

文章编号 1006-8147(2021)06-0574-06

论著

# 沉默 circPVT1 对 5-氟尿嘧啶耐药胃癌细胞化疗增敏作用及机制研究

左兴盛<sup>1</sup>, 宋志玉<sup>1</sup>, 贾海盼<sup>1</sup>, 付中华<sup>1</sup>, 王振基<sup>2</sup>, 马培志<sup>1</sup>

(1.河南省人民医院药学部, 郑州大学人民医院药学部, 郑州 450003; 2.郑州大学药学院, 郑州 450000)

**摘要** 目的: 研究 circPVT1 对胃癌细胞 5-氟尿嘧啶(FU)敏感性的作用及分子机制。方法: 采用 RT-PCR 检测胃癌组织、胃癌细胞 BGC823 和 5-FU 抵抗胃癌细胞 BGC823/5-FU 中 circPVT1 的相对表达水平。沉默 circPVT1, 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性, 观察其对细胞活性的影响。采用克隆形成实验检测细胞克隆形成能力。采用 TUNEL 试剂盒和流式细胞仪检测细胞凋亡情况。采用 RT-PCR 和 Western 印迹检测 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 基因 mRNA 和蛋白的表达水平。沉默 circPVT1 观察裸鼠皮下移植瘤生长。结果: 在 5-FU 抵抗患者胃癌组织中 circPVT1 的表达水平明显高于 5-FU 敏感患者( $P<0.01$ )。与 BGC823 细胞相比, circPVT1 在 BGC823/5-FU 细胞中的表达水平明显升高( $P<0.001$ )。下调 circPVT1 表达可增强 5-FU 的细胞毒性( $P<0.05$ )。与 5-FU+si-NC 组相比, 5-FU+si-circPVT1 组 BGC823/5-FU 细胞的克隆形成能力明显降低( $P<0.05$ )。5-FU+si-circPVT1 组 BGC823/5-FU 细胞的凋亡数目明显高于 5-FU+si-NC 组( $P<0.01$ )。沉默 circPVT1, 与 5-FU+si-NC 组相比, 5-FU+si-circPVT1 组 BGC823/5-FU 细胞中 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低, Bax 和 caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$ )。裸鼠移植瘤实验结果显示, 5-FU+si-circPVT1 组移植瘤体积和重量明显低于 5-FU+si-NC 组( $P<0.05$ )。结论: 沉默 circPVT1 可以通过调控 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的表达, 增强 BGC823/5-FU 细胞对 5-FU 的敏感性。

**关键词** circPVT1; 胃癌; 5-氟尿嘧啶; 耐药

中图分类号 R735.2

文献标志码 A

## The sensitizing effect and mechanism of silencing of circPVT1 on 5-fluorouracil chemosensitivity in gastric cancer cells

ZUO Xing-sheng<sup>1</sup>, SONG Zhi-yu<sup>1</sup>, JIA Hai-pan<sup>1</sup>, FU Zhong-hua<sup>1</sup>, WANG Zhen-ji<sup>2</sup>, MA Pei-zhi<sup>1</sup>

(1.Department of Pharmacy, Henan People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China; 2.School of Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

**Abstract Objective:** To analyze the effects and molecular mechanism of circPVT1 on 5-fluorouracil(FU) sensitivity of gastric cancer cells. **Methods:** RT-PCR was used to detect the relative expression level of circPVT1 in gastric cancer tissues, gastric cancer cells (BGC823) and 5-FU resistant gastric cancer cells (BGC823/5-FU). The CCK-8 kit was used to detect cell viability. The clone formation experiment was used to detect the ability of cell proliferation. TUNEL kit and flow cytometer were used to detect cell apoptosis. RT-PCR and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 genes. Subcutaneous tumor growth in nude mice was used to assess the effect of circPVT1. **Results:** Compared with gastric cancer patients showing sensitivity to 5-FU, the expression of circPVT1 was much higher in gastric cancer tissues of patients showing resistance to 5-FU ( $P<0.01$ ). The expression of circPVT1 was higher in BGC823/5-FU cells as compared with that in BGC823 cells ( $P<0.001$ ). Downregulation of circPVT1 expression enhanced the cytotoxicity of 5-FU( $P<0.05$ ). Compared with 5-FU+si-NC group, the cell clone formation ability of BGC823/5-FU cells in 5-FU+si-circPVT1 group was significantly decreased( $P<0.05$ ). The apoptosis number of BGC823/5-FU cells in 5-FU+si-circPVT1 group was significantly higher than that in 5-FU+si-NC group ( $P<0.01$ ). After silencing of circPVT1, compared with the 5-FU+si-NC group, and the Bcl-2 mRNA and protein expression in the 5-FU+si-circPVT1 group were significantly reduced in BGC823/5-FU cells, the mRNA and protein expression of Bax and caspase-3 were significantly increased( $P<0.01$ ). The experimental results of tumor transplantation in nude mice showed that the volume and weight of transplanted tumor in 5-FU+si-circPVT1 group were significantly lower than those in 5-FU+si-NC group( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Silencing of circPVT1 can enhance the sensitivity of BGC823/5-FU cells to 5-FU through regulating Bcl-2, Bax and caspase-3.

**Key words** circular PVT1; gastric cancer; 5-fluorouracil; drug resistance

基金项目 国家自然科学基金青年科学基金(82002574)

作者简介 左兴盛(1987-), 男, 硕士, 研究方向: 肿瘤化疗药物耐药的分子机制; 通信作者: 马培志, E-mail: zuoxs\_hn@163.com。

胃癌作为最常见的恶性肿瘤之一,是全球癌症死亡的第二大主要原因<sup>[1]</sup>。尽管目前在胃癌化疗和靶向治疗方面卓有成效,但胃癌的预后仍不容乐观,原发或继发性耐药是胃癌化疗失败的主要原因<sup>[2]</sup>。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)作为临床常用的化疗药物,因其对多种癌症的抗肿瘤作用而闻名,包括胃癌。然而,临床上胃癌患者对 5-FU 也产生了不同程度的耐药,导致临床疗效不佳<sup>[3]</sup>。5-FU 耐药性产生的机制目前尚未明确。环状 RNA(circular RNA, circRNA)是一类缺少 5' 和 3' 末端,由共价键形成闭合环状的非编码 RNA。circRNAs 在真核生物内的含量丰富,已被证明能够参与调控肿瘤的发生、转移及耐药性<sup>[4-5]</sup>。环状 RNA PVT1(circPVT1)来源于致癌基因 PVT1 基因的外显子 2, 位于染色体 8q24。研究表明, circPVT1 与多种癌症的发生、发展密切相关<sup>[6-7]</sup>。Chen 等<sup>[8]</sup>发现, circPVT1 在胃癌患者肿瘤组织中的表达上调,可作为胃癌的一种新型增殖因子和预后标志物。近来研究显示, circPVT1 参与肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[9]</sup>。然而, circPVT1 是否参与调节胃癌细胞对 5-FU 的化学敏感性尚不清楚。因此,本研究通过构建 5-FU 耐药的胃癌细胞,探讨 circPVT1 对胃癌 5-FU 耐药细胞株的增殖和凋亡的影响及其可能的分子机制,为寻找耐药逆转剂的研究提供一定参考意义。

## 1 材料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2017—2018 年在河南省人民医院进行外科手术切除且经病理确认为胃癌患者 29 例,年龄 28~64 岁(中位年龄为 51 岁;平均年龄为 48.6 岁)。所有患者术前接受以 5-FU 为基础的化疗,根据患者对化疗药物 5-FU 的敏感性,将其分为 5-FU 敏感组( $n=22$ )和 5-FU 耐药组( $n=7$ )。患者在接受术前化疗前未接受过任何放疗或免疫治疗且均在接受治疗前签署知情同意书。胃癌组织切除后立即使用液氮处理,后置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。本研究已取得医院伦理委员会批准。

**1.2 主要材料** 胃癌细胞 BGC823 购自上海中科院细胞库, si-NC、si-circPVT1-1 和 si-circPVT1-2 购自上海吉玛制药技术有限公司, Bcl-2、Bax、caspase-3 抗体购自美国 Novus 公司, TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒-POD(20T)购自武汉博士德生物工程有限公司, CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司, Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

**1.3 BGC823 细胞的培养与 BGC823/5 的构建** BGC823 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640

培养基中在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。采用浓度梯度法建立 5-FU 耐药胃癌细胞株 BGC823/5-FU。取对数生长期的 BGC823 细胞置于含有  $0.1\ \mu\text{mol/L}$  5-FU 的 RPMI-1640 培养基中培养 3 d, 随后转移至不含 5-FU 的培养基中培养至 70% 融合。取对数生长期的细胞分瓶传代, 并给予 2 倍浓度的 5-FU 继续培养。以这种方式逐渐增加 5-FU 的剂量, 直至 BGC823 细胞可以在含有  $1.0\ \mu\text{mol/L}$  5-FU 的 RPMI-1640 培养基中稳定生长。经过长达 12 个月的培养, 获得可以在含有  $1.0\ \mu\text{mol/L}$  5-FU 的 RPMI-1640 培养基中良好生长的 BGC823/5-FU 细胞。

**1.4 细胞转染** 按照 Lipofectmine2000 使用说明书, 分别将 si-NC、si-circPVT1-1 和 si-circPVT1-2 转染至 BGC823/5-FU 细胞中, 将 BGC823/5-FU 细胞置于含有  $16\ \mu\text{mol/L}$  5-FU 的培养基中培养 24、48、72 h。将细胞分为 4 组, 分别为 Control 组、5-FU 组、5-FU+si-NC 组、5-FU+si-circPVT1 组。收集细胞用于后续实验。

**1.5 RT-PCR 检测目的基因的表达** 使用 TRIzol 提取试剂提取总 RNA, 使用 One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR Kit(Perfect Real Time)试剂盒进行 RT-PCR 检测。以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算 mRNA 的表达量, 引物序列: circPVT1 上游 5'-GGTTCACACGCGTTATTC-3', 下游 5'-CAAC-TTCCTTTGGGTCTCC-3'; Bcl-2 上游 5'-CTACAG-TGATGTCTCCATCC-3', 下游 5'-AAAGCCTCAATGC-CTGTCTC-3'; Bax 上游 5'-TGAACCCTAAGGCCAA-CCGTG-3', 下游 5'-GCTCATAGCTCTTCTCCAGG-G-3'; caspase-3 上游 5'-GAACTGGACTGTGGCAT-TGA-3', 下游 5'-TGTCGGCATACTGTTTCAGC-3'; GAPDH 上游 5'-AATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3', 下游 5'-TGAAGGGGTCATTGATGGCA-3'。反应体系  $10\ \mu\text{L}$ , 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 扩增 40 个循环。

**1.6 CCK-8 检测细胞增殖** 稀释 BGC823/5-FU 细胞设置 6 个细胞浓度梯度( $0.625\times 10^3/\text{孔}$ 、 $1.25\times 10^3/\text{孔}$ 、 $2.5\times 10^3/\text{孔}$ 、 $5.0\times 10^3/\text{孔}$ 、 $1.0\times 10^4/\text{孔}$ 、 $2.0\times 10^4/\text{孔}$ ), 每组 4 个复孔; 接种于 96 孔板中, 并加入 CCK-8 试剂  $10\ \mu\text{L}$ , 继续培养 3 h 后, 在 450 nm 处测 OD 值并制作标准曲线。根据标准曲线确定 BGC823/5-FU 细胞的接种数量以及加入 CCK-8 试剂后所需的孵育时间。将 BGC823/5-FU 细胞置于含有不同浓度(0、1、2、4、8、16 和  $32\ \mu\text{mol/L}$ ) 5-FU 的培养基中培养 48 h, 按照 CCK-8 试剂盒操作说明检测各组的细胞活性。

1.7 克隆形成实验测定细胞增殖能力 取对数生长期的细胞0.25%胰蛋白酶消化,制作混悬液后梯度倍数稀释,并分别接种于含有10 mL培养液的培养皿中,37℃下培养。多聚甲醛固定后结晶紫染色,计算克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.8 TUNEL检测细胞凋亡 收集BGC823/5-FU细胞,PBS溶液漂洗1次,使用多聚赖氨酸处理玻片,多聚甲醛固定细胞后,向玻片上加入准备好的标记缓冲液,37℃条件下标记2 h,封闭液及地高辛抗体稀释以后DAB染色,显色20 min后,苏木素复染后脱水,透明,封片,在荧光显微镜下观察染色的细胞,拍照并计数。

1.9 Western印迹检测目的蛋白的表达 使用哺乳动物蛋白抽提试剂盒(CW0889M)提取BGC823/5-FU细胞的总蛋白质,使用BCA蛋白定量试剂盒(CW0014)检测从BGC823/5-FU细胞中提取的总蛋白质的浓度。SDS-PAGE分离总蛋白后,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。将膜用5%脱脂牛奶封闭2.5 h后,加入相应的一抗于4℃下孵育过夜。次日,经TVST洗涤后,将膜与二抗于37℃下孵育60 min。采用增强化学发光试剂ECL显影液于暗室中进行显影。以 $\beta$ -actin作为内参分析目标蛋白的表达水平。

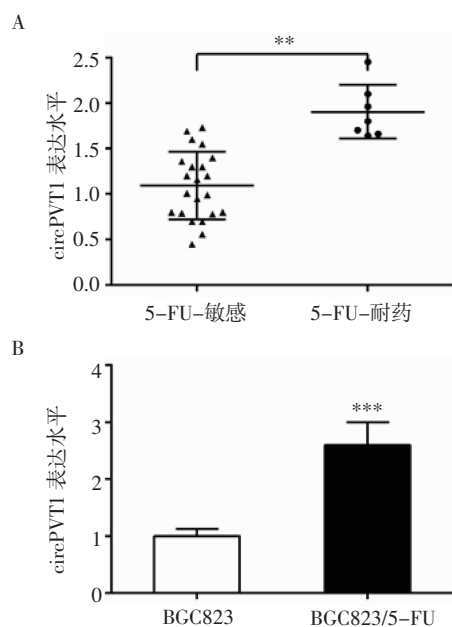
1.10 Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡 收集BGC823/5-FU细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,制成细胞悬浮液,离心后加入195  $\mu$ L Annexin V-FITC结合液重悬细胞,加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC,再加入10  $\mu$ L碘化丙啶染色液,室温条件下避光孵育20 min,使用流式细胞仪分析凋亡细胞。

1.11 裸鼠移植瘤模型 雌性BALB/c裸鼠12只(5周龄,18~20 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物在郑州大学实验动物中心饲养,实验动物的处置符合伦理学标准。将裸鼠适应性喂养1周后,随机分为3组,每组4只:5-FU组、5-FU+si-NC组、5-FU+si-circPVT1组。根据对应的分组,分别将转染si-NC或si-circPVT1的BGC823/5-FU细胞于裸鼠右侧背部皮下移植。每只小鼠通过尾静脉注射5-FU(10 mg/kg)进行治疗,每周注射1次,共进行4次注射<sup>[10]</sup>。观察注射5-FU后测量裸鼠瘤体的长(a)和短(b)直径,并根据公式: $V(\text{mm}^3)=ab^2/2$ 计算移植瘤体积。给药4周后处死裸鼠,剥离移植瘤组织并称重。

1.12 统计学处理 利用SPSS20.0统计分析软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较分析组间差异, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 circPVT1在胃癌组织和细胞系中的表达 RT-PCR结果显示,circPVT1在5-FU耐药患者胃癌组织中的表达水平明显高于5-FU敏感患者,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ,图1A)。此外,circPVT1表达水平在BGC823/5-FU细胞中显著高于BGC823细胞( $P<0.001$ ,图1B)。



注:A:circPVT1在胃癌组织中的表达,\*\* $P<0.01$ ;B:circPVT1在BGC823/5-FU细胞中的表达,\*\*\* $P<0.001$ ;5-FU:5-氟尿嘧啶

图1 circPVT1在胃癌组织和癌细胞中的表达水平

Fig 1 Expression of circPVT1 in gastric cancer tissues and cancer cells

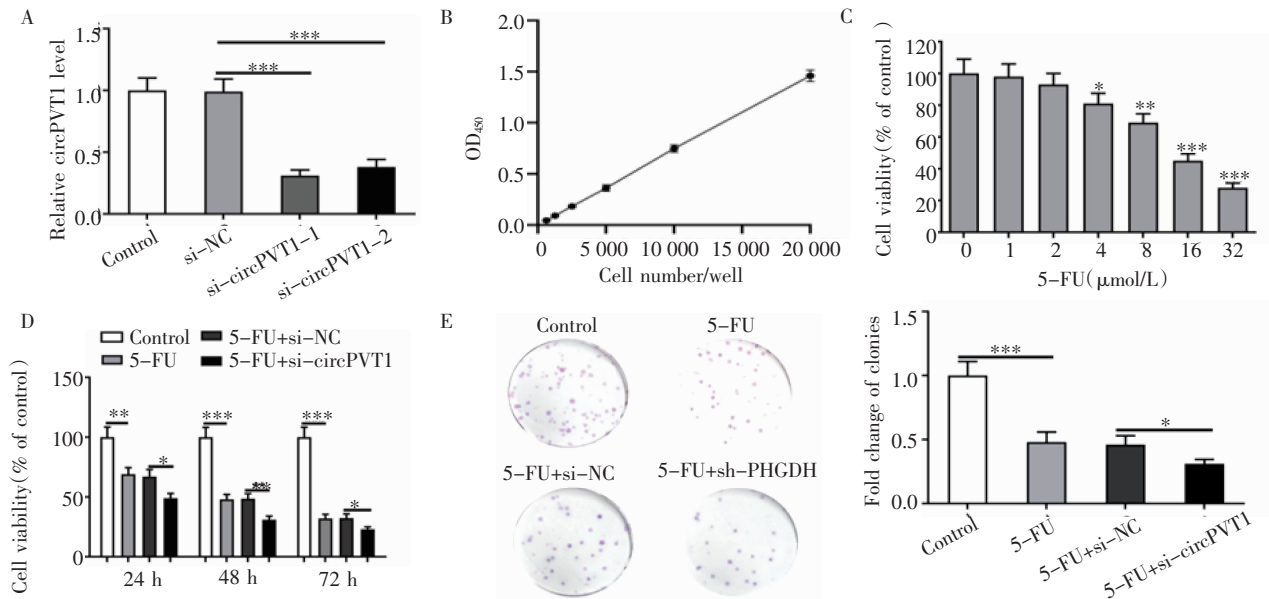
2.2 沉默circPVT1促进5-FU对BGC823/5-FU细胞的增殖抑制作用 si-circPVT1-1和si-circPVT1-2转染BGC823/5-FU细胞48 h后,RT-PCR检测发现,BGC823/5-FU细胞中circPVT1的表达水平显著降低( $P<0.001$ ),且si-circPVT1-1组中circPVT1的表达水平低于si-circPVT1-2组( $P<0.001$ ),因此,在后续实验中使用si-circPVT1-1沉默circPVT1的表达(图2A)。使用CCK-8试剂盒检测细胞活性,标准曲线如图2B所示。将BGC823/5-FU细胞置于含有不同浓度(0、1、2、4、8、16和32  $\mu$ mol/L)5-FU的培养基中培养48 h,利用CCK-8试剂盒分析各组的细胞活性。结果显示,BGC823/5-FU细胞活性随5-FU浓度的升高而降低( $P<0.001$ ,图2C)。而沉默circPVT1后,CCK-8实验结果发现,5-FU+si-circPVT1组BGC823/5-FU细胞的活性明显低于5-FU+si-NC组( $P<0.05$ ,图2D)。克隆形成实验结果发现,5-FU处理可以抑制细胞的克隆形成能力。与5-FU+si-NC组相比,5-FU+si-circPVT1组BGC823/5-FU细胞的克



隆形成能力明显降低( $P<0.05$ ,图 2E)。

**2.3 沉默 circPVT1 增强 5-FU 对 BGC823/5-FU 细胞的凋亡促进作用** TUNEL 实验结果表明,与对照组相比,5-FU 组 BGC823/5-FU 细胞的凋亡数目明显上升( $P<0.001$ )。5-FU+si-circPVT1 组 BGC823/

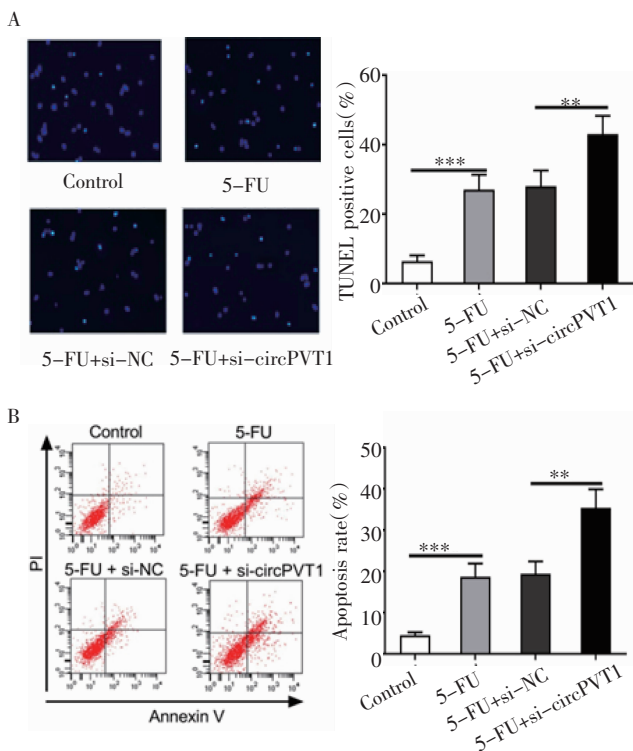
5-FU 细胞的凋亡数目明显高于 5-FU+si-NC 组( $P<0.01$ ,图 3A)。5-FU 组 BGC823/5-FU 细胞的凋亡率明显高于对照组( $P<0.001$ )。与 5-FU+si-NC 组相比,5-FU+si-circPVT1 组 BGC823/5-FU 细胞的凋亡率明显升高( $P<0.01$ ,图 3B)。



注:A:RT-PCR 检测 si-circPVT1-1 和 si-circPVT1-2 转染 BGC823/5-FU 细胞 48 h 后转染效率,\*\*\* $P<0.001$ ;B:CCK-8 试剂盒检测细胞活性,制作标准曲线;C:CCK-8 检测不同浓度 5-FU 对 BGC823/5-FU 细胞活性影响,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;D:下调 circPVT1 表达对 5-FU 的细胞毒性的作用,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;E:5-FU 对细胞克隆形成能力的作用,与 5-FU+si-NC 组相比,\* $P<0.05$ ;与对照组相比,\*\*\* $P<0.001$

图 2 沉默 circPVT1 促进 5-FU 对 BGC823/5-FU 细胞的增殖抑制作用

Fig 2 Silencing circPVT1 promotes the inhibition role of 5-FU on the proliferation of BGC823/5-FU cells



注:A:TUNEL 检测细胞凋亡结果,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;B:流式细胞仪检测细胞凋亡结果,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$

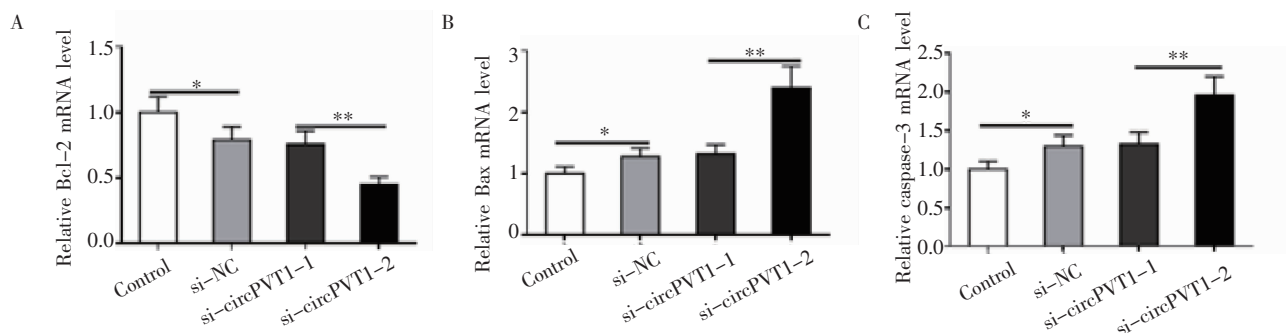
图 3 沉默 circPVT1 增强 5-FU 对 BGC823/5-FU 细胞的凋亡促进作用

Fig 3 Silencing circPVT1 enhances the promotion effect of 5-FU on the apoptosis of BGC823/5-FU cells

**2.4 沉默 circPVT1 对 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 mRNA 表达水平的影响** RT-PCR 结果表明 5-FU 处理可以下调 Bcl-2 的表达,上调 Bax 和 caspase-3 的表达。与 5-FU+si-NC 组相比,5-FU+si-circPVT1 组 BGC823/5-FU 细胞中 Bcl-2 的 mRNA 表达水平明显降低( $P<0.01$ ,图 4A),Bax 和 caspase-3 的 mRNA 表达水平明显升高( $P<0.01$ ,图 4B、4C)。

**2.5 沉默 circPVT1 对 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 蛋白表达水平的影响** Western 印迹结果表明,5-FU 处理可以下调 Bcl-2 的表达,上调 Bax 和 caspase-3 的表达。与 5-FU+si-NC 组相比,5-FU+si-circPVT1 组 BGC823/5-FU 细胞中 Bcl-2 的蛋白表达水平明显降低,Bax 和 caspase-3 的蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$ ,图 5)。

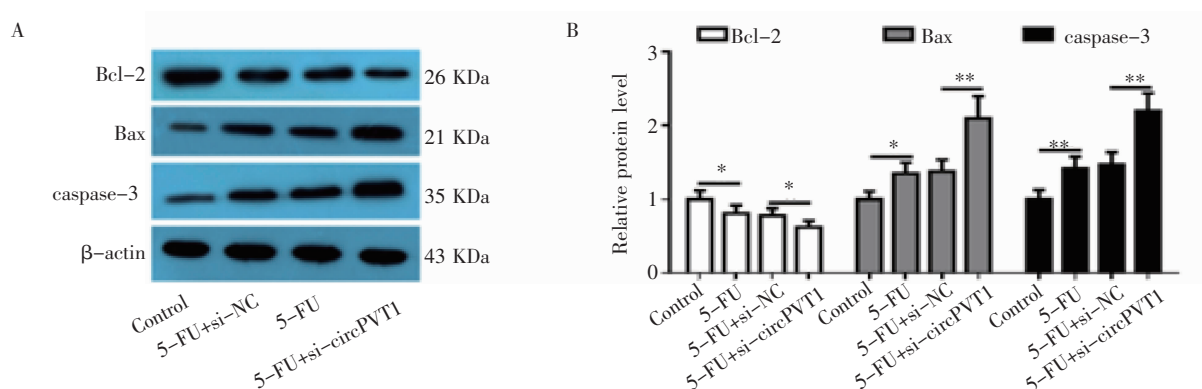
**2.6 沉默 circPVT1 抑制裸鼠 BGC823/5-FU 移植瘤生长** 裸鼠移植瘤实验 结果显示,5-FU+si-circPVT1 组移植瘤体积(图 6A)和质量(图 6B)均小于 5-FU+si-NC 组,差异均具有统计学意义(均  $P<0.05$ )。



注:A:沉默 circPVT1 对 5-FU 诱导的 Bcl-2 mRNA 表达水平的影响,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;B:沉默 circPVT1 对 5-FU 诱导的 Bax mRNA 表达水平的影响,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;C:沉默 circPVT1 对 5-FU 诱导的 caspase-3 mRNA 表达水平的影响,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

图 4 沉默 circPVT1 对 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 mRNA 表达水平的影响

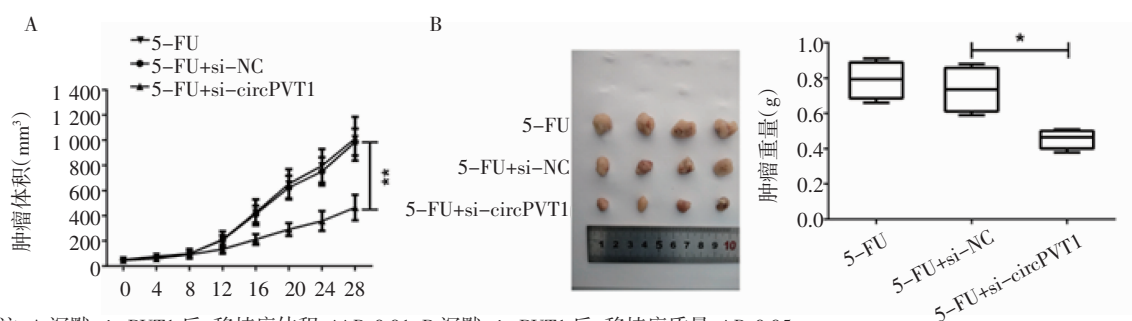
Fig 4 The effect of silencing circPVT1 on the expression levels of Bcl-2, Bax, and caspase-3 mRNAs



注:A:Western 印迹检测 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的蛋白表达水平,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;B:Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的蛋白相对表达水平,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

图 5 沉默 circPVT1 对 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 蛋白表达水平的影响

Fig 5 The effect of silencing circPVT1 on the expression levels of Bcl-2, Bax, and caspase-3 proteins



注:A:沉默 circPVT1 后,移植瘤体积,\*\* $P<0.01$ ;B:沉默 circPVT1 后,移植瘤质量,\* $P<0.05$

图 6 沉默 circPVT1 抑制裸鼠 BGC823/5-FU 移植瘤的生长

Fig 6 Silencing circPVT1 inhibits growth of BGC823 / 5-FU xenografts in nude mice

### 3 讨论

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,以 5-FU 为基础的化疗是胃癌患者手术后辅助化疗以及中晚期胃癌患者的标准治疗方案<sup>[1]</sup>。然而,由于对 5-FU 产生原发性或获得性耐药性,部分胃癌患者在化疗后仍会发生肿瘤复发和转移,导致预后不良。探寻与 5-FU 化疗敏感性相关的分子机制对改善胃癌患

者的预后具有重要意义。本研究发现沉默 circPVT1 可以增强胃癌细胞对 5-FU 的化疗敏感性,其机制可能是通过调控 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的表达以促进细胞凋亡。

circRNA 是一类参与转录和转录后基因表达调节的非编码 RNA。多项研究表明, circRNA 的异常表达在包括胃癌在内的多种肿瘤的发生、发展中起

重要作用<sup>[12-13]</sup>。目前研究认为, circRNA 有望成为肿瘤诊断的生物标志物和治疗的新靶点<sup>[14-15]</sup>。此外, circRNA 在肿瘤耐药中的作用也受到广泛关注<sup>[16]</sup>。Zhou 等<sup>[7]</sup>发现, hsa\_circ\_0004015 可以通过调控 miR-1183/PDPD1 轴来影响埃克替尼耐药非小细胞肺癌细胞对化疗药物的敏感程度。徐飞等<sup>[17]</sup>研究也证实, 抑制 circ\_MIHF2 的表达可增强细胞对培美曲塞的敏感性。circPVT1 也称之为 circ6, 是新近被证实与肿瘤发生、发展和耐药性相关的基因<sup>[9, 18]</sup>。Chen 等<sup>[8]</sup>通过分析胃癌组织和癌旁正常组织发现 5 500 个 circRNAs 在胃癌组织中差异表达, 其中 circPVT1 在胃癌组织中的表达显著升高, 并提出 circPVT1 可以独立作为预测胃癌患者预后的生物标志物。此外, 他们还发现 circPVT1 序列上包含多个 miR-125b 的结合位点, 可以作为 miR-125b 的“海绵”, 促进 MGC-803 和 AGS 细胞的增殖。此外, 有研究发现 circPVT1 在肿瘤细胞化疗耐药性的产生和发展过程中起关键作用<sup>[9, 19]</sup>。沉默 circPVT1 可以增强骨肉瘤细胞对阿霉素和顺铂的敏感性<sup>[9]</sup>。Chen 等<sup>[20]</sup>发现, circPVT1 敲低能够增强顺铂对非小细胞肺癌耐药细胞 A549/DDR 活力的抑制作用和凋亡的诱导作用。然而, circPVT1 对 5-FU 耐药胃癌细胞的影响尚不清楚。本研究发现, circPVT1 在 5-FU 耐药患者胃癌组织中的表达水平明显高于 circPVT1 在 5-FU 敏感患者胃癌组织中的表达水平。与此一致, 在胃癌 5-FU 耐药细胞株 BGC823/5-FU 中, circPVT1 的表达明显增加。这些结果提示 circPVT1 表达的上调可能与胃癌患者对 5-FU 的耐药性有关。为进一步观察 circPVT1 在胃癌细胞对 5-FU 耐药中的可能作用, 本研究将靶向 circPVT1 的 siRNA 转染至胃癌耐药细胞株 BGC823/5-FU 中, 并通过 CCK-8 和克隆形成实验分析 circPVT1 沉默对耐药细胞增殖的影响。结果发现, circPVT1 沉默可以增强 5-FU 对 BGC823/5-FU 细胞增殖的抑制作用。此外, TUNEL 和流式细胞术实验显示, circPVT1 沉默能够增强 5-FU 对 BGC823/5-FU 细胞凋亡的促进作用。提示 circPVT1 沉默能够增加 BGC823/5-FU 细胞对 5-FU 的敏感性, 达到更好的抗肿瘤效应。另外, 本研究通过构建 BGC823/5-FU 细胞裸鼠移植瘤模型, 在体内也证实沉默 circPVT1 可以增强 BGC823/5-FU 细胞对 5-FU 的敏感性。因此, circPVT1 有望成为克服胃癌细胞 5-FU 耐药的治疗靶点。

鉴于大部分化疗药物主要通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗癌效应, 细胞凋亡通路被认为是与耐药性相关的重要机制<sup>[21]</sup>。因此, 为进一步分析 circPVT1

对 5-FU 耐药性影响的相关机制, 本研究分析了凋亡相关因子的表达变化。结果发现, 5-FU 处理导致胃癌耐药细胞中 Bcl-2 的表达下调, 以及 Bax 和 caspase-3 的表达上调, 而沉默 circPVT1 可以在一定程度上增强 5-FU 对细胞凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 表达的影响。因此推测, 沉默 circPVT1 可能通过调控凋亡信号通路以增强胃癌细胞对 5-FU 的耐药性。

综上所述, 沉默 circPVT1 能够在体内和体外增强胃癌细胞对 5-FU 的敏感性, 这可能与其对细胞凋亡相关蛋白的调控作用有关。然而, circPVT1 在胃癌细胞对 5-FU 耐药中的调控作用还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 段续, 燕速. HIF-1 $\alpha$  与河湟谷底胃癌侵袭转移的关系[J]. 医学信息, 2015, 12(2): 400
- [2] 郭萍, 张军鹏, 贺继东. 胃癌患者原发病灶的组织学评价与新辅助化疗预后的相关性[J]. 国际肿瘤学杂志, 2018, 45(10): 588
- [3] 潘安萍, 朱建伟, 杨跃. 沉默  $\beta$ -catenin 表达对胃癌细胞 5-Fu 敏感性的影响[J]. 浙江临床医学, 2018, 20(12): 1931
- [4] YIN J, HU T, XU L, et al. Circular RNA expression profile in peripheral blood mononuclear cells from Crohn disease patients[J]. Medicine, 2019, 98(26): e16072
- [5] 李可, 林进, 吴丹. 环状 RNA 在肿瘤中的表达与功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(3): 259
- [6] YOU X T, VLATKOVIC I, BABIC A, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. Nat Neurosci, 2015, 18(4): 603
- [7] GREENE J, BAIRD A M, BRADY L, et al. Circular RNAs: biogenesis, function and role in human diseases[J]. Front Mol Biosci, 2017, 4: 38
- [8] CHEN J, LI Y, ZHENG Q, et al. Circular RNA profile identifies circPVT1 as a proliferative factor and prognostic marker in gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2017, 388: 208
- [9] ZHU K P, MA X L, ZHANG C L. Overexpressed circPVT1, a potential new circular RNA biomarker, contributes to doxorubicin and cisplatin resistance of osteosarcoma cells by regulating ABCB1[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(3): 321
- [10] YANG W, GU J, WANG X, et al. Inhibition of circular RNA CDR1as increases chemosensitivity of 5-FU-resistant BC cells through up-regulating miR-7[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5): 3166
- [11] 尚昆, 马妮娜, 曹邦伟. 雷替曲塞在转移性结直肠癌一线及二线化疗中的有效性及安全性评价[J]. 癌症进展, 2019, 17(15): 1737, 1751
- [12] CHEN S J, LI T W, ZHAO Q F, et al. Using circular RNA hsa\_circ\_0000190 as a new biomarker in the diagnosis of gastric cancer[J]. Clinica Chimica Acta, 2017, 466(466): 167
- [13] SHAO Y, LI J, LU R, et al. Global circular RNA expression profile of human gastric cancer and its clinical significance[J]. Cancer Med, 2017, 6(6): 1173
- [14] MENG S. CircRNA: functions and properties of a novel potential

(下转第 585 页)

- [14] BUSHELL M, STONELEY M, KONG Y W, et al. Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated gene expression during apoptosis[J]. *Mol Cell*, 2006, 23(3):401
- [15] SODERBERG M, RAFFALLI-MATHIEU F, LANG M A. Identification of a regulatory cis-element within the 3'-untranslated region of the murine inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA; interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins I and L and role in the iNOS gene expression[J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(4):434
- [16] SHINOHARA H, KUMAZAKI M, MINAMI Y, et al. Perturbation of energy metabolism by fatty-acid derivative AIC-47 and imatinib in BCR-ABL-harboring leukemic cells[J]. *Cancer Lett*, 2016, 371(1):1
- [17] HE X, ARSLAN A D, HO T T, et al. Involvement of polypyrimidine tract-binding protein (PTBP1) in maintaining breast cancer cell growth and malignant properties[J]. *Oncogenesis*, 2014, 3:e84
- [18] TANIGUCHI K, UCHIYAMA K, AKAO Y. PTBP1-targeting microRNAs regulate cancer-specific energy metabolism through the modulation of PKM1/M2 splicing[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(1):41
- [19] SHARMA S H, RAJAMANICKAM V, NAGARAJAN S. Antiproliferative effect of p-Coumaric acid targets UPR activation by downregulating Grp78 in colon cancer[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 291:16
- [20] HE X, YUAN C, YANG J. Regulation and functional significance of CDC42 alternative splicing in ovarian cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30):29651
- [21] YANG B, HU P, LIN X, et al. PTBP1 induces ADAR1 p110 isoform expression through IRES-like dependent translation control and influences cell proliferation in gliomas[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(22):4383
- [22] DAHAI Z, DALIANG C, FAMU L, et al. Lowly expressed lncRNA PVT1 suppresses proliferation and advances apoptosis of glioma cells through up-regulating microRNA-128-1-5p and inhibiting PTBP1[J]. *Brain Res Bull*, 2020, 163:1
- [23] FERRARESE R, HARSH G T, YADAV A K, et al. Lineage-specific splicing of a brain-enriched alternative exon promotes glioblastoma progression[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(7):2861
- [24] BARBAGALLO D, CAPONNETTO A, CIRNIGLIARO M, et al. Circ-SMARCA5 inhibits migration of glioblastoma multiforme cells by regulating a molecular axis involving splicing factors SRSF1/SRSF3/PTB[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2):480

(2021-02-08 收稿)

(上接第 579 页)

- biomarker for cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):94
- [15] KRISTENSEN L S, HANSEN T B, VENØ M T, et al. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field [J]. *Oncogene*, 2018, 37(5):555
- [16] ZHOU Y, ZHENG X, XU B, et al. Circular RNA hsa\_circ\_0004015 regulates the proliferation, invasion, and TKI drug resistance of non-small cell lung cancer by miR-1183/PDPK1 signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(2):527
- [17] 徐飞, 马蕾娜, 冯龄鑫, 等. 环状 RNA circ\_MTHFD2 对 mircoRNA-124 的调控在肺癌培养曲霉耐药中的作用[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2017, 22(11):961.
- [18] VERDUCI L, FERRAIUOLO M, SACCONI A, et al. The oncogenic role of circPVT1 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated through the mutant p53/YAP/TEAD transcription-competent complex[J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1):237
- [19] VERDUCI L, FERRAIUOLO M, SACCONI A, et al. The oncogenic role of circPVT1 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated through the mutant p53/YAP/TEAD transcription-competent complex[J]. *Genome Biol*, 2017, 18(1):237
- [20] CHEN L, HAN X, HU Z, et al. The PVT1/miR-216b/beclin-1 regulates cisplatin sensitivity of NSCLC cells via modulating autophagy and apoptosis[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 83(5):921
- [21] DI H, ZHANG X, GUO Y, et al. Silencing LDHA inhibits proliferation, induces apoptosis and increases chemosensitivity to temozolomide in glioma cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4):5131

(2020-12-23 收稿)