

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.04.005

· 基础研究 ·

CircPUM1 通过 miR-337-3p/NPM1 轴调控子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的恶性生物学行为

万亚丽, 吴云龙, 詹磊(安徽医科大学第一附属医院 妇产科, 安徽 合肥 230001)

[摘要] **目的:** 探讨环状 RNA(circRNA)pumilio RNA 结合家族成员 1(PUM1)调节 miR-337-3p/核磷蛋白 1(NPM1)轴对子宫内膜癌(EC)Ishikawa 细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响。**方法:** 选用 Ishikawa 细胞, 利用 RNA 干扰技术分别将 sh-circPUM1 及其阴性对照(sh-NC)、anti-miR-337-3p 及其阴性对照(anti-NC)质粒转染至 Ishikawa 细胞, 实验分为对照组(未转染细胞)、sh-NC 组、sh-circPUM1 组、sh-circPUM1 + anti-NC 组、sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p 组。qPCR 法检测各组 Ishikawa 细胞中 circPUM1、miR-337-3p、NPM1 mRNA 的表达, CCK-8 法、EdU 染色法、Transwell 小室实验和流式细胞术分别检测敲低 circPUM1 对 Ishikawa 细胞增殖、迁移和侵袭及凋亡的影响, WB 法检测 Ishikawa 细胞中 PCNA、NPM1、MMP-9、SNAIL、E-cadherin、BAX、C-caspase-3 蛋白表达变化。双萤光素酶报告基因实验验证 circPUM1 与 miR-337-3p、miR-337-3p 与 NPM1 之间的靶向关系。**结果:** 与 sh-NC 组和对照组相比, sh-circPUM1 组 Ishikawa 细胞增殖能力、EdU 阳性细胞率、迁移及侵袭细胞数、circPUM1、NPM1 mRNA 及蛋白、PCNA、NPM1、MMP-9 和 SNAIL 蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$), 细胞凋亡率、miR-337-3p, 以及细胞中 E-cadherin、BAX 和 C-caspase-3 蛋白表达均显著增加(均 $P < 0.05$); 与 sh-circPUM1 组、sh-circPUM1 + anti-NC 组相比, sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p 组细胞凋亡率、miR-337-3p、E-cadherin、BAX、C-caspase-3 蛋白表达均显著降低(均 $P < 0.05$), 细胞增殖能力、EdU 阳性细胞率、迁移及侵袭细胞数、NPM1 mRNA 及蛋白、PCNA、NPM1、MMP-9 和 SNAIL 蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$)。circPUM1 可靶向负调控 miR-337-3p、miR-337-3p 可靶向负调控 NPM1。**结论:** 敲低 circPUM1 可以抑制 Ishikawa 细胞的恶性生物学行为, 其机制可能是通过靶向 miR-337-3p/NPM1 轴实现的。

[关键词] 环状 RNA; pumilio RNA 结合家族成员 1; miR-337-3p; 核磷蛋白 1; 子宫内膜癌; Ishikawa 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡
[中图分类号] R737.33; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)04-0378-08

CircPUM1 regulates malignant biological behaviors of endometrial cancer Ishikawa cells through the miR-337-3p/NPM1 axis

WAN Yali, WU Yunlong, ZHAN Lei (Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of circular RNA (circRNA) pumilio RNA binding family member 1 (PUM1) on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of endometrial cancer (EC) Ishikawa cells by regulating the miR-337-3p/nucleophosmin 1 (NPM1) axis. **Methods:** Ishikawa cells were selected and plasmid sh-circPUM1 and its negative control (sh-NC), anti-miR-337-3p and its negative control (anti-NC) were transfected into Ishikawa cells by RNA interference. The experiment cells were divided into the control group (non-transfected cells), sh-NC group, sh-circPUM1 group, sh-circPUM1 + anti-NC group and sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p group. The qPCR method was applied to detect the expressions of circPUM1, miR-337-3p, and NPM1 mRNA in Ishikawa cells in each group. CCK-8 method, EdU staining method, Transwell assay, and flow cytometry were applied respectively to detect the effects of knocking down circPUM1 on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of Ishikawa cells. Western blot was applied to detect the changes in the expressions of PCNA, NPM1, MMP-9, SNAIL, E-cadherin, BAX and C-caspase-3 proteins in Ishikawa cells. Dual luciferase reporter gene experiment was applied to verify the targeting relationship between circPUM1 and miR-337-3p, and between miR-337-3p and NPM1. **Results:** Cell proliferation ability, EdU positive cell rate, migration and invasion numbers, circPUM1, NPM1 mRNA and protein, the expressions of PCNA, NPM1, MMP-9 and SNAIL protein in Ishikawa cells in the sh-circPUM1 group were significantly lower than those in the sh-NC group and Control group (all $P < 0.05$); the

[基金项目] 安徽医科大学 2020 年度科研基金项目(No. 2020xkj058)

[作者简介] 万亚丽(1993—), 女, 学士, 住院医师, 主要从事妇科肿瘤的临床研究

[通信作者] 詹磊(扫码获取作者联系方式)



apoptosis rate, the expressions of miR-337-3p, E-cadherin, BAX, and C-caspase-3 proteins were significantly higher than those in the sh-NC group and the Control group (all $P < 0.05$). Compared with those in the sh-circPUM1 group and the sh-circPUM1 + anti-NC group, the apoptosis rate, miR-337-3p, the expressions of E-cadherin, BAX, and C-caspase-3 proteins in the sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p group were significantly lower (all $P < 0.05$); Cell proliferation ability, EdU positive cell rate, migration and invasion numbers, NPM1 mRNA and protein, the expressions of PCNA, NPM1, MMP-9, and SNAIL proteins were significantly higher (all $P < 0.05$). CircPUM1 might target and negatively regulate miR-337-3p, and miR-337-3p might target and negatively regulate NPM1. **Conclusion:** Knocking down circPUM1 can inhibit the malignant biological behavior of Ishikawa cells, which might be achieved by targeting the miR-337-3p/NPM1 axis.

[Key words] circular RNA (circRNA); pumilio RNA binding family member 1 (PUM1); miR-337-3p; nucleophosmin 1 (NPM1); endometrial cancer (EC); Ishikawa cell; proliferation; migration; invasion; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(4): 378-385. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.04.005]

子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)是一种起源于子宫内膜细胞的恶性肿瘤,其发病率在妇科恶性肿瘤中位居第二,仅次于卵巢癌,近年来该病的发病率呈逐年上升趋势,并且患者呈现年轻化的特点^[1]。EC易发于围绝经期妇女,肥胖、糖尿病、高血压、未怀孕、长期不排卵者均为高危人群^[2]。目前,EC的治疗方法有手术切除、激素治疗、化疗、放疗等,但均主要适用于早期患者,对晚期EC患者疗效较差且5年生存率仅为20%^[3]。因此,阐明EC发生发展的分子机制有助于发现新的诊断标志物和治疗靶点。环状RNA(circRNA)是一类共价闭合的circRNA分子,通常由线性前mRNA反向剪接产生,对RNase R酶具有抗性,circRNA与肿瘤细胞的恶性生物学密切相关,在EC进展中发挥重要作用^[4]。pumilio RNA结合家族成员1(pumilio RNA binding family member 1, PUM1)由PUM1基因反向剪接而成,circPUM1在EC患者血清中高表达且与肿瘤分化程度、临床分期等病理特征相关,对EC具有较高的诊断效能^[5]。CircRNA通过充当miRNA海绵并与蛋白质相互作用,参与多种生物学过程。miR-337-3p位于染色体14q32.2,在EC患者中呈低表达,与临床分期和淋巴结转移相关,其过表达可抑制EC细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化(EMT)^[6]。核磷蛋白1(nucleophosmin 1, NPM1)是一种多功能蛋白,主要定位于核仁中,在EC中呈高表达,与EC临床分期和组织学分级呈正相关,其高表达可促进EC细胞增殖、迁移与侵袭^[7]。本研究前期通过Starbase网站发现,circPUM1与miR-337-3p、miR-337-3p与NPM1之间存在结合位点,circPUM1可能通过调控miR-337-3p/NPM1轴发挥作用。因此,本研究探讨circPUM1调控miR-337-3p/NPM1轴对EC细胞增殖、迁移、侵袭、EMT、凋亡的影响,以期提高EC的临床治疗效果。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

Ishikawa细胞(货号:IM-H018-1)购自厦门逸漠

生物科技有限公司。TRIzol试剂、cDNA合成试剂盒、qPCR试剂盒(货号:15596018、634925、638315)购自上海善然生物科技有限公司,Lipofectamine 3000转染试剂(货号:11668027)购自北京兰博康斯科技公司,CCK-8细胞增殖试剂盒(货号:210818)购自无锡耐思生命科技股份有限公司,EdU细胞增殖检测试剂盒(货号:SB-C6043)购自上海圣尔生物科技有限公司,Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号:HQF02-KVA)购自北京百奥莱博科技有限公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒(货号:KTA8010)购自武汉亚科因生物技术有限公司,BCA蛋白检测试剂盒(货号:KL1DBE095)购自上海康朗生物科技有限公司,PCNA、NPM1、MMP-9、BAX、GAPDH、SNAIL、E-cadherin、C-caspase-3一抗及HRP标记的山羊抗兔二抗(ab308212、ab183340、ab38898、ab212790、ab128915、ab216347、ab227639、ab2302、ab205718)均购自英国Abcam公司。

1.2 细胞分组转染

将Ishikawa细胞分为对照组(未转染细胞)、sh-NC组(转染sh-NC)、sh-circPUM1组(转染sh-circPUM1)、sh-circPUM1+anti-NC组(转染sh-circPUM1+anti-NC)、sh-circPUM1+anti-miR-337-3p组(转染sh-circPUM1+anti-miR-337-3p)。转染24 h后,进行后续实验。

1.3 qPCR法检测各组Ishikawa细胞中circPUM1、miR-337-3p、NPM1 mRNA表达

使用TRIzol试剂从EC细胞中提取总RNA,并逆转录为cDNA。按照qPCR试剂盒说明书进行qPCR。PCR反应条件:95℃预变性30 s;95℃下变性5 s,60℃下退火和延伸30 s,共40次循环。引物序列:circPUM1上游引物为5'-CCAAGCCTGTGGAGGATTTCT-3',下游引物为5'-CACATCACCTCCTCCTTCAA-3'; miR-337-3p上游引物为5'-CTTCCTTCCCTCCTATATGATGC-3',下游引物为5'-TATGCTTGTCTCGTCTCTGTGTC-3'; NPM1上游引物为5'-GGAGGTGGTAGCAAGGTTCC-3',下游引物为5'-TTCACGTGGCGCTTTTCTTCA-3'; U6上游引物为5'-GCTGGA

CTCTAGGGTGCAAG-3', 下游引物为 5'-GAGCATAEC AGGTGGTAGTAG-3'; GAPDH 上游引物为 5'-GAA GGTGAAGGTCGGAGTCA-3', 下游引物为 5'-AAT GAAGGGGTCATTGATGG-3'。CircPUM1、NPM1 以 GAPDH 作为内参, miR-337-3p 以 U6 作为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 circPUM1、miR-337-3p、NPM1 mRNA 的相对表达量。

1.4 CCK-8 法和 EdU 染色法检测敲减 circPUM1 对 Ishikawa 细胞增殖的影响

CCK-8 法: 将各组 Ishikawa 细胞接种到 96 孔板 (3×10^3 个/孔) 中, 培养 24 h。在孔中加入 100 μ L 含 10 μ L CCK-8 (将 CCK-8 试剂和 PBS 以 1:10 稀释) 的混合试剂, 作用 3 h 后, 使用酶标仪在波长 450 nm 处测量光密度 (D) 值, 以 D 值表示细胞的增殖能力。

EdU 染色法: 各组 Ishikawa 细胞在 50 μ mol/L EdU 混合试剂中, 处理 2 h。采用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min 后, 加入 0.5% 的 Triton X-100, 在室温下处理 5~10 min, 在 Click-iT 反应液室温下反应 30 min 后进行 DNA 染色, PBS 洗涤细胞, 在荧光显微镜下进行图像采集和分析, 计算 EdU 阳性细胞率。阳性细胞率 = EdU 阳性细胞数/总细胞数。

1.5 Transwell 实验检测敲减 circPUM1 对 Ishikawa 细胞迁移和侵袭的影响

迁移实验: 将 Ishikawa 细胞以 1×10^5 个/mL 的密度重悬于无血清培养基中, 取 200 μ L 细胞悬液接种于 Transwell 小室的上室, 在下室中加入 500 μ L 含 10% 胎牛血清的培养基。培养 24 h 后, 取出 Transwell 小室, PBS 溶液洗涤 3 次, 甲醇固定 15 min, 再用 0.1% 结晶紫染色 20 min。最后, 将迁移到下室的细胞置于载玻片上, 在显微镜下选取 5 个视野计数迁移细胞的数量, 以评估细胞的迁移能力。

侵袭实验: 将 50 mg/L 的基质胶按照 1:15 的比例与无血清培养基稀释后, 取 32 μ L 均匀覆盖在 Transwell 小室的上室表面, 后续操作同迁移实验。

1.6 流式细胞术检测敲减 circPUM1 对 Ishikawa 细胞凋亡的影响

将各组 Ishikawa 细胞以每孔 30×10^5 个的密度接种于 6 孔培养板中, 培养 48 h 后, 收集细胞悬液。随后, 向细胞悬液中加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 PI 染色溶液, 避光反应 15~20 min 后, 上流式细胞仪检测并分析细胞凋亡率。细胞凋亡率 = 凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.7 WB 法检测敲减 circPUM1 对 Ishikawa 细胞中 PCNA、NPM1 及相关蛋白的表达影响

使用 RIPA 缓冲液提取各组 Ishikawa 细胞的总蛋白质, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白

质样品进行 10% SDS-PAGE 分离后, 将蛋白质转移至 PVDF 膜, 在 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h。加入 PCNA (1:1 000)、NPM1 (1:400)、MMP-9 (1:1 000)、BAX (1:1 000)、SNAIL (1:1 000)、E-cadherin (1:25)、C-caspase-3 (1:50) 和 GAPDH (1:10 000) 一抗, 室温下反应 12 h。清洗后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:25 000) 室温下振荡作用 1 h。使用 ECL 试剂盒显色, 通过 Image J 软件分析蛋白质条带的灰度值。

1.8 双萤光素酶报告基因实验验证 circPUM1 与 miR-337-3p、miR-337-3p 与 NPM1 的靶向关系

将含 miR-337-3p 结合序列的 circPUM1-野生型 (WT) 和 NPM1-WT 及其突变序列 circPUM1-突变型 (MUT) 和 NPM1-MUT 克隆到 pMIR-Reporter 质粒中。随后, 将上述构建的质粒载体与 miR-337-3p mimic 和 mimic NC 一起转染 Ishikawa 细胞, 培养 48 h 后, 使用萤光素酶报告基因试剂盒测定萤光素酶活性。

1.9 统计学处理

以上主要实验均独立重复 3 次。实验数据采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较行 SNK- q 检验, 两组间比较行独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 敲低 circPUM1 后 Ishikawa 细胞中 circPUM1、miR-337-3p、NPM1 mRNA 表达的变化

qPCR 法检测结果 (表 1) 显示, 与对照组、sh-NC 组相比, sh-circPUM1 组 Ishikawa 细胞中 circPUM1、NPM1 mRNA 表达均显著降低 (均 $P < 0.05$), miR-337-3p 表达显著增加 ($P < 0.05$); 与 sh-circPUM1 组、sh-circPUM1 + anti-NC 组相比, sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p 组 miR-337-3p 表达降低, NPM1 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。结果表明, 敲低 circPUM1 可显著抑制 Ishikawa 细胞中 circPUM1 和 NPM1 mRNA 的表达, 上调 miR-337-3p 的表达水平; 而同时使用 anti-miR-337-3p 能够逆转敲低 circPUM1 对 NPM1 mRNA 的下调作用, 提示 circPUM1 可能通过调控 miR-337-3p 影响 NPM1 的表达。

2.2 敲低 circPUM1 降低 Ishikawa 细胞增殖能力

CCK-8 和 EdU 染色法实验结果 (图 1, 表 2) 显示, 与 sh-NC 组、对照组相比, sh-circPUM1 组 Ishikawa 细胞的增殖、EdU 阳性细胞率均显著降低 (均 $P < 0.05$); 与 sh-circPUM1 组、sh-circPUM1 + anti-NC 组相比, sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p 组 Ishikawa 细胞的增殖、EdU 阳性细胞率均显著升高 (均 $P < 0.05$)。结果表明, 敲低 circPUM1 显著降低 Ishikawa 细胞的增殖

能力, 而同时使用 anti-miR-337-3p 能够逆转敲低 circPUM1 对细胞增殖的抑制作用。

表1 敲低 circPUM1 对 Ishikawa 细胞中 circPUM1、miR-337-3p、NPM1 mRNA 表达的影响

分 组	circPUM1	miR-337-3p	NPM1
对照	0.98 ± 0.16	1.01 ± 0.33	1.00 ± 0.21
sh-NC	0.99 ± 0.16	0.99 ± 0.33	1.03 ± 0.21
sh-circPUM1	0.43 ± 0.13 ^{*△}	1.69 ± 0.37 ^{*△}	0.52 ± 0.15 ^{*△}
sh-circPUM1 + anti-NC	0.41 ± 0.13	1.71 ± 0.37	0.53 ± 0.15
sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p	0.42 ± 0.13	1.23 ± 0.35 ^{▲▽}	0.89 ± 0.18 ^{▲▽}

与对照组相比, ^{*}*P* < 0.05; 与 sh-NC 组相比, [△]*P* < 0.05; 与 sh-circPUM1 组相比, [▲]*P* < 0.05; 与 sh-circPUM1 + anti-NC 组相比, [▽]*P* < 0.05。

表2 敲低 sh-circPUM1 对 Ishikawa 细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响

分 组	细胞增殖(<i>D</i> ₄₅₀)	EdU 阳性率/%	迁移数/个	侵袭数/个	凋亡率/%
对照	1.39 ± 0.25	47.31 ± 5.87	136.59 ± 14.25	115.31 ± 12.08	2.25 ± 0.68
sh-NC	1.37 ± 0.25	47.25 ± 5.83	135.87 ± 14.08	116.81 ± 11.96	2.39 ± 0.68
sh-circPUM1	0.68 ± 0.18 ^{*△}	20.19 ± 3.24 ^{*△}	64.36 ± 10.51 ^{*△}	57.96 ± 8.34 ^{*△}	39.88 ± 4.17 ^{*△}
sh-circPUM1 + anti-NC	0.65 ± 0.17	19.86 ± 3.18	64.25 ± 10.83	56.44 ± 8.07	39.67 ± 4.11
sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p	0.99 ± 0.22 ^{▲▽}	34.47 ± 4.31 ^{▲▽}	90.12 ± 12.34 ^{▲▽}	87.53 ± 10.27 ^{▲▽}	16.56 ± 2.33 ^{▲▽}

与对照组相比, ^{*}*P* < 0.05; 与 sh-NC 组相比, [△]*P* < 0.05; 与 sh-circPUM1 组相比, [▲]*P* < 0.05; 与 sh-circPUM1 + anti-NC 组相比, [▽]*P* < 0.05。

2.3 敲低 circPUM1 抑制 Ishikawa 细胞的迁移和侵袭

Transwell 实验结果(图 1, 表 2)显示, sh-NC 组、对照组相比, sh-circPUM1 组 Ishikawa 细胞迁移和侵袭数均显著减少(均 *P* < 0.05); 与 sh-circPUM1 组、sh-circPUM1 + anti-NC 组相比, sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p 组 Ishikawa 细胞迁移和侵袭数均显著增加(均 *P* < 0.05)。结果表明, 敲低 circPUM1 显著降低 Ishikawa 细胞的迁移和侵袭能力, 同时使用 anti-miR-337-3p 能够逆转敲低 circPUM1 对细胞迁移和侵袭的抑制作用。

2.4 敲低 circPUM1 促进 Ishikawa 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图 1, 表 2)显示, 与 sh-NC 组、对照组相比, sh-circPUM1 组 Ishikawa 细胞凋亡率显著升高(均 *P* < 0.05); 与 sh-circPUM1 组、sh-circPUM1 + anti-NC 组相比, sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p 组 Ishikawa 细胞凋亡率显著降低(均 *P* < 0.05)。结果表明, 敲低 circPUM1 显著提高 Ishikawa 细胞的凋亡率, 同时使用 anti-miR-337-3p 能够逆转敲低 circPUM1 对细胞凋亡的促进作用。

2.5 敲低 circPUM1 对 PCNA、NPM1、MMP-9、SNAIL、E-cadherin、BAX 和 C-caspase-3 蛋白表达的影响

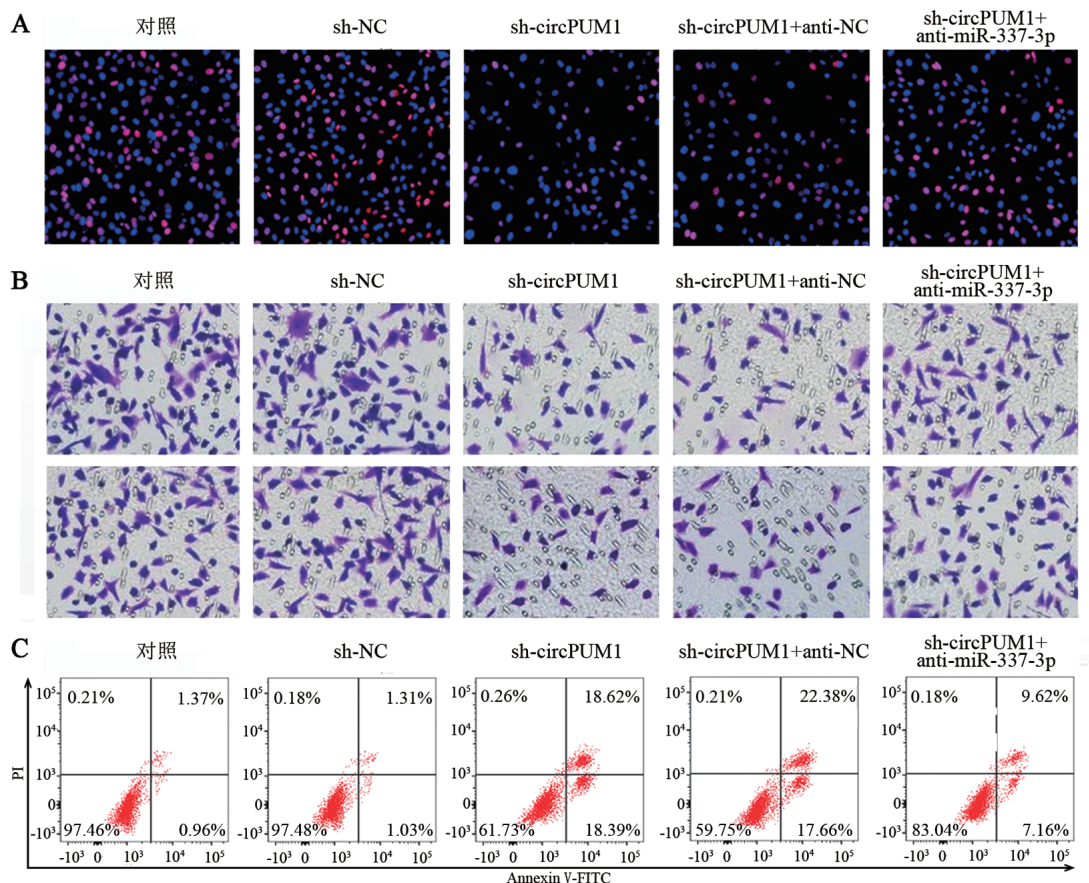
WB 实验结果(图 2, 表 3)显示, 与 sh-NC 组、对照组相比, sh-circPUM1 组 Ishikawa 细胞中 PCNA、NPM1、MMP-9、SNAIL 蛋白表达均显著降低(*P* < 0.05), E-cadherin、BAX、C-caspase-3 蛋白表达均显

著升高(均 *P* < 0.05); 与 sh-circPUM1 组、sh-circPUM1 + anti-NC 组相比, sh-circPUM1 + anti-miR-337-3p 组 Ishikawa 细胞中 PCNA、NPM1、MMP-9、SNAIL 蛋白表达均显著升高(均 *P* < 0.05), E-cadherin、BAX、C-caspase-3 蛋白表达均显著降低(均 *P* < 0.05)。结果表明, 敲低 circPUM1 可显著抑制 Ishikawa 细胞中 PCNA、NPM1、MMP-9、SNAIL 的表达, 上调 E-cadherin、BAX、C-caspase-3 蛋白的表达水平; 同时使用 anti-miR-337-3p 能够逆转敲低 circPUM1 对上述蛋白表达的作用。

2.6 双萤光素酶报告基因实验证实 circPUM1 靶向结合 miR-337-3p、miR-337-3p 靶向结合 NPM1

Starbase 网站预测分析结果(图 3)显示, circPUM1 与 miR-337-3p 之间存在结合位点, 同时 miR-337-3p 与 NPM1 mRNA 3'UTR 区也存在潜在结合位点。双萤光素报告基因实验结果(表 4)显示, 在转染 circPUM1-WT 的 Ishikawa 细胞中, 与 mimic-NC 组相比, miR-337-3p mimic 组的萤光素酶活性显著降低(*P* < 0.05), 而在转染 circPUM1-MUT 的细胞中萤光素酶活性无变化(*P* > 0.05)。在转染 NPM1-WT 的 Ishikawa 细胞中, 与 mimic-NC 组相比, miR-337-3p mimic 组的萤光素酶活性显著降低(*P* < 0.05), 而在转染 circPUM1-MUT 的细胞中萤光素酶活性无变化(*P* > 0.05)。实验结果表明, circPUM1 与 miR-337-3p、miR-337-3p 与 NPM1 之间存在结合位点, circPUM1

可以靶向负调控 miR-337-3p、miR-337-3p 可以靶向 负调控 NPM1。



A: EdU 染色观察 Ishikawa 细胞增殖($\times 400$); B: Transwell 实验检测 Ishikawa 细胞迁移与侵袭(结晶紫染色, $\times 200$); C: 流式细胞术检测 Ishikawa 细胞的凋亡水平。

图1 敲低 circPUM1 对 Ishikawa 细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响

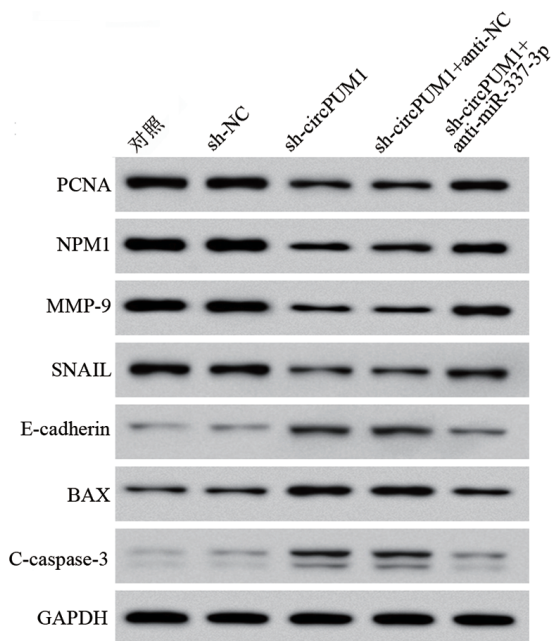


图2 WB 法检测 Ishikawa 细胞中 PCNA、NPM1 及相关蛋白的表达

3 讨论

EC 进展是一个多因素、多步骤的复杂过程,长期雌激素刺激子宫内膜和/或缺乏孕酮拮抗作用被认为是导致子宫内膜增生和癌变的主要关键因素^[8]。约 5% 的 EC 患者年龄在 40 岁以下,其中一半在诊断时无子女,因此保留生育能力的治疗成为患者的重要需求。目前,大剂量孕激素是早期高分化子宫内膜样 EC 患者的一线治疗措施,然而孕激素治疗与相对较低的完全缓解率、较长的治疗持续时间和不良反应(如体重增加、血栓形成风险和子宫内膜损伤等)相关^[9]。此外,晚期 EC 患者病变不能完全切除,长期复发率高,而且放化疗敏感性差、毒性大、不良反应多发且疗效差^[10]。研发用于 EC 分子诊断、靶向治疗和预后监测的高效新型生物标志物是一项具有挑战性的任务,需要在基础研究、临床诊断、精准治疗和预后评估等多领域进行深入探索。因此,深入研究和阐明 EC 的发病机制,以及剖析 EC 细胞在恶性转

调控HCC细胞的增殖、迁移及侵袭。MENG等^[17]发现,miR-337-3p在宫颈癌中表达下调,miR-337-3p受上游circ_0000388基因的调控,靶向下游TCF12调控宫颈癌细胞的增殖和转移,可作为宫颈癌的诊断生物标志物和治疗靶点。WEI等^[18]发现,NSCLC组织和细胞中miR-337-3p表达下调,circ_0007385过表达可以促进NSCLC细胞的增殖并抑制细胞凋亡,而circ_0007385过表达介导的作用在很大程度上可以被NSCLC细胞中miR-337-3p的过表达所逆转,circ_0007385通过miR-337-3p依赖性调控LMO3促进NSCLC细胞的恶性生物行为及NSCLC模型小鼠的肿瘤生长。目前,miR-337-3p在EC中的研究较少。郭婷等^[19]发现,EC患者血清外泌体中miR-337-3p表达水平降低,与组织学分级、肌层浸润等临床病理特征相关,是EC发生的影响因素,可以为EC的诊断标志物。此外,研究^[6]显示miR-337-3p受上游lncRNA MIR210HG的调控,并靶向下游HMGA2,在EC细胞的增殖、迁移、侵袭、EMT及体内肿瘤的发生过程中起着重要作用。本研究发现,circPUM1与miR-337-3p之间存在结合位点,敲低circPUM1导致miR-337-3p高表达,而抑制miR-337-3p则逆转敲低circPUM1对细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用,提示circPUM1可能通过海绵化miR-337-3p调控EC细胞的恶性生物学进展。

NPM1是一种普遍存在的核-胞质穿梭蛋白,主要存在于核仁中,参与组蛋白组装、中心体复制、核糖体生物合成、基因组稳定性维持、对核仁应激的反应等多种细胞功能^[20]。NPM1参与多种肿瘤的发生,在EC中发挥致癌基因的作用^[7]。郑莹莹等^[21]发现,EC组织NPM1阳性表达率高于癌旁组织,NPM1的表达与肌层浸润深度、淋巴结转移和预后相关。SHEN等^[22]发现,NPM1在EC组织和细胞中的表达高于良性子宫内膜和正常子宫内膜上皮细胞,lncRNA NNT-AS1通过调节miR-30c/NPM1轴促进雌激素介导的EC细胞增殖。LIU等^[23]发现,NPM1在EC组织中的表达增加,circWHSC1通过海绵化miR-646靶向NPM1促进EC的发展。本研究发现,miR-337-3p与NPM1之间存在结合位点,敲低circPUM1导致NPM1低表达,抑制miR-337-3p则导致NPM1高表达,提示circPUM1可能通过调节miR-337-3p/NPM1信号通路促进EC细胞的恶性生物学进展。

综上所述,敲低circPUM1可以抑制EC细胞的恶性生物学行为,其机制可能是通过靶向miR-337-3p/NPM1轴实现的。然而,本实验的研究范围主要集中在circPUM1/miR-337-3p/NPM1信号通路,且尚未进行体内实验。因此,后期研究需重新设计实验方案,

进一步深入探讨该信号通路在EC中的作用机制。

[参考文献]

- [1] SUN Q, ZHEN P, LI D D, *et al.* Amentoflavone promotes ferroptosis by regulating reactive oxygen species (ROS)/5'AMP-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) to inhibit the malignant progression of endometrial carcinoma cells[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 13269-13279. DOI:10.1080/21655979.2022.2079256.
- [2] 姚素环, 史利锋, 李淑芳, 等. 穿心莲内酯通过抑制Fas/FasL信号轴降低子宫内膜癌Ishikawa/DPP细胞对顺铂的耐药性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(2): 154-160. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.02.006.
- [3] XIE S D, JIN Y S, WANG J K, *et al.* DOCK1 regulates the malignant biological behavior of endometrial cancer through c-Raf/ERK pathway[J/OL]. *BMC Cancer*, 2024, 24(1): 296[2024-07-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38438882/>. DOI:10.1186/s12885-024-12030-1.
- [4] GUO J L, TONG J Y, ZHENG J F. Circular RNAs: a promising biomarker for endometrial cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 1651-1665. DOI:10.2147/CMAR.S290975.
- [5] 阴莉, 许剑利, 程其军, 等. 子宫内膜癌病人血清circWHSC1和circPUM1的表达及诊断价值[J]. *安徽医药*, 2023, 27(11): 2245-2248. DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.11.028.
- [6] MA J, KONG F F, YANG D, *et al.* lncRNA MIR210HG promotes the progression of endometrial cancer by sponging miR-337-3p/137 via the HMGA2-TGF- β /Wnt pathway[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 24: 905-922. DOI:10.1016/j.omtn.2021.04.011.
- [7] CHENG X Y, SHEN C M, LIAO Z R. KLF2 transcription suppresses endometrial cancer cell proliferation, invasion, and migration through the inhibition of NPM1[J/OL]. *J Obstet Gynaecol*, 2023, 43(2): 2238827[2024-07-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37610103/>. DOI:10.1080/01443615.2023.2238827.
- [8] LI W, LYU W, LIU S J, *et al.* GLP1R boosts survival, migration and invasion of endometrial cancer cells and protects against ferroptotic cell death[J/OL]. *J Obstet Gynaecol*, 2024, 44(1): 2301324[2024-07-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38269495/>. DOI:10.1080/01443615.2023.2301324.
- [9] XU Y H, HU J L, LV Q Y, *et al.* Endometrium-derived mesenchymal stem cells suppress progression of endometrial cancer via the DKK1-Wnt/ β -catenin signaling pathway[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 159[2024-07-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37287079/>. DOI:10.1186/s13287-023-03387-4.
- [10] NIE X, GAO L L, ZHENG M J, *et al.* Overexpression of TMEFF1 in endometrial carcinoma and the mechanism underlying its promotion of malignant behavior in cancer cells[J]. *J Cancer*, 2021, 12(19): 5772-5788. DOI:10.7150/jca.58524.
- [11] WU Y, WANG F H, SHI J, *et al.* circSMAD2 accelerates endometrial cancer cell proliferation and metastasis by regulating the miR-1277-5p/MFGE8 axis[J/OL]. *J Gynecol Oncol*, 2023, 34(2): e19[2024-07-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36659830/>. DOI:10.3802/jgo.2023.34.e19.
- [12] ZHANG Y Q, WANG D G, ZHU T, *et al.* circPUM1 promotes hepatocellular carcinoma progression through the miR-1208/

- MAP3K2 axis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(1): 600-612. DOI: 10.1111/jcmm.15998.
- [13] GUAN X, ZONG Z H, LIU Y, *et al.* circPUM1 promotes tumorigenesis and progression of ovarian cancer by sponging miR-615-5p and miR-6753-5p[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 18: 882-892. DOI:10.1016/j.omtn.2019.09.032.
- [14] LI M J, WANG Q Q, ZHANG X F, *et al.* circPUM1 promotes cell growth and glycolysis in NSCLC *via* up-regulating METTL3 expression through miR-590-5p[J]. Cell Cycle, 2021, 20(13): 1279-1294. DOI:10.1080/15384101.2021.1934625.
- [15] PATERSON E, BLENKIRON C, DANIELSON K, *et al.* Recommendations for extracellular vesicle miRNA biomarker research in the endometrial cancer context[J/OL]. Transl Oncol, 2022, 23: 101478[2024-07-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35820359/>. DOI:10.1016/j.tranon.2022.101478.
- [16] ZUO X L, CHEN Z Q, WANG J F, *et al.* miR-337-3p suppresses the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells through targeting JAK2[J/OL]. Am J Cancer Res, 2018, 8(4): 662-674[2024-07-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29736311/>.
- [17] MENG Q H, LI Y, KONG C, *et al.* circ_0000388 exerts oncogenic function in cervical cancer cells by regulating miR-337-3p/*TCF12* axis[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2021, 36(1): 58-69. DOI: 10.1089/cbr.2019.3159.
- [18] WEI M C, YIN R J, QU L, *et al.* circ_0007385 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of non-small cell lung cancer cells *via* miR-337-3p-dependent regulation of LMO3[J]. Histol Histopathol, 2023, 38(7): 797-810. DOI: 10.14670/HH-18-553.
- [19] 郭婷, 孙一, 王海丽, 等. 血清外泌体 MIR210HG、miR-337-3p 在子宫内膜癌中的表达及意义[J]. 广东医学, 2022, 43(12): 1466-1470. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.20223612.
- [20] RANIERI R, PIANIGIANI G, SCIABOLACCI S, *et al.* Current status and future perspectives in targeted therapy of NPM1-mutated AML[J]. Leukemia, 2022, 36(10): 2351-2367. DOI: 10.1038/s41375-022-01666-2.
- [21] 郑莹莹, 田晓予, 霍礼娜. NPM1 表达与子宫内膜癌患者临床病理特征参数的相关性分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2024, 32(2): 311-314.
- [22] SHEN J, YUAN Z L, SHENG J J, *et al.* Long non-coding RNA NNT-AS1 positively regulates NPM1 expression to affect the proliferation of estrogen-mediated endometrial carcinoma by interacting[J]. J Cancer, 2022, 13(1): 112-123. DOI: 10.7150/jca.62630.
- [23] LIU Y, CHEN S, ZONG Z H, *et al.* circRNA WHSC1 targets the miR-646/NPM1 pathway to promote the development of endometrial cancer[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(12): 6898-6907. DOI:10.1111/jcmm.15346.
- [收稿日期] 2024-07-27 [修回日期] 2025-03-25
[本文编辑] 党瑞山