

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.06.007

· 基础研究 ·

hsa_circ_0034762通过miR-17-3p调控自噬参与舌鳞状细胞癌CAL27-res细胞顺铂耐药

方松城¹,高晓琳²,孙文豪³,谢舒乐³,程慧琳³(1. 东莞东华医院 口腔科,广东 东莞 523110;2. 广州市海珠区口腔医院 口腔科,广东 广州 510220;3. 中山大学孙逸仙纪念医院 口腔科,广东 广州 510030)

[摘要] **目的:**探究环状RNA(circRNA)调控舌鳞状细胞癌(TSCC)顺铂(CDDP)耐药的机制。**方法:**本研究以TSCC化疗敏感CAL27细胞与耐药CAL27-res细胞为研究对象,RT-qPCR检测两种细胞内hsa_circ_0034762的表达量差异,流式细胞术检测细胞凋亡率,Western blotting检测自噬相关蛋白p62及LC3-II/LC3-I比值,透射电镜观察自噬小体的数量,双萤光素酶报告实验检测hsa_circ_0034762与miR-17-3p的结合关系,荧光原位杂交实验检测二者在细胞中的共定位,敲低hsa_circ_0034762联合抑制miR-17-3p进行功能回复实验。**结果:**相比亲本化疗敏感细胞,TSCC耐药细胞CAL27-res自噬水平显著提升,表现为自噬小体数量增加、LC3-II/LC3-I比值升高及p62蛋白表达降低。hsa_circ_0034762在TSCC耐药组织及CAL27-res细胞中高表达。敲低hsa_circ_0034762后,CAL27-res细胞凋亡率升高,自噬小体数量减少,p62蛋白表达增加,LC3-II/LC3-I比值降低(均 $P < 0.05$)。双萤光素酶报告实验与荧光原位杂交实验发现hsa_circ_0034762与miR-17-3p存在靶向结合作用。抑制miR-17-3p可部分逆转hsa_circ_0034762敲低所致的促凋亡及抑制自噬效应。**结论:**hsa_circ_0034762在TSCC耐药细胞及组织中高表达。敲低hsa_circ_0034762可能通过miR-17-3p抑制细胞自噬并促进细胞凋亡,从而降低TSCC细胞的化疗耐药性。

[关键词] 舌鳞状细胞癌;环状RNA;miR-17-3p;化疗耐药;自噬

[中图分类号] R739.8;R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)06-0651-10

hsa_circ_0034762 contributes to cisplatin resistance in tongue squamous cell carcinoma CAL27-res cells via miR-17-3p-mediated regulation of autophagy

FANG Songcheng¹, GAO Xiaolin², SUN Wenhao³, XIE Shule³, CHENG Huilin³ (1. Department of Stomatology, Dongguan Tungwah Hospital, Dongguan 523110, Guangdong, China; 2. Department of Stomatology, Haizhu District Stomatological Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510220, Guangdong, China; 3. Department of Stomatology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510030, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the mechanism by which circular RNA (circRNA) regulates cisplatin (CDDP) resistance in tongue squamous cell carcinoma (TSCC). **Methods:** Chemosensitive and chemoresistant TSCC cells were used in this study. The differential expression of hsa_circ_0034762 in CAL27 and CAL27-res cells was detected by RT-qPCR. Cell apoptosis was evaluated by flow cytometry, and the autophagy-related protein p62, the LC3-II/LC3-I ratio were determined by Western blotting. The number of autophagosomes was observed by transmission electron microscopy (TEM). The targeting relationship between hsa_circ_0034762 and miR-17-3p was verified using a dual-luciferase reporter assay, and their co-localization in cells was detected by fluorescence in situ hybridization (FISH). Functional rescue experiments were performed by knocking down hsa_circ_0034762 alone or in combination with miR-17-3p inhibition. **Results:** Compared with parental chemosensitive cells, CAL27-res cells displayed significantly increased autophagy, as evidenced by an increased number of autophagosomes, an elevated LC3-II/LC3-I ratio, and decreased p62 protein expression. hsa_circ_0034762 was highly expressed in both chemoresistant TSCC tissues and CAL27-res cells. Knockdown of hsa_circ_0034762 significantly increased the apoptosis rate of CAL27-res cells, reduced the number of autophagosomes, upregulated p62 expression, and decreased the LC3-II/LC3-I ratio (all $P < 0.05$). Dual-luciferase reporter and FISH assays confirmed the targeted binding between hsa_circ_0034762 and miR-17-3p. Inhibition of miR-17-3p partially reversed the pro-apoptotic and autophagy-suppressive effects induced by hsa_circ_0034762 knockdown. **Conclusion:** hsa_circ_0034762 is overexpressed in chemoresistant TSCC tissues and cells. Knockdown of hsa_circ_0034762 suppresses autophagy and promotes apoptosis through miR-17-3p-mediated

[基金项目] 国家自然科学基金(81903045)

[作者简介] 方松城,男,本科,副主任医师

[通信作者] 程慧琳(扫码获取作者通信方式)



regulation, thereby reducing the chemoresistance of TSCC cells.

[Key words] tongue squamous cell carcinoma (TSCC); circular RNA (circRNA); miR-17-3p; chemoresistance; autophagy

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(6): 651-660. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.06.007]

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是常见的口腔恶性肿瘤之一,占口腔恶性肿瘤的85%~90%,与吸烟、饮酒、嚼槟榔等不良行为密切相关,具有高度恶性、转移性和侵袭性的特点,且预后不良^[1]。化疗是TSCC综合治疗中的关键环节,但化疗耐药常导致治疗失败^[2-3]。因此,探索化疗耐药的调控机制具有重要意义。近年来,研究^[4]发现,非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)与肿瘤化疗耐药密切相关。环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类新发现的ncRNA,在多种肿瘤中不仅表达异常,而且参与调控肿瘤化疗耐药^[5]。研究^[6]发现, circSEC24B可以促进去泛素化酶OTUB1与SRPX2蛋白结合,进而激活自噬并诱导化疗耐药; circ_ARHGEF28与MST1/2蛋白相互作用、抑制Hippo通路活性,从而促进卵巢癌顺铂(cisplatin, CDDP)耐药^[7]。然而, circRNA在TSCC化疗耐药中的作用机制尚不清楚。

自噬是一种进化保守的细胞过程,受多种应激信号调控,可促使肿瘤细胞产生化疗耐药^[8-9]。自噬活化过程中,LC3-I可经脂质化修饰转化为膜结合形式LC3-II,而p62作为自噬底物可被持续降解,因此LC3-II/LC3-I比值升高和p62表达降低常被作为评价自噬活性增强的重要指标^[10-11]。现有研究^[12]表明,异常激活的自噬能够削弱化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用,从而延长其存活时间。值得注意的是, ncRNA可通过调控自噬相关通路降低肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,提示ncRNA-自噬轴可能是肿瘤化疗耐药的重要调控机制^[13-15]。然而, circRNA是否通过自噬途径调控TSCC化疗耐药尚不清楚。

本研究前期通过circRNA表达谱分析比较TSCC化疗敏感细胞CAL27与化疗耐药细胞CAL27-res中circRNA的差异表达情况,筛选出在化疗耐药细胞中显著上调的hsa_circ_0034762。RT-qPCR验证结果进一步显示, hsa_circ_0034762在TSCC化疗耐药组织及CAL27-res细胞中高表达,提示其可能参与TSCC化疗耐药的调控。基于此,本研究以hsa_circ_0034762为研究对象,分析其在TSCC化疗耐药细胞中的表达特征,并通过敲低hsa_circ_0034762检测其对CAL27-res细胞凋亡、自噬及化疗耐药表型的影响。同时,结合生物信息学预测、荧光原位杂交实验、双萤光素酶报告实验及miR-17-3p功能回复实验,进一步探讨hsa_circ_0034762/miR-17-3p轴调控自噬并影响TSCC化疗耐药的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2021年9月至2023年9月于东莞东华医院和中山大学孙逸仙纪念医院就诊的40例晚期TSCC患者手术标本及临床资料。病例纳入标准:(1)经病理组织学确诊为舌鳞状细胞癌;(2)临床分期为III或IV期;(3)术前均接受2个疗程多西他赛+CDDP+氟尿嘧啶方案(TPF)的新辅助化疗;(4)完整手术标本于-80℃保存以防止降解。病例排除标准:(1)术前接受过放疗;(2)组织标本中肿瘤细胞含量<50%;(3)患有严重免疫系统疾病或全身感染。参照RECIST 1.1标准评价疗效,将完全缓解或部分缓解者归为CDDP敏感组,疾病稳定或疾病进展者归为CDDP耐药组;其中CDDP敏感组20例,CDDP耐药组20例。手术标本置于-80℃保存,用于后续RT-qPCR检测。本研究获东莞东华医院和中山大学孙逸仙纪念医院医学伦理委员会审核批准(DHKY-2025-025-01和SYSKY-2025-518-01),且患者及家属均签署知情同意书。

1.2 细胞及主要试剂

人TSCC细胞CAL27购自南京科佰生物科技有限公司,CDDP诱导耐药细胞CAL27-res由中山大学孙逸仙纪念医院团队惠赠,DMEM、TRIzol试剂、Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒及实时荧光定量试剂盒购自日本TaKaRa公司,双萤光素酶活性检测试剂盒购自南京陌凡生物科技有限公司,兔抗人SQSTM1/p62单克隆抗体和兔抗人LC3-I/II单克隆抗体购自美国CST公司,β-actin鼠单克隆抗体、HRP标记的羊抗兔IgG二抗和HRP标记的羊抗鼠IgG二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司,RIPA裂解液和BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,ECL化学发光液购自美国Thermo Fisher公司。miR-17-3p mimics、mimic NC、miR-17-3p inhibitor、inhibitor NC及3种siRNA均购自广州市锐博生物科技有限公司,胎牛血清购自上海吉泰依科赛生物科技有限公司,pRL-TK和野生型hsa_circ_0034762质粒购自上海吉玛生物公司,FITC标记的miR-17-3p探针与Cy3标记的hsa_circ_0034762探针均购自广州市外显子生物技术有限公司。

1.3 细胞培养、转染及分组

CAL27细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM

培养基中, CDDP 耐药细胞 CAL27-res 培养于含 10 $\mu\text{mol/L}$ CDDP、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基内, 所有细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中常规培养。

将 CAL27-res 细胞接种于 6 孔板, 培养 24 h 待细胞汇合度达 40%~50% 时进行转染。根据不同实验目的设置相应转染分组。用于 hsa_circ_0034762 敲低实验的分组包括 si-NC 组、si-hsa_circ_0034762-1 组

和 si-hsa_circ_0034762-2 组。用于双萤光素酶报告实验的分组包括 miR-NC mimics 组和 miR-17-3p mimics 组。用于功能回复实验的分组包括 si-NC 组、si-hsa_circ_0034762 组和 si-hsa_circ_0034762 + miR-17-3p inhibitor 组。按照 Lipofectamine 2000 说明书进行转染, 转染 6 h 后更换完全培养基, 继续培养 24 h 收集细胞。所用 siRNA、miR-17-3p mimics/inhibitor 及阴性对照序列见表 1。

表1 siRNA 及 miRNA 的靶序列信息

序列名称	极性	序列详情(5'→3')
si-hsa_circ_0034762-1(si-circ-1)	正义链	GAGCUGAGGGUGUGUGGUUGU
	反义链	ACAACCACACACCCUCAGCUC
si-hsa_circ_0034762-2(si-circ-2)	正义链	CUGAGGGUGUGUGGUUGUGUU
	反义链	AACACAACCACACACCCUCAG
si-hsa_circ_0034762-NC(si-NC)	正义链	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反义链	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
miR-17-3p mimics	正义链	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG
miR-NC	正义链	CAGUACUUUUGUGUAGUACAA
miR-17-3p inhibitor	正义链	CUACAAGUGCCUUCACUGCAGU
inhibitor-NC	正义链	CAGUACUUUUGUGUAGUACAA

1.4 circRNA 表达谱分析与 miRNA 靶点预测

收集对数生长期的 CAL27 细胞及 CAL27-res 细胞, 采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 委托上海康成生物工程有限公司进行 circRNA 表达谱分析。经 RNase R 处理去除线性 RNA 并富集 circRNA 后, 采用 Arraystar Human circRNA Array (8 $\times$ 15K) 芯片进行检测。芯片原始图像经 Agilent Feature Extraction 软件提取原始数据后, 采用 R 软件包进行分位数标准化及后续差异表达分析。差异表达 circRNA 的筛选标准为 $|\log_2\text{FC}| \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 。

circRNA/miRNA 相互作用采用 Arraystar 自建 miRNA 靶点预测软件进行预测。该程序基于 TargetScan 和 miRanda 算法, 对差异表达 circRNA 序列中的潜在 miRNA 反应元件 (miRNA response element, MRE) 进行注释, 并构建 circRNA-miRNA 相互作用网络。根据上述预测结果, 筛选到 hsa_circ_0034762 及其潜在结合 miRNA 用于后续实验验证。

1.5 RT-qPCR 检测临床样本及 CAL27、CAL27-res 细胞中 hsa_circ_0034762 的表达水平

使用 TRIzol 试剂提取临床样本、CAL27 细胞或 CAL27-res 细胞的总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA。随后按照 RT-qPCR 试剂盒说明书进行扩增, 以检测 hsa_circ_0034762 的表达情况。RT-qPCR 反应程序为预变性: 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min;

95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s (共 40 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$ 终末延伸 10 min。以 β -actin 为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析目的基因相对表达量。

1.6 MTT 法检测 CDDP 对 CAL27 和 CAL27-res 细胞的 IC₅₀

将对数生长期的 CAL27 和 CAL27-res 细胞以 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔。贴壁培养 24 h 后, 加入不同终浓度的 CDDP 处理, 浓度梯度为 0、2、4、8、16、32、64、90、128、256 $\mu\text{mol/L}$, 继续培养 72 h。每孔加入 10 μL MTT, 培养 4 h, 弃上清液, 加入 150 μL DMSO 振荡 5 min 溶解结晶, 酶标仪检测每孔在 490 nm 处的光密度 (D) 值, 采用非线性回归拟合剂量-反应曲线, 计算 IC_{50} 。

1.7 Western blotting 检测 CAL27 和 CAL27-res 细胞中自噬相关蛋白的表达

RIPA 裂解液收集 CAL27 细胞和 CAL27-res 细胞的总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μg 样品通过 SDS-PAGE 分离蛋白, 转膜后室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入 p62 和 LC3 抗体 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 作用过夜。TBST 洗膜 3 次后, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1:5 000), 加入 ECL 显影液进行曝光。ImageJ 软件对电泳条带进行定量分析。

1.8 流式细胞术检测 CAL27-res 细胞的凋亡率

将收集的 CAL27-res 细胞用 PBS 清洗 2 次, 加

100 μL 缓冲液制成细胞悬液后加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 染液, 避光室温反应 15 min, 流式细胞仪检测 Annexin V 和 PI 阳性细胞比例。FlowJo 软件分析数据, 按照细胞总凋亡率 = 早期凋亡细胞 (Annexin V⁺/PI⁻) + 晚期凋亡细胞 (Annexin V⁺/PI⁺), 计算 CAL27-res 细胞的凋亡率。

1.9 双荧光素酶报告实验检测 CAL27-res 细胞中 hsa_circ_0034762 与 miR-17-3p 的结合关系

根据 miRNA 靶点预测结果, hsa_circ_0034762 序列中存在 2 个潜在 miR-17-3p 结合位点, 分别命名为位点 1 和位点 2。为了明确 miR-17-3p 与 hsa_circ_0034762 的具体结合区域, 本研究构建了 3 种双荧光素酶报告质粒: WT (野生型 hsa_circ_0034762)、Mutant-1 (仅突变位点 1 种子区)、Mutant-2 (仅突变位点 2 种子区), 均采用定点突变技术构建。

将报告质粒 (WT、Mutant-1 或 Mutant-2) 与内参质粒 pRL-TK 按 10:1 的比例混合。依据前述转染方案, 将混合质粒与 miR-17-3p mimics 或其阴性对照 miR-NC mimics 共转染至 CAL27-res 细胞中。转染 48 h 后, 裂解细胞, 检测 Firefly 荧光素酶和 Renilla 荧光素酶的活性。以 Firefly/Renilla 荧光素酶活性比值评估 hsa_circ_0034762 与 miR-17-3p 的结合关系。

1.10 透射电镜观察 CAL27 和 CAL27-res 细胞内的自噬小体

将 CAL27 细胞和 CAL27-res 细胞分别接种至 96 孔板内的蓝宝石基片上, 贴壁后, 用无血清培养基处理 24 h 诱导细胞自噬。弃上清液, PBS 洗涤细胞 3 次, 加入 2.5% 戊二醛, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞 2 h, 再用 1% 锇酸后固定 1 h。梯度乙醇脱水 (各 15 min), 环氧树脂渗透包埋, 60 $^{\circ}\text{C}$ 过夜聚合。聚合后的样品块使用超薄切片机进行切片 (60~80 nm), 醋酸铀和柠檬酸铅对切片进行双重染色, 透射电子显微镜观察细胞内典型双层膜自噬小体结构并拍照记录。

1.11 荧光原位杂交实验检测 CAL27-res 细胞内 miR-17-3p 与 hsa_circ_0034762 的共定位

将 CAL27-res 细胞以 5×10^4 个/孔的密度接种到含细胞爬片的 24 孔板中。待细胞贴壁后, 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 洗涤 3 次后加入 0.5% Triton X-100 冰浴处理 10 min。将 FITC 标记的 miR-17-3p 探针与 Cy3 标记的 hsa_circ_0034762 探针按 1:1 混合, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中与 CAL27-res 细胞杂交过夜。次日, 严格避光洗涤, DAPI 复染细胞核, 封片后于共聚焦荧光显微镜下观察并采集图像。

1.12 统计学处理

使用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析, 统计图表均使用 GraphPad Prism 9.0 软件绘制。所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据比较采用独立样本 *t* 检验, 多组数据比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 视为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CAL27-res 细胞呈现 CDDP 耐药性并伴随自噬活性增强

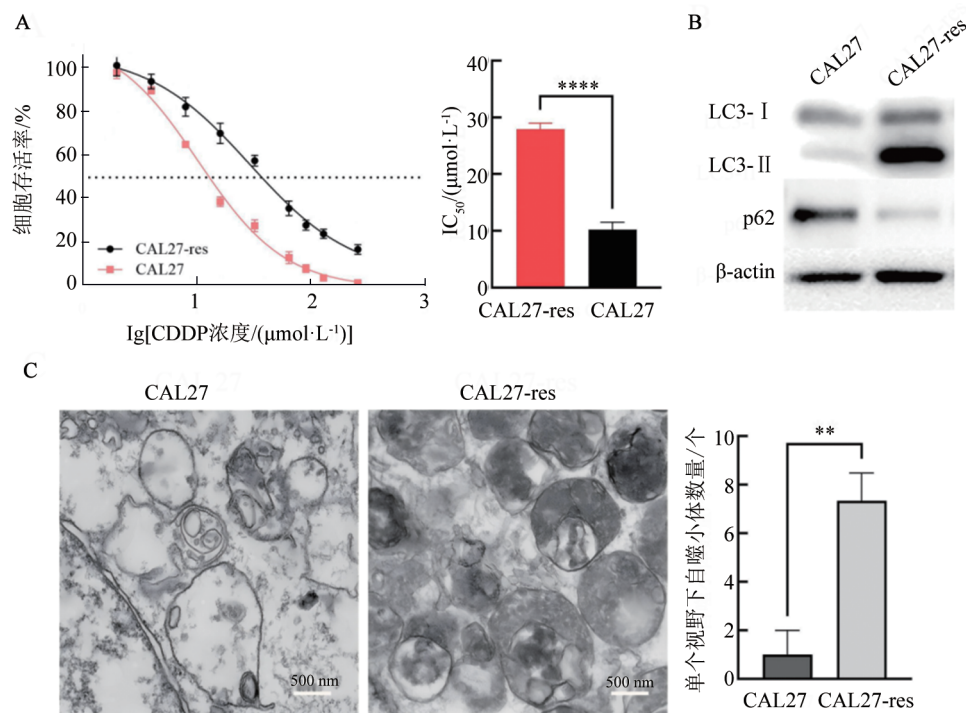
MTT 实验结果 (图 1A) 显示, CAL27 细胞对 CDDP 的 IC_{50} 为 $(10.24 \pm 0.95) \mu\text{mol/L}$, CAL27-res 细胞对 CDDP 的 IC_{50} 为 $(27.92 \pm 1.768) \mu\text{mol/L}$; 与 CAL27 细胞相比, CAL27-res 细胞的耐药性显著提高 ($P < 0.0001$)。Western blotting 检测结果 (图 1B) 显示, 与 CAL27 细胞相比, CAL27-res 细胞中 LC3-II/LC3-I 比值显著提高, p62 的蛋白表达水平显著下降 (均 $P < 0.05$)。透射电子显微镜观察到, 与 CAL27 细胞相比, CAL27-res 细胞中自噬小体数量显著增加 (图 1C, $P < 0.01$)。

2.2 hsa_circ_0034762 在耐药细胞及组织中显著高表达

本研究筛选了 CAL27 细胞和 CAL27-res 细胞之间差异表达的 circRNA。结果 (图 2A) 显示, 共筛选到 119 个显著上调的 circRNA 和 96 个显著下调的 circRNA ($|\log_2 \text{FC}| \geq 1, P < 0.01$)。选择其中表达上调最为显著的 8 个 circRNA, 在 CAL27 和 CAL27-res 细胞中进行 RT-qPCR 验证, 结果 (图 2B) 显示, hsa_circ_0034762 在上述 8 个候选分子中表达上调最为显著 ($P < 0.01$)。进一步在 40 例 TSCC 样本中检测候选 circRNA 的表达水平, RT-qPCR 结果 (图 2C) 显示, 与 CDDP 敏感组 ($n = 20$) 相比, hsa_circ_0034762 在 CDDP 耐药组肿瘤组织 ($n = 20$) 中的表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。以上结果提示, hsa_circ_0034762 的异常高表达可能与 TSCC 的 CDDP 耐药密切相关。

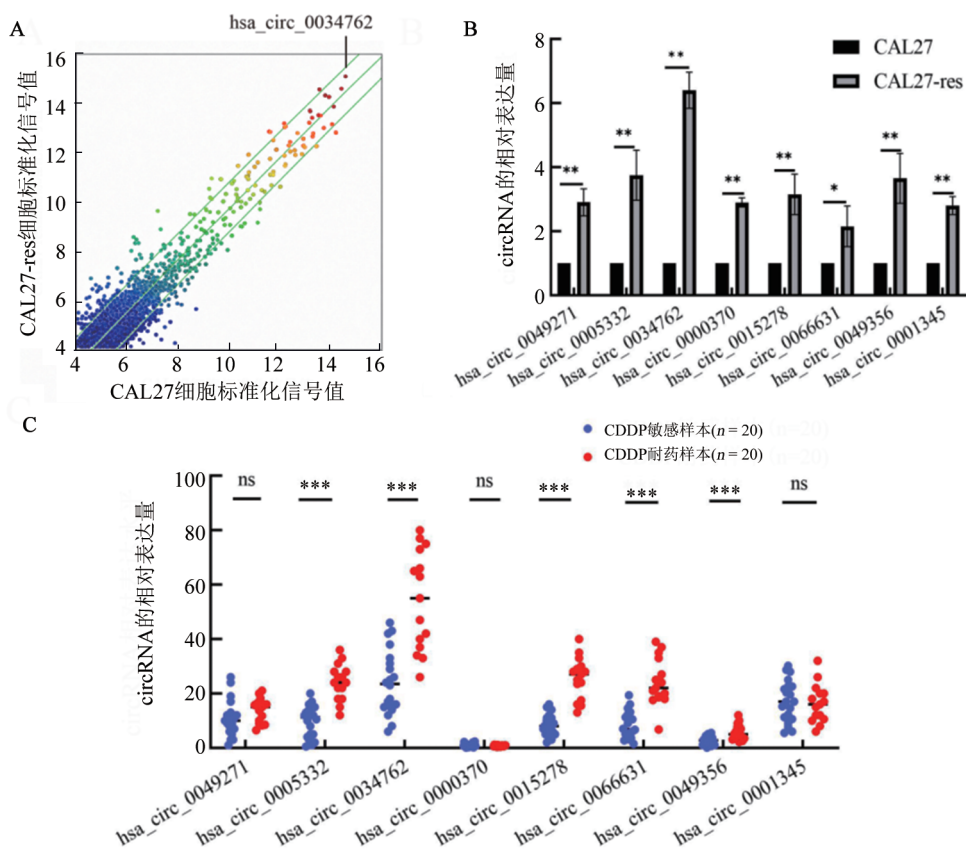
2.3 干扰 hsa_circ_0034762 表达影响 CAL27-res 细胞对 CDDP 的敏感性

RT-qPCR 验证 siRNA 转染后 hsa_circ_0034762 的表达水平, 结果 (图 3A) 显示, 转染特异性靶向 hsa_circ_0034762 的 siRNA (si-circ-1 组和 si-circ-2 组) 后, CAL27-res 细胞中 hsa_circ_0034762 的相对表达量显著下降 ($P < 0.01$)。流式细胞术结果 (图 3B、C) 显示, 与 si-NC 组相比, si-circ-1 组和 si-circ-2 组 CAL27-res 细胞凋亡率均无统计学差异。经 CDDP 处理后, 与 si-NC 组 CAL27-res 细胞相比, si-circ-1 组和 si-circ-2 组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。



A: MTT法检测 CAL27 和 CAL27-res 细胞对 CDDP 的 IC_{50} ; B: Western blotting 检测自噬相关蛋白 p62 及 LC3-II、LC3-I 在 CAL27 和 CAL27-res 细胞中的表达情况; C: 透射电镜观察单个视野下 CAL27 和 CAL27-res 细胞中自噬小体的数量。**** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$ 。

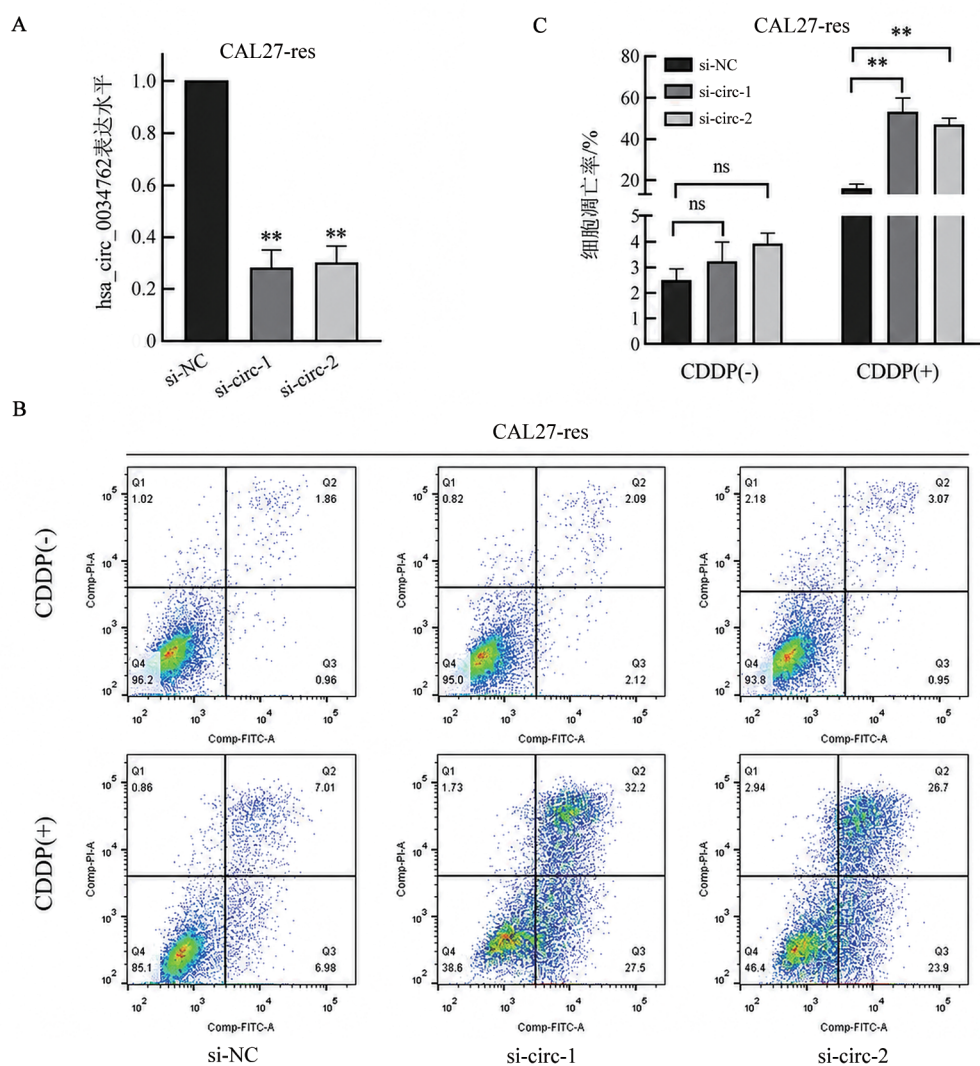
图1 TSCC 亲本株和CDDP 耐药株中自噬水平比较



A: 散点图显示 CAL27 和 CAL27-res 细胞中差异表达的 circRNA; B: RT-qPCR 验证差异表达的 circRNA 在 CAL27 和 CAL27-res 细胞的表达情况; C: RT-qPCR 验证差异表达的 circRNA 在 TSCC CDDP 敏感组 ($n = 20$) 和 CDDP 耐药组 ($n = 20$) 的表达情况。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图2 hsa_circ_0034762 在 TSCC 耐药细胞和组织中的表达



A: RT-qPCR 检测 si-hsa_circ_0034762 在 CAL27-res 细胞中的敲低效率; B、C: 流式细胞术检测敲低 hsa_circ_0034762 后 CAL27-res 细胞对 CDDP 敏感性的影响。与 si-NC 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图3 干扰 hsa_circ_0034762 表达影响 CAL27-res 细胞对 CDDP 的敏感性

2.4 干扰 hsa_circ_0034762 表达影响 CAL27-res 细胞自噬水平

Western blotting 结果(图4A)显示,与 si-NC 组相比, si-circ-1 组和 si-circ-2 组 CAL27-res 细胞中的自噬相关蛋白 p62 表达显著升高, LC3-II/LC3-I 比值下降(均 $P < 0.05$)。透射电子显微镜下观察到,与 si-NC 组细胞相比, si-circ-1 组和 si-circ-2 组 CAL27-res 细胞中自噬小体数量均显著减少(图4B、C, 均 $P < 0.01$)。

2.5 hsa_circ_0034762 与 miR-17-3p 存在相互作用

对 hsa_circ_0034762 进行 miRNA 结合位点预测分析, 结果(图5A)显示, hsa_circ_0034762 序列上含有 2 个 miR-17-3p 互补位点。双萤光素酶报告基因实验结果(图5B)显示, 与 miR-NC 组相比, 转染 miR-17-3p mimics 显著下调了野生型 WT-hsa_circ_0034762 载体的相对萤光素酶活性($P < 0.01$)。对于突变型载体, miR-17-3p mimics 对 MUT-1 组仍具有显著的抑制作用($P < 0.01$); 而对 MUT-2 组的相对萤光

素酶活性无明显影响($P > 0.05$)。以上结果表明, hsa_circ_0034762 序列中的位点 2 是 miR-17-3p 的功能性结合位点。荧光原位杂交实验结果(图5C)显示, hsa_circ_0034762 与 miR-17-3p 共定位于 CAL27-res 细胞的胞质中。

2.6 抑制 miR-17-3p 表达逆转 hsa_circ_0034762 敲低对 CAL27-res 细胞耐药和自噬水平的影响

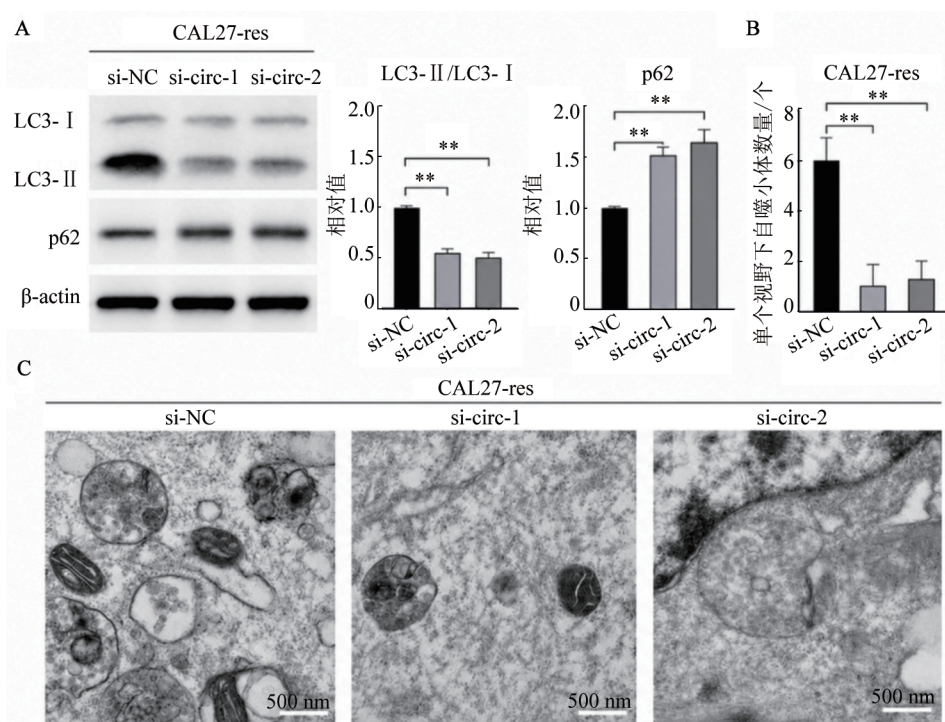
功能回复实验结果(图6)显示, 与 si-circ 组相比, si-circ + miR-17-3p inhibitor 组 CAL27-res 细胞的细胞凋亡率显著降低($P < 0.01$), 自噬小体数量显著增加($P < 0.05$)。

3 讨论

TSCC 是口腔颌面部常见的恶性肿瘤之一, 化疗耐药是影响治疗效果和患者预后的重要因素。阐明 TSCC 化疗耐药的分子机制, 对于寻找新的治疗靶点及提高化疗疗效具有重要意义。本研究以 CDDP 耐

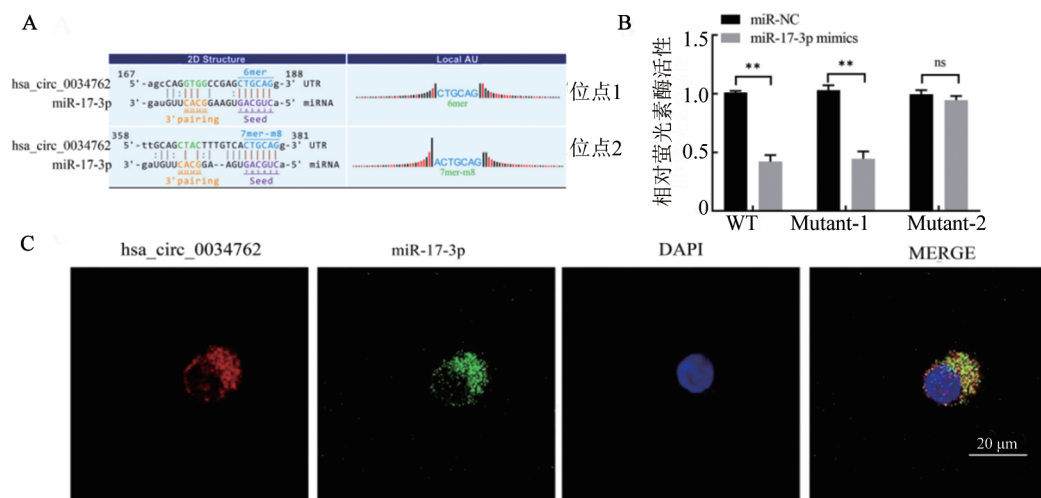
药细胞CAL27-res为研究对象,发现与亲本CAL27细胞相比,CAL27-res细胞中自噬小体数量明显增加,LC3-II/LC3-I比值升高,而p62蛋白表达降低,

提示CDDP耐药TSCC细胞内自噬水平升高。上述结果提示,自噬激活可能是TSCC细胞适应化疗压力并形成耐药表型的重要机制之一。



A: Western blotting检测 hsa_circ_0034762 敲低后自噬相关蛋白的表达; B: CAL27-res 细胞中单个视野下自噬小体数量统计; C: 透射电镜观察 hsa_circ_0034762 敲低后 CAL27-res 细胞中自噬小体的变化。* $P < 0.01$ 。

图4 干扰 hsa_circ_0034762 表达对 CAL27-res 自噬水平的影响



A: hsa_circ_0034762 序列上 miR-17-3p 结合位点的预测分析; B: 双荧光素酶实验检测 hsa_circ_0034762 与 miR-17-3p 的相互作用; C: 荧光原位杂交实验检测 hsa_circ_0034762 和 miR-17-3p 在 CAL27-res 细胞中的共定位, hsa-miR-17 的探针用 FITC 标记并染成绿色, hsa_circ_0034762 的探针用 Cy3 标记并染成红色, DAPI 将细胞核染色为蓝色。* $P < 0.01$ 。

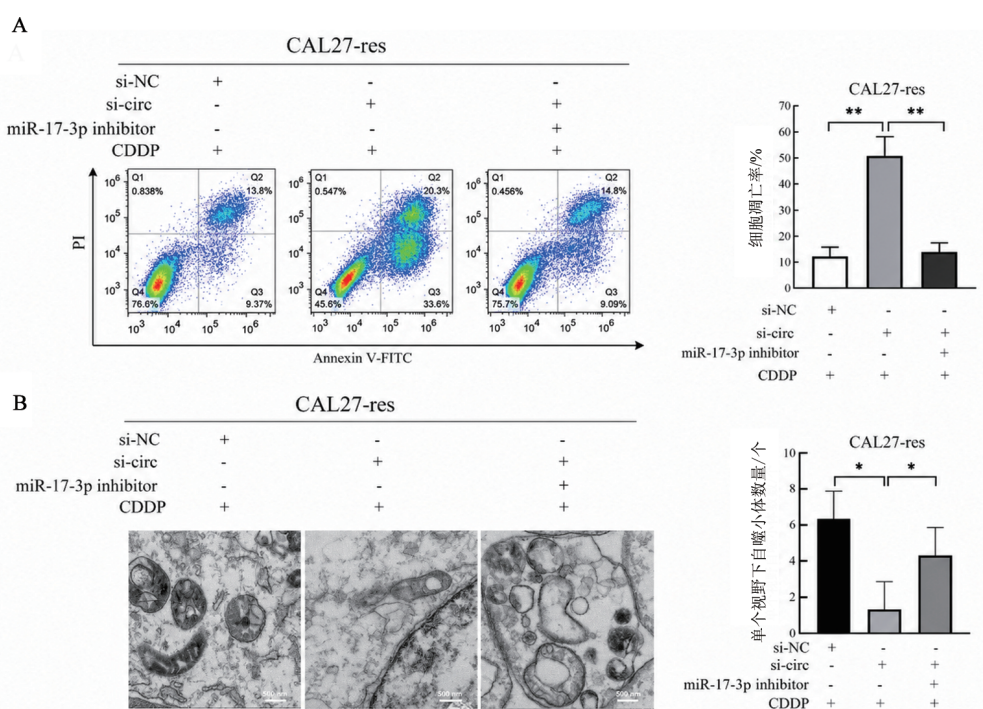
图5 hsa_circ_0034762 与 miR-17-3p 的相互作用

已有研究^[16-17]表明,自噬在肿瘤化疗中具有“双刃剑”作用。一方面,自噬通过清除受损细胞器和毒性蛋白,帮助肿瘤细胞在化疗诱导的应激中存活,从而促进化疗耐药;另一方面,在特定条件下,过度活

跃的自噬也可能诱导自噬性细胞死亡并增强治疗效果^[18]。在头颈鳞癌等实体肿瘤中,化疗压力下激活的自噬多表现为保护性作用,可促进肿瘤细胞对化疗药物的耐受。LIN 等^[19]发现 CDDP 耐药的 FaDu 细胞

中,染色体外环状DNA扩增了自噬相关基因RAB3B,通过提高自噬水平促进CDDP耐药,提示化疗耐药与自噬功能紊乱密切相关。此外,在临床前模型中抑制自噬能够逆转肿瘤细胞的化疗耐药性^[20]。本研究结果与上述研究趋势一致,即CDDP耐药TSCC细胞中存在更高水平的自噬活性。更重要的

是,本研究进一步发现,敲低 hsa_circ_0034762 后, CAL27-res 细胞的自噬小体数量减少、LC3- II/LC3- I 比值降低、p62 表达升高,同时细胞凋亡率增加,提示 hsa_circ_0034762 可能通过维持或增强保护性自噬,促进 TSCC 细胞对 CDDP 的耐受。



A: 流式细胞术分析 si-NC、si-circ 及 si-circ + miR-17-3p inhibitor 处理后 CAL27-res 细胞凋亡率的变化; B: 透射电镜观察 si-NC、si-circ 及 si-circ + miR-17-3p inhibitor 处理后 CAL27-res 细胞中单个视野下自噬小体数量变化。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图6 抑制 miR-17-3p 表达逆转 hsa_circ_0034762 敲低对 CAL27-res 细胞耐药和自噬水平的影响

circRNA 是一种反向剪接生成的内源性 ncRNA, 因其显著的稳定性、组织特异性及多功能性, 在细胞增殖和凋亡等生物学过程中具有重要调控作用, 并在包括 TSCC 在内的多种癌症的发生与进展中发挥重要作用^[21-22]。近年来, 越来越多研究^[23-24]表明, circRNA 可通过调控细胞增殖、凋亡、自噬及药物代谢等过程参与肿瘤发生发展和治疗抵抗。本研究通过 circRNA 表达谱分析, 筛选 CAL27 与 CAL27-res 细胞中的差异表达 circRNA, 并经 RT-qPCR 进一步验证, 发现 hsa_circ_0034762 在 CDDP 耐药 TSCC 细胞及组织中均显著高表达。功能实验显示, 敲低 hsa_circ_0034762 可显著诱导 CAL27-res 细胞凋亡, 并抑制其自噬水平, 说明 hsa_circ_0034762 不仅与 TSCC 化疗耐药表型密切相关, 而且可能是调控耐药细胞自噬和生存能力的重要上游分子。

circRNA 可作为竞争性内源 RNA 吸附 miRNA, 从而解除 miRNA 对其下游靶基因的抑制作用, 并参与肿瘤细胞生物学行为调控^[25-26]。既往研究^[27-29]显

示, miR-17 相关分子参与多种肿瘤细胞增殖、凋亡、自噬及化疗敏感性的调节。研究^[30]发现 ncRNA BLACAT1 可通过与 miR-17 相互作用并正向调控 ATG7 表达, 促进非小细胞肺癌细胞自噬和化疗耐药。本研究通过生物信息学预测发现 hsa_circ_0034762 上存在 miR-17-3p 潜在结合位点, 并且通过双萤光素酶报告实验与荧光原位杂交实验进一步证实, hsa_circ_0034762 能够与 miR-17-3p 直接结合。功能回复实验显示, 在 hsa_circ_0034762 敲低的 CAL27-res 细胞中抑制 miR-17-3p 后, 细胞凋亡率降低, 而自噬小体数量增加。上述结果提示, miR-17-3p 参与了 hsa_circ_0034762 介导的自噬和化疗耐药调控, hsa_circ_0034762 可能与 miR-17-3p 相互作用, 减弱 miR-17-3p 的抑制作用, 从而增强自噬并促进 TSCC 细胞 CDDP 耐药。

综上所述, 本研究表明 CDDP 耐药 TSCC 细胞中自噬活性增强, hsa_circ_0034762 在 TSCC 化疗耐药组织和细胞中高表达。敲低 hsa_circ_0034762 通过

miR-17-3p 介导的调控抑制自噬并促进细胞凋亡, 从而降低 TSCC 细胞的化疗耐药性。hsa_circ_0034762/miR-17-3p 轴可能是 TSCC 化疗耐药的重要调控通路, 并有望成为逆转 TSCC 化疗耐药的潜在干预靶点。然而, 本研究仍存在一定局限性: 本研究临床样本量相对有限, 后续仍需扩大样本量进一步分析 hsa_circ_0034762 表达与患者化疗反应及预后的关系; 此外, 本研究尚缺乏动物模型验证, 后续将开展体内实验加以验证。

【参 考 文 献】

- [1] LENZE N R, FARQUHAR D R, DORISMOND C, et al. Age and risk of recurrence in oral tongue squamous cell carcinoma: systematic review[J]. *Head Neck*, 2020, 42(12): 3755-3768. DOI: 10.1002/hed.26464.
- [2] 谢非, 秦星, 童桐, 等. IGF2BP1 在口腔鳞癌细胞耐药中的作用及机制探讨[J]. *上海口腔医学*, 2021, 30(5): 456-461. DOI:10.19439/j.sjos.2021.05.002.
- [3] WANG C, LIU X Q, HOU J S, et al. Molecular mechanisms of chemoresistance in oral cancer[J]. *Chin J Dent Res*, 2016, 19(1): 25-33. DOI: 10.3290/j.cjdra.35694.
- [4] EBRAHIMNEZHAD M, ASL S H, REZAIE M, et al. lncRNAs: new players of cancer drug resistance via targeting ABC transporters [J]. *IUBMB Life*, 2024, 76(11): 883-921. DOI:10.1002/iub.2888.
- [5] ZHANG J W, YU Q W, ZHU W J, et al. Recent advances in the role of circRNA in cisplatin resistance in tumors[J]. *Cancer Gene Ther*, 2025, 32(5): 497-506. DOI:10.1038/s41417-025-00899-4.
- [6] WANG D, LI Y G, CHANG W L, et al. CircSEC24B activates autophagy and induces chemoresistance of colorectal cancer via OTUB1-mediated deubiquitination of SRPX2[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(9): 693. DOI:10.1038/s41419-024-07057-y.
- [7] LEI R L, LONG Y, LI Q J, et al. Circular RNA circ_ARHGEF28 inhibits MST1/2 dimerization to suppress Hippo pathway to induce cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 256. DOI:10.1186/s12935-024-03451-w.
- [8] JIA H Q, WEI J, ZHENG W, et al. The dual role of autophagy in cancer stem cells: implications for tumor progression and therapy resistance[J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 583. DOI:10.1186/s12967-025-06595-z.
- [9] ZOU Y C, WAN X L, ZHOU Q C, et al. Mechanisms of drug resistance in hepatocellular carcinoma[J]. *Biol Proced Online*, 2025, 27(1): 19. DOI:10.1186/s12575-025-00281-6.
- [10] MIYAMOTO M, TAKANO M, AOYAMA T, et al. Inhibition of autophagy protein LC3A as a therapeutic target in ovarian clear cell carcinomas[J]. *J Gynecol Oncol*, 2017, 28(3): e33. DOI: 10.3802/jgo.2017.28.e33.
- [11] WATANABE Y, TANAKA M. p62/SQSTM1 in autophagic clearance of a non-ubiquitylated substrate[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(16): 2692-2701. DOI:10.1242/jcs.081232.
- [12] SENAPATI P K, MAHAPATRA K K, SINGH A, et al. mTOR inhibitors in targeting autophagy and autophagy-associated signaling for cancer cell death and therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2025, 1880(3): 189342. DOI: 10.1016/j.bbcan.2025.189342.
- [13] FENG C, YUAN X X. Role of autophagy and its regulation by noncoding RNAs in ovarian cancer[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023, 248(12): 1001-1012. DOI:10.1177/15353702231151958.
- [14] ZHANG L, LI S, SHI J, et al. The lncRNA RMST-miR-4295-ITPR1 axis: a key mechanism in regulating autophagy in triple-negative breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2025, 25(1): 782. DOI: 10.1186/s12885-025-14189-7.
- [15] WANG T, HE M, ZHANG X, et al. Deciphering the impact of circRNA-mediated autophagy on tumor therapeutic resistance: a novel perspective[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29: 60. DOI: 10.1186/s11658-024-00571-z.
- [16] DADGAR-ZANKBAR L, ELAHI Z, SHARIATI A, et al. Exploring the role of *Fusobacterium nucleatum* in colorectal cancer: implications for tumor proliferation and chemoresistance[J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 547. DOI: 10.1186/s12964-024-01909-y.
- [17] ZHENG H S, TAN J, QIN F, et al. PKM2 modulates chemotherapy sensitivity by regulating autophagy and predicts the prognosis and immunity in pancreatic cancer[J]. *Sci Rep*, 2025, 15: 14626. DOI:10.1038/s41598-025-96562-x.
- [18] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541. DOI:10.1038/s41418-017-0012-4.
- [19] LIN C W, CHEN Y F, ZHANG F, et al. Encoding gene RAB3B exists in linear chromosomal and circular extrachromosomal DNA and contributes to cisplatin resistance of hypopharyngeal squamous cell carcinoma via inducing autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(2): 171. DOI:10.1038/s41419-022-04627-w.
- [20] SU K Y, KHOO X H, PATERSON I C, et al. Autophagy and extracellular vesicles mediate cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma with LC3B-II as a potential non-invasive biomarker [J]. *Sci Rep*, 2025, 15: 15945. DOI:10.1038/s41598-025-00703-1.
- [21] HASHEMI M, KHOUSHAB S, AGHMIUNI M H, et al. Non-coding RNAs in oral cancer: emerging biomarkers and therapeutic frontier[J]. *Heliyon*, 2024, 10(21): e40096. DOI:10.1016/j.heliyon.2024.e40096.
- [22] TONG H X, JIA N, LI W Y, et al. RNA profiling and immunohistochemistry analyses of circRNAs in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors[J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 601. DOI: 10.1186/s12967-025-06598-w.
- [23] PAN Y J, YANG H, ZHANG J Y, et al. CircSLC22A3 inhibits the invasion and metastasis of ESCC via the miR-19b-3p/TRAK2 axis and by reducing the stability of m⁶A-modified ACSBG1 mRNA[J]. *BMC Cancer*, 2025, 25(1): 971. DOI:10.1186/s12885-025-14390-8.
- [24] HONG Y, LIU L J, HAI Y D, et al. hsa_circ_0001103 correlates with unfavorable MRI features and promotes glioma progression by modulating the miR-375/YAP1 axis[J]. *J Mol Histol*, 2025, 56(3): 173. DOI:10.1007/s10735-025-10445-z.
- [25] FAN H Y, ZHAO M D, JIANG H J, et al. Cisplatin-based miRNA delivery strategy inspired by the circCPNE1/miR-330-3p pathway for oral squamous cell carcinoma[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(6): 2748-2760. DOI:10.1016/j.apsb.2024.02.009.
- [26] EL-ASHMAWY N E, KHEDR E G, DARWISH R T, et al. Competing

- endogenous RNAs network and therapeutic implications: new horizons in disease research[J]. BBA-Gene Regul Mech, 2025, 1868(1): 195073. DOI:10.1016/j.bbagr.2024.195073.
- [27] LU D B, TANG L, ZHUANG Y, et al. miR-17-3p regulates the proliferation and survival of colon cancer cells by targeting Par4[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 618-623. DOI:10.3892/mmr.2017.7863.
- [28] SUN K Y, CHEN L, LI Y W, et al. METTL14-dependent maturation of pri-miR-17 regulates mitochondrial homeostasis and induces chemoresistance in colorectal cancer[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(2): 148. DOI:10.1038/s41419-023-05670-x.
- [29] WU D M, HONG X W, WANG L L, et al. microRNA-17 inhibition overcomes chemoresistance and suppresses epithelial-mesenchymal transition through a DEDD-dependent mechanism in gastric cancer [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 102: 59-70. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.06.007.
- [30] HUANG F X, CHEN H J, ZHENG F X, et al. LncRNA BLACAT1 is involved in chemoresistance of non-small cell lung cancer cells by regulating autophagy[J]. Int J Oncol, 2019, 54(1): 339-347. DOI: 10.3892/ijo.2018.4614.
- [收稿日期] 2025-12-13 [修回日期] 2026-04-22
- [本文编辑] 邢一凡