

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.08.006

· 基础研究 ·

circFSCN1通过 miR-429/GPNMB 轴影响胃癌细胞的恶性生物学行为

李超,王世卉,林洁,王凡珂,张蕊(河北医科大学第一医院 胃肠病诊疗中心,河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的:**探究环状RNA肌动蛋白束蛋白1(circFSCN1)调节 miR-429/非转移性黑色素蛋白B(GPNMB)轴对胃癌细胞恶性生物学行为的影响及机制。**方法:**收集2022年9月至2023年9月期间在河北医科大学第一医院手术切除的54例胃癌组织及相应癌旁组织,用qPCR法检测胃癌组织中 circFSCN1、miR-429和GPNMB mRNA的表达。常规培养胃癌细胞MGC803,将其分为对照组、sh-NC组、sh-circFSCN1组、sh-circFSCN1 + anti-NC组、sh-circFSCN1 + anti-miR-429组。qPCR法各组MGC803细胞中 circFSCN1、miR-429和GPNMB mRNA的表达。CCK-8法、克隆形成实验、Transwell实验和流式细胞术分别检测各组MGC803细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡。免疫荧光法检测各组细胞中GPNMB蛋白的表达。WB法检测各组MGC803细胞中PCNA、MMP-2、GPNMB、cleaved caspase-3蛋白的表达。双萤光素酶报告基因实验和RNA结合蛋白免疫共沉淀(RIP)实验验证 circFSCN1与miR-429和miR-429与GPNMB之间的结合调控关系。**结果:**circFSCN1、GPNMB mRNA在胃癌组织中均呈高表达(均 $P < 0.05$),miR-429呈低表达($P < 0.05$)。敲减 circFSCN1可促进 miR-429表达,抑制 GPNMB mRNA表达,抑制 miR-429则可促进 GPNMB mRNA表达。敲减 circFSCN1可显著抑制 MGC803细胞的增殖、迁移、侵袭能力,并促进其凋亡,抑制 miR-429可部分逆转敲减 circFSCN1的作用。敲减 circFSCN1可抑制 MGC803细胞中PCNA、MMP-2和GPNMB蛋白表达,抑制 cleaved caspase-3蛋白表达,抑制 miR-429可部分逆转敲减 circFSCN1的作用。circFSCN1与miR-429和miR-429与GPNMB mRNA之间存在靶向结合负向调控关系。**结论:**敲减 circFSCN1通过 miR-429/GPNMB轴抑制胃癌细胞的恶性生物学行为,circFSCN1是胃癌潜在的治疗靶点。

[关键词] 胃癌;circFSCN1;miR-429;非转移性黑色素蛋白B;增殖;迁移;侵袭

[中图分类号] R735.2; R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 08-0831-08

circFSCN1 regulates malignant behaviors of gastric cancer MGC803 cells via the miR-429/GPNMB axis

LI Chao, WANG Shihui, LIN Jie, WANG Fanke, ZHANG Rui (Gastroenterology Diagnosis and Treatment Center, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of circular RNA fascin actin-bundling protein 1 (circFSCN1) on the malignant biological behaviors of gastric cancer cells by regulating the microRNA-429 (miR-429)/glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) axis and its mechanisms. **Methods:** The gastric cancer tissues and corresponding para-cancerous tissues of 54 patients who underwent surgical resection at the First Hospital of Hebei Medical University between September 2022 and September 2023 were collected. The expressions of circFSCN1, miR-429 and GPNMB mRNA in gastric cancer tissues were detected by qPCR. Gastric cancer MGC803 cells were routinely cultured and divided into the control group, the sh-NC group, the sh-circFSCN1 group, the sh-circFSCN1+anti-NC group, and the sh-circFSCN1 + anti-miR-429 group. The expressions of circFSCN1, miR-429 and GPNMB mRNA in MGC803 cells of each group were detected by qPCR. The proliferation, migration, invasion and apoptosis of MGC803 cells in each group were detected by CCK-8 method, colony formation assay, Transwell assay and flow cytometry, respectively. Immunofluorescence was used to detect the expressions of GPNMB protein in cells of each group. WB assay was used to detect the expressions of PCNA, MMP-2, GPNMB and Cleaved Caspase-3 proteins in MGC803 cells of each group. Dual luciferase reporter assay and RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP) assay were used to verify the binding regulatory relationship between circFSCN1 and miR-429, and between miR-429 and GPNMB. **Results:** circFSCN1 and GPNMB mRNA were both highly expressed in gastric cancer tissues (both $P < 0.05$), while miR-429 was lowly expressed ($P < 0.05$). Knockdown of circFSCN1 could promote the expression of miR-429 and inhibit the expression of GPNMB mRNA. Inhibition of miR-429 could promote the expression of GPNMB

[基金项目] 2022年政府资助临床医学优秀人才培养项目(No. LS202208)

[作者简介] 李超(1981—),男,硕士,副主任医师,主要从事消化系统疾病及内镜诊疗

[通信作者] 张蕊(扫码获取作者联系方式)



mRNA. Knockdown of circFSCN1 could significantly inhibit the proliferation, migration and invasion abilities of MGC803 cells and promote their apoptosis. Inhibition of miR-429 could partially reverse the effect of circFSCN1 knockdown. Knockdown of circFSCN1 could inhibit the expressions of PCNA, MMP-2 and GPNMB proteins in MGC803 cells and inhibit the expression of cleaved caspase-3 protein. There was a targeted binding and negative regulatory relationship between circFSCN1 and miR-429 and between miR-429 and GPNMB mRNA. **Conclusion:** Knocking down circFSCN1 inhibits the malignant biological behaviors of gastric cancer cells through the miR-429/GPNMB axis, indicating that circFSCN1 is a potential therapeutic target for gastric cancer.

[Key words] gastric cancer; circular RNA fascin actin-bundling protein 1 (circFSCN1); microRNA-429 (miR-429); glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB); proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(8): 831-838. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.08.006]

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,虽然在全球范围内发病率呈下降趋势,但在中国其发病率仍然较高^[1]。胃癌发生是一个多阶段缓慢进展的病理过程,幽门螺杆菌感染、硝酸盐摄入过多、肥胖、A型血等是胃癌的高危因素;此外,基因突变、表观遗传改变和异常的分子信号通路也参与了胃癌的发生和转移^[2]。由于诊断、新手术和多模式治疗的发展,早期胃癌患者的生存率显著提高。然而,多数胃癌患者被诊断时已处于中晚期,总生存率仍然很低^[3]。因此,迫切需要确定胃癌发生的分子机制和生物标志物,以改进临床胃癌治疗手段和提高患者生存率。circRNA以组织特异性、发育阶段特异性和疾病特异性的方式表达,其高稳定性使其成为早期胃癌诊断的分子生物标志物^[4]。DENG等^[5]从基因芯片数据中筛选出一种来自致癌基因肌动蛋白束蛋白1(fascin actin-bundling protein 1, FSCN1)的新型环状RNA,即circFSCN1,其在膀胱癌中高表达,过表达可促进膀胱癌细胞的恶性生物学行为。但circFSCN1在胃癌中的作用鲜有报道。微小RNA(miRNA)的异常表达与胃癌发生密切相关^[6]。研究^[7]发现,miR-429在胃癌中低表达,其异常表达与细胞的恶性生物学行为和耐药性相关。非转移性黑色素蛋白B(glycoprotein non-metastatic melanoma protein b, GPNMB)广泛表达于各种组织和细胞中,前人通过转录组学分析发现,GPNMB在胃癌介导的免疫抑制中发挥多模态调节作用,可以促进胃癌肿瘤的进展^[8]。本研究前期通过生物信息学发现,circFSCN1与miR-429、miR-429与GPNMB之间存在结合位点。据此推测circFSCN1/miR-429/GPNMB信号轴可能对胃癌细胞恶性生物学的产生影响。本研究将探究circFSCN1在胃癌组织中的表达和作用,并深入研究其潜在机制,为胃癌治疗提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞及主要试剂

收集2022年9月—2023年9月期间在河北医科大学第一医院进行胃癌手术切除的54例胃癌组织及

对应癌旁组织。所有患者及家属均已充分知情并签署了知情同意书。本研究方案获本院伦理委员会的批准(批准号:202208011)。

胃癌细胞MGC803(货号:CM-H182)购自上海盖宁生物科技有限公司,cDNA合成试剂盒、qPCR试剂盒、BCA法蛋白定量检测试剂盒、超敏ECL试剂盒(货号:639505、RR390A、T9300A、S6008M)均购自上海百赛生物技术股份有限公司,CCK-8细胞增殖检测试剂盒(货号:CK04)购自深圳市纽邦生物技术有限公司,Annexin V-APC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(货号:CA011)购自南京莱富赛生物科技有限公司,双萤光素酶报告基因检测试剂盒(货号:GM-040502)购自上海吉满生物科技有限公司,抗PCNA、MMP-2、GPNMB、cleaved caspase-3抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(货号:ab308212、ab92536、ab222109、ab2302、ab22555、ab205719)抗体均购自Abcam公司,Lipofectamine 3000转染试剂(货号:L3000015)购自美国Thermo Fisher Scientific公司,qPCR仪(型号:OSE-R96)购自北京天根生化科技有限公司,酶标仪(型号:K3 Plus)购自广东丹利科技有限公司,流式细胞仪(型号:SinoCyte X)购自苏州中生医疗科技有限公司。

1.2 qPCR法检测胃癌组织中circFSCN1、miR-429、GPNMB mRNA表达

用TRIzol试剂提取胃癌组织和癌旁组织中的总RNA,检测其纯度和浓度后,将1 μg总RNA反转录为cDNA,用qPCR方法进行扩增。PCR反应条件:95 °C 5 min,95 °C 20 s、60 °C 20 s,共38个循环。circFSCN1、GPNMB以GAPDH作为内参,miR-429以U6作为内参,据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算胃癌组织中circFSCN1、miR-429、GPNMB mRNA相对表达量。引物序列见表1。

1.3 细胞培养、转染与分组

常规培养MGC803细胞,将其分为对照组(常规培养)、sh-NC组(转染sh-NC)、sh-circFSCN1组(转染sh-circFSCN1)、sh-circFSCN1 + anti-NC组(sh-circFSCN1和anti-NC共转染)、sh-circFSCN1 + anti-

miR-429 组 (sh-circFSCN1 和 anti-miR-429 共转染)。检测 各组 MGC803 细胞 中 circFSCN1、miR-429、GPNMB mRNA 相对表达量。

用 Lipofectamine 3000 将相应的核酸转染各组细胞。GPNMB mRNA 相对表达量。

每组实验重复 3 次, 每次设 2 个平行管。用 1.2 方法

表1 qPCR引物序列(5'-3')

基因名称	上游引物	下游引物
circFSCN1	CCAGGGTATGGACCTGTCTG	GTGTGGGTACGGAAGGCAC
miR-429	CGGTAATACTGTCTGGTAA	GTGCAGGGTCCGAGGT
GPNMB	AGAAATGGAGCTTTGTCTACGTC	CTTCGAGATGGGAATGTATGCC
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCG
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	AATGAAGGGGTCATTGATGG

1.4 CCK-8 法及克隆形成实验检测 MGC803 细胞的增殖能力

CCK-8 法: 转染 48 h 后收集 各组 MGC803 细胞, 重悬调整密度为 1×10^3 个/100 μ L, 接种于 96 孔板, 置于培养箱中培养 24 h, 加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续培养 1 h, 用酶标仪检测每孔在 450 nm 波长处的光密度 (*D*) 值, 以 *D* 值代表细胞活力。

克隆形成实验: 在每个 6.0 cm 培养皿中接种 1×10^3 个 MGC803 细胞, 培养 2 周, 弃培养基, 用 PBS 仔细清洗 2 次, 用 10% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 0.1% 结晶紫溶液染色 15 min, 轻洗干燥后, 在显微镜下观察、计数克隆数。

1.5 Transwell 实验检测 MGC803 细胞的迁移和侵袭能力

收集 各组 MGC803 细胞, 用无血清培养基重悬, 调整细胞密度至 1×10^5 个/mL, 然后, 在每个 Transwell 小室上室中加入 200 μ L 细胞悬液, 置于 24 孔板中, 在下室中加入 600 μ L 完全培养基, 培养 24 h 后, 用棉签轻轻擦除上室内未迁移细胞, 将迁移后的细胞用 95% 乙醇固定 20 min, 用 0.1% 结晶紫溶液染色 10 min, 在倒置显微镜下观察、计数迁移细胞。

对于侵袭试验, 在细胞接种前在 Transwell 小室的膜上涂覆 Matrigel 基质胶, 其他步骤与迁移实验相同。

1.6 流式细胞术检测 各组 MGC803 细胞的凋亡

将 各组 MGC803 细胞洗涤离心, 用结合缓冲液重悬细胞, 调节细胞密度至 1×10^4 个/mL, 依次加入 10 μ L Annexin V-FITC 溶液和 PI 染色后, 将细胞充分混合, 室温避光染色 15 min, 然后用流式细胞仪检测 各组细胞的凋亡率。

1.7 免疫荧光法检测 各组 MGC803 细胞中 GPNMB 表达

用 4% 甲醛溶液固定细胞 15 min, 用 Triton X-100 (0.2%) 透化细胞膜 30 min, 室温下用封闭液处理 1 h, 加入 GPNMB 一抗 (1:500) 4 $^{\circ}$ C 下处理过夜, 荧光标

记二抗室温下反应 1 h, DAPI 复染细胞核 15 min, 最后用共聚焦显微镜观察拍照。结果以平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 表示。

1.8 WB 法检测 各组 MGC803 细胞中 PCNA、MMP-2、GPNMB、cleaved caspase-3 蛋白的表达

用 RIPA 缓冲液裂解提取 各组 MGC803 细胞的总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白质变性后, 用 12% SDS-PAGE 分离, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h, 加入 PCNA (1:1 000 稀释)、MMP-2 (1:1 000 稀释)、GPNMB (1:1 000 稀释)、cleaved caspase-3 (1:50 稀释)、GAPDH (1:1 000 稀释) 一抗 4 $^{\circ}$ C 下处理过夜, HRP 标记二抗 (1:2 000 稀释) 室温下处理 1 h, 最后, 用超敏 ECL 试剂盒显影成像, 以 GAPDH 为内参, 用 ImageJ 软件分析蛋白的相对表达量。

1.9 双荧光素酶报告基因实验验证 circFSCN1 与 miR-429 和 miR-429 与 GPNMB 间的结合关系

将含 miR-429 结合位点的野生型 (WT) 和突变型 (MUT) circFSCN1 和 GPNMB 序列克隆到 pmiRGLO 载体中, 与 miR-429 mimic 和 mimic NC 共转染至 MGC803 细胞中, 转染 48 h 后用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测 各组细胞的荧光素酶活性。

1.10 RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP)

按说明书以蛋白 A/G 琼脂糖珠进行 RIP 实验。简言之, 将 circFSCN1-WT 或 circFSCN1-MUT, miR-429 mimic 或 mimic NC, GPNMB-WT 或 GPNMB-MUT 共转染 MGC803 细胞。转染 48 h 后收获细胞, 用 NP-40 裂解缓冲液裂解。离心后, 上清液与人 AGO2 抗体共孵育。蛋白 A/G 琼脂糖珠与 AGO2 抗体结合 3 h, 然后从免疫复合物中提取 RNA, 免疫沉淀的 RNA 用于 qRT-PCR 分析。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 25.0 分析处理数据。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, GC 组织和癌旁组织中的数据比较采用配对 *t* 检验, 其余组间比较采用单因素方

差分析,两两比较行 SNK-q 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

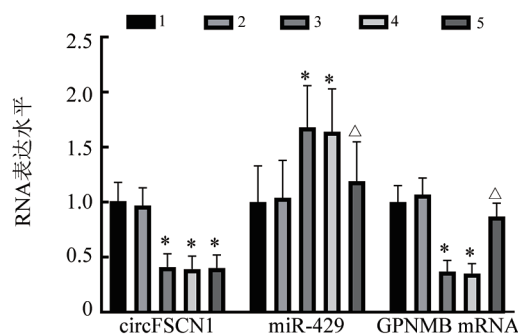
2 结果

2.1 胃癌组织中 circFSCN1 和 GPNMB mRNA 呈高表达、miR-429 呈低表达

qPCR 法检测结果显示,与癌旁组织相比,胃癌组织中 circFSCN1 (1.59 ± 0.29 vs 1.00 ± 0.24)、GPNMB (1.82 ± 0.36 vs 0.99 ± 0.32) mRNA 均呈高表达(均 $P < 0.05$),miR-429 表达呈低表达(0.45 ± 0.14 vs 1.02 ± 0.16 , $P < 0.05$)。

2.2 敲减 circFSCN1 可促进 miR-429 表达,抑制 GPNMB mRNA 表达,抑制 miR-429 则可促进 GPNMB mRNA 表达

qPCR 法检测结果(图1)显示,与对照组、sh-NC 组相比,sh-circFSCN1 组 MGC803 细胞中 circFSCN1 和 GPNMB mRNA 表达均明显降低(均 $P < 0.05$),miR-429 表达明显升高($P < 0.05$);与 sh-circFSCN1 组、sh-circFSCN1 + anti-NC 组相比,sh-circFSCN1 + anti-miR-429 组 MGC803 细胞中 GPNMB mRNA 表达明显升高($P < 0.05$),miR-429 表达明显降低($P < 0.05$)。结果说明,敲减 circFSCN1 促进 miR-429 表达,抑制 GPNMB mRNA 表达,抑制 miR-429 则可促进 GPNMB mRNA 表达,提示 FSCN1 可海绵化 miR-429,而 miR-429 则抑制 GPNMB mRNA 表达。

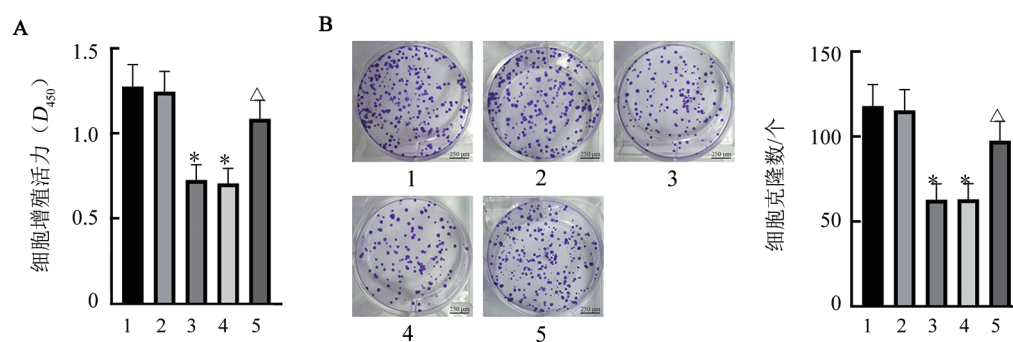


1:对照组;2:sh-NC组;3:sh-circFSCN1组;4:sh-circFSCN1 + anti-NC组;5:sh-circFSCN1 + anti-miR-429组。与对照或sh-NC组比较,* $P < 0.05$,与sh-circFSCN1 + anti-NC组比较,Δ $P < 0.05$ 。

图1 敲减 circFSCN1 对 MGC803 细胞中 CircFSCN1、miR-429、GPNMB mRNA 表达的影响

2.3 敲减 circFSCN1 可抑制 MGC803 细胞的增殖能力,抑制 miR-429 则可增强其增殖活力

CCK-8 法和克隆形成实验检测结果(图2)显示,与对照组、sh-NC 组比较,sh-circFSCN1 组 MGC803 细胞的增殖活力和克隆数均明显降低(均 $P < 0.05$);与 sh-circFSCN1 组、sh-circFSCN1 + anti-NC 组比较,sh-circFSCN1 + anti-miR-429 组 MGC803 细胞的活力和克隆形成数均明显升高(均 $P < 0.05$)。实验结果说明,敲减 FSCN1 可抑制 MGC803 细胞的增殖能力,抑制 miR-429 则可增强其增殖活力。



1:对照组;2:sh-NC组;3:sh-circFSCN1组;4:sh-circFSCN1 + anti-NC组;5:sh-circFSCN1 + anti-miR-429组。与对照或sh-NC组比较,* $P < 0.05$,与sh-circFSCN1 + anti-NC组比较,Δ $P < 0.05$ 。

图2 敲减 circFSCN1 对 MGC803 细胞增殖的影响

2.4 敲减 circFSCN1 可抑制 MGC803 细胞的迁移和侵袭能力,抑制 miR-429 则可增强其迁移和侵袭活力

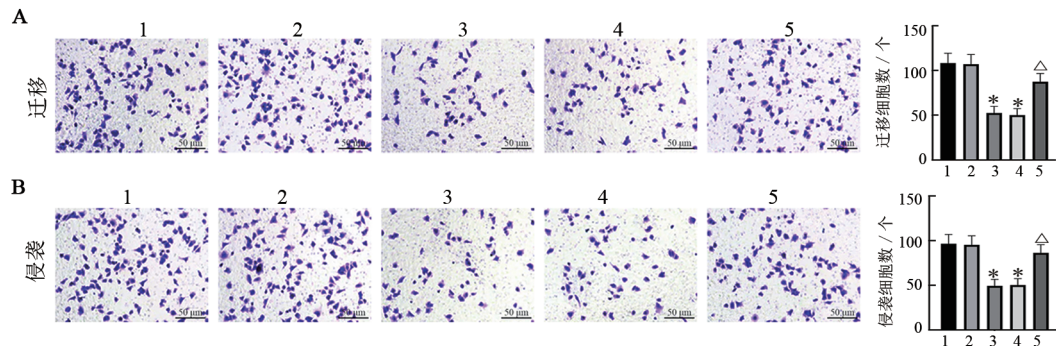
Transwell 实验检测结果(图3)显示,与对照组、sh-NC 组比较,sh-circFSCN1 组 MGC803 细胞的迁移、侵袭数均明显减少(均 $P < 0.05$);与 sh-circFSCN1 组、sh-circFSCN1 + anti-NC 组比较,sh-circFSCN1 + anti-miR-429 组 MGC803 细胞的迁移和侵袭数均明

显增多(均 $P < 0.05$)。实验结果说明,敲减 FSCN1 可抑制 MGC803 细胞的迁移和侵袭能力,抑制 miR-429 则可增强其迁移和侵袭活力。

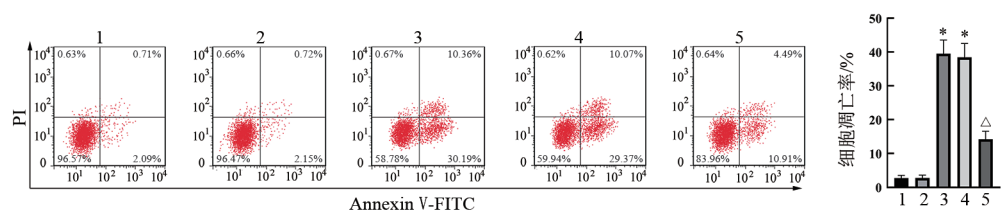
2.5 敲减 circFSCN1 可促进 MGC803 细胞凋亡,抑制 miR-429 则可抑制其凋亡

流式细胞术检测结果(图4)显示,与对照组和 sh-NC 组比较,sh-circFSCN1 组 MGC803 细胞的调

亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与 sh-circFSCN1 组或 sh-circFSCN1 + anti-NC 组相比, sh-circFSCN1 + anti-miR-429 组 MGC803 细胞的凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。实验结果说明, 敲减 circFSCN1 可促进 MGC803 细胞凋亡, 抑制 miR-429 则可抑制其凋亡。



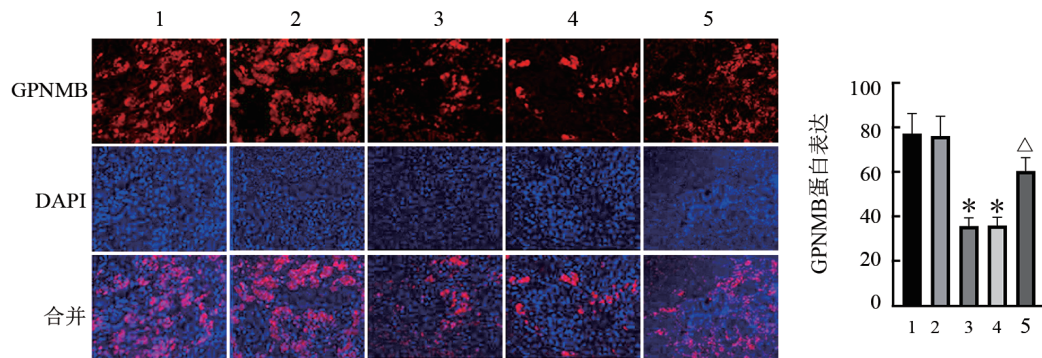
1: 对照组; 2: sh-NC 组; 3: sh-circFSCN1 组; 4: sh-circFSCN1 + anti-NC 组; 5: sh-circFSCN1 + anti-miR-429 组。与对照或 sh-NC 组比较, * $P < 0.05$, 与 sh-circFSCN1 + anti-NC 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。
图3 敲减 circFSCN1 对 MGC803 细胞迁移、侵袭能力的影响



1: 对照组; 2: sh-NC 组; 3: sh-circFSCN1 组; 4: sh-circFSCN1 + anti-NC 组; 5: sh-circFSCN1 + anti-miR-429 组。与对照或 sh-NC 组比较, * $P < 0.05$, 与 sh-circFSCN1 + anti-NC 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。
图4 敲减 circFSCN1 对 MGC803 细胞凋亡的影响

2.6 敲减 circFSCN1 可抑制 MGC803 细胞中 GPNMB 蛋白的表达, 抑制 miR-429 则可促进其表达
免疫荧光法检测结果 (图 5) 显示, 与对照组或 sh-NC 组比较, sh-circFSCN1 组 MGC803 细胞中

GPNMB 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与 sh-circFSCN1 组、sh-circFSCN1 + anti-NC 组相比, sh-circFSCN1 + anti-miR-429 组 MGC803 细胞中 GPNMB 表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。



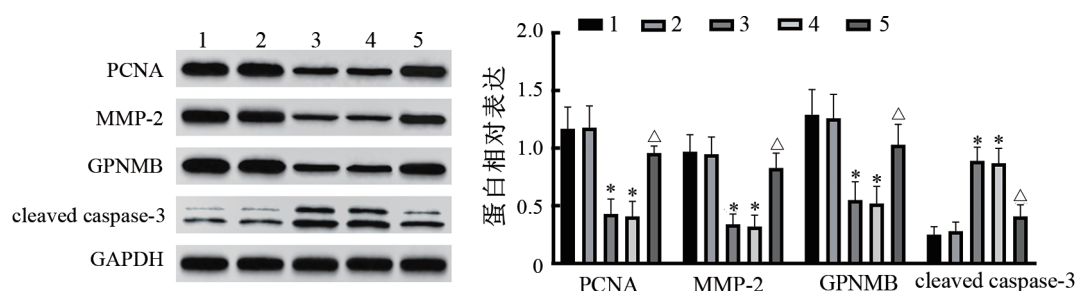
1: 对照组; 2: sh-NC 组; 3: sh-circFSCN1 组; 4: sh-circFSCN1 + anti-NC 组; 5: sh-circFSCN1 + anti-miR-429 组。与对照或 sh-NC 组比较, * $P < 0.05$, 与 sh-circFSCN1 + anti-NC 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。
图5 敲减 circFSCN1 对 MGC803 细胞 GPNMB 表达的影响

2.7 敲减 circFSCN1 可抑制 MGC803 细胞中 PCNA、MMP-2 和 GPNMB 蛋白表达, 抑制 cleaved-caspase-3

蛋白表达, 抑制 miR-429 的作用与之相反
WB 法检测结果 (图 6) 显示, 与对照组或 sh-NC

组比较, sh-circFSCN1 组 MGC803 细胞中 PCNA、MMP-2、GPNMB 蛋白表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$), cleaved-caspase-3 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$); 与 sh-circFSCN1 组、sh-circFSCN1 + anti-NC 组相比, sh-circFSCN1 + anti-miR-429 组 MGC803 细胞中 PCNA、MMP-2、GPNMB 蛋白表达水平均明

显升高(均 $P < 0.05$), cleaved-caspase-3 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。结果说明, 敲减 circFSCN1 可抑制 MGC803 细胞中 PCNA、MMP-2 和 GPNMB 蛋白表达, 抑制 cleaved-caspase-3 蛋白表达, 抑制 miR-429 的作用与之相反。



1: 对照组; 2: sh-NC 组; 3: sh-circFSCN1 组; 4: sh-circFSCN1 + anti-NC 组; 5: sh-circFSCN1 + anti-miR-429 组。与对照或 sh-NC 组比较, * $P < 0.05$, 与 sh-circFSCN1 + anti-NC 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

图6 敲减 circFSCN1 对 MGC803 细胞 PCNA、MMP-2、GPNMB 和 cleaved caspase-3 蛋白表达的影响

2.8 circFSCN1 与 miR-429 和 miR-429 与 GPNMB mRNA 之间存在靶向结合负向调控关系

Starbase 网站数据分析结果(图 7A、B)显示, circFSCN1 与 miR-429 和 miR-429 与 GPNMB 之间存在结合位点。双萤光素酶报告基因实验检测结果(图 7C)显示, 与 circFSCN1-WT + mimic-NC 组比较, circFSCN1-WT + miR-429 mimic 组 MGC803 细胞中萤光素酶活性明显降低($P < 0.05$), 与 circFSCN1-MUT + mimic-NC 组比较, circFSCN1-MUT + miR-429 mimic 组 MGC803 细胞中萤光素酶活性无明显变化; 与 GPNMB-WT + mimic-NC 比较, GPNMB-WT + miR-429 mimic 组 MGC803 细胞的萤光素酶活性降低($P < 0.05$), 与 GPNMB-MUT + mimic-NC 比较, GPNMB-MUT + miR-429 mimic 组 MGC803 细胞的萤光素酶活性无明显变化。AGO2 是 RISC 复合物的关键组分, 抗 AGO2 抗体可下拉 circFSCN1-WT 和 GPNMB-WT 结合的 miR-375(图 7D、E)。实验结果说明, circFSCN1 与 miR-429 和 miR-429 与 GPNMB mRNA 之间存在结合调控关系。

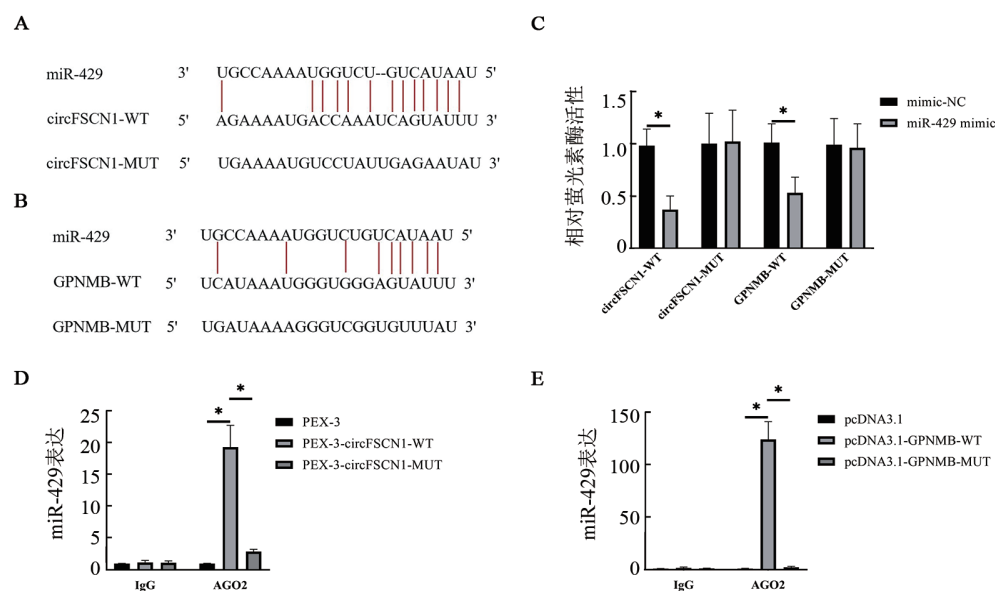
3 讨论

胃癌发病率在老年人中迅速增加, 在年轻人中, FSCN1 的表达与老年人不同, 高于正常胃黏膜及癌组织邻近组织, 其高表达与胃癌患者预后不良有关并随着癌细胞分化程度的降低而升高, 过表达 FSCN1 可促进胃癌细胞迁移、EMT 标志物和转录因子的表达, 以及异种移植肿瘤形成^[14-16]。circFSCN1 是由 FSCN1 基因反向剪接形成, 比本体

FSCN1 更稳定。WANG 等^[17]发现, 敲减 circFSCN1 可诱导产生耐受树突状细胞, 以此可防止同种异体免疫排斥反应并延长移植物存活时间。DENG 等^[5]发现, circFSCN1 水平升高是膀胱癌患者预后的独立危险因素, circFSCN1 主要定位于细胞质, 通过海绵化 miR-145-5p 增强 MDM2 介导的 p53 沉默, 从而诱导膀胱癌的发生发展和上皮间质转化。本的高峰^[9]。胃癌发生是一个循序渐进的过程, 在环境和遗传的协同作用下, 个体首先发生胃黏膜萎缩或肠化生, 然后是致癌分子积累, 细胞非典型性程度增加, 最终发生胃癌^[10]。由于缺乏高灵敏度和特异性的诊断方法, 大多数患者被诊断时胃癌已经发展到晚期, 失去手术治疗的最好时间。筛选出非侵入性肿瘤标志物对于早期发现癌症、评估个体癌症发生风险从而降低胃癌病死率至关重要^[11]。然而, 胃癌发展的机制尚不完全清楚, 需要进一步研究阐明其发病机制和潜在的分子靶点。

在肿瘤生物学中, circRNA 已被视为新型临床生物标志物和潜在治疗靶点^[12]。FSCN1 在胚胎发育过程中广泛表达, 支持各种细胞结构, 包括微绒毛、丝伪足、板状伪足和其他基于肌动蛋白的质膜下突起, 对于细胞迁移和细胞基质黏附等过程非常重要, 是多种肿瘤发生过程中的致癌基因^[13]。本研究发现 FSCN1 在胃癌细胞及组织中高表达, circFSCN1 在胃癌组织中高表达, 敲减 circFSCN1 抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭, 促进凋亡, 且增殖蛋白 PCNA、迁移侵袭蛋白 MMP-2 表达下调, 凋亡蛋白 cleaved caspase-3 表达上调, 提示敲减 circFSCN1 可能通过调

节相关蛋白表达抑制胃癌细胞的恶性生物学行为, 进而抑制胃癌的发生发展。



A: circFSCN1与miR-429的结合位点; B: miR-429与GPNMB的结合位点; C: 双萤光素酶报告基因实验检测结果; D: RIP实验验证circFSCN1与miR-429的结合; E: RIP实验用于验证miR-429和GPNMB的结合。* $P < 0.05$ 。

图7 双萤光素酶报告基因和RIP实验验证circ-FSCN1与miR-429和miR-429与GPNMB mRNA的结合关系

circRNA、miRNA及长链非编码RNA(lncRNA)等被视为细胞间通信的介质, circRNA、lncRNA可海绵化miRNA,以调节胃癌的发生发展^[18]。MU等^[19]发现, HIF1A-AS2作为癌基因经调节miR-429/PD-L1轴促进胃癌细胞的增殖和转移,抑制miR-429可逆转敲减HIF1A-AS2对胃癌细胞的影响。HANG等^[20]发现, miR-429在胃癌细胞中表达下调, linc00641抑制了miR-429的表达,随后上调了胃癌细胞中Notch-1的表达。YANG等^[21]发现, miR-429在胃癌中低表达, circ-0007707/miR-429/PDGFD通路干扰肿瘤微环境,促进胃癌的发生发展和预后不良。WAN等^[22]发现, circ_0003789通过miR-429/ZFP36L2轴调控胃癌的肿瘤进展。本研究发现, miR-429在胃癌组织中呈低表达,此外, circFSCN1可与miR-429直接结合并靶向负调控miR-429,敲减circFSCN1导致miR-429显著高表达,而抑制miR-429则逆转敲减circFSCN1对胃癌恶性生物学行为的抑制作用,提示circFSCN1可能通过海绵化miR-429调控胃癌细胞的恶性生物学行为。

miRNA通过与靶基因的3'UTR区域结合来调节靶基因的表达,从而发挥多种生物学功能^[6]。GPNMB与黑色素瘤、胶质瘤、三阴性乳腺癌等多种癌症的恶性进展有关,其高表达是这些癌症预后不良的重要因素^[23]。ZHAI等^[24]发现,发生骨转移的肾细胞癌患者GPNMB显著高表达,敲减GPNMB可通过抑制ERK信号通路进而抑制肾细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭。MENG等^[25]发现, GPNMB Gal-3实

质细胞是肝细胞癌中免疫抑制微环境的主要亚群,通过促进免疫抑制,导致肝细胞癌进展。研究发现, GPNMB在胃癌患者血浆中高表达,沉默CSE1L通过正向调节转录因子MITF抑制GPNMB的表达,进而抑制胃癌肿瘤的生长和转移^[26-27]。本研究发现, GPNMB在胃癌组织中呈高表达,与FENG等^[26]研究结果一致,且敲减circFSCN1导致GPNMB表达显著降低,而抑制miR-429则导致GPNMB高表达,且miR-429可以靶向结合并负调控GPNMB,提示敲减circFSCN1通过调节miR-429/GPNMB轴抑制胃癌细胞的恶性生物学行为。

综上所述,敲减circFSCN1可以抑制胃癌细胞的恶性生物学行为,其机制可能与miR-429/GPNMB轴调控相关。本研究结果为开发胃癌治疗策略提供线索。

[参考文献]

- [1] SUN H, WANG X, WANG X, *et al.* The role of cancer-associated fibroblasts in tumorigenesis of gastric cancer[J/OL]. Cell Death Dis, 2022, 13(10): 874[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36244987/>. DOI: 10.1038/s41419-022-05320-8.
- [2] JIANG T L, XIA Y W, LV J L, *et al.* A novel protein encoded by circMAPK1 inhibits progression of gastric cancer by suppressing activation of MAPK signaling[J/OL]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 66[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33836754/>. DOI: 10.1186/s12943-021-01358-y.
- [3] CHUNG M W, PARK Y L, PARK S Y, *et al.* Expression of ADAM12 in

- gastric cancer and its relation to tumor cell behavior and prognosis[J]. *In Vivo*, 2022, 36(5): 2194-2204. DOI: 10.21873/in vivo.12945.
- [4] PENG Y, XU Y D, ZHANG X J, *et al.* A novel protein AXIN1-295aa encoded by circAXIN1 activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote gastric cancer progression[J/OL]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 158[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34863211/>. DOI: 10.1186/s12943-021-01457-w.
- [5] DENG W, CHEN R, XIONG S T, *et al.* CircFSCN1 induces tumor progression and triggers epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer through augmentation of MDM2-mediated p53 silencing[J/OL]. *Cell Signal*, 2024, 114: 110982[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37981069/>. DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110982.
- [6] FU Z J, XU Y Q, CHEN Y, *et al.* Construction of miRNA-mRNA-TF regulatory network for diagnosis of gastric cancer[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 9121478[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34840985/>. DOI: 10.1155/2021/9121478.
- [7] GUO C M, LIU S Q, SUN M Z. miR-429 as biomarker for diagnosis, treatment and prognosis of cancers and its potential action mechanisms: a systematic literature review[J]. *Neoplasma*, 2020, 67(2): 215-228. DOI: 10.4149/neo_2019_190401N282.
- [8] REN F F, ZHAO Q T, LIU B, *et al.* Transcriptome analysis reveals GPNMB as a potential therapeutic target for gastric cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(3): 2738-2752. DOI: 10.1002/jcp.29177.
- [9] KIM J, PARK C, KIM K H, *et al.* Single-cell analysis of gastric pre-cancerous and cancer lesions reveals cell lineage diversity and intratumoral heterogeneity[J/OL]. *NPJ Precis Oncol*, 2022, 6(1): 9[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35087207/>. DOI: 10.1038/s41698-022-00251-1.
- [10] LI Y Z, LIU A R, LIU S Y, *et al.* Involvement of CXCL17 and GPR35 in gastric cancer initiation and progression[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 615[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36614059/>. DOI: 10.3390/ijms24010615.
- [11] LI J, XUE H Z, XIANG Z, *et al.* Genetic profiles affect the biological effects of serine on gastric cancer cells[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1183[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32848786/>. DOI: 10.3389/fphar.2020.01183.
- [12] WANG Y X, ZHANG J B, CHEN X C, *et al.* Circ_0001023 promotes proliferation and metastasis of gastric cancer cells through miR-409-3p/PHF10 axis[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 4533-4544. DOI: 10.2147/OTT.S244358.
- [13] LI Z X, SHI J, ZHANG N N, *et al.* FSCN1 acts as a promising therapeutic target in the blockade of tumor cell motility: a review of its function, mechanism, and clinical significance[J]. *J Cancer*, 2022, 13(8): 2528-2539. DOI: 10.7150/jca.67977.
- [14] 于斌, 朱蔚远, 彭文斌, 等. FSCN1 蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2022, 27(5): 571-575.
- [15] 潘菊花, 刘炳辉, 陈灵斌, 等. ADP 核糖基化因子的 GTP 酶激活蛋白 1、肌动蛋白束蛋白 1 在胃癌组织中的表达及与患者预后的关系[J]. *中国卫生检验杂志*, 2023, 33(8): 967-971, 975.
- [16] WANG G H, GU Y H, LU W Q, *et al.* Fascin1 promotes gastric cancer progression by facilitating cell migration and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(9): 1362-1369. DOI: 10.1016/j.prp.2018.06.018.
- [17] WANG B W, ZHOU Q F, LI T, *et al.* Preventing alloimmune rejection using circular RNA FSCN1-silenced dendritic cells in heart transplantation[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2021, 40(7): 584-594. DOI: 10.1016/j.healun.2021.03.025.
- [18] XU Q, JIA X Y, WU Q, *et al.* Esomeprazole affects the proliferation, metastasis, apoptosis and chemosensitivity of gastric cancer cells by regulating lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA CeRNA networks[J/OL]. *Oncol Lett*, 2020, 20(6): 329[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33101498/>. DOI: 10.3892/ol.2020.12193.
- [19] MU L S, WANG Y L, SU H L, *et al.* HIF1A-AS2 promotes the proliferation and metastasis of gastric cancer cells through miR-429/PD-L1 axis[J]. *Dig Dis Sci*, 2021, 66(12): 4314-4325. DOI: 10.1007/s10620-020-06819-w.
- [20] HANG Q, LU J, ZUO L G, *et al.* Linc00641 promotes the progression of gastric carcinoma by modulating the miR-429/Notch-1 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(6): 8497-8509. DOI: 10.18632/aging.202661.
- [21] YANG Y, KANG W B, YUAN Y, *et al.* circ-0007707/miR-429/PDGF pathway regulates the progression of gastric cancer by modulating the immune-gene signature[J/OL]. *J Oncol*, 2022, 2022: 2214686[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35509844/>. DOI: 10.1155/2022/2214686.
- [22] WAN L, JIA Y, CHEN N, *et al.* Circ_0003789 knockdown inhibits tumor progression by miR-429/ZFP36L2 axis in gastric cancer[J]. *Biochem Genet*, 2024, 62(4): 2504-2521. DOI: 10.1007/s10528-023-10535-1.
- [23] MANEVICH L, OKITA Y, OKANO Y, *et al.* Glycoprotein NMB promotes tumor formation and malignant progression of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(9): 3244-3254. DOI: 10.1111/cas.15359.
- [24] ZHAI J P, LIU Z H, WANG H D, *et al.* GPNMB overexpression is associated with extensive bone metastasis and poor prognosis in renal cell carcinoma[J/OL]. *Oncol Lett*, 2022, 23(1): 36[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34966452/>. DOI: 10.3892/ol.2021.13154.
- [25] MENG Y, ZHAO Q D, SANG Y, *et al.* GPNMB⁺ Gal-3⁺ hepatic parenchymal cells promote immunosuppression and hepatocellular carcinogenesis[J/OL]. *EMBO J*, 2023, 42(24): e114060[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38009297/>. DOI: 10.15252/embj.2023114060.
- [26] FENG T, JIE M W, DENG K, *et al.* Targeted plasma proteomic analysis uncovers a high-performance biomarker panel for early diagnosis of gastric cancer[J/OL]. *Clin Chim Acta*, 2024, 558: 119675[2025-05-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38631604/>. DOI: 10.1016/j.cca.2024.119675.
- [27] LI Y J, YUAN S S, LIU J M, *et al.* CSE1L silence inhibits the growth and metastasis in gastric cancer by repressing GPNMB via positively regulating transcription factor MITF[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(3): 2071-2079. DOI: 10.1002/jcp.29107.

[收稿日期] 2025-02-21

[修回日期] 2025-07-02

[本文编辑] 向正华