

·基础研究·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.007

circ_0072088 通过调控 miR-545-3p/STAT3 轴促进非小细胞肺癌细胞的恶性生物学行为

项保利, 王布, 林卫佳, 于亚楠 (河北北方学院附属第一医院呼吸与危重症医学科, 河北张家口 075000)

[摘要] **目的:** 探究环状 RNA(circular RNA, circRNA)0072088 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞中的生物学功能及其作用机制。**方法:** 在公共基因芯片数据库 Gene Expression Omnibus(GEO)中下载 GSE101684 数据集, 通过 GEO2R 分析得到差异基因。通过 qPCR 检测 NSCLC 细胞 H165、H358、H460、H226 和 A549 细胞中 circ_0072088 的表达水平, 随后采用 CCK-8 法和 Transwell 小室法分别检测 circ_0072088 对 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭的作用。通过 CircInteractome 和 TargetScan 数据库预测 circ_0072088 与 miR-545-3p、miR-545-3p 与 STAT3 之间的靶向关系, 并通过双荧光素酶报告基因实验和 RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)实验验证 circ_0072088、miR-545-3p 与 STAT3 之间的靶向关系。**结果:** circ_0072088 在 NSCLC 细胞系中的表达均显著上调(均 $P < 0.05$)。过表达 circ_0072088 促进了 NSCLC 细胞的增殖、侵袭和迁移(均 $P < 0.05$); 敲低 circ_0072088 抑制了 NSCLC 细胞的增殖、侵袭和迁移(均 $P < 0.05$)。miR-545-3p 是 circ_0072088 的下游靶点, 可以被 circ_0072088 吸附; STAT3 是 miR-545-3p 的靶基因, 可以被 circ_0072088 间接正向调控。**结论:** Circ_0072088 通过调节 miR-545-3p/STAT3 轴促进 NSCLC 细胞的增殖和转移。

[关键词] circ_0072088; miR-545-3p; STAT3; 非小细胞肺癌

[中图分类号] R734.2; R730.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)05-0469-08

circ_0072088 promotes the malignant biological behaviors of non-small cell lung cancer cells by regulating miR-545-3p/STAT3 axis

XIANG Baoli, WANG Bu, LIN Weijia, YU Yanan (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the biological function and mechanism of circular RNA (circRNA) 0072088 in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Method:** GSE101684 Gene expression profiles data set were downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO, GSE101684), and the differentially expressed genes (DEGs) were screened with GEO2R analysis was used to obtain differential genes. qPCR was used to detect the expression of circ_0072088 in NSCLC cell lines (H165, H358, H460, H226 and A549 cells) was detected using qPCR. CCK-8 assay and Transwell cell method chamber assays were utilized to assess cell proliferation, migration and invasion. CircInteractome and TargetScan database, dual luciferase reporter gene experiment and RNA binding protein immunoprecipitation (RIP) experiment were used to predict and verify the targeting relationship between circ_0072088 and miR-545-3p, as well as between miR-545-3p and STAT3, which were then verified by Dual luciferase reporter gene experiment and RNA binding protein immunoprecipitation (RIP) experiment. **Results:** The expression of circ_0072088 in NSCLC cell lines was significantly up-regulated ($P < 0.05$). Over-expression of circ_0072088 promoted the proliferation, invasion and migration of NSCLC cells ($P < 0.05$); knock down of circ_0072088 inhibited the proliferation, invasion and migration of NSCLC cells ($P < 0.05$). MiR-545-3p is the downstream target of circ_0072088 and can be sponged by circ_0072088; STAT3 is the target gene of miR-545-3p, which can be indirectly and positively regulated by circ_0072088. **Conclusion:** Circ_0072088 promotes the proliferation and metastasis of NSCLC cells by regulating the miR-545-3p/STAT3 axis.

[Key words] circ_0072088; miR-545-3p; STAT3; non-small cell lung cancer (NSCLC)

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(5): 469-476. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.007]

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一^[1-2], 肺癌主要分为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 和小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC), 其中 NSCLC 占肺癌病例总数的 85%^[3]。目前, NSCLC 的治疗方法包括手术切除、化疗、放疗、靶向治疗和免疫治疗^[1]。尽管近年来 NSCLC 的治疗不断取得进步, 然而由于 NSCLC 具有较强的侵袭能力, 术后复发和转移率高, 导致患者预后极差^[4]。为了提高 NSCLC 患者的生存率和

[基金项目] 张家口市科学技术研究与发展计划资助项目 (No.1911021D-3)。Project supported by the Science and Technology Research and Development Plan Project of Zhangjiakou City (No.1911021D-3)

[作者简介] 项保利(1979-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事呼吸介入治疗、肺癌诊治和肿瘤分子生物学研究工作, E-mail: liao3254@163.com

[通信作者] 王布(WANG Bu, corresponding author), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事呼吸病学相关的研究和诊治工作, E-mail: 289974726@qq.com

治愈率,寻找新的、有效的 NSCLC 生物标志物有重要意义。越来越多的研究表明,真核细胞中的非编码 RNA 对肿瘤细胞的增殖,迁移和侵袭都有不可或缺的调控作用^[5]。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是由前体信使 RNA(pre-mRNA) 反向剪切形成的新型非编码闭合环状 RNA,在真核生物中广泛表达^[6-7]。由于 circRNA 本身缺少 5'末端帽子和 poly A 尾巴结构,不会轻易被核糖核酸酶和核酸外切酶降解,其相对于线形 RNA 来说结构更加稳定^[8-9]。越来越多的科研人员发现, circRNA 参与肿瘤细胞的侵袭和转移等多种生物学过程,其主要生物学功能和临床意义也引起了越来越多的重视^[10-11]。同一肿瘤可受多种 circRNA 调控,如 circ_0043278 和 circ_0013958 均显著促进 NSCLC 细胞的增殖和侵袭,并抑制其凋亡^[12-13];同一种 circRNA 在不同肿瘤细胞中的功能也不尽相同,如 circ_0004277 抑制结肠癌细胞的生长^[14],而在白血病中抑制肿瘤细胞的增殖和迁移^[11]。然而 circ_0072088 在 NSCLC 的进展中发挥作用的机制尚不十分清楚。研究^[15]表明, miR-545-3p 在 NSCLC 中表达下调,在肿瘤的生长中发挥抑制作用; STAT3 在 NSCLC 中表达上调,可促进 NSCLC 细胞的增殖和转移^[16-17]。本研究通过生物信息学预测、相关机制实验探讨 miR-545-3p 与 STAT3、circ_0072088 间的靶向调控关系,以及 miR-545-3p/STAT3 轴对 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭的影响,希望能为 NSCLC 的诊断和治疗提供新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

NSCLC 细胞 H165、H358、H460、H226、A549 及正常肺上皮细胞 BEAS-2B 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库; Dulbecco 改良的 DMEM 培养基购自 Hyclone 公司 (Logan, UT, USA); 10% 胎牛血清购自 GE Healthcare Life Sciences 公司 (Little Chalfont, UK); 青霉素、链霉素、胰蛋白酶和脂质体 Lipofectamine 2000 均购自 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA, USA); cDNA 逆转录试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒和 RIPA 蛋白裂解液均购自 Beyotime 公司 (Shanghai, China), CCK-8 法检测试剂盒购自 MedChemExpress 公司 (Monmouth Junction, NJ, USA); 一抗 STAT 抗体和二抗抗体均购自 Abcam 公司 (Shanghai, China), 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司 (Madison, WI, USA); MmagnaRIP RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒购自 Millipore 公司 (Billerica, MA, USA); 空载质粒和 circ_0072088 过表达质粒均购自 Bio Link 公司 (Shanghai, China)。

1.2 细胞培养和转染

将所有细胞用含 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 完全饱和湿度条件下常规培养,每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行后续实验。使用 Lipofectamine 2000 分别将空载质粒 (Vector)、circ_0072088 过表达质粒、靶向 circ_0072088 的 siRNA (si-circ_0072088: 5'-TTTCCAAGCTGGCCCTTACGT-3')、对照 si-NC (序列: 5'-GUACGCGGAAUACUUCGAUU-3')、miR-545-3p 模拟物 (mimics) 和 miR-545-3p 抑制剂 (inhibitors) 及其对照 mimics NC 转染细胞,同时转染空质粒作为对照组。

1.3 qPCR 检测 circ_0072088 在细胞中的表达水平

采用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA 并检测浓度后,按 TaKaRa 试剂盒操作说明反转录成 cDNA。取 1 μ l 的 cDNA 样本采用 SYBR Green Premix Ex Taq II 进行 qPCR,以 U6 和 GAPDH 为内参,引物序列见表 1,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 circ_0072088 相对表达量。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

| Target | Primer sequence |
|--------------|-----------------------------|
| circ_0072088 | F: GACCTCTGTCAGCGAGTTCC |
| | R: CTGCCTGTAACCTCTCTTCAGT |
| miR-545-3p | F: TGGCTCAGTTCAGCAGGAAC |
| | R: universal reverse primer |
| GAPDH | F: AGAAGGCTGGGGCTCATTTG |
| | R: AGGGGCCATCCACAGTCTTC |
| U6 | F: CTCGCTTCGGCAGCACA |
| | R: AACGCTTCACGAATT TGCCT |

1.4 核质分离实验

将 NSCLC 细胞用 150 μ l 核质分离裂解液重悬,冰上裂解 5、10 min,每隔 1 min 颠倒混匀。在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min,上清为细胞质样品,沉淀为细胞核。使用 TRIzol 法分别抽提 RNA 并溶于 DEPC 水中,-80 $^{\circ}$ C 保存,随后采用 qPCR 检测 circ_0072088, U6 和 GAPDH 的相对富集程度。

1.5 CCK-8 法检测

使用 CCK-8 试剂盒检测 A549 细胞活力,取转染后的 A549 细胞平铺在 96 孔板中,每个孔中约 2×10^3 个细胞,培养 48 h 后每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,测定各孔在 450 nm 处的光密度 (D) 值。此后分别在第 24、48、72 和 96 h 各测定 1 次。

1.6 Transwell 实验检测

采用 Transwell 小室和基质胶侵袭实验测定细胞的迁移和侵袭能力。取对数生长期的 A549 细胞,胰酶消化各组细胞,用不含血清的 DMEM 培养基重悬细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml。在 Transwell 小室 (8 μ m) 上室加入细胞悬液 200 μ l,同

时在下室加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养 48 h, 取出小室用 4% 的多聚甲醛固定 15 min, 0.1% 结晶紫溶液染色 15 min, PBS 洗去残余结晶紫后用棉拭子小心擦去 Transwell 小室上室中未穿膜的细胞, 显微镜下对穿膜细胞进行计数。在侵袭实验中, 除了 Transwell 小室底层覆有一层基质胶, 其余步骤同迁移实验。

1.7 WB 法检测

用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞, 提取总蛋白, 使用 BCA 蛋白浓度试剂盒进行定量, 制备蛋白样品行 SDS-PAGE。选取 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶, 取 20 μl 蛋白样品进行上样, 电泳结束后, 将蛋白在 200 mA 恒流的条件下电转 90 min 转移至 PVDF 膜上。使用 10% 的脱脂乳粉溶液对 PVDF 膜进行封闭 2 h, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜。使用 TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 将膜与二抗溶液在室温下孵育 2 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 加入 ECL 化学发光液对蛋白进行显色成像。最后采用自动成像系统进行图像采集, 使用 Image Pro 软件测算蛋白条带灰度值, 计算蛋白相对表达量并进行统计学分析。

1.8 双荧光素酶报告基因实验检测

野生型 pGL3-circ_0072088 (circ_0072088-wild) 和突变型 pGL3-circ_0072088 (circ_0072088) 质粒、野生型 pGL3-STAT3-3'UTR (pGL3-STAT3-3'UTR-wild) 和突变型 pGL3-STAT3-3'UTR (pGL3-STAT3-3'UTR-mutant) 质粒均由 Promega 公司合成。将 A549 细胞按 4.5×10^4 个/孔细胞密度接种于 48 孔板

中, 培养至约 70% 汇合。然后用 Lipofectamine 2000 将上述报告载体与 miR-545-3p 模拟物共转染 A549 细胞, 48 h 后用双荧光素酶报告系统分析荧光素酶活性。

1.9 RNA 免疫沉淀 (RIP) 实验检测

采用 MmagnaRIP RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒验证 circ_0072088 和 miR-545-3p 的靶向关系, 按试剂盒说明书进行操作。将细胞在 RIP 裂解缓冲液中裂解, 将 100 μl 细胞裂解液与含有与人抗 Argonaute2 (Ago2) 抗体或阴性对照 IgG 抗体偶联的磁珠在 RIP 缓冲液中孵育。将样品与蛋白酶 K 振荡孵育以消化蛋白质, 获得 RNA 的沉淀。取纯化的 RNA 进行 qPCR 分析以进一步研究。

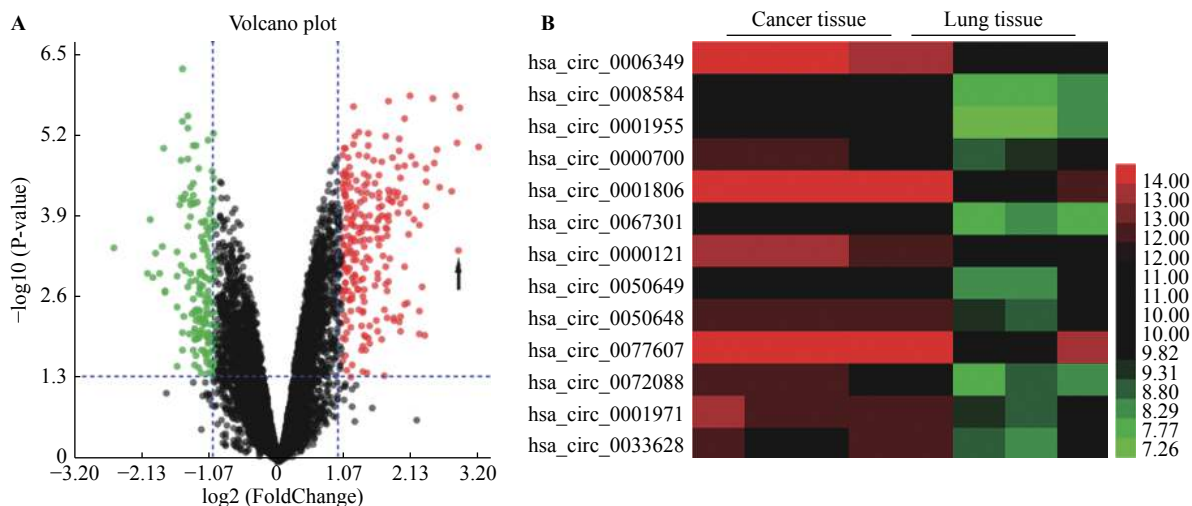
1.10 统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计学分析, 所有实验独立重复 3 次, 符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据之间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两组之间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 circ_0072088 在 NSCLC 组织中呈高表达

从公共基因芯片数据库 Gene Expression Omnibus (GEO) 中下载 GSE101684 数据集, 通过 GEO2R 分析差异基因, 结果 (图 1) 显示, circ_0072088 在 NSCLC 组织中的表达水平显著高于正常肺组织 ($P < 0.05$)。



A: Volcano map was used to show the differentially expressed circRNAs in NSCLC tissues ($|\text{FoldChange}| > 1, P < 0.05$);

B: Heat map was used to show the differential expression of circ_0072088 in NSCLC tissues

图 1 circ_0072088 在 NSCLC 组织中的表达

Fig.1 The expression of circ_0072088 in NSCLC tissues

2.2 过表达 circ_0072088 促进 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭

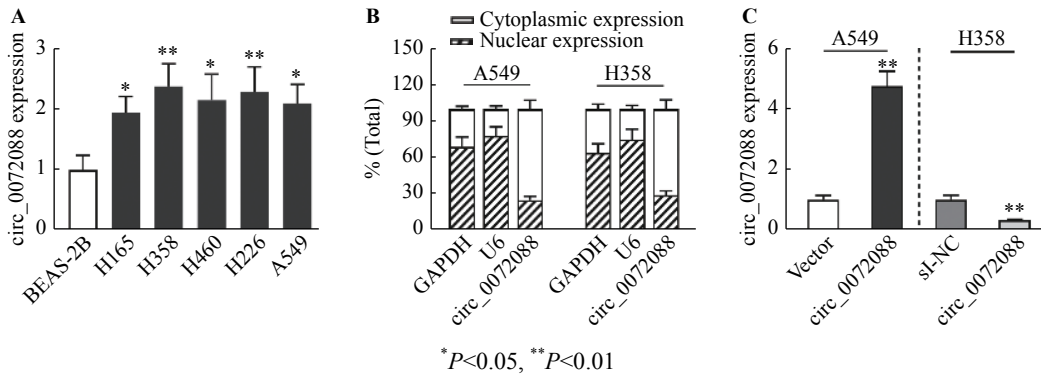
qPCR 检测结果显示, circ_0072088 在 NSCLC 细胞中的表达均显著高于 BEAS-2B 细胞 (均

$P < 0.05$, 图 2A), 并且在 A549 中表达相对最低、在 H358 中表达最高; circ_0072088 主要分布在细胞质中 (图 2B); 将 circ_0072088 过表达质粒转染 A549 细胞, si-circ_0072088 转染 H358 细胞后, 实验组细

胞中的 circ_0072088 表达均被有效提升或抑制 (均 $P < 0.01$, 图 2C)。

CCK-8 实验检测结果 (图 3A) 显示, 与空载体对照组相比, circ_0072088 过表达组 A549 细胞的增殖水平显著升高 (48 h 起, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), circ_0072088 敲低组 H358 细胞增殖水平显著降

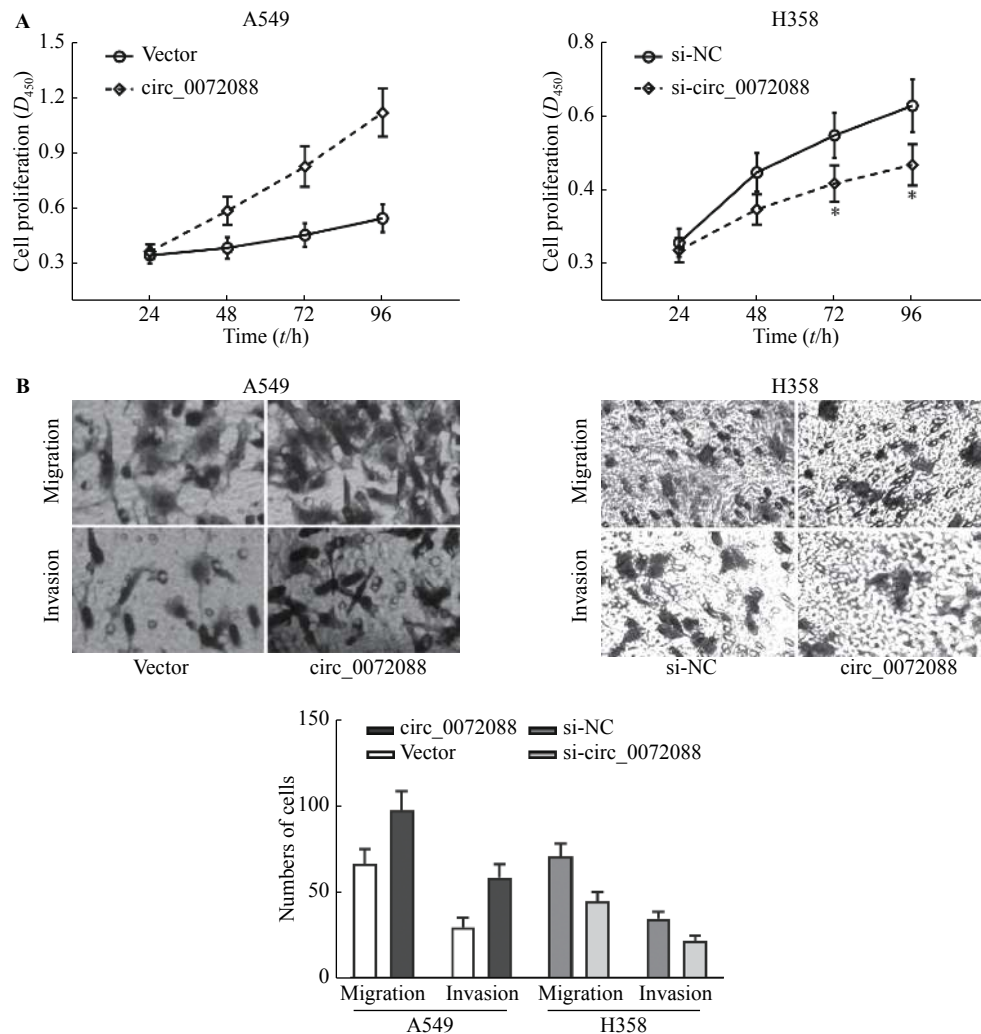
低 (72、96 h, 均 $P < 0.05$)。Transwell 实验检测结果 (图 3B) 显示, 与空载体对照组相比, circ_0072088 过表达组 A549 细胞的迁移和侵袭细胞数均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), circ_0072088 敲低组 H358 细胞的迁移和侵袭细胞数均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



A: circ_0072088 expression in NSCLC cells was detected by qPCR; B: The subcellular localization of circ_0072088 was verified by qPCR; C: Transfection efficiency was detected by qPCR

图 2 circ_0072088 在 NSCLC 细胞中的表达

Fig.2 Expression of circ_0072088 in NSCLC cells



A: Cell viability was detected by CCK-8 assay; B: Cell migration and invasion were detected by Transwell assay ($\times 40$)

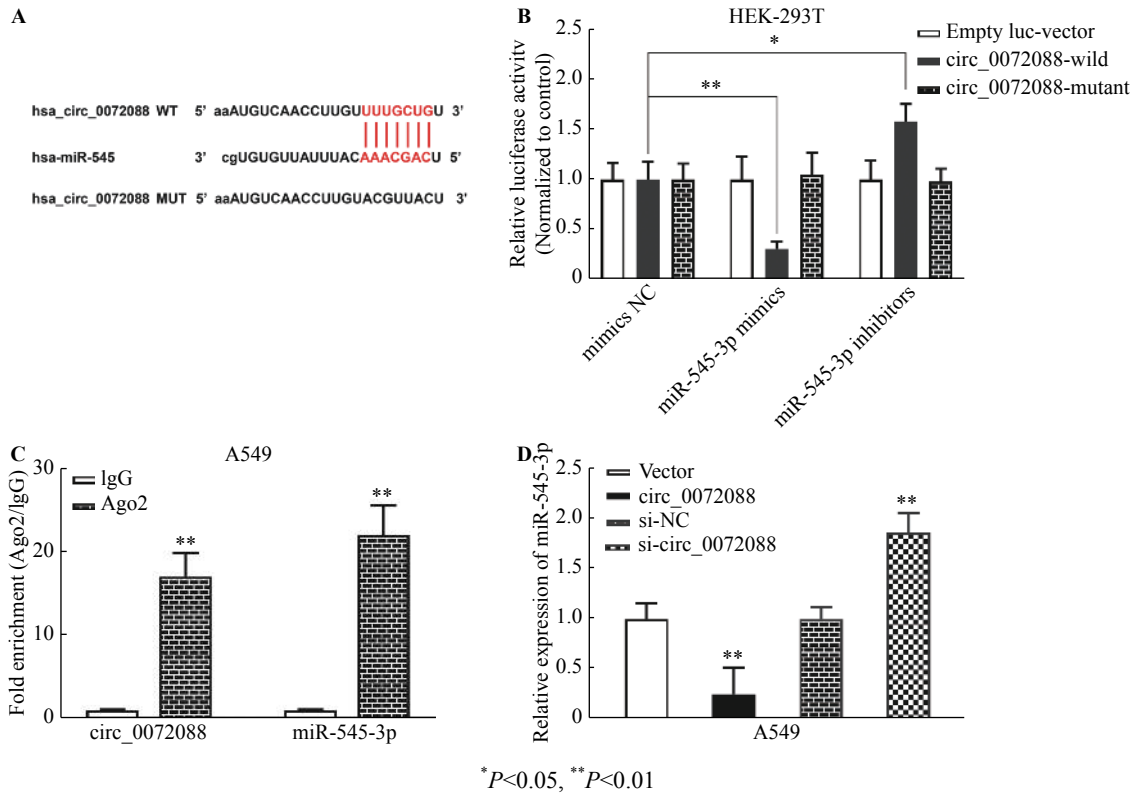
图 3 Circ_0072088 对 A549 和 H358 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Fig.3 The effects of circ_0072088 on cell viability, migration and invasion of A549 and H358 cells

2.3 circ_0072088 直接靶向 miR-545-3p

为了进一步验证 circ_0072088 的作用机制, 通过 CircInteractome 网站 (<https://circinteractome.nia.nih.gov/>) 预测发现, miR-545-3p 与 circ_0072088 之间存在结合位点 (图 4A)。双荧光素酶报告基因实验结果 (图 4B) 证实, 转染 miR-545-3p mimics 可显著抑制 circ_0072088-Wild 的荧光素酶活性 ($P < 0.05$

或 $P < 0.01$), 而对于 circ_0072088-Mutant 的荧光素酶活性无显著影响。RIP 实验结果 (图 4C) 显示, 在 Ago2 组中, miR-545-3p 与 circ_0072088 高度富集, 而在抗 IgG 组中未发现明显富集。此外, 过表达 circ_0072088 显著抑制 A549 细胞中 miR-545-3p 的表达, 而敲低 circ_0072088 则显著上调 miR-545-3p 的表达 (均 $P < 0.01$, 图 4D)。



A: The binding site of between circ_0072088 and miR-545-3p; B, C: Dual luciferase reporter gene experiment and RIP experiment verify verified the targeting relationship between miR-545-3p and circ_0072088; D: The effect of over-expression or knockdown of circ_0072088 on the expression of miR-545-3p

图 4 过表达 circ_0072088 和 miR-545-3p 对 A549 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

Fig.4 Effects of overexpression of circ_0072088 and miR-545-3p on the proliferation, migration and invasion of A549 cells

2.4 circ_0072088 通过吸附 miR-545-3p 对 NSCLC 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

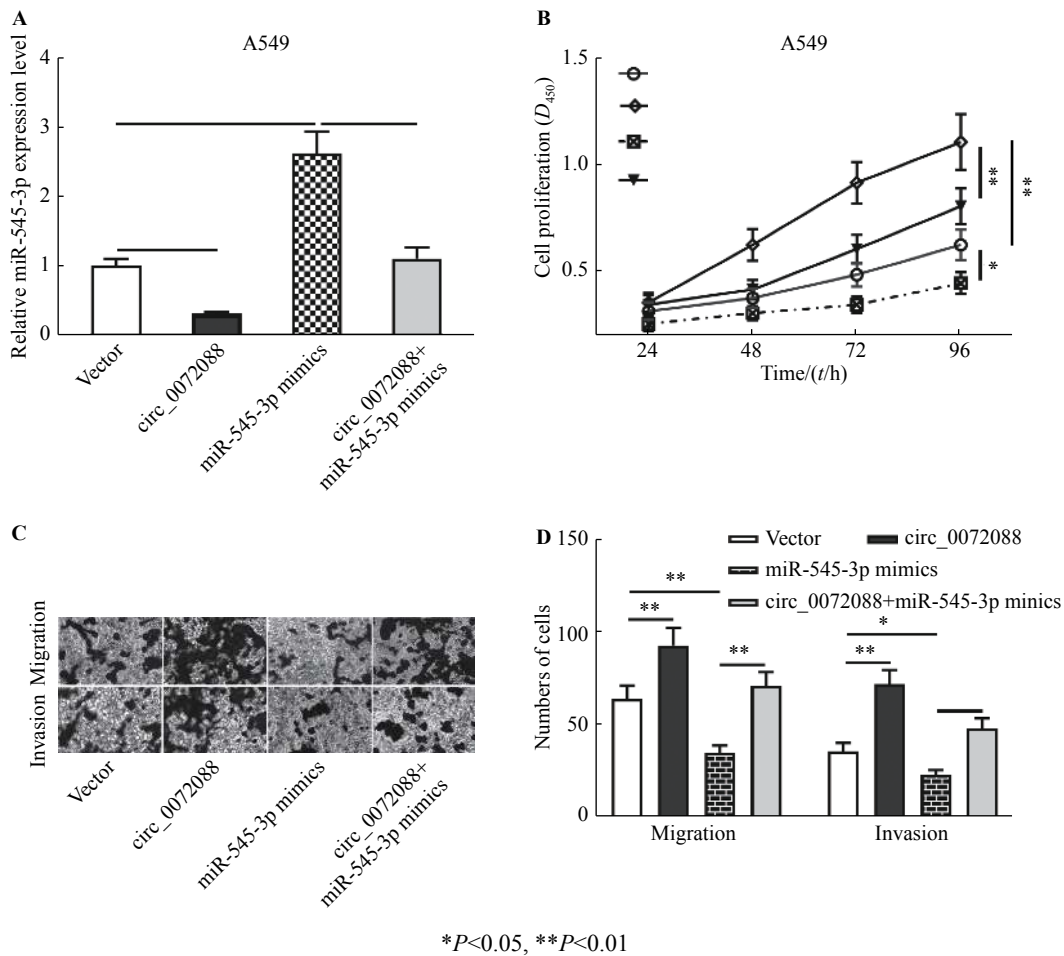
qPCR 检测结果 (图 5A) 显示, 与空载体对照组相比, circ_0072088 过表达质粒转染组 A549 细胞中 miR-545-3p 的表达显著降低 ($P < 0.01$), miR-545-3p 模拟物组 miR-545-3p 的表达显著升高 ($P < 0.01$), 而 circ_0072088 过表达质粒+ miR-545-3p 模拟物共转染组 miR-545-3p 的表达与对照组无显著差异, 提示转染成功。

CKK-8 (图 5B) 和 Transwell (图 5C) 实验检测结果表明, 相比于空载体对照组, circ_0072088 过表达组 A549 细胞的增殖, 迁移和侵袭能力均显著升高 (均 $P < 0.01$), miR-545-3p 模拟物组细胞的增殖、迁移和侵袭能力均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 上调 miR-545-3p 可削弱过表达 circ_0072088 对细胞增

殖、迁移和侵袭的促进作用。

2.5 circ_0072088 通过吸附 miR-545-3p 促进 STAT3 的表达

通过 Targetscan (http://www.targetscan.org/vert_72/) 数据库进行预测发现, STAT3 是 miR-545-3p 的潜在靶基因之一, 结合位点见图 6A。双荧光素酶报告基因实验证实, 转染 miR-545-3p 模拟物可显著抑制 STAT3-Wild 组细胞中的荧光素酶活性 ($P < 0.01$), 而对 STAT3-Mutant 组的荧光素酶活性无显著影响 (图 6B)。WB 检测结果 (图 6C) 显示, 相比于对照组, 过表达 circ_0072088 促进 STAT3 的表达, 而上调 miR-545-3p 抑制 STAT3 的表达, 且上调 miR-545-3p 削弱过表达 circ_0072088 对 STAT3 表达的促进作用。



A: Binding site of MiR-545-3p and STAT3 predicted by the Targetscan database; B: Effect of overexpression of circ_0072088 and miR-545-3p on the proliferation of A549 cells detected by CCK-8 assay; C: Effect of overexpression of circ_0072088 and miR-545-3p on the migration and invasion of A549 cells detected with Transwell experiment

图 5 circ_0072088 通过吸附 miR-545-3p 促进 A549 细胞中 STAT3 蛋白的表达

Fig.5 circ_0072088 promoted the expression of STAT3 protein in A549 cells by adsorbing miR-545-3p

3 讨论

研究^[18-20]发现, circRNA 可能在多种疾病的发展中起作用, 包括动脉粥样硬化性血管疾病的风险、神经系统疾病、病毒疾病、骨关节炎和糖尿病等。重要的是, circRNA 在多种肿瘤中异常表达, 并参与肿瘤的发生发展^[20]。例如, circ_0078767 和 circ_0001649 可抑制 NSCLC 细胞的生长^[21-22], 而 circ_0020123 可以促进 NSCLC 细胞增殖和侵袭^[23], circ_0072088 能促进 NSCLC 细胞和肺癌裸鼠移植瘤的生长^[24]。本研究发现, circ_0072088 能显著促进 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭, 这表明 circ_0072088 有望成为 NSCLC 的新型诊断标志物和分子治疗靶点。

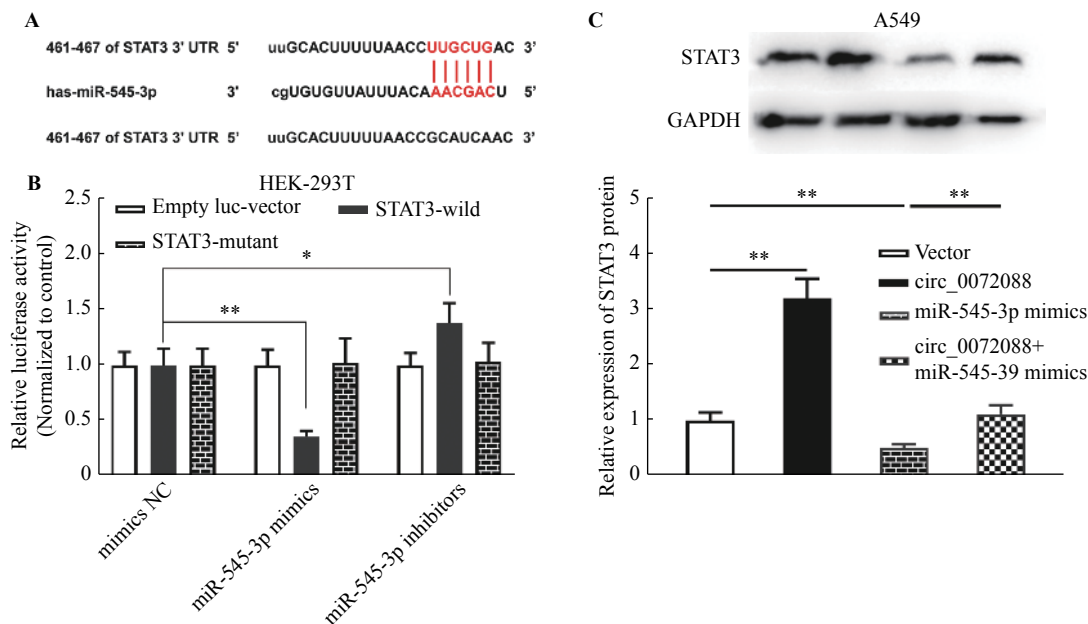
miRNA 在肿瘤的发生、发展和转移中发挥着重要的作用^[25]。关于 miR-545-3p 的研究发现, 其可通过靶向 CBLL1 抑制 NSCLC 细胞的生长, 并增强其对顺铂的化学敏感性^[26]; 可通过抑制 p38/丝裂原激

活的蛋白激酶通路在体内和体外抑制 NSCLC 的进展, 并且其表达受到 circ_0007580 的靶向调控^[15]。本研究发现, miR-545-3p 是 circ_0072088 下游靶点, circ_0072088 可通过吸附 miR-545-3p 抑制 A549 细胞的恶性生物学行为。

STAT3 是 STAT 转录因子家族的重要成员之一, 在调控细胞增殖、分化、凋亡、血管生成、免疫反应、肿瘤发生和转移等生物学进程中发挥重要作用^[27-28]。JAK/STAT、MAPK 和 mTOR 途径均可激活 STAT3, 被激活的 STAT3 易位至细胞核内诱导许多基因的转录, 从而促进多种肿瘤的恶性进展^[29-30]。此外, STAT3 的表达还受到 miRNA 的直接靶向调控和 circRNA 的间接调控^[31]。在 NSCLC 细胞中发现, circ_0076305 通过吸附 miR-296-5p 上调 STAT3 的表达, 从而促进肿瘤细胞的增殖和转移^[32]。circ_ZNF124 通过吸附 miR-337-3p 促进 STAT3 的表达, 从而促进 NSCLC 的发生和发展^[31]。近年来研究^[26, 33-34]表明, miR-545-3p 通过靶向 CBLL1、

VEGFA 和 MT1M 参与肿瘤的发生发展。本研究发
现, STAT3 也是 miR-545-3p 的靶基因, 进一步研究

表明 circ_0072088 通过吸附 miR-545-3p 上调 STAT3
的表达, 从而促进 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Vector group

A: The binding site between circ_0072088 and miR-545-3p; B, C: Dual luciferase reporter gene experiment and RIP experiment verify the targeting relationship between miR-545-3p and circ_0072088; D: The effect of over-expression or knockdown of circ_0072088 on the expression of miR-545-3p

图 6 circ_0072088 靶向调控 miR-545-3p 的表达

Fig.6 circ_0072088 promoted the protein expression of STAT3 in A549 cells by sponging miR-545-3p

总之, 本研究发
现 circ_0072088 通过调
控 miR-545-3p/STAT3 分子轴促进 NSCLC A549 细胞
的恶性生物学行为, 表明 circ_0072088 可作为
NSCLC 的一个候选的预后生物标记物和新的治疗
靶点。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FEDEWA S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2017, 67(3): 177-193. DOI: 10.3322/caac.21395.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [3] ZHOU B, YU Y L, QIU Z, et al. GDF11 ameliorated myocardial ischemia reperfusion injury by antioxidant stress and up-regulating autophagy in STZ-induced type 1 diabetic rats[J/OL]. *Acta Cir Bras*, 2020, 34(11): e201901106[2021-03-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6958563/>. DOI:10.1590/s0102-86502019011000006.
- [4] HERBST R S, MORGENZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454. DOI: 10.1038/nature25183.
- [5] SANTOS R M, MORENO C, ZHANG W C. Non-coding RNAs in lung tumor initiation and progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2774. DOI: 10.3390/ijms21082774.
- [6] SZABO L, SALZMAN J. Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges[J]. *Nat Rev Genetics*, 2016, 17(11): 679-692. DOI: 10.1038/nrg.2016.114.
- [7] WILUSZ J E. Circular RNAs: Unexpected outputs of many protein-coding genes[J/OL]. *RNA Biol*, 2017, 14(8): 1007-1017[2020-08-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5680674/>. DOI:10.1080/15476286.2016.1227905.
- [8] WILUSZ J E. A 360° view of circular RNAs: From biogenesis to functions[J/OL]. *WIREs RNA*, 2018, 9(4): e1478[2020-08-22]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wrna.1478>. DOI:10.1002/wrna.1478.
- [9] WERFEL S, NOTHJUNGE S, SCHWARZMAYR T, et al. Characterization of circular RNAs in human, mouse and rat hearts[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 98: 103-107. DOI: 10.1016/j.jmcc.2016.07.007.
- [10] TANG Q, HANN S S. Biological roles and mechanisms of circular RNA in human cancers[J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 2067-2092. DOI: 10.2147/ott.s233672.
- [11] LI W, ZHONG C Q, JIAO J, et al. Characterization of hsa_circ_0004277 as a new biomarker for acute myeloid leukemia via circular RNA profile and bioinformatics analysis[J/OL]. *Int J MoSci* 2017, 18(3): E597[2020-08-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372613/>. DOI:10.3390/ijms18030597.
- [12] HANG D, ZHOU J, QIN N, et al. A novel plasma circular RNA circFARSA is a potential biomarker for non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(6): 2783-2791. DOI: 10.1002/

- cam4.1514.
- [13] WANG C D, TAN S Y, LIU W R, et al. RNA-Seq profiling of circular RNA in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma[J/OL]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 134[2020-08-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6724331/>. DOI:10.1186/s12943-019-1061-8.
- [14] YANG L, SUN H W, LIU X, et al. Circular RNA hsa_circ_0004277 contributes to malignant phenotype of colorectal cancer by sponging miR-512-5p to upregulate the expression of PTMA[J]. *J Cell Physiol*, 2020: jcp.29484. DOI: 10.1002/jcp.29484.
- [15] CHEN S F, LU S, YAO Y N, et al. Downregulation of hsa_circ_0007580 inhibits non-small cell lung cancer tumorigenesis by reducing miR-545-3p sponging[J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(14): 14329-14340[2020-04-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7425484/>. DOI:10.18632/aging.103472.
- [16] LI Y L, DING K, HU X, et al. DYRK1A inhibition suppresses STAT3/EGFR/Met signalling and sensitizes EGFR wild-type NSCLC cells to AZD9291[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7427-7437. DOI: 10.1111/jcmm.14609.
- [17] YAN X H, LI P F, ZHAN Y H, et al. Dihydroartemisinin suppresses STAT3 signaling and Mcl-1 and Survivin expression to potentiate ABT-263-induced apoptosis in Non-small Cell Lung Cancer cells harboring EGFR or RAS mutation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 150: 72-85. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.01.031.
- [18] QU S B, YANG X S, LI X L, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 141-148. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.003.
- [19] PATOP I L, KADENER S. circRNAs in Cancer[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2018, 48: 121-127. DOI: 10.1016/j.gde.2017.11.007.
- [20] ZHANG H D, JIANG L H, SUN D W, et al. CircRNA: a novel type of biomarker for cancer[J]. *Breast Cancer*, 2018, 25(1): 1-7. DOI: 10.1007/s12282-017-0793-9.
- [21] CHEN T, YANG Z Z, LIU C, et al. Circ_0078767 suppresses non-small-cell lung cancer by protecting RASSF1A expression via sponging miR-330-3p[J/OL]. *Cell Prolif*, 2019, 52(2): e12548[2020-08-22]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cpr.12548>. DOI:10.1111/cpr.12548.
- [22] LIU T M, SONG Z, GAI Y L. Circular RNA circ_0001649 acts as a prognostic biomarker and inhibits NSCLC progression via sponging miR-331-3p and miR-338-5p[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3): 1503-1509. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.070.
- [23] WAN J R, HAO L G, ZHENG X Y, et al. Circular RNA circ_0020123 promotes non-small cell lung cancer progression by acting as a ceRNA for miR-488-3p to regulate ADAM9 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(2): 303-309. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.05.158.
- [24] TAN Z F, CAO F, JIA B, et al. Circ_0072088 promotes the development of non-small cell lung cancer via the miR-377-5p/NOVA2 axis[J/OL]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(8): 2224-2236[2020-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7396390/>. DOI:10.1111/1759-7714.13529.
- [25] VESCOVO V D, DENTI M A. MicroRNA and lung cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 889(4): 153-177. DOI: 10.1007/978-3-319-23730-5_9.
- [26] LI H P, LIU F F, QIN W J. Circ_0072083 interference enhances growth-inhibiting effects of cisplatin in non-small-cell lung cancer cells via miR-545-3p/CBLL1 axis[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 78[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7066755/>. DOI:10.1186/s12935-020-1162-x.
- [27] FATHI N, RASHIDI G, KHODADADI A, et al. STAT3 and apoptosis challenges in cancer[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 117: 993-1001. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.121.
- [28] GUANIZO A C, FERNANDO C D, GARAMA D J, et al. STAT3: a multifaceted oncoprotein[J]. *Growth Factors*, 2018, 36(1/2): 1-14. DOI: 10.1080/08977194.2018.1473393.
- [29] NJATCHA C, FAROOQUI M, KORNBERG A, et al. STAT3 cyclic decoy demonstrates robust antitumor effects in non-small cell lung cancer[J/OL]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(9): 1917-1926[2020-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6125196/>. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-17-1194.
- [30] XU G J, CAI J, WANG L, et al. MicroRNA-30e-5p suppresses non-small cell lung cancer tumorigenesis by regulating USP22-mediated Sirt1/JAK/STAT3 signaling[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 362(2): 268-278. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.11.027.
- [31] LI Q P, HUANG Q, CHENG S F, et al. Circ_ZNF124 promotes non-small cell lung cancer progression by abolishing miR-337-3p mediated downregulation of JAK2/STAT3 signaling pathway[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 291[2020-08-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6854740/>. DOI:10.1186/s12935-019-1011-y.
- [32] DONG Y, XU T, ZHONG S P, et al. Circ_0076305 regulates cisplatin resistance of non-small cell lung cancer via positively modulating STAT3 by sponging miR-296-5p[J]. *Life Sci*, 2019, 239: 116984. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116984.
- [33] ZHONG Y W, WANG Y D, DANG H M, et al. LncRNA AFAP1-AS1 contributes to the progression of endometrial carcinoma by regulating miR-545-3p/VEGFA pathway[J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 53: 101606. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101606.
- [34] LIU C J, HUANG F Z, PENG D Z, et al. MiR-545-3p/MT1M axis regulates cell proliferation, invasion and migration in hepatocellular carcinoma[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, 108: 347-354. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.09.009.

[收稿日期] 2020-12-28

[修回日期] 2021-04-16

[本文编辑] 黄静怡