DOI:10.16016/j.2097-0927.202311127

circ_UBE2C 通过调控 miR-107/HK2 分子轴促进肺癌细胞增殖和糖酵解

聂 霁[1],刘 晨[1],普丹丹[1],查 梅[2],张云辉[1] 650032 昆明,云南省第一人民医院,昆明理工大学附属医院呼吸与危重症医学科[1];650093 昆明,昆明理工大学医学院[2]

[**摘要**] **目的** 探讨 circ_UBE2C 对肺癌细胞增殖和糖酵解的影响及其作用机制。**方法** 基于 TCGA 数据库分析 circ_UBE2C、miR-107 和己糖激酶 2(hexokinase 2,HK2)在肺癌组织和正常肺组织中的表达情况。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,分析 circ_UBE2C/miR-107/HK2 表达量和肺癌患者生存期的相关性。常规培养人正常肺上皮细胞(BEAS-2B)和人肺癌细胞株(A549、NCI-H460 和 NCI-H1299),采用 qRT-PCR 检测 circ_UBE2C 和 miR-107 的表达量,Western blot 检测 HK2 和 PCNA 蛋白的表达量。将 A549 和 NCI-H1299 细胞分为空白组(NC)、circ_UBE2C 敲减组(si-circ)、HK2 敲减组(si-HK2)、同时敲减 miR-107+HK2 组(miR-inhibitor+si-HK2)和同时敲减 circ_UBE2C+miR-107 组(si-circ+miR-inhibitor)。CCK-8 和克隆形成实验分析细胞增殖活力。葡萄糖摄取比色测定试剂盒、乳酸检测试剂盒和 ATP 含量测定试剂盒分析 A549 和 NCI-H1299 细胞葡萄糖摄取量、乳酸生成量和 ATP 产生量。Seahorse XF 糖酵解应激测试试剂盒和 Seahorse XF 细胞线粒体应激测试试剂盒检测细胞外酸化率(extracellular acidification ratio,ECAR)和细胞耗氧率(oxygen consumption ratio,OCR)。双荧光素酶报告基因实验评估 circ_UBE2C 和 miR-107、miR-107 和 HK2 的靶向关系。**结果** 与正常组织相比,肺癌组织中 circ_UBE2C 和 HK2 表达上调,miR-107 表达下调($P<0.05$)。与 BEAS-2B 细胞相比,A549 和 NCI-H1299 细胞中 circ_UBE2C 和 HK2 表达量升高,miR-107 表达下调($P<0.05$)。生存分析显示,circ_UBE2C 和 HK2 高表达或 miR-107 低表达肺癌患者的生存期较短($P<0.05$)。相比于 NC 组,si-circ 或 si-HK2 组 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖活力、葡萄糖摄取量、乳酸生成量、ATP 产生量、ECAR 和 OCR 均显著减少($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因证实,circ_UBE2C 靶向负调控 miR-107,且 HK2 是 miR-107 的靶基因。与 si-HK2 组相比,miR-inhibitor+si-HK2 组和 si-circ+miR-inhibitor 组中 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖活力和糖酵解水平显著增加。**结论** 敲减 circ_UBE2C 可显著抑制肺癌细胞增殖和糖酵解水平,其机制是通过靶向上调 miR-107 抑制 HK2 表达。

[**关键词**] 肺癌;circ_UBE2C/miR-107/HK2 分子轴;Warburg 效应;增殖
[**中图法分类号**] R394.3;R730.23;R734.2 [**文献标志码**] A

Circ_UBE2C promotes proliferation and glycolysis of lung cancer cells by regulating miR-107/HK2 axis

NIE Ji[1], LIU Chen[1], PU Dandan[1], CHA Mei[2], ZHANG Yunhui[1] [1]Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Yunnan Provincial First People's Hospital · Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan Province, 650032; [2]School of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan Province, 650093, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of circ_UBE2C on the proliferation and glycolysis of lung cancer cells and its mechanism of action. **Methods** The expression of circ_UBE2C, miR-107, and hexokinase 2 (HK2) in lung cancer tissues and normal lung tissues were analyzed based on the The Cancer

[**基金项目**] 云南省第一人民医院临床医学中心开放项目(2021LCZXXF-HX09);云南省第一人民医院博士科研基金(KHBS-2022-030)
[**通信作者**] 张云辉,E-mail:yunhuizhang3188@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Genome Atlas (TCGA) database. Kaplan-Meier survival curve was plotted to analyze the correlation between circ_UBE2C/miR-107/HK2 expression and survival of the lung cancer patients. qRT-PCR was used to detect the expression of circ_UBE2C and miR-107, and Western blotting was employed to measure the expression of HK2 and PCNA in human normal lung epithelial cells (BEAS-2B) and human lung cancer cell lines (A549, NCI-H460, and NCI-H1299). Then A549 and NCI-H1299 cells were divided into the blank group (NC), circ_UBE2C knockdown group (si-circ), HK2 knockdown group (si-HK2), simultaneous knockdown of miR-107+HK2 group (miR-inhibitor+si-HK2), and simultaneous knockdown of circ_UBE2C+miR-107 group (si-circ+miR-inhibitor). CCK-8 assay and colony formation assay were employed to measure the proliferation of above cell groups. The glucose uptake, lactate generation, and ATP production in the cells were measured by glucose uptake colorimetric assay kit, lactic acid detection kit, and ATP content determination kit, respectively. Seahorse XF glycolytic stress test and Seahorse XF cellular mitochondrial stress test were respectively performed to detect the extracellular acidification ratio (ECAR) and cellular oxygen consumption ratio (OCR). The targeting relationship between the circ_UBE2C and miR-107, and miR-107 and HK2 was validated by dual-luciferase reporter gene assay. **Results** Compared with normal lung tissues, the expression of circ_UBE2C and HK2 was up-regulated, while that of miR-107 was down-regulated in lung cancer tissues ($P<0.05$). The expression of circ_UBE2C and HK2 was elevated, and that of miR-107 was reduced in A549 and NCI-H1299 cells when compared with BEAS-2B cells ($P<0.05$). Survival analysis showed that the patients with high expression of circ_UBE2C and HK2 or low expression of miR-107 had shorter survival ($P<0.05$). Compared with the NC group, both si-circ and si-HK2 resulted in significantly reduced proliferation, glucose uptake, lactate generation, ATP production, and ECAR and OCR values in A549 and NCI-H1299 cells ($P<0.05$). Dual luciferase reporter gene assay confirmed that circ_UBE2C could directly bind to and negatively regulate miR-107 expression. HK2 was then identified as a downstream target of miR-107. Compared with the si-HK2 group, the proliferative ability and glycolysis level of A549 and NCI-H1299 cells were significantly increased in the miR-inhibitor + si-HK2 group and the si-circ + miR-inhibitor group. **Conclusion** Knockdown of circ_UBE2C significantly suppresses the proliferation and glycolysis of lung cancer cells *via* targeting up-regulation of miR-107 and then exerting inhibitory effect on HK2 expression.

[**Key words**] lung cancer; circ_UBE2C/miR-107/HK2 axis; Warburg effect; proliferation

Supported by the Open Project of Yunnan Provincial Clinical Medical Center (2021LCZXXF-HX09), and the Research Fund for Doctoral Program of Yunnan Provincial First People's Hospital (KHBS-2022-030). Corresponding author: ZHANG Yunhui, E-mail: yunhuizhang3188@126.com

肺癌是全世界发病率第二和死亡率第一的恶性肿瘤[1],给人类健康和社会经济带来严重的威胁。同时,临床上对肺癌缺乏特异性的治疗手段,常规治疗策略存在的局限性、副作用导致预期疗效不佳和预后差,且5年总生存率约为20%[2]。为此,明确肺癌发病机理和揭示相关的分子调控机制是临床上肿瘤医学亟待解决的关键问题。研究表明,癌细胞有氧糖酵解为其异常增殖和转移提供了充足的能量供应[3],进而导致恶性肿瘤的快速进展。这提示阻断癌细胞糖酵解可能是肺癌防治的有效策略,但其调控机制尚不明确。近年来,环状RNA(circRNA)被证实在多种恶性肿瘤发生发展进程中异常表达,且对癌细胞的糖酵解具有调控作用[4]。TCGA数据库分析表明,has_circ_0060551(circ_UBE2C)在肺癌组织中异常高表达,且与患者生存期较短密切相关,然而其在肺癌发生发展中的调控作用尚不清楚。circ_UBE2C潜在的靶基因miR-107作为抑癌基因[5],被报道参与调控肿瘤细胞的糖酵解过程[6],但miR-107调控肺癌细胞糖酵解尚不清楚。此外,己糖激酶2(hexokinase 2,HK2)作为miR-107的潜在靶基因,其可促进肺癌细胞糖酵解[7-8],并被作为多种恶性肿瘤治疗的有效靶点[9]。然而,目前circ_UBE2C/miR-107/HK2信号轴调控肺癌细胞增殖和糖酵解的作用机制尚未有研究报道。基于此,本研究将探讨circ_UBE2C通过miR-107/HK2分子轴对肺癌细胞增殖和糖酵解的调控机制,旨在为揭示肺癌发病机理和临床治疗提供参考和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人源肺癌细胞株(A549、NCI-H1299和NCI-

H460)和人正常肺上皮细胞(BEAS-2B)购自美国模式培养物保藏中心。DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;胰蛋白酶购自美国 BD 公司;CCK-8 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;荧光素酶报告基因活性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;葡萄糖摄取比色检测试剂盒购自广州伟伯科技有限公司;乳酸检测试剂盒和 ATP 含量测定试剂盒南京建成生物工程研究所;circ_UBE2C 敲减(si-circ)载体、过表达 miR-107(miR-107)、miR-107 敲减(miR-inhibitor)载体、HK2 敲减(si-HK2)载体及其阴性对照购自上海吉玛制药技术有限公司;BCA 蛋白质分析试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;SDS-PAGE 分离胶、PVDF 膜、电泳缓冲液购自北京索莱宝生物科技有限公司;HK2 抗体、PCNA 抗体、β-actin 抗体和山羊抗兔 IgG-HRP 均购自美国 Abcam 公司。

1.2 细胞培养、转染和分组

将人肺癌细胞株和 BEAS-2B 细胞置于含 10%胎牛血清、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 DMEM 培养基中培养,培养条件为 37 ℃,5%CO_2。待 A549 和 NCI-H1299 细胞生长达到 80%时,采用胰酶消化细胞,并将收集到的细胞按 2×10^5 个/孔接种到 6 孔板中。随后,根据不同实验目的采用随机数字表法将 A549 或 NCI-H1299 细胞分为以下不同组别:(1)si-NC 组、circ_UBE2C 敲减(si-circ)组;(2)NC mimic 组、过表达 miR-107(miR-107)组;(3)NC 组、HK2 敲减(si-HK2)组、同时敲减 HK2+miR-107(si-HK2+miR-inhibitor)组、同时敲减 miR-107+circ_UBE2C(miR-inhibitor+si-circ)组。转染时严格参照 Lipofectamine™ 3000 试剂说明书进行操作,并将上述载体转染于细胞中培养 6 h,更换正常培养基 DMEM 继续培养 24 h 后用于后续实验。

1.3 CCK-8 检测肺癌细胞增殖活力

将对数生长期的 A549 和 NCI-H1299 细胞接种至 96 孔板(3×10^3 个/150 μL)中进行培养,并按照 1.2 转染方法对细胞进行处理,转染结束后于 37 ℃培养箱(5%CO_2)中继续培养 0、24、48、72 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 工作液,置于培养箱继续孵育 1.5 h 后,酶标仪检测 450 nm 处各孔光密度值[$D(450)$]。

1.4 克隆形成实验评估肺癌细胞克隆形成数

将消化后的 A549 和 NCI-H1299 细胞悬液以 1×10^3 个/孔接种于 6 孔板内,并按照 1.2 转染方法对细胞进行处理,转染结束后于 37 ℃培养箱(5%CO_2)中继续培养 2 周,培养结束后用 PBS 清洗 2 次。然后,采用 4%多聚甲醛固定细胞 20 min 后用 PBS 清洗 2 次,再将 500 μL 结晶紫(0.2%)加入 6 孔板中,置于培养箱继续孵育 10 min 后用 PBS 清洗,使用照相机拍照。

1.5 qRT-PCR 检测 circ_UBE2C 和 miR-107 的表达

采用 TRIzol 提取细胞中总 RNA,反转录成 cDNA。随后,采用 qRT-PCR 检测 circ_UBE2C 和 miR-107 的表达量。其中,qRT-PCR 的热循环条件为:94 ℃初始变性 5 min;随后 94 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s 和 72 ℃ 30 s 循环 40 次;最后延伸 72 ℃ 150 s。circ_UBE2C 和 miR-107 以及内参引物如表 1 所示。最后,通过 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 circ_UBE2C 和 miR-107 的相对表达量。

表 1 引物序列

名称	引物序列
circ_UBE2C	上游:5′-GATGACCCTCATGGCAGTGG-3′ 下游:5′- TGGGTTCTGGCATTTGGAGA-3′
miR-107	上游:5′-ATGATGAGCAGCATTGTACAGG-3′ 下游:5′-GCAGGGTCCGAGGTATTC-3′
β-actin	上游:5′-GTGGACATCCGCAAAGAC-3′ 下游:5′-AAAGGGTGTAACGCAACTA-3′
U6	上游:5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′ 下游:5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′

1.6 肺癌细胞葡萄糖摄取、乳酸生成和 ATP 含量检测

严格按照葡萄糖摄取比色测定试剂盒、乳酸检测试剂盒和 ATP 含量测定试剂盒说明书检测 A549 和 NCI-H1299 细胞葡萄糖摄取、乳酸产生量和 ATP 生成量。

1.7 肺癌细胞外酸化率和细胞耗氧率检测

将 A549 或 NCI-H1299 细胞以 1×10^4 个/mL 接种于 Seahorse Xfe-24 专用培养板内,根据试剂盒说明书依次加入葡萄糖(Glucose,10 mmol/L)、寡霉素(Oligomycin,1 μmol/L)、2-脱氧-D-葡萄糖(2-DG,100 mmol/L),置于培养箱继续孵育 0.5 h 后检测细胞外酸化率(extracellular acidification ratio,ECAR)。根据试剂盒说明书依次加入 Oligomycin(1.5 μmol/L)、线粒体氧化磷酸化解偶联剂(FCCP,1 μmol/L)、鱼藤酮/抗霉素 A(Rote/AA,0.5 μmol/L),置于培养箱继续孵育 0.5 h 后检查细胞耗氧率(oxygen consumption ratio,OCR)。

1.8 Western blot 检测 HK2 和 PCNA 蛋白的表达

收集处于对数期的 A549 和 NCI-H1299 细胞,采用 RAPI 裂解液提取细胞中的总蛋白。随后,根据 BCA 试剂盒说明书检测提取到的蛋白质浓度。然后,进行 10% SDS-PAGE 分离蛋白,电转膜法将目的条带转移至 PVDF 膜上,以 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h。其

次,分别加入兔抗人 HK2(1∶1 000)、PCNA(1∶1 000)和 β-actin 单克隆抗体(1∶1 000),4 ℃孵育过夜。之后,加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1∶2 000)室温孵育 2 h。最后,进行 ECL 染色,凝胶成像仪采集图像;通过 Image J 分析灰度值。实验重复 3 次。

1.9 双荧光素酶报告基因验证靶向关系

通过在线生物信息学软件 Starbase 预测显示 circ_UBE2C 和 miR-107 或 miR-107 和 HK2 的 3′UTR 存在互补的碱基序列。然后将 miR-107 结合位点的 circ_UBE2C 3′UTR 或 HK2 3′UTR 的野生型(WT)和突变型(MUT)克隆至 pGL3 载体中,生成质粒 circ_UBE2C WT(WT-UBE2C)、circ_UBE2C MUT(MUT-UBE2C)、HK2 WT(WT-HK2)、HK2 MUT(MUT-HK2)。按照 Lipofectamine™ 3000 转染试剂盒说明书与 NC mimic 或 miR-107 mimic(miR-107)共转染至 A549 细胞内。48 h 后按照双荧光素酶检测试剂盒说明书检测细胞的荧光素酶活性。

1.10 circ_UBE2C、miR-107 和 HK2 的差异表达及其与肺癌患者生存分析

使用 TCGA 数据库,通过 GEPIA(http://gepia.cancer-pku.cn/)网站分析 circ_UBE2C 或 HK2 在肺癌组织中和正常组织中的表达情况,以及 circ_UBE2C 与肺癌患者生存的相关性。通过 Starbase(https://rnasysu.com/encori/panCancer.php)网站分析 miR-107 在肺癌组织中和正常组织中的表达情况。通过 Kaplan-Meier plotter(http://kmplot.com/analysis/)网站分析 miR-107 和 HK2 与肺癌患者生存的相关性。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,用 GraphPad Prism 8.0 对实验数据进行绘图。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,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。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

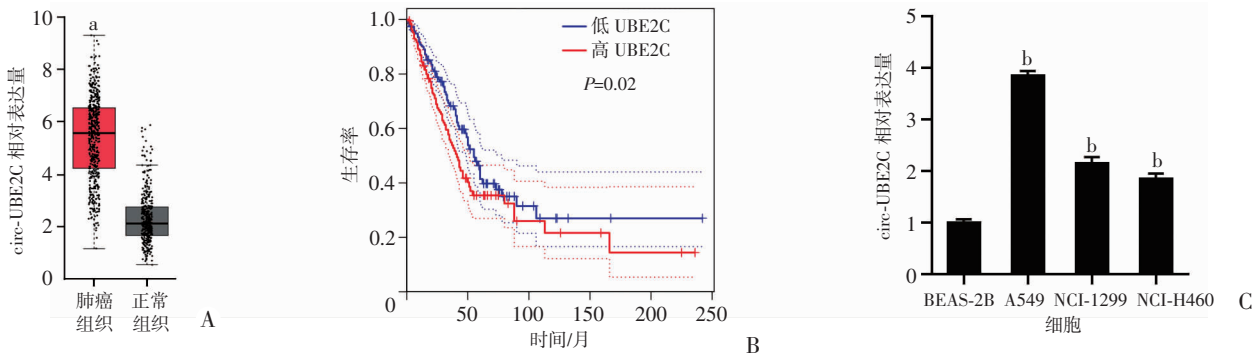
2 结果

2.1 circ-UBE2C 在肺癌中高表达及与患者不良预后相关

TCGA 数据库分析结果显示,circ_UBE2C 在肺癌组织($n=483$)中的表达量明显高于正常组织($n=347$)($P<0.05$,图 1A)。同时,circ_UBE2C 高表达组(高 UBE2C)肺癌患者生存期明显短于 circ_UBE2C 低表达组(低 UBE2C)($P<0.05$,图 1B)。qRT-PCR 检测结果证实,与 BEAS-2B 细胞相比,circ_UBE2C 在人肺癌细胞系(A549、NCI-H1299 和 NCI-H460)中显著上调($P<0.05$,图 1C),在 A549 细胞中表达量最高。

2.2 敲减 circ_UBE2C 抑制肺癌 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖和糖酵解

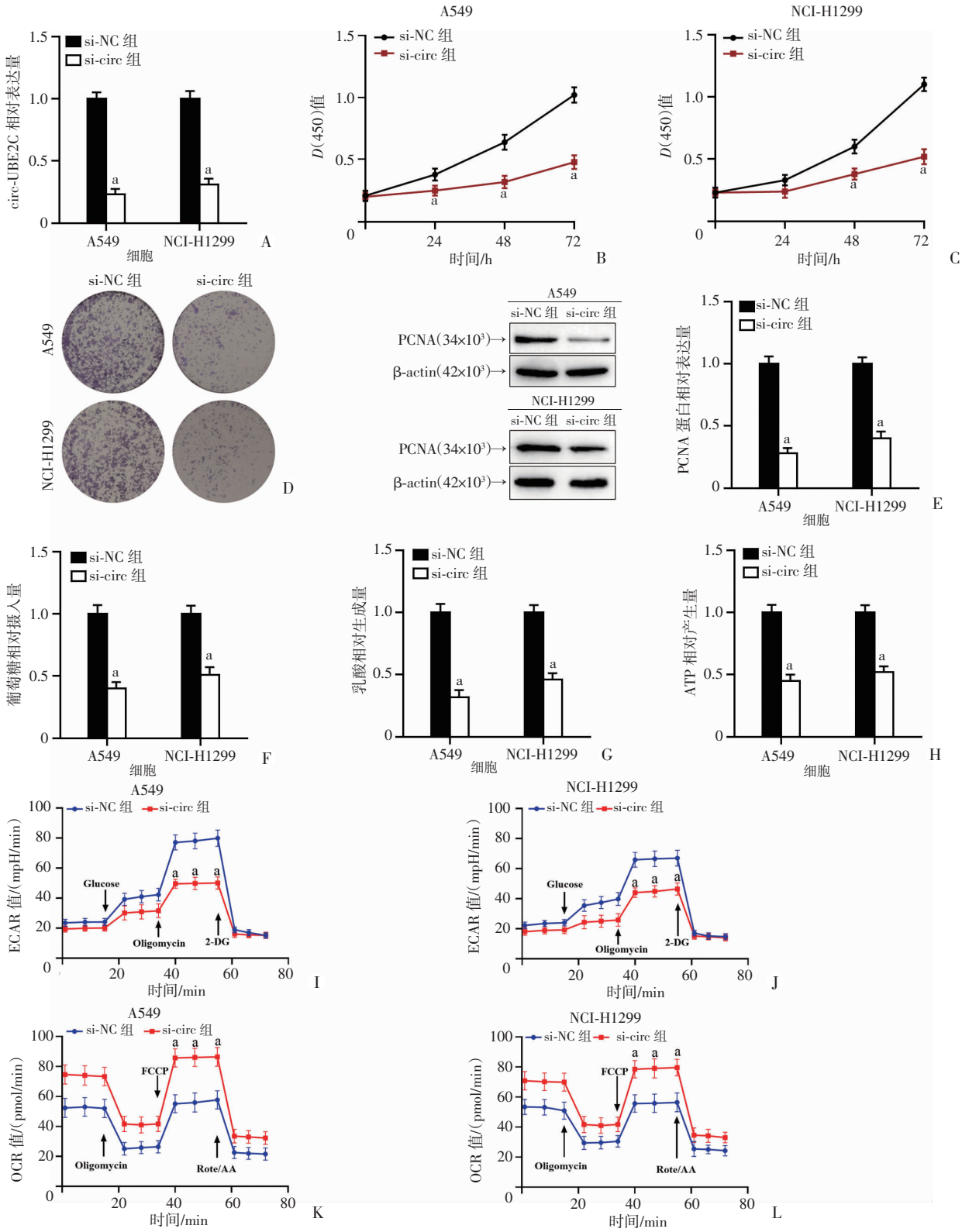
与 si-NC 组相比,si-circ 组 circ_UBE2C 表达量明显减少($P<0.05$,图 2A)。CCK-8 和克隆形成实验均证实,敲减 circ_UBE2C 可明显抑制 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖活力($P<0.05$,图 2B~E)。同时,敲减 circ_UBE2C 显著减少了 A549 和 NCI-H1299 细胞的葡萄糖摄取($P<0.05$,图 2F)、乳酸生成量($P<0.05$,图 2G)和 ATP 产生量($P<0.05$,图 2H)。此外,敲减 circ_UBE2C 明显降低了 A549 和 NCI-H1299 细胞 ECAR($P<0.05$,图 2I、J)和 OCR($P<0.05$,图 2K、L)。表明敲减 circ_UBE2C 可明显抑制 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖活力和糖酵解水平。



a:$P<0.05$,与正常组织比较;b:$P<0.05$,与 BEAS-2B 细胞比较

A:TCGA 数据库分析 circ_UBE2C 在肺癌和正常组织中的表达;B:TCGA 数据库分析 circ_UBE2C 高低表达肺癌患者的生存情况;C:qRT-PCR 检测 circ_UBE2C 在人 BEAS-2B 和肺癌细胞系中的表达

图 1 circ_UBE2C 在肺癌组织和细胞中的表达



a: $P<0.05$,与 si-NC 组比较

A:qRT-PCR 检测 circ_UBE2C 在 A549 和 NCI-H1299 细胞中的转染效率;B~D:CCK-8 和克隆形成实验评估 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖活力;E: Western blot 检测 HK2 蛋白在 A549 和 NCI-H1299 细胞中的表达量;F:葡萄糖摄取比色测定试剂盒检测 A549 和 NCI-H1299 细胞的葡萄糖摄取能力;G:乳酸检测试剂盒检测 A549 和 NCI-H1299 细胞乳酸生成量;H:ATP 比色测定试剂盒评估 A549 和 NCI-H1299 细胞 ATP 产生量;I~L:Seahorse XF 糖酵解应激测试试剂盒检测 A549 和 NCI-H1299 细胞的 ECAR 和 OCR

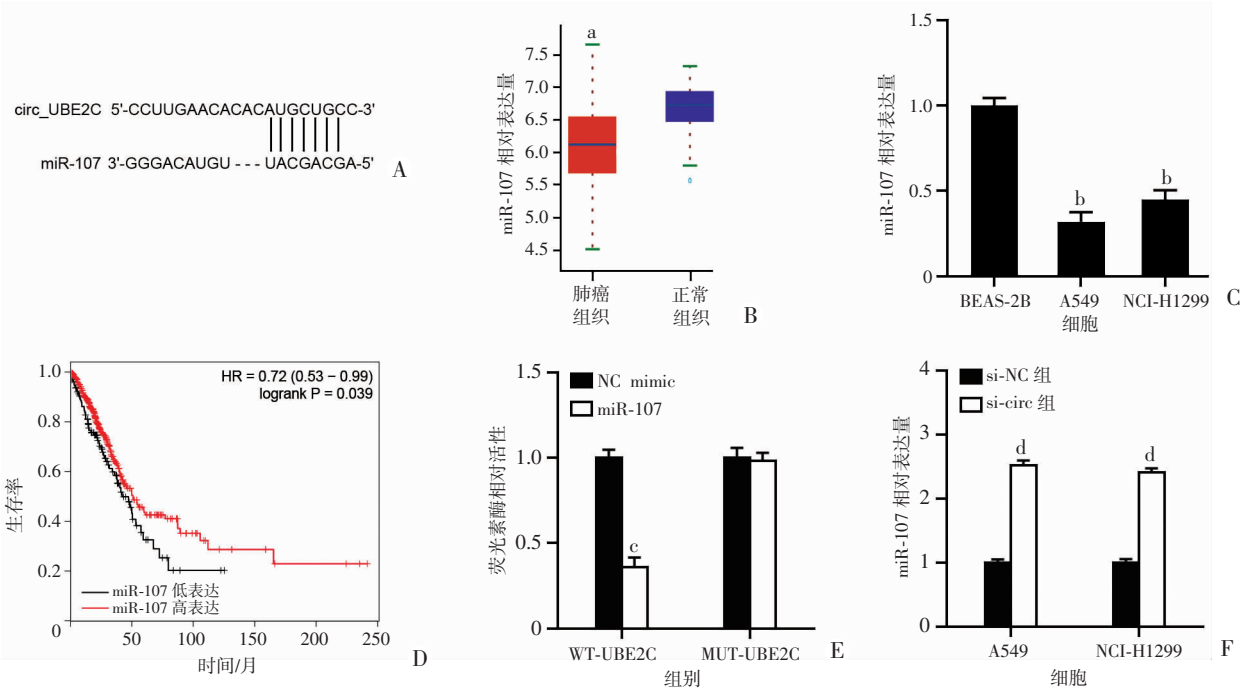
图 2 敲减 circ_UBE2C 对肺癌细胞增殖和糖酵解水平的影响

2.3 circ_UBE2C 靶向调控 miR-107

Starbase 预测结果表明,circ_UBE2C 与 miR-107 具有靶向关系,在 3′UTR 区存在结合位点(图 3A)。TCGA 数据库分析结果证实,miR-107 在肺癌组织中的表达量明显低于正常肺组织($P<0.05$,图 3B)。qRT-PCR 检测结果显示,miR-107 在 A549 和 NCI-H1299 细胞中的表达量明显低于 BEAS-2B 细胞($P<0.05$,图 3C)。Kaplan-Meier 生存分析显示,miR-107 低表达的肺癌患者生存期明显短于 miR-107 高表达患者($P<0.05$,图 3D)。双荧光素酶报告基因证实,过表达 miR-107 明显下调与 WT-UBE2C 共转染的 A549 细胞荧光素酶活性($P<0.05$,图 3E),但对于 MUT-UBE2C 共转染的 A549 细胞荧光素酶活性没有影响。qRT-PCR 检测结果证实,敲减 circ_UBE2C 可明显上调 A549 和 NCI-H1299 细胞中 miR-107 的表达量($P<0.05$,图 3F)。提示 circ_UBE2C 靶向负调控 miR-107。

2.4 miR-107 靶向负调控 HK2

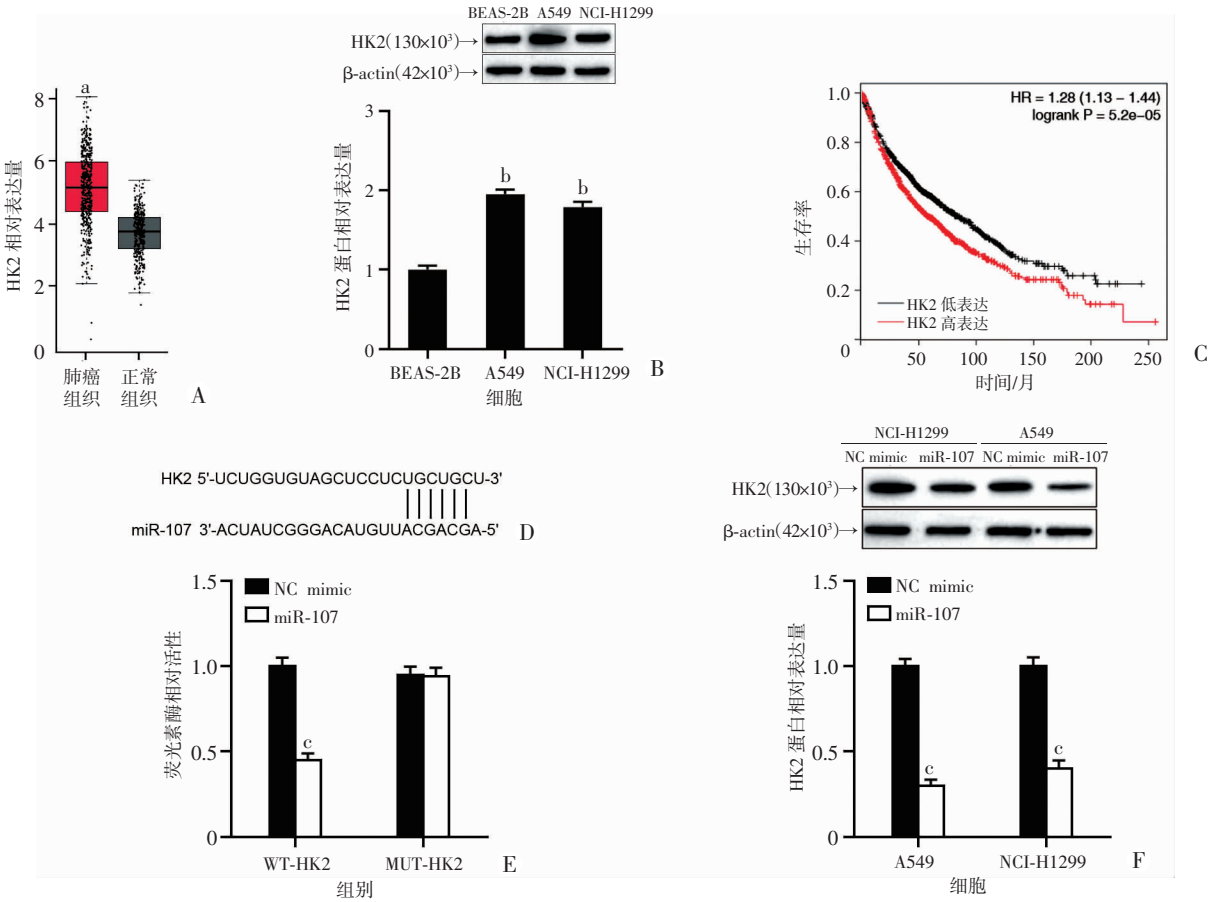
TCGA 数据库分析结果表明,HK2 在肺癌组织中的表达量明显高于正常组织($P<0.05$,图 4A)。Western blot 检测结果证实,HK2 蛋白在肺癌 A549 和 NCI-H1299 细胞中的表达量高于 BEAS-2B 细胞($P<0.05$,图 4B)。同时,Kaplan-Meier 生存分析结果显示,肺癌患者 HK2 高表达的生存期短于 HK2 低表达($P<0.05$,图 4C)。通过 Starbase 软件预测显示,miR-107 和 HK2 在 3′UTR 区存在结合位点(图 4D)。与 NC mimic 组相比,miR-107 组中的 miR-107 表达量明显增加(3.88 ± 0.11 *vs* 1.01 ± 0.06,$P<0.05$)。双荧光素酶报告基因证实,与 MUT-HK2 组相比,过表达 miR-107 显著减少 WT-HK2 组的荧光素酶活性($P<0.05$,图 4E)。Western blot 检测结果证实,过表达 miR-107 可显著降低 A549 和 NCI-H1299 细胞中 HK2 蛋白的表达水平($P<0.05$,图 4F)。提示 HK2 是 miR-107 的靶基因。



a:$P<0.05$,与正常肺组织比较;b:$P<0.05$,与 BEAS-2B 细胞比较;c:$P<0.05$,与 NC mimic 组比较;d:$P<0.05$,与 si-NC 组比较

A:circ_UBE2C 与 miR-107 的结合位点;B:TCGA 数据库分析 miR-107 在肺癌组织和正常组织中的表达;C:qRT-PCR 检测 miR-107 在 BEAS-2B、A549 和 NCI-H1299 细胞中的表达;D:TCGA 数据库分析 miR-107 高低表达肺癌患者的生存情况;E:双荧光素酶报告基因验证 circ_UBE2C 与 miR-107 的靶向关系;F:qRT-PCR 检测 circ_UBE2C 敲减后 A549 和 NCI-H1299 细胞中 miR-107 的表达

图 3 miR-107 是 circ_UBE2C 的靶基因



a: $P<0.05$,与正常肺组织比较;b: $P<0.05$,与 BEAS-2B 细胞比较;c: $P<0.05$,与 NC mimic 组比较

A:TCGA 数据库分析 HK2 在肺癌组织和正常肺组织中的表达;B:Western blot 检测 HK2 蛋白在 BEAS-2B、A549 和 NCI-H1299 细胞中的表达;C:TCGA 数据库分析 HK2 高低表达肺癌患者的生存情况;D:miR-107 和 HK2 在 3′UTR 存在结合位点;E:双荧光素酶报告基因验证 miR-107 和 HK2 的靶向关系;F:Western blot 检测 HK2 在转染 miR-107 过表达载体或空载体的 A549 和 NCI-H1299 细胞中的表达

图 4 HK2 是 miR-107 的靶基因

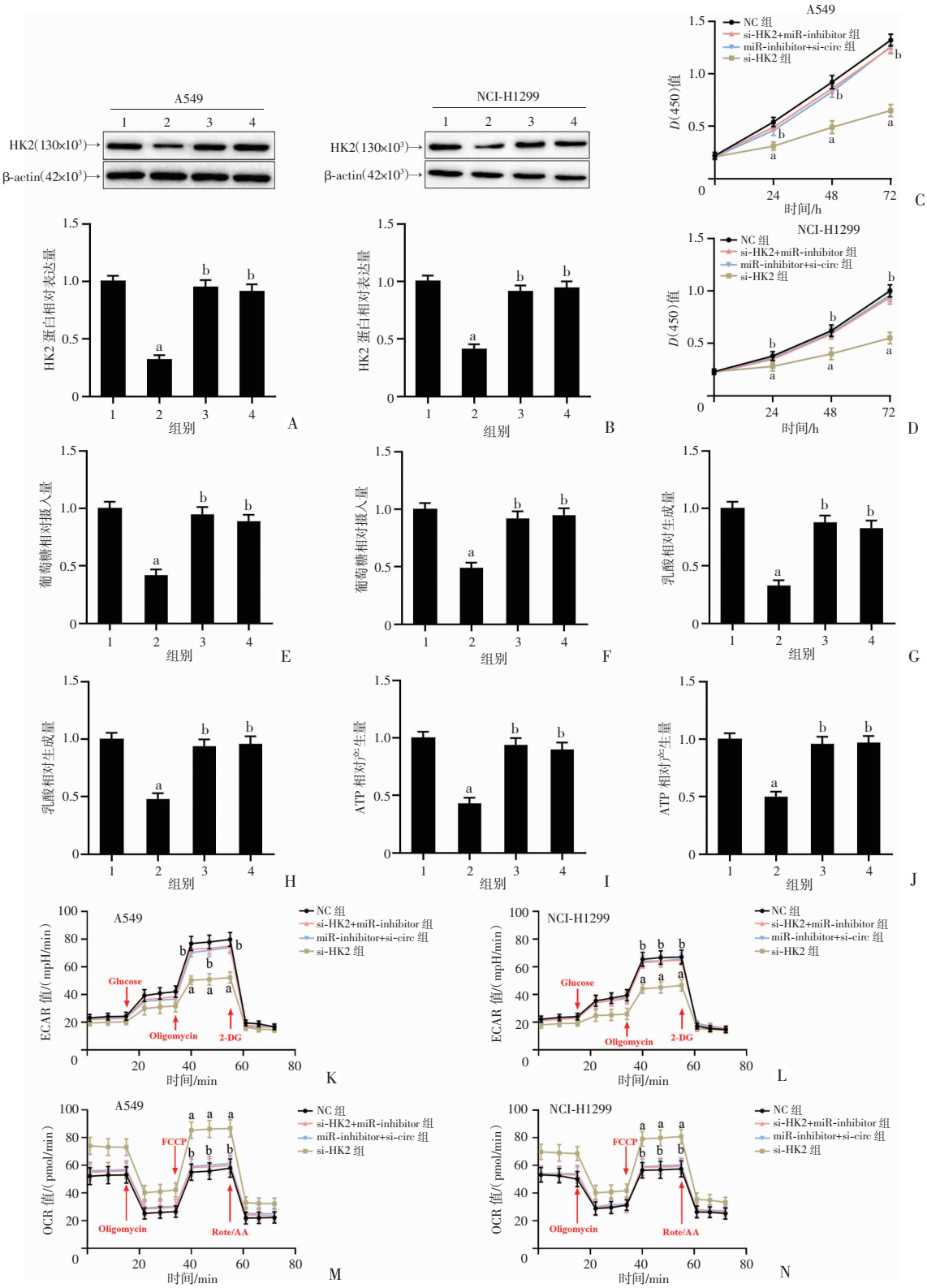
2.5 敲减 circ_UBE2C 通过 miR-107/HK2 分子轴抑制肺癌细胞增殖和糖酵解

与 NC 组比较,si-HK2 组中 HK2 蛋白的表达量显著下调($P<0.05$,图 5A、B),但 si-HK2+miR-inhibitor 组和 miR-inhibitor+si-circ 组中 HK2 蛋白的表达量均高于 si-HK2 组($P<0.05$)。与 NC 组比较,敲减 HK2 可显著抑制 A549($P<0.05$,图 5C)和 NCI-H1299($P<0.05$,图 5D)细胞增殖活力,减少细胞葡萄糖摄取能力($P<0.05$,图 5E、F)、乳酸生成量($P<0.05$,图 5G、H)、ATP 产生量($P<0.05$,图 5I、J)、ECAR($P<0.05$,图 5K、L)和 OCR($P<0.05$,图 5M、N),但同时敲减 miR-107 可逆转单独敲减 HK2 对上述指标的影响(图 5C~N),且同时敲减 circ_UBE2C 和 miR-107 也能有效恢复 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖活力(图 5C、D)和糖酵解水平(图 5E~N)。表明敲减 circ_UBE2C 可通过靶向上调 miR-107 对 HK2 的抑制作用,进而阻滞 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖和糖酵解水平。

3 讨论

3.1 circ_UBE2C 是肺癌治疗的有效靶点

随着肺癌治疗策略的推陈出新,在一定程度上延长了患者的生存期,但因肺癌发病隐匿及高复发的特点导致患者预后极差。为此,阐明肺癌发病机理和寻找有效治疗靶点并揭示其分子调控机制就显得尤为重要。circRNA 可作为肺癌发生发展进程的治疗靶点[10]。例如,ZHANG 等[11]研究表明,circ_0023179 在非小细胞肺癌组织、血清和细胞系中高表达,且其表达量与患者 TNM 分期、淋巴结转移和远端转移呈正相关。功能上,异常表达 circRNA 可通过调控癌细胞恶性生物学行为和糖酵解水平,在肺癌发展进程中扮演重要角色。



1:NC 组;2:si-HK2 组;3:si-HK2+miR-inhibitor 组;4:miR-inhibitor+si-circ 组;a:$P<0.05$,与 NC 组比较;b:$P<0.05$,与 si-HK2 组比较

A、B:Western blot 检测 HK2 蛋白在 A549 和 NCI-H1299 细胞中的表达;C、D:CCK-8 检测 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖活力;E、F:葡萄糖摄取比色测定试剂盒检测 A549 和 NCI-H1299 细胞的葡萄糖摄取能力;G、H:乳酸检测试剂盒检测 A549 和 NCI-H1299 细胞乳酸生成量;I、J:ATP 比色测定试剂盒评估 A549 和 NCI-H1299 细胞 ATP 产生量;K~N:Seahorse XF 糖酵解应激测试试剂盒检测 A549 和 NCI-H1299 细胞 ECAR 和 OCR

图 5 circ _UBE2C/miR-107/HK2 信号轴对肺癌细胞增殖和糖酵解水平的调控作用

例如,促癌基因 circRNA C190 通过激活 EGFR/ERK 信号通路促进非小细胞肺癌细胞恶性表型和移植瘤生长[12]。另一项研究表明,circ_0023404 高表达预示着非小细胞肺癌总体生存期短,敲减 circ_0023404 可抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭[13]。circ_0047921 通过促进癌细胞恶性表型和糖酵解水平,加速肺癌的恶性发展[14]。尽管已有研究阐明 circRNA 在肿瘤发生发展中的调控作用,但目前尚不清楚 circ_UBE2C 在肺癌病理进展中的表达及其调控机制。本研究通过 TCGA 数据库分析表明,circ_UBE2C 在肺癌组织中的表达量高于正常肺组织,且其高表达的肺癌患者生存期较短。同时,利用 qRT-PCR 技术检测出 circ_UBE2C 在肺癌细胞 A549、NCI-H1299 和 NCI-H460 中呈高表达。这与本研究生物信息学分析结果一致,且目前尚未见 circ_UBE2C 在肺癌中的功能注释。SHI 等[15]证实,circ_UBE2C 在宫颈癌组织中异常高表达,且其过表达可促进宫颈癌细胞侵袭和迁移能力。以上研究提示,circ_UBE2C 在肺癌中具有促癌作者,可能是肺癌治疗的有效干预靶点。

3.2 敲减 circ_UBE2C 抑制肺癌细胞增殖和糖酵解

越来越多的研究表明,肿瘤的快速生长和进展与代谢重编程有关[16],尤为重要的是癌细胞有氧糖酵解,即 Warburg 效应[17]。这主要可能是癌细胞的有氧糖酵解不仅给自身提供了 ATP,而且代谢产生的乳酸会降低抗免疫疗效[18]。FAUBERT 等[19]研究表明,肺癌细胞利用葡萄糖并分泌乳酸,加速恶化进程。同时,靶向阻断癌细胞 Warburg 效应是一种控制肺癌在内的多种恶性肿瘤进展的有效治疗策略[20]。最新研究证实,circRNA 对于恶性肿瘤细胞糖酵解具有调控作用[21]。机制上,circRNA 可通过 miRNA/mRNA 分子轴调控癌细胞恶性生物学行为及糖酵解水平[22],从而在肿瘤进展中扮演重要角色。例如,circ_0008037 通过靶向下调 miR-433-3p 对 NUCKS1 表达的抑制作用,促进肺癌细胞增殖和 Warburg 效应,进而促进肺癌发展进程[23]。也有研究证实,circP4HB 通过促进 PKM2 介导的有氧糖酵解水平和肿瘤相关巨噬细胞 M2 极化,进而导致肺癌恶性进展[24]。为了探索 circ_UBE2C 基因对肺癌糖酵解的调控作用,本研究将 si-circ_UBE2C 转染至 A549 和 NCI-H1299 细胞中干扰 circ_UBE2C 的表达,结果显示 A549 和 NCI-H1299 细胞的增殖能力显著下降,说明干扰 circ_UBE2C 能够抑制肺癌细胞的增殖。同时,干扰 circ_UBE2C 能够减少肺癌细胞葡萄糖摄取量、乳酸生成量、ATP 产生量、ECAR 和 OCR。此外,干扰 circ_UBE2C 可上调 miR-107 和下调 HK2 的表达。也有研究证实,circRNA 通过加速癌细胞糖酵解水平,增强肿瘤细胞对化疗的耐受性[25-26]。提示糖酵解是肺癌快速进展的重要致病机制,且靶向 circ_UBE2C/miR-107/HK2 信号轴介导的糖酵解可能是肺癌治疗的有效途径。

3.3 敲减 circ_UBE2C 通过 miR-107/HK2 分子轴抑制肺癌细胞增殖和糖酵解

进一步探究 circ_UBE2C 是否通过调控 miR-107/HK2 分子轴介导的糖酵解,进而影响肺癌形成和发展。以往研究证实,抑癌基因 miR-107 可通过阻断 Warburg 效应抑制恶性肿瘤发展进程,包括胰管腺癌[6]和口腔癌[27]。同时,miR-107 也被证实可抑制肺癌生长和转移[28-29]。本研究结果证实,miR-107 在肺癌组织和细胞中的表达量低于正常对照组,且敲减 miR-107 可逆转单独敲减 circ_UBE2C 对 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖及糖酵解的抑制作用。机制上,HK2 作为 miR-107 的直接靶基因,与恶性肿瘤进展有关[30]。HK2 的活化可促进癌细胞 Warburg 效应,加速癌细胞增殖、侵袭和迁移,并被认为是肿瘤治疗的有效靶点分子[9, 31]。本研究结果表明,HK2 在肺癌组织和细胞中表达量升高,敲减 HK2 可明显抑制 A549 和 NCI-H1299 细胞增殖活力及糖酵解水平,但同时敲减 miR-107 可逆转单独敲减 HK2 对肺癌细胞的干预作用。众所周知,circRNA 可结合其靶向 miRNA,从而抑制 miRNA 的表达和下调 miRNA 对其靶基因 mRNA 的抑制作用,参与癌细胞的有氧糖酵解水平。例如,敲减 circ_0061140 可通过上调 miR-654 抑制 HK2 的表达,阻滞肺癌细胞恶性表型和糖酵解[32]。另一项研究表明,circRNF20 靶向下调 miR-487 对 HK2 的抑制作用,进而促进乳腺癌细胞恶性表型和糖酵解水平[33]。以上研究表明,在 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络上,为阐明 circ_UBE2C/miR-107/HK2 信号轴调控肺癌细胞糖酵解的分子调控机制提供了新的见解。

综上所述,circ_UBE2C 在肺癌进展中扮演促癌作用,敲减 circ_UBE2C 抑制了肺癌细胞增殖和糖酵解,其作用机制与靶向上调抑癌基因 miR-107 和下调 HK2 介导的 Warburg 效应有关。本研究为肺癌临床靶向治疗提供了有效的分子靶点和实验依据。

参考文献:

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al*. Cancer

statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1):7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.

[2] LUO Y H, LUO L, WAMPFLER J A, *et al*. 5-year overall survival in patients with lung cancer eligible or ineligible for screening according to US Preventive Services Task Force criteria: a prospective, observational cohort study[J]. Lancet Oncol, 2019, 20(8): 1098-1108. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30329-8.

[3] LIBERTI M V, LOCASALE J W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? [J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(3): 211-218. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.

[4] LI T, XIAN H C, DAI L, *et al*. Tip of the iceberg: roles of CircRNAs in cancer glycolysis [J]. Onco Targets Ther, 2021, 14: 2379-2395. DOI: 10.2147/OTT.S297140.

[5] FU Y X, LIN L W, XIA L G. MiR-107 function as a tumor suppressor gene in colorectal cancer by targeting transferrin receptor 1[J]. Cell Mol Biol Lett, 2019, 24: 31. DOI: 10.1186/s11658-019-0155-z.

[6] YE H L, ZHOU Q B, ZHENG S Y, *et al*. FEZF1-AS1/miR-107/ZNF$_3$12B axis facilitates progression and Warburg effect in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 34. DOI: 10.1038/s41419-017-0052-1.

[7] XIE K, FENG J, FAN D W, *et al*. *BARX2*/*FOXA1*/*HK2* axis promotes lung adenocarcinoma progression and energy metabolism reprogramming[J]. Transl Lung Cancer Res, 2022, 11(7): 1405-1419. DOI: 10.21037/tlcr-22-465.

[8] HUANG Y M, ZHAO W, OUYANG X P, *et al*. Monoamine oxidase A inhibits lung adenocarcinoma cell proliferation by abrogating aerobic glycolysis[J]. Front Oncol, 2021, 11: 645821. DOI: 10.3389/fonc.2021.645821.

[9] AFONSO J, GONÇALVES C, COSTA M, *et al*. Glucose metabolism reprogramming in bladder cancer: hexokinase 2 (HK2) as prognostic biomarker and target for bladder cancer therapy[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(3): 982. DOI: 10.3390/cancers15030982.

[10] SUFIANOV A, BEGLIARZADE S, BEILERLI A, *et al*. Circular RNAs as biomarkers for lung cancer[J]. Noncoding RNA Res, 2023, 8(1): 83-88. DOI: 10.1016/j.ncrna.2022.11.002.

[11] ZHANG Q, QIN S Y, PENG C L, *et al*. Circulating circular RNA hsa_circ_0023179 acts as a diagnostic biomarker for non-small-cell lung cancer detection[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2023, 149(7): 3649-3660. DOI: 10.1007/s00432-022-04254-0.

[12] ISHOLA A A, CHIEN C S, YANG Y P, *et al*. Oncogenic circRNA C190 promotes non-small cell lung cancer *via* modulation of the EGFR/ERK pathway[J]. Cancer Res, 2022, 82(1): 75-89. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1473.

[13] LIU C J, ZHANG Z W, QI D D. Circular RNA hsa_circ_0023404 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer by regulating miR-217/ZEB1 axis [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 6181-6189. DOI: 10.2147/OTT.S201834.

[14] XIAO Y H, GU S Q, YAO W X, *et al*. Circ_0047921 acts as the sponge of miR-1287-5p to stimulate lung cancer progression by regulating proliferation, migration, invasion, and glycolysis of lung cancer cells[J]. World J Surg Oncol, 2022, 20(1): 108. DOI: 10.1186/s12957-021-02466-1.

[15] SHI Q, MA Y Y, ZHANG X J, *et al*. Circ_0060551 promotes the migration and invasion of cervical cancer by upregulating TPD52[J]. Am J Reprod Immunol, 2022, 88(3): e13586. DOI: 10.1111/aji.13586.

[16] SUN L C, ZHANG H F, GAO P. Metabolic reprogramming and epigenetic modifications on the path to cancer[J]. Protein Cell, 2022, 13(12): 877-919. DOI: 10.1007/s13238-021-00846-7.

[17] JAWORSKA M, SZCZUDŁO J, PIETRZYK A, *et al*. The Warburg effect: a score for many instruments in the concert of cancer and cancer niche cells[J]. Pharmacol Rep, 2023, 75(4): 876-890. DOI: 10.1007/s43440-023-00504-1.

[18] YU M, CHEN S Y, HONG W F, *et al*. Prognostic role of glycolysis for cancer outcome: evidence from 86 studies[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(4): 967-999. DOI: 10.1007/s00432-019-02847-w.

[19] FAUBERT B, LI K Y, CAI L, *et al*. Lactate metabolism in human lung tumors[J]. Cell, 2017, 171(2): 358-371.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.019.

[20] CHELAKKOT C, CHELAKKOT V S, SHIN Y, *et al*. Modulating glycolysis to improve cancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2606. DOI: 10.3390/ijms24032606.

[21] JI X Y, SUN W, LV C Z, *et al*. Circular RNAs regulate glucose metabolism in cancer cells[J]. Onco Targets Ther, 2021, 14: 4005-4021. DOI: 10.2147/OTT.S316597.

[22] CAI Z R, HU Y, LIAO K, *et al*. Circular RNAs: emerging regulators of glucose metabolism in cancer[J]. Cancer Lett, 2023, 552: 215978. DOI: 10.1016/j.canlet.2022.215978.

[23] YU J, ZHANG H, ZHAO C, *et al*. CircRNA circ_0008037 facilitates tumor growth and the Warburg effect *via* upregulating NUCKS1 by binding to miR-433-3p in non-

small cell lung cancer[J]. Thorac Cancer, 2022, 13(2): 162-172. DOI: 10.1111/1759-7714.14235.

[24] LI H R, GUO H F, HUANG Q, *et al*. Circular RNA P4HB promotes glycolysis and tumor progression by binding with PKM2 in lung adenocarcinoma[J]. Respir Res, 2023, 24(1): 252. DOI: 10.1186/s12931-023-02563-7.

[25] ZHANG M X, WANG J L, MO C Q, *et al*. CircME1 promotes aerobic glycolysis and sunitinib resistance of clear cell renal cell carcinoma through cis-regulation of ME1[J]. Oncogene, 2022, 41(33): 3979-3990. DOI: 10.1038/s41388-022-02386-8.

[26] ZHOU S S, GUO Z Y, LV X L, *et al*. CircGOT1 promotes cell proliferation, mobility, and glycolysis-mediated cisplatin resistance *via* inhibiting its host gene *GOT*1 in esophageal squamous cell cancer[J]. Cell Cycle, 2022, 21(3): 247-260. DOI: 10.1080/15384101.2021.2015671.

[27] LU X P, XIE H G. Circ_0001971 makes progress of oral squamous cell carcinoma by targeting miR-107/FZD4 axis[J]. Oral Dis, 2023, 29(5): 1979-1990. DOI: 10.1111/odi.14207.

[28] CAI P, LI J J, CHEN G M, *et al*. MicroRNA-107 may regulate lung cancer cell proliferation and apoptosis by targeting TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1[J]. Oncol Lett, 2020, 19(3): 1958-1966. DOI: 10.3892/ol.2020.11248.

[29] JIN D, GUO J W, WU Y, *et al*. m^6A demethylase ALKBH5 inhibits tumor growth and metastasis by reducing YTHDFs-mediated YAP expression and inhibiting miR-107/LATS2-mediated YAP activity in NSCLC[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 40. DOI: 10.1186/s12943-020-01161-1.

[30] CISCATO F, FERRONE L, MASGRAS I, *et al*. Hexokinase 2 in cancer: a *Prima* donna playing multiple characters[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4716. DOI: 10.3390/ijms22094716.

[31] FERREIRA J C, KHRBTLI A R, SHETLER C L, *et al*. Linker residues regulate the activity and stability of hexokinase 2, a promising anticancer target[J]. J Biol Chem, 2021, 296: 100071. DOI: 10.1074/jbc.RA120.015293.

[32] WANG S B, ZHANG H, XIA L X, *et al*. Circular RNA circ_0061140 accelerates hypoxia-induced glycolysis, migration, and invasion in lung adenocarcinoma through the microRNA-653/hexokinase 2 (HK2) axis[J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 7156-7166. DOI: 10.1080/21655979.2021.2000743.

[33] CAO L L, WANG M, DONG Y J, *et al*. Circular RNA circRNF20 promotes breast cancer tumorigenesis and Warburg effect through miR-487a/HIF-1α/HK2[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 145. DOI: 10.1038/s41419-020-2336-0.

(**收稿**:2023-11-27;**修回**:2024-01-22)

(编辑 汪勤俭)