

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.01.003

· 基础研究 ·

IL-22/IL-22RA1 通路在口腔鳞状细胞癌恶性进展中的作用及其机制

张晗, 甘桂芳(上海交通大学医学院附属第九人民医院 检验科, 上海 200011)

[摘要] **目的:** 探讨 IL-22/IL-22 受体 A1(IL-22RA1) 通路在口腔鳞状细胞癌(OSCC)恶性进展中的作用及其机制。**方法:** 利用 GEO 数据库和免疫组化法分析 IL-22RA1 在 OSCC 组织及配对癌旁组织中的表达水平, 采用组织芯片免疫组化法检测并分析 IL-22RA1 表达水平与 OSCC 患者临床病理特征的关系, 通过 EBI ArrayExpress 数据库分析 IL-22RA1 表达水平与患者预后的关系。采用免疫荧光法检测 IL-22 和 IL-22RA1 在 OSCC 组织中表达水平并分析两者间的相关性。用 RNA 干扰技术敲减 OSCC 细胞 WSU-HN4 和 CAL27 的 IL-22RA1 表达, 用 qPCR 法验证敲减效率。采用克隆形成实验、Transwell 小室法分别检测 IL-22 对阴性对照 (siNC) 组和 IL-22RA1 敲减 (siIL-22RA1) 组 OSCC 细胞克隆形成及迁移能力的影响, WB 法检测 IL-22 对 OSCC 细胞 IL-22RA1 表达水平及 STAT1、STAT3 和 ERK1/2 磷酸化水平的影响。**结果:** OSCC 组织中 IL-22RA1 mRNA 的表达水平显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。IL-22RA1 表达水平与 OSCC 患者的肿瘤大小 ($P < 0.05$)、淋巴结转移 ($P < 0.01$) 及预后不良 ($P < 0.05$) 有关联。OSCC 组织中的 IL-22 和 IL-22RA1 表达水平无明显关联, IL-22 对 OSCC 细胞 IL-22RA1 表达无影响 (均 $P > 0.05$)。IL-22 可显著增强 OSCC 细胞的克隆形成和迁移能力 (均 $P < 0.01$), 并可激活 OSCC 细胞的 STAT1、STAT3 及 ERK1/2 信号分子; 敲减 OSCC 细胞的 IL-22RA1 后, IL-22 则无法发挥上述作用。**结论:** IL-22/IL-22RA1 可通过调控细胞增殖和迁移促进 OSCC 的生长和转移, 其下游机制可能是激活 ERK1/2-STAT1/3 信号通路。

[关键词] IL-22; IL-22 受体 A1; 口腔鳞状细胞癌; WSU-HN4 细胞; CAL27 细胞; 增殖; 迁移

[中图分类号] R739.8; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)01-0019-08

Role of IL-22/IL-22RA1 pathway in the malignant progression of oral squamous carcinoma and its mechanism

ZHANG Han, GAN Guifang (Department of Clinical Laboratory, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

[Abstract] Objective: To investigate the role of IL-22/IL-22RA1 (IL-22 receptor A1) pathway in the malignant progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and the underlying mechanisms. **Methods:** The expression levels of IL-22RA1 in OSCC tissues and paired para-cancerous tissues were analyzed using the GEO database and immunohistochemistry. The association between IL-22RA1 expression and the clinicopathological characteristics of OSCC patients was detected and analyzed by tissue microarray immunohistochemistry. The relationship between IL-22RA1 expression and the prognosis of OSCC patients was analyzed using the EBI ArrayExpress database. The expression of IL-22 and IL-22RA1 in OSCC tissues was examined by immunofluorescence, and their association was also analyzed. IL-22RA1 expression was knocked down in OSCC WSU-HN4 and CAL27 cells by RNA interference technology, and the efficiency was verified using qPCR. The effects of IL-22 on the colonogenesis and migration of OSCC cells in the negative control (siNC) group and IL-22RA1 knock-down (siIL-22RA1) group were determined by plate cloning and transwell assays, respectively. The effects of IL-22 on the expression of IL-22RA1 and the phosphorylation level of STAT1, STAT3 and ERK1/2 in OSCC cells were detected using the WB assay. **Results:** The mRNA expression of IL-22RA1 in OSCC tissues was significantly higher than that in para-cancerous tissues ($P < 0.05$). The expression of IL-22RA1 was associated with tumor size ($P < 0.05$), lymph node metastasis ($P < 0.01$), and poor prognosis ($P < 0.05$) of OSCC patients. There was no significant correlation between the expression levels of IL-22 and IL-22RA1 in OSCC tissues, and IL-22 did not affect on the expression level of IL-22RA1 in OSCC cells (all $P > 0.05$). IL-22 significantly enhanced the colony formation and migration abilities (all $P < 0.01$) of OSCC cells, and activated STAT1, STAT3 and ERK1/2 signals in OSCC cells. After knocking down IL-22RA1 in OSCC cells, IL-22 could not exert the above effects. **Conclusion:** IL-22/IL-22RA1 can promote the growth and metastasis of OSCC by regulating cell proliferation and migration, and the downstream mechanism may be the activation of ERK1/2-STAT1/3 signaling pathway.

[Key words] IL-22; IL-22RA1; oral squamous cell carcinoma (OSCC); WSU-HN4 cell; CAL27 cell; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(1): 19-26. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.01.003]

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目 (No. 82203551); 上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划 (No. 沪卫人事[2020]087号); 上海交通大学医工交叉项目 (No. YG2022QN065)

[作者简介] 张晗(1987—), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事肿瘤免疫学研究。E-mail: zhanghan4015@163.com

[通信作者] 张晗, E-mail: zhanghan4015@163.com

IL-22 是一种由 T 细胞和固有淋巴细胞产生的 IL-10 家族细胞因子, IL-22 的独特受体 IL-22 受体 $\alpha 1$ (IL-22 receptor A1, IL-22RA1) 选择性地表达在非免疫细胞上, 尤其是上皮细胞、角质形成细胞、肝细胞和胰腺细胞等^[1-2]。近年来, IL-22/IL-22RA1 信号通路在肿瘤研究中日益受到重视, 由于免疫细胞缺乏 IL-22 的特异受体, IL-22/IL-22RA1 可能是不良反应较少的潜在治疗靶点^[3]。IL-22RA1 在胰腺癌中高表达, 并且与患者预后呈负相关^[4]。在皮肤鳞状细胞癌中, IL-22 可促进肿瘤细胞增殖, 靶向 IL-22/IL-22RA1 下游信号通路可抑制肿瘤生长^[5]。此外, IL-22 还可促进肺癌细胞的增殖和迁移^[6]。口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是发生于口腔部位最常见的恶性肿瘤。目前, OSCC 患者的 5 年生存率为 50% 左右, 致死原因主要是肿瘤复发和远处转移^[7]。因此, 阐明 OSCC 恶性进展的分子机制至关重要。OSCC 起源于口腔上皮细胞, 发生癌变时其 IL-22RA1 表达发生何种改变, 以及 IL-22/IL-22RA1 轴在 OSCC 进展中发挥何种作用, 尚少见报道。本研究利用组织芯片和数据库分析 IL-22RA1 在 OSCC 组织中的表达水平及其与患者临床病理特征和预后的关系, 进一步探索 IL-22 在 OSCC 细胞增殖和迁移中的作用及其可能机制, 为揭示 IL-22/IL-22RA1 信号通路在 OSCC 进展中的作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、组织芯片及主要试剂

人 OSCC 细胞 WSU-HN4 和 CAL27 分别来自美国国立卫生研究院 (NIH) 和美国 ATCC 细胞库, 均由上海市口腔医学重点实验室提供。

OSCC 组织芯片 (HOraC060PG01, 含临床病理资料) 购自上海芯超生物科技有限公司, 该组织芯片包含 46 例 OSCC 组织及 5 例配对的癌旁正常口腔组织, 部分 OSCC 患者的病理信息 (如肿瘤大小、淋巴结转移状态等) 缺失。

DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 0.25% 胰蛋白酶等细胞培养试剂购自美国 Gibco 公司, IL-22 购自美国 Peprotech 公司, siRNA 干扰序列及转染试剂盒购自广州锐博生物技术公司 (siIL-22RA1 序列为 5'-CCACCTGATGTGACCTGTATCTCCA-3'), qPCR 引物由上海生工生物工程公司合成, TRIzol 试剂、逆转录试剂盒和 Real-time PCR 试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, BCA 蛋白测定试剂盒购自美国 Thermo 公司, IL-22RA1 一抗购自美国 Abcam 公司, STAT1、p-STAT1、STAT3、p-STAT3、ERK1/2 和 p-ERK1/2

一抗及 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗均购自美国 CST 公司, β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, IL-22 抗体购自武汉赛维尔公司。

1.2 利用数据库数据分析 IL-22RA1 在 OSCC 患者组织中的表达水平及其与 OS 的关系

利用 GEO 数据库筛选包含 OSCC 患者癌及配对癌旁组织的数据集, 其中 GSE31056^[8] 符合条件, 该数据集包含 23 例 OSCC 患者。利用 GEO 数据库的 GEO2R 程序获取每例样本中 IL-22RA1 mRNA 表达水平并进行统计分析。

从 PubMed 网站 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) 获取包含 OSCC 患者随访数据的组织测序文献^[9], 根据文献进入 EBI ArrayExpress 数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) 获取组织测序数据 (收录号: E-TABM-302)。该数据集是头颈鳞状细胞癌的测序结果, 其中包含 27 例含有随访数据的 OSCC 组织。获取每例样本中 IL-22RA1 mRNA 表达水平及随访生存数据并进行统计分析。

1.3 免疫组化和免疫荧光染色法检测 OSCC 组织中 IL-22 和 IL-22RA1 的表达水平

免疫组化染色法检测: OSCC 组织芯片经二甲苯及梯度乙醇溶液脱蜡至水, 3% H_2O_2 室温处理 10 min 以消除内源性过氧化物酶的活性。切片经 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH6.0) 热修复后, 滴加 3% 牛血清白蛋白, 室温中反应 30 min。将切片置入湿盒中, 滴加 IL-22RA1 抗体 (稀释比例为 1:200), 4 °C 反应过夜。次日, 在生物素标记的羊抗兔 IgG 二抗 (稀释比例为 1:200) 作用后, 滴加链霉亲和素-HRP 复合物, 室温反应 30 min。滴加 DAB 工作液, 显微镜观察显色进程, 适时终止显色, 苏木精复染、中性树脂封片。光学显微镜下观察和拍照, 利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 IL-22RA1 的染色强度。

免疫荧光双染法检测: 对 15 例石蜡组织切片进行的脱蜡、抗原修复及封闭过程与免疫组化一致。随后将组织切片置于 IL-22 抗体 (稀释比例为 1:200) 中 4 °C 反应过夜。次日, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (稀释比例为 1:1 000) 反应 60 min, 洗涤后加入荧光素 CY3 标记的酪胺 (CY3-Tyramide), 室温反应 10 min, 洗涤后经微波处理去除结合至组织中的一、二抗, 加入 IL-22RA1 抗体 (1:100) 4 °C 过夜。第 3 天加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (稀释比例为 1:1 000) 反应 60 min 后加入 FITC-Tyramide 反应 10 min, 洗涤后微波去除一、二抗, DAPI 复染细胞核后, 用抗荧光淬灭封片剂封片。在荧光显微镜下观察、拍照, 利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 IL-22 (红色) 和 IL-22RA1 (绿色) 的荧光强度, 并采用积分光密度

(integral optical density, IOD)分析统计其表达水平。

1.4 细胞培养、转染及分组

WSU-HN4和CAL27细胞在含10%FBS和1%青/链霉素的DMEM培养基中,于37℃、5%CO₂的培养箱进行常规培养。

取对数生长期的WSU-HN4和CAL27细胞,接种于6孔板(1×10⁵个/孔),培养24h后细胞汇合度达50%~60%时,按照转染试剂说明书分别将阴性对照siRNA(siRNA negative control, siNC)和siRNA IL-22RA1(siIL-22RA1)转染至WSU-HN4和CAL27细胞,实验分为siNC组(转染siNC)和siIL-22RA1组(转染siIL-22RA1)。

1.5 qPCR法检测敲减IL-22RA1对OSCC细胞IL-22RA1 mRNA表达的影响

OSCC细胞转染siRNA 48 h后,用TRIzol试剂提取细胞总RNA。用逆转录试剂盒合成cDNA后,按照qPCR试剂盒说明书在ABI 7500仪器上进行qPCR检测。引物序列:IL-22RA1正向引物为5'-CCGGCTAACCCTGGAAGAC-3',反向引物为5'-TCCAAGGTGCATTTGGTAGGT-3';β-actin正向引物为5'-CACATTGGCAATGAGCGGTTC-3',反向引物为5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'。qPCR反应条件:95℃预变性30s;95℃变性5s、60℃延伸30s,共40个循环。以β-actin为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算IL-22RA1基因mRNA的相对表达水平。

1.6 克隆形成实验检测IL-22或敲减IL-22RA1对OSCC细胞克隆形成能力的影响

将转染后各组WSU-HN4和CAL27细胞接种于6孔培养板中(1×10³个/孔),IL-22处理组加入终质量浓度为100 ng/mL的IL-22,对照组加入相同体积的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS),每3d换液1次。培养12d后,弃上清,PBS洗涤后,4%多聚甲醛溶液室温固定15 min。0.5%结晶紫溶液室温染色30 min,去离子水洗涤后室温干燥,显微镜下拍照并统计克隆数量。

1.7 Transwell小室法检测IL-22或敲减IL-22RA1对OSCC细胞迁移能力的影响

使用胰酶消化转染后各组WSU-HN4和CAL27细胞,用无血清DMEM培养液调整细胞密度为5×10⁵个/mL,IL-22处理组加入终质量浓度为100 ng/mL的IL-22,对照组加入相同体积的PBS。将200 μL细胞悬液加入Transwell上室,下室中加入600 μL含10% FBS的DMEM培养基,培养箱中培养24 h。用棉签拭去上室的细胞,4%多聚甲醛固定15 min,0.5%结晶紫染色30 min,漂洗并干燥。在倒置显微镜下观察、拍照,并随机选取5个视野统计穿膜细胞数。

1.8 WB法检测IL-22对OSCC细胞IL-22RA1蛋白和

STAT1、STAT3和ERK1/2信号通路相关蛋白表达的影响

RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白进行10% SDS-PAGE,将蛋白质条带转至PDVF膜后,5%脱脂牛奶室温反应1 h,加入均以1:1 000稀释的一抗(IL-22RA1、p-STAT1、p-STAT3、p-ERK1/2等单抗),4℃反应过夜。次日,洗膜后加入以1:5 000稀释的HRP标记的羊抗兔或抗小鼠IgG二抗,室温中处理1 h,洗膜后滴加ECL发光液,利用化学发光成像仪进行曝光显影,以Image-Pro Plus 6.0软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.9 统计学处理

1.5~1.8实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism 6软件进行统计分析和绘图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,配对样本之间的比较采用配对样本 t 检验,两组间差异比较采用独立样本 t 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析。采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,并用Log-Rank法对不同组别OSCC患者的OS进行比较。采用Pearson相关分析评估指标间的相关性。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-22RA1在OSCC癌组织中呈高表达

利用GEO数据库筛选符合条件的数据集(GSE31056),该数据集包含23例OSCC患者的癌组织及配对癌旁组织,对其IL-22RA1基因的mRNA水平进行统计分析。结果显示,IL-22RA1在OSCC组织中的表达水平显著高于癌旁组织($t = 2.87, P < 0.05$;图1A)。组织芯片免疫组化染色结果(图1B、C)显示,OSCC组织中IL-22RA1蛋白表达水平显著高于癌旁组织($t = 3.34, P < 0.01$)。结果表明,IL-22RA1在OSCC患者癌组织中呈高表达。

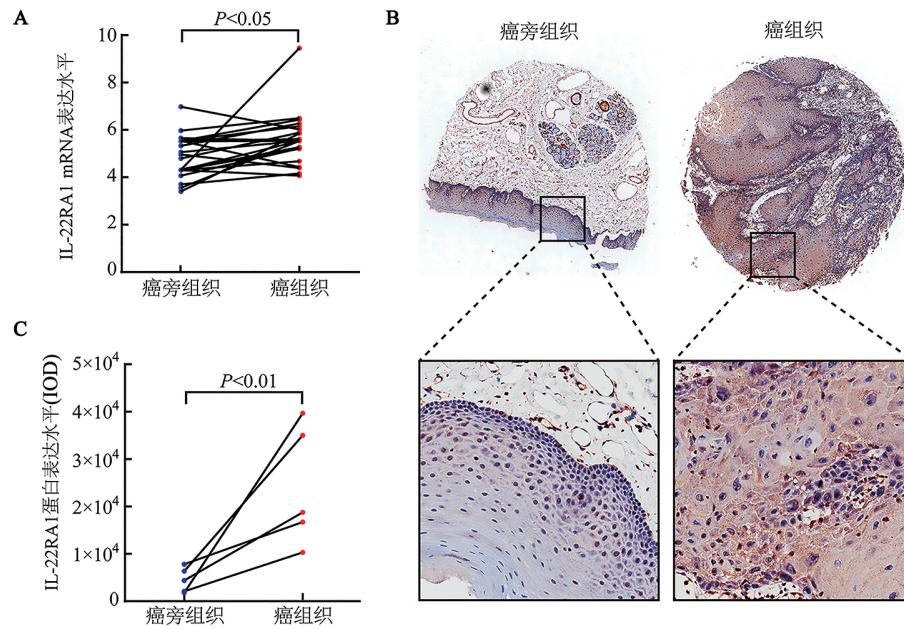
2.2 IL-22RA1表达水平与OSCC患者肿瘤大小和淋巴结转移相关联

免疫组化结果(图2)显示,肿瘤直径≥3 cm的OSCC组织中IL-22RA1蛋白表达水平显著高于肿瘤直径<3 cm的OSCC组织($t = 2.25, P < 0.05$);此外,发生淋巴结转移OSCC患者的IL-22RA1表达水平显著高于未发生淋巴结转移的患者($t = 3.69, P < 0.01$)。IL-22RA1蛋白表达水平与OSCC患者年龄、性别、肿瘤位置及病理分级无明显关联(均 $P > 0.05$,表1)。结果表明,IL-22RA1蛋白表达水平与OSCC患者肿瘤大小、淋巴结转移相关联。

2.3 IL-22RA1表达水平与OSCC患者预后相关联

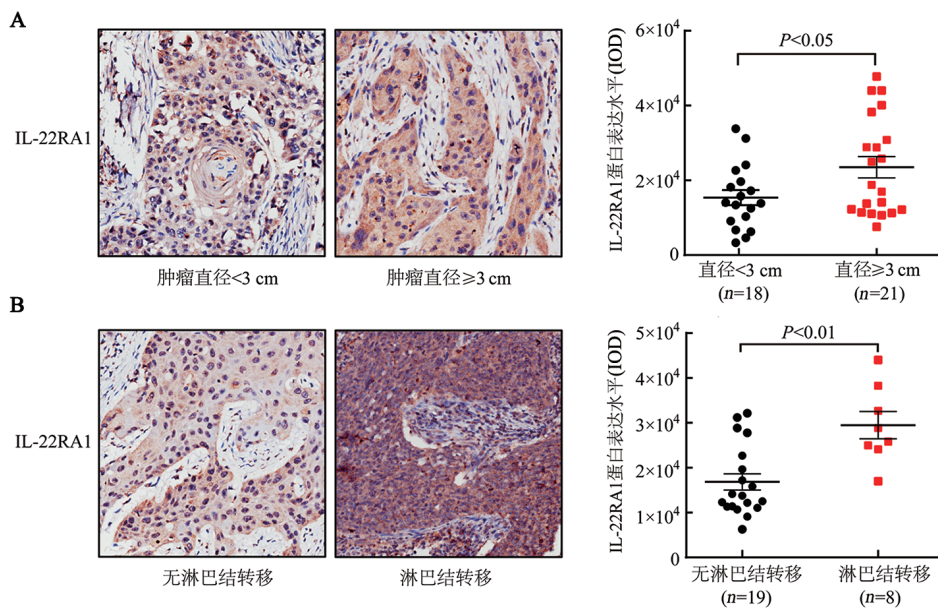
用Kaplan-Meier生存分析评估EBI ArrayExpress数据库中获得的27例包含OSCC患者生存期的组织

测序数据,结果(图3)显示,IL-22RA1低表达OSCC患者的OS率显著高于IL-22RA1高表达患者($\chi^2=4.236, P<0.05$)。



A: GEO数据库中OSCC患者癌及癌旁组织中IL-22RA1 mRNA表达水平; B: OSCC患者癌及癌旁组织中IL-22RA1蛋白表达的典型图像(免疫组化染色, 上图×40、下图×400); C: IL-22RA1蛋白表达数据分析图。

图1 OSCC患者癌及癌旁组织中IL-22RA1 mRNA和蛋白的表达水平比较



A: 肿瘤直径不同的OSCC组织中IL-22RA1的表达水平; B: 淋巴结转移状态不同患者的OSCC组织中IL-22RA1的表达水平。

图2 不同临床病理特征OSCC患者的IL-22RA1表达水平比较(免疫组化染色, ×400)

2.4 IL-22不影响OSCC细胞的IL-22RA1表达水平
免疫荧光染色结果(图4A)显示,在OSCC患者的癌组织中,IL-22主要在肿瘤间质中表达,IL-22RA1则主要在OSCC细胞中表达,但二者表达水平无显著相关性($r=0.256, P>0.05$)。WB实验结果(图4B)显示,IL-22处理组WSU-HN4和CAL27细胞的IL-22RA1表达水平与对照组相比差异无统计学意义($t=0.36、$

$0.88, 均P>0.05$)。结果表明,IL-22不影响OSCC细胞的IL-22RA1表达水平。

qPCR法检测结果(图4C)显示,与siNC组比较,siIL-22RA1组WSU-HN4和CAL27细胞IL-22RA1的表达水平显著降低($t=13.52、32.40, 均P<0.01$)。结果表明,在两种OSCC细胞中成功敲减了IL-22RA1表达,可以进行后续实验。

表1 OSCC患者IL-22RA1表达的临床意义

临床特征	n	IL-22RA1(IOD)	t/F	P
年龄/岁			1.061	0.295
<64	22	21 329±12 019		
≥64	23	17 733±10 703		
不明	1			
性别			0.3856	0.701
男性	25	19 074±11 389		
女性	21	20 381±11 475		
肿瘤位置			0.2034	0.935
唇	4	21 448±8 385		
下颌	8	21 215±9 076		
颊	13	18341±11 532		
舌	15	20 611±12 860		
牙周	6	16 956±13 824		
肿瘤直径/cm			2.253	0.030
<3	18	15 385±8 576		
≥3	21	23 512±13 068		
不明	7			
病理分期			0.1834	0.855
I-II	34	19 854±10 808		
III	12	19 150±13 167		
淋巴结转移			3.692	0.001
无	19	16 845±7 918		
有	8	29 475±8 609		
不明	19			

2.5 IL-22/IL-22RA1 通路提高 OSCC 细胞的克隆形成能力

克隆形成实验结果(图5)显示,与 siNC 组相比,WSU-HN4 和 CAL27 细胞经 IL-22 处理后的克隆形成数量均显著增多($t=5.23、8.07$,均 $P<0.01$);敲减 IL-22RA1

表达后,WSU-HN4 和 CAL27 细胞的克隆数量均显著减少($t=3.53、7.47$, $P<0.05、P<0.01$);在敲减 IL-22RA1 表达的 OSCC 细胞中,IL-22(100 ng/mL)处理组 WSU-HN4 和 CAL27 细胞的克隆数量与 siIL-22RA1 相比差异均无统计学意义($t=1.27、1.20$,均 $P>0.05$)。结果表明,敲减 IL-22RA1 表达可显著降低 OSCC 细胞的增殖能力,而同时经 IL-22 处理后,siNC 组细胞的增殖能力显著增强,而 IL-22RA1 敲减细胞则无明显改变。

2.6 IL-22/IL-22RA1 通路提高 OSCC 细胞的迁移能力

Tranwell 实验结果(图6)显示,与 siNC 组相比,WSU-HN4 和 CAL27 细胞经 IL-22 处理后的迁移数量均显著增多($t=9.51、10.45$,均 $P<0.01$);敲减 IL-22RA1 表达后,WSU-HN4 和 CAL27 细胞的迁移数量均显著减少($t=5.33、9.95$,均 $P<0.01$);在敲减 IL-22RA1 表达的 OSCC 细胞中,IL-22 处理组 WSU-HN4 和 CAL27 细胞的迁移数量与 siIL-22RA1 相比差异均无统计学意义($t=1.15、0.97$,均 $P>0.05$)。结果表明,敲减 IL-22RA1 表达可显著降低 OSCC 细胞的迁移能力,而同时经 IL-22(100 ng/mL)处理后,siNC 组细胞的迁移能力显著增强,而 IL-22RA1 敲减细胞则无明显改变。

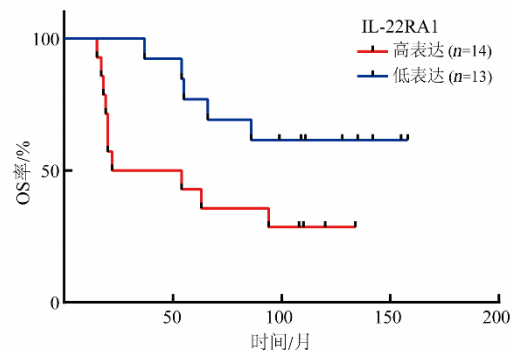
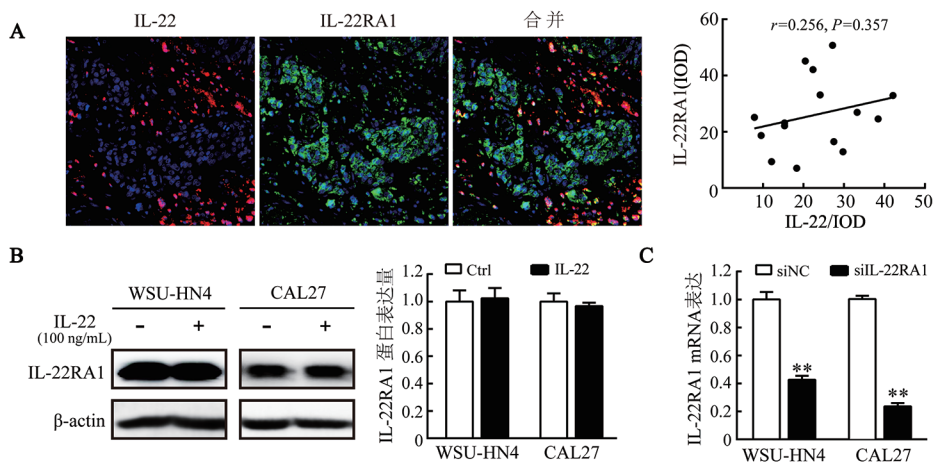
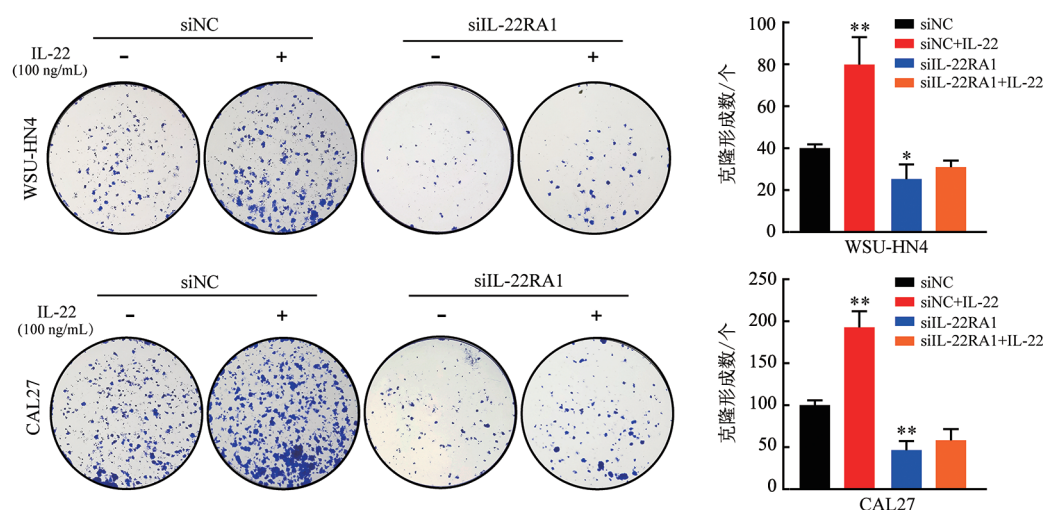


图3 不同IL-22RA1表达水平 OSCC 患者的 OS 比较



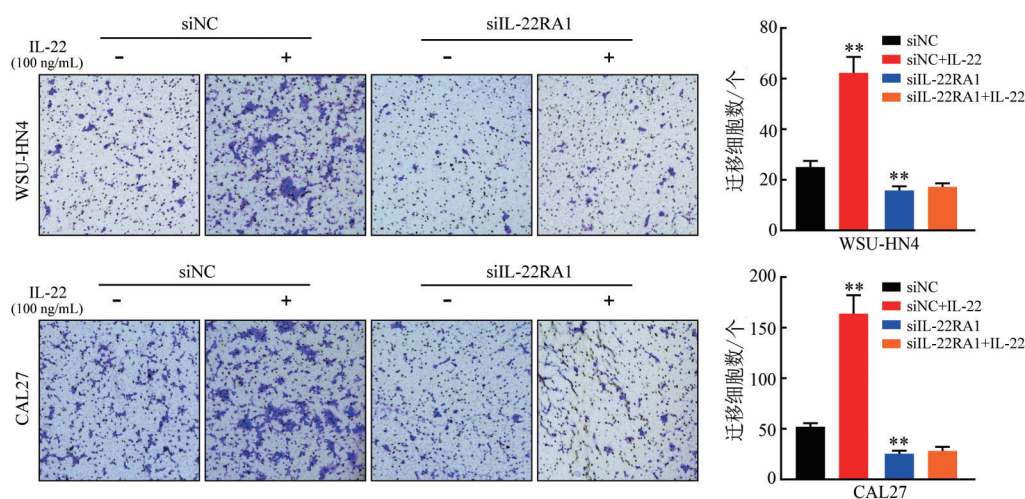
A: OSCC 组织中 IL-22 和 IL-22RA1 的表达及两者相关性(免疫荧光染色,×400);B: IL-22 处理对 OSCC 细胞 IL-22RA1 蛋白表达的影响;C: 敲减 IL-22RA1 对 OSCC 细胞 IL-22RA1 mRNA 表达的影响。与 siNC 组比较,** $P<0.01$ 。

图4 IL-22 处理不影响 OSCC 细胞 IL-22RA1 表达



与siNC组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 IL-22/IL-22RA1通路对OSCC细胞克隆形成能力的影响(结晶紫染色, $\times 10$)



与siNC组比较, ** $P < 0.01$ 。

图6 IL-22/IL-22RA1通路对OSCC细胞迁移能力的影响(结晶紫染色, $\times 100$)

2.7 IL-22/IL-22RA1通路激活OSCC细胞的STAT1、STAT3和ERK1/2信号分子

WB实验结果(图7A)显示,WSU-HN4细胞经IL-22刺激后,不同时间点STAT1、STAT3和ERK1/2的磷酸化水平均升高,其中以15 min时的差异最为显著($t=10.58$ 、 15.61 、 14.93 ,均 $P < 0.01$);与之相似,IL-22处理CAL27细胞15 min后,上述分子的磷酸化水平也均显著升高($t=9.04$ 、 8.19 、 16.65 ,均 $P < 0.01$)。在敲减IL-22RA1表达的OSCC细胞中,IL-22处理组WSU-HN4细胞($t=2.75$ 、 1.95 、 1.67 ,均 $P > 0.05$)和CAL27细胞($t=0.74$ 、 0.55 、 1.21 ,均 $P > 0.05$)的STAT1、STAT3和ERK1/2的磷酸化水平与对照组相比差异均无统计学意义(图7B)。结果表明,IL-22可通过与IL-22RA1相互作用激活OSCC细胞的STAT1、STAT3和ERK1/2信号分子通路。

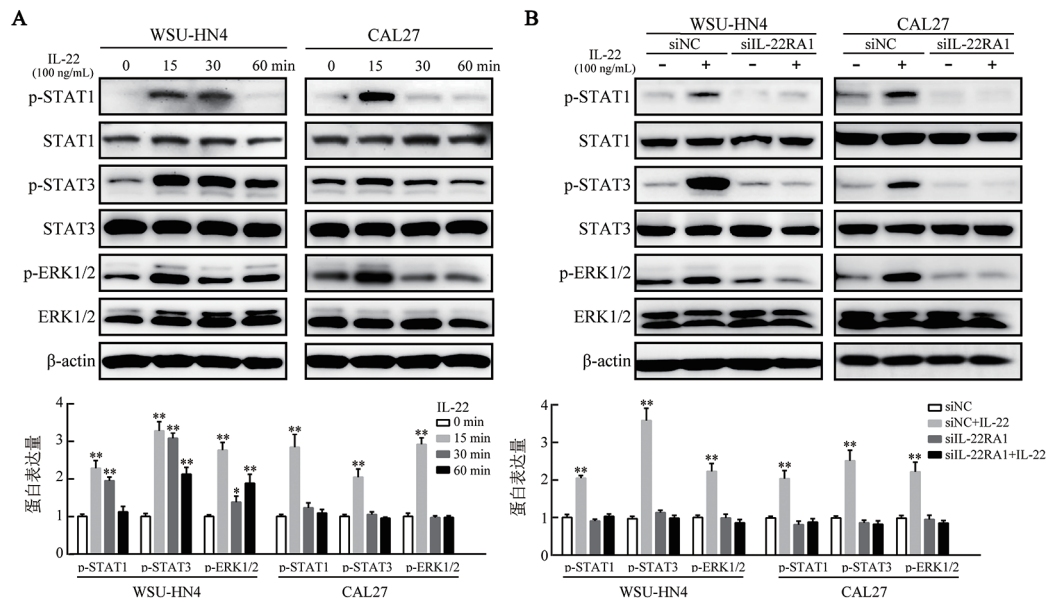
3 讨论

本研究明确了IL-22RA1在OSCC组织中表达升高,发现IL-22RA1表达水平与OSCC患者肿瘤大小、淋巴结转移及预后不良有关。细胞实验发现,IL-22可通过IL-22RA1显著增强OSCC细胞的克隆形成和迁移能力,并可激活ERK1/2-STAT1/3信号通路。本研究初步探明了IL-22/IL-22RA1轴在OSCC中的作用及可能机制。

目前,只有少量研究报道了肿瘤组织中的IL-22RA1表达水平改变及其与患者临床特征的关系。在胰腺癌组织中,IL-22RA1蛋白水平显著高于癌旁正常组织,并与患者预后呈负相关^[4]。此外,IL-22RA1 mRNA水平与侵袭性膀胱癌患者的不良预后相关^[10]。本研究通过组织芯片的免疫组化染色及数据库数据分

析发现, OSCC 组织中 IL-22RA1 表达水平显著高于癌旁组织并与患者不良预后相关联, 该结果与以上两项研究结果相似, 但这是有关 OSCC 组织中 IL-22RA1 表达的首次报道。重要的是, 本研究发现 OSCC 患者的肿瘤大小和淋巴结转移状态与 IL-22RA1 的表达水平相关联, 提示 IL-22/IL-22RA1 可能在 OSCC 肿瘤生长和转移中发挥重要作用。由于 IL-22RA1 是 IL-22 的特异受体, 本研究同时观察了 IL-22 和 IL-22RA1 在 OSCC

组织中的表达情况, 发现 IL-22 主要表达在肿瘤间质中, 而 IL-22RA1 则主要表达在 OSCC 细胞中, 提示 IL-22 主要由免疫细胞分泌, 作用于 OSCC 细胞发挥生物学作用。然而, IL-22 和 IL-22RA1 在 OSCC 组织中的表达水平并无显著相关性, IL-22 对 OSCC 细胞的 IL-22RA1 表达水平也无明显影响, 提示 IL-22 不通过调控 IL-22RA1 表达, 而是通过与 IL-22RA1 相互作用激活下游信号通路发挥促肿瘤作用。



A: IL-22 在不同时间点对 OSCC 细胞 STAT1、STAT3 和 ERK1/2 磷酸化水平的影响; B: IL-22 对 siNC 和 siIL-22RA1 组 OSCC 细胞 STAT1、STAT3 和 ERK1/2 磷酸化水平的影响。与 0 min 组或 siNC 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 7 IL-22/IL-22RA1 通路对 OSCC 细胞 STAT1、STAT3 和 ERK1/2 分子磷酸化的影响

IL-22/IL-22RA1 主要通过调控肿瘤细胞的增殖和迁移发挥生物学作用。既往研究结果显示, IL-22 可增强皮肤鳞癌细胞的增殖能力^[5], 促进胃癌细胞的迁移^[11], 以及增强肺癌细胞的增殖和迁移能力^[6]。本研究发现, IL-22 可显著增强 OSCC 细胞的克隆形成和迁移能力。值得关注的是, 单纯敲减 IL-22RA1 表达后, OSCC 细胞的增殖和迁移能力均显著降低。由于 IL-22RA1 可分别与 IL-10RB 和 IL-20RB 形成异二聚体发挥生物学作用, 笔者推测敲减 IL-22RA1 可能通过影响异二聚体的形成抑制 OSCC 细胞的增殖和迁移。此外, 在敲减 IL-22RA1 的 OSCC 细胞中, IL-22 无法发挥促肿瘤作用。结合本研究的临床数据, 即 IL-22RA1 表达水平与 OSCC 患者的肿瘤大小和淋巴结转移呈正相关, 进一步提示 IL-22/IL-22RA1 可促进 OSCC 的肿瘤生长和转移。

STAT3 是 IL-22RA1 的下游信号分子, IL-22/IL-22RA1 可通过激活皮肤鳞癌、肺癌和胰腺癌等细胞的 STAT3 信号通路发挥生物学作用^[5-6,12]。本研究发现, IL-22 也可显著增强 OSCC 细胞的 STAT3 磷酸

化水平。此外, IL-22 还可以激活 STAT1 信号分子。STAT1 和 STAT3 的激活在 OSCC 恶性进展中发挥重要作用, 可促进 OSCC 的生长、转移和耐药等^[13-15]。由于 STAT1/3 的活化依赖于 ERK1/2 信号分子^[16-17], 而 ERK1/2 激活在 OSCC 恶性进展中起关键作用^[18-20]。因此, 本研究进一步观察了 IL-22 对 ERK1/2 磷酸化水平的影响, 发现 IL-22 可明显活化 ERK1/2 信号分子。重要的是, 敲减 OSCC 细胞的 IL-22RA1 表达后, IL-22 则不能激活上述信号分子。以上结果提示, IL-22/IL-22RA1 可通过激活 ERK1/2-STAT1/3 信号通路发挥促进 OSCC 细胞克隆形成和迁移的作用。

综上所述, IL-22RA1 在 OSCC 组织中呈高表达, 与患者肿瘤大小、淋巴结转移和不良预后相关联, IL-22/IL-22RA1 可通过激活 ERK1/2-STAT1/3 信号通路促进 OSCC 细胞的增殖和迁移能力。本研究初步阐明了 IL-22/IL-22RA1 轴在 OSCC 恶性进展中的作用及可能机制, 但也存在不足之处, 后续研究将进一步探索具体的分子机制, 并利用动物模型进行验证。目前, IL-22/IL-22RA1 轴已成为肿瘤治疗的潜在靶

点^[3]。本研究为揭示OSCC发生发展的机制和开发新型抗肿瘤策略提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] WU Y, MIN J, GE C, *et al.* Interleukin 22 in liver injury, inflammation and cancer[J/OL]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(13): 2405-2413[2023-07-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7378634/>. DOI: 10.7150/ijbs.38925.
- [2] LIM C, SAVAN R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, 25(3): 257-271. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2014.04.005.
- [3] SABAT R, OUYANG W, WOLK K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(1): 21-38. DOI: 10.1038/nrd4176.
- [4] WEN Z, LIAO Q, ZHAO J G, *et al.* High expression of interleukin-22 and its receptor predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(1): 125-132. DOI: 10.1245/s10434-013-3322-x.
- [5] ABIKHAIR BURGO M, ROUDIANI N, CHEN J, *et al.* Ruxolitinib inhibits cyclosporine-induced proliferation of cutaneous squamous cell carcinoma[J/OL]. *JCI Insight*, 2018, 3(17): e120750[2023-07-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6171807/>. DOI: 10.1172/jci.insight.120750.
- [6] BI Y, CAO J Y, JIN S, *et al.* Interleukin-22 promotes lung cancer cell proliferation and migration *via* the IL-22R1/STAT3 and IL-22R1/AKT signaling pathways[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 415(1/2): 1-11. DOI: 10.1007/s11010-016-2663-8.
- [7] CHAMOLI A, GOSAVI A S, SHIRWADKAR U P, *et al.* Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: risk factors, mechanisms, and diagnostics[J/OL]. *Oral Oncol*, 2021, 121: 105451[2023-07-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34329869/>. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2021.105451.
- [8] REIS P P, WALDRON L, PEREZ-ORDONEZ B, *et al.* A gene signature in histologically normal surgical margins is predictive of oral carcinoma recurrence[J/OL]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 437[2023-07-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3198722/>. DOI: 10.1186/1471-2407-11-437.
- [9] RICKMAN D S, MILLON R, DE REYNIES A, *et al.* Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays[J]. *Oncogene*, 2008, 27(51): 6607-6622. DOI: 10.1038/onc.2008.251.
- [10] NITSCHKE K, WORST T S, VON RHADE S M, *et al.* High IL-22RA1 gene expression is associated with poor outcome in muscle invasive bladder cancer[J]. *Urol Oncol*, 2021, 39(8): 499.e1-499.e8. DOI: 10.1016/j.urolonc.2021.05.010.
- [11] JI Y H, YANG X Y, LI J S, *et al.* IL-22 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells *via* IL-22R1/AKT/MMP-9 signaling[J/OL]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7): 3694-3703[2023-07-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4128980/>.
- [12] HE W Z, WU J H, SHI J J, *et al.* IL22RA1/STAT3 signaling promotes stemness and tumorigenicity in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(12): 3293-3305. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3131.
- [13] JIANG M J, LI B. STAT3 and its targeting inhibitors in oral squamous cell carcinoma[J/OL]. *Cells*, 2022, 11(19): 3131[2023-07-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36231093/>. DOI: 10.3390/cells11193131.
- [14] CUI B M, CHEN J, LUO M, *et al.* PKD3 promotes metastasis and growth of oral squamous cell carcinoma through positive feedback regulation with PD-L1 and activation of ERK-STAT1/3-EMT signalling[J/OL]. *Int J Oral Sci*, 2021, 13: 8[2023-07-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33692335/>. DOI: 10.1038/s41368-021-00112-w.
- [15] XIAO L, LI X, CAO P L, *et al.* Interleukin-6 mediated inflammasome activation promotes oral squamous cell carcinoma progression *via* JAK2/STAT3/Sox4/NLRP3 signaling pathway[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 166[2023-07-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9069786/>. DOI: 10.1186/s13046-022-02376-4.
- [16] DUAN Y, ZHANG X Z, YING H G, *et al.* Targeting MFAP5 in cancer-associated fibroblasts sensitizes pancreatic cancer to PD-L1-based immunochemotherapy *via* remodeling the matrix [J/OL]. *Oncogene*, 2023, 42(25): 2061-2073[2023-07-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10275759/>. DOI: 10.1038/s41388-023-02711-9.
- [17] ZHANG X H, ZHAO L L, XIAO J L, *et al.* 5-Demethylnobiletin mediates cell cycle arrest and apoptosis *via* the ERK1/2/AKT/STAT3 signaling pathways in glioblastoma cells[J/OL]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1143664[2023-07-18]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1143664>. DOI: 10.3389/fonc.2023.1143664.
- [18] WANG Z C, ZHANG J, WEN Y M, *et al.* Bupivacaine inhibits the malignant biological behavior of oral squamous cell carcinoma cells by inhibiting the activation of ERK1/2 and STAT3[J/OL]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(10): 839[2023-07-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8184410/>. DOI: 10.21037/atm-21-1414.
- [19] CHEN J L, LAI C Y, YING T H, *et al.* Modulating the ERK1/2-MMP1 axis through corosolic acid inhibits metastasis of human oral squamous cell carcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8641. DOI: 10.3390/ijms22168641.
- [20] SHAN F Y, SHEN S, WANG X X, *et al.* BST2 regulated by the transcription factor STAT1 can promote metastasis, invasion and proliferation of oral squamous cell carcinoma *via* the AKT/ERK1/2 signaling pathway[J/OL]. *Int J Oncol*, 2023, 62(4): 54[2023-07-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10019759/>. DOI: 10.3892/ijo.2023.5502.

[收稿日期] 2023-07-20

[修回日期] 2023-11-12

[本文编辑] 党瑞山