

• 论 著 •

circ_0009910 对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡的影响及机制研究^{*}

陈 鑫, 葛 鹏, 齐 冰, 孙志红[△]

西安医学院第二附属医院胸外科, 陕西西安 710038

摘 要:目的 探讨环状 RNA_circ_0009910 对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡的影响及机制。方法 将 A549 细胞随机分组并进行转染, 分为 si-NC 组、si-circ_0009910 组、miR-NC 组、miR-34a-5p 组、si-circ_0009910+anti-miR-NC 组、si-circ_0009910+anti-miR-34a-5p 组。转染成功后, CCK8 法检测细胞增殖能力, 双荧光素酶报告试验验证 circ_0009910 的靶基因, 流式细胞术检测 A549 细胞凋亡, 蛋白质印迹法检测 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、跨膜受体蛋白 1(Notch1)、细胞增殖相关核抗原(Ki-67)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱天冬酶-3(Caspase-3)表达。皮下注射 si-NC 组、si-circ_0009910 组、miR-NC 组、miR-34a-5p 组、si-circ_0009910+anti-miR-NC 组、si-circ_0009910+anti-miR-34a-5p 组细胞到雄性裸鼠腹部, 并建立活体异种移植小鼠模型。检测各组肿瘤体积和肿瘤重量, 以及小鼠肿瘤组织内相关蛋白表达。**结果** 与 si-NC 组相比, si-circ_0009910 组 A549 细胞的增殖能力明显下降, 且细胞凋亡率显著升高, Ki-67、Notch1、Bcl-2 表达明显减少, Bax、Caspase-3 表达明显增多($P<0.05$)。与 miR-NC 组相比, miR-34a-5p 组 A549 细胞的成功转染野生型-circ_0009910 后, 细胞内的荧光素酶活性显著下降($P<0.05$)。与 si-NC 组相比, si-circ_0009910 组 miR-34a-5p 表达上调; 与 miR-NC 组比较, miR-34a-5p 组 A549 细胞增殖力弱, 细胞凋亡率高, Bcl-2、Notch1、Ki-67 表达下调, Bax、Caspase-3 表达上调($P<0.05$); 与 si-circ_0009910+anti-miR-NC 组相比, si-circ_0009910+anti-miR-34a-5p 组 A549 细胞的增殖能力更强, 细胞凋亡率下降, Bcl-2、Notch1、Ki-67 表达上调, Bax、Caspase-3 表达下调($P<0.05$)。与 si-NC 组比较, si-circ_0009910 组小鼠肿瘤体积和肿瘤重量明显减小, 肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达明显下调, Bax、Caspase-3 表达明显上调; 与 miR-NC 组比较, miR-34a-5p 组小鼠肿瘤体积和肿瘤重量明显减小, miR-34a-5p 组小鼠肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达明显下调, Bax、Caspase-3 表达明显上调; miR-34a-5p 组小鼠肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达明显下调, Bax、Caspase-3 表达明显上调, 肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达显著上调, Bax、Caspase-3 表达显著下调。**结论** circ_0009910 低表达能够抑制 A549 细胞增殖, 促进其凋亡, 其调控机制可能与 miR-34a-5p/Notch1 信号通路有关。

关键词: 环状 RNA_circ_0009910; 非小细胞肺癌; 增殖; 凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.13.006

中图法分类号:R734.2

文章编号:1673-4130(2025)13-1568-07

文献标志码:A

Study on the effect and mechanism of circ_0009910 on the proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer cells^{*}

CHEN Xin, GE Peng, QI Bing, SUN Zhihong[△]

Department of Thoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of circular RNA_circ_0009910 (circ_0009910) on the proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer cells. **Methods** A549 cells were randomly divided into groups and transfected as follows: si-NC group, si-circ_0009910 group, miR-NC group, miR-34a-5p group, si-circ_0009910+anti-miR-NC group, and si-circ_0009910+anti-miR-34a-5p group. After successful transfection, cell proliferation was measured using the CCK-8 assay. Dual-luciferase reporter assays were used to validate the target gene of circ_0009910. Apoptosis of A549 cells was analyzed by flow cytometry. Protein expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), transmembrane receptor protein 1 (Notch1), cell proliferation-associated nuclear antigen (Ki-67), Bcl-2-associated X protein (Bax), and cysteine aspartic acid protease-3 (Caspase-3) were detected by Western blot. Cells from each group were subcutaneously injected into the abdo-

^{*} 基金项目: 陕西省西安市创新能力强基计划-医学研究项目(21YXYJ0130)。

作者简介: 陈鑫, 男, 副主任医师, 主要从事肺癌基础与临床方向的研究。 [△] 通信作者, E-mail: 164061708@qq.com。

mens of male nude mice to establish xenograft models. Tumor volume, tumor weight, and protein expression in tumor tissues were measured. **Results** Compared with the si-NC group, the si-circ_0009910 group showed significantly reduced A549 cell proliferation, increased apoptosis, decreased expression of Ki-67, Notch1, and Bcl-2, and increased expression of Bax and Caspase-3 ($P < 0.05$). Compared with the miR-NC group, the miR-34a-5p group exhibited significantly reduced luciferase activity after transfection with wild-type circ_0009910 ($P < 0.05$). The si-circ_0009910 group showed upregulated miR-34a-5p expression compared to the si-NC group. The miR-34a-5p group demonstrated weaker proliferation, higher apoptosis, downregulated Bcl-2, Notch1, and Ki-67, and upregulated Bax and Caspase-3 compared to the miR-NC group ($P < 0.05$). Compared with the si-circ_0009910 + anti-miR-NC group, the si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p group exhibited enhanced proliferation, reduced apoptosis, upregulated Bcl-2, Notch1, and Ki-67, and downregulated Bax and Caspase-3 ($P < 0.05$). In vivo, the si-circ_0009910 and miR-34a-5p groups showed smaller tumor volumes and weights, downregulated Notch1, Ki-67, and Bcl-2, and upregulated Bax and Caspase-3 in tumor tissues compared to their respective control groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Low expression of circ_0009910 inhibits A549 cell proliferation and promotes apoptosis, potentially via the miR-34a-5p/Notch1 signaling pathway.

Key words: circular RNA_0009910; non-small cell lung cancer; proliferation; apoptosis

肺癌是最常见的癌症之一,也是全球癌症患者死亡的主要原因,而非小细胞肺癌是肺癌最为常见的类型^[1]。根据临床数据统计显示,癌症患者的 5 年生存率仍仅约 15%^[2]。肿瘤的发生和进展是一个多因素、多机制参与的复杂病理过程,因此,更好地阐明非小细胞肺癌发生发展的机制对于临床治疗显得至关重要^[3]。环状 RNA (circRNA) 是新近发现的内源性非编码 RNA,环状 RNA 由前体 mRNA 的回剪接产生,形成共价闭环结构,由于环状结构的 circRNA 具有较强的稳定性,可以避免被 RNA 酶降解^[4]。circRNA 在调节病理过程和多种细胞活动中发挥关键作用^[4]。有研究证明, circRNA 在多种肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[5]。circRNA 在肿瘤组织和细胞系中异常表达,并可作为多种肿瘤包括白血病、卵巢癌、胃癌等的新治疗靶点^[7]。此外,已有报道,过表达 circ_0009910 能够促进肿瘤细胞增殖、转移,抑制细胞凋亡^[8]。然而 circ_0009910 在非小细胞肺癌发生、发展过程中的具体作用机制尚不明确。近年来,微小核糖核酸(miR)-34a 通过调控与细胞增殖、细胞周期进程、细胞凋亡等多个生物学过程相关的靶蛋白,在多种恶性肿瘤中发挥潜在的肿瘤抑制作用,引起了广泛关注^[9-10]。笔者在前期工作中对 Circular RNA Interactome 数据库进行基因筛选,结果显示 circ_0009910 与肿瘤生长发育有关。因此,本研究选取 miR-34a-5p 作为研究靶点,并通过实验进一步研究 circ_0009910 调控 miR-34a-5p 在非小细胞肺癌发生、发展过程中发挥作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 实验时间为 2022 年 10 月至 2024 年 6 月,人非小细胞肺癌细胞株 A549 购自 American Type Culture Collection。6 周龄雄性裸鼠由赛业(苏州)生物科技有限公司提供[许可证号:SCXK(Wan) 2022-232]。实验地点包括西安医学院相关实验室、西

安医学院第二附属医院相关实验室,且所有实验均按照美国国立卫生研究院《实验动物的护理和使用指南》进行,并经西安医学院机构动物护理和使用委员会批准[许可证号:SYXK(Shan)2022-007]。

1.2 仪器与试剂 多功能酶标仪购自美国 Thermo Scientific 公司;PCR 仪购自美国 BD Bio-sciences 公司;麻醉机购自上海贺默仪器科技有限公司;细胞培养箱购自江苏和创生物科技有限公司;SC-2546 低温高速离心机购自美国 Thermo Scientific 公司;流式细胞仪购自郑州华沃生物科技有限公司。胎牛血清(FBS)和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;双抗、Lipo-fectamine™脂质体 3000 转染试剂、冻存液、胰蛋白酶购自北京索莱宝公司;对照 miR-NC、anti-miR-NC、miR-34a-5p mimic/inhibitor 购自宝日医生生物技术北京有限公司;对照 si-NC、pcDNA-circ_0009910、circ_0009910 特定 siRNA si-circ_0009910 购自 Roche 公司,反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;CCK8 检测试剂盒购自上海 Bio Basic 公司;凋亡双染检测试剂盒购自 Elabscience 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自南京建成生物技术有限公司;B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、Notch 同源物 1(Notch1)、细胞增殖相关核抗原(Ki-67)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱天冬酶-3 (Caspase-3)等抗体购自美国 Abcam 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养、分组和转染 将 A549 细胞在含 0.5% 的双抗和 10% 胎牛血清的高糖培养基中生长,细胞接种于培养瓶后放置于保存细胞培养箱中进行培养。待细胞处于对数生长期时,将细胞使用胰蛋白酶消化下来并接种于六孔板中,通过细胞计数仪计数,将每孔的细胞数量控制在 50 000 个,镜下观察到每孔细胞生长至汇度 70%~80%时,进行转染。转染过程按照 Lipo-fectamine 3000 试剂盒的说明书步骤进行。转染时随机选择孔进行分组,消除边缘效应造

成的干扰。将 A549 细胞随机分组并进行转染,分为 si-NC 组、si-circ_0009910 组、miR-NC 组、miR-34a-5p 组、si-circ_0009910 + anti-miR-NC 组、si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p 组。si-NC 组 A549 细胞转染 si-NC, miR-NC 组 A549 细胞转染 miR-NC, miR-34a-5p 组 A549 细胞转染 miR-34a-5p mimic, si-circ_0009910 组 A549 细胞转染 si-circ_0009910, si-circ_0009910 + anti-miR-NC 组 A549 细胞共转染 si-circ_0009910 和 anti-miR-NC, si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p 组细胞进行共转染 miR-34a-5p inhibitor 和 si-circ_0009910。转染后继续培养约 48 h。

1.3.2 CCK8 检测细胞增殖能力 采用 CCK8 实验检测 A549 细胞增殖能力。将处于对数生长期的 A549 细胞使用胰蛋白酶消化下来并重新接种在 96 孔板上,每孔将细胞数量控制在 5 000 个左右,并每组设置 6 个复孔,待细胞过夜后完全贴壁再进行转染处理。造模完成后的 24 h 内,进行 CCK8 检测。每孔加入 10 μ L 的 CCK8 染液,补齐 90 μ L 的不含 FBS 培养基,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育,2 h 后每间隔 30 min 使用多功能酶标仪检测吸光度值,酶标仪检测时波长设置再 450 nm,待数值稳定后即最后数值,并取复孔平均值。

1.3.3 双荧光素酶报告试验 本研究借助 Circular RNA Interactome 数据库进行基因筛选,筛选的结果显示 miR-34a-5p 是 circ_0009910 的潜在靶基因之一。构建野生型 (WT)-circ_0009910 和突变型 (MUT)-circ_0009910 报告载体,包括 miR-34a-5p mimic、miR-NC,并转染 A549 细胞。转染成功后,按照双荧光素酶的说明书步骤检测 A549 细胞内荧光素酶活性。

1.3.4 流式细胞术检测 A549 细胞凋亡 造模结束后,将各组细胞使用胰蛋白酶消化下来,使用超低温高速离心 600 $\times$ g 离心 15 min,弃去培养基,使用含 10 μ L 异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V (Annexin V-FITC)染液重悬细胞,染色 10 min 后,离心,弃去培养液,使用含 5 μ L 的碘化丙啶 (PI)染液进行染色,染色 5 min 后,离心,弃去培养液,使用 PBS 缓冲液重悬细胞。最后使用流式细胞仪计算细胞凋亡率。

1.3.5 蛋白质印迹法检测相关蛋白表达 将冻存液保存的蛋白进行复苏,并使用各组待测蛋白浓度。根据 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白总浓度确定上样量。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳将各组总蛋白进行分离,电泳完成后使用 200 mA 恒流将分离后的蛋白从凝胶转移至聚偏氟乙烯膜上。转膜完成后将膜在封闭液中封闭 60 min。封闭完成后将膜与一抗 (Notch1、Ki-67、Bax、Bcl-2、Caspase-3) 在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,完成后使用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,结束后将膜与稀释好的二抗孵育 60 min。最后显影仪检测,并使用 image j 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.3.6 活体异种移植小鼠模型构建和实验分组 收集对数生长期的 A549 细胞,转染成功后,用浓度为 1 $\times$ 10⁷/mL 的 PBS 悬浮。小鼠皮下注射 si-NC 组、si-circ_0009910 组、miR-NC 组、miR-34a-5p 组、si-circ_0009910 + anti-miR-NC 组、si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p 组细胞到雄性裸鼠腹部。即小鼠对应的分组为 si-NC 组、si-circ_0009910 组、miR-NC 组、miR-34a-5p 组、si-circ_0009910 + anti-miR-NC 组、si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p 组。通过测量肿瘤体积监测肿瘤生长情况。实验结束时,采用颈椎脱位法对小鼠实施安乐死,解剖肿瘤组织进行后续实验。

1.3.7 小鼠肿瘤体积和肿瘤重量检测 将 si-NC 组、si-circ_0009910 组、miR-NC 组、miR-34a-5p 组、si-circ_0009910 + anti-miR-NC 组、si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p 组细胞皮下注射到裸鼠腹部,注射 21 d 后小鼠被处死,取出肿瘤进行称重并测量长度和宽度。肿瘤体积计算公式:体积 = 长度 $\times$ (宽度/2)²。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 15.0 软件进行数据处理,计量资料经 Shapiro-Wilk 正态性检验,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组细胞增殖能力比较 与 si-NC 组 (0.83 $\pm$ 0.03) 相比, si-circ_0009910 组 A549 细胞增殖能力 (0.51 $\pm$ 0.02) 更弱;与 miR-NC 组 (0.79 $\pm$ 0.04) 相比, miR-34a-5p 组 A549 细胞增殖能力 (0.55 $\pm$ 0.02) 更弱;与 si-circ_0009910 + anti-miR-NC 组 (0.47 $\pm$ 0.03) 相比, si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p 组 A549 细胞增殖能力 (0.76 $\pm$ 0.04) 更强,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

2.2 各组双荧光素酶报告试验结果比较 与 miR-NC 组相比, miR-34a-5p 组 A549 细胞成功转染 WT-circ_0009910 后,细胞内的荧光素酶活性显著下降,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);然而, miR-NC 组和 miR-34a-5p 组成功转染 MUT-circ_0009910 后,细胞内的荧光素酶活性无明显变化,差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。见表 1。

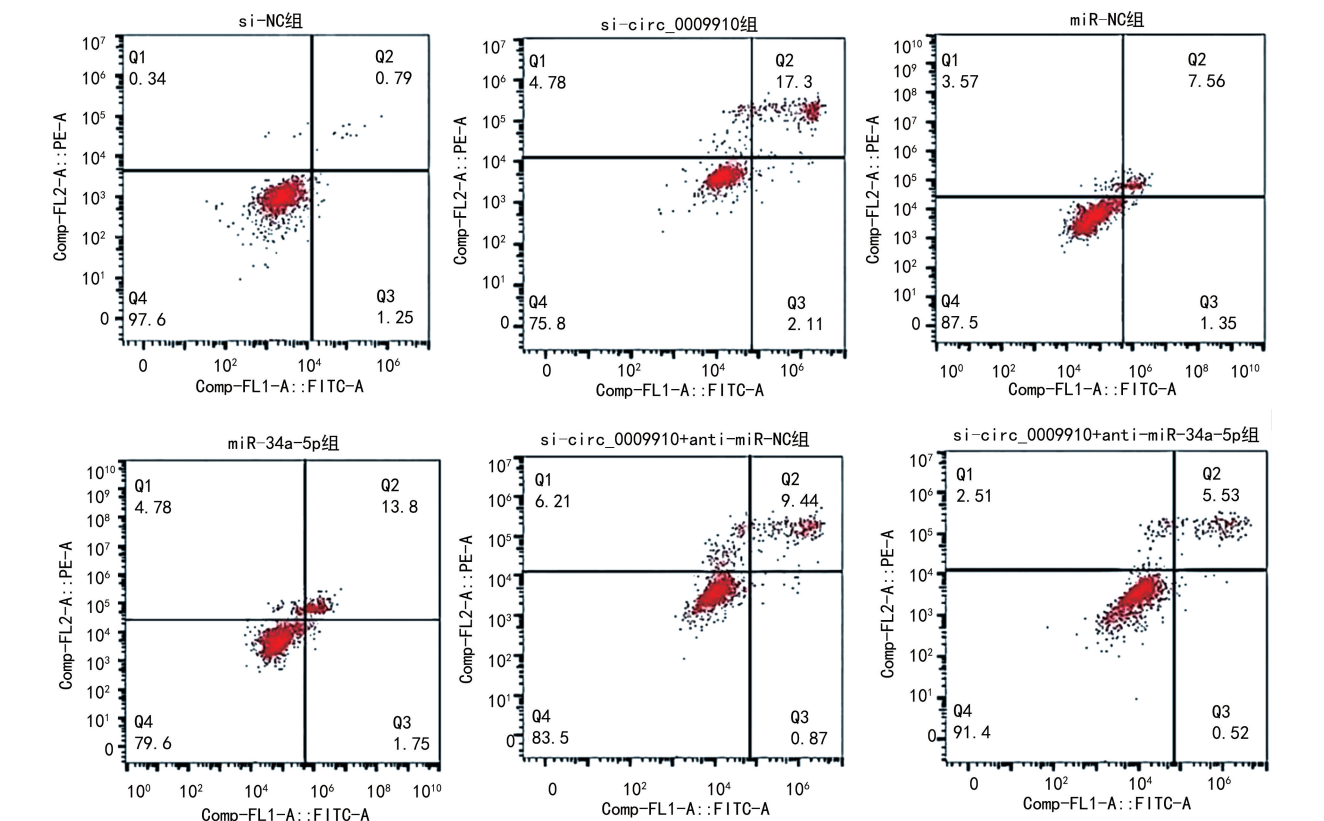
表 1 各组双荧光素酶报告试验结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	转染 WT-circ_0009910	转染 MUT-circ_0009910
miR-NC 组	1.05 $\pm$ 0.05	1.01 $\pm$ 0.06
miR-34a-5p 组	0.57 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.03
<i>t</i>	18.362	0.730
<i>P</i>	< 0.05	0.482

2.3 各组细胞凋亡情况比较 与 si-NC 组 [(3.20 $\pm$ 0.55)%] 相比, si-circ_0009910 组 A549 细胞凋亡率

$[(22.35 \pm 1.03)\%]$ 显著升高;与 miR-NC 组 $[(6.65 \pm 0.25)\%]$ 相比,miR-34a-5p 组 A549 细胞凋亡率 $[(12.21 \pm 1.94)\%]$ 显著升高;与 si-circ_0009910+anti-miR-NC 组 $[(9.92 \pm 1.34)\%]$ 相比, si-circ_

0009910 + anti-miR-34a-5p 组 A549 细胞凋亡率 $[(5.56 \pm 0.32)\%]$ 显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



注:Comp-FL1-A::FITC-A 表示对 FITC 标记的荧光信号进行的补偿校正,FL1 通道的 A 信号对应 FITC 的荧光强度;Comp-FL2-A::PE-A 表示在流式细胞术中中对藻红蛋白(PE)标记的荧光信号进行的补偿校正,FL2 通道的 A 信号对应于 PE 的荧光强度。

图 1 各组细胞流式细胞术检测结果

2.4 各组细胞内相关蛋白表达情况比较 与 si-NC 组比较,si-circ_0009910 组 A549 细胞 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达明显下调,Bax、Caspase-3 表达明显上调;与 miR-NC 组比较,miR-34a-5p 组 A549 细胞 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达明显下调,Bax、Caspase-3

表达明显上调;与 si-circ_0009910 + anti-miR-NC 组相比,si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p 组 A549 细胞 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达显著上调,Bax、Caspase-3 表达显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

表 2 各组细胞 Notch1、Ki-67、Bcl-2、Bax、Caspase-3 相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)					
组别	Notch1	Ki-67	Bcl-2	Bax	Caspase-3
si-NC 组	0.65±0.02	0.53±0.02	0.79±0.03	0.20±0.02	0.15±0.01
si-circ_0009910 组	0.44±0.05 ^a	0.25±0.03 ^a	0.34±0.02 ^a	0.63±0.04 ^a	0.37±0.02 ^a
miR-NC 组	0.70±0.07	0.57±0.04	0.76±0.06	0.25±0.03	0.27±0.02
miR-34a-5p 组	0.38±0.04 ^b	0.24±0.03 ^b	0.47±0.04 ^b	0.60±0.06 ^b	0.61±0.03 ^b
si-circ_0009910+anti-miR-NC 组	0.27±0.03	0.28±0.03	0.36±0.02	0.58±0.04	0.62±0.05
si-circ_0009910+anti-miR-34a-5p 组	0.62±0.05 ^c	0.66±0.05 ^c	0.68±0.03 ^c	0.19±0.02 ^c	0.37±0.03 ^c
F	8.008	12.057	14.651	13.598	15.127
P	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001

注:与 si-NC 组比较,^a $P < 0.05$;与 miR-NC 组比较,^b $P < 0.05$;与 si-circ_0009910+anti-miR-NC 组比较,^c $P < 0.05$ 。

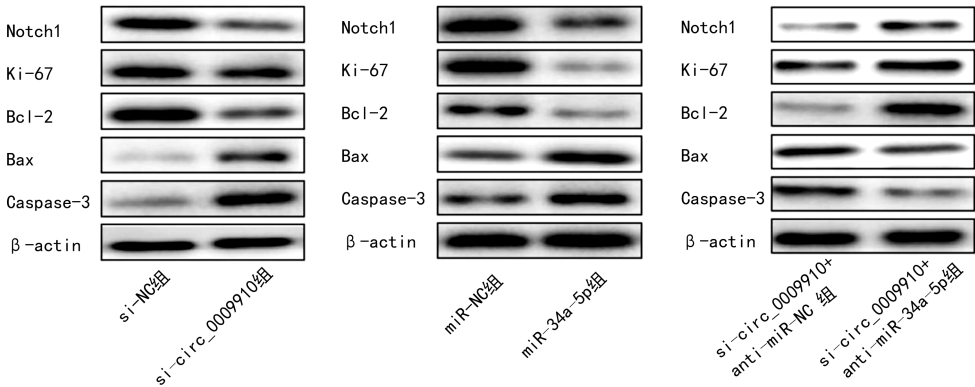


图 2 各组细胞相关蛋白条带图

2.5 各组小鼠肿瘤体积和肿瘤重量比较 与 si-NC 组比较, si-circ_0009910 组小鼠肿瘤体积和肿瘤重量明显减小, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 miR-NC 组比较, miR-34a-5p 组小鼠肿瘤体积和肿瘤重量明显减小, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 si-circ_0009910+anti-miR-NC 组相比, si-circ_0009910+anti-miR-34a-5p 组小鼠肿瘤体积和肿瘤重量明显增大, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

2.6 各组小鼠肿瘤组织内相关蛋白表达情况比较 与 si-NC 组比较, si-circ_0009910 组小鼠肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达明显下调, Bax、Caspase-3 表达明显上调; 与 miR-NC 组比较, miR-34a-5p 组小鼠肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达明显下调, Bax、Caspase-3 表达明显上调; 与 si-circ_0009910+anti-miR-NC 组相比, si-circ_0009910+anti-miR-34a-

5p 组小鼠肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达显著上调, Bax、Caspase-3 表达显著下调, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3、表 4。

表 3 各组小鼠肿瘤体积、肿瘤重量比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤重量(g)
si-NC 组	701.36±52.36	0.563±0.05
si-circ_0009910 组	321.05±24.34 ^a	0.247±0.02 ^a
miR-NC 组	683.34±48.21	0.484±0.05
miR-34a-5p 组	382.65±28.65 ^b	0.216±0.02 ^b
si-circ_0009910+anti-miR-NC 组	653.74±23.96	0.198±0.01
si-circ_0009910+anti-miR-34a-5p 组	350.20±28.39 ^c	0.427±0.05 ^c
<i>F</i>	53.519	12.264
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注: 与 si-NC 组比较, ^a $P<0.05$; 与 miR-NC 组比较, ^b $P<0.05$; 与 si-circ_0009910+anti-miR-NC 组比较, ^c $P<0.05$ 。

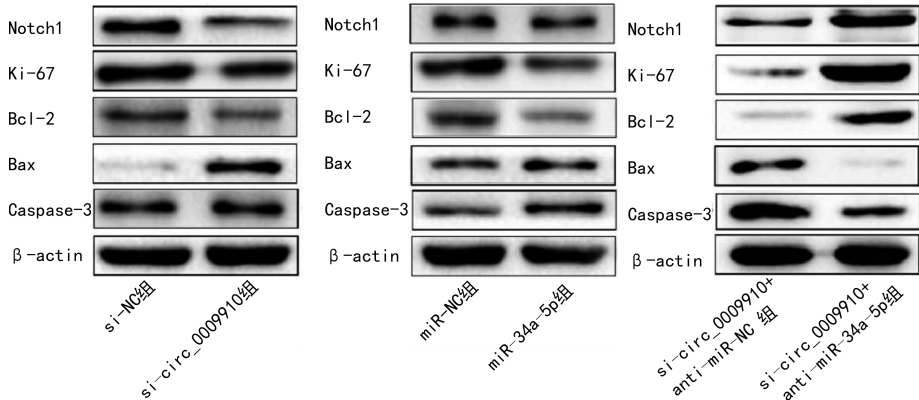


图 3 各组小鼠肿瘤组织相关蛋白条带图

表 4 各组小鼠肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2、Bax、Caspase-3 相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Notch1	Ki-67	Bcl-2	Bax	Caspase-3
si-NC 组	1.83±0.14	1.20±0.10	1.44±0.13	0.33±0.03	0.22±0.02
si-circ_0009910 组	0.35±0.03 ^a	0.36±0.03 ^a	0.42±0.04 ^a	1.09±0.09 ^a	0.67±0.06 ^a
miR-NC 组	1.52±0.12	1.37±0.11	1.36±0.12	0.24±0.02	0.29±0.03
miR-34a-5p 组	0.39±0.04 ^b	0.18±0.01 ^b	0.45±0.06 ^b	0.65±0.07 ^b	0.74±0.06 ^b
si-circ_0009910+anti-miR-NC 组	0.14±0.02	0.20±0.03	0.31±0.02	1.84±0.13	1.65±0.11
si-circ_0009910+anti-miR-34a-5p 组	0.48±0.06 ^c	0.57±0.07 ^c	0.97±0.10 ^c	0.42±0.04 ^c	0.55±0.05 ^c
<i>F</i>	16.387	19.427	21.028	18.369	15.508
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 si-NC 组比较, ^a $P<0.05$; 与 miR-NC 组比较, ^b $P<0.05$; 与 si-circ_0009910+anti-miR-NC 组比较, ^c $P<0.05$ 。

3 讨 论

非小细胞肺癌是最常见的癌症之一,也是大多数国家癌症死亡的主要原因。尽管近年来非小细胞肺癌的临床治疗取得了较大的进展,但患者的总治愈率和生存率仍然很低^[11]。探索 and 了解肺癌发生、发展的分子机制对改善肺癌患者的预后十分必要。目前手术、放疗、化疗、免疫治疗或分子靶向治疗均可用于治疗非小细胞肺癌^[12-14]。根据不同的分期,非小细胞肺癌患者可选择不同的治疗方案。治疗必须根据具体的医疗条件和其他变量为每个患者定制。免疫治疗与靶向治疗的结合为非小细胞肺癌患者的治疗带来了创新。免疫治疗无论是单独应用还是联合化疗,均已成为标准的一线治疗。由于目前治疗手段均存在高复发率和不良反应的问题,因此寻找新的靶向治疗手段是研究的关键。

circRNA 是一类具有共价闭环结构的内源性非编码 RNA^[15]。一项研究阐明,由于缺乏 5' 和 3' 多聚腺苷酸尾, circRNA 比线性 mRNA 更稳定^[16]。近年来的相关研究显示, circRNA 可参与肿瘤的许多病理生理过程,包括细胞增殖、迁移、侵袭、上皮-间充质转化和凋亡^[17]。有研究报道,上调 circ cRAPGEF515、circ PLEKHM310 或敲低 circ_000527616、circ UBAP2 可显著抑制癌细胞的生长和转移^[18]。此外, circRNA 靶向 miRNA 通过介导下游基因调控人类癌细胞生物学行为的作用已有报道^[19]。ZHOU 等^[20]发现 circRNA PVT1 通过下调 miR-203 对 HOXD3 表达的抑制作用促进人肝细胞癌的进展。研究表明, miR-34a-5p 是一种对癌细胞的增殖、迁移等生物学行为有明显抑制作用的基因^[21]。临床上已有相关研究将 miR-34a-5p 作为非小细胞肺癌患者的诊断标志物^[22]。有研究报道,上调 miR-34a-5p 的表达可抑制喉癌细胞的增殖并诱导其凋亡发生^[23]。有研究发现,在人宫颈癌中 miR-34a-5p 高表达通过沉默 Bcl-2 引起细胞增殖、迁移和侵袭能力的降低和细胞凋亡活性的增加^[24]。在体外实验中, miR-34a-5p 过表达抑制了结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导了结直肠癌细胞的凋亡^[25]。双荧光素酶报告试验和转染实验也发现了 miR-34a-5p 和 circ_0009910 存在相互作用的位点。因此, circ_0009910 通过靶向调控 miR-34a-5p 进而影响非小细胞肺癌 A549 细胞的生物学行为这一结论有待实验证实。尽管有不少研究报道了 circRNAs 和 miR-34a-5p 对癌细胞恶性生物学的抑制作用,然而其具体作用机制仍缺乏系统性分析^[26]。

为了深入探究 circ_0009910 在非小细胞肺癌细胞生物学行为中的影响和具体作用机制,首先通过转染 siRNA 沉默了 A549 细胞中 circ_0009910 的表达。

后续的研究发现 circ_0009910 的表达被干扰后, A549 细胞的增殖能力明显减弱,细胞增殖相关蛋白 Ki-67 表达显著下调,流式细胞术显示,细胞的凋亡率显著上升,蛋白质印迹法结果显示,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达明显下调,凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 表达明显上调。为了进一步探究 circ_0009910 的具体作用机制,继续借助 siRNA 沉默了 miR-34a-5p 表达,后续实验结果发现 miR-34a-5p 被沉默后, circ_0009910 抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用均被逆转。通过以上的实验结果,可分析得出 circ_0009910 能够通过靶向负调控 miR-34a-5p 进而抑制肺癌细胞 A549 的生物学行为。同时 miR-34a-5p 的下游 Notch1 蛋白与多种肿瘤的增殖、侵袭和迁移相关。蛋白质印迹法结果显示, miR-34a-5p 过表达时 A549 细胞内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达明显下调, Bax、Caspase-3 表达明显上调。同时在体内实验中,皮下注射 si-NC 组、si-circ_0009910 组、miR-NC 组、miR-34a-5p 组、si-circ_0009910 + anti-miR-NC 组、si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p 组细胞到雄性裸鼠腹部,建立了活体异种移植小鼠模型,并测量了小鼠肿瘤体积和肿瘤重量,结果显示,与 si-NC 组比较, si-circ_0009910 组小鼠肿瘤体积和肿瘤重量明显减小,与 miR-NC 组比较, miR-34a-5p 组小鼠肿瘤体积和肿瘤重量明显减小,与 si-circ_0009910 + anti-miR-NC 组相比, si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p 组小鼠肿瘤体积和肿瘤重量明显增大,同时本研究检测了小鼠肿瘤组织内相关通路蛋白的表达,蛋白质印迹法实验结果显示,与 si-NC 组比较, si-circ_0009910 组小鼠肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达明显下调, Bax、Caspase-3 表达明显上调,与 miR-NC 组比较, miR-34a-5p 组小鼠肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达明显下调, Bax、Caspase-3 表达明显上调,与 si-circ_0009910 + anti-miR-NC 组相比, si-circ_0009910 + anti-miR-34a-5p 组小鼠肿瘤组织内 Notch1、Ki-67、Bcl-2 表达显著上调, Bax、Caspase-3 表达显著下调,体内实验结果进一步验证了本研究的结论。

综上所述,当 circ_0009910 表达上调时,可抑制非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖,并促进 A549 细胞的凋亡,其影响 A549 细胞的生物学行为可能与调控 miR-198/Notch1 信号通路有关。这一发现,提示 circ_0009910 可能是临床治疗非小细胞肺癌的潜在靶点,为临床治疗非小细胞肺癌提供了新的理论依据。然而,本实验仍局限于基础实验研究,缺乏临床实验结果的支持,因此,本课题组将在今后的研究中,补充临床相关实验以验证本研究的可行性。

参考文献

[1] SOLTA A, ERNHOFER B, BOETTIGER K, et al. Small

cells-big issues;biological implications and preclinical advancements in small cell lung cancer[J]. Mol Cancer, 2024,23(1):41.

[2] WANG Y,WANG Y,WU C,et al. CircEPB41L2 blocks the progression and metastasis in non-small cell lung cancer by promoting TRIP12-triggered PTBP1 ubiquitylation[J]. Cell Death Discov,2024,10(1):72.

[3] 李亚男,李伟,李瑞萍,等. hsa_circ_0072309 对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响及机制研究[J]. 临床肺科杂志,2024,29(12):1881-1887.

[4] NIU M,WANG C,CHEN Y,et al. CircRNA identification and feature interpretability analysis[J]. BMC Biol, 2024,22(1):44.

[5] 王文哲,龙辉,张振,等. 环状 RNA 在胰腺癌中的发病机制和作为肿瘤标志物的潜力[J]. 现代消化及介入诊疗, 2024,29(6):749-754.

[6] SALEH R,AL-HAWARY S,JASIM S,et al. A therapeutic insight into the correlation between circRNAs and signaling pathways involved in cancer pathogenesis[J]. Med Oncol,2024,41(3):69.

[7] JIA S,YU L,WANG L,et al. The functional significance of circRNA/miRNA/mRNA interactions as a regulatory network in lung cancer biology[J]. Int J Biochem Cell Biol,2024,169(1):106548.

[8] LIU J,LI J,SU Y,et al. Circ_0009910 serves as miR-361-3p sponge to promote the proliferation, metastasis, and glycolysis of gastric cancer via regulating SNRPA[J]. Biochem Genet,2022,60(5):1809-1824.

[9] LI W,WANG Y,LIU X,et al. Developing folate-conjugated miR-34a therapeutic for prostate cancer: challenges and promises[J]. Int J Mol Sci,2024,25(4):2123.

[10] LI J,ZHONG X,ZHAO Y,et al. Acacetin inhibited non-small-cell lung cancer (NSCLC) cell growth via upregulating miR-34a in vitro and in vivo[J]. Sci Rep,2024,14(1):2348.

[11] 王梦娇,高超,王涛,等. CDA C435T 基因多态性显著延长吉西他滨治疗晚期非小细胞肺癌远期疗效[J]. 中国临床药理学与治疗学,2024,29(12):1337-1343.

[12] ABU R F,SINGHI E,et al. Lung cancer treatment advances in 2022[J]. Cancer Invest,2023,41(1):12-24.

[13] 史健,王亚静,侯冉,等. 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂联合化疗一线治疗表皮生长因子受体突变晚期非小细胞肺癌疗效及安全性的 Meta 分析[J]. 中国全科医学, 2025,28(11):1383-1394.

[14] 王文雯,李全,李哲,等. 祛毒扶正汤联合紫杉醇化疗方案治疗Ⅳ期非小细胞肺癌的疗效[J]. 辽宁中医杂志,2024, 51(11):107-111.

[15] CHEN L,WANG C,SUN H,et al. The bioinformatics toolbox for circRNA discovery and analysis[J]. Brief Bioinform,2021,22(2):1706-1728.

[16] CHEN Y,LIAN Z,ZHANG G,et al. CircRNA ITCH inhibits epithelial-mesenchymal transformation and promotes apoptosis in papillary thyroid carcinoma via miR-106a-5p/JAZF1 axis[J]. Biochem Genet, 2024, 62(6): 4755-4769.

[17] 陈静颖,黄甫达. 环状 RNA 在结直肠癌上皮-间充质转化中的研究进展[J]. 癌症进展,2025,23(4):382-385.

[18] YUAN H,CHEN C,LI H,et al. Role of a novel circRNA-CGNL1 in regulating pancreatic cancer progression via NUDT4-HDAC4-RUNX2-GAMT-mediated apoptosis[J]. Mol Cancer,2024,23(1):27.

[19] WANG T,WANG J,REN W,et al. CircRNA-0008717 promotes cell proliferation, migration, and invasion by regulating miR-203/Slug in esophageal cancer cells[J]. Ann Transl Med,2020,8(16):999.

[20] ZHOU X,NATINO D,QIN Z,et al. Identification and functional characterization of circRNA-0008717 as an oncogene in osteosarcoma through sponging miR-203[J]. Oncotarget,2017,9(32):22288-22300.

[21] ODA T,TSUTSUMI K,OBATA T,et al. MicroRNA-34a-5p:a pivotal therapeutic target in gallbladder cancer [J]. Mol Ther Oncol,2024,32(1):200765.

[22] ZHANG S,GUO G. Circ_FURIN promotes trophoblast cell proliferation,migration and invasion in preeclampsia by regulating miR-34a-5p and TFAP2A [J]. Hypertens Res,2022,45(8):1334-1344.

[23] HUANG X,YAN P,DING W,et al. α -Pinene inhibits the growth of cervical cancer cells through its proapoptotic activity by regulating the miR-34a-5p/Bcl-2 signaling axis [J]. Drug Dev Res,2022,83(8):1766-1776.

[24] GAO Y,YANG M,WEI L,et al. MiR-34a-5p inhibits cell proliferation, migration and invasion through targeting JAG1/Notch1 pathway in HPV-infected human epidermal keratinocytes[J]. Pathol Oncol Res, 2020, 26(3): 1851-1859.

[25] LIU C,ROKAVEC M,HUANG Z,et al. Salicylate induces AMPK and inhibits c-MYC to activate a NRF2/ARE/miR-34a/b/c cascade resulting in suppression of colorectal cancer metastasis[J]. Cell Death Dis,2023,14(10):707.

[26] YONG Z,YUANYUAN M,CHUNHUI H. 2-methoxyestradiol restrains non-small cell lung cancer tumorigenesis through regulating circ0010235/miR-34a-5p/NFAT5 axis[J]. Thoracic cancer, 2023, 14(22): 2105-2115.

(收稿日期:2024-10-11 修回日期:2025-03-20)