doi:10.11659/jjssx.12E022012

·基础研究·

circDCUN1D4调节miR-18a-5p/FBP1轴对肺癌细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响

史春辉[1],蔺建平[2],吴 超[3] (1.宝鸡市中医医院肿瘤科,陕西 宝鸡 721000;2.宝鸡市中医医院呼吸与危重症医学科,陕西 宝鸡 721000;3.西安国际医学中心医院呼吸内科,陕西 西安 710000)

[摘 要] **目的** 探讨环状RNA(circRNA)DCUN1D4调节微小RNA(miR)-18a-5p/果糖-1,6-二磷酸酶1(FBP1)轴对肺癌细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响。**方法** 选取人肺癌细胞系(H1975、H1650、A549、SPCA-1)和人正常肺表皮细胞(HPL-1),qRT-PCR检测各种细胞中circDCUN1D4、miR-18a-5p、FBP1 mRNA表达水平。取对数生长期的A549细胞并分为空白组、circDCUN1D4过表达质粒(circDCUN1D4)组、过表达质粒阴性对照(NC)组、circDCUN1D4+miR-18a-5p模拟物阴性对照(circDCUN1D4+mimics NC)组、circDCUN1D4+miR-18a-5p模拟物(circDCUN1D4+miR-18a-5p mimics)组。CCK-8法检测各组A549细胞活力,流式细胞术检测各组A549细胞凋亡水平,qRT-PCR检测各组A549细胞中circDCUN1D4、miR-18a-5p、FBP1 mRNA表达水平,Western blot检测各组A549细胞中FBP1、caspase-3、Ki67、增殖细胞核抗原(PCNA)及程序性死亡分子配体-1(PD-L1)表达水平,双荧光素酶实验验证miR-18a-5p分别与circDCUN1D4、FBP1的靶向关系。**结果** 与HPL-1细胞相比,人肺癌细胞系中circDCUN1D4、FBP1 mRNA表达显著下降($P<0.05$),miR-18a-5p表达显著增加($P<0.05$)。miR-18a-5p分别与circDCUN1D4、FBP1存在靶向关系。与空白组、NC组相比,circDCUN1D4组细胞24 h和48 h的OD值、Ki67、PCNA、miR-18a-5p、PD-L1表达显著降低($P<0.05$),细胞凋亡率、circDCUN1D4、FBP1、caspase-3表达显著增加($P<0.05$);过表达miR-18a-5p逆转了circDCUN1D4对肺癌细胞恶性行为的抑制作用($P<0.05$)。**结论** circDCUN1D4过表达可以促进肺癌细胞凋亡,抑制肺癌细胞增殖及免疫逃逸,其作用机制可能与调控miR-18a-5p/FBP1轴有关。

[关键词] circDCUN1D4;miR-18a-5p/FBP1轴;肺癌;增殖;凋亡;免疫逃逸

[中图分类号] R734.2 [文献标志码] A [收稿日期] 2022-12-02

Effect of circDCUN1D4 on proliferation, apoptosis and immune escape of lung cancer cells by regulating the miR-18a-5p/FBP1 axis

SHI Chun-hui[1], LIN Jian-ping[2], WU Chao[3] (1. Department of Oncology, Baoji Traditional Chinese Medicine Hospital, Baoji Shaanxi 721000, China; 2. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Baoji Traditional Chinese Medicine Hospital, Baoji Shaanxi 721000, China; 3. Department of Respiratory Medicine, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an Shaanxi 710000, China)

Abstract: Objective To investigate the influences of circular RNA (circRNA) DCUN1D4 on the proliferation, apoptosis and immune escape of lung cancer cells by regulating the microRNA (miR)-18a-5p/fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1) axis. **Methods** The human lung cancer cell lines H1975, H1650, A549 and SPCA-1 and human normal lung epidermal cells HPL-1 were selected, qRT-PCR was used to detect the expression levels of circDCUN1D4, miR-18a-5p and FBP1 mRNA in various cells. A549 cells in logarithmic growth phase were selected and divided into the blank group, circDCUN1D4 overexpression plasmid (circDCUN1D4) group, overexpression plasmid negative control (NC) group, circDCUN1D4+miR-18a-5p mimics negative control (circDCUN1D4+mimics NC) group, and circDCUN1D4+miR-18a-5p mimics group. The cell viability of each group was detected by CCK-8 method, the cell apoptosis was detected by flow cytometry, the expression levels of circDCUN1D4, miR-18a-5p and FBP1 mRNA of cells in each group were detected by qRT-PCR, the expression levels of FBP1, caspase-3, Ki67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and programmed death ligand-1 (PD-L1) were detected by Western blot, the targeting relationships of miR-18a-5p with circDCUN1D4 and FBP1 were verified by dual luciferase assay. **Results** Compared with HPL-1 cells, the mRNA expressions of circDCUN1D4 and FBP1 were significantly decreased ($P<0.05$), and the expression of miR-18a-5p was significantly increased ($P<0.05$). miR-18a-5p had targeting relationships with circDCUN1D4 and FBP1, respectively. Compared with the blank group and NC group, the OD values at 24 hours and 48 hours, and the expressions of Ki67, PCNA, miR-18a-5p and PD-L1 of cells in the circDCUN1D4 group were significantly decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate, and the expressions of circDCUN1D4, FBP1 and caspase-3 were significantly increased ($P<0.05$). Overexpression of miR-18a-5p reversed the inhibitory effect of circDCUN1D4 on the malignant behavior of lung cancer cells ($P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of circDCUN1D4 can promote lung cancer cell apoptosis, inhibit lung cancer cell proliferation and immune escape, and its mechanism may be related to the regulation of miR-18a-5p/FBP1 axis.

Keywords: circDCUN1D4; miR-18a-5p/FBP1 axis; lung cancer; proliferation; apoptosis; immune escape

[基金项目] 陕西省自然科学基础研究计划项目(S2021-JC-QN-2452)

[通信作者] 蔺建平,E-mail:iqqnu61@163.com

肺癌是全球癌症死亡的最常见原因，预计到2050年，全球癌症发生率将翻倍，而肺癌居首位[1-2]，其总体发病率、病死率均居我国恶性肿瘤首位，故肺癌的早期诊断至关重要[3]。环状RNAs（circular RNAs, circRNAs）包含一类具有共价闭合单链环构象的调节RNA，由外显子5~7的前体mRNA反向剪接产生[4]。circRNAs参与多种生物学过程，如自身免疫性疾病、大脑发育等[5]。circRNAs的作用已在各种类型的癌症中证实，因此其可能是潜在的治疗靶点或生物标志物，而circDCUN1D4作为circRNAs中的一员，在癌症中的作用少见报道[6]。微小RNA（microRNA,miRNA）主要通过与mRNA的3′-非翻译区结合进而诱导mRNA降解或抑制翻译[7]。miR-18a-5p在卵巢癌等癌症中异常表达，且研究显示，果糖-1,6-二磷酸酶1（fructose-1,6-bisphosphatase 1,FBP1）为miR-18a-5p的下游靶基因，但miR-18a-5p能否通过调节FBP1表达在肺癌中发挥作用尚不清楚[8]。因此，本研究探讨circDCUN1D4调节miR-18a-5p/FBP1轴对肺癌细胞增殖、凋亡和免疫逃逸的影响，以期为肺癌的基础研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

人肺癌细胞系（H1975、H1650、A549和SPCA-1）和人正常肺表皮细胞系HPL-1购自美国典型培养物保藏中心。

1.2 主要试剂、仪器

circDCUN1D4过表达质粒（circDCUN1D4）及过表达质粒阴性对照（NC）购自上海汉恒生物科技有限公司；miR-18a-5p模拟物阴性对照（mimics NC）、miR-18a-5p模拟物（miR-18a-5p mimics）购自广州锐博生物科技有限公司；Trizol试剂购自上海生工生物科技有限公司；PrimeScript RT Master Mix检测试剂盒、qRT-PCR试剂盒购自日本Takara Biotech公司；CCK-8测定试剂盒购自日本Dojindo公司；Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD Pharmingen公司；双荧光素酶试剂盒购自美国Promega公司；Invitrogen Lipofectamine™ 2000转染试剂购自美国Life Technologies公司；RIPA裂解缓冲液购自江苏康为世纪生物公司；FBP1、caspase-3、Ki67、增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen,PCNA）及程序性死亡分子配体-1（programmed death-ligand 1, PD-L1）一抗购自英国Abcam公司。

FLx8多功能酶标仪购自美国BioTek公司；MoFlo XDP流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

1.3 细胞培养、转染

H1975、H1650、A549、HPL-1、SPCA-1细胞置于含10%胎牛血清的DMEM培养基中，并于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养，经胰蛋白酶消化后，进行传代培养。取对数生长期的A549细胞，采用Invitrogen Lipofectamine™ 2000进行转染，然后分为空白组（不转染）、NC组（转染NC）、circDCUN1D4组（转染circDCUN1D4）、circDCUN1D4+mimics NC组（共转染circDCUN1D4和mimics NC）、circDCUN1D4+miR-18a-5p mimics组（共转染circDCUN1D4和miR-18a-5p mimics），转染48 h后，收集细胞用于后续研究。

1.4 qRT-PCR检测circDCUN1D4、miR-18a-5p、FBP1 mRNA表达水平

使用TRIzol试剂分离总RNA，使用PrimeScript RT Master Mix试剂盒对circRNA、miRNA、mRNA进行定量。按照逆转录试剂盒说明书合成cDNA，根据试剂盒说明书进行qRT-PCR。使用ABI 7500 qPCR仪检测circDCUN1D4、miR-18a-5p、FBP1 mRNA表达，其中circDCUN1D4、FBP1 mRNA以GAPDH为内参；miR-18a-5p以U6为内参，均采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行计算。引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	序列（5′-3′）
circDCUN1D4	F:TGCAGGCAGTGGACAAGAAA
	R:GGATCTTGCTGACCACGACA
miR-18a-5p	F:TAAGGTGCATCTAGTGCAGATAG
	R:GCAGGGTCCGAGGTATTC
FBP1 mRNA	F:CGCGCACCTCTATGGCATT
	R:TTCTTCTGACACGAGAACACAC
GAPDH	F:GGTCGGAGTCAACGGATTTG
	R:ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT
U6	F:GACTATCATATGCTTACCGT
	R:GGGCAGGAAGAGGGCCTAT

1.5 CCK-8法检测细胞活力

将各组细胞接种于96孔板，于37 ℃、5% CO_2培养48 h，然后与10 μL CCK-8共孵育2 h，酶标仪检测0 h、24 h、48 h时450 nm波长处的OD值。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡水平

细胞转染48 h后，收集细胞，并与PI、Annexin V-FITC室温避光孵育20 min。然后通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.7 验证miR-18a-5p分别与circDCUN1D4、FBP1的靶向关系

通过Starbase数据库预测miR-18a-5p分别与circDCUN1D4、FBP1的结合位点。细胞接种于96孔板中，将构建的circDCUN1D4、FBP1野生（WT）及突变（MUT）报告质粒分别与miR-18a-5p mimics或mimics

NC共转染到A549细胞中,48 h后检测荧光素酶活性。

1.8　Western blot检测相关蛋白表达

收集细胞,并在预冷的细胞裂解缓冲液中裂解,然后在4 ℃下以13 000 r/min离心10 min。取上清液进行BCA蛋白定量。将上样缓冲液添加到等量的蛋白样品中并煮沸5 min。样品于SDS-PAGE进行凝胶电泳分离(120 mV),随后用半干法进行电转移到硝酸纤维素膜上。用5%脱脂牛奶室温封闭膜1 h,然后与FBP1(1∶1 000)、caspase-3(1∶1 000)、Ki67(1∶2 000)、PCNA(1∶1 000)、PD-L1(1∶1 000)一抗4 ℃孵育过夜。TBST洗膜3次,室温下与二抗(1∶2 000)孵育1 h。通过电化学发光系统对蛋白条带进行可视化,以β-actin为内参,Image J软件测量灰度值以评估蛋白相对表达。

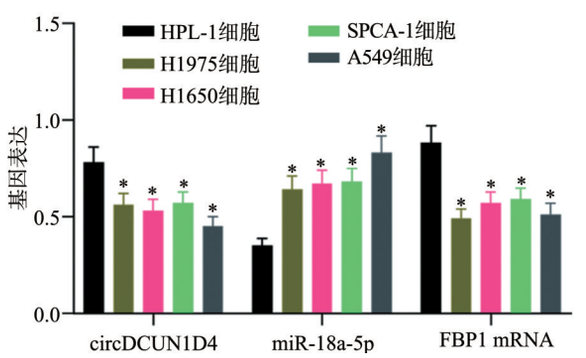
1.9　统计学分析

采用SPSS 21.0软件进行统计学分析,结果以均数±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。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　各细胞中circDCUN1D4、miR-18a-5p、FBP1 mRNA表达水平

与人正常肺表皮细胞HPL-1相比,人肺癌细胞系(H1975、H1650、A549、SPCA-1)中circDCUN1D4、FBP1表达显著降低($P<0.05$),miR-18a-5p表达显著增加($P<0.05$),其中A549细胞差异最显著,故选择其进行后续实验,见图1。

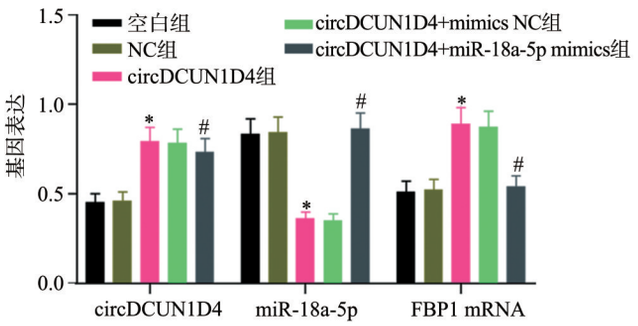


*:与HPL-1细胞比较,$P<0.05$

图1　各细胞中circDCUN1D4、miR-18a-5p、FBP1 mRNA表达水平比较

2.2　各组A549细胞中circDCUN1D4、miR-18a-5p、FBP1表达水平

与空白组、NC组相比,circDCUN1D4组细胞中circDCUN1D4、FBP1表达显著增加($P<0.05$),miR-18a-5p表达显著降低($P<0.05$);与circDCUN1D4+mimics NC组相比,circDCUN1D4+miR-18a-5p mimics组细胞中circDCUN1D4、FBP1表达显著降低($P<0.05$),miR-18a-5p表达显著增加($P<0.05$),见图2。

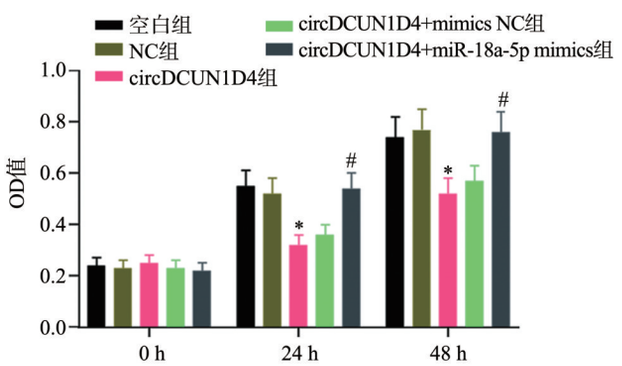


*:与空白组、NC组比较,$P<0.05$;#:与circDCUN1D4+mimics NC组比较,$P<0.05$

图2　各组A549细胞中circDCUN1D4、miR-18a-5p、FBP1表达水平比较

2.3　各组A549细胞的增殖活性

与空白组、NC组相比,circDCUN1D4组细胞中24 h、48 h的OD值显著降低($P<0.05$);与circDCUN1D4+mimics NC组相比,circDCUN1D4+miR-18a-5p mimics组细胞中24 h、48 h的OD值显著增加($P<0.05$),见图3。



*:与空白组、NC组比较,$P<0.05$;#:与circDCUN1D4+mimics NC组比较,$P<0.05$

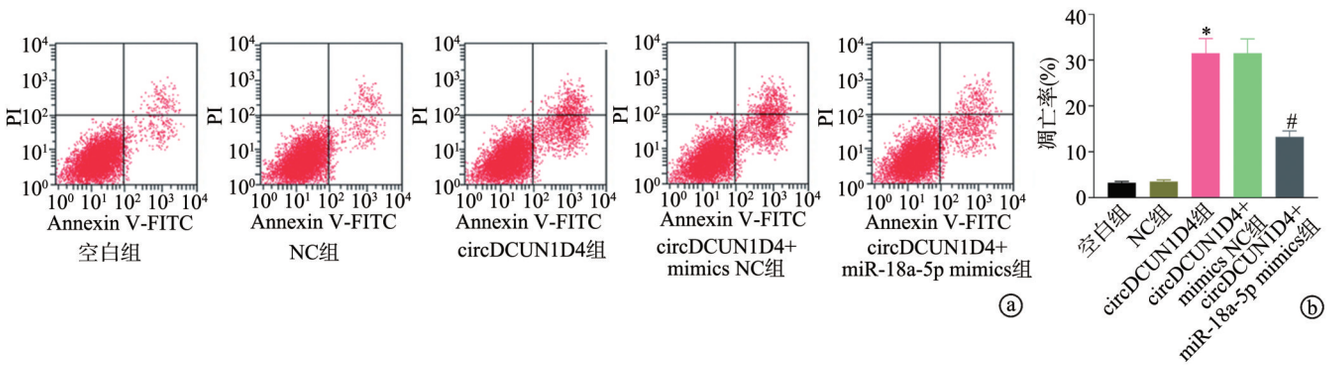
图3　各组A549细胞在0 h、24 h、48 h的OD值比较

2.4　各组A549细胞的凋亡情况

与空白组、NC组相比,circDCUN1D4组细胞凋亡率显著增加($P<0.05$);与circDCUN1D4+mimics NC组相比,circDCUN1D4+miR-18a-5p mimics组细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),见图4。

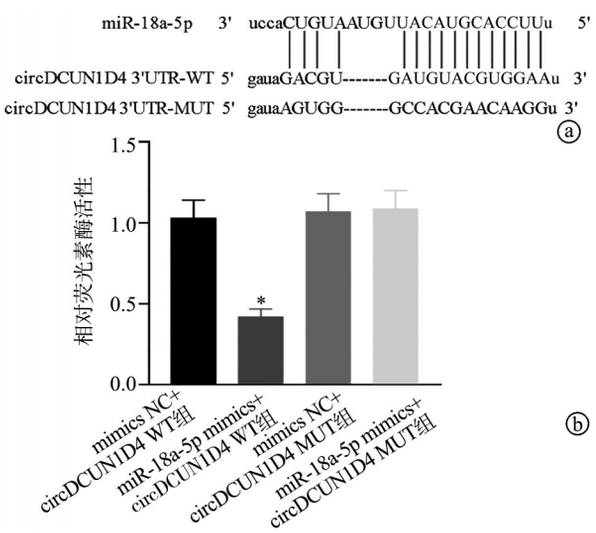
2.5　miR-18a-5p与circDCUN1D4的靶向关系

miR-18a-5p与circDCUN1D4存在结合位点,见图5a。与mimics NC+circDCUN1D4 WT组相比,miR-18a-5p mimics+circDCUN1D4 WT组细胞相对荧光素酶活性降低($P<0.05$);与mimics NC+circDCUN1D4 MUT组相比,miR-18a-5p mimics+circDCUN1D4 MUT组细胞相对荧光素酶活性差异无统计学意义($P>0.05$),见图5b。



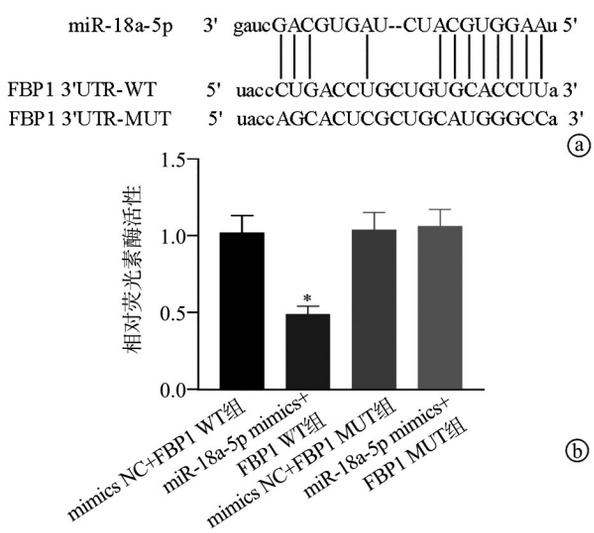
a:各组流式细胞图;b:细胞凋亡定量图　*:与空白组、NC组比较,$P<0.05$;#:与circDCUN1D4+mimics NC组比较,$P<0.05$

图4　各组细胞凋亡变化



a:miR-18a-5p与circDCUN1D4的结合位点;b:各组细胞荧光素酶活性　*:与mimics NC+circDCUN1D4 WT组比较,$P<0.05$

图5　miR-18a-5p与circDCUN1D4的靶向关系



a:miR-18a-5p与FBP1的结合位点;b:各组细胞荧光素酶活性　*:与mimics NC+FBP1 WT组比较,$P<0.05$

图6　miR-18a-5p与FBP1的靶向关系

2.6　miR-18a-5p与FBP1的靶向关系

miR-18a-5p与FBP1存在结合位点,见图6a。与mimics NC+FBP1 WT组相比,miR-18a-5p mimics+FBP1 WT组细胞相对荧光素酶活性降低($P<0.05$);与mimics NC+FBP1 MUT组相比,miR-18a-5p mimics+FBP1 MUT组细胞相对荧光素酶活性差异无统计学意义($P>0.05$),见图6b。

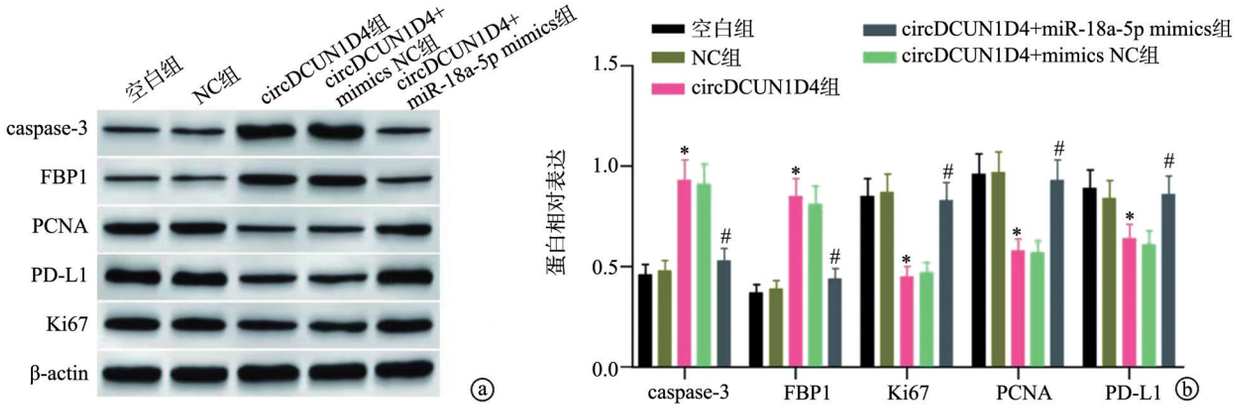
2.7　各组细胞相关蛋白表达

与空白组、NC组相比,circDCUN1D4组细胞Ki67、PCNA、PD-L1表达显著降低($P<0.05$),FBP1、caspase-3表达显著增加($P<0.05$);与circDCUN1D4+mimics NC组相比,circDCUN1D4+miR-18a-5p mimics组细胞Ki67、PCNA、PD-L1表达显著增加($P<0.05$),FBP1、caspase-3表达显著降低($P<0.05$),见图7。

3　讨论

肺癌是世界范围内最常见的癌症和癌症患者死亡的主要原因[9],其5年生存率约为19%[10]。由于大部分肺癌患者诊断时已为晚期,难以采用手术治疗;基于分子和基因水平的精准治疗成为目前肺癌治疗的研究热点。因此,了解肺癌的发生机制及找到潜在的治疗靶点对于疾病的精准治疗至关重要[11]。

circRNAs是一类新发现的在真核细胞中广泛表达的RNA,通过非规范剪接形成,可对抗外切酶降解[12]。circRNAs与各种疾病的发展密切相关,尤其是癌症[13]。研究表明,circRNA-002178在肺腺癌组织及细胞中表达上调,其可作为肺腺癌早期诊断的生物标志物[14]。circDCUN1D4来源于DCUN1D4基因的外显子区域。Liang等[15]研究发现,circDCUN1D4在肿瘤样本中下调,其通过稳定TXNIP mRNA抑制肺腺癌中的糖酵解和肿瘤转移,可作为肺腺癌的治疗靶点。本研究发现,人肺癌细胞系中circDCUN1D4表达较人正常肺表皮细胞显著降低,与Liang等[15]研究结果一致,表明circDCUN1D4的下调与肺癌的发展密切相关;过表



a:蛋白条带灰度图;b:蛋白定量图 *:与空白组、NC组比较,$P<0.05$;#:与circDCUN1D4+mimics NC组比较,$P<0.05$

图7 Western blot检测各组细胞相关蛋白表达

达circDCUN1D4后,细胞增殖活力及增殖相关蛋白Ki67、PCNA显著降低,细胞凋亡率及促凋亡相关蛋白caspase-3显著升高,表明上调circDCUN1D4可以抑制肺癌细胞增殖,促进其凋亡,其可能是肺癌的潜在治疗靶点。

miRNAs参与调节细胞分化、代谢和肿瘤发生等过程[16]。如miR-18a-5p在多种肿瘤中异常表达。在肝癌细胞中miR-18a-5p显著高表达,转染miR-18a-5p mimics后可促进肝癌的进展,而抑制miR-18a-5p表达后,肝癌细胞的生长亦受到抑制[17]。Guo等[18]研究表明,在黑色素瘤组织和细胞系中miR-18a-5p表达显著升高,并通过靶向抑制EPHA7表达促进黑色素瘤细胞增殖并抑制细胞凋亡及自噬。FBP1是糖异生的关键酶,可将1,6-磷酸果糖转化为6-磷酸果糖,且FBP1在各种癌症中发挥着重要作用[19]。Zhang等[20]研究发现,FBP1在肺癌组织和细胞中下调,上调其表达抑制了体外缺氧条件下肺癌细胞的增殖和侵袭。本研究结果显示,miR-18a-5p与circDCUN1D4、FBP1都存在结合点,并经双荧光素酶实验验证了其靶向关系;肺癌细胞系中FBP1 mRNA表达下降,miR-18a-5p表达显著增加;经circDCUN1D4过表达处理细胞后逆转了FBP1 mRNA、miR-18a-5p的表达,表明circDCUN1D4可以抑制肺癌细胞生长,可能与抑制miR-18a-5p表达,促进FBP1表达有关。为证明该猜想,本实验以miR-18a-5p mimics进行反向验证发现,过表达miR-18a-5p逆转了circDCUN1D4对肺癌细胞恶性行为的抑制作用。PD-L1是一种重要的免疫检查点分子,作为一种跨膜蛋白,在乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、结肠癌、黑色素瘤和肺癌等多种癌症中表达,可通过其受体程序性细胞死亡-1帮助癌细胞逃避免疫监视[21]。本研究发现,上调circDCUN1D4可抑制PD-L1表达,而过表达miR-18a-5p则促进了PD-L1表达。这说明circDCUN1D4可能通过抑制miR-18a-5p促进FBP1表达,进而阻碍癌细胞免疫逃逸。

综上,上调circDCUN1D4可以抑制miR-18a-5p表达,促进FBP1表达,进而抑制肺癌细胞的增殖,促进其凋亡,阻断其免疫逃逸,为肺癌的靶向治疗提供有力依据。但本研究也存在不足,如靶向关系未采用pull down实验进一步验证,且circDCUN1D4对肺癌的作用涉及靶点较多、机制较复杂,还需进一步研究。

[参考文献]

[1] 邵为朋,王晓伟,刘德若. 小细胞肺癌目前治疗的策略与未来方向[J]. 中国肺癌杂志,2017,20(6):421-426. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2017.06.09.

[2] 陈天佑,熊 飞,张 倬,等. LncRNA IGF2-AS基因通过靶向miR-370-3p对肺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志,2021,41(23):5308-5313. doi:10.3969/j.issn.1005-9202.

[3] 国家癌症中心,国家肿瘤质控中心肺癌质控专家委员会. 中国原发性肺癌规范诊疗质量控制指标(2022版)[J]. 中华肿瘤杂志,2022,44(12):1235-1241. doi:10.3760/cma.j.cn112152-20220418-00266.

[4] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2019,20(11):675-691. doi:10.1038/s41576-019-0158-7.

[5] Li B, Zhu L, Lu C, et al. circNDUFB2 inhibits non-small cell lung cancer progression via destabilizing IGF2BPs and activating anti-tumor immunity[J]. Nat Commun, 2021,12(1):295. doi:10.1038/s41467-020-20527-z.

[6] Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, et al. The landscape of circular RNA in cancer[J]. Cell, 2019, 176(4): 869-881. e13. doi: 10.1016/j.cell.2018.12.021.

[7] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. Genome Res, 2009, 19(1): 92-105. doi:10.1101/gr.082701.108.

[8] Quiñones-Díaz BI, Reyes-González JM, Sánchez-Guzmán V, et al. MicroRNA-18a-5p suppresses tumor growth via targeting matrix metalloproteinase-3 in cisplatin-resistant ovarian cancer[J]. Front Oncol, 2020,10:602670. doi:10.3389/fonc.2020.602670.