

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2025.03.001

❖ 基础医学研究 ❖

circ_0014130 通过靶向调节 miR-671-5p/PDL1 轴促进胃癌进展

郭婷婷, 张雨新, 成建斌

(珠海市人民医院·暨南大学珠海临床医学院消化内科, 广东 珠海 519000)

【摘要】目的: 探究 circ_0014130/miR-671-5p/PDL1 轴在胃癌进展中的作用机制。**方法:** 为探究 circ_0014130 与 miR-671-5p 在胃癌细胞中的作用, 将 AGS 和 HGC27 细胞分为四组: si-NC 组、si-circ_0014130 组、si-circ_0014130 + inhibitor NC 组和 si-circ_0014130 + miR-671-5p inhibitor 组。为探究 miR-671-5p 与 PDL1 在胃癌细胞中的作用, 将 AGS 和 HGC27 细胞分为 mimic NC 组、miR-671-5p mimic 组、miR-671-5p mimic + pcDNA-NC 组和 miR-671-5p mimic + pcDNA-PDL1 组。采用双荧光素酶报告基因实验分析 circ_0014130 与 miR-671-5p 和 miR-671-5p 与 PDL1 的靶向结合关系。采用 CCK-8 实验检测细胞活力, EdU 实验检测细胞增殖水平, 流式细胞术检测细胞凋亡水平, Transwell 实验检测细胞侵袭水平。RT-qPCR 检测 RNA 表达水平, 蛋白质印迹检测 PCNA、Bcl-2、Bax 和 PDL1 蛋白表达水平。**结果:** circ_0014130 与 miR-671-5p 存在结合位点, circ_0014130 在 AGS 和 HGC27 细胞中表达升高 ($P < 0.05$), 敲低 circ_0014130 表达抑制细胞增殖和侵袭, 促进细胞凋亡; miR-671-5p 下调抵消 circ_0014130 敲除对胃癌细胞恶性生物学行为的抑制作用。miR-671-5p 与 PDL1 存在结合位点, miR-671-5p 过表达抑制细胞增殖和侵袭, 促进细胞凋亡; 而 PDL1 过表达部分抵消 miR-671-5p 对胃癌细胞恶性生物学行为的抑制作用。**结论:** circ_0014130 可能通过调控 miR-671-5p/PDL1 轴促进胃癌细胞增殖和侵袭, 并抑制胃癌细胞凋亡。

【关键词】 胃癌; 增殖和凋亡; circ_0014130; miR-671-5p; PDL1

【中图分类号】 R735.2 **【文献标志码】** A

circ_0014130 promotes gastric cancer progression by targeting miR-671-5p/PDL1 axis

GUO Ting-ting, ZHANG Yu-xin, CHENG Jian-bin

(Department of Gastroenterology, Zhuhai People's Hospital · Zhuhai Clinical Medical College of Jinan University, Zhuhai 519000, Guangdong, China)

【Abstract】 Objective: To explore the mechanism of circ_0014130/miR-671-5p/PDL1 axis in the progression of gastric cancer. **Methods:** In order to explore the role of circ_0014130 and miR-671-5p in gastric cancer cells, AGS and HGC27 cells were divided into si-NC group, si-circ_0014130 group, si-circ_0014130 + inhibitor NC group and si-circ_0014130 + miR-671-5p inhibitor group. In order to explore the role of miR-671-5p and PDL1 in gastric cancer cells, AGS and HGC27 cells were divided into mimic NC group, miR-671-5p mimic group, miR-671-5p mimic + pcDNA-NC group, and miR-671-5p mimic + pcDNA-PDL1 group. The targeting binding relationship between circ_0014130 and miR-671-5p, miR-671-5p and PDL1 were analyzed by Dual luciferase reporter gene assay. The cell viability was detected by CCK-8 assay, cell proliferation was detected by EdU assay, cell apoptosis was detected by flow cytometry, and cell invasion was detected by Transwell assay. The RNA expression level was detected by RT-qPCR, and protein expression level of PCNA, Bcl-2, Bax and PDL1 were detected by western blot. **Results:** There was a binding site between circ_0014130 and miR-671-5p, and the expression of circ_0014130 was increased in AGS and HGC27 cells ($P < 0.05$). The knockdown of circ_0014130 expression inhibited cell proliferation and invasion, promoted cell apoptosis. The down-regulation of miR-671-5p counteracted the inhibitory effect of circ_0014130 knockout on the malignant biological behavior of gastric cancer cells. There was a binding site between miR-671-5p and PDL1, and overexpression of miR-671-5p inhibited cell proliferation and invasion, promoted cell apoptosis. The overexpression of PDL1 partially offset the inhibitory effect of miR-671-5p on the malignant biological behavior of gastric cancer cells. **Conclusion:** circ_0014130 may promote the proliferation and invasion of gastric cancer cells and inhibit the apoptosis of gastric cancer cells by regulating miR-671-5p/PDL1 axis.

基金项目: 广东省珠海市医学科研项目(2220009000103)

作者简介: 郭婷婷(1981-), 女, 硕士, 主治医师。E-mail: 676584170@qq.com

【Key words】 Gastric cancer; Proliferation and apoptosis; circ_0014130; miR-671-5p; PDL1

胃癌作为最常见的消化道恶性肿瘤,一直被认为是全球范围内一个主要的公共卫生问题,2024年,美国新增病例约 26 890 例,死亡 10 880 例^[1-2]。随着手术、传统化疗和新辅助治疗的进步,胃癌患者早期的预后取得了显著改善^[3]。然而,大多数患者在诊断时已到晚期,侵袭性高,治愈率低^[4]。因此,深入探究胃癌进展所涉及的具体分子机制对于肿瘤的早期检测和预后评估具有重要意义。

环状 RNA (circRNA) 为新发现的一类内源性非编码 RNA,具有进化上保守、含量丰富且组织/细胞特异性高度表达的特点,是各种肿瘤疾病的潜在诊断标志物^[5-6]。研究^[7]表明,circAFF2 和 hsa_circ_0000751 等一些 circRNA 被发现在胃癌细胞中差异性表达,并参与调节肿瘤恶性行为。值得注意的是,circ_0014130 (也称为 circPIP5K1A) 作为众所周知的与肿瘤相关的 circRNA,其失调与结肠癌、非小细胞肺癌和膀胱癌等多种肿瘤的恶性行为有关^[8]。进一步研究^[9]表明,circ_0014130 可在胃癌细胞中作为致癌因子,促进细胞生长和转移,但 circ_0014130 在胃癌中的具体作用机制仍有待进一步揭示。本课题组在前期生物信息学研究发现 circ_0014130 含有与 miR-671-5p 结合的位点,且进一步分析发现 PDL1 疑似 miR-671-5p 的下游靶标基因。据报道^[10],miR-671-5p 在多种肿瘤组织中异常表达,并与多种肿瘤进展密切相关,且有文献报道 miR-671-5p 通过调节多个靶基因来抑制胃癌细胞的恶性表型^[11]。程序性死亡配体 1 (PDL1) 是一种负性共刺激受体,肿瘤通过表达 PDL1 来逃避免疫监视,已被发现在胃癌中高表达,PDL1 也成为胃癌中重要的免疫抑制治疗靶点^[12]。基于此,本课题组推测 circ_0014130 可能通过靶向 miR-671-5p/PDL1 来调控胃癌进展,并在细胞水平上进行研究和验证。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验试剂 CCK-8 试剂盒 (C0037)、Edu 试剂盒 (C0071L) 和 RIPA 裂解液 (P0013B) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (CA1020)、细胞侵袭实验染色试剂盒 (G4740) 和双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (D0011) 均购自北京索莱宝科技有限公司。Lipofectamine 3000 试剂 (L3000150)、TRIzol 试剂 (15596018CN) 和 PARIS™ 试剂盒 (AM1921) 均购自美国 Invitrogen 公司。Quantscript RT 试剂盒 (KR103) 和 FastUniversal SYBR Green PCR 试剂盒

(FP227) 购自天根生化科技(北京)有限公司。一抗 PCNA (ab18197)、Bcl-2 (ab32124)、Bax (ab32503)、PDL1 (ab205921) 和 GAPDH (ab9485) 均购自美国 Abcam 公司。

1.1.2 实验细胞 胃癌细胞系 HGC27 (CL-0107)、AGS (CL-0022) 和人胃上皮细胞 GES-1 (CL-0563) 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。HGC27 和 AGS 细胞培养基均为含有 10% FBS 和 1% P/S 双抗的 RPMI-1640 培养基,GES-1 细胞在培养基为含有 10% FBS 和 1% P/S 双抗的 Ham's F-12 培养基。细胞培养条件为 37 ℃ 和 5% CO₂。

1.2 方 法

1.2.1 细胞分组与转染处理 为探究 circ_0014130 与 miR-671-5p 在胃癌细胞中的作用,将 AGS 和 HGC27 细胞分组为 si-NC 组、si-circ_0014130 组、si-circ_0014130 + inhibitor NC 组和 si-circ_0014130 + miR-671-5p inhibitor 组。将对数生长期的 AGS 和 HGC27 细胞转接至 6 孔板,待细胞融合度达到 70% 左右,采用 Lipofectamine 3000 试剂进行转染处理。si-NC 组细胞转染 si-NC; si-circ_0014130 组细胞转染 si-circ_0014130; si-circ_0014130 + inhibitor NC 组细胞共转染 si-circ_0014130 和 inhibitor NC; si-circ_0014130 + miR-671-5p inhibitor 组细胞转染 si-circ_0014130 和 miR-671-5p inhibitor; 转染后培养 48 h,收集细胞采用 RT-qPCR 法验证转染效率。为探究 miR-671-5p 与 PDL1 在胃癌细胞中的作用,将 AGS 和 HGC27 细胞分为 mimic NC 组、miR-671-5p mimic 组、miR-671-5p mimic + pcDNA-NC 组和 miR-671-5p mimic + pcDNA-PDL1 组。将对数生长期的 AGS 和 HGC27 细胞转接至 6 孔板,待细胞融合度达到 70% 左右,采用 Lipofectamine 3000 试剂进行转染处理。mimic NC 组细胞转染 mimic NC; miR-671-5p mimic 组细胞转染 miR-671-5p mimic; miR-671-5p mimic + pcDNA-NC 组细胞共转染 miR-671-5p mimic 和 pcDNA-NC; miR-671-5p mimic + pcDNA-PDL1 组细胞转染 miR-671-5p mimic 和 pcDNA-PDL1; 转染后培养 48 h,收集细胞采用 RT-qPCR 法验证转染效率。

1.2.2 双荧光素酶报告基因实验 采用 TargetScanHuman 软件在线预测分析 circ_0014130 与 miR-671-5p,及 miR-671-5p 与 PDL1 的潜在结合位点。采用双荧光素酶报告基因检测进行实验验证,构建野生型 (WT) 荧光素酶报告质粒 WT-circ_0014130 与 WT-PDL1 3' UTR,及突变型 (MUT) 荧光素酶报告质粒 (Hanbio) MUT-circ_0014130 与 MUT-

PDL1 3' UTR, 分别与 miR-671-5p mimic 或 mimic NC 共转染至 AGS 和 HGC27 细胞, 然后采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒分析相对荧光素酶活性。

1.2.3 CCK-8 实验检测细胞活力 收集各组对数生长期细胞, 调整密度至 2×10^4 个/mL, 取 100 μ L 转接至 96 孔板, 培养至检测时, 每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂, 继续培养 2 h, 采用酶标仪分析波长 450 nm 处的吸光度。检测时间点设置为 0、24、48 和 72 h。

1.2.4 EdU 实验检测细胞增殖 收集各组对数生长期细胞, 调整密度至 1×10^5 个/mL, 转接至 6 孔板培养 24 h, 每孔加入等体积的 37 $^{\circ}$ C 条件下预热的 EdU 试剂后继续孵育 2 h。去除培养液后加入 1 mL 固定液室温孵育 15 min, 洗涤细胞后再加入 1 mL 通透液处理 15 min, 洗涤细胞后加入 0.5 mL 的反应液室温避光孵育 30 min, 洗涤细胞后加入 DAPI 试剂核染, 洗涤细胞后采用荧光显微镜进行观察和分析。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 收集转接后继续培养 48 h 的各组细胞, 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 溶液洗涤细胞, 加入稀释后的 Binding Buffer 调整细胞密度至 3×10^6 个/mL, 取 100 μ L 的细胞悬液加至 5 mL 流式管, 再依次加入 5 μ L 的 Annexin V/FITC 和 10 μ L 的 PI 试剂, 轻柔混匀后避光孵育 10 min, 采用流式细胞仪检测分析细胞凋亡水平。

1.2.6 Transwell 实验检测细胞侵袭 Transwell 小室上室预铺 Matrigel 基质胶凝固后备用。取各组对数生长期细胞, 采用不含 FBS 的培养基调整细胞密度至 1×10^5 个/mL, 取 200 μ L 细胞悬液加入上室, 下室中加入 600 μ L 培养基(含 10% FBS), 48 h 后取出小室, 采用细胞侵袭实验染色试剂盒所述方法进行染色处理, 然后镜检和细胞计数。

1.2.7 RT-qPCR 检测 RNA 表达水平 离心收集各组细胞, 采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 按照 PARIS 试剂盒说明书步骤, 分离 AGS 和 HGC27 细胞的细胞质和细胞核 RNA。采用 Quantscript RT 试剂盒合成 cDNA, 然后在 7500 检测系统(Applied Biosystems) 上用 FastUniversal SYBR Green PCR 试剂盒进行 PCR 反应。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 该过程循环 40 次。最后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 以 GAPDH 或 U6 为内参计算相对表达量。

1.2.8 蛋白质印迹检测蛋白表达水平 离心收集各组细胞, 采 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 经过 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 转移至硝酸纤维素膜并封闭处理。加入稀释后的一抗试剂: PCNA (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、Bax (1:1 000)、PDL1 (1:1 000) 和 GAPDH (1:5 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。再加入二抗试剂室温孵育 2 h, 采用 ECL 化学发光液显色, 成像后采用 Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计分析。计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 与 Tukey's 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circ_0014130 在胃癌细胞中高表达

与 GES-1 细胞比较, circ_0014130 在 AGS 和 HGC27 细胞中表达升高 ($P < 0.05$)。且与 AGS 和 HGC27 细胞核比较, circ_0014130 在其细胞质中表达水平更高 ($P < 0.05$)。见图 1。

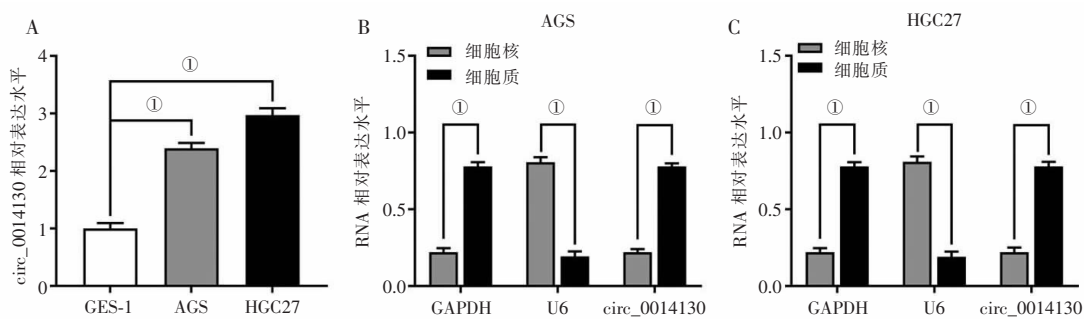


图 1 circ_0014130 在 AGS 和 HGC27 细胞中表达水平比较

A. circ_0014130 在 AGS 和 HGC27 细胞中表达水平; B. circ_0014130 在 AGS 细胞的细胞质和细胞核中表达水平;

C. circ_0014130 在 HGC27 细胞的细胞质和细胞核中表达水平。① $P < 0.05$ 。

2.2 circ_0014130 靶向调节 miR-671-5p

circ_0014130 与 miR-671-5p 存在结合位点, 双荧光素酶报告基因检测与 mimic NC 组相比, miR-671-5p mimics 和 WT-circ_0014130 共转染细胞中相

对荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$)。与 GES-1 细胞比较, miR-671-5p 在 AGS 和 HGC27 细胞中表达降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

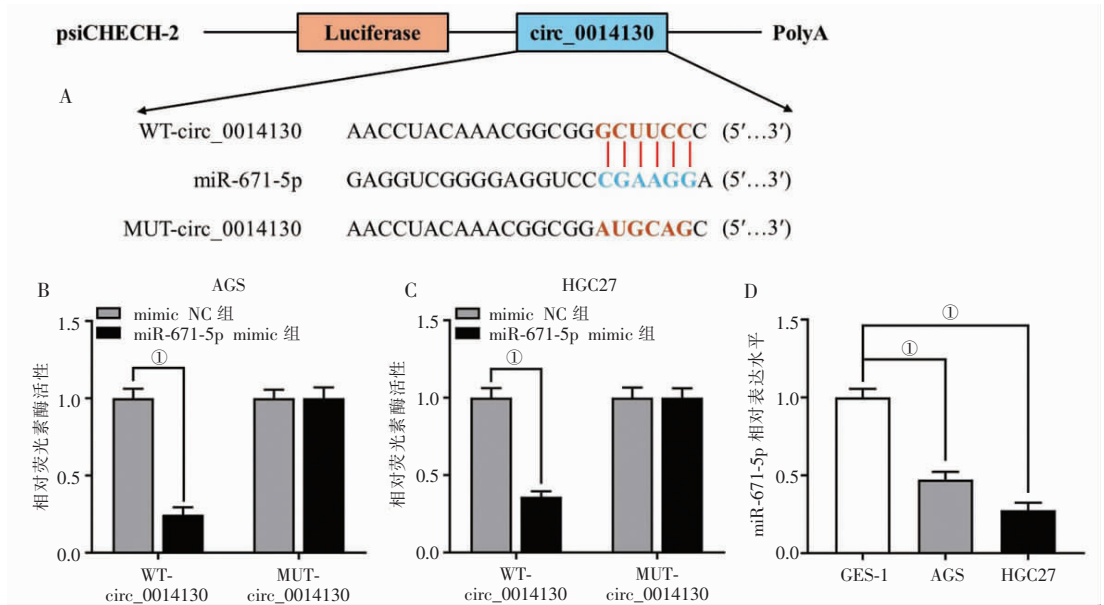


图 2 circ_0014130 与 miR-671-5p 靶向关系分析

A. circ_0014130 与 miR-671-5p 结合位点分析; B-C. 双荧光素酶报告基因检测分析; D. miR-671-5p 在各细胞中表达水平比较。① $P < 0.05$ 。

2.3 miR-671-5p 下调抵消 circ_0014130 敲除对胃癌细胞恶性生物学行为的抑制作用

与 si-NC 组比较, si-circ_0014130 组 AGS 和 HGC27 细胞增殖活力、EdU 阳性率、侵袭细胞数量及 PCNA 和 Bcl-2 蛋白相对表达水平均降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率和 Bax 蛋白相对表达水平均升

高 ($P < 0.05$)。与 si-circ_0014130 + inhibitor 组比较, si-circ_0014130 + miR-671-5p inhibitor 组 AGS 和 HGC27 细胞增殖活力、EdU 阳性率、侵袭细胞数量及 PCNA 和 Bcl-2 蛋白相对表达水平均升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率和 Bax 蛋白相对表达水平均降低 ($P < 0.05$)。见图 3-5。

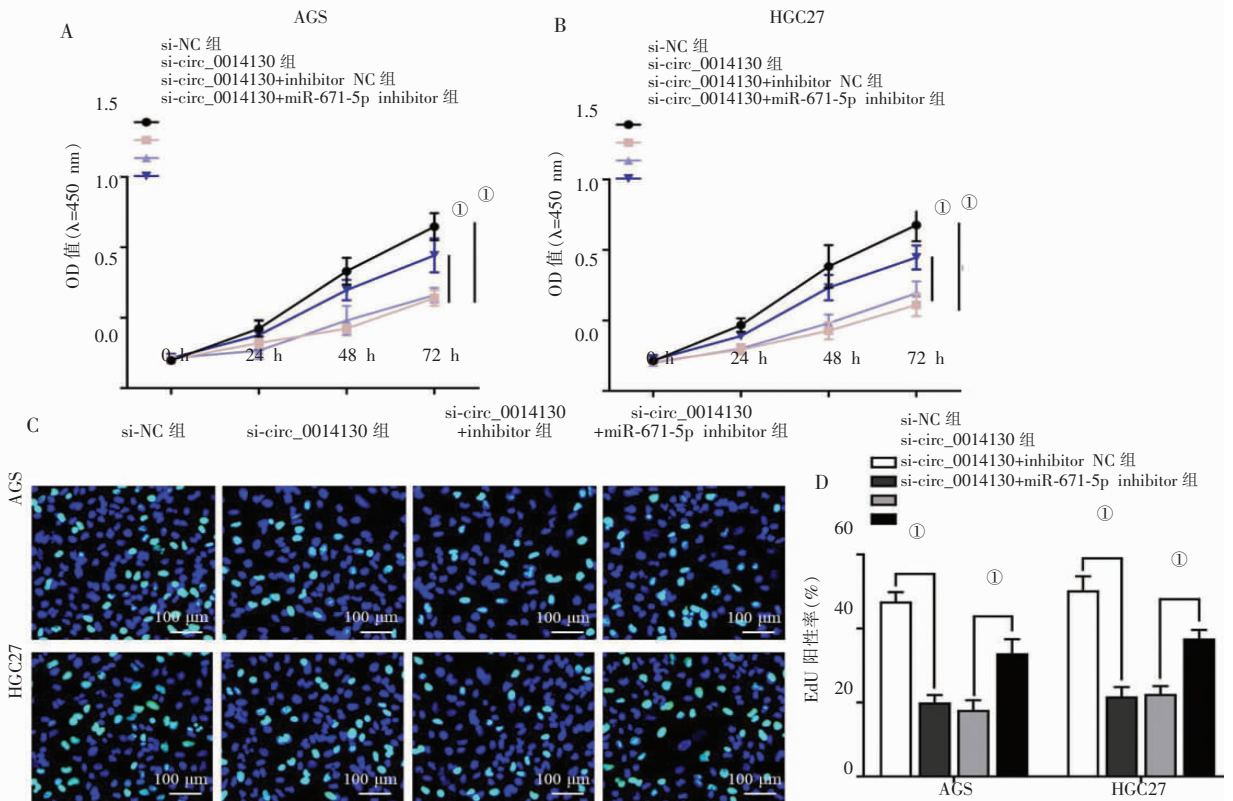


图 3 circ_0014130/miR-671-5p 调控对 AGS 和 HGC27 细胞增殖的影响

A-B. CCK-8 法检测 AGS 和 HGC27 细胞增殖活力; C-D. EdU 法检测 AGS 和 HGC27 细胞增殖。① $P < 0.05$ 。

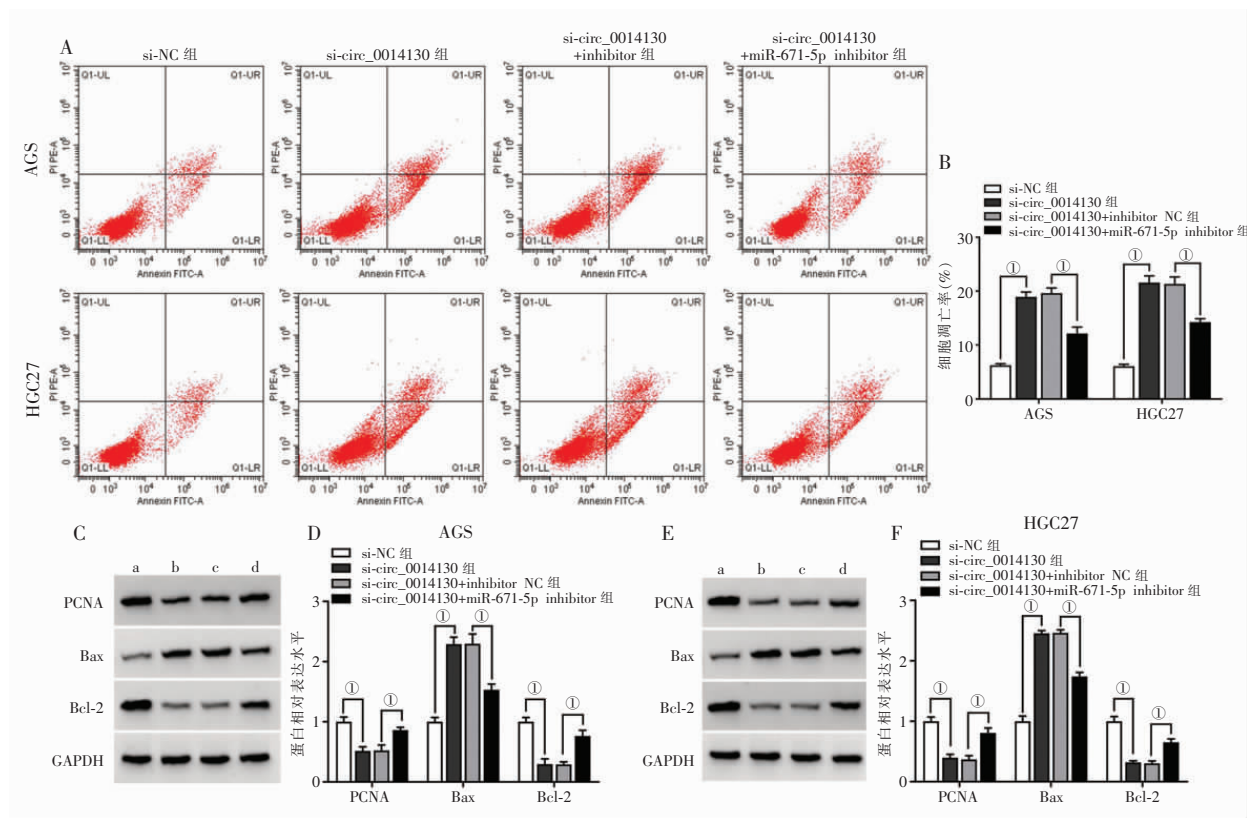


图4 circ_0014130/miR-671-5p 调控对 AGS 和 HGC27 细胞凋亡的影响

A-B. 流式细胞术检测 AGS 和 HGC27 细胞凋亡;C-F. AGS 和 HGC27 细胞凋亡相关蛋白表达水平分析。a:si-NC 组;b:si-circ_0014130 组;c:si-circ_0014130+inhibitor 组;d:si-circ_0014130+miR-671-5p inhibitor 组。① $P < 0.05$ 。

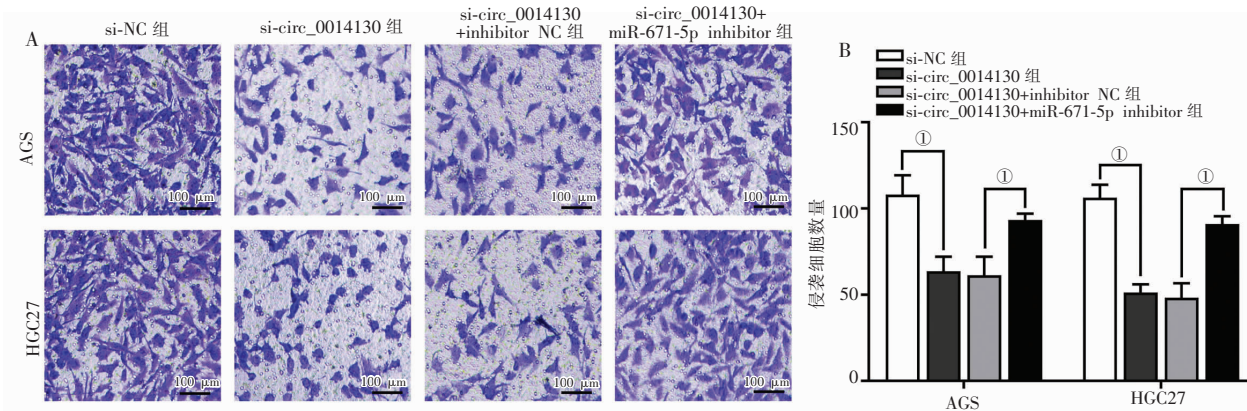


图5 circ_0014130/miR-671-5p 调控对 AGS 和 HGC27 细胞侵袭的影响

A. Transwell 实验检测 AGS 和 HGC27 细胞侵袭;B:AGS 和 HGC27 细胞侵袭数量统计分析。① $P < 0.05$ 。

2.4 miR-671-5p 靶向并负调控 PDL1 表达

miR-671-5p 与 PDL1 存在结合位点,双荧光素酶报告基因检测与 mimic NC 组相比,miR-671-5p mimic 和 WT-PDL1 3'UTR 共转染细胞中相对荧光素酶活性降低($P < 0.05$)。与 GES-1 细胞比较,PDL1 蛋白在 AGS 和 HGC27 细胞中表达升高($P < 0.05$)。与 mimic NC 组比较,miR-671-5p mimic 组 AGS 和 HGC27 细胞中 PDL1 蛋白相对表达水平均

降低($P < 0.05$)。与 miR-671-5p mimic + pcDNA-NC 组比较,miR-671-5p mimic + pcDNA-PDL1 组 AGS 和 HGC27 细胞中 PDL1 蛋白相对表达水平均升高($P < 0.05$)。见图 6 及图 7。

2.5 PDL1 过表达部分抵消 miR-671-5p 对胃癌细胞恶性生物学行为的抑制作用

与 mimic NC 组比较,miR-671-5p mimic 组 AGS 和 HGC27 细胞增殖活力、Edu 阳性率、侵袭细胞数

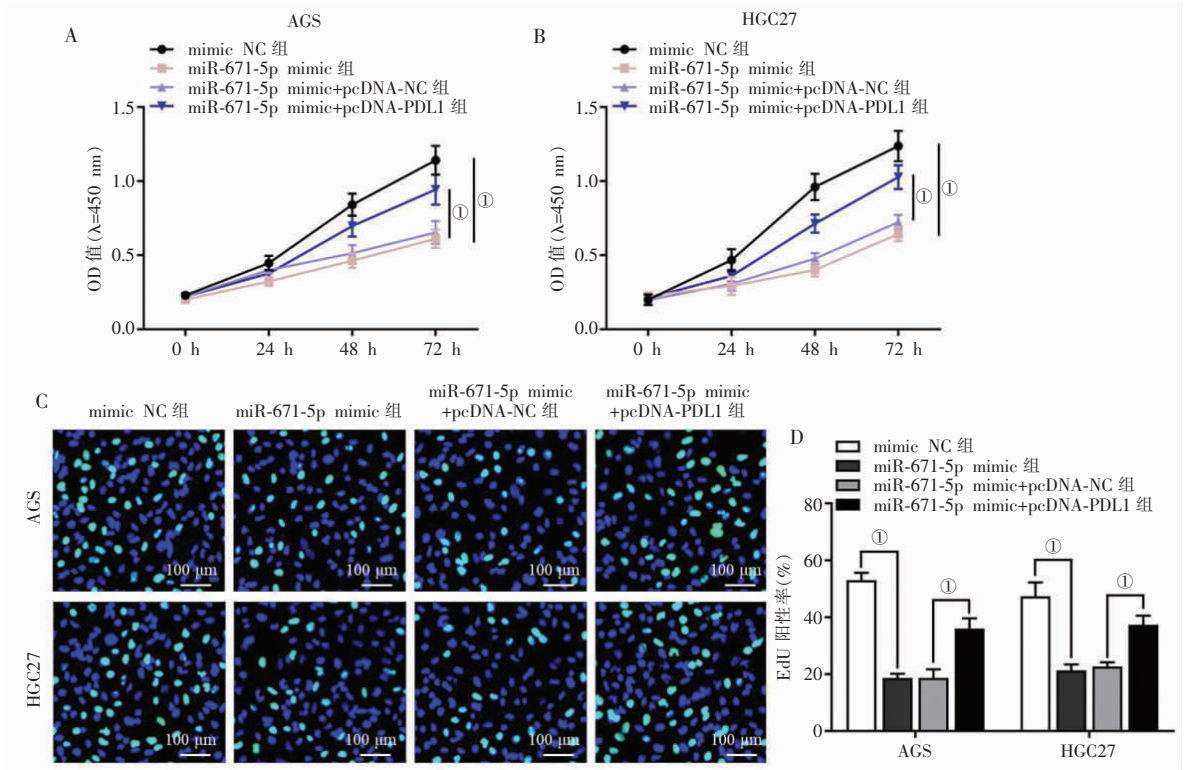


图 8 miR-671-5p/PDL1 调控对 AGS 和 HGC27 细胞增殖的影响

A-B. CCK-8 法检测 AGS 和 HGC27 细胞增殖活力;C-D. EdU 法检测 AGS 和 HGC27 细胞增殖。① $P < 0.05$ 。

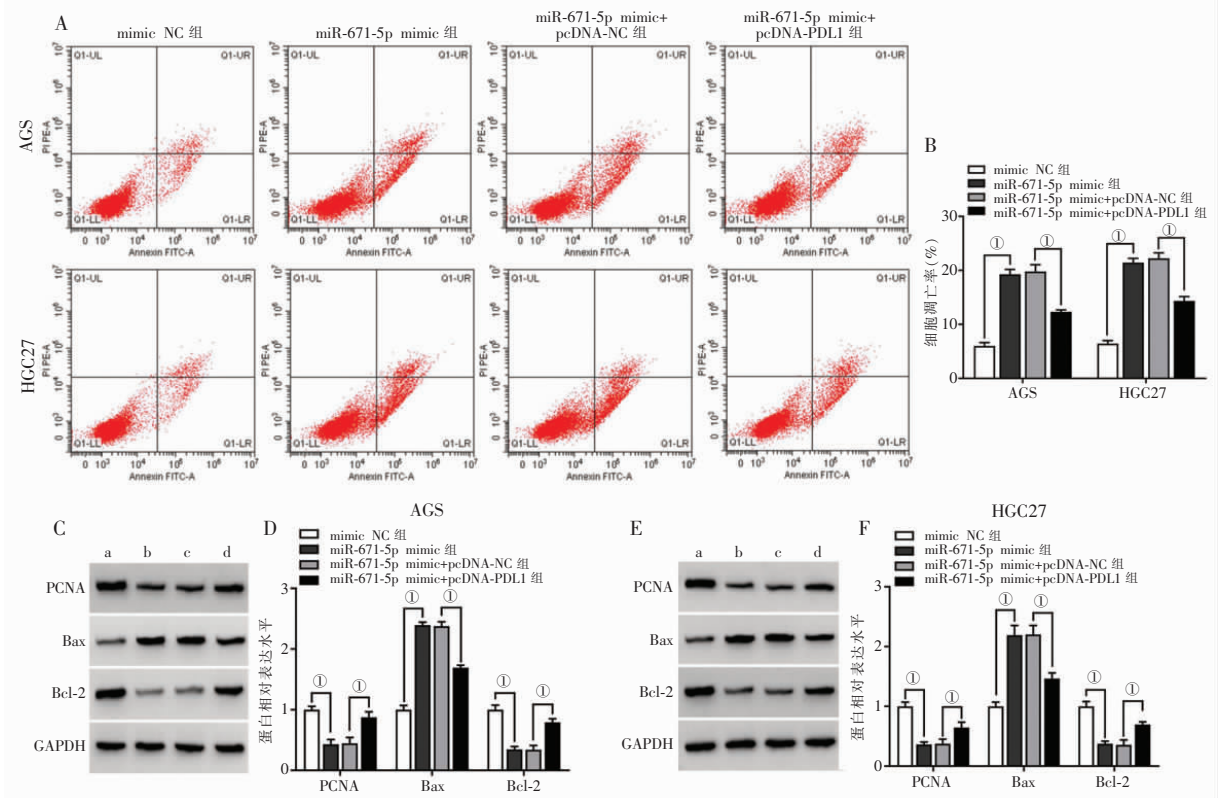


图 9 miR-671-5p/PDL1 调控对 AGS 和 HGC27 细胞凋亡的影响

A-B. 流式细胞术检测 AGS 和 HGC27 细胞凋亡;C-F. AGS 和 HGC27 细胞凋亡相关蛋白表达水平分析。a:mimic NC 组; b:miR-671-5p mimic 组;c:miR-671-5p mimic+pcDNA-NC 组;d:miR-671-5p mimic+pcDNA-PDL1 组。① $P < 0.05$ 。

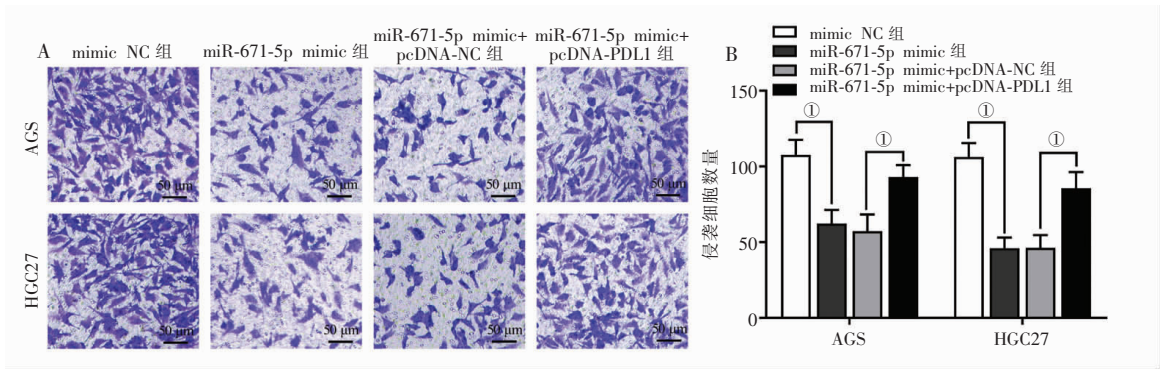


图 10 miR-671-5p/PDL1 调控对 AGS 和 HGC27 细胞侵袭的影响

A. Transwell 实验检测 AGS 和 HGC27 细胞侵袭; B. AGS 和 HGC27 细胞侵袭数量统计分析。① $P < 0.05$ 。

2.6 circ_0014130/miR-671-5p/PDL1 轴在胃癌细胞中的作用关系验证

与 si-NC 组比较, si-circ_0014130 组 AGS 和 HGC27 细胞中 PDL1 蛋白相对表达水平均降低

($P < 0.05$); 与 si-circ_0014130 + inhibitor 组比较, si-circ_0014130 + miR-671-5p inhibitor 组 AGS 和 HGC27 细胞中 PDL1 蛋白相对表达水平均升高 ($P < 0.05$)。见图 11。

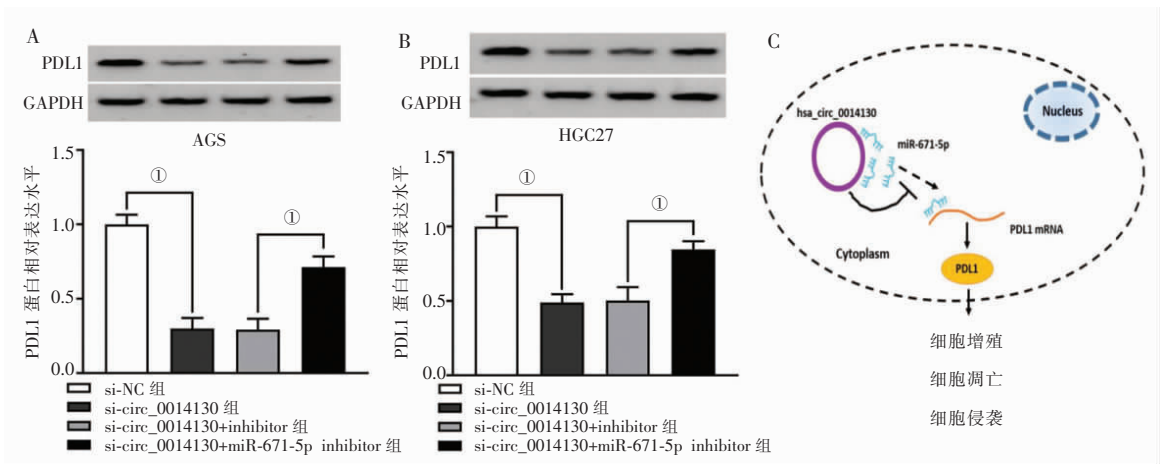


图 11 circ_0014130/miR-671-5p/PDL1 轴在胃癌细胞中的作用关系分析

A-B. AGS 和 HGC27 细胞中 PDL1 蛋白表达分析; C. circ_0014130/miR-671-5p/PDL1 轴在胃癌细胞中的作用关系分析。① $P < 0.05$ 。

3 讨论

尽管在 40 年前研究者就发现了 circRNA 的存在, 但当时被误解为剪接错误的副产品^[13]。随着测序技术与生物信息学技术的发展, 极大提高了研究人员对 circRNA 的认识^[14]。目前, 研究^[15]表明, 多数 circRNA 是普遍表达的 RNA 分子, 具有 miRNA 海绵、调控转录本可变剪接及调控蛋白质翻译等多种生物活性。事实上, 一些细胞和动物实验已经验证了 circRNA 在多种人类疾病中的重要性, 特别是恶性肿瘤^[16]。而 ceRNA 假说的提出在人类疾病研究领域引起了广泛关注, 该假说认为编码和非编码的 RNA 转录可通过 miRNA 反应元件实现相互调节^[17], 此机制被认为是 circRNA 在生物学中的主要调节机制^[18]。就胃癌而言, 近年来发现了越来越多的具有生物学和调控作用的 circRNA^[19]。Liu 等^[20]

研究证实, hsa_circ_0000670 缺乏会减少肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 减缓胃癌进展; Ma 等^[21]研究发现, hsa_circ_0004872 与 miR-224/Smad4/ADAR1 组成负调节环, 在胃癌中发挥肿瘤抑制因子的作用; Yao 等^[22]研究表明, circRNA_102191 通过调节 miR-493-3p/XPR1 轴和 M2 巨噬细胞极化来促进胃癌细胞的恶性生物学功能。

circ_0014130 在胃癌中具有重要作用, Ma 等^[9]研究发现 circ_0014130 在胃癌组织和细胞中明显高表达, 通过降低 circPIP5K1A 的表达可以抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 但 circ_0014130 在胃癌中的研究报道仍较少, 其潜在调控机制并未完全得以解析。在目前已报道的研究中, circ_0014130 作为一种有着环状结构的典型 circRNA, 被证明在多种肿瘤细胞中高表达, 如结肠癌^[23]、非小细胞肺癌^[24]和膀胱癌^[8]等。Du 等^[25]研究发现, 抑制 circ_

0014130 表达可通过调节 miR-545-3p/YAP1 轴抑制多西他赛耐药获得性 NSCLC 细胞的耐药性和恶性行为;Zan 等^[26]发现 hsa_circ_0014130 通过靶向 hsa-miR-566 增强 TWIST1 的表达来促进肺癌细胞的侵袭和增殖。本研究以胃癌细胞系 AGS 和 HGC27 细胞为研究对象,通过沉默 circ_0014130 表达发现 AGS 和 HGC27 细胞增殖和侵袭能力降低,凋亡水平升高;该结果表明 circ_0014130 参与了胃癌进展,而 circ_0014130 可能是胃癌治疗的潜在靶标。

circRNA 通常在细胞质中广泛吸附 miRNA^[27],因此,circRNA 的生物学功能需要细胞亚定位。本研究通过质核分离后检测 circ_0014130 表达水平,结果发现 circ_0014130 在细胞质中高表达。后续基于文献报道及 CircInteractome 数据库的分析,本研究发现 circ_0014130 与 miR-671-5p 具有结合位点,并采用双荧光素酶基因报告检测实验得以验证。进一步研究发现,胃癌细胞系 AGS 和 HGC27 中 miR-671-5p 表达水平显著升高,该结果与之前报道^[11]的研究结果一致。研究^[27]表明,异常表达的 miR-671-5p 可参与调节胃癌细胞生长、迁移和血管生成;Liu 等^[11]研究发现,上调 miR-671-5p 表达可以抑制胃癌细胞的增殖和转移。本研究进一步功能分析表明,抑制 miR-671-5p 表达能够逆转 circ_0014130 缺失对胃癌细胞恶性行为的抑制作用。引人注意的是,circ_0014130 通过吸附不同的 miRNA 促进胃癌、骨肉瘤和卵巢癌的细胞增殖能力^[28]。从本研究结果来看,circ_0014130 可能参与了多种肿瘤复杂的调控网络。

通常,miRNA 通过与靶基因结合来发挥生物学作用^[29]。本研究利用生物信息学工具搜索了 miR-671-5p 的下游靶基因,结果发现 PDL1 疑似 miR-671-5p 的靶标基因,这也与已报道的研究一致^[30]。PD-L1 蛋白通过磷酸化、棕榈酰化和泛素化的调控在肿瘤的发生发展中发挥促进作用^[31],Wang 等^[32]研究显示,Pumilio1 通过调节 NPM3/NPM1 轴促进 PD-L1 介导的胃癌免疫逃逸;Ma 等^[33]研究表明,TRIM28 通过增加 PD-L1 丰度促进胃癌细胞逃避免疫监视。目前,针对 PD-1/PD-L1 途径的治疗性抗体通过增强 T 细胞功能以恢复免疫反应,已有效地用于胃癌等癌症的临床治疗^[34]。本研究结果表明,PDL1 在胃癌中表达明显上调,研究表明 PDL1 表达异常可能参与调节胃癌进展,如细胞增殖和血管生成^[35]。Miao 等^[36]研究发现,hsa_circ_0136666 通过调节 miR-375/PRKDC 轴和 PD-L1 磷酸化抑制胃癌进展和肿瘤免疫逃逸。本研究数据表明,过表达 PDL1 可以部分消除 miR-671-5p 对胃癌细胞恶性行

为的抑制作用;而挽救实验结果表明,抑制 miR-671-5p 可逆转 circ_0014130 缺失引起的 PDL1 表达降低的现象,进一步证实了胃癌细胞中可能存在的 circ_0014130/miR-671-5p/PDL1 轴调控机制。

综上,circ_0014130 是胃癌进展的促进因子,可能通过调控 miR-671-5p/PDL1 轴促进胃癌细胞增殖和侵袭,并抑制胃癌细胞凋亡。circ_0014130 可作为胃癌临床治疗的潜在靶标,但考虑到研究水平的限制,未来需要在动物及临床层面开展更多的试验以验证 circ_0014130/miR-671-5p/PDL1 轴在胃癌治疗中的应用可能性。

参考文献

- [1] Siegel R, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2024, 74: 12-49.
- [2] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA, 2024, 74(3): 229-263.
- [3] Guan WL, He Y, Xu RH. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives [J]. Journal of Hematology & Oncology, 2023, 16(1): 57.
- [4] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648.
- [5] Panni S, Lovering RC, Porras P, et al. Non-coding RNA regulatory networks [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 2020, 1863(6): 194417.
- [6] Belousova EA, Filipenko ML, Kushlinskii NE. Circular RNA: new regulatory molecules [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2018, 164(6): 803-815.
- [7] Bu X, Chen Z, Zhang A, et al. Circular RNA circAFF2 accelerates gastric cancer development by activating miR-6894-5p and regulating ANTXR 1 expression [J]. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 2021, 45(3): 101671.
- [8] Li G, Guo BY, Wang HD, et al. CircRNA hsa_circ_0014130 function as a miR-132-3p sponge for playing oncogenic roles in bladder cancer via upregulating KCNJ12 expression [J]. Cell Biology and Toxicology, 2022, 38(6): 1079-1096.
- [9] Ma Y, Cong X, Zhang Y, et al. CircPIP5K1A facilitates gastric cancer progression via miR-376c-3p/ZNF146 axis [J]. Cancer Cell International, 2020, 20: 81.
- [10] Wang WJ, Yuan Y, Zhang D, et al. MiR-671-5p repressed progression of papillary thyroid carcinoma via TRIM14 [J]. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2021, 37(11): 983-990.
- [11] Liu H, Liu X. LINC01207 is up-regulated in gastric cancer tissues and promotes disease progression by regulating miR-671-5p/DDX5 axis [J]. Journal of Biochemistry, 2021, 170(3): 337-347.
- [12] Chen K, Wang X, Yang L, et al. The anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy for gastric esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis and literature review [J]. Cancer Control, 2021, 28: 1073274821997430.
- [13] Cocquerelle C, Mascrez B, Hétiun D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules [J]. FASEB Journal, 1993, 7(1):

- 155 - 160.
- [14] López-Jiménez E, Rojas AM, Andrés-León E. RNA sequencing and prediction tools for circular RNAs analysis[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018, 1087:17 - 33.
- [15] Xiao MS, Ai Y, Wilusz JE. Biogenesis and functions of circular RNAs come into focus[J]. *Trends in Cell Biology*, 2020, 30(3): 226 - 240.
- [16] Chen L, Shan G. CircRNA in cancer: Fundamental mechanism and clinical potential[J]. *Cancer Letters*, 2021, 505:49 - 57.
- [17] Ye J, Li J, Zhao P. Roles of ncRNAs as ceRNAs in gastric cancer [J]. *Genes*, 2021, 12(7): 1036.
- [18] Panda AC. Circular RNAs act as miRNA sponges[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018, 1087:67 - 79.
- [19] Li R, Jiang J, Shi H, *et al.* CircRNA: a rising star in gastric cancer [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77(9): 1661 - 1680.
- [20] Liu P, Cai S, Li N. Circular RNA-hsa-circ-0000670 promotes gastric cancer progression through the microRNA-384/SIX4 axis[J]. *Experimental Cell Research*, 2020, 394(2): 112141.
- [21] Ma C, Wang X, Yang F, *et al.* Circular RNA hsa_circ_0004872 inhibits gastric cancer progression via the miR-224/Smad4/ADAR1 successive regulatory circuit[J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19(1): 157.
- [22] Yao M, Mao X, Zhang Z, *et al.* Tumor-derived CircRNA_102191 promotes gastric cancer and facilitates M2 macrophage polarization [J]. *Cell Cycle*, 2023, 22(18): 2003 - 2017.
- [23] Wang W, Zhou L, Li Z, *et al.* Circ_0014130 is involved in the drug sensitivity of colorectal cancer through miR-197-3p/PFKFB3 axis [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2022, 37(5): 908 - 918.
- [24] Wang M, Shi J, Jiang H, *et al.* Circ_0014130 participates in the proliferation and apoptosis of nonsmall cell lung cancer cells via the miR-142-5p/IGF-1 axis [J]. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2020, 35(3): 233 - 240.
- [25] Du D, Cao X, Duan X, *et al.* Blocking circ_0014130 suppressed drug resistance and malignant behaviors of docetaxel resistance-acquired NSCLC cells via regulating miR-545-3p-YAP1 axis [J]. *Cytotechnology*, 2021, 73(4): 571 - 584.
- [26] Zan SJ, Zhao Y, Fang T, *et al.* Expression of circular RNA hsa_circ_0014130 in lung adenocarcinoma cell lines and its effect on proliferation and invasion of lung adenocarcinoma cell line [J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2019, 48(12): 934 - 939.
- [27] Ren J, Pan G, Yang J, *et al.* Circ_0000620 acts as an oncogenic factor in gastric cancer through regulating MMP2 expression via sponging miR-671-5p [J]. *Journal of Biological Research*, 2021, 28(1): 23.
- [28] Shi P, Li Y, Guo Q. Circular RNA circPIP5K1A contributes to cancer stemness of osteosarcoma by miR-515-5p/YAP axis [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2021, 19(1): 464.
- [29] Dexheimer PJ, Cochella L. MicroRNAs: from mechanism to organism [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 409.
- [30] Xing X, Guo J, Ding G, *et al.* Analysis of PD1, PDL1, PDL2 expression and T cells infiltration in 1014 gastric cancer patients [J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(3): e1356144.
- [31] Wang Y, Sun Q, Mu N, *et al.* The deubiquitinase USP22 regulates PD-L1 degradation in human cancer cells [J]. *Cell Communication and Signaling*, 2020, 18(1): 112.
- [32] Wang H, Zhou Z, Zhang J, *et al.* Pumilio1 regulates NPM3/NPM1 axis to promote PD-L1-mediated immune escape in gastric cancer [J]. *Cancer Letters*, 2024, 581: 216498.
- [33] Ma X, Jia S, Wang G, *et al.* TRIM28 promotes the escape of gastric cancer cells from immune surveillance by increasing PD-L1 abundance [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8(1): 246.
- [34] Yu X, Zhai X, Wu J, *et al.* Evolving perspectives regarding the role of the PD-1/PD-L1 pathway in gastric cancer immunotherapy [J]. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, 2024, 1870(1): 166881.
- [35] Chen B, Gao A, Tu B, *et al.* Metabolic modulation via mTOR pathway and anti-angiogenesis remodels tumor microenvironment using PD-L1-targeting codelivery [J]. *Biomaterials*, 2020, 255: 120187.
- [36] Miao Z, Li J, Wang Y, *et al.* Hsa_circ_0136666 stimulates gastric cancer progression and tumor immune escape by regulating the miR-375/PRKDC Axis and PD-L1 phosphorylation [J]. *Molecular Cancer*, 2023, 22(1): 205.

(收稿日期: 2024 - 10 - 18

修回日期: 2024 - 11 - 20)