

LncRNA FGD5-AS1调节miR-22-3p/*ISG15*表达 对喉癌细胞恶性生物学行为的影响

范浩 綦彬*

(黄冈市中心医院耳鼻咽喉头颈外科, 黄冈 438000)

摘要 该文旨在探讨LncRNA FGD5-AS1调节miR-22-3p/*ISG15*表达对喉癌细胞恶性生物学行为的影响。利用qRT-PCR检测喉癌组织及细胞中FGD5-AS1、miR-22-3p和*ISG15* mRNA的表达情况,同时筛选最佳细胞系进行后续实验。将TU212细胞分为si-NC组、FGD5-AS1 siRNA组、miR-NC组、miR-22-3p组、FGD5-AS1 siRNA+anti-miR-22-3p组、FGD5-AS1 siRNA+*ISG15*组,并以未处理的细胞为空白组。qRT-PCR检测FGD5-AS1、miR-22-3p和*ISG15* mRNA的表达水平;双荧光素酶报告基因法及RNA免疫沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)实验验证miR-22-3p分别与FGD5-AS1和*ISG15*靶向关系;CCK-8、EdU法检测细胞增殖情况;Transwell、划痕实验分别检测细胞侵袭、迁移情况;Western blot检测c-Myc、p21、紧密连接蛋白-1(ZO-1)、波形蛋白(Vimentin)表达水平。双荧光素酶报告基因结果显示,miR-22-3p与FGD5-AS1、*ISG15*具有靶向关系,FGD5-AS1和*ISG15* mRNA在喉癌细胞及组织中表达水平增加,miR-22-3p表达水平降低($P<0.05$);敲低FGD5-AS1或过表达miR-22-3p可抑制TU212细胞增殖、侵袭、迁移($P<0.05$);抑制miR-22-3p表达或过表达*ISG15*可逆转敲低FGD5-AS1对TU212细胞增殖、侵袭、迁移的抑制作用($P<0.05$)。LncRNA FGD5-AS1在喉癌细胞中表达上调,干扰LncRNA FGD5-AS1表达通过调控miR-22-3p/*ISG15*表达抑制喉癌细胞恶性生物学行为。

关键词 LncRNA FGD5-AS1; miR-22-3p/*ISG15*表达; 喉癌; 增殖; 侵袭; 迁移

The Effect of LncRNA FGD5-AS1 on the Malignant Biological Behaviors of Laryngeal Cancer Cells by Regulating miR-22-3p/*ISG15* Expression

FAN Hao, QI Bin*

(Department of Otorhinolaryngology and Head & Neck Surgery, Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000, China)

Abstract This study aims to investigate the effect of LncRNA FGD5-AS1 on the malignant biological behaviors of laryngeal cancer cells by regulating miR-22-3p/*ISG15* expression. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression levels of FGD5-AS1, miR-22-3p and *ISG15* in laryngeal cancer tissues and cells. At the same time, the best cell line was selected for subsequent experiments. TU212 cells were assigned into the si-NC group, the FGD5-AS1 siRNA group, the miR-NC group, the miR-22-3p group, the FGD5-AS1 siRNA+anti-miR-22-3p group, and the FGD5-AS1 siRNA+*ISG15* group. The untreated cells were used as the blank group. qRT-PCR was used to detect the expression levels of FGD5-AS1, miR-22-3p and *ISG15* mRNA; the dual-luciferase reporter gene assay and RIP (RNA immunoprecipitation) experiment were used to verify the targeting relationship of miR-22-3p with FGD5-AS1 and *ISG15*, respectively; CCK-8 and EdU assays were used to detect cell proliferation; Transwell and scratch assays

收稿日期: 2026-01-22

接受日期: 2026-03-04

湖北省卫生健康委科研项目(批准号: WJ2021M087)资助的课题

*通信作者。Tel: 0713-8625757, E-mail: 18171781873@163.com

Received: January 22, 2026

Accepted: March 4, 2026

This work was supported by the Scientific Research Project of Hubei Provincial Health Commission (Grant No. WJ2021M087)

*Corresponding author. Tel: +86-713-8625757, E-mail: 18171781873@163.com

were used to examine cell invasion and migration; Western blot was used to detect the expression levels of c-Myc, p21, ZO-1 (zonula occludens-1), and Vimentin. The dual luciferase reporter gene assay results showed that miR-22-3p had a targeting relationship with FGD5-AS1 and *ISG15*. The expression of FGD5-AS1 and *ISG15* mRNA increased in laryngeal cancer cells and tissues, while the expression of miR-22-3p decreased ($P<0.05$). Knocking down FGD5-AS1 or overexpressing miR-22-3p could inhibit the proliferation, invasion and migration of TU212 cells ($P<0.05$); inhibiting the expression of miR-22-3p or overexpressing *ISG15* could reverse the inhibitory effects of knocking down FGD5-AS1 on the proliferation, invasion and migration of TU212 cells ($P<0.05$); the LncRNA FGD5-AS1 is upregulated in laryngeal cancer cells. Interference with LncRNA FGD5-AS1 can inhibit the malignant biological behaviors of laryngeal cancer cells by regulating miR-22-3p/*ISG15* expression.

Keywords LncRNA FGD5-AS1; miR-22-3p/*ISG15* expression; laryngeal cancer; proliferation; invasion; migration

喉癌作为最常见的头颈癌类型之一,发病率逐年上升,占有所有肿瘤的1%~5%,而约60%的患者在诊断时已处于晚期,且预后相对较差,给患者及其家属带来了重大负担^[1-2]。LncRNA是常见于真核生物中一类非编码RNA,与mRNA不同,LncRNA不参与蛋白质翻译,但其失调与多种疾病(包括肿瘤)的发生和进展有关^[3]。FGD5-AS1(PH domain containing 5 antisense RNA 1)是一种新发现的LncRNA,在不同癌组织中显著上调表达,且与肿瘤大小、转移、分期以及生存时间密切相关,已成为恶性肿瘤预后潜在的生物标志物^[4]。喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)是常见喉癌类型,FGD5-AS1被证明在LSCC组织和细胞中表达上调,沉默其表达可抑制LSCC进展^[5],但其发挥作用的下游分子网络仍有待进一步阐明。FGD5-AS1通过调控miRNA参与肿瘤发生,结合生物信息学预测及前期预实验结果发现miR-22-3p存在与FGD5-AS1的潜在结合位点,这提示二者可能存在靶向调控关系,且miR-22-3p在人类癌症(如肝细胞癌)中的作用已被研究^[6]。XU等^[7]研究表明miR-22在LSCC组织中明显表达下调,且其表达下调与肿瘤的晚期分期及患者的不良预后密切相关,miR-22过表达显著抑制了LSCC细胞的增殖和侵袭。基于以上研究,本研究推测FGD5-AS1可能通过靶向吸附miR-22-3p参与LSCC的进展调控。而miR-22-3p通过靶向不同基因发挥肿瘤抑制作用^[8]。本研究通过生物信息学预测miR-22-3p可与干扰素刺激基因15(interferon-stimulated gene 15, *ISG15*)结合。已有研究表明,*ISG15*在多种肿瘤(包括LSCC)中呈异常表达^[9-10]。但FGD5-AS1能否通过调节miR-22-3p/*ISG15*表达影响喉癌细胞恶性生物学行为尚未

见报道。本研究旨在探索FGD5-AS1在喉癌细胞中的作用及其调控的信号通路,为其作为喉癌潜在治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及组织来源

人类喉癌细胞系TU212、HEp-2和Tu-177购于中国科学院上海细胞库;人类喉癌细胞系TU686购于北京北纳创联生物技术研究院;人喉上皮细胞NP69细胞购于美国典型培养物保藏中心。

2023年2月至2025年11月,从黄冈市中心医院耳鼻咽喉头颈外科接受手术切除的30例喉癌患者中,采集新鲜喉癌组织及癌旁组织。患者入院前未接受放疗、化疗,组织标本均经术后病理学检查。样品被迅速冷冻在液氮中,随后储存于-80 °C,用于qRT-PCR检测mRNA表达水平。本研究已获得黄冈市中心医院伦理委员会批准(批号:HGYY-KY-2022-008),所有患者均签署书面知情同意书。

1.2 主要材料

FGD5-AS1 siRNA(5'-GCA AUG CGC CAC UAG AUU G-3')、miR-22-3p(5'-AAG CUG CCA GUG AAC UGU-3')、anti-miR-22-3p(5'-ACA GUC UCU CAA CUG GCC UU-3')和阴性对照(si-NC、miR-NC),以及*ISG15* pcDNA3.1质粒均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成;RNA提取试剂盒购于上海普洛麦格生物产品有限公司;Lipofectamine 2000试剂盒购于美国ThermoFisher Scientific公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于上海乐赛生物科技有限公司; c-Myc、p21、紧密连接蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)、波形蛋白(Vimentin)抗体购于英国Abcam公司;CCK-8试剂盒购于爱必信(上海)生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养、转染及分组 喉癌细胞系及NP69细胞在RPMI 1640培养基中培养(37 °C、5% CO₂), 培养基中补充10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗。取对数生长期TU212细胞, 采用Lipofectamine 2000试剂, 将各干预片段与质粒分别或共转染至细胞中。转染si-NC的细胞记为si-NC组, 转染FGD5-AS1 siRNA的细胞记为FGD5-AS1 siRNA组; 转染miR-NC的细胞记为miR-NC组, 转染miR-22-3p mimic的细胞记为miR-22-3p组; 共转染FGD5-AS1 siRNA与anti-miR-22-3p的细胞记为FGD5-AS1 siRNA+anti-miR-22-3p组, 共转染FGD5-AS1 siRNA与ISG15 pcDNA3.1质粒的细胞记为FGD5-AS1 siRNA+ISG15组。以未处理的细胞为空白组, 转染48 h用于后续实验。

1.3.2 实时荧光定量PCR分析FGD5-AS1、miR-22-3p和ISG15 mRNA表达情况 采用Easstep® Super Total RNA提取试剂盒提取组织及细胞中的总RNA, 利用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性, 采用PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒合成cDNA, 使用SYBR Green Supermix试剂盒在CFX96™实时荧光定量PCR检测系统上完成qRT-PCR检测, miRNA的定量检测则使用Hairpin-it™ miRNAs qPCR试剂盒完成, 反应程序采用两步法: 95 °C预变性2 min; 95 °C变性5 s、60 °C退火/延伸30 s, 40个循环。基因相对表达水平采用2^{-ΔΔCt}计算。引物序列见表1。

1.3.3 CCK-8、EdU法检测细胞增殖情况 转染的TU212细胞(每孔5 000个细胞)在37 °C、5% CO₂条件下孵育24 h, 随后将细胞与CCK-8试剂在37 °C孵育4 h, 利用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(D)值。

将细胞在96孔板中培养, 密度为6×10³/孔, 转染后用20 μmol/L的EdU标记培养基并于37 °C孵育2 h。室温下用4%多聚甲醛固定30 min后, 细胞被用抗EdU工作液染色, 室温避光孵育30 min。采用荧光显微镜观察并采集图像, 计算EdU阳性细胞所占百分比。

1.3.4 Transwell实验检测细胞侵袭情况 5×10⁵个细胞被预先涂在铺有Matrigel的Transwell过滤器顶部, 用于检测细胞侵袭情况。在Transwell侵袭检测过程中, 将细胞悬浮于无血清培养基中, 底部腔室使用含10%血清的培养基孵育(37 °C、48 h), 顶部腔室的非侵入细胞用棉签擦除, 侵入至滤膜下表面的细胞被固定在100%甲醇中, 风干后用结晶紫溶液室温染色15 min, 然后在显微镜下计数。

1.3.5 划痕实验检测细胞迁移情况 转染细胞被接种到6孔板中, 密度为每孔5×10⁵个细胞, 并培养至完全融合。使用无菌移液器吸头尖端划出人工划痕, 去除划落的细胞碎片, 在无血清培养基中继续培养(37 °C、5% CO₂、24 h)。分别于划痕后0 h和24 h在显微镜下采集图像, 并计算细胞划痕愈合率。划痕愈合率=[(0 h划痕面积-24 h划痕面积)/0 h划痕面积]×100%。

1.3.6 Western blot检测c-Myc、p21、ZO-1、Vimentin蛋白表达水平 细胞样本采用RIPA裂解液充分研磨并均质化, 离心(4 °C、12 000 r/min、15 min)后收集含上清液的蛋白质, 蛋白浓度通过BCA(bicinchoninic acid)检测并校准, 将在沸水浴中变性的总蛋白进行SDS-PAGE电泳以分离蛋白, 随后进行转膜、封闭。加入特异性一抗(抗c-Myc, 1:1 000; 抗p21, 1:1 000; 抗GAPDH, 1:1 000; 抗ZO-1, 1:1 000; 抗Vimentin, 1:500) 4 °C孵育过

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
FGD5-AS1	F: AAC AGT GCC TAT GTG GAC GG R: CCC ATC ACA GAG GTC CAC AC
miR-22-3p	F: GCG AAG CTG CCA GTT GAA G R: AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT
ISG15 mRNA	F: CTC TGA GCA TCC TGG TGA GGAA R: AAG GTC AGC CAG AAC AGG TCG T
GAPDH	F: ACA ACT TTG GTA TCG TGG AAG G R: GCC ATC ACGCCA CAG TTT C
U6	F: CTC GCT TCG GCA GCA CA R: AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT

夜;洗膜后,加入二抗(1:5 000)室温避光孵育1 h,使用ECL发光液观察蛋白质条带。

1.3.7 验证 miR-22-3p 与 FGD5-AS1、ISG15 的靶向关系 将对数生长期的细胞用 RNA 免疫沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 裂解缓冲液充分裂解,随后取适量细胞裂解液,分别与结合了抗 Ago2 抗体 (1:100) 或 IgG 对照抗体 (1:100) 的磁珠混悬液混合,于 4 °C 条件下孵育过夜。孵育结束后,加入蛋白酶 K 缓冲液反应,随后提取并纯化免疫沉淀复合物中的 RNA,通过 qRT-PCR 技术检测其中 miR-22-3p、FGD5-AS1、ISG15 的水平。

采用 starBase 在线数据库预测 miR-22-3p 与 FGD5-AS1、ISG15 靶向关系;将 TU212 细胞接种于 24 孔板,培养至 85% 融合度后,采用 Lipofectamine 2000 转染试剂,将 miR-22-3p 或 miR-NC 分别与野生型报告质粒 (WT-FGD5-AS1、WT-ISG15) 或突变型报告质粒 (MUT-FGD5-AS1、MUT-ISG15) 进行共转染,48 h 后测定细胞裂解液中的荧光素酶活性。

1.4 统计分析

利用 SPSS 26.0 软件分析实验结果,数据以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验;两组间比较采用 *t* 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FGD5-AS1、miR-22-3p 和 ISG15 mRNA 在喉癌中的表达水平

FGD5-AS1 和 ISG15 mRNA 在喉癌细胞 (HEp-

2、Tu-177、TU686、TU212) 及组织中表达水平增加,miR-22-3p 表达水平降低 ($P<0.05$), 见图 1。后续则以基因表达差异最为显著的 TU212 作为研究对象。

2.2 FGD5-AS1、miR-22-3p 和 ISG15 mRNA 在 TU212 细胞中的表达水平

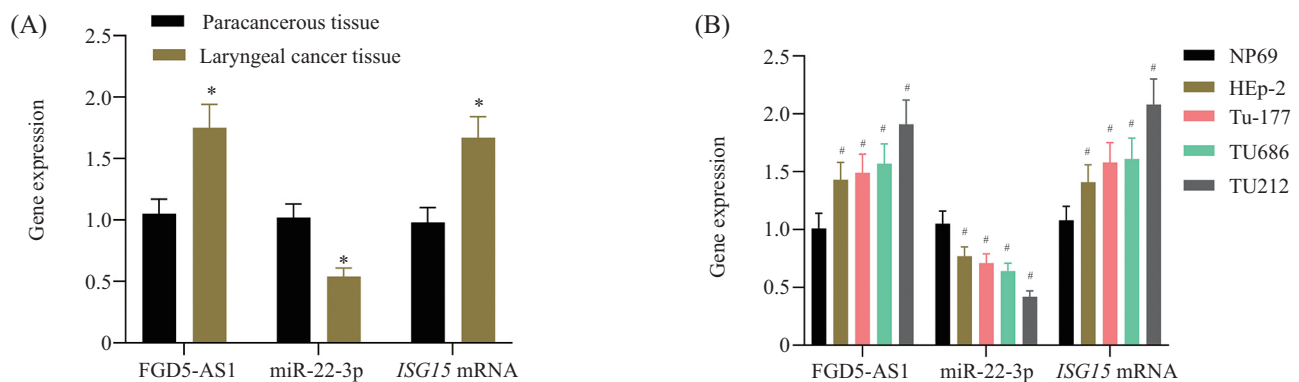
FGD5-AS1 siRNA 组 FGD5-AS1 和 ISG15 mRNA 表达水平较 si-NC 组、空白组降低,miR-22-3p 表达水平升高 ($P<0.05$); miR-22-3p 组 ISG15 mRNA 表达水平较 miR-NC 组降低,miR-22-3p 表达水平升高 ($P<0.05$); FGD5-AS1 siRNA+anti-miR-22-3p 组 ISG15 mRNA 表达水平较 FGD5-AS1 siRNA 组升高,miR-22-3p 表达水平降低 ($P<0.05$); FGD5-AS1 siRNA+ISG15 组 ISG15 mRNA 表达水平较 FGD5-AS1 siRNA 组升高 ($P<0.05$), 见图 2。

2.3 TU212 细胞增殖、侵袭及迁移变化

FGD5-AS1 siRNA 组吸光度值、EdU 阳性率、细胞侵袭数、愈合率较 si-NC 组、空白组降低 ($P<0.05$); miR-22-3p 组吸光度值、EdU 阳性率、细胞侵袭数、愈合率较 miR-NC 组降低 ($P<0.05$); FGD5-AS1 siRNA+anti-miR-22-3p 组吸光度值、EdU 阳性率、细胞侵袭数、愈合率较 FGD5-AS1 siRNA 组升高 ($P<0.05$); FGD5-AS1 siRNA+ISG15 组吸光度值、EdU 阳性率、细胞侵袭数、愈合率较 FGD5-AS1 siRNA 组升高 ($P<0.05$), 见图 3~图 5。

2.4 TU212 细胞增殖、侵袭及迁移相关蛋白表达变化

FGD5-AS1 siRNA 组 Vimentin、c-Myc 表达

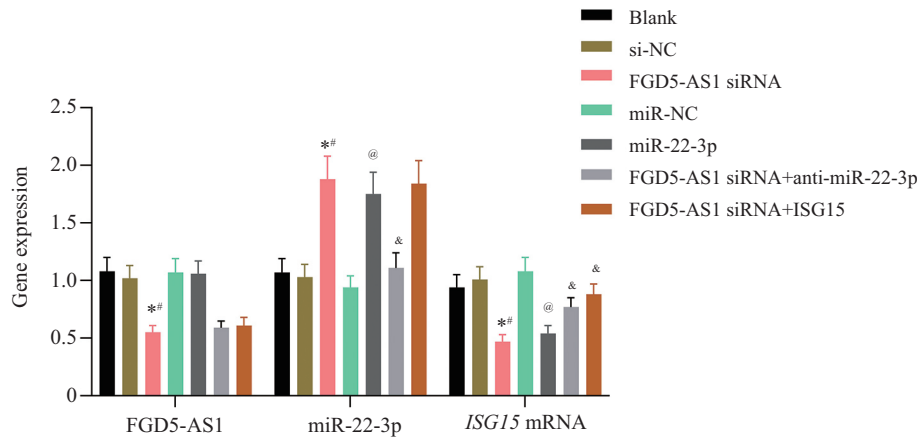


A: 组织中各基因表达变化; B: 细胞中各基因表达变化。* $P<0.05$, 与癌旁组织比较; # $P<0.05$, 与 NP69 细胞比较。

A: changes in gene expression within the tissues; B: changes in gene expression within the cells. * $P<0.05$ compared with the paracancerous tissue; # $P<0.05$ compared with NP69 cells.

图1 FGD5-AS1、miR-22-3p 和 ISG15 mRNA 在喉癌组织及细胞中的表达情况

Fig.1 Expression of FGD5-AS1, miR-22-3p and ISG15 mRNA in laryngeal cancer tissues and cells

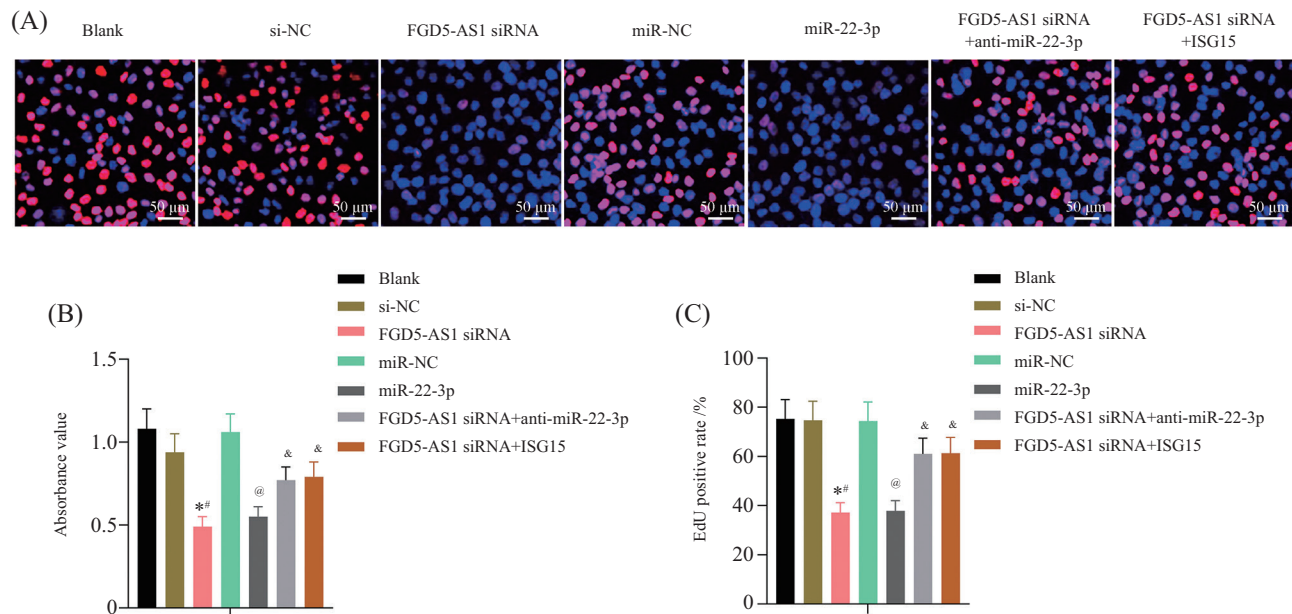


* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与si-NC组比较; @ $P < 0.05$, 与miR-NC组比较; & $P < 0.05$, 与FGD5-AS1 siRNA组比较。

* $P < 0.05$ compared with the blank group; # $P < 0.05$ compared with the si-NC group; @ $P < 0.05$ compared with the miR-NC group; & $P < 0.05$ compared with the FGD5-AS1 siRNA group.

图2 FGD5-AS1、miR-22-3p和*ISG15* mRNA在TU212细胞中的表达情况

Fig.2 Expression of FGD5-AS1, miR-22-3p and *ISG15* mRNA in TU212 cells



A: 细胞EdU染色变化; B: 定量分析细胞吸光度值变化; C: 定量分析细胞EdU阳性率变化。* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与si-NC组比较; @ $P < 0.05$, 与miR-NC组比较; & $P < 0.05$, 与FGD5-AS1 siRNA组比较。

A: changes in cell EdU staining; B: quantitative analysis of changes in cell absorbance values; C: quantitative analysis of changes in cell EdU positive rates. * $P < 0.05$ compared with the blank group; # $P < 0.05$ compared with the si-NC group; @ $P < 0.05$ compared with the miR-NC group; & $P < 0.05$ compared with the FGD5-AS1 siRNA group.

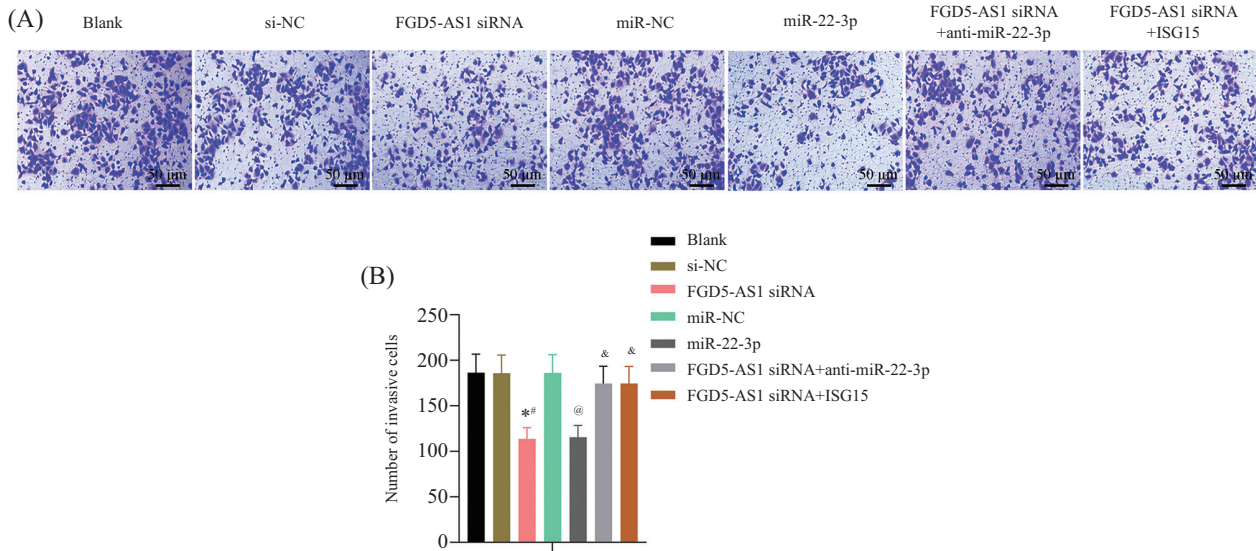
图3 观察细胞增殖变化

Fig.3 Observing changes in cell proliferation

水平较 si-NC组、空白组降低, ZO-1、p21表达水平升高($P < 0.05$); miR-22-3p组 Vimentin、c-Myc表达水平较 miR-NC组降低, ZO-1、p21表达水平升高($P < 0.05$); FGD5-AS1 siRNA+anti-miR-22-3p组 Vimentin、c-Myc表达水平较 FGD5-AS1 siRNA组升高, ZO-1、p21表达水平降低($P < 0.05$); FGD5-

AS1 siRNA+ISG15组 Vimentin、c-Myc表达水平较 FGD5-AS1 siRNA组升高, ZO-1、p21表达水平降低($P < 0.05$), 见图6。

2.5 验证miR-22-3p、FGD5-AS1和*ISG15*的靶向关系
starBase数据库预测 miR-22-3p、FGD5-AS1和*ISG15*之间存在互补的结合位点, 见图7。荧光素酶

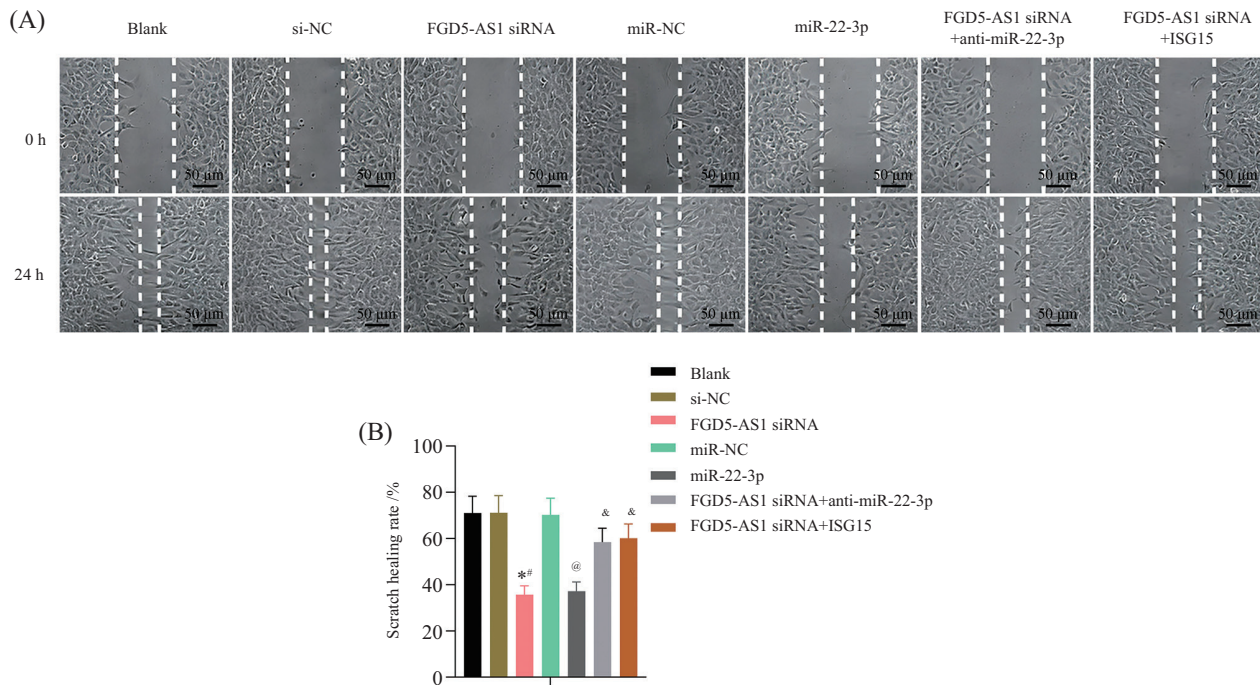


A: 各组细胞侵袭变化; B: 定量分析细胞侵袭变化。* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与si-NC组比较; @ $P < 0.05$, 与miR-NC组比较; & $P < 0.05$, 与FGD5-AS1 siRNA组比较。

A: changes in cell invasion in each group; B: quantitative analysis of cell invasion changes. * $P < 0.05$ compared with the blank group; # $P < 0.05$ compared with the si-NC group; @ $P < 0.05$ compared with the miR-NC group; & $P < 0.05$ compared with the FGD5-AS1 siRNA group.

图4 观察细胞侵袭变化

Fig.4 Observing the changes in cell invasion



A: 各组细胞划痕愈合变化; B: 定量分析细胞划痕愈合率变化。* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与si-NC组比较; @ $P < 0.05$, 与miR-NC组比较; & $P < 0.05$, 与FGD5-AS1 siRNA组比较。

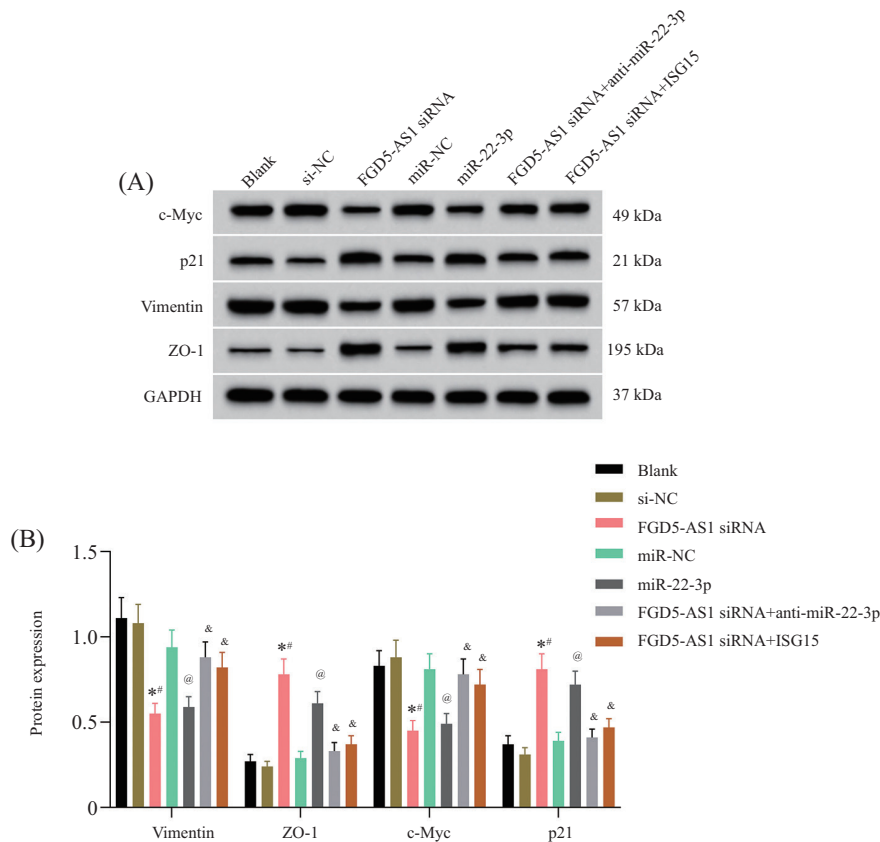
A: changes in cell scratch healing of each group; B: quantitative analysis of the changes in cell scratch healing rates. * $P < 0.05$ compared with the blank group; # $P < 0.05$ compared with the si-NC group; @ $P < 0.05$ compared with the miR-NC group; & $P < 0.05$ compared with the FGD5-AS1 siRNA group.

图5 观察细胞迁移变化

Fig.5 Observing changes in cell migration

报告基因检测结果表明, miR-22-3p过表达显著降低了TU212细胞中WT-FGD5-AS1、WT-*ISG15*的荧光素活性,但未显著影响MUT-FGD5-AS1、MUT-

*ISG15*的荧光素活性,见表2。RIP检测显示,与IgG组相比,miR-22-3p、FGD5-AS1和*ISG15*在Ago2组中水平增加($P < 0.05$),见表3。

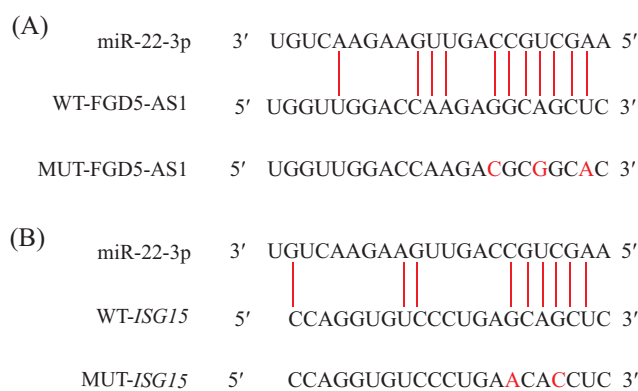


A: Western blot检测细胞中各蛋白表达情况; B: 定量分析各蛋白表达变化。* $P < 0.05$, 与空白组比较; # $P < 0.05$, 与si-NC组比较; @ $P < 0.05$, 与miR-NC组比较; & $P < 0.05$, 与FGD5-AS1 siRNA组比较。

A: Western blot is used to detect the expression levels of various proteins in the cells; B: quantitative analysis is conducted to examine the changes in the expression levels of each protein. * $P < 0.05$ compared with the blank group; # $P < 0.05$ compared with the si-NC group; @ $P < 0.05$ compared with the miR-NC group; & $P < 0.05$ compared with the FGD5-AS1 siRNA group.

图6 细胞中各蛋白表达变化

Fig.6 Changes in protein expression in cells



A: miR-22-3p与FGD5-AS1的结合位点; B: miR-22-3p与ISG15的结合位点。红色碱基表示MUT序列中的突变位点。

A: binding sites of miR-22-3p and FGD5-AS1; B: binding sites of miR-22-3p and ISG15. Red bases indicate the mutation sites in the MUT sequences.

图7 miR-22-3p分别与FGD5-AS1、ISG15的结合位点

Fig.7 miR-22-3p respectively targets the binding sites of FGD5-AS1 and ISG15

3 讨论

LSCC是喉癌中主要的组织学亚型, 占比超90%, 最新的全球癌症统计报告预测, 该病新增病例

预计超1.9万例, 尽管喉癌的诊断和治疗取得进展, 但因发生率、复发率较高, 整体生存率的提升仍有限^[11-12], 因此亟需确定更有效的预测和治疗靶标。

表2 双荧光素酶验证miR-22-3p分别与FGD5-AS1、ISG15的靶向关系

Table 2 Dual luciferase assay to verify the targeting relationships of miR-22-3p with FGD5-AS1 and ISG15

组别 Group	WT-FGD5-AS1	MUT-FGD5-AS1	WT-ISG15	MUT-ISG15
miR-NC	1.01±0.11	0.98±0.10	1.08±0.12	1.04±0.11
miR-22-3p	0.55±0.06*	1.03±0.11	0.67±0.08*	1.06±0.11

* $P < 0.05$, 与miR-NC组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P < 0.05$ compared with the miR-NC group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

表3 RIP实验验证miR-22-3p与FGD5-AS1、ISG15的结合富集情况

Table 3 Detection of the enrichment of miR-22-3p with FGD5-AS1 and ISG15 in the RIP experiment

组别 Group	miR-22-3p与FGD5-AS1 miR-22-3p and FGD5-AS1		miR-22-3p与ISG15 miR-22-3p and ISG15	
	FGD5-AS1	miR-22-3p	miR-22-3p	ISG15
IgG	1.04±0.05	1.09±0.12	1.06±0.12	1.01±0.05
Ago2	5.11±0.72*	7.21±0.88*	8.01±0.98*	6.11±0.87*

* $P < 0.05$, 与IgG组比较。 $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P < 0.05$ compared with the IgG group. $\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。

LncRNA通常被定义为长度超过200个核苷酸的转录本, 可以调控癌症的发生和进展, 在喉癌中多种LncRNA(如AFAP1-AS1、ZFAS1和NEAT1)被证实是参与肿瘤恶性进展的关键调控因子^[13]。FGD5-AS1是一种高丰度的LncRNA, 在多种肿瘤中具有致癌作用, 如FGD5-AS1过度表达可能促进卵巢癌细胞增殖^[14]。QIN等^[15]证实FGD5-AS1是一种与上皮-间质转化相关的LncRNA, 降低其表达水平可抑制胃癌细胞增殖, 其过表达与胃癌转移及患者不良预后显著相关, 提示FGD5-AS1是胃癌发展的肿瘤驱动基因。在同属于消化系统癌症的喉癌中, FGD5-AS1被证实与其恶性进展相关^[5]。本研究结果也同样发现FGD5-AS1在喉癌组织及细胞中表达上调, 干扰其表达可显著抑制细胞增殖、迁移及侵袭, 同时抑制相关蛋白如c-Myc和Vimentin的表达, 促进p21和ZO-1的表达, 这与上述以往FGD5-AS1作为促癌LncRNA的作用趋势一致, 进一步表明FGD5-AS1可能作为一种新型促肿瘤LncRNA, 调控喉部癌症发生。

最新研究表明, LncRNA可以作为一种内源竞争RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)与miRNA相互作用, 并通过与miRNA相互作用进一步调控靶mRNA的表达, 因此LncRNA-miRNA-mRNA在转录后水平形成了一种新的调控网络^[16]。miR-22在人类基因组中的位置为17p13.3, 通过靶向不同基因在多种癌症如肝癌中发挥肿瘤抑制作用^[17]。鉴于先前研究已证明miR-22-3p可作为头颈癌患者接受

调强放疗期间发生营养缺乏的潜在预测标志物^[18], 且其在喉癌中表达下调并被表征为抑癌基因^[7], 本研究探讨了FGD5-AS1与miR-22-3p相互作用的可能性。荧光素酶报告基因检测结果证实FGD5-AS1能够特异性结合miR-22-3p, RIP检测结果表明FGD5-AS1与miR-22-3p在Ago2组中的富集量显著高于IgG组, 提示FGD5-AS1可以特异性地与喉癌细胞中的miR-22-3p结合。本研究还显示喉癌组织及细胞中miR-22-3p表达下调, 除了抑制细胞迁移和侵袭外, miR-22-3p过表达还抑制了喉癌细胞增殖。而干扰FGD5-AS1表达促进了miR-22-3p的表达, 进而参与了喉癌细胞的增殖、迁移和侵袭调控。共转染anti-miR-22-3p后, 敲低FGD5-AS1对喉癌细胞增殖、侵袭及迁移的抑制作用均被逆转。

转录后调控机制揭示, LncRNA能够通过海绵化miRNA实现对其靶基因的调控, 荧光素酶报告基因检测及RIP检测证实, ISG15是miR-22-3p在喉癌细胞中的直接靶点。作为泛素类蛋白, ISG15及其偶联物已被证实与多种人类恶性肿瘤相关。研究表明, ISG15在卵巢癌等多种癌细胞中表达上调, 是一种重要的致癌基因^[19]。ISG15在喉癌细胞中表达上调并作为致癌基因发挥作用^[20]。本研究发现ISG15在喉癌组织及细胞中表达上调, 且FGD5-AS1敲低可降低喉癌细胞中ISG15表达水平, 而miR-22-3p过表达则保持这一趋势。此外, 本研究还证明共转染ISG15过表达质粒可逆转喉癌细胞中FGD5-AS1敲低引起的

效应。以上结果表明, FGD5-AS1通过海绵化 miR-22-3p调控喉癌细胞中 ISG15的表达, 参与喉癌恶性发展。

综上所述, FGD5-AS1在喉癌细胞中表达上调, 干扰 LncRNA FGD5-AS1表达通过调控 miR-22-3p/ISG15表达抑制喉癌细胞恶性生物学行为, 提示 FGD5-AS1有望成为喉癌治疗的潜在新靶点。但本研究仅使用单一喉癌细胞系开展体外实验, 存在一定局限性, 后续将通过使用多种喉癌细胞系样本及构建动物模型进一步验证该调控机制。

参考文献 (References)

- [1] LI L L, CUI J, LI X Y, et al. Prmt1-mediated histone H4R3me2a methylation regulates the proliferation, migration and invasion of laryngeal cancer cells by affecting the expression level of NCOA5 [J]. *Front Oncol*, 2024, 14(1): 1489164-73.
- [2] WANG X Y, WANG J R, WANG L, et al. CTSL promotes autophagy in laryngeal cancer through the IL6-JAK-STAT3 signaling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2025, 29(3): e70364-80.
- [3] HE J R, TIAN F, LI J, et al. The lncrna HMMR-AS1 promotes the malignant progression of ovarian cancer cells by regulating the miR-627-3p/PTN axis [J]. *J Ovarian Res*, 2025, 18(1): 119-28.
- [4] LEI H Y, YE T, SUN J X, et al. The prognostic significance of lncRNA FGD5-AS1 in various malignancies: a meta-analysis [J]. *Front Oncol*, 2024, 14(1): 1451949-58.
- [5] SONG K B, YU P Y, ZHANG C, et al. The LncRNA FGD5-AS1/miR-497-5p axis regulates septin 2 (SEPT2) to accelerate cancer progression and increase cisplatin-resistance in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2021, 60(7): 469-80.
- [6] LI K, BAI Y P, WANG J T, et al. Targeting STK26 and ATG4B: miR-22-3p as a modulator of autophagy and tumor progression in HCC [J]. *Transl Oncol*, 2025, 51(1): 102214-23.
- [7] XU Z X, XI K. LncRNA RGMB-AS1 promotes laryngeal squamous cell carcinoma cells progression via sponging miR-22/NLRP3 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118(1): 109222-31.
- [8] JIN Y, WANG Z J, LIANG Y S, et al. MiRNA-22-3p inhibits cell viability and metastasis of nasopharyngeal carcinoma by targeting FOXP1 [J]. *Oncol Lett*, 2024, 29(2): 96-105.
- [9] LIU X R, MA Q J, JIA Z, et al. The multifaceted roles of ISG15 in cancer: conjugated and free forms [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2025, 1880(6): 189473-82.
- [10] GUO F, LI S R, YAN S Q, et al. Bioinformatics analysis of laryngeal squamous cell carcinoma based on the high infection rate of HPV in Northwest China [J]. *PeerJ*, 2025, 13(1): e19851-71.
- [11] ZHANG M, SUN Q, HAN Z J, et al. Construction of a novel disulfidptosis-related lncRNAs signature for prognosis prediction and anti-tumor immunity in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Heliyon*, 2024, 10(10): e30877-93.
- [12] BOCK S, HENLEY S J, O'NEIL M E, et al. Cancer distribution among Asian, native Hawaiian, and Pacific Islander subgroups-United States, 2015-2019 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2023, 72(16): 421-5.
- [13] YIN X Y, ZHANG H Z, WANG J M, et al. LncRNA FLJ20021 regulates CDK1-mediated PANoptosis in a ZBP1-dependent manner to increase the sensitivity of laryngeal cancer-resistant cells to cisplatin [J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 265-74.
- [14] ZHANG W, SHI J G, LIU G Y. Abnormal expression of long non-coding RNA FGD5-AS1 affects the development of ovarian cancer through regulating miR-107/RBBP6 axis [J]. *Chin J Physiol*, 2023, 66(3): 171-80.
- [15] QIN S S, LIU Y, ZHANG X G, et al. LncRNA FGD5-AS1 is required for gastric cancer proliferation by inhibiting cell senescence and ROS production via stabilizing YBX1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 188-97.
- [16] REN S L, LEE W, PARK B, et al. Constructing lncRNA-miRNA-mRNA networks specific to individual cancer patients and finding prognostic biomarkers [J]. *BMC Genom Data*, 2024, 25(Suppl 1): 67-76.
- [17] CUI S S, CHEN Y Y, GUO Y F, et al. Hsa-miR-22-3p inhibits liver cancer cell EMT and cell migration/ invasion by indirectly regulating SPRY2 [J]. *PLoS One*, 2023, 18(2): e0281536-51.
- [18] CHAWRYLAK K, HOMA-MLAK I, MAZUREK M, et al. MiR-22-3p as a promising predictor of nutritional deficiencies in patients with head and neck cancer subjected to intensity-modulated radiation therapy [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 28120-9.
- [19] DORAYAPPAN K D P, WAGNER V, PARK D, et al. ISG15 mediates the function of extracellular vesicles in promoting ovarian cancer progression and metastasis [J]. *J Extracell Biol*, 2024, 3(2): e92-106.
- [20] 刘洋君, 李丽, 陆晓丹. miR-370调控ISG15表达对喉癌细胞增殖、迁移的影响[J]. *河北医药*(LIU Y J, LI L, LU X D. Effects of miR-370 on the proliferation and migration of laryngeal carcinoma cells by regulating the expression of ISG15 [J]. *Hebei Med*), 2022, 44(16): 2416-20.