

研究论文

Circ_0001666通过靶向miR-330-5p/HMGA2轴促进非小细胞肺癌细胞的增殖并抑制凋亡

项保利*, 苏菁, 刘洋

河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症医学科, 张家口 075000

摘要: 许多研究表明环状RNA (circular RNAs, circRNAs)在肿瘤的整体生物过程中发挥着关键的调控作用。本研究旨在探讨circ_0001666在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞中的生物学功能及其分子机制, 以期为NSCLC的早期诊断和治疗提供新的靶点。在公共基因芯片数据库GEO (Gene Expression Omnibus)中下载GSE101586数据集, 通过GEO2R分析得到差异基因。采用实时定量聚合酶链反应检测NSCLC细胞中circ_0001666的表达水平。采用细胞计数试剂盒-8和细胞凋亡检测试剂盒分别检测敲低circ_0001666对NSCLC细胞增殖和凋亡的作用。通过生物信息学预测、双荧光素酶报告实验、RNA结合蛋白免疫沉淀实验和RNA pull down实验研究微小RNA 330-5p (microRNA 330-5p, miR-330-5p)与circ_0001666、高迁移率蛋白A2 (high mobility group A2 protein, HMGA2)之间的靶向关系。结果显示: circ_0001666在NSCLC细胞系中的表达显著高于正常肺上皮细胞。敲低circ_0001666显著降低了NSCLC细胞的增殖活力, 并促进了细胞凋亡, 而转染miR-330-5p抑制剂可逆转此作用。miR-330-5p是circ_0001666的下游靶点, 可以被circ_0001666吸附; HMGA2是miR-330-5p的靶基因, 可以被circ_0001666间接正向调控。以上结果提示, circ_0001666通过靶向调控miR-330-5p/HMGA2轴促进NSCLC细胞的增殖并抑制凋亡。

关键词: circ_0001666; miR-330-5p; 高迁移率蛋白A2; 非小细胞肺癌

中图分类号: R332; R734

Circ_0001666 promotes the proliferation and inhibits apoptosis of non-small cell lung cancer cells by targeting the miR-330-5p/HMGA2 axis

XIANG Bao-Li*, SU Jing, LIU Yang

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: Many studies have shown that circular RNAs (circRNAs) play a key regulatory role in the whole biological process of tumors. The purpose of this study was to explore the biological function and molecular mechanism of circ_0001666 in non-small cell lung cancer (NSCLC), so as to provide new targets for the diagnosis and treatment of NSCLC. Gene expression profiles were downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO, GSE101586) and the differential genes were obtained by using GEO2R analysis. The quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression level of circ_0001666 in NSCLC cells. Cell counting kit-8 (CCK-8) and Annexin V-FITC apoptosis detection kit were respectively used to assess the cell proliferation and apoptosis, where circ_0001666 was knockdown in NSCLC cells. The targeted relationship among microRNA 330-5p (miR-330-5p), circ_0001666, and high mobility group A2 protein (HMGA2) was verified by bioinformatics prediction, dual-luciferase reporter gene, RNA immunoprecipitation (RIP) and RNA pull down assay. The results showed that the expression of circ_0001666 in NSCLC cells was significantly up-regulated than that in normal lung epithelial cells. Circ_0001666 knockdown reduced the cell viability and

Received 2020-09-17 Accepted 2021-02-08

This work was supported by Zhangjiakou Science and Technology Research and Development Plan Project, China (No. 1911021D-3).

*Corresponding author. E-mail: zishantuo75@163.com

promoted the apoptosis of NSCLC cells, which could be reversed by miR-330-5p inhibitors. MiR-330-5p is the downstream target of circ_0001666 and can be adsorbed by circ_0001666. HMGA2 is a target gene of miR-330-5p, which can be indirectly regulated by circ_0001666. The results suggest that circ_0001666 promotes the proliferation and inhibits apoptosis of NSCLC cells via miR-330-5p/HMGA2 axis.

Key words: circ_0001666; miR-330-5p; high mobility group A2 protein; non-small cell lung cancer

肺癌是全球患病人数最多的恶性肿瘤, 世界卫生组织将肺癌分为两大组织学亚型: 非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC), 其中 NSCLC 占肺癌总病例数的 85%^[1]。NSCLC 的亚型又被分为: 腺癌 (占有肺癌的 38.5%)、鳞状细胞癌 (20%) 和大细胞癌 (3%)^[2]。近几十年来, 随着 NSCLC 早期诊断和治疗技术的不断进步, NSCLC 的发病率和死亡率有所下降^[3]。然而, 大部分 NSCLC 患者初次确诊时已进入中晚期, 导致患者失去手术根治机会, 预后较差, 5 年生存率只有 10%~15%^[4]。因此, 寻找有效的 NSCLC 早期诊断生物标志物和治疗靶点具有重要意义^[5, 6]。

环状 RNA (circular RNAs, circRNAs) 是共价连接的环状 RNA 分子, 在哺乳动物细胞内普遍表达^[7]。CircRNAs 的种类非常丰富, 在物种间高度保守, 并在不同组织和发育阶段特异性表达^[8]。此外, circRNAs 对 RNA 酶具有显著的抗性, 它在作为肿瘤和其他疾病的生物标志物方面表现出极大的潜力^[9]。CircRNAs 在肿瘤中的生物学功能已得到普遍认可和重视^[10]。CircRNAs 在肺癌、膀胱癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤中表达异常, 其表达失调与肿瘤的发生和发展密切相关^[11-14]。公共基因芯片数据库 GEO (Gene Expression Omnibus) 显示 circ_0001666 在 NSCLC 组织中异常高表达^[15], 然而 circ_0001666 在 NSCLC 中的作用及其潜在机制尚不清楚。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 在包括 NSCLC 在内的各种癌症的发生和进展中发挥重要作用^[16]。miR-330-5p 在 NSCLC 中表达下调, 上调 miR-330-5p 可抑制 NSCLC 细胞的增殖和迁移^[17, 18]。而高迁移率蛋白 A2 (high mobility group A2 protein, HMGA2) 在 NSCLC 中作为肿瘤生长的促进因子发挥作用, 过表达 HMGA2 可促进 NSCLC 细胞增殖和侵袭能力^[19]。在本研究中, 我们旨在探究 circ_0001666/miR-330-5p/HMGA2 轴在 NSCLC 细胞增殖和凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 NSCLC 细胞系 (A549, H358, H460 和 H226 细胞) 及正常肺上皮细胞 BEAS-2B 均购于中国典型培养物保藏中心 (武汉); 10% 胎牛血清购于 GE 公司 (Little Chalfont, UK); RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶和脂质体 Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA, USA); 空质粒载体 (NC)、circ_0001666 过表达质粒、circ_0001666 特异性小干扰 RNA (si-circ_0001666) 及其阴性对照 si-NC、miR-330-5p 模拟物及其对照 miR-NC、miR-330-5p 抑制剂及其对照 inh-NC 均购于 RiboBio 公司 (广州); cDNA 逆转录试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒和 RIPA 蛋白裂解液购于 Beyotime 公司 (上海); 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购于 MedChemExpress 公司 (Monmouth Junction, NJ, USA); 一抗 HMGA2 抗体、内参 GAPDH 抗体及对应二抗、Ago2 抗体和 IgG 抗体购于 Abcam 公司 (上海); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于 Promega 公司 (Madison, WI, USA); AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒购于上海翊圣生物科技有限公司; EZMagna RIP 试剂盒购于 Millipore 公司 (Billerica, MA, 美国); 生物素 RNA 标记试剂盒购于 Roche 公司 (上海)。

1.2 细胞培养和转染 将 NSCLC 细胞和正常肺上皮细胞接种到含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基中, 并置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每隔 3 天换液。待细胞融合度达 90% 左右时, 使用 0.25% 的胰蛋白酶消化贴壁细胞, 离心后加入新的培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下进行传代培养。

随机将所有细胞分为空载对照组 (转染空质粒载体)、敲低组 (转染 si-circ_0001666)、过表达组 (转染 circ_0001666 过表达质粒)、上调 miR-330-5p 组 (转染 miR-330-5p 模拟物, miR-330-5p mimics) 及其对照组 miR-NC, 下调 miR-330-5p 组 (转染 miR-330-5p 抑制剂, miR-330-5p inhibitor) 及其对照组 inh-NC。

1.3 实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

按照 TRIzol 试剂使用说明书抽提总 RNA, 采用 Thermo Nano Drop 2000 检测其浓度和纯度, 并采用凝胶电泳系统 Agilent-2100 检测总 RNA 的完整性, 应用软件 Primer Premier 5.0 设计引物。所有引物序列见表 1, 以 GAPDH 和 U6 为内参, 由 Invitrogen 公司合成。将 TRIzol 法分别提取得到的细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA。设置反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 45 个循环, 同时扩增各个样本的目的基因和内参基因, 每组细胞设计 3 个重复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析法检测 circ_0001666 和 miR-330-5p 的相对表达量。

1.4 CCK-8 实验

取各组细胞以 2×10^3 个 / 孔的密度接种于 96 孔板中, 贴壁培养 24 h 后, 向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液。随后, 将 96 孔板在培养箱内继续孵育 4 h, 用酶标仪测定在 450 nm 的吸光度值。以此分别测定 H226 细胞在转染以及共转染后 24、48 和 72 h 细胞增殖能力的变化。

1.5 流式细胞术

采用 Annexin V-FITC 和 PI 双染法检测细胞凋亡, 按照试剂盒说明书操作。将转染后的 H226 细胞用胰蛋白酶消化, 收集细胞, 接种于 6 孔板中, 调整细胞密度为 2×10^6 个 / 孔。继续培养 24 h 后, 弃上清, 预冷 PBS 洗 2 次后用 $1 \times$ Binding buffer 重悬细胞。细胞悬液中加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI, 充分混匀后室温孵育 15 min, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 Western blot 实验

收集细胞并用冷 PBS 清洗 3 次, 加入 150 μ L RIPA 裂解液, 在冰水中超声裂解细胞, 并采用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。各组取等量蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳, 将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上。膜在 4 °C 封闭 1 h,

加入一抗 (1:1 000) 于 4 °C 孵育过夜。随后, 加入二抗 (1:2 000) 室温杂交 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。将 ECL 化学发光底物均匀加在 PVDF 膜上, 显色 5 min, X 射线片曝光 3 min 后, 将 X 射线片依次进行显影和定影。将 X 射线胶片进行扫描或拍照, 用凝胶图像处理系统进行蛋白条带的灰度测定, 以目的蛋白条带的灰度值与内参 GAPDH 的灰度值之比对所加入的蛋白质总量进行校正, 以校正后的对照组的蛋白质表达量作为 100%, 计算各个样品相对于对照组蛋白含量的百分率, 比较各组蛋白质表达水平。每个实验组重复 3 次。

1.7 双荧光素酶报告实验

由 Promega 公司构建荧光素酶报告载体 circ_0001666 野生型 (circ_0001666-WT)、circ_0001666 突变型 (circ_0001666-MUT)、HMGA2 野生型 (HMGA2-WT) 和 HMGA2 突变型 (HMGA2-MUT)。将上述载体分别与 miR-330-5p mimics 或 miR-330-5p inhibitors 转染 H226 细胞, 培养 24 h。随后, 按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书操作步骤要求操作, 检测各组的荧光素酶活性。

1.8 RNA 免疫共沉淀 (RNA immunoprecipitation, RIP) 实验

EZMagna RIP 试剂盒用于 RIP 实验, 首先提取蛋白, 将 H226 细胞置于灭菌的离心管中, 加入预冷的 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂, 于冰上充分研磨后, 在冰上静置 30 min。于 4 °C 下以 11 000 r/min 离心 20 min, 小心吸取上清液, 转移到新的灭菌离心管中, 即为蛋白样品。随后, 准备免疫沉淀磁珠, 离心管中加入 50 μ L A/G 磁珠悬液, 再加入 500 μ L RIP 洗涤液, 轻轻搅拌混合均匀, 将离心管置于磁力架上, 使磁珠聚集到离心管管壁的一侧, 去除上清。离心管中加入 500 μ L RIP 洗涤液, 轻轻晃动, 洗涤磁珠, 去上清。随后, 在离心管中加入 100 μ L RIP 洗涤液, 再加入 Ago2 抗体, 阴性对照组加入 IgG 抗体, 室温孵育 30 min。取上清, 再次洗涤磁珠, 吸出上清。离心管中加入 500 μ L RIP 洗涤液, 短暂涡旋后, 将离心管转移至冰上, 去上清。取得到的 RNA- 目的蛋白复合物进行 RNA 纯化, 随后进行 qRT-PCR 分析以进一步分析 circ_0001666 和 miR-330-3p 的表达。

1.9 RNA pull-down 实验

按照生物素 RNA 标记试剂盒说明书标记 circ_0001666, 得到生物素标记的空白对照组 (Bio-probe NC)、野生型 circ_0001666 组 (Bio-circ_0001666 WT) 和突变型 circ_0001666 组

表 1. qRT-PCR 引物序列

Table 1. Primers for qRT-PCR

	Primers (5'-3')
circ_0001666	Forward: GACCTCTGTCTAGCGAGTTCC Reverse: CTGCCTGTAACCTCTCTTCAGT
miR-330-5p	Forward: TGGCTCAGTTCAGCAGGAAC Reverse: universal reverse primer
GAPDH	Forward: AGAAGGCTGGGGCTCATTG Reverse: AGGGGCCATCCACAGTCTTC
U6	Forward: CTCGCTTCGGCAGCAC Reverse: AACGCTTCACGAATT TGCGT

(Bio-circ_0001666 MUT)。

随后提取细胞总蛋白：取 1×10^7 个生长状态良好的 H226 细胞，弃去培养液，PBS 洗涤，刮取，离心收取细胞，在细胞沉淀中加入蛋白裂解液，于 4°C 下作用 30 min，离心后获取细胞总蛋白。

随后，将 1 mg 的总蛋白与生物素标记的 circRNAs 在室温孵育 1 h，在上述的孵育过的混合液中加入 60 μL 清洗过的链霉亲和素磁珠，室温孵育 1 h，去上清。离心管中加入 50 μL TBST 缓冲液洗涤磁珠，去上清。离心管中加入 50 μL RNA 捕获缓冲液，加入 50 pmol 生物素标记的 circRNAs，混匀。离心管中加入 100 μL 的 RNA-蛋白结合缓冲液使 circRNAs 和蛋白结合，去上清。再次加入 100 μL RNA-蛋白结合缓冲液，混匀，于 4°C 孵育 1 h。去上清，洗涤。离心管中加入 50 μL 洗脱液，常温下搅拌 20 min 使其混合均匀。提取、纯化 circRNAs-结合蛋白复合物中的 RNA，检测 miR-330-5p 在 Bio-circ_0001666 WT 和 Bio-circ_0001666 MUT 复合物中的富集程度。

1.10 核质分离实验 将细胞或组织沉淀用 150 μL 核质分离裂解液重悬，冰上裂解 5 min、10 min，每隔 1 min 颠倒混匀。在 4°C 下以 11 000 r/min 离心 10 min，取上清为细胞质样品，沉淀为细胞核。使用 TRIzol 法抽提 RNA 并溶于 DEPC 水中， -80°C 保存，随后采用 qRT-PCR 检测 circ_0001666、U6 和 GAPDH 的相对富集程度。

1.11 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件分析。所有计量资料均采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用独立样本 t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Circ_0001666在NSCLC组织样本中的表达

根据文献报道^[15]，首先我们在公共基因芯片数据库 GEO 中 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载 GSE101586 数据集，并通过 GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) 分析差异基因，结果显示 circ_0001666 在 NSCLC 组织样本中显著高表达 (图 1)。

2.2 敲低circ_0001666对 NSCLC细胞增殖和凋亡的影响

随后，我们通过 qRT-PCR 检测发现，相比于正常肺上皮细胞，circ_0001666 在 NSCLC 细胞系中

均显著高表达 (图 2A)。为了进一步验证 circ_0001666 在 NSCLC 细胞中的生物学功能，我们将 si-circ_0001666 成功转染 H226 细胞 (图 2B)。随后，我们采用 CCK-8 法和流式细胞术检测细胞的增殖和凋亡。结果显示，敲低 circ_0001666 显著抑制 H226 细胞增殖活力，并促进细胞凋亡 (图 2C~D)。

2.3 Circ_0001666与miR-330-5p的靶向关系

为了进一步探究 circ_0001666 的下游机制，我们通过 CircInteractome 生物信息学网站 (<https://circinteractome.nia.nih.gov/>) 预测发现 miR-330-5p 与 circ_0001666 之间可能存在的结合位点 (图 3A)。随后，我们采用双荧光素酶报告实验验证二者的结合关系，结果显示上调 miR-330-5p 显著抑制 circ_0001666-WT 的荧光素酶活性，下调 miR-330-5p 显著促进 circ_0001666-WT 的荧光素酶活性；而上调或下调 miR-330-5p 对 circ_0001666-MUT 的荧光素酶活性无显著影响 (图 3B)。随后，我们采用 RIP 实验进一步验证二者的结合关系，结果显示 miR-330-5p 与 circ_0001666 在 Ago2 组中高度富集，这表明二者可直接结合 (图 3C)。

RNA pull down 实验结果显示，相比于 Bio-probe NC 组，miR-330-5p 在 Bio-circ_0001666 WT 组中高度富集，而在 Bio-circ_0001666 MUT 无显著富集 (图 3D)。核质分离实验结果显示 circ_0001666 富集在细胞质中 (图 3E)。此外，过表达 circ_0001666 显著下调 miR-330-5p 的表达，而敲低 circ_0001666 显著上调 miR-330-5p 的表达 (图 3F)。

2.4 Circ_0001666通过吸附miR-330-5p对NSCLC细胞增殖和凋亡发挥作用

为了进一步验证 circ_0001666 是否通过吸附 miR-330-5p 对 NSCLC 细胞增殖和凋亡发挥调节作用，我们将 si-circ_0001666 和 miR-330-5p inhibitors 单独或共转染 H226 细胞，qRT-PCR 结果显示转染成功 (4A, B)。CCK-8 实验和流式细胞术结果显示，相比于对照组，敲低 circ_0001666 抑制 H226 细胞活力，并促进凋亡；下调 miR-330-5p 促进 H226 细胞活力，并抑制凋亡；共转染 si-circ_0001666+miR-330-5p inhibitors 可逆转敲低 circ_0001666 对细胞增长的抑制作用 (图 4C, D)。

2.5 Circ_0001666通过吸附miR-330-5p上调HMGA2的表达

随后，我们试图进一步探究 miR-330-5p 的下游机制，通过 Starbase (<http://starbase.sysu.edu.cn/index>。

php) 数据库, 我们发现 HMGA2 是 miR-330-5p 的潜在靶基因之一, 结合位点如图 5A 所示。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 上调 miR-330-5p 显

著抑制 HMGA2-WT 的荧光素酶活性, 下调 miR-330-5p 显著促进 HMGA2-WT 的荧光素酶活性; 而 miR-330-5p 对 HMGA2-MUT 的荧光素酶活性无显

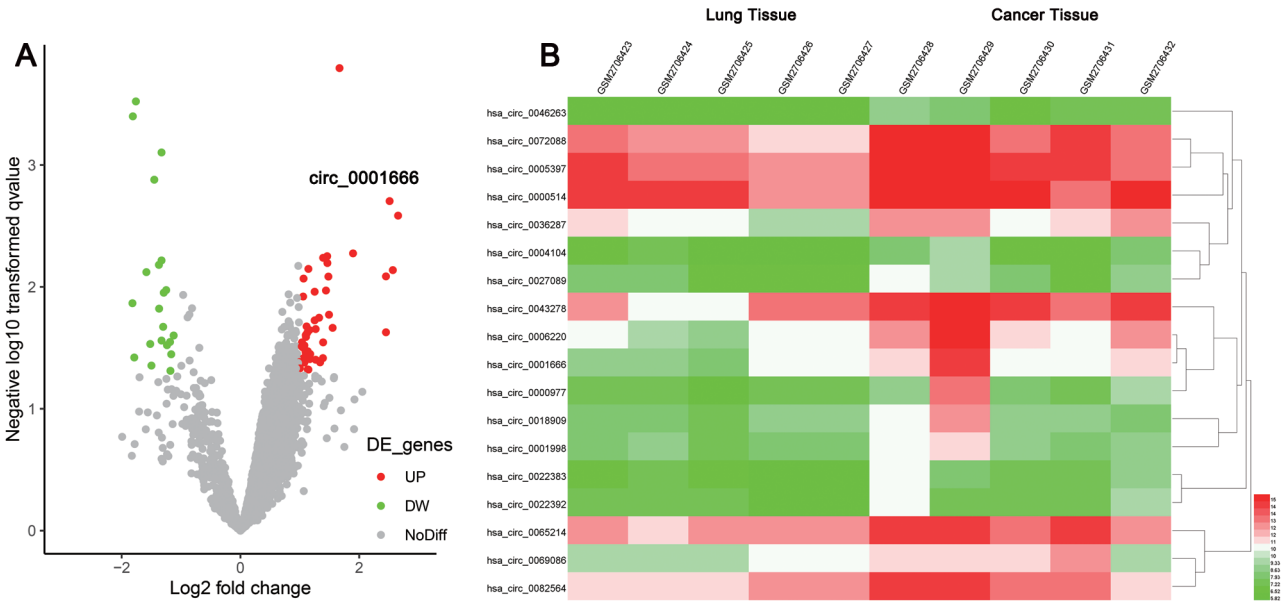


图 1. 通过GEO数据库分析NSCLC组织和正常组织中circRNAs的表达差异

Fig. 1. Gene chip dataset GSE101586 was downloaded from the GEO database to analyze the difference in the expression of circRNAs between NSCLC tissue samples and normal tissues. A: The volcano map was used to show the analysis results. B: The heat map was used to show the analysis results.

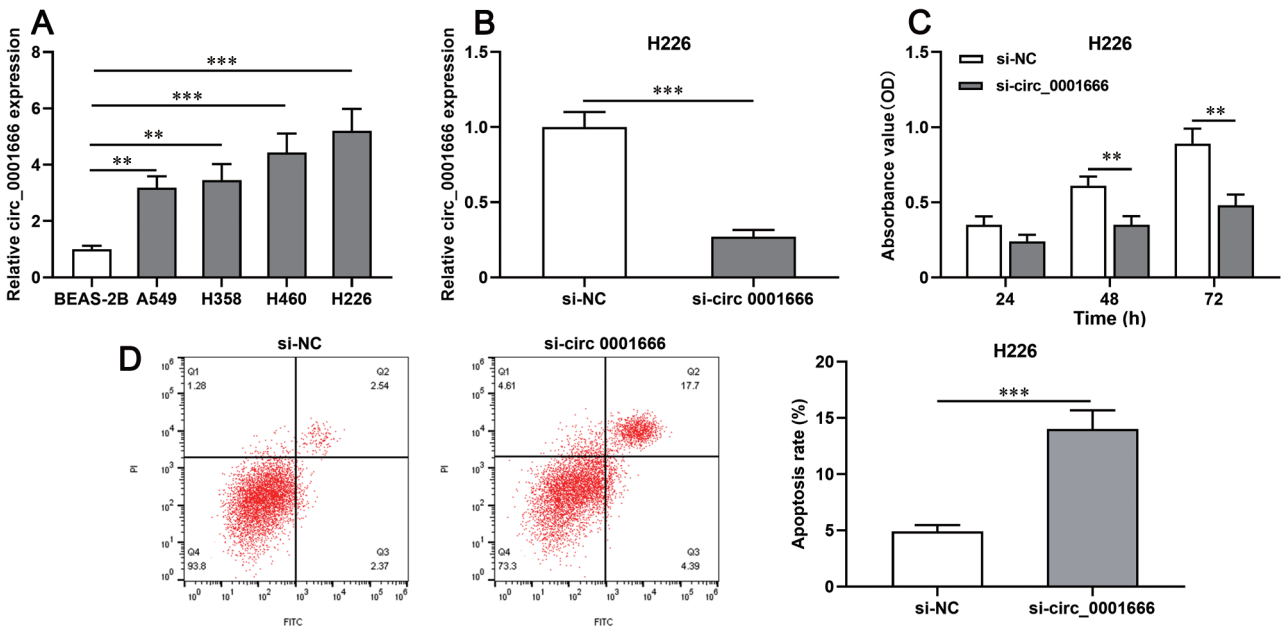


图 2. Circ_0001666对 NSCLC细胞增殖和凋亡的影响

Fig. 2. Effects of circ_0001666 on proliferation and apoptosis of NSCLC cells. A: The expression of circ_0001666 in NSCLC cells was detected by qRT-PCR. B: The transfection efficiency of si-circ_0001666 was determined by qRT-PCR in H226 cells. C, D: CCK-8 assay and flow cytometry were used to detect proliferation and apoptosis of H226 cells, respectively. Mean \pm SD, $n = 3$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

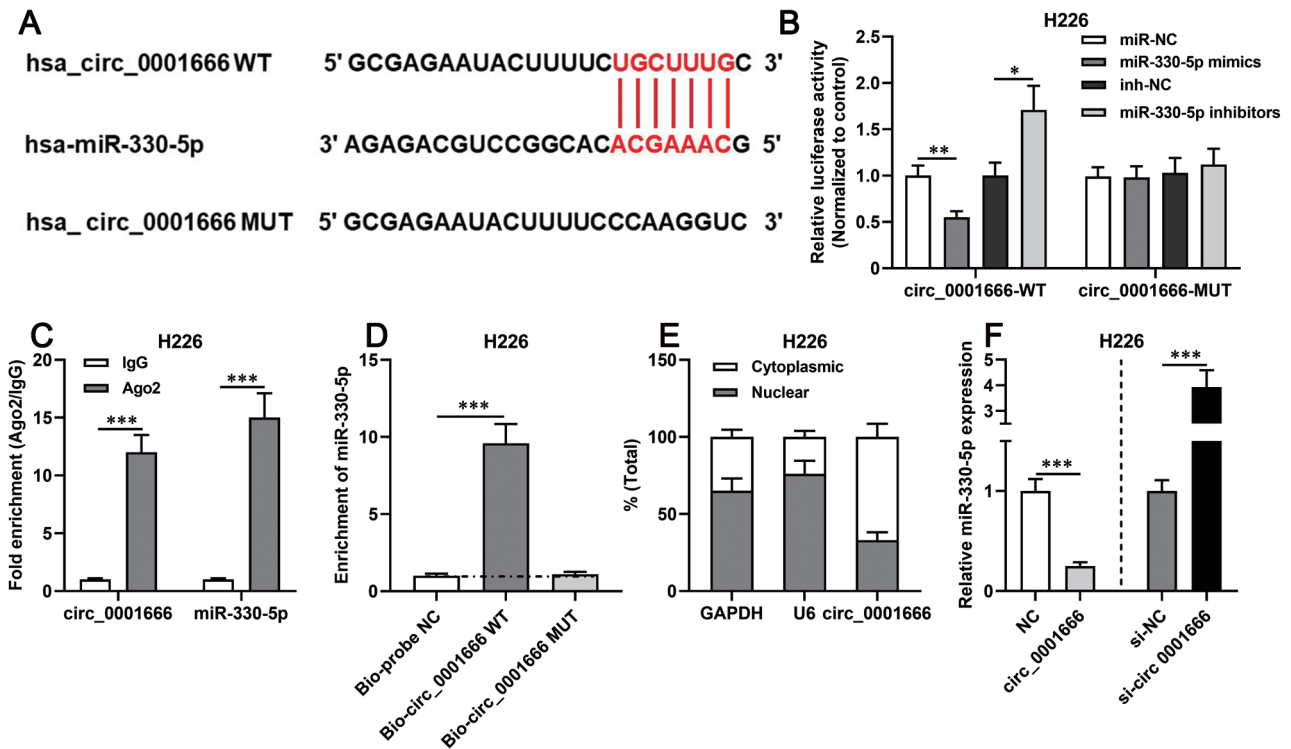


图 3. Circ_0001666与miR-330-5p的靶向关系

Fig. 3. The targeting relationship between circ_0001666 and miR-330-5p. *A*: The binding site between circ_0001666 and miR-330-5p. *B*: Double luciferase reporter assay in H226 cells. *C*, *D*: RNA immunoprecipitation (RIP) assay and RNA pull down assay in H226 cells. *E*: Location of circ_0001666 in H226 cells. *F*: qRT-PCR was used to detect the effects of circ_0001666 on miR-330-5p expression in H226 cells. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

著影响 (图 5B)。Western blot 结果显示, 相比于对照组, 敲低 circ_0001666 可显著抑制 HMGA2 的表达, 而下调 miR-330-5p 可逆转敲低 circ_0001666 对 HMGA2 表达的抑制作用 (图 5C)。

3 讨论

CircRNAs 是一类长链内源性连续闭环非编码 RNA, 在 3' 端没有聚腺苷酸的尾部, 在 5' 端没有帽状结构^[20]。由于这种特殊的结构, circRNAs 基本不会被 RNA 外切酶降解, 相对于线状 RNA 更加稳定^[21]。据研究报道, circRNAs 可通过 miRNAs 或 RNA 结合蛋白 (RNA binding proteins, RBPs) 相互作用, 间接或直接调控下游基因的转录, 部分 circRNAs 也可以直接翻译成蛋白质^[22, 23]。近年来很多研究阐述了 circRNAs 在肿瘤的整体新陈代谢过程中发挥着重要的作用, circRNA 不仅可以作为肿瘤诊断的生物标志物, 而且还是治疗癌症的潜在靶点或药物作用靶点^[24]。通过改变 circRNAs 在肿瘤中的表达水平, 可以间接调节肿瘤的良好或

恶性发展, 如在肝癌细胞中, 过表达 circ_100395 可以抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 降低细胞的迁移和侵袭能力^[25]。在宫颈癌细胞中, 过表达 circRNA_101996 可促进肿瘤细胞的增殖和侵袭^[26]。circRNA 在 NSCLC 中的作用也有报道, 敲低 circ_0033155 显著抑制 NSCLC 细胞的增殖能力^[27]。Circ_0002483 通过吸附 miR-182-5p 抑制肿瘤细胞的增殖, 并提高 NSCLC 细胞对紫杉醇的化学敏感度^[28]。同属于 circRNA 家族的 circ_0001666 在乳腺癌中表达异常, 并与乳腺癌患者的预后相关^[29]。在本研究中, 我们发现 circ_0001666 在 NSCLC 组织和细胞中表达显著上调, 进一步研究表明敲低 circ_0001666 可以抑制 NSCLC 细胞的增殖活力, 并促进凋亡。这提示 circ_0001666 可作为 NSCLC 早期诊断和治疗的生物标志物。

miRNAs 是长度为 19~25 个核苷酸的内源性短链非编码 RNA, 在调控基因表达中起关键作用^[30]。miRNAs 可参与调控与癌症发展过程相关的多种信号通路, 包括 DNA 损伤修复通路、凋亡信号通路

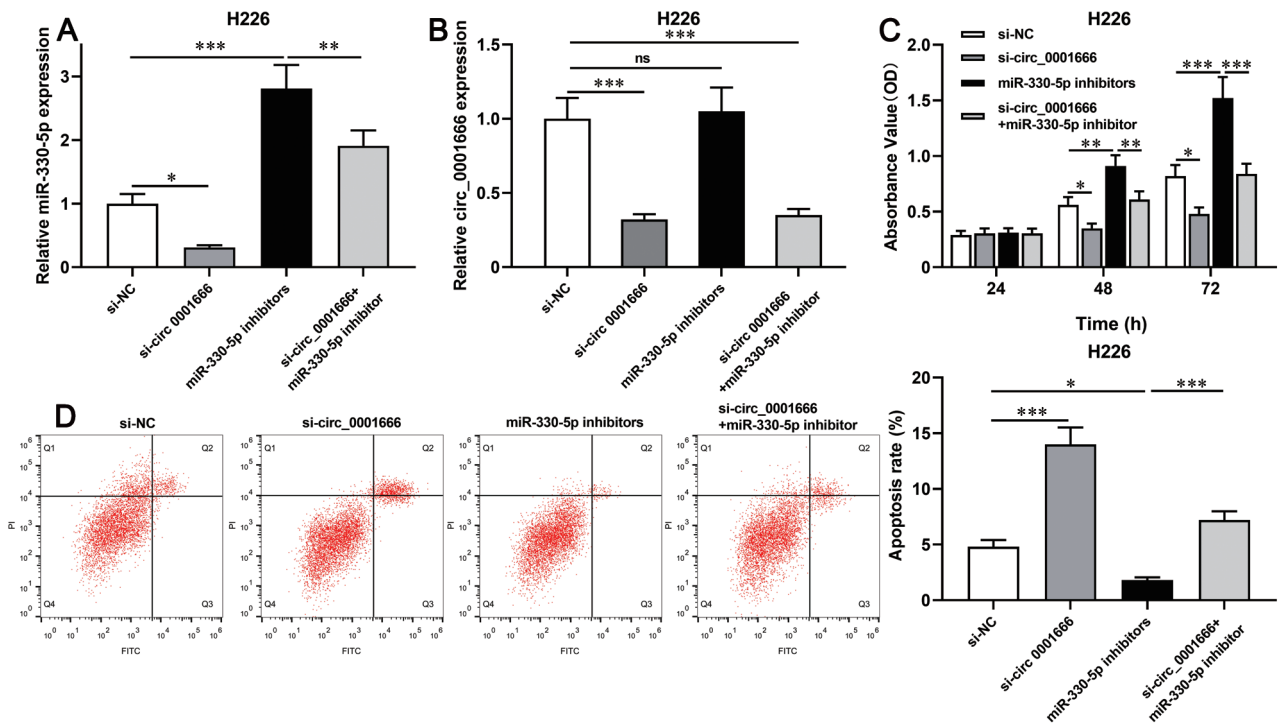


图 4. Circ_0001666和miR-330-5p对NSCLC细胞增殖和凋亡的作用

Fig. 4. Effects of circ_0001666 and miR-330-5p on proliferation and apoptosis of NSCLC cells. *A, B*: The co-transfection efficiency of si-circ_0001666 and miR-330-5p inhibitors was detected by qRT-PCR in H226 cells. *C, D*: CCK-8 assay and flow cytometry were used to detect proliferation and apoptosis in H226 cells. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

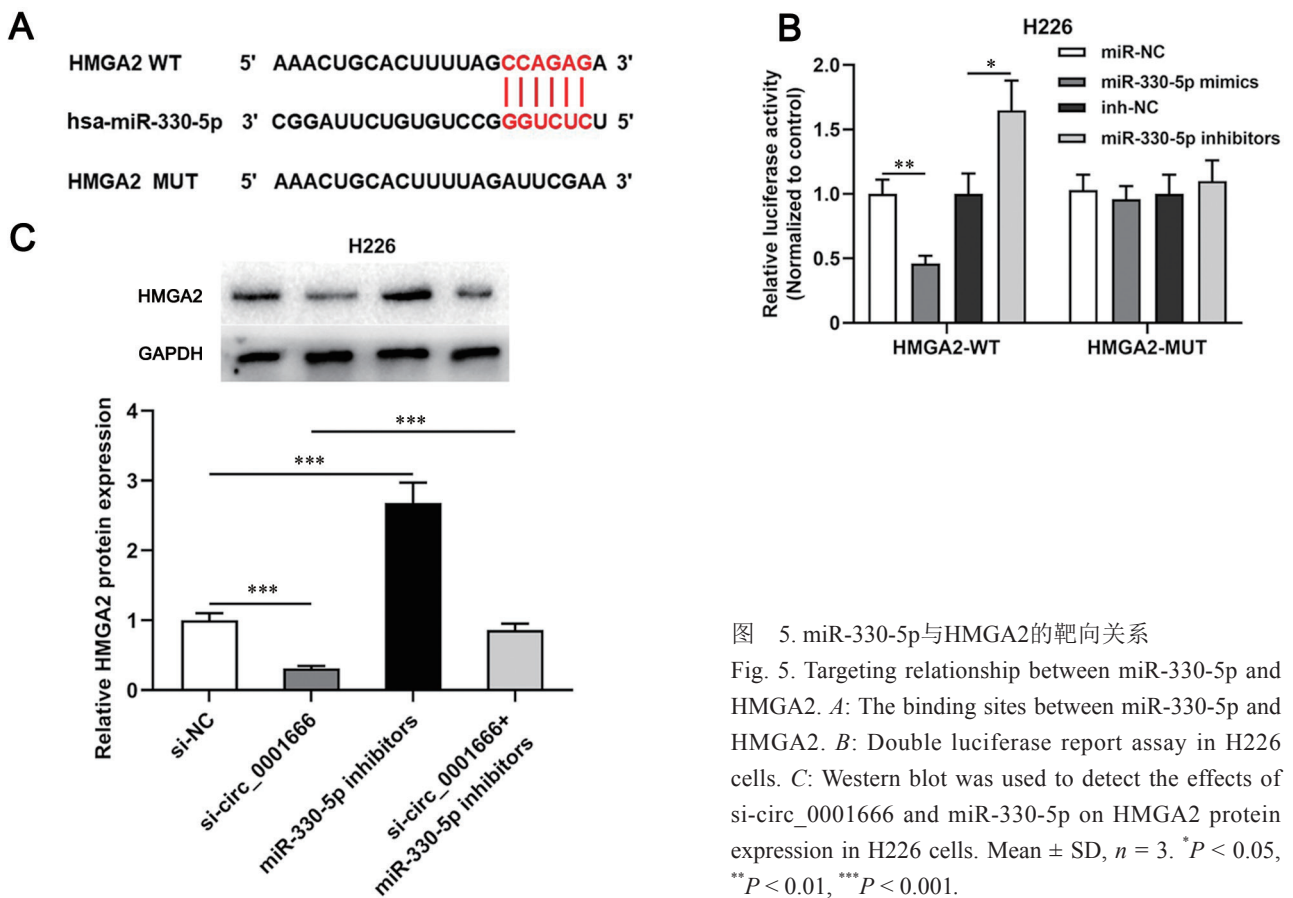


图 5. miR-330-5p与HMGA2的靶向关系

Fig. 5. Targeting relationship between miR-330-5p and HMGA2. *A*: The binding sites between miR-330-5p and HMGA2. *B*: Double luciferase report assay in H226 cells. *C*: Western blot was used to detect the effects of si-circ_0001666 and miR-330-5p on HMGA2 protein expression in H226 cells. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

和成纤维细胞生长因子受体信号通路等^[31]。机制上, miRNA 通常靶向 mRNA 的 3'UTR 调节基因的表达, 从而介导细胞增殖、细胞凋亡和细胞分化等多种生物学行为^[32]。例如, miRNA-148a 通过靶向 Wnt1 抑制 NSCLC 细胞的迁移和侵袭^[33]。此前已有研究证实 miR-330-5p 可抑制胶质瘤细胞和黑色素瘤细胞的增殖和侵袭能力^[34, 35]。miR-330-5p 通过靶向调控 NOB1 抑制 NSCLC 细胞的生长和转移^[36, 37]。此外, miR-330-5p 的表达还受到 circRNAs 的靶向调节, 如 circPTN 通过吸附 miR-330-5p 促进胶质瘤细胞的增殖^[38]。有研究报道, circ-ZKSCAN1 通过吸附 miR-330-5p 促进 NSCLC 细胞的增殖和肺癌裸鼠移植瘤的生长^[39]。与该研究结果类似, 本研究再次证明了 miR-330-5p 对 NSCLC 细胞生长的抑制作用, 重要的是, 我们发现 circ_0001666 直接靶向 miR-330-5p, circ_0001666 通过吸附 miR-330-5p 促进 NSCLC 细胞的增殖, 抑制细胞的凋亡。

HMGA2 是一种非组蛋白染色质相关蛋白, 参与了细胞周期过程、DNA 损伤修复过程、凋亡、衰老、上皮-间充质转化和端粒修复多种生物学过程^[40]。HMGA2 是一种结构转录因子, 它通过改变

染色质结构促进或抑制其他基因的表达^[41]。据研究, HMGA2 在胰腺癌、乳腺癌、结直肠癌等多种癌症中均表达上调, 并与患者预后不良相关^[42-44]。HMGA2 在 NSCLC 中的作用已有广泛的报道, HMGA2 在 NSCLC 组织和细胞中表达上调, 其高表达水平与 NSCLC 的分化程度低、淋巴结转移、临床分期增加和生存时间较短相关, 这提示 HMGA2 可作为 NSCLC 的预后标志物^[45, 46]。HMGA2 靶向 Twist 1 促进 NSCLC 细胞的上皮-间充质转化进程, 并抑制细胞凋亡^[47]。目前已经发现 miR-330-5p 在肿瘤中通过靶向 SPRY2、ITGA5、PDIA3 和 ELK1 调控肿瘤的进展^[34, 35, 48, 49]。在本研究中, 我们证明了 HMGA2 也是 miR-330-5p 下游靶点之一, 进一步探究发现 circ_0001666 通过靶向 miR-330-5p 上调 HMGA2 的表达, 从而促进 NSCLC 细胞的生长(图 6), 这与前述研究类似^[27, 39], 本研究为临床上 NSCLC 的防治提供了一条新的思路。

总之, 本研究结果显示 circ_0001666 通过调控 miR-330-5p/HMGA2 分子轴促进 NSCLC 细胞的生长, 提示 circ_0001666 有望作为 NSCLC 的一个预后生物标记物和新的治疗靶点。

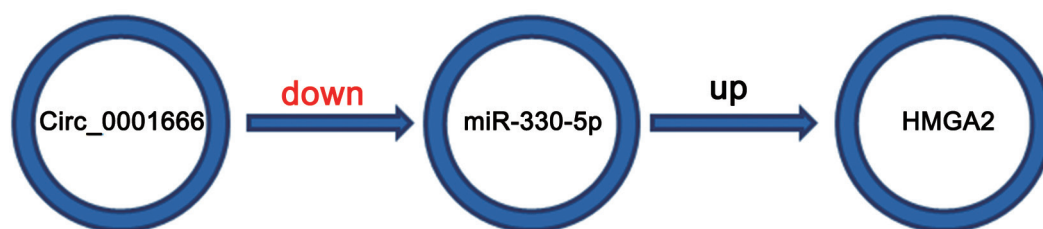


图 6. 网络互作节点图

Fig. 6. Network interaction node diagram.

参考文献

- Duruiseaux M, Esteller M. Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications. *Semin Cancer Biol* 2018; 51: 116–128.
- Skříčková J, Kadlec B, Venclíček O, Merta Z. Lung cancer. *Cas Lek Cesk* 2018; 157(5): 226–236.
- Schwartz AG, Cote ML. Epidemiology of lung cancer. *Adv Exp Med Biol* 2016; 893: 21–41.
- Cagle PT, Allen TC, Olsen RJ. Lung cancer biomarkers: present status and future developments. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137(9): 1191–1198.
- Villalobos P, Wistuba II. Lung cancer biomarkers. *Hematol Oncol Clin North Am* 2017; 31(1): 13–29.
- Gasparri R, Romano R, Sedda G, Borri A, Petrella F, Galetta D, Casiraghi M, Spaggiari L. Diagnostic biomarkers for lung cancer prevention. *J Breath Res* 2018; 12(2): 027111.
- Patop IL, Wüst S, Kadener S. Past, present, and future of circRNAs. *EMBO J* 2019; 38(16): e100836.
- Lux S, Bullinger L. Circular RNAs in cancer. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1087: 215–230.
- Arnaiz E, Sole C, Manterola L, Iparraguirre L, Otaegui D, Lawrie CH. CircRNAs and cancer: Biomarkers and master regulators. *Semin Cancer Biol* 2019; 58: 90–99.
- Shang Q, Yang Z, Jia R, Ge S. The novel roles of circRNAs in human cancer. *Mol Cancer* 2019; 18(1): 6.
- Yang F, Hu A, Li D, Wang J, Guo Y, Liu Y, Li H, Chen Y,

- Wang X, Huang K, Zheng L, Tong Q. Circ-HuR suppresses HuR expression and gastric cancer progression by inhibiting CNBP transactivation. *Mol Cancer* 2019; 18(1): 158.
- 12 Han J, Zhao G, Ma X, Dong Q, Zhang H, Wang Y, Cui J. CircRNA circ-BANP-mediated miR-503/LARP1 signaling contributes to lung cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503(4): 2429–2435.
- 13 Du WW, Yang W, Li X, Awan FM, Yang Z, Fang L, Lyu J, Li F, Peng C, Krylov SN, Xie Y, Zhang Y, He C, Wu N, Zhang C, Sdiri M, Dong J, Ma J, Gao C, Hibberd S, Yang BB. A circular RNA circ-DNMT1 enhances breast cancer progression by activating autophagy. *Oncogene* 2018; 37(44): 5829–5842.
- 14 Bi J, Liu H, Dong W, Xie W, He Q, Cai Z, Huang J, Lin T. Circular RNA circ-ZKSCAN1 inhibits bladder cancer progression through miR-1178-3p/p21 axis and acts as a prognostic factor of recurrence. *Mol Cancer* 2019; 18(1): 133.
- 15 Chen T, Yang Z, Liu C, Wang L, Yang J, Chen L, Li W. Circ_0078767 suppresses non-small-cell lung cancer by protecting RASSF1A expression via sponging miR-330-3p. *Cell Prolif* 2019; 52(2): e12548.
- 16 Tutar Y. miRNA and cancer; computational and experimental approaches. *Curr Pharm Biotechnol* 2014; 15(5): 429.
- 17 Chen S, Chen JZ, Zhang JQ, Chen HX, Qiu FN, Yan ML, Tian YF, Peng CH, Shen BY, Chen YL, Wang YD. Silencing of long noncoding RNA LINC00958 prevents tumor initiation of pancreatic cancer by acting as a sponge of microRNA-330-5p to down-regulate PAX8. *Cancer Lett* 2019; 446: 49–61.
- 18 Cui LH, Xu HR, Yang W, Yu LJ. lncRNA PCAT6 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion through regulating miR-330-5p. *Onco Targets Ther* 2018; 11: 7715–7724.
- 19 Kumar MS, Armenteros-Monterroso E, East P, Chakravorty P, Matthews N, Winslow MM, Downward J. HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. *Nature* 2014; 505(7482): 212–217.
- 20 Salzman J. Circular RNA expression: its potential regulation and function. *Trends Genet* 2016; 32(5): 309–316.
- 21 Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol* 2014; 32(5): 453–461.
- 22 Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 2013; 495(7441): 333–338.
- 23 Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, Ashwal-Fluss R, Stottmeister C, Ruhe L, Hanan M, Wyler E, Perez-Hernandez D, Ramberger E, Shenzis S, Samson M, Dittmar G, Landthaler M, Chekulaeva M, Rajewsky N, Kadener S. Translation of CircRNAs. *Mol Cell* 2017; 66(1): 9–21.e7.
- 24 Zhong Y, Du Y, Yang X, Mo Y, Fan C, Xiong F, Ren D, Ye X, Li C, Wang Y, Wei F, Guo C, Wu X, Li X, Li Y, Li G, Zeng Z, Xiong W. Circular RNAs function as ceRNAs to regulate and control human cancer progression. *Mol Cancer* 2018; 17(1): 79.
- 25 Chen Q, Chen Z, Cao S, Guo B, Chen Y, Feng Z, Wang J, Guo G, Chen X, Huang X. Role of circRNAs_100395 in proliferation and metastases of liver cancer. *Med Sci Monit* 2019; 25: 6181–6192.
- 26 Song T, Xu A, Zhang Z, Gao F, Zhao L, Chen X, Gao J, Kong X. CircRNA hsa_circRNA_101996 increases cervical cancer proliferation and invasion through activating TPX2 expression by restraining miR-8075. *J Cell Physiol* 2019; 234(8): 14296–14305.
- 27 Gu X, Wang G, Shen H, Fei X. Hsa_circ_0033155: A potential novel biomarker for non-small cell lung cancer. *Exp Ther Med* 2018; 16(4): 3220–3226.
- 28 Li X, Yang B, Ren H, Xiao T, Zhang L, Li L, Li M, Wang X, Zhou H, Zhang W. Hsa_circ_0002483 inhibited the progression and enhanced the Taxol sensitivity of non-small cell lung cancer by targeting miR-182-5p. *Cell Death Dis* 2019; 10(12): 953.
- 29 Afzali F, Salimi M. Unearthing regulatory axes of breast cancer circrnas networks to find novel targets and fathom pivotal mechanisms. *Interdiscip Sci* 2019; 11(4): 711–722.
- 30 Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 141(4): 1202–1207.
- 31 Wu M, Wang G, Tian W, Deng Y, Xu Y. MiRNA-based therapeutics for lung cancer. *Curr Pharm Des* 2018; 23(39): 5989–5996.
- 32 Chava S, Reynolds CP, Pathania AS, Gorantla S, Poluektova LY, Coulter DW, Gupta SC, Pandey MK, Challagundla KB. miR-15a-5p, miR-15b-5p, and miR-16-5p inhibit tumor progression by directly targeting MYCN in neuroblastoma. *Mol Oncol* 2020; 14(1): 180–196.
- 33 Chen Y, Min L, Ren C, Xu X, Yang J, Sun X, Wang T, Wang F, Sun C, Zhang X. miRNA-148a serves as a prognostic factor and suppresses migration and invasion through Wnt1 in non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2017; 12(2): e0171751.
- 34 Feng L, Ma J, Ji H, Liu Y, Hu W. miR-330-5p suppresses glioblastoma cell proliferation and invasiveness through targeting ITGA5. *Biosci Rep* 2017; 37(3): BSR20170019.
- 35 Su BB, Zhou SW, Gan CB, Zhang XN. MiR-330-5p regulates tyrosinase and PDIA3 expression and suppresses cell proliferation and invasion in cutaneous malignant melanoma. *J Surg Res* 2016; 203(2): 434–440.

- 36 Zhan JW, Jiao DM, Wang Y, Song J, Wu JH, Wu LJ, Chen QY, Ma SL. Integrated microRNA and gene expression profiling reveals the crucial miRNAs in curcumin anti-lung cancer cell invasion. *Thorac Cancer* 2017; 8(5): 461–470.
- 37 Kong R, Liu W, Guo Y, Feng J, Cheng C, Zhang X, Ma Y, Li S, Jiang J, Zhang J, Qiao Z, Qin J, Lu T, He X. Inhibition of NOB1 by microRNA-330-5p overexpression represses cell growth of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2017; 38(4): 2572–2580.
- 38 Chen J, Chen T, Zhu Y, Li Y, Zhang Y, Wang Y, Li X, Xie X, Wang J, Huang M, Sun X, Ke Y. circPTN sponges miR-145-5p/miR-330-5p to promote proliferation and stemness in glioma. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38(1): 398.
- 39 Wang Y, Xu R, Zhang D, Lu T, Yu W, Wo Y, Liu A, Sui T, Cui J, Qin Y, Dong Y, Leng X, Kong D, Du W, Huang Z, Su W, Yuan T, Sun X, Wang J, Jiao W. Circ-ZKSCAN1 regulates FAM83A expression and inactivates MAPK signaling by targeting miR-330-5p to promote non-small cell lung cancer progression. *Transl Lung Cancer Res* 2019; 8(6): 862–875.
- 40 Zhang S, Mo Q, Wang X. Oncological role of HMGA2 (Review). *Int J Oncol* 2019; 55(4): 775–788.
- 41 Ozturk N, Singh I, Mehta A, Braun T, Barreto G. HMGA proteins as modulators of chromatin structure during transcriptional activation. *Front Cell Dev Biol* 2014; 2: 5.
- 42 Chiou SH, Dorsch M, Kusch E, Naranjo S, Kozak MM, Koong AC, Winslow MM, Grüner BM. Hmga2 is dispensable for pancreatic cancer development, metastasis, and therapy resistance. *Sci Rep* 2018; 8(1): 14008.
- 43 Mansoori B, Mohammadi A, Asadzadeh Z, Shirjang S, Minouei M, Abedi Gaballu F, Shajari N, Kazemi T, Gjerstorff MF, Duijf PHG, Baradaran B. HMGA2 and Bach-1 cooperate to promote breast cancer cell malignancy. *J Cell Physiol* 2019; 234(10): 17714–17726.
- 44 Leung SW, Chou CJ, Huang TC, Yang PM. An integrated bioinformatics analysis repurposes an antihelminthic drug niclosamide for treating HMGA2-overexpressing human colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 2019; 11(10): 1482.
- 45 Guo X, Shi J, Wen Y, Li M, Li Q, Li X, Li J. Increased high-mobility group A2 correlates with lymph node metastasis and prognosis of non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark* 2018; 21(3): 547–555.
- 46 Li XX, Di X, Cong S, Wang Y, Wang K. The role of let-7 and HMGA2 in the occurrence and development of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; 22(23): 8353–8366.
- 47 Gao X, Dai M, Li Q, Wang Z, Lu Y, Song Z. HMGA2 regulates lung cancer proliferation and metastasis. *Thorac Cancer* 2017; 8(5): 501–510.
- 48 Xiao S, Yang M, Yang H, Chang R, Fang F, Yang L. miR-330-5p targets SPRY2 to promote hepatocellular carcinoma progression via MAPK/ERK signaling. *Oncogenesis* 2018; 7(11): 90.
- 49 Zhao H, Hu GM, Wang WL, Wang ZH, Fang Y, Liu YL. LncRNA TDRG1 functions as an oncogene in cervical cancer through sponging miR-330-5p to modulate ELK1 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23(17): 7295–7306.