

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.006

· 基础研究 ·

circSMARCA5通过CCL5富集Treg细胞促进非小细胞肺癌细胞的增殖

季娟娟^a, 王谦^a, 孙露露^a, 郁文越^a, 宝音^a, 朱佳^a, 田芳^b(南京中医药大学附属医院 江苏省中医院 a.呼吸科; b. 中心实验室, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**检测 circSMARCA5 在非小细胞肺癌(NSCLC)组织和细胞中的表达, 以及其在 NSCLC 发生发展中的潜在功能和机制。**方法:**用 qPCR 法检测 circSMARCA5 在 NSCLC 组织中的表达。使用慢病毒转染法将 circSMARCA5 过表达质粒和对照质粒 pLC5 分别转染人肺癌 A549 和 H1975 细胞。采用 qPCR 法检测稳定转染细胞中 circSMARCA5 的表达水平。通过 CCK-8、克隆形成、细胞周期和异种移植瘤实验检测 circSMARCA5 过表达对 A549 和 H1975 细胞生物学行为的影响。通过转录组测序、KEGG 和 GO 富集分析, 确定 circSMARCA5 可能的靶基因。分别构建 circSMARCA5 过表达 A549、Lewis 细胞 BABL/c 裸鼠和免疫正常的 C57 小鼠皮下移植瘤模型, 观察 circSMARCA5 对裸鼠皮下移植瘤生长的影响, 流式细胞术检测对 Lewis 细胞移植瘤组织中 Treg 细胞水平的影响。**结果:**circSMARCA5 在 NSCLC 组织中呈高表达($P<0.01$)。过表达 circSMARCA5 可以在体外促进 NSCLC 细胞的增殖($P<0.05$, $P<0.01$)。体内实验中, circSMARCA5 可以促进裸鼠皮下移植瘤的生长($P<0.01$)。机制上, 经 KEGG 和 GO 富集分析, 确定 C-C 趋化因子配体 5(CCL5)为 circSMARCA5 的下游靶基因。过表达 circSMARCA5 组 A549 和 H1975 细胞中 CCL5 的表达量增加(均 $P<0.05$)。circSMARCA5 介导的 CCL5 上调促进了免疫正常的 C57 小鼠皮下移植瘤的生长。C57 小鼠皮下移植瘤制备成的单细胞悬液行流式细胞术检测显示, circSMARCA5 过表达组的 Treg 细胞比例高于对照组[(3.1±0.5)% vs (1.0±0.1)%], $P<0.05$ 。**结论:**circSMARCA5 在 NSCLC 组织中呈高表达, 其可能通过 CCL5 将 Treg 细胞招募到肿瘤中, 导致肿瘤的免疫逃逸, 促进 NSCLC 的进展。

[关键词] 非小细胞肺癌; circSMARCA5; C-C 趋化因子配体 5; Treg 细胞

[中图分类号] R734.2; R730.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)07-0586-08

circSMARCA5 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation via enrichment of Treg cells by CCL5

JI Juanjuan^a, WANG Qian^a, SUN Lulu^a, YU Wenyue^a, BAO Yin^a, ZHU Jia^a, TIAN Fang^b(a. Department of Respiratory Medicine; b. Central Laboratory, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine & Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of circSMARCA5 in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and cells and its potential function and mechanism in the occurrence and development of NSCLC. **Methods:** The expression of circSMARCA5 in NSCLC tissues was detected by qPCR. The circSMARCA5 over-expression plasmid and the control plasmid pLC5 were transfected into human lung cancer A549 and H1975 cells using the lentiviral transfection method, and the expression levels of circSMARCA5 in the stably transfected cell lines were detected by qPCR. The effects of circSMARCA5 over-expression on the biological behaviors of A549 and H1975 cells were examined by CCK-8, clone formation, cell cycle, and tumor xenografts. Mechanistically, transcriptome sequencing, KEGG and GO enrichment analysis were conducted to identify possible target genes of circSMARCA5. Subcutaneous xenograft models were constructed in BABL/c nude mice and immunocompetent C57 mice by using circSMARCA5-over-expressed NSCLC cells or Lewis cells. The effect of circSMARCA5 on the growth of subcutaneously transplanted tumors in nude mice was observed, and its effect on the contents of Treg cells in Lewis cells transplanted tumor tissues was detected by flow cytometry. **Results:** circSMARCA5 was highly expressed in NSCLC tissues ($P<0.01$). Over-expression of circSMARCA5 could promote the proliferation of NSCLC cells *in vitro* ($P<0.05$, $P<0.01$). In *in vivo* experiments, circSMARCA5 could promote the growth of the transplanted tumors in nude mice ($P<0.01$). Mechanistically, C-C chemokine ligand 5 (CCL5) was identified as a downstream target gene of circSMARCA5 by KEGG and GO enrichment analysis. The expression of CCL5 was increased in A549 and H1975 cells of circSMARCA5 over-expression group ($P<0.05$). circSMARCA5-mediated upregulation of CCL5 promoted the growth of subcutaneous tumors in immunocompetent C57 mice. Flow cytometry of single-cell

[基金项目] 国家自然科学基金(No.81803942); 南京中医药大学自然科学基金(No.XZR2020001)

[作者简介] 季娟娟(1983—), 女, 硕士生, 主要从事临床中西医呼吸病的研究, E-mail: jijuajuan1030@126.com

[通信作者] 田芳, E-mail: tfgzyxh1986@njucm.edu.cn; 朱佳, E-mail: jsnjzj@163.com

suspensions prepared from subcutaneous tumors of C57 mice showed that the proportion of Treg cells in the circSMARCA5 over-expression group was higher than that in the control group ([3.1±0.5]% vs [1.0±0.1]%, $P<0.05$). **Conclusion:** circSMARCA5 is highly expressed in NSCLC tissues. circSMARCA5 may recruit Treg cells *via* CCL5, leading to the immune escape of tumors and promoting the progression of NSCLC.

[Key words] non-small cell lung cancer (NSCLC); circSMARCA5; CCL5; Treg cell

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(7): 586-593. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.07.006]

肺癌是全球病死率最高的恶性肿瘤^[1]。其中约85%的肺癌属于非小细胞肺癌(NSCLC), NSCLC包括两大组织学类型, 肺腺癌和肺鳞癌^[2]。近年来, 靶向治疗和免疫治疗给患者带来了生存获益, 但NSCLC患者的总体治愈率和生存率仍然较低。因此, 了解NSCLC发生发展的分子机制, 探索新的治疗靶点具有重要意义。环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类非编码RNA, 呈单链闭环结构, 表达稳定, 不易被RNA酶降解^[3-4]。circRNA可以调控肺癌细胞增殖、迁移等多种生物学行为, 可能是肺癌治疗的潜在生物标志物^[5]。既往研究^[6]表明, circRNA与肿瘤浸润Treg细胞密切相关。此外, Treg细胞作为原始免疫细胞群有助于建立免疫抑制性肿瘤微环境^[7-9], 可能与肿瘤预后不佳有关^[9-10]。而Treg细胞对NSCLC影响的研究较少, 且circRNA影响Treg细胞的可能机制尚不清楚。本研究选择circSMARCA5(CircBase ID: hsa_circ_0001445)为研究对象, 检测其在NSCLC组织和细胞中的表达水平, 进一步通过在NSCLC细胞中过表达circSMARCA5确定其表型功能, 为深入了解circSMARCA5影响NSCLC发生发展的确切机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

收集2021年2至8月在江苏省中医院胸外科接受手术治疗的30例NSCLC患者的癌组织和配对的癌旁组织。招募的受试者均未接受过放疗、化疗、靶向治疗或免疫治疗。将样品立即快速冷冻并保持在-80℃。所有组织样本在患者知情同意下收集。所有实验方案均符合江苏省中医院伦理委员会的规定, 通过南京中医药大学附属医院研究伦理审查(批件号2019NL-025-02)并取得患者知情同意书。

人NSCLC细胞A549和H1975购自中国科学院细胞库(上海), 鼠源性NSCLC Lewis细胞购自广州赛库生物公司。RPMI 1640、胰酶均购自美国GIBCO公司, DMEM培养基购自广州赛库生物公司, 逆转录试剂盒、SYBR qPCR试剂盒、Lipo8000转染试剂、CCK-8试剂均购自上海翌圣生物公司, circSMARCA5过表达质粒和对照组质粒pLC5购自中国广州吉赛生物公司, 慢病毒包装质粒psPAX2和pMD2购自中国武汉淼灵科技公司,

TRIzol购自美国Invitrogen公司, 基因组DNA提取试剂盒、RIPA裂解液购自上海碧云天公司, RNase R购自美国Epicentre公司, 引物购自擎科生物公司, C-C趋化因子配体5(C-C chemokine ligand 5, CCL5)抗体购自Affinity公司, CD45-AF 700购自美国Biolegend公司, CD4-FITC和CD3-VB均购自德国MiltenyiBiotec公司, CD25-PE购自美国eBioscience公司, FOXP3抗体购自美国Invitrogen公司, β -actin抗体购自北京全式金生物公司, HRP标记山羊抗兔抗体购自白鲨生物公司, HRP标记山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥公司。

1.2 鉴定circSMARCA5

circSMARCA5引物扩增产物在1%琼脂糖凝胶上分离, Sanger测序验证circSMARCA5反向剪接连接的位置。

1.3 qPCR法检测相关基因在NSCLC组织和细胞中的表达

用TRIzol试剂从冷冻组织和培养细胞中提取总RNA, 逆转录为cDNA。采用qPCR SYBR Green master mix进行qPCR。以 β -actin为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量。实验中使用的引物序列见表1。

表1 qPCR引物

目的基因	引物序列(3'-5')
circSMARCA5	F:GCTATCAAGCTCCATCCGCAT R:TAAGACGAAGCACCCGGA
β -actin	F:AAGTGTGACGTGGACATCCG R:CCCGACTCGTCATACTCCTGCT
β -actin(鼠源)	F:GGCTGTATCCCCTCCATCG R:CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
CCL5	F:CCAGCAGTCGTCTTTGTGAC R:CTCTGGGTTGGCACACACTT
CCL5(鼠源)	F:TTTGCCTACCTCTCCCTCG R:CGACTGCAAGATTGGAGCACT
IFIT1	F:AGAAGCAGGCAATCACAGAAAA R:CTGAAACCGACCATAGTGGAAAT
IFIT2	F:GACACGGTTAAAGTGTGGAGG R:TCCAGACGGTAGCTTGCTATT
IFIT3	F:TCAGAAGTCTAGTCACTTGGGG R:ACACCTTCGCCCTTTCATTC
ISG5	F:CGCAGATCACCCAGAAGATCG R:TTCGTGCGATTTGTCCACCA

IFIT: tetratricopeptide repeats(含四肽重复序列的干扰素诱导蛋白); ISG5: interferon-stimulated gene(干扰素刺激基因)。

从 A549 细胞中提取的总的 RNA, 分为两部分, 一部分用 Rnase R 消化, 另一部分用缓冲液作为对照, 37 °C 下反应 30 min, 采用 qPCR 法分析 circSMARCA5 和 actin mRNA 的表达情况。

1.4 circSMARCA5 过表达慢病毒载体构建及转染

将 293T 细胞接种于六孔板中, 待细胞生长汇合度达到 90% 左右, 用 Lipo8000 进行转染, 将 circSMARCA5 过表达或对照质粒 pLC5、psPAX2、pMD2 按 4、3、2 μg 共转染 293T 细胞, 转染 48 h 后收集病毒液, 用 0.45 μm PVDF 过滤器过滤, 采用超速离心法浓缩慢病毒液, 再将浓缩的病毒液加到细胞中, 使用 qPCR 法检测稳定转染效率。

1.5 CCK-8 法检测 circSMARCA5 过表达对 NSCLC 细胞增殖的影响

将稳定转染的 A549 和 H1975 细胞分为 circSMARCA5 过表达组和对照组, 置于 96 孔板中, 每孔 1×10^3 个细胞, 37 °C 培养 5 d, 加入 CCK-8 液, 反应 2 h, 酶标仪检测波长 450 nm 处的光密度(D)值。

1.6 克隆形成实验检测 circSMARCA5 过表达对 NSCLC 细胞克隆形成的影响

取各组转染细胞按每孔 1×10^3 个细胞接种于六孔板中, 37 °C 培养 14 d 后, PBS 洗涤, 甲醇固定, 结紫染色并拍照, 计数克隆性成数。

1.7 流式细胞术检测 circSMARCA5 过表达对 NSCLC 细胞周期的影响

将各组转染细胞在培养皿中培养, 待细胞汇合度达 80% 左右, 消化收集细胞, PBS 洗涤, 75% 冰乙醇中固定过夜, 加入 RNase A 室温避光反应 30 min, 再加入碘化丙啶(PI)染色, 流式细胞仪检测并分析细胞周期各时相的比例。

1.8 WB 法检测 circSMARCA5 过表达对 NSCLC 细胞中 CCL5 表达的影响

用 RIPA 裂解液裂解细胞, 收集蛋白样品。通过电泳、转膜、封闭, 加入 CCL5 一抗、二抗, 最后使用化学发光成像仪显影成像。

1.9 转录组测序筛选过表达 circSMARCA5 后 A549 细胞中表达显著改变的蛋白质

从 circSMARCA5 过表达或对照的 A549 细胞中分离总 RNA。转录组测序由上海欧易生物医学科技有限公司使用 Illumina Novaseq6000 进行。按 |fold change| > 2 和 FDR < 0.05 筛选差异表达的转录本。

1.10 小鼠皮下成瘤实验检测 circSMARCA5 过表达对 NSCLC 细胞移植瘤生长的影响

5 周龄雄性 BALB/c 裸鼠(5 只/组)和 7 周龄雄性 C57BL/6 小鼠(7 只/组)背部分别注射转染 A549 细胞和 Lewis 细胞(分为 circSMARCA5 过表达和对照

组), 待观察到小鼠皮下肿瘤后, 每 3~5 d 测量肿瘤体积, 当肿瘤体积达到 1500 mm^3 时处死小鼠。剥离皮下移植瘤, 采用免疫组织化学(IHC)或流式细胞术进行分析。所有实验方案均符合江苏省中医院伦理委员会的规定, 并通过南京中医药大学附属医院实验动物研究伦理审查(批件号: 2019DW22-01)。

1.10.1 IHC 检测移植瘤中 Ki67 和 CCL5 的表达

小鼠处死后取出移植瘤样本, 在 10% 甲醛中固定过夜, 石蜡包埋并切片。然后将切片与 Ki67 或 CCL5 抗体反应, 再与二抗反应。最后, 在显微镜下观察、拍照, 抗原含量越多, 分布密度越高, 阳性结果显色则越强。并使用 Image J 软件测定光密度(D)值。

1.10.2 流式细胞术检测移植瘤中 T 细胞亚群的比例

C57 小鼠皮下移植瘤按照肿瘤分离试剂盒(小鼠)说明书消化成单细胞悬液。将单细胞悬液分别加入 CD45-AF 700、CD4-FITC、CD3-VB 和 CD25-PE, 4 °C 反应 15 min, 用染色缓冲液洗涤 2 次后, 用透膜工作液破膜固定细胞, 加入 FOXP3 抗体染色, 继续 4 °C 反应 30 min 后, 洗涤细胞, PBS 重悬, 用流式细胞仪分析 Treg 细胞的比例。

1.11 统计学处理

主要实验独立重复 3 次。采用 GraphPad Prism V7.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验分析组间差异。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circSMARCA5 在 NSCLC 组织中呈高表达

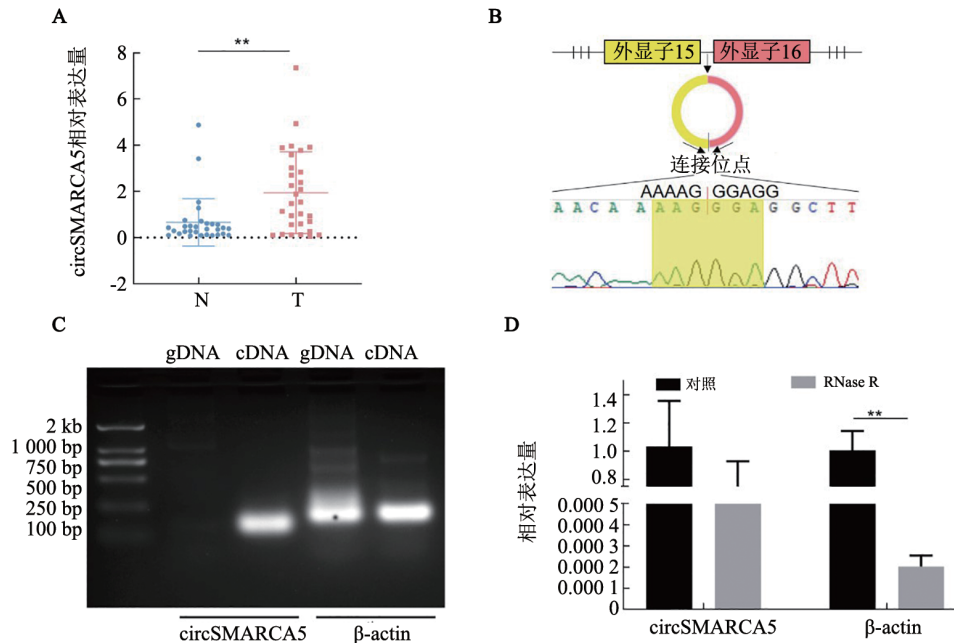
qPCR 检测结果(图 1A)显示, 与癌旁组织相比, 癌组织中 circSMARCA5 的表达水平显著升高($P < 0.01$)。Sanger 测序实验证实了 circSMARCA5 的后剪接位点(图 1B)。利用 NSCLC 细胞 A549 的 mRNA 逆转录而来的互补 DNA(cDNA)或基因组 DNA(gDNA)进行 PCR 和凝胶电泳, 只有以 cDNA 为模板时能够获得特定的 circSMARCA5 扩增产物(269 bp), 而以 gDNA 为模板则不能获得(图 1C)。RNase R 核酸外切酶处理后, circSMARCA5 的表达没有降低, 表明 circSMARCA5 是一种稳定的环状结构 RNA(图 1D)。结果表明, circSMARCA5 呈环形, 在 NSCLC 组织中高表达。

2.2 circSMARCA5 在体外促进 NSCLC 细胞增殖

qPCR 法检测结果显示, 与对照组相比, circSMARCA5 过表达组 A549 和 H1975 细胞中 circSMARCA5 表达分别提高(14.3 ± 1.0)倍和(24.0 ± 0.3)倍, 表达水平显著升高(均 $P < 0.01$)。CCK-8 法检测结

果(图2A)显示, circSMARCA5过表达组 A549 和 H1975 细胞 D_{450} 值均显著高于对照组(均 $P < 0.01$)。克隆形成实验结果(图2B)显示, circSMARCA5过表达组 NSCLC 细胞的克隆数均显著高于对照组[A549细胞: (234.0 ± 24.5) vs (161.3 ± 13.3) 个, $P < 0.05$; H1975细胞: (130.0 ± 3.6)

vs (77.0 ± 5.0) 个, $P < 0.01$]。流式细胞术检测结果(图2C、D)显示, circSMARCA5过表达组 A549 和 H1975 细胞 G0/G1 细胞的比例均显著降低($P < 0.05$)、G2/M 细胞的比例均显著升高($P < 0.01$)。



A: 30 对 NSCLC 组织样本中 circSMARCA5 的表达水平分析, β -actin 作为对照, T: 肿瘤组织, N: 非肿瘤组织; B: 通过 Sanger 测序确定 circSMARCA5 的后剪接位点; C: cDNA 和 gDNA 中 circSMARCA5 的 PCR 分析; D: RNase R 处理后 circSMARCA5 和 β -actin 的 mRNA 水平分析。* $P < 0.01$ 。

图1 circSMARCA5在NSCLC组织和细胞中表达的鉴定

2.3 circSMARCA5在体内促进NSCLC肿瘤的生长

异种移植瘤实验结果(图3A)显示, circSMARCA5过表达组 A549 细胞裸鼠移植瘤质量 $[(0.4 \pm 0.1) \text{ vs } (0.2 \pm 0.1) \text{ g}]$ 和体积均大于对照组(均 $P < 0.01$)。免疫组化染色结果(图3B)显示, circSMARCA5的过表达增加了 Ki-67 阳性细胞的数量, 对照组 D 值显著低于过表达组 $[(0.19 \pm 0.01) \text{ vs } (0.30 \pm 0.02)]$, $P < 0.05$ 。

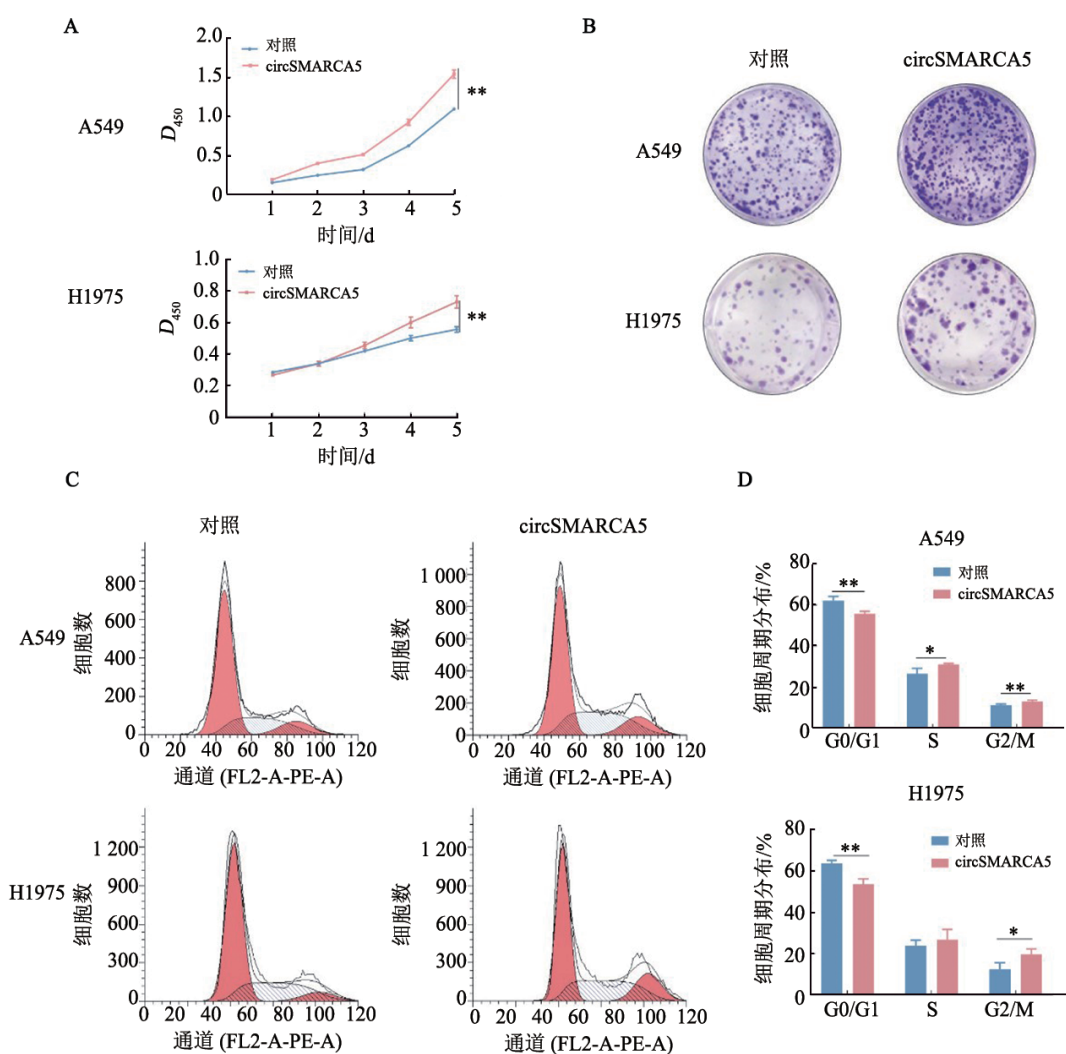
2.4 circSMARCA5通过上调CCL5促进NSCLC细胞增殖

转录组测序结果显示, circSMARCA5过表达组 A549 细胞与对照组中有 904 个表达不同的基因, 其中下调基因 356 个, 上调基因 548 个(图4A、B)。KEGG 和 GO 富集分析显示, 差异基因主要集中在免疫应答通路中(图4C、D), 表明 circSMARCA5 可能对 NSCLC 的免疫微环境至关重要。qPCR 法检测与免疫相关的表达量最高的几个基因, 结果(图4E)显示, CCL5 的表达量最高($P < 0.01$)。WB 法检测结果(图4F)显示, circSMARCA5过表达组 A549 细胞中 CCL5 的表达较对照组上调了 (1.4 ± 0.4) 倍($P < 0.05$)。动物实验结果(图3B)表明, 在 circSMARCA5 过表达组中, 移植瘤的 CCL5 水平较对照组有升高趋势 $[(0.29 \pm$

$0.03) \text{ vs } (0.18 \pm 0.02)]$ 。此外, 分析 TCGA 数据库中数据, 结果(图4G)显示 CCL5 在 NSCLC 最常见的组织学亚型肺腺癌中表达升高。

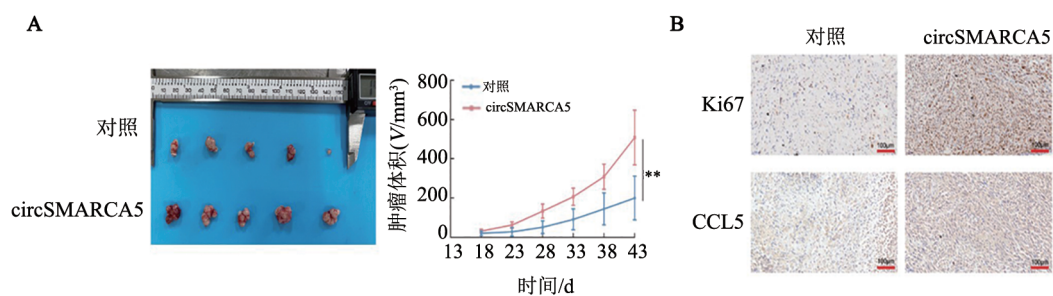
2.5 circSMARCA5通过CCL5免疫富集Treg细胞促进NSCLC细胞增殖

qPCR 法检测结果显示, circSMARCA5过表达组 Lewis 细胞的 circSMARCA5 的表达量为对照组的 (21.5 ± 0.6) 倍, 表达显著升高($P < 0.01$); circSMARCA5 过表达组的 CCL5 表达为对照组的 (17.3 ± 2.0) 倍($P < 0.01$)。WB 法检测结果(图5A)也显示出相似的趋势($P < 0.01$)。C57 小鼠皮下移植瘤实验结果(图5B、C)显示, circSMARCA5 过表达组的移植瘤质量 $[(0.8 \pm 0.2) \text{ vs } (0.4 \pm 0.1) \text{ g}]$ 和体积均显著大于对照组(均 $P < 0.01$); 免疫组化实验检测结果(图5D)显示, circSMARCA5 过表达组的移植瘤组织中 Ki-67 和 CCL5 阳性细胞较对照组有所增加。流式细胞术检测结果(图5E)显示, circSMARCA5 过表达组和对照组皮下移植瘤组织中 $CD4^+$ T 细胞的百分比无显著差异 $[(71.3 \pm 14.0)\% \text{ vs } (67.6 \pm 8.3)\%]$, 而 circSMARCA5 过表达组的 Treg 细胞比例显著升高 $[(3.1 \pm 0.5)\% \text{ vs } (1.0 \pm 0.1)\%, P < 0.01]$ 。



A、B: CCK-8(A)和克隆形成实验(B)检测过表达 circSMARCA5 对 A549 和 H1975 细胞活力的影响; C、D: 流式细胞术分析 circSMARCA5 过表达 对 A549 和 H1975 细胞细胞周期的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 circSMARCA5 过表达促进 NSCLC 细胞的增殖



A: A549 细胞裸鼠皮下移植瘤的体积 ($n=5$ 只/组); B: circSMARCA5 过表达组和对照组肿瘤的免疫组化分析, 比例尺=100 μm 。** $P < 0.01$ 。

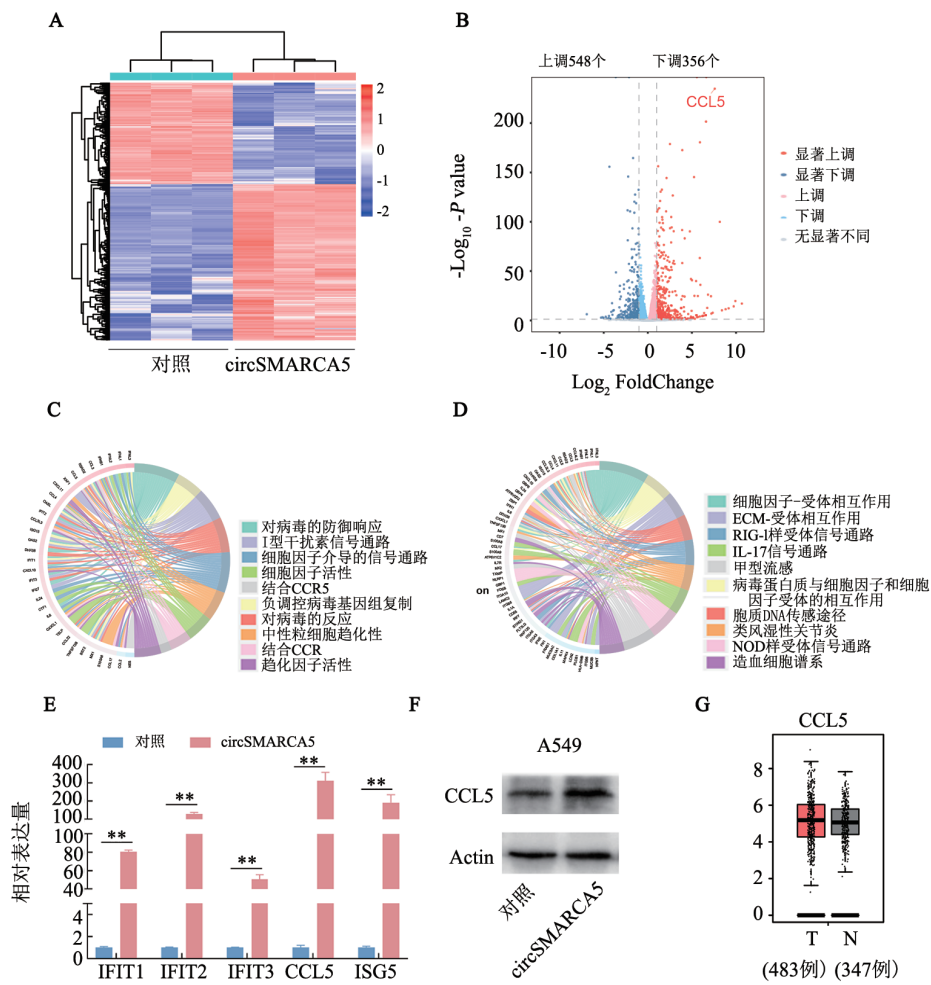
图3 circSMARCA5 过表达促进 NSCLC 细胞小鼠移植瘤的生长

3 讨论

近年来, circRNA 的研究取得了显著进展, 许多 circRNA 已被证实在多种恶性肿瘤中发挥作用, 尤其是肺癌。越来越多的研究^[11-12]表明, circRNA 在肿瘤免疫中发挥重要作用。本研究验证了 circSMARCA5 的环

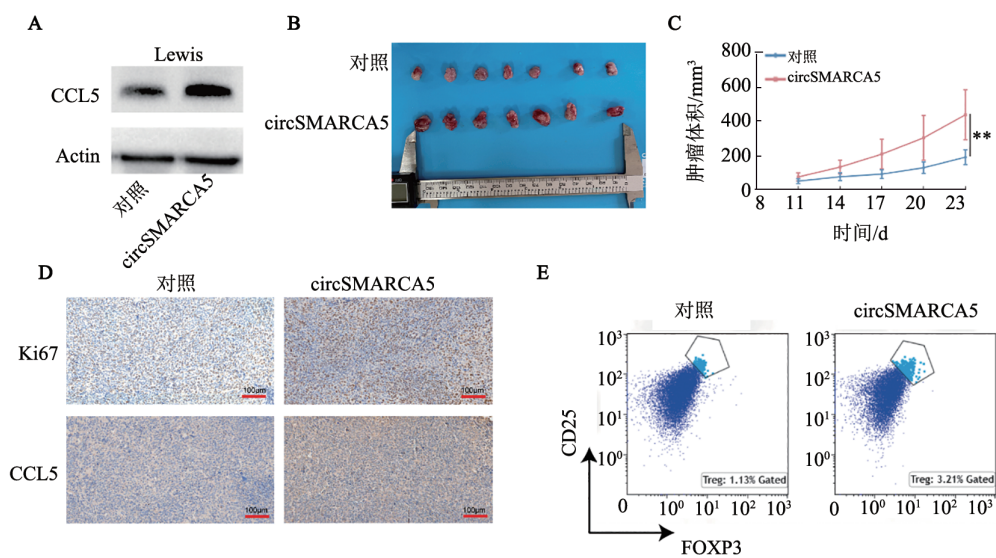
状结构, 并证实 circSMARCA5 在 NSCLC 组织中呈高表达; 体内外研究表明, 过表达 circSMARCA5 后可以促进 NSCLC 细胞的增殖和细胞周期的进程。

circSMARCA5 是一个抑癌基因或癌基因, 在不同的恶性肿瘤中异常表达^[13]。既往对 circSMARCA5 的研究集中在其与各种 miRNA 结合^[14-15], 或与 RNA 结合蛋



A、B:分析对照组和circSMARCA5过表达组的组间差异表达基因绘制的热图(A)和火山图(B);C、D:差异表达基因的KEGG和GO富集分析;E:在A549细胞(circSMARCA5过表达组)中,通过qPCR验证5个与免疫相关的表达量最高的基因;F:通过qPCR和WB实验验证A549细胞(circSMARCA5过表达组)中CCL5的表达量;G:通过TCGA数据库中数据分析CCL5在肺癌组织(T)和非肿瘤组织(N)中的表达。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

图4 转录组测序鉴定 circSMARCA5 靶基因为 CCL5



A:WB法验证 circSMARCA5过表达组Lewis细胞中CCL5的表达量;B、C:从C57小鼠分离的Lewis细胞皮下移植瘤的体积和质量($n=7$ 只小鼠/组);D:circSMARCA5过表达组和对照组肿瘤组织中Ki67和CCL5表达的免疫组化分析;E:流式细胞术检测C57小鼠皮下移植瘤中CD3⁺/CD4⁺细胞的比例($n=5$)。 $**P<0.01$ 。

图5 circSMARCA5通过CCL5促进Treg细胞富集

白相互作用调节下游表达基因^[16-17]。然而, circSMARCA5 在肿瘤免疫学领域的生物学功能和机制尚未见报道。本研究通过高通量测序技术, 经 KEGG 和 GO 分析, 发现 circSMARCA5 的下游靶基因主要调控免疫相关通路, 其中与免疫相关基因中 CCL5 的表达量最高。CCL5 是位于 17 号染色体上的趋化因子基因, 它可以通过富集免疫 Treg 细胞在肿瘤免疫逃逸中发挥关键作用, 从而促进肿瘤细胞增殖^[18-19]。CCL5 在肿瘤微环境中高表达, CCL5 不仅能促进人类和小鼠肿瘤发展^[20-22], 还参与肿瘤免疫抑制和肿瘤微环境的形成^[23]。本研究发现, CCL5 在 Treg 细胞的募集中起关键作用, 而 Treg 细胞在 NSCLC 肿瘤微环境中可以帮助癌细胞逃避免疫监视, 促进肿瘤进展^[24-26]。有研究^[18]发现, CCL5 通过免疫富集 Treg 细胞进入肿瘤微环境, 增强其杀伤 CD8⁺ T 细胞的能力, 抑制肿瘤免疫微环境, 促进结肠癌进展。本研究发现, 在 NSCLC 中 circSMARCA5 的过表达导致了更多的 Treg 细胞被 CCL5 聚集, 促进了肿瘤细胞的增殖和免疫逃逸。因此, 阻断和(或)去除 Treg 细胞可能增强抗肿瘤免疫, 但更多关于 CCL5 和 Treg 细胞作用机制的细节仍需进一步研究。

总之, Treg 细胞是研究抗肿瘤免疫和潜在靶点的重要细胞, 而 circSMARCA5 可通过 CCL5 免疫富集 Treg 细胞, 促进 NSCLC 的进展, 这为 NSCLC 的潜在治疗生物标志物提供了新的靶点。

[参 考 文 献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] HERBST R S, MORGENZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454. DOI: 10.1038/nature25183.
- [3] PATOP I L, WÜST S, KADENER S. Past, present, and future of circRNAs[J/OL]. *EMBO J*, 2019, 38(16): e100836[2023-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31343080/>. DOI: 10.15252/embj.2018100836.
- [4] CHEN L L, YANG L. Regulation of circRNA biogenesis[J]. *RNA Biol*, 2015, 12(4): 381-388. DOI: 10.1080/15476286.2015.1020271.
- [5] HONG W J, XUE M, JIANG J, *et al.* Circular RNA circ-CPA4/let-7 miRNA/PD-L1 axis regulates cell growth, stemness, drug resistance and immune evasion in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 149[2023-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32746878/>. DOI: 10.1186/s13046-020-01648-1.
- [6] XU Y J, ZHAO J M, GAO C, *et al.* Hsa_circ_0136666 activates Treg-mediated immune escape of colorectal cancer via miR-497/PD-L1 pathway[J/OL]. *Cell Signal*, 2021, 86: 110095[2023-01-12]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110095>. DOI: 10.1016/j.cellsig.2021.110095.
- [7] TAKEUCHI Y, NISHIKAWA H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity[J]. *Int Immunol*, 2016, 28(8): 401-409. DOI: 10.1093/intimm/dxw025.
- [8] TANAKA A, SAKAGUCHI S. Targeting Treg cells in cancer immunotherapy[J]. *Eur J Immunol*, 2019, 49(8): 1140-1146. DOI: 10.1002/eji.201847659.
- [9] TANAKA A, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy[J]. *Cell Res*, 2017, 27(1): 109-118. DOI: 10.1038/cr.2016.151.
- [10] SAITO T, NISHIKAWA H, WADA H, *et al.* FOXP3⁺CD4⁺ T-cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers [J]. *Nat Med*, 2016, 22(6): 679-684. DOI: 10.1038/nm.4086.
- [11] WEI C Y, ZHU M X, LU N H, *et al.* Circular RNA circ_0020710 drives tumor progression and immune evasion by regulating the miR-370-3p/CXCL12 axis in melanoma[J/OL]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 84[2023-01-12]. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-020-01191-9>. DOI: 10.1186/s12943-020-01191-9.
- [12] CAO P, MA B, SUN D, *et al.* hsa_circ_0003410 promotes hepatocellular carcinoma progression by increasing the ratio of M2/M1 macrophages through the miR-139-3p/CCL5 axis[J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(2): 634-647. DOI: 10.1111/cas.15238.
- [13] XUE C N, WEI J X, LI M N, *et al.* The emerging roles and clinical potential of circSMARCA5 in cancer[J/OL]. *Cells*, 2022, 11(19): 3074[2023-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36231036/>. DOI: 10.3390/cells11193074.
- [14] YU J, XU Q G, WANG Z G, *et al.* Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(6): 1214-1227. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.012.
- [15] YANG S W, GAO S Y, LIU T M, *et al.* Circular RNA SMARCA5 functions as an anti-tumor candidate in colon cancer by sponging microRNA-552[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(7): 689-701. DOI: 10.1080/15384101.2021.1899519.
- [16] BARBAGALLO D, CAPONNETTO A, BREX D, *et al.* CircSMARCA5 regulates VEGFA mRNA splicing and angiogenesis in glioblastoma multiforme through the binding of SRSF1[J/OL]. *Cancers*, 2019, 11(2): 194[2023-01-12]. <https://doi.org/10.3390/cancers11020194>. DOI: 10.3390/cancers11020194.
- [17] BARBAGALLO D, CAPONNETTO A, CIRNIGLIARO M, *et al.* CircSMARCA5 inhibits migration of glioblastoma multiforme cells by regulating a molecular axis involving splicing factors SRSF1/SRSF3/PTB[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 480 [2023-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29415469/>. DOI: 10.3390/ijms19020480.
- [18] CHANG L Y, LIN Y C, MAHALINGAM J, *et al.* Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF- β -mediated killing of CD8(+) T cells in colon cancer by T-regulatory cells[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(5): 1092-1102. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2493.
- [19] WANG X, LANG M, ZHAO T, *et al.* Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3⁺ Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncogene*, 2017, 36(21): 3048-3058. DOI: 10.1038/onc.2016.458.
- [20] HUANG C Y, FONG Y C, LEE C Y, *et al.* CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF- κ B pathways[J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(5): 794-803. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.11.014.
- [21] TAN M C B, GOEDEGEBUURE P S, BELT B A, *et al.* Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor

- growth in a murine model of pancreatic cancer[J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1746-1755. DOI: 10.4049/jimmunol.182.3.1746.
- [22] SORIA G, BEN-BARUCH A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2008, 267(2): 271-285. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.03.018.
- [23] ALDINUCCI D, BORGHESE C, CASAGRANDE N. The CCL5/CCR5 axis in cancer progression[J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(7): 1765 [2023-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32630699/>. DOI: 10.3390/cancers12071765.
- [24] STOCKIS J, ROYCHOUDHURI R, HALIM T Y F. Regulation of regulatory T cells in cancer[J]. *Immunology*, 2019, 157(3): 219-231. DOI: 10.1111/imm.13064.
- [25] ZAYNAGETDINOV R, STATHOPOULOS G T, SHERRILL T P, *et al.* Epithelial nuclear factor- κ B signaling promotes lung carcinogenesis via recruitment of regulatory T lymphocytes[J]. *Oncogene*, 2012, 31(26): 3164-3176. DOI: 10.1038/onc.2011.480.
- [26] WEI T F, ZHANG J, QIN Y H, *et al.* Increased expression of immunosuppressive molecules on intratumoral and circulating regulatory T cells in non-small-cell lung cancer patients[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(7): 2190-2201.

[收稿日期] 2023-02-06

[修回日期] 2023-06-20

[本文编辑] 黄静怡