌症的发生发展密切相关，可作为肿瘤的特异性生物标志物[2]。研究证实，lncRNA在子宫内膜癌中存在差异表达，并参与子宫内膜癌发生发展的多种恶性过程[3-4]。近期有研究报道，线粒体处理RNA的内切酶复合物RNA组分（RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease，RMRP）参与调控乳腺癌、食管癌等多种恶性肿瘤的进展[5-6]。然而，lncRNA RMRP在子宫内膜癌中的作用及机制尚不明确。有研究报道，在子宫内膜癌中，Janus激酶/信号转导与转录激活因子（Janus kinase/signal transducer and activator of transcription，JAK/STAT）信号通路参与癌细胞的迁移、生长、凋亡及分化等进程[7]。因此，本研究分析lncRNA RMRP在子宫内膜癌组织和细胞中的表达水平，探讨其是否通过调控JAK/STAT信号通路参与子宫内膜癌的进展，并分析其相关分子机制，以期为子宫内膜癌诊断和治疗寻找新的生物标志物和潜在治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

正常子宫内膜细胞系HESC细胞和子宫内膜癌细胞系HEC-1-A细胞（中国科学院细胞研究所）；TRIzol®试剂（美国Invitrogen公司）；PrimeScript®RT试剂盒（日

本Takara公司);CCK-8试剂盒(美国Sigma-Aldrich公司);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);双荧光素酶报告基因试剂盒(北京普洛麦格生物技术有限公司);兔抗人JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3单克隆抗体以及山羊抗兔IgG(H+L)二抗(美国Abcam公司);化学发光凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);流式细胞仪(美国BD公司);酶标仪(美国Molecular Devices公司);引物设计和合成委托上海生工生物完成。

1.2 *方法*

1.2.1 临床组织样本收集 纳入2021年7月至2022年3月在我院经组织活检和组织病理学分析确诊为子宫内膜癌的30例患者,在其接受手术治疗时收集子宫内膜癌组织标本,并在距离癌组织5 cm处收集癌旁组织标本。纳入标准:①符合《子宫内膜癌诊断与治疗指南(第四版)》中子宫内膜癌的相关诊断标准,经子宫内膜组织活检和组织病理学分析确诊;②初次确诊;③生存期超过3个月,且临床资料完整。排除标准:①接受过抗癌治疗,包括免疫抑制剂和/或性激素等相关治疗;②合并其他恶性肿瘤;③合并子宫肌瘤、子宫腺肌症等子宫良性疾病;④合并重要脏器疾病;⑤合并糖尿病和/或其他感染性疾病。本研究方案已由我院伦理委员会批准(202106-03)。所有入选患者均签署手术知情同意书。

1.2.2 细胞培养和转染 将正常子宫内膜细胞系HESC和子宫内膜癌细胞系HEC-1-A分别培养于RPMI-1640培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素),置于恒温培养箱(37 ℃、5%$CO_2$)中培养。将对数生长期的HEC-1-A细胞($4\times10^5$个/孔)接种至24孔板中,待细胞融合度达到80%时,根据Lipofectamine 2000试剂说明书分别将空载体、pcDNA-RMRP、NC-siRNA、RMRP-siRNA、NC mimic、miR-580-3p mimic、pcDNA-RMRP+NC mimic、pcDNA-RMRP+miR-580-3p mimic、RMRP-siRNA+空载体、RMRP-siRNA+pcDNA-JAK2、NC inhibitor和miR-580-3p inhibitor转染至HEC-1-A细胞中,分为空载体组、pcDNA-RMRP组、NC-siRNA组、RMRP-siRNA组、NC mimic组、miR-580-3p mimic组、pcDNA-RMRP+NC mimic组、pcDNA-RMRP+miR-580-3p mimic组、RMRP-siRNA+空载体组、RMRP-siRNA+pcDNA-JAK2组、NC inhibitor组、miR-580-3p inhibitor组,转染48 h后收集细胞。

1.2.3 CCK-8法检测细胞增殖率 将各组转染后的细胞以$4\times10^3$个/孔的密度接种到96孔板中,置于恒温培养箱(37 ℃、5%$CO_2$)中培养。孵育0 h、24 h、48 h和72 h后,分别加入10 μL CCK-8溶液,然后放回恒温培养箱中继续孵育2 h。使用酶标仪测定450 nm波长下的吸光度值。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 使用胰蛋白酶消化各组转染后的细胞,加入完全培养液重悬细胞,离心,弃上清。每个样本中加入Binding Buffer重悬,然后加入5 μL Annexin V-FITC,在4 ℃下避光染色15 min。然后加入5 μL PI,在4 ℃下孵育5 min。流式细胞仪上机检测,用FlowJo软件分析细胞凋亡率。

1.2.5 RT-qPCR检测lncRNA RMRP、miR-580-3p表达 使用TRIzol®试剂分离提取组织和细胞的RNA,然后在微量分光光度计NanoDrop 2000上检测RNA浓度以及OD260/OD280,如果OD260/OD280为1.8~2.0,可继续进行下一步实验。使用PrimeScript®RT试剂盒将RNA反转录为cDNA。随后使用SYBR Green试剂盒在PCR仪上进行PCR扩增反应,反应条件为:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共40个循环。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因表达水平。lncRNA RMRP上游引物(5′-3′):GCTGAAGGCCTGTATCCTAG,下游引物(5′-3′):GCTCAGCGGGATACGCTTC;GAPDH上游引物(5′-3′):ATTTTGGAGGGATCTCGCTC,下游引物(5′-3′):CAACGGATTTGGTCGTATTG;miR-580-3p上游引物(5′-3′):AAAATTTCCAATTGGAACC,下游引物(5′-3′):AAGCAGGGTCCGAGGT;U6上游引物(5′-3′):GCTTCGGCAGCACATATAC,下游引物(5′-3′):ATTTGCGTGTCATCCTTGC。

1.2.6 Western blot检测JAK/STAT信号通路蛋白表达 收集各组转染后的细胞,加入RIPA裂解缓冲液提取总蛋白,在冰上操作。随后使用BCA试剂盒检测蛋白样品浓度。制备SDS-PAGE电泳分离胶及浓缩胶,将蛋白样品加入到凝胶孔中,进行恒压电泳,然后转移到PVDF膜上。转膜结束后,将膜置于5%的脱脂牛奶封闭液中封闭1 h。然后加入一抗,在4 ℃冰箱过夜。PBST洗膜3次,每次5 min,加入二抗,室温孵育90 min。最后用ECL化学发光液显影,用Image J软件检测免疫印迹条带的灰度值,计算目标蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值。抗体工作液稀释度如下:兔抗人一抗JAK2(1∶2 000稀释)、p-JAK2(1∶1 500稀释)、STAT3(1∶2 000稀释)、p-STAT3(1∶1 500稀释),山羊抗兔IgG(H+L)二抗(1∶5 000稀释)。

1.2.7 生物信息学分析 使用TargetScanHuman v7.2网页版(https://www.targetscan.org/vert_72/)对lncRNA RMRP与miR-580-3p的直接序列互作位点、

miR-580-3p与JAK2 3′-UTR的直接序列互作位点进行分析和预测。

1.2.8 双荧光素酶报告基因实验 使用双荧光素酶报告基因实验分别验证miR-580-3p与lncRNA RMRP、JAK2 3′-UTR之间的靶向序列直接互作关系。将RMRP、JAK2野生型(WT)或突变型(MUT)3′-UTR序列分别插入pGL3载体中,构建lncRNA RMRP-WT或lncRNA RMRP-MUT、JAK2-WT或JAK2-MUT报告基因载体。按照说明书的方法使用Lipofectamine 2000试剂将lncRNA RMRP-WT或lncRNA RMRP-MUT、JAK2-WT或JAK2-MUT与NC mimic或miR-580-3p mimic共转染至细胞中。48 h后收集细胞,使用双荧光素酶报告系统检测相对荧光素酶活性。

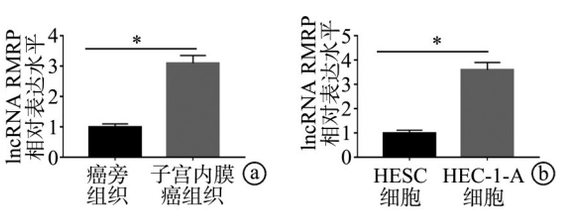
1.3 统计学方法

使用SPSS 20.0软件进行统计学分析。所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,*Student t*检验用于分析2组间的差异,单因素方差分析用于多组间比较,进一步两两比较采用*LSD-t*检验。以$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 lncRNA RMRP在子宫内膜癌组织和细胞中的表达

RT-qPCR实验显示,与癌旁组织比较,lncRNA RMRP在子宫内膜癌组织中的表达显著升高($P<0.05$),见图1a。与HESC细胞比较,lncRNA RMRP在HEC-1-A细胞中的表达显著升高($P<0.05$),见图1b。以上研究结果提示,lncRNA RMRP可能参与了子宫内膜癌的发生发展。




a:RT-qPCR法测定癌旁组织和子宫内膜癌组织中lncRNA RMRP的相对表达水平;b:RT-qPCR法测定HESC细胞和HEC-1-A细胞中lncRNA RMRP的相对表达水平 *:$P<0.05$

**图1 lncRNA RMRP在子宫内膜癌组织和细胞中的表达**

2.2 过表达或敲低lncRNA RMRP对子宫内膜癌细胞增殖和凋亡的影响

与NC-siRNA组比较,RMRP-siRNA组细胞中lncRNA RMRP的表达显著降低($P<0.05$);与空载体组比较,pcDNA-RMRP组细胞中lncRNA RMRP的表达显著升高($P<0.05$),见图2a、b。CCK-8和流式细胞术实验结果显示,与NC-siRNA组比较,RMRP-siRNA组细胞增殖率降低($P<0.05$),细胞凋亡率升高($P<0.05$);与空载体组比较,pcDNA-RMRP组细胞增殖率升高($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$),见图2c~f。以上研究结果表明,过表达lncRNA RMRP可显著促进子宫内膜癌细胞增殖,抑制细胞凋亡;敲低lncRNA RMRP可显著抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。

2.3 lncRNA RMRP靶向并调控miR-580-3p的表达

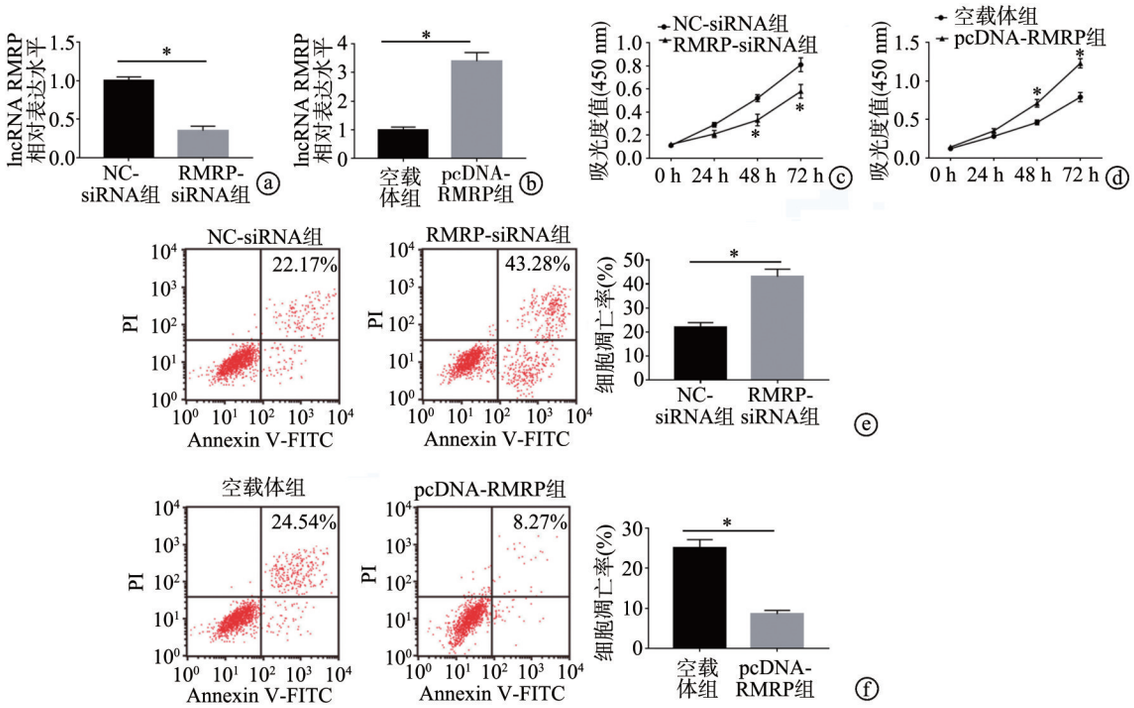
通过生物信息学软件发现,lncRNA RMRP可能含有miR-580-3p的潜在结合位点(图3a)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与NC mimic组比较,miR-580-3p mimic组lncRNA RMRP-WT报告基因载体的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$),而lncRNA RMRP-MUT报告基因载体的荧光素酶活性变化无统计学意义($P>0.05$),见图3b。RT-qPCR实验结果显示,与NC-siRNA组相比,RMRP-siRNA组miR-580-3p水平显著升高($P<0.05$),见图3c;而与空载体组比较,pcDNA-RMRP组miR-580-3p水平显著降低($P<0.05$),见图3d。以上研究结果表明,lncRNA RMRP可靶向并负调控miR-580-3p的表达。

2.4 miR-580-3p靶向并调控JAK2的表达

通过生物信息学软件预测发现,miR-580-3p与下游靶基因JAK2的3′-UTR可能含有潜在的结合位点(图4a)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与NC mimic组比较,miR-580-3p mimic组JAK2-WT报告基因载体的荧光素酶活性显著降低($P<0.05$),而JAK2-MUT报告基因载体的荧光素酶活性变化无统计学差异($P>0.05$),见图4b。Western blot实验结果显示,与NC mimic组比较,miR-580-3p mimic组细胞中JAK2蛋白水平显著降低($P<0.05$),见图4c;而与NC inhibitor组比较,miR-580-3p inhibitor组细胞中JAK2蛋白水平显著升高($P<0.05$),见图4d。以上研究结果表明,miR-580-3p可靶向并负调控JAK2的表达。

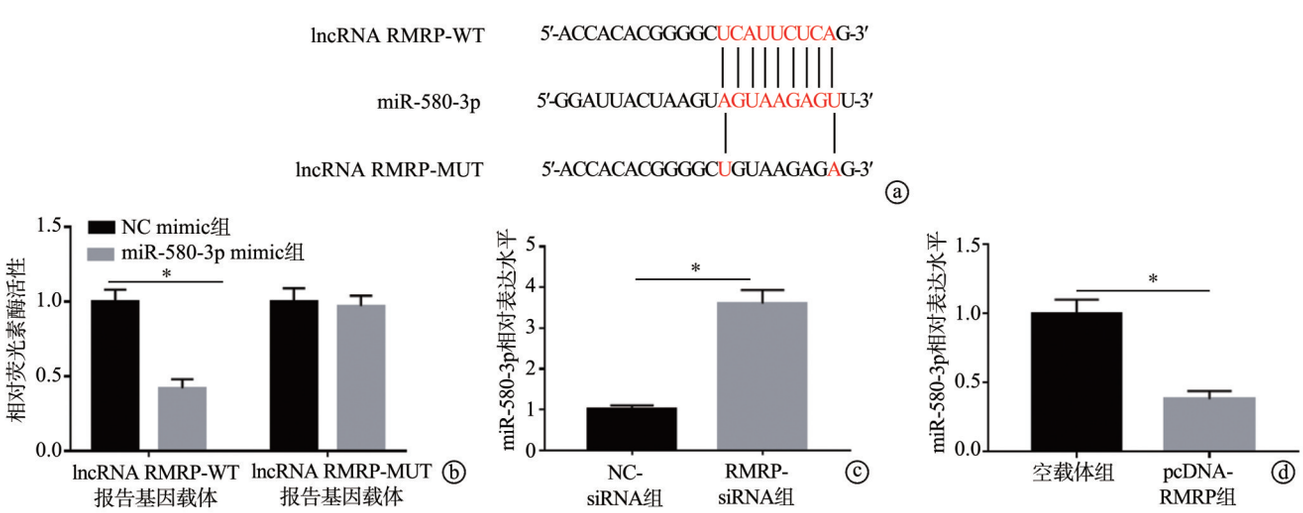
2.5 lncRNA RMRP通过靶向miR-580-3p调控JAK/STAT信号通路

Western blot结果显示,与空载体组比较,pcDNA-RMRP组细胞中JAK2、p-JAK2和p-STAT3蛋白水平显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),STAT3蛋白表达水平变化则无统计学意义($P>0.05$);与pcDNA-RMRP+NC mimic组比较,pcDNA-RMRP+miR-580-3p mimic组细胞中JAK2、p-JAK2、p-STAT3蛋白水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),STAT3蛋白表




a、b:RT-qPCR法测定各组细胞中lncRNA RMRP的相对表达水平;c、d:CCK-8法测定各组细胞增殖率;e~f:流式细胞术测定各组细胞凋亡率 *:$P<0.05$

**图2 过表达或敲低lncRNA RMRP对子宫内膜癌细胞增殖和凋亡的影响**



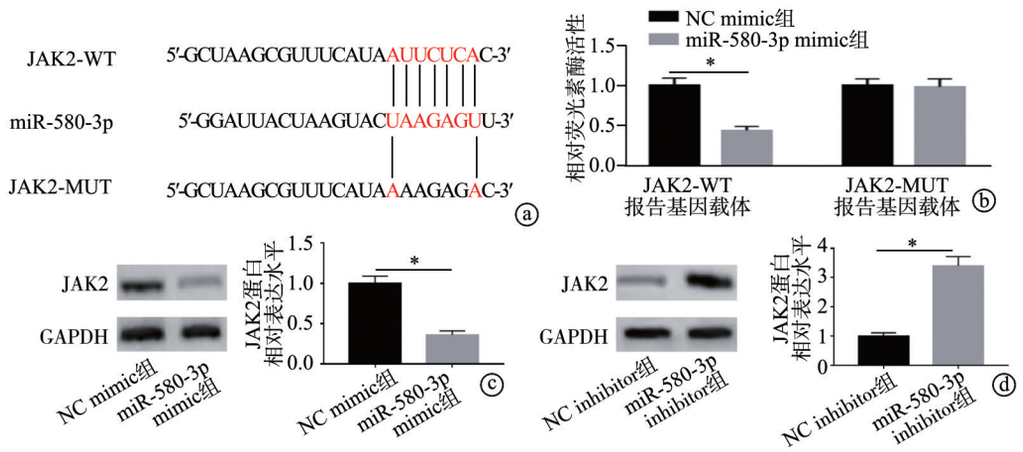

a:lncRNA RMRP和miR-580-3p的直接序列互作分析结果;b:双荧光素酶报告基因实验测定结果;c、d:RT-qPCR法测定各组细胞中miR-580-3p相对表达水平 *:$P<0.05$

**图3 lncRNA RMRP靶向并调控miR-580-3p的表达**

达水平变化则无统计学意义($P>0.05$),见图5。以上研究结果表明,lncRNA RMRP可能作为miR-580-3p的竞争性内源RNA(competitive endogenous RNA,ceRNA)激活JAK/STAT信号通路。

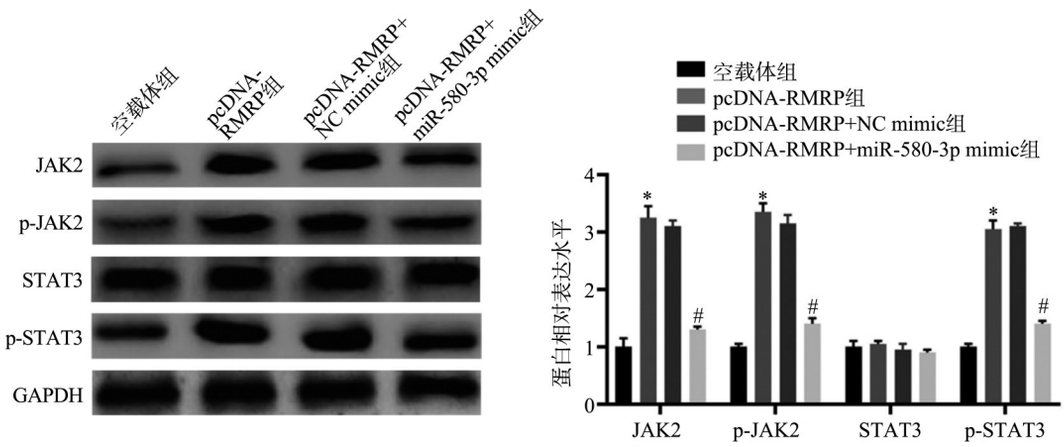
### 2.6 lncRNA RMRP通过JAK/STAT信号通路对子宫内膜癌细胞增殖和凋亡的影响

Western blot结果显示,与NC-siRNA组比较,RMRP-siRNA组细胞中JAK2、p-JAK2、p-STAT3蛋白水平显著降低($P<0.05$),STAT3蛋白表达水平变化无统计学意义($P>0.05$);与RMRP-siRNA+空载体组比较,RMRP-siRNA+pcDNA-JAK2组细胞中JAK2、p-JAK2、p-STAT3蛋白水平显著升高($P<0.05$),STAT3蛋白表达水平变化无统计学意义($P>0.05$);此外,与RMRP-siRNA+空载体组比较,RMRP-siRNA+pcDNA-JAK2组细胞增殖率升高($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$),见图6。




a:miR-580-3p和JAK2 3′-UTR的直接序列互作分析结果;b:双荧光素酶报告基因实验测定结果;c、d:Western blot法测定组JAK2蛋白相对表达水平　*:$P<0.05$

**图4　miR-580-3p靶向并调控JAK2的表达**



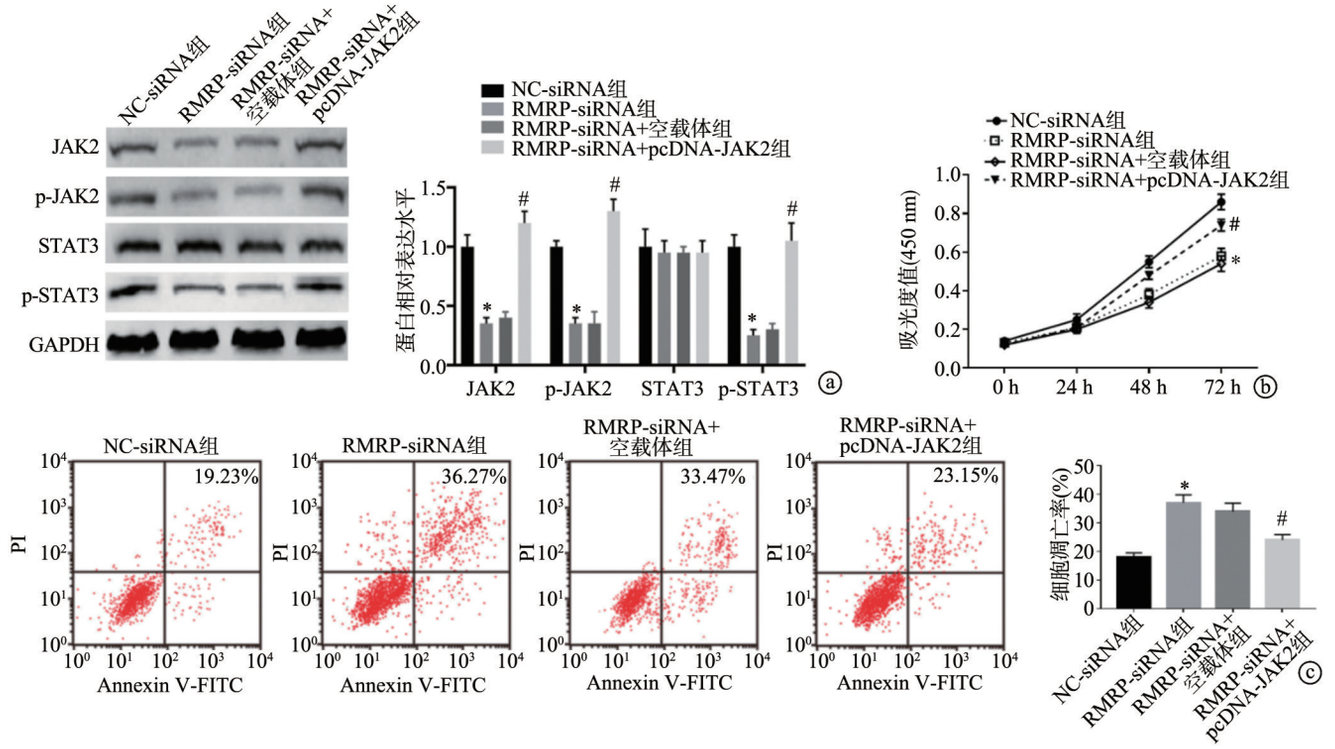

*:与空载体组比较,$P<0.05$;#:与pcDNA-RMRP+NC mimic组比较,$P<0.05$

**图5　lncRNA RMRP通过靶向miR-580-3p调控JAK/STAT信号通路**

## 3　讨论

近年来子宫内膜癌的发病率持续上升。研究表明,lncRNA可作为潜在的肿瘤标志物和治疗的新靶点[8]。lncRNA是一类转录本长度超过200 nt的RNA分子,不编码蛋白质,而是以RNA的形式在不同水平(表观遗传调控、转录调控、转录后调控等)调控基因表达。随着临床和细胞实验的深入研究,lncRNA已被证明是一种具有多种生物学功能的非编码RNA,其在细胞增殖、分化、凋亡以及肿瘤的发生发展中起重要作用[9]。之前的研究已经揭示了lncRNA在子宫内膜癌中的关键作用。例如,lncRNA TTN-AS1通过靶向miR-376a-3p/PUM2轴促进子宫内膜癌细胞增殖和转移[10]。lncRNA RHPN1-AS1通过激活ERK/MAPK通路促进子宫内膜癌进展[11]。RMRP位于人染色体9p13.3上,由10个不同的亚基和1个RNA分子组成,共有277个nts,其广泛参与调控肿瘤的发生发展。lncRNA RMRP通过靶向miR-206促进膀胱癌细胞侵袭、迁移和增殖[12]。lncRNA RMRP通过miR-613/NFAT5轴促进非小细胞肺癌细胞的侵袭、迁移和增殖[13]。然而,lncRNA RMRP是否在子宫内膜癌中发挥作用尚不清楚。本研究发现,lncRNA RMRP在子宫内膜癌组织和细胞中的表达均显著升高;进一步功能实验显示,过表达lncRNA RMRP可显著促进子宫内膜癌细胞增殖,抑制细胞凋亡;反之,敲低lncRNA RMRP可显著抑制子宫内膜癌细胞增殖,促进细胞凋亡。以上研究结果提示,lncRNA RMRP与子宫内膜癌的进展密切相关,可能成为诊断和治疗子宫内膜癌的潜在靶点。

ceRNA假说揭示了一种全新的基因表达调控模式,lncRNA可作为ceRNA与miRNA相互作用参与下游靶基因的调控,通过ceRNA假说可以更好地理解基因调控网络在肿瘤发生发展中的作用。例如,lncRNA




a:Western blot测定各组细胞中JAK2、p-JAK2、p-STAT3和STAT3蛋白相对表达水平;b:CCK-8法测定各组细胞增殖率;c:流式细胞术测定各组细胞凋亡率 *:与NC-siRNA组比较,$P<0.05$;#:与RMRP-siRNA+空载体组比较,$P<0.05$

**图6 lncRNA RMRP通过JAK/STAT信号通路对子宫内膜癌细胞增殖和凋亡的影响**

SNHG16可作为ceRNA调控miR-520/VEGF轴促进肺癌细胞的迁移[14]。基于这一理论,越来越多的研究表明,lncRNA RMRP可以通过海绵化miRNA来影响肿瘤的发生和进展,如miR-206、miR-1-3p、miR-613等已被鉴定为各种类型癌症中lncRNA RMRP的作用靶点[15-17]。研究报道,lncRNA RMRP通过调控miR-580-3p/MICU1信号通路提高卵巢癌对紫杉醇的敏感性[18]。然而,lncRNA RMRP是否海绵化miR-580-3p在子宫内膜癌中发挥作用尚不清楚。本研究通过双荧光素酶报告基因实验证实了lncRNA RMRP与miR-580-3p靶向结合;进一步实验表明了miR-580-3p的表达与lncRNA RMRP的表达呈负相关。以上研究结果表明lncRNA RMRP可靶向并负调控miR-580-3p的表达。

JAK/STAT信号通路是经典的致癌信号通路,可诱导癌细胞迁移、生长和分化[19]。各种配体(如细胞因子)与细胞表面受体的结合引起受体分子二聚化,从而使得与受体偶联的JAK相互接近,然后通过酪氨酸残基上的相互磷酸化激活JAK,活化的JAKs磷酸化STATs的酪氨酸残基并导致STATs活化,参与肿瘤进展的调控[20]。研究表明,JAK/STAT信号通路,尤其是JAK2和STAT3,可通过提高c-myc水平刺激细胞增殖[21]。JAK2/STAT3信号通路作为经典的致癌信号通路,在调控子宫内膜癌进展中发挥着重要作用[22]。本研究双荧光素酶报告基因实验结果显示,JAK2为miR-580-3p的潜在靶点;进一步研究发现,miR-580-3p可负向调控JAK2的蛋白表达。本研究还揭示了lncRNA RMRP对JAK/STAT信号通路的调控作用,lncRNA RMRP过表达后JAK2、p-JAK2和p-STAT3蛋白水平显著升高,而miR-580-3p mimic处理细胞后可逆转lncRNA RMRP对JAK/STAT信号通路的调控作用;功能实验进一步表明,lncRNA RMRP敲低显著抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,而JAK2过表达显著逆转了这一结果。虽然大量lncRNAs被认为是子宫内膜癌的诊断和预后标志物以及治疗靶点,但由于子宫内膜癌发病机制复杂,更多参与子宫内膜癌的分子机制还有待进一步探索。

综上所述,本研究表明敲低lncRNA RMRP通过靶向miR-580-3p和调控JAK/STAT信号通路抑制子宫内膜癌细胞的增殖,促进细胞凋亡。这一研究结果阐明了lncRNA RMRP/miR-580-3p/JAK/STAT轴与子宫内膜癌进展的关系,提示了lncRNA RMRP在子宫内膜癌治疗中的潜在价值,为子宫内膜癌的治疗提供了新的

治疗靶点和新思路。

## [参考文献]


[1] Crosbie EJ, Kitson SJ, McAlpine JN, et al. Endometrial cancer[J]. Lancet, 2022, 399(10333): 1412-1428. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00323-3.

[2] Reggiardo RE, Maroli SV, Kim DH. LncRNA biomarkers of inflammation and cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2022, 1363: 121-145. doi: 10.1007/978-3-030-92034-0_7.

[3] Shetty A, Venkatesh T, Kabbekodu SP, et al. LncRNA-miRNA-mRNA regulatory axes in endometrial cancer: a comprehensive overview[J]. Arch Gynecol Obstet, 2022, 306(5): 1431-1447. doi: 10.1007/s00404-022-06423-5.

[4] Wang GF, Wen LN. LncRNA SNHG14 promotes proliferation of endometrial cancer through regulating microRNA-655-3p[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(20): 10410-10418. doi: 10.26355/eurrev_202010_23391.

[5] Huang Y, Xie B, Cao M, et al. LncRNA RNA component of mitochondrial RNA-processing endoribonuclease promotes AKT-dependent breast cancer growth and migration by trapping microRNA-206[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 730538. doi: 10.3389/fcell.2021.730538.

[6] Xie Z, Liu S, Chu S, et al. lncRNA RMRP predicts poor prognosis and mediates tumor progression of esophageal squamous cell carcinoma by regulating miR-613/neuropilin 2 (NRP2) axis[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 6913-6922. doi: 10.1080/21655979.2021.1974656.

[7] Tzeng HT, Chyuan IT, Lai JH. Targeting the JAK-STAT pathway in autoimmune diseases and cancers: a focus on molecular mechanisms and therapeutic potential[J]. Biochem Pharmacol, 2021, 193: 114760. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114760.

[8] McCabe EM, Rasmussen TP. lncRNA involvement in cancer stem cell function and epithelial-mesenchymal transitions[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 75: 38-48. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.12.012.

[9] Nojima T, Proudfoot NJ. Mechanisms of lncRNA biogenesis as revealed by nascent transcriptomics[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(6): 389-406. doi: 10.1038/s41580-021-00447-6.

[10] Shen L, Wu Y, Li A, et al. LncRNA TTN-AS1 promotes endometrial cancer by sponging miR-376a-3p[J]. Oncol Rep, 2020, 44(4): 1343-1354. doi: 10.3892/or.2020.7691.

[11] Zhang XJ, Qi GT, Zhang XM, et al. lncRNA RHPN1-AS1 promotes the progression of endometrial cancer through the activation of ERK/MAPK pathway[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2021, 47(2): 533-543. doi: 10.1111/jog.14548.

[12] Cao HL, Liu ZJ, Huang PL, et al. lncRNA-RMRP promotes proliferation, migration and invasion of bladder cancer via miR-206[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 1012-1021. doi: 10.26355/eurrev_201902_16988.

[13] Yang M, Ke H, Zhou W. lncRNA RMRP promotes cell proliferation and invasion through miR-613/NFAT5 axis in non-small cell lung cancer[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 8941-8950. doi: 10.2147/OTT.S255126.

[14] Chen L, Qiu CH, Chen Y, et al. LncRNA SNHG16 drives proliferation, migration, and invasion of lung cancer cell through modulation of miR-520/VEGF axis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(18): 9522-9531. doi: 10.26355/eurrev_202009_23037.

[15] Pan J, Zhang D, Zhang J, et al. lncRNA RMRP silence curbs neonatal neuroblastoma progression by regulating microRNA-206/tachykinin-1 receptor axis via inactivating extracellular signal-regulated kinases[J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(5): 653-665. doi: 10.1080/15384047.2018.1550568.

[16] Wang Y, Luo X, Liu Y, et al. Long noncoding RNA RMRP promotes proliferation and invasion via targeting miR-1-3p in non-small-cell lung cancer[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 15170-15181. doi: 10.1002/jcb.28779.

[17] Zhou N, He Z, Tang H, et al. lncRNA RMRP/miR-613 axis is associated with poor prognosis and enhances the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma by impacting oncogenic phenotypes[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(5): 2801-2815.

[18] Li L, Zeng S, Guo L, et al. Long noncoding RNA RMRP contributes to paclitaxel sensitivity of ovarian cancer by regulating miR-580-3p/MICU1 signaling[J]. J Oncol, 2022, 2022: 8301941. doi: 10.1155/2022/8301941.

[19] Sabaawy HE, Ryan BM, Khiabanian H, et al. JAK/STAT of all trades: linking inflammation with cancer development, tumor progression and therapy resistance[J]. Carcinogenesis, 2021, 42(12): 1411-1419. doi: 10.1093/carcin/bgab075.

[20] Bose S, Banerjee S, Mondal A, et al. Targeting the JAK/STAT signaling pathway using phytocompounds for cancer prevention and therapy[J]. Cells, 2020, 9(6): 1451. doi: 10.3390/cells9061451.

[21] Gao Y, Luo L, Xie Y, et al. PYCR1 knockdown inhibits the proliferation, migration, and invasion by affecting JAK/STAT signaling pathway in lung adenocarcinoma[J]. Mol Carcinog, 2020, 59(5): 503-511. doi: 10.1002/mc.23174.

[22] 陈悦群, 翟洪波, 仝进毅, 等. 竹节香附素通过抑制JAK/STAT3信号转导通路抑制人子宫内膜癌HEC-1-B细胞的侵袭转移[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(4): 391-396. doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2019.04.005.


(编辑: 魏 源)