

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.05.002

· 基础研究 ·

缺氧诱导的 circ_0007766 表达在前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭中的作用

赵梓岐¹, 张敏¹, 杨涛¹, 杨丽², 廖国玲¹, 张玮¹, 楚元奎^{1,3} (1. 宁夏医科大学 检验学院, 宁夏 银川 750004; 2. 宁夏医科大学 实验动物中心, 宁夏 银川 750004; 3. 宁夏医科大学总医院 医学实验中心, 宁夏 银川 750004)

[摘要] **目的:** 探讨环化自 erb-b2 受体酪氨酸激酶 2 (ERBB2) 基因的 circ_0007766 分子在前列腺癌 (PCa) 细胞中的作用及缺氧对其表达调控的影响。 **方法:** qRT-PCR 检测 circ_0007766 分子在 PCa 细胞及组织中的表达; 分别转染 circ_0007766 的 siRNA 至 PCa 细胞 DU145 和 PC3 中, 平板克隆实验、CCK-8 实验和 Transwell 实验检测 circ_0007766 敲低对 PCa 细胞克隆形成、增殖、迁移和侵袭能力的影响; 厌氧袋法建立 DU145 和 PC3 细胞的缺氧细胞模型, WB 法检测缺氧通路关键分子 HIF-1 α 的蛋白表达, qRT-PCR 检测缺氧模型细胞中 circ_0007766 分子的表达, WB 检测 RNA 结合蛋白真核翻译起始因子 4A3 (EIF4A3) 的蛋白水平表达, RNA 免疫沉淀 (RIP) 法检测缺氧条件下 EIF4A3 与 circ_0007766 的结合, qRT-PCR 进一步检测缺氧条件下敲低 EIF4A3 对 circ_0007766 表达的影响。 **结果:** circ_0007766 在 PCa 细胞 ($P < 0.01$) 及 PCa 组织 ($P < 0.05$) 中呈高表达; 敲低 circ_0007766 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 能显著抑制 PCa 细胞的增殖、迁移和侵袭能力 (均 $P < 0.01$)。缺氧条件下 HIF-1 α 蛋白表达增加, 表明缺氧细胞模型建立成功。qRT-PCR 检测结果显示, 相较于常氧组, 缺氧组 circ_0007766 的表达显著升高 ($P < 0.01$), WB 法检测结果显示缺氧组细胞中 EIF4A3 的蛋白表达增强。RIP 实验结果显示, circ_0007766 在 EIF4A3 富集组高度富集 ($P < 0.01$)。qRT-PCR 检测结果显示, 缺氧可显著促进 circ_0007766 的表达, 同时, 敲低 EIF4A3 分子可显著降低缺氧诱导的 circ_0007766 的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论:** circ_0007766 在 PCa 细胞中扮演着促癌分子的角色, 其表达形成与缺氧条件下 EIF4A3 分子的调控有关。

[关键词] 前列腺癌; circ_0007766; 缺氧; EIF4A3; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R730.2; R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)05-0460-09

The role of hypoxia-induced circ_0007766 expression in the proliferation, migration and invasion of PCa cells

ZHAO Ziqi¹, ZHANG Min¹, YANG Tao¹, YANG Li², LIAO Guoling¹, ZHANG Wei¹, CHU Yuankui^{1,3} (1. School of Inspection, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China; 2. Laboratory Animal Center, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China; 3. Medical Experimental Center, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the role of circ_0007766 molecule cyclized from the erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2) gene in prostate cancer (PCa) cells and the impact of hypoxia on the regulation of its expression. **Methods:** The expression of circ_0007766 molecule in PCa cells and tissues was detected by qRT-PCR. The siRNA of circ_0007766 was transfected to PCa cells (DU145 cell and PC3 cell) respectively; Colony formation assay, CCK-8 assay and Transwell assay were performed to detect the effect of circ_0007766 knockdown on the colony formation, proliferation, migration, and invasion abilities of PCa cells. Hypoxia cell model of DU145 and PC3 cells were established by hypoxic chamber method, and WB was performed to detect the protein expression of HIF-1 α , a key molecule of the hypoxic pathway. qRT-PCR was performed to detect the expression of circ_0007766 molecule in hypoxic cell model, and the protein expression of RNA-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4A3 (EIF4A3) was detected by WB. RNA immunoprecipitation (RIP) was performed to detect the binding of EIF4A3 to circ_0007766 under hypoxic conditions. qRT-PCR assay was performed to further detect the effect of EIF4A3 knockdown on the expression of circ_0007766 under hypoxic conditions. **Results:** circ_0007766 was highly expressed in PCa cells ($P < 0.01$) and PCa tissues ($P < 0.05$). The knockdown of circ_0007766 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) could significantly inhibit the proliferation, migration and invasion abilities of PCa cells (all $P < 0.01$). The upregulation of HIF-1 α protein under hypoxic conditions confirmed the successful establishment of the hypoxia cell model. qRT-PCR analysis revealed that compared with that in the normoxia group, circ_0007766 expression was markedly elevated in the hypoxia group ($P < 0.01$). WB analysis demonstrated increased EIF4A3 protein expression in cells of the hypoxia group. RIP assays indicated that circ_0007766 was highly concentrated in the EIF4A3-enriched group ($P <$

[基金项目] 宁夏自然科学基金项目 (No. 2024AAC03215); 宁夏医科大学 2024 年校级科研项目重点项目 (开放课题) (No. XZ2024004); 国家自然科学基金项目 (No. 82160465)

[作者简介] 赵梓岐 (1999—), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤发病机制与分子机制研究

[通信作者] 楚元奎 (扫码获取作者联系方式)



0.01). Additionally, qRT-PCR showed that hypoxia significantly boosted circ_0007766 expression, whereas EIF4A3 knockdown notably diminished the hypoxia-induced expression of circ_0007766 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Circ-0007766 plays the role of cancer-promoting molecule in PCa cells, and its expression is related to the regulation of EIF4A3 molecule under hypoxic conditions.

[Key words] prostate cancer (PCa); circ_0007766; hypoxia; EIF4A3; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(5): 460-468. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.05.002]

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是全球男性第二大常见恶性肿瘤^[1],也是男性因癌死亡的第五大原因^[2]。前列腺特异性抗原是一种基于血液的传统PCa筛查标志物,但由于其检测结果的非特异性较高,常导致PCa的误诊^[3]。雄激素剥夺疗法是目前临床治疗转移性PCa的主要策略,然而其治疗效果常随着PCa进展而减弱^[4]。因此,进一步阐明PCa发生发展过程中的分子机制,寻找新的生物标志物和治疗靶点,对于PCa的诊治具有重要意义。环状RNA(circular RNA, circRNA)参与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭等恶性行为^[5-6]。erb-b2受体酪氨酸激酶2(erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, ERBB2)属于蛋白酪氨酸激酶家族,ERBB2的激活可增强PCa细胞中的雄激素受体信号活性并促进细胞的耐药,是PCa进程中的重要分子^[7]。已有研究表明,环化自ERBB2的circ_0007766分子在胃癌组织和细胞中呈高表达,体外下调circ_0007766分子对胃癌细胞的生长起抑制作用^[8];circ_0007766分子对肺腺癌细胞增殖、迁移具有促进作用^[9]。然而,目前尚少见circ_0007766分子在PCa方面的研究报道。笔者所在课题组前期检测发现circ_0007766分子在PCa细胞中表达显著升高,本研究将进一步探讨circ_0007766分子在PCa发生发展中的作用,以及影响其表达调控的分子机制。

缺氧是恶性肿瘤的常见特征,能够触发细胞应激,并通过激活缺氧诱导因子(HIF)途径参与恶性肿瘤的进展和治疗抵抗^[10-11]。目前,已有研究表明缺氧参与了circRNA的生成调控。缺氧可诱导外泌体circPDK1的生成,circPDK1进而通过调控miR-628-3p/BPTF轴及泛素化降解BIN1激活c-MYC介导的胰腺癌糖酵解过程^[12]。缺氧环境中,HIF-1 α 可与circRTN4IP1的启动子区域结合诱导肝癌细胞中circRTN4IP1的表达增加^[13]。PCa细胞中circ_0007766分子的表达升高是否与缺氧调控有关?该问题的阐释可更好地了解circ_0007766分子在PCa进展中发挥的分子机制。

本文旨在探究PCa细胞中circ_0007766分子的表达水平和作用,以及缺氧对circ_0007766分子表达的影响,为PCa的诊治提供新的潜在的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人前列腺正常上皮细胞RWPE-1及前列腺癌细胞Lncap、22RV1、PC3、DU145均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(上海)。病理组织切片来源:PCa病理组织8对,取自2023年8月至2023年10月宁夏医科大学总医院病理科采集且未经放化疗治疗的PCa患者的癌组织和癌旁组织石蜡切块。上述病理标本经两名病理学家确认诊断。本研究项目已获宁夏医科大学伦理委员会审核批准(批准号:宁医大伦理第2024-N046号)。

RPMI 1640培养基、优级胎牛血清、GAPDH抗体购自武汉赛维公司,circ_0007766和真核翻译起始因子4A3(eukaryotic translation initiation factor 4A3, EIF4A3)的siRNA由广州锐博生物公司合成,Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,胰蛋白酶、0.1%结晶紫水溶液购自北京索莱宝公司,RNA提取试剂盒、HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒均购自诺唯赞生物公司,RNAPure FFPE Kit固定组织RNA提取试剂盒购自康为世纪生物公司,CCK-8试剂购自AbMole公司,Matrigel基质胶购自Corning公司,Golden Easy PCR系统、DNA纯化回收试剂盒、基因组DNA提取试剂盒均购自天根生化科技公司,引物序列由生工生物公司合成,HIF-1 α 抗体、EIF4A3抗体、 β -tubulin抗体、IgG抗体购自Proteintech(武汉三鹰),山羊抗兔IgG-HRP、山羊抗鼠IgG-HRP购自Thermo公司,全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度检测试剂盒购自凯基生物公司,2.5 L厌氧产气包、2.5 L圆底立式厌氧培养袋、氧气指示剂购自海博生物公司,RNA免疫沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)试剂盒购自吉赛生物公司。

1.2 细胞培养及细胞转染

DU145、PC3、Lncap、22RV1细胞均采用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,RWPE-1细胞培养于含有50 μ g/mL牛垂体提取物和5 ng/mL表皮生长因子的K-SFM培养液中。上述细胞均置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱进行培养,每2 d换液1次。待细胞汇合度达到80%~90%时进行消化传代。细胞实验所用细胞传代次数不超过15代。细胞转染:取对数生长期细胞接种于6孔板中,待汇合度达50%~60%时,使用Lipofectamine 2000试剂将各siRNA转染至DU145和PC3细胞中,转染circ_0007766的干扰序列分别设

组为si-circ#1、si-circ#2组,对照为si-NC(circ_0007766)组;转染EIF4A3的干扰序列分别设si-EIF4A3#1、si-EIF4A3#2组,对照为si-NC(EIF4A3)组(siRNA序列见表1)。置于培养箱中培养24~48 h后进行相关实验,所有操作参照试剂盒说明书进行。

表1 siRNA序列

基 因	siRNA序列(5'→3')
si-hsa-circ_0007766#1	CTGTCCCTGATATCCAGGA
si-hsa-circ_0007766#2	TGCCTGTCCCTGATATCCA
si-EIF4A3#1	AGCCACCUUCAGUAUCUCA
si-EIF4A3#2	CCUCCAGUGUUUGGAUAUU

1.3 厌氧袋法建立DU145和PC3细胞的缺氧细胞模型
取对数生长期的DU145和PC3细胞的培养皿置于厌氧培养袋中,并在每个袋内放入一个CO₂产气包和一

支氧气指示剂,该装置可迅速使袋内CO₂体积分数升高、O₂体积分数下降,从而制造缺氧环境^[4]。通过检测HIF-1 α 蛋白表达评价缺氧细胞模型是否建立成功。实验结束时收取RNA或者蛋白样本,进行后续相关实验。

1.4 RT-PCR及Sanger测序验证circ_0007766扩增引物的特异性

TRIzol法提取各处理组细胞的总RNA,使用HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit将其反转录成cDNA;使用基因组DNA提取试剂盒提取DU145与PC3细胞的基因组DNA;Golden Easy PCR试剂分别对上述cDNA和DNA进行circ_0007766的PCR扩增(引物序列见表2)。2%琼脂糖凝胶电泳分离circ_0007766的PCR产物,胶回收纯化后,送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

表2 引物序列

基 因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
circ_0007766	TGCCTCCACTTCAACCACAG	GAGCGATGAGCACGTAGCC
GAPDH	AAATCCCATCACCATCTTCC	ATGACCCTTTTGCTCCC
EIF4A3	AAGGGAGAGATGTCATCGCAC	GCTTGAGTTTCACGAACCTGA

1.5 qRT-PCR法检测circ_0007766、EIF4A3分子的表达

TRIzol法提取各PCa细胞的总RNA,使用康为世纪组织RNA提取试剂盒提取PCa组织中的总RNA。NanoDrop One微量分光光度计测量各组RNA浓度与纯度,使用HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit和ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂进行RNA反转录与qRT-PCR扩增,反应体系为20 μ L,具体参照试剂盒说明书进行。反应条件:95 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 8 s,60.5 $^{\circ}$ C 8 s(EIF4A3分子退火温度为58 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 8 s,72 $^{\circ}$ C 10 min;共40个循环。以GAPDH作为内参对照,2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算各基因的相对表达量(引物序列见表2)。

1.6 生物信息学分析circ_0007766的染色体定位以及与其结合的RNA结合蛋白

CircBase网站(www.circbase.org)检索获取circ_0007766的染色体定位信息。CircPrimer 2.0软件获取circ_0007766的基因组成信息。Circinteractome网站(<http://circinteractome.nia.nih.gov>)检索分析与circ_0007766生成有关的RNA结合蛋白信息。

1.7 CCK-8法检测转染si-circ_0007766对PCa细胞增殖活力的影响

将各处理组细胞以3 $\times$ 10³个/孔的密度接种于96孔板中,每组设置6个复孔,分别孵育0、24、48、72和96 h后,向每孔中添加10 μ L CCK-8试剂,37 $^{\circ}$ C下处理2 h后,酶标仪上450 nm波长测定各孔光密度值(D值),以D值

代表细胞增殖活力水平,统计分析测定结果。

1.8 Transwell小室实验检测转染si-circ_0007766对PCa细胞迁移、侵袭能力的影响

胰酶消化收集各处理组细胞,以(4~5) $\times$ 10⁴个/孔的密度将细胞接种于包被基质胶(迁移实验不做铺胶处理)的Transwell小室内,小室内的培养液中不含血清,Transwell小室的下部加入含20% FBS的RMPI 1640完全培养基。置于CO₂培养箱培养24~36 h,擦去小室上表面的细胞,4%多聚甲醛溶液固定小室下表面的细胞,固定时间约为20 min;固定完成后,弃去固定液,并使用0.1%结晶紫水溶液染色3~5 min,弃去染液,PBS轻轻洗涤小室,一次性棉签擦拭小室内残存细胞。显微镜下每孔随机选取6个视野照相,Image J软件分析各视野细胞数,分别计算细胞迁移率和侵袭率。计算公式:细胞迁移率=(迁移到小室下表面的细胞数/原先接种的细胞数) $\times$ 100%;细胞侵袭率=(侵袭到小室下表面的细胞数/最初接种的细胞数) $\times$ 100%。

1.9 平板克隆实验检测转染si-circ_0007766对PCa细胞克隆形成的影响

各处理组细胞按2 $\times$ 10²个/孔的密度接种于12孔板中,每组设3个复孔,继续培养10~14 d,每隔3 d换一次液。4%多聚甲醛溶液固定细胞20 min,0.1%结晶紫水溶液染色3~5 min,PBS润洗细胞,自然风干后在显微镜下拍照,计数各组大于100个细胞的克隆

形成数以及计算克隆形成率。使用相机拍摄小孔克隆形成照片。计算使用公式:克隆形成率=(克隆形成数)/(接种的细胞数)×100%。

1.10 WB 法检测缺氧处理后 PCa 细胞中 HIF-1 α 、EIF4A3 蛋白的表达

预冷 PBS 洗涤各组细胞,全蛋白提取试剂盒提取蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转印至 PVDF 膜上,含 5% 脱脂奶粉封闭液常温封闭 1~2 h。加入一抗溶液,4℃ 下反应过夜,PBST 洗涤,加入二抗溶液后室温下反应 1 h,PBST 洗涤。ECL 化学发光液显影,以 GAPDH 或 β -tubulin 作为内参对照,Image J 分析灰度值进行处理。抗体按照说明书建议稀释比例进行稀释。

1.11 RIP 实验验证缺氧下 EIF4A3 与 circ_0007766 的结合

收集缺氧处理后的 DU145、PC3 细胞,加入裂解液进行裂解。各取 50、100 μ L 标记为 Input 组。磁珠经预处理后,分别与 IP 级的 EIF4A3 (IP 组)、IgG (IgG 组) 抗体于 4℃ 10 rpm 旋转反应 1~2 h;再分别向其中加入细胞裂解液,继续于 4℃、10 rpm 过夜旋转,进行抗原捕获;处理过夜后的磁珠复合物经洗涤,吸取 100 μ L 液体,标记为 IP 组、IgG 组,弃上清液并加入 50 μ L 上样缓冲液(1 $\times$)煮沸后行 WB 检测 EIF4A3 蛋白的下拉效率;剩余磁珠复合物过柱去除 DNA、过柱纯化 RNA 后,用 dd H₂O 洗脱后收集 RNA 溶液,进行

RT-PCR 以及 qPCR 检测 circ_0007766 的富集。

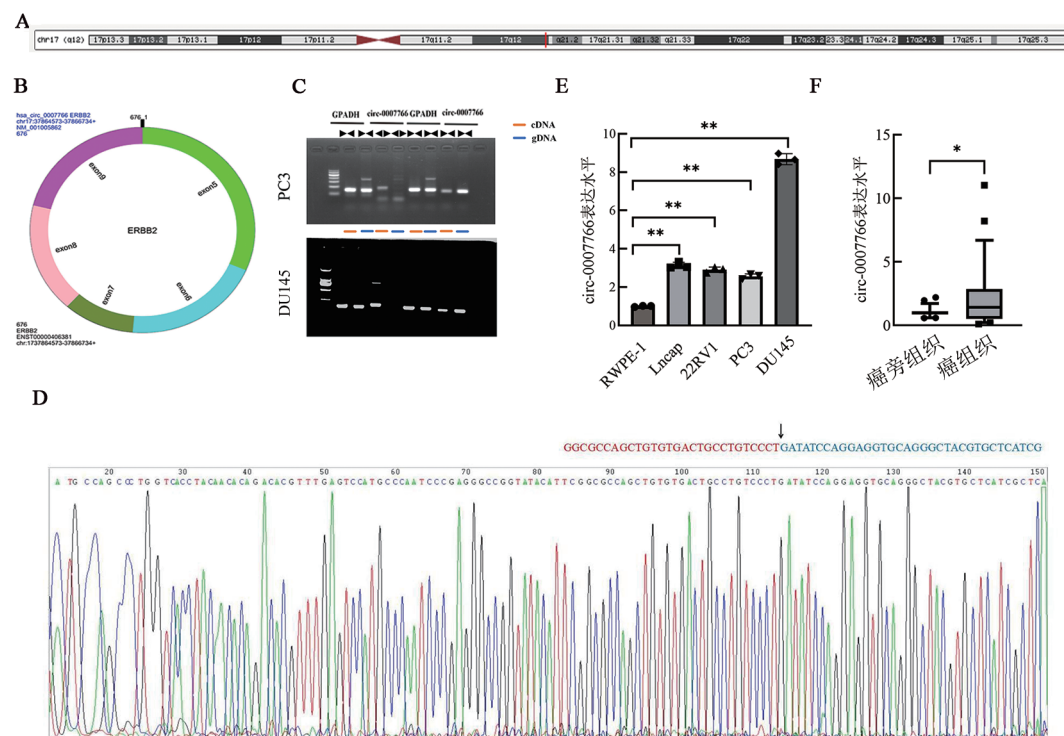
1.12 统计学处理

采用 Graphpad Prism 9.5.1 软件对实验数据进行统计学分析并作图。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 One-way ANOVA 方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circ_0007766 在 PCa 组织和细胞中呈高表达

生物信息学软件分析发现,circ_0007766 的染色体定位为 chr17:37864573-37866734 (图 1 A),它是由其线性基因 ERBB2 的 5 号到 9 号外显子反向剪接而成,全长为 676 bp (图 1 B)。课题组设计了跨其剪接点的特异性检测引物,PCR 结果可见 circ_0007766 在 cDNA 模板中特异性扩增,在 gDNA 模板中不能被扩增 (图 1 C);Sanger 测序证实,PCR 扩增产物包含 circ_0007766 的剪切点 (图 1 D)。以上结果证实了 circ_0007766 检测引物的特异性。qRT-PCR 检测结果显示,与前列腺正常上皮细胞 RWPE-1 相比 (图 1 E),circ_0007766 在 PCa 细胞中呈高表达 ($P < 0.01$);与癌旁组织相比 (图 1 F),circ_0007766 在 PCa 病理组织中也呈高表达 ($P < 0.05$)。



A: circ_0007766 染色体定位; B: circ_0007766 分子结构图; C: 引物特异性验证; D: PCR 扩增纯化产物 Sanger 测序结果; E: circ_0007766 在 PCa 细胞中的表达; F: circ_0007766 在 PCa 组织中的表达 ($n = 8$)。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

图 1 circ_0007766 在 PCa 细胞及组织中高表达

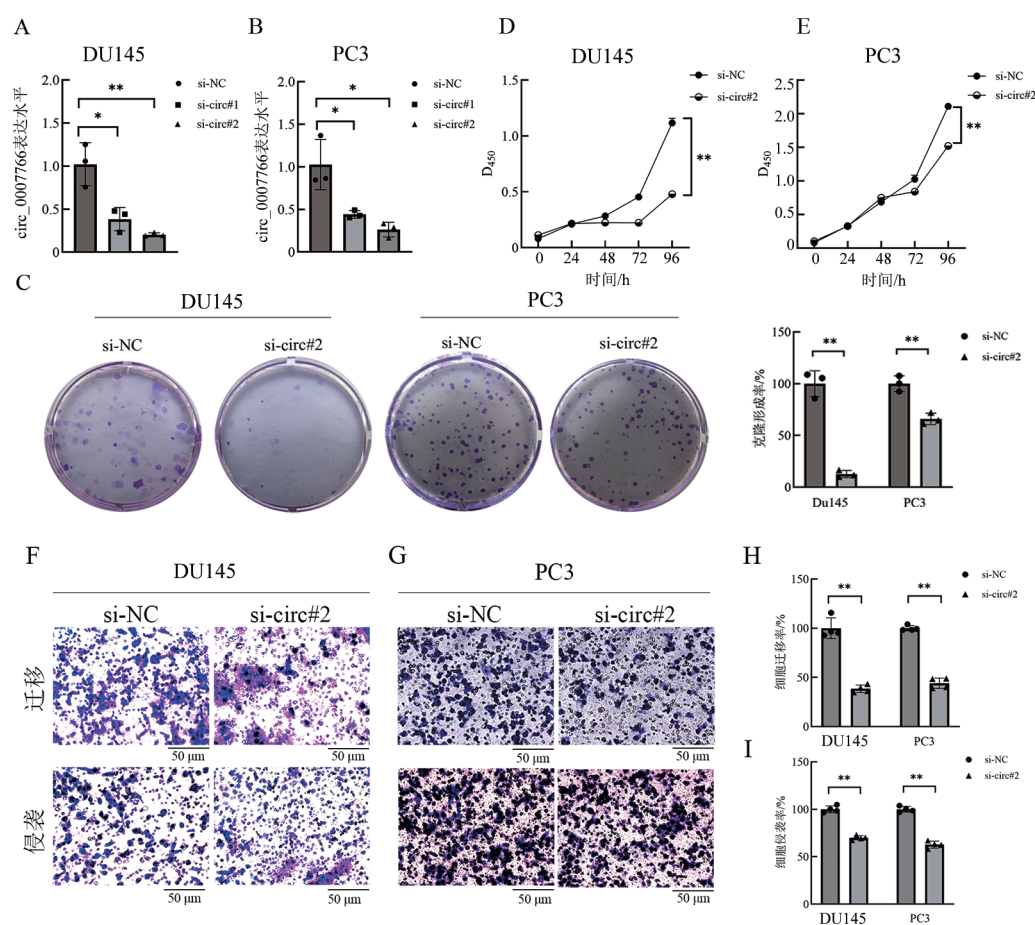
2.2 敲低circ_0007766可抑制PCa细胞的增殖、迁移和侵袭能力

鉴于circ_0007766在PCa细胞和组织中呈高表达,为进一步明确circ_0007766在PCa进程中的作用,设计合成circ_0007766的siRNA,分别将其转染到DU145和PC3细胞中进行相关研究。qRT-PCR检测结果显示(图2 A、B),与si-NC组相比,两条干扰序列都可有效降低circ_0007766的表达,且第二条干扰序列敲低效果更佳($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。平板克隆实验结果显示(图2 C),si-circ#2组形成的细胞集团数量明显少于si-NC组(均 $P < 0.01$);CCK-8实验结果显示(图2 D、E),与si-NC组相比,si-circ#2组PCa细胞增殖活力明显受到抑制(均 $P < 0.01$)。Transwell

小室实验结果(图2 F~I)显示,与si-NC组相比,si-circ#2组的迁移和侵袭细胞数量显著减少(均 $P < 0.01$)。综上,敲低circ_0007766可抑制PCa细胞的增殖、迁移和侵袭的能力。

2.3 缺氧可促进PCa细胞circ_0007766的表达

WB法检测HIF-1 α 的蛋白表达来评价缺氧细胞模型建立的成功与否,结果显示,使用厌氧袋法处理后,HIF-1 α 的蛋白表达显著增强(图3 A),表明缺氧细胞模型建立成功。qRT-PCR检测circ_0007766的表达,结果(图3B、C)显示,相较于常氧培养组(0 h组),缺氧细胞中circ_0007766的表达显著增强($P < 0.01$)。结果表明,缺氧可促进circ_0007766在PCa细胞中的表达。



A、B: qRT-PCR检测si-circ_0007766的转染效率;C:敲低circ_0007766对PCa细胞克隆形成能力的影响;D、E:敲低circ_0007766对PCa细胞增殖活力的影响;F~I:敲低circ_0007766对PCa细胞迁移和侵袭能力的影响。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图2 敲低circ_0007766可抑制PCa细胞的增殖、迁移和侵袭能力

2.4 EIF4A3可结合并调控circ_0007766的表达

采用生物信息学手段分析发现,EIF4A3与circ_0007766侧翼序列有结合位点(图4 A)。已有研究表明EIF4A3可通过与circRNA侧翼序列结合调控其生成。因此,使用RIP实验富集缺氧下PCa细胞中与EIF4A3结合的RNA分子,WB法检测RIP下拉蛋白

效率(图4 B、E),EIF4A3组有特异性蛋白条带,IgG组没有特异性条带,表明EIF4A3的有效下拉;qRT-PCR检测结果(图4 C、F)表明,相较于IgG组,EIF4A3组DU145和PC3细胞中circ_0007766富集显著增加(均 $P < 0.01$);琼脂糖凝胶电泳分离实验进一步说明circ_0007766与EIF4A3结合(图4 D、G),表明EIF4A3可

与 circ_0007766 结合。据此,推测 circ_0007766 的生成可能受 EIF4A3 的调控。根据文献检索获得 EIF4A3 的 siRNA 信息,合成两条 siRNA。通过 qRT-PCR 和 WB 法检测结果(图 5 A~C)可见,与 si-NC 相比,转染 si-EIF4A3#1 和 si-EIF4A3#2 后,DU145 和 PC3 细胞中 EIF4A3 的 mRNA(均 $P < 0.01$)和蛋白表

达均显著降低。qRT-PCR 进一步检测显示(图 5 D、E),在常氧条件下,敲低 EIF4A3 后 PCa 细胞中 circ_0007766 的表达也显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果表明,缺氧下 EIF4A3 可与 circ_0007766 结合;常氧条件下 circ_0007766 的表达可受 EIF4A3 调控。

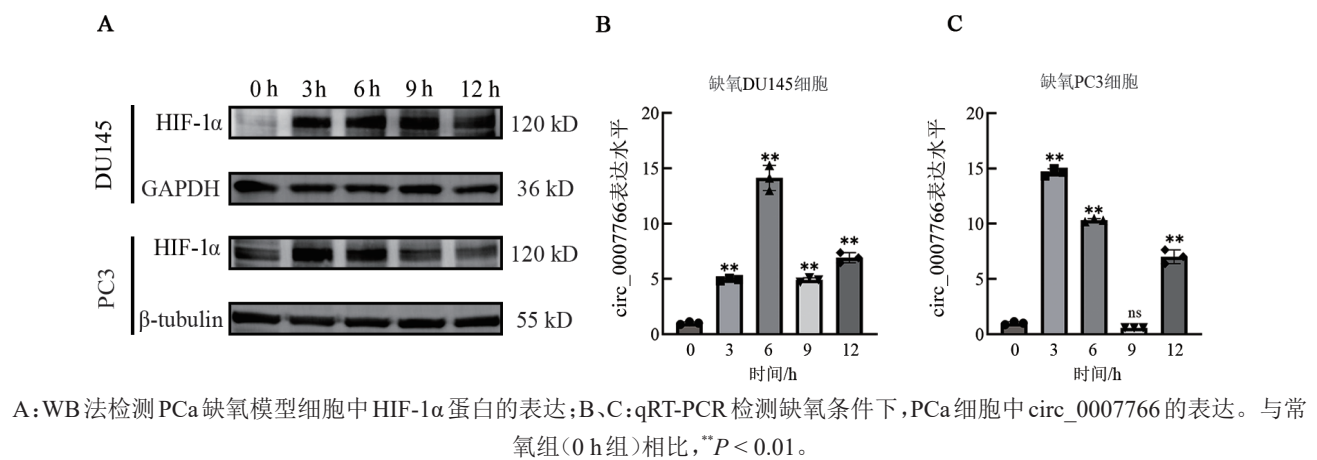


图3 缺氧可促进 PCa 细胞中 circ_0007766 的表达

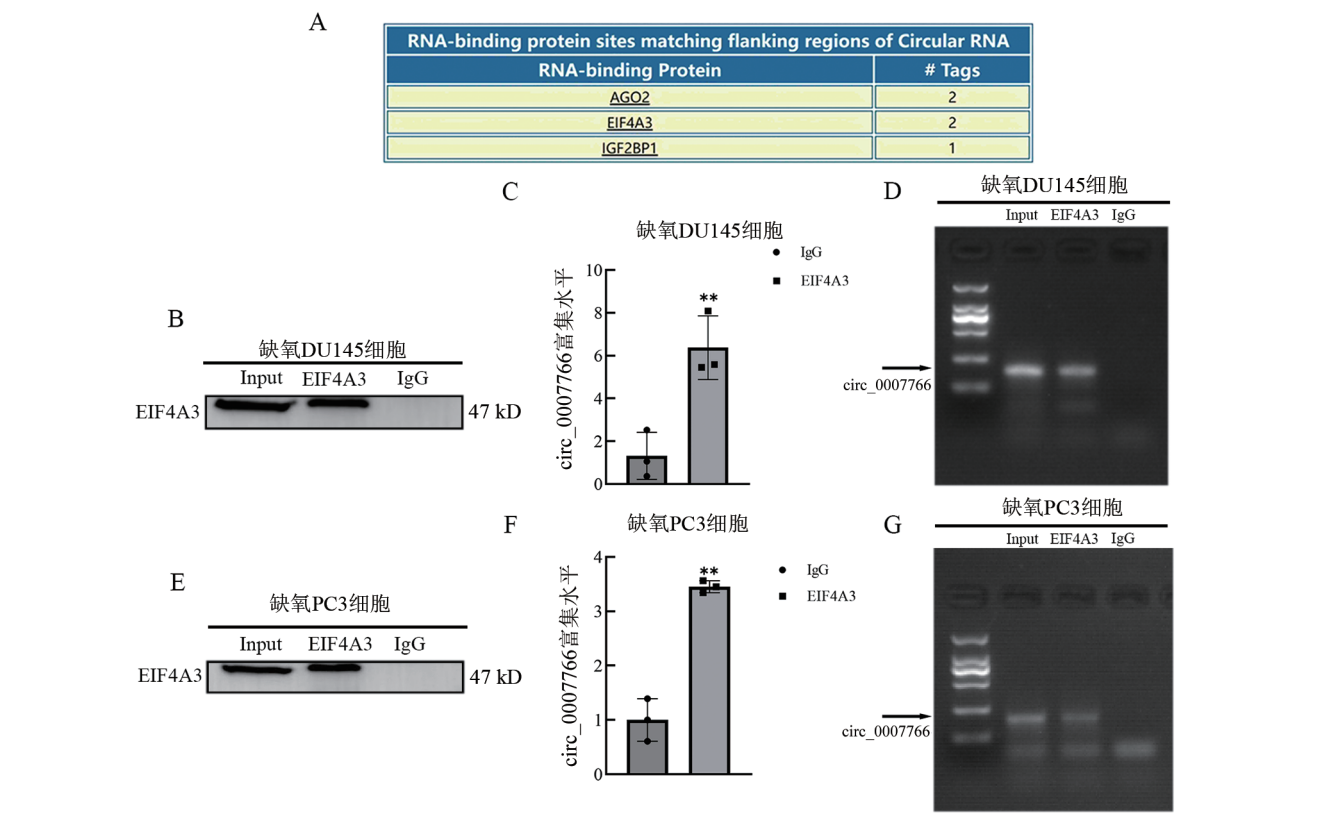


图4 缺氧下 PCa 细胞中的 EIF4A3 可结合 circ_0007766

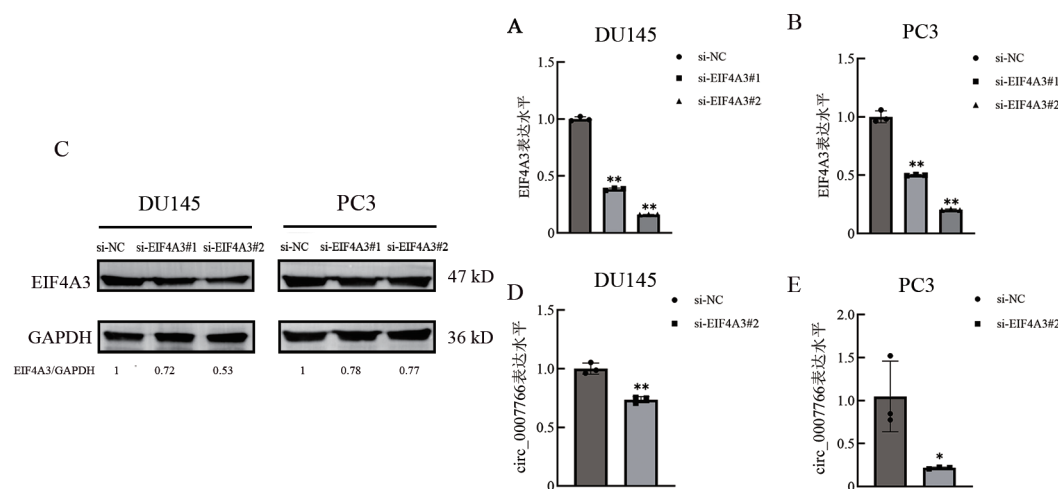
2.5 敲低 EIF4A3 能够降低缺氧诱导的 circ_0007766 表达

为明确缺氧条件下 EIF4A3 的表达情况, WB 法

检测缺氧 PCa 细胞中 EIF4A3 的表达, 结果显示细胞缺氧诱导 6 h 和 12 h 后 EIF4A3 的蛋白表达明显增强(图 6A)。为进一步明确敲低 EIF4A3 是否能够降低

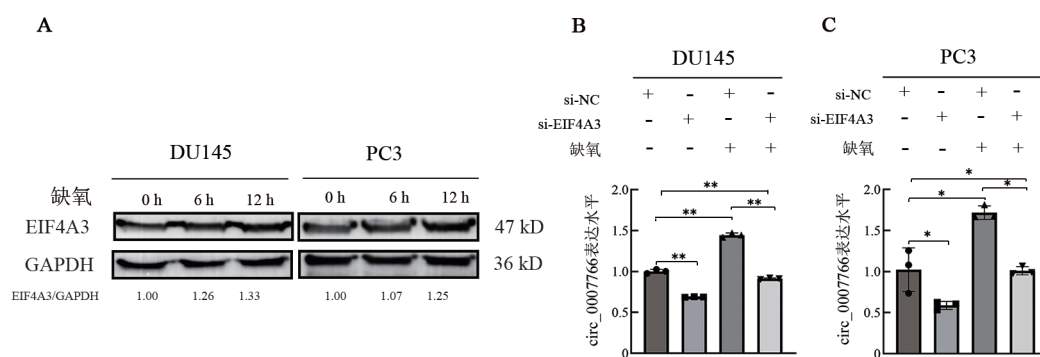
缺氧诱导的 circ_0007766 表达,在缺氧诱导的同时在 DU145 和 PC3 细胞中转染 EIF4A3 的 siRNA, qRT-PCR 检测结果(图 6 B、C)显示,缺氧可显著促进 circ_0007766 的表达,同时敲低 EIF4A3 基因,可显著降低

缺氧诱导的 circ_0007766 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。综上所述,缺氧条件下 EIF4A3 的表达增高,敲低 EIF4A3 能够降低缺氧诱导的 circ_0007766 表达,表明缺氧条件下 circ_0007766 的表达受 EIF4A3 调控。



A、B: qRT-PCR 检测 PCa 细胞转染 siRNA 对 EIF4A3 mRNA 表达的影响; C: WB 法检测转染 siRNA 对 EIF4A3 蛋白表达的影响; D、E: qRT-PCR 检测敲低 EIF4A3 对 PCa 细胞中 circ_0007766 表达的影响。与 si-NC 组相比, * $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

图 5 EIF4A3 可调控 PCa 细胞中 circ_0007766 的表达



A: 缺氧对 EIF4A3 表达的影响; B、C: 敲低 EIF4A3 能够降低缺氧诱导的 circ_0007766 表达。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

图 6 在 PCa 细胞中敲低 EIF4A3 能够降低缺氧诱导的 circ_0007766 表达

3 讨论

PCa 是男性常见的恶性肿瘤之一,在世界范围内都有着严重的危害。目前,由于 PCa 分子发病机制在很大程度上仍未阐明,晚期 PCa 尚无有效的临床治疗方法。因此,进一步揭示 PCa 发生发展的分子机制,寻找新的特异性的诊断标志物和治疗靶点,将在很大程度上有助于提高 PCa 的临床诊断和治疗水平。

近年来, circRNA 因其具有表达特异性和更加稳定的环状结构^[15],在 PCa 诊断和治疗中的作用越来越受到关注^[16]。LU 等^[17]报道称, circTENM3 通过 miR-558/RUNX3 轴抑制 PCa 的发生; XIE 等^[18]研究表明, circSMARCC1 通过 miR-1322/CCL20/CCR6 信号

干扰 PCa 细胞与肿瘤相关巨噬细胞之间的串联,从而促进肿瘤的发展进程。 circTHSD4 可通过调控 miR-203/HMGA2 轴促进 PCa 的多西他赛耐药和恶性进程^[19]。深入研究 circRNA 的作用和机制对于更好地阐释 PCa 的发病机制和寻找更加有效的治疗靶点具有重要的意义。 ERBB2 是蛋白酪氨酸激酶家族的一个独特成员,本课题组在前期研究^[20]中已证实体外下调 circ_0007766 可显著抑制乳腺癌细胞的恶性行为。研究显示,环化自 ERBB2 的 circ_0007766 在胃癌组织和细胞中呈高表达,体外下调 circ_0007766 对胃癌细胞的生长起抑制作用^[8]; circ_0007766 对肺癌细胞增殖、迁移具有促进作用^[9]。然而,目前尚未见 circ_0007766 在 PCa 方面的研究报道。课题组前期

研究发现, circ_0007766 定位于 17 号染色体, 是由 ERBB2 基因的 5 号至 9 号外显子反向剪接而成 circRNA。GEO 数据库进一步分析发现: circ_0007766 在 PCa 组织中表达显著上调, 并与 PCa 的 Gleason 评分 (GSE113153 数据集) 和恩扎鲁胺耐药 (GSE118959 数据集) 有关。课题组设计合成了 circ_0007766 的特异性检测引物, 并通过 RT-PCR 检测和 PCR 产物测序证实了引物的特异性。进一步检测发现 circ_0007766 在 PCa 组织和细胞中表达显著增强, 通过设计合成 siRNA 体外敲低 circ_0007766 可抑制 PCa 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。在实验过程中发现, 利用 siRNA 进行体外敲低时, 可能由于细胞株差异, 导致 DU145 细胞敲低效果相对于 PC3 细胞更好, 从而导致了其在两种细胞增殖、迁移和侵袭中检测的差异, 但总体敲低效果保持一致。综上, circ_0007766 在 PCa 的诊断和治疗中具有一定的潜在价值。

缺氧是恶性肿瘤的常见特征。目前已有研究表明, 缺氧参与了 circRNA 的生成调控。为探讨 circ_0007766 在 PCa 组织和细胞中差异表达的原因和潜在机制, 课题组参照相关研究^[14], 使用厌氧袋法建立了 PCa 的体外缺氧细胞模型。WB 法检测结果显示, 缺氧重要信号分子 HIF-1 α 的蛋白表达在模型细胞中显著增强, 表明缺氧细胞模型建立成功。值得一提的是, 课题组前期也尝试使用氯化钴建立 PCa 缺氧细胞模型^[21], 但多次建模后的检测结果显示, 与对照组相比, circ_0007766 的表达不但没有显著升高, 反而出现了降低。GÓMEZ-ARNAIZ 等^[22]报道, 暴露于高浓度的细胞外钴对神经元和星形胶质细胞具有一定的毒性作用。因此本课题组推测, circ_0007766 在氯化钴造模法中的异常表达可能与氯化钴对细胞的毒性作用有关。qRT-PCR 检测结果显示, 厌氧袋法造模细胞中 circ_0007766 的表达显著升高, 表明缺氧可促进 circ_0007766 的表达。

真核生物起始因子 4A3 (EIF4A3) 是外显子连接复合物的核心蛋白, 参与 RNA 剪接, 无义介导的衰变、翻译和定位等生物学过程^[23]。EIF4A3 可作为一种 RNA 结合蛋白与 BRWD3、ZFAND6 或 STX6 基因的特异位点结合, 诱导环状 RNA circBRWD3、circZFAND6 和 circSTX6 的生成^[24-26]。本研究使用 circinteractome 数据库检索分析显示, EIF4A3 与 circ_000776 的侧翼序列存在结合位点。qRT-PCR 检测发现, EIF4A3 敲低后 circ_0007766 的表达水平显著降低, 表明 circ_0007766 的表达与 EIF4A3 调控有关。有报道称缺氧可增强 EIF4A3 的表达^[27]。推测 EIF4A3 可能参与了缺氧诱导的 circ_0007766 生成。缺氧模型细胞中 EIF4A3 的表达明显增强, 敲低

EIF4A3 后 PCa 细胞中 circ_0007766 的表达显著降低, 同时能够降低缺氧诱导的 circ_0007766 表达上调。上述结果表明, EIF4A3 参与缺氧诱导的 circ_0007766 生成。

综上所述, 本研究证实 circ_0007766 在 PCa 组织和细胞中呈高表达, 敲低 circ_0007766 可显著抑制 PCa 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 表明 circ_0007766 在 PCa 的诊断和治疗中具有一定的潜在价值。与此同时, 研究结果揭示 PCa 细胞中 circ_0007766 的表达增强与缺氧以及 EIF4A3 的调控有关, 为 circ_0007766 表达调控机制和缺氧条件下 PCa 进展分子机制的阐释提供了参考依据。项目组将在随后的研究中增添体内实验, 探讨 circ_0007766 在动物水平上的作用, 并进一步阐释 circ_0007766 在缺氧介导的 PCa 进程中的作用机制。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024 [J]. CA A Cancer J Clinicians, 2024, 74(1): 12-49. DOI: 10.3322/caac.21820.
- [2] CHHIKARA B S, PARANG K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis[J]. Chemical Biology Letters, 2023, 10 (1): 451.
- [3] SAMARE-NAJAF M, KOUCHAKI H, MOEIN MAHINI S, et al. Prostate cancer: Novel genetic and immunologic biomarkers[J]. Clin Chim Acta, 2024, 555: 117824. DOI:10.1016/j.cca.2024.117824.
- [4] HUSSAIN M, FIZAZI K, SHORE N D, et al. Metastatic hormone-sensitive prostate cancer and combination treatment outcomes: a review[J]. JAMA Oncol, 2024, 10(6): 807-820. DOI: 10.1001/jamaoncol.2024.0591.
- [5] CHEN L L, YANG L. Regulation of circRNA biogenesis[J]. RNA Biol, 2015, 12(4): 381-388. DOI:10.1080/15476286.2015.1020271.
- [6] MAO S Y, ZHANG W T, YANG F H, et al. Hsa_circ_0004296 inhibits metastasis of prostate cancer by interacting with EIF4A3 to prevent nuclear export of ETS1 mRNA[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 336. DOI:10.1186/s13046-021-02138-8.
- [7] MILLER D R, INGERSOLL M A, LIN M F. ErbB-2 signaling in advanced prostate cancer progression and potential therapy[J]. Endocr Relat Cancer, 2019, 26(4): R195-R209. DOI:10.1530/ERC-19-0009.
- [8] XU W G, ZHOU B, WU J, et al. Circular RNA hsa-circ_0007766 modulates the progression of Gastric Carcinoma via miR-1233-3p/GDF15 axis[J]. Int J Med Sci, 2020, 17(11): 1569-1583. DOI: 10.7150/ijms.46261.
- [9] 张帅, 夏文佳, 董高超, 等. 环状 RNA 分子 circ_0007766 通过上调细胞周期相关蛋白 Cyclin D1/CyclinE1/CDK4 的表达促进肺腺癌细胞增殖[J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22(5): 271-279. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2019.05.03.
- [10] LUO Y W, YANG Z H, YU Y, et al. HIF-1 α lactylation enhances KIAA1199 transcription to promote angiogenesis and vasculogenic mimicry in prostate cancer[J]. Int J Biol Macromol, 2022, 222(Pt

- B); 2225-2243. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.014.
- [11] MARGNOL L, RIVERA-FIGUEROA K, LYNCH T, *et al.* Hypoxia, Notch signalling, and prostate cancer[J]. *Nat Rev Urol*, 2013, 10(7): 405-413. DOI:10.1038/nrurol.2013.110.
- [12] LIN J W, WANG X J, ZHAI S Y, *et al.* Hypoxia-induced exosomal circPDK1 promotes pancreatic cancer glycolysis *via* c-myc activation by modulating miR-628-3p/BPTF axis and degrading BIN1[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 128. DOI:10.1186/s13045-022-01348-7.
- [13] YANG X J, LOU C, ZHANG Q, *et al.* Hypoxia-induced circRTN4IP1 promotes progression and glycolysis of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Funct Integr Genomics*, 2023, 23(4): 339. DOI: 10.1007/s10142-023-01256-0.
- [14] 陈雨, 李艳, 周子妍, 等. 基于混合气体法的H9c2心肌细胞缺氧/复氧模型建立及优化研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(9): 1123-1127. DOI:10.19378/j.issn.1003-9783.2020.09.018.
- [15] KRISTENSEN L S, ANDERSEN M S, STAGSTED L V W, *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.
- [16] SONG X M, WEI Z W, ZHANG C, *et al.* circAKT3 promotes prostate cancer proliferation and metastasis by enhancing the binding of RPS27A and RPL11[J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1): 53. DOI:10.1186/s12943-025-02261-6.
- [17] LU L X, WANG F, CHEN J C, *et al.* CircTENM3 inhibites tumor progression *via* the miR-558/RUNX3 axis in prostate cancer[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 850. DOI:10.1186/s12967-023-04708-0.
- [18] XIE T, FU D J, LI Z M, *et al.* CircSMARCC1 facilitates tumor progression by disrupting the crosstalk between prostate cancer cells and tumor-associated macrophages *via* miR-1322/CCL20/CCR6 signaling[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 173. DOI: 10.1186/s12943-022-01630-9.
- [19] XIE J Y, LU L J, ZHANG J L, *et al.* CircTHSD4 promotes the malignancy and docetaxel (DTX) resistance in prostate cancer by regulating miR-203/HMGA2 axis[J]. *Oncol Res*, 2024, 32(3): 529-544. DOI:10.32604/or.2023.031511.
- [20] 路玉祥. hsa_circ_0007766在人乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移中的作用及机制研究[D]. 银川: 宁夏医科大学, 2021. DOI:10.27258/d.cnki.gnxyc.2021.000474.
- [21] 罗婷, 祁琳, 李杰, 等. 氯化钴模拟低氧条件下红景天苷对小鼠成骨细胞的调节作用[J]. *医学信息*, 2024, 37(9): 101-106. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2024.09.019.
- [22] GÓMEZ-ARNAIZ S, TATE R J, GRANT M H. Cytotoxicity of cobalt chloride in brain cell lines-a comparison between astrocytoma and neuroblastoma cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 68: 104958. DOI:10.1016/j.tiv.2020.104958.
- [23] GEHRING N H, KUNZ J B, NEU-YILIK G, *et al.* Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements[J]. *Mol Cell*, 2005, 20(1): 65-75. DOI:10.1016/j.molcel.2005.08.012.
- [24] HUANG X J, TAN W G, LIU Z T, *et al.* EIF4A3-induced circZFAND6 promotes breast cancer proliferation and metastasis through the miR-647/FASN axis[J]. *Life Sci*, 2023, 324: 121745. DOI:10.1016/j.lfs.2023.121745.
- [25] MENG X G, LI W, MENG Z Q, *et al.* EIF4A3-induced circBRWD3 promotes tumorigenesis of breast cancer through miR-142-3p_miR-142-5p/RAC1/PAK1 signaling[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1): 1225. DOI:10.1186/s12885-022-10200-7.
- [26] WEI W J, LIU K, HUANG X, *et al.* EIF4A3-mediated biogenesis of circSTX6 promotes bladder cancer metastasis and cisplatin resistance[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 2. DOI:10.1186/s13046-023-02932-6.
- [27] KONG R J, WEI W X, MAN Q H, *et al.* Hypoxia-induced circ-CDYL-EEF1A2 transcriptional complex drives lung metastasis of cancer stem cells from hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2023, 578: 216442. DOI:10.1016/j.canlet.2023.216442.

[收稿日期] 2024-12-17

[修回日期] 2025-04-14

[本文编辑] 黄静怡