

• 妇儿临床诊断与实验医学专题 •

circFAM169A 在儿童肝母细胞瘤中的表达水平和临床价值

金依颖^{1,2}, 潘秋辉^{1,2△}

1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心检验科, 上海 200127; 2. 上海交通大学医学院医学技术学院, 上海 200025

摘要:目的 探讨 circFAM169A 在儿童肝母细胞瘤(HB)中的表达特征、生物学功能及其潜在分子机制。方法 采用实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 circFAM169A 在 HB 患儿临床组织及细胞系中的表达水平。通过体外功能实验(流式细胞术、CCK-8 实验、克隆形成实验)及体内裸鼠成瘤实验,评估 circFAM169A 对细胞凋亡、增殖及肿瘤生长的影响。利用免疫印迹法和 qPCR 分析 circFAM169A 对 DNA 损伤应答通路关键分子表达的影响。通过双荧光素酶报告基因实验、qPCR 及免疫印迹法验证,探究其作为微小 RNA(miRNA)海绵的竞争性内源 RNA 的机制。结果 circFAM169A 在 HB 患儿组织及细胞系中特异性高表达,且独立于其亲本基因 FAM169A。敲低 circFAM169A 可显著抑制细胞增殖与克隆形成,并诱导细胞凋亡,在体内同样有效抑制肿瘤生长。机制上,干扰 circFAM169A 可激活 DNA 损伤应答通路。circFAM169A 可直接吸附 miR-1253,从而解除 miR-1253 对其下游靶基因 CDK6 的抑制作用,形成 circFAM169A/miR-1253/CDK6 功能轴。结论 circFAM169A 在 HB 中作为致癌分子,通过抑制 DNA 损伤应答、circFAM169A/miR-1253/CDK6 轴驱动肿瘤进展,是有潜力的诊断标志物,该研究结果可为 HB 患儿的靶向治疗提供理论依据。

关键词:环状 RNA; 肝母细胞瘤; DNA 损伤应答; 生物标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2026.09.002 中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2026)09-1032-09

文献标志码:A

Expression levels and clinical significance of circFAM169A in pediatric hepatoblastoma

JIN Yiyang^{1,2}, PAN Qiuhui^{1,2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 2. College of Health Science and Technology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Abstract: Objective To investigate the expression characteristics, biological functions, and potential molecular mechanisms of circFAM169A in pediatric hepatoblastoma (HB). **Methods** The expression levels of circFAM169A in clinical HB tissues and cell lines were detected using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Through in vitro functional experiments (flow cytometry, CCK-8 experiment, and colony formation assays) and in vivo tumor xenograft experiments in nude mice, the effects of circFAM169A on apoptosis, proliferation, and tumor growth were evaluated. Western blotting and qPCR were employed to analyze the impact of circFAM169A on the expression of key molecules in the DNA damage response pathway. Dual-luciferase reporter assays, along with qPCR and Western blotting, were used to investigate its mechanism as a competitive endogenous RNA sponge for microRNA (miRNA). **Results** CircFAM169A was specifically over-expressed in tissues of HB patients and cell lines, independent of its parental gene FAM169A. Knockdown of circFAM169A significantly inhibited cell proliferation and colony formation while inducing apoptosis, with similar effects observed in vivo to suppress tumor growth. Mechanistically, interference with circFAM169A activated the DNA damage response pathway. Further studies revealed that circFAM169A directly binded to miR-1253, thereby relieving inhibitory effect of miR-1253 on its downstream target gene CDK6, forming the circFAM169A/miR-1253/CDK6 functional axis. **Conclusion** This study elucidates the role of circFAM169A as an oncogenic molecule in HB, driving tumor progression by suppressing the DNA damage response and the circFAM169A/miR-1253/CDK6 axis. It identifies circFAM169A as a potential diagnostic biomarker and pro-

vides a theoretical basis for targeted therapy in HB patients.

Key words: circular RNA; hepatoblastoma; DNA damage response; biomarker

儿童肝母细胞瘤(HB)是一种由肝细胞发育异常引起的罕见胚胎肝肿瘤,最常见于 5 岁以下的儿童,占儿童肝脏原发肿瘤的 80% 以上^[1]。HB 起病隐匿但进展迅速,大多数患儿在早期阶段无症状。尽管手术联合新辅助化疗显著改善了患儿的总体生存率,局部疾病的 5 年生存率可达 80%~90%^[2],但复发、转移及化疗耐药的高危型患者生存率仍较低,成为临床治疗的棘手难题。甲胎蛋白(AFP)是一种在胎儿发育过程中正常产生的糖蛋白,是 HB 重要的肿瘤标志物,但其也常见于良性肝病和健康婴儿,因此特异度较低^[3]。有研究发现,5%~10% 的 HB 患者会出现 AFP 水平降低^[4],这表明 AFP 作为 HB 生物标志物的作用有限,早期检测 HB 仍然具有挑战性。目前对 HB 无限增殖、侵袭转移和耐药性等的深层分子机制理解仍不全面,这极大地限制了对高危患儿的精准诊断和有效治疗策略的开发。因此,理解 HB 恶性演进的分子基础并识别有效的生物标志物,将有助于早期诊断 HB、开发治疗方法及改善 HB 患者的预后。

在过去 10 年里,非编码核糖核酸(RNA)因其在致癌和癌症进展中的作用而受到广泛关注。环状 RNA(circRNA)作为哺乳动物体内广泛表达的新型内源性 RNA,其特征是通过反向剪接事件形成共价闭环结构和发育过程中组织特异性的表达模式^[5]。由于其高丰度、稳定性和独特的表达模式,circRNA 在多种生物过程中发挥重要的调控作用(包括肿瘤发育和耐药性)。有研究发现,circRNA 参与多种生理与病理生理过程,例如调控可变剪接^[6],作为微小 RNA(miRNA)海绵^[7],可调节蛋白质-RNA 相互作用^[8],以及在转录水平调控亲本基因^[9]。近年来,许多 circRNA 被发现在结直肠癌^[10]、肝细胞癌^[11]和胃癌^[12]等癌种中存在异常表达,并在癌症发生过程中发挥重要作用。

在儿童 HB 中,ZHEN 等^[13]通过 circRNA 测序识别出 3 395 个在 HB 与配对非肿瘤肝组织之间差异表达的 circRNA,表明 HB 组织中 circRNA 表达水平显著改变,提示其在 HB 发生过程中可能发挥重要作用。本研究聚焦于在 HB 组织中显著上调的 hsa_circ_0004405,其源自具有序列相似性的家族 169 成员 A (FAM169A) 基因(circFAM169A),旨在探究其在 HB 中的表达特征、功能及潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源 本研究共纳入来自上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心外科的 26 对 HB 肿瘤组织和癌旁非肿瘤肝组织,其中男 17 例,女 9 例;年龄

1.4~7.8 岁,平均 3.6 岁。纳入标准:(1)经病理确诊为 HB;(2)年龄≤18 岁;(3)接受肝切除术;(4)术前未进行放疗或化疗。排除标准:合并其他恶性肿瘤或严重肝病。本研究已获得上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心伦理委员会批准(批件号:SCM-CIRB-K2023075-1),患儿法定监护人代理签署书面知情同意书。

1.2 仪器与试剂 上海赛默飞世尔公司提供 Applied Biosystems™ ProFlex™ PCR 系统,QuantStudio Dx 实时荧光定量 PCR(qPCR)仪器,BD Biosciences 提供 BD Fortessa 流式细胞分析仪,瑞士 TECAN 公司提供 Tecan Infinite® 200Pro 多功能酶标仪。美国 Gibco 公司提供血清、抗菌药物、细胞培养基,上海赛默飞世尔公司提供 Lipofectamine 2000,宝日生物技术有限公司提供逆转录及 qPCR 试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司提供 RNA 提取试剂盒。上海碧云天生物技术有限公司提供 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、CCK-8 试剂、双荧光素酶报告基因实验检测试剂盒,Abcam 公司提供抗体。

1.3 方法

1.3.1 临床标本处理 肿瘤及癌旁组织标本于术中采集后,立即液氮冷冻,-80℃ 保存。RNA 提取前将组织研磨成末,使用 RNA 提取试剂盒按说明书操作以获取组织 RNA。

1.3.2 circFAM169A 环化位点及相互作用的蛋白质和 miRNA 使用 circbase 数据库(<https://www.circbase.org/>)预测 circFAM169A 环化位点。使用 CircInteractome 工具(<https://circinteractome.nia.nih.gov/>)探究与 circFAM169A 相互作用的蛋白质和 miRNA。

1.3.3 细胞培养 人 HB 细胞系 HepG2 和 HUH6、人正常肝细胞系 QSG-7701、人胚肾细胞系 293T 来源于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞培养采用含有 10% 的胎牛血清及 1% 的青霉素/链霉素的 DMEM 培养基,培养环境为 37℃、5% CO₂、饱和湿度。细胞培养至汇合度为 80%~90% 时,采用胰酶消化,制成单细胞悬液后按 1:5 的比例传至新培养基中。

1.3.4 寡核苷酸转染与慢病毒转导 miRNA 模拟物和小干扰 RNA(siRNA)由 GenePharma 化学设计合成(siNC:敲低对照组;sicircFAM169A-1/sicircFAM169A-2:针对 circFAM169A 的两条不同 siRNA,敲低组-1/敲低组-2)。根据制造商的说明,使用

Lipofectamine 2000 用寡核苷酸转染 HepG2 和 HUH6 细胞。使用 circFAM169A 的短发夹 RNA (shRNA) 和对照慢病毒(广州吉赛生物科技有限公司)构建 circFAM169A 稳定敲除细胞系(lv_sh_NC: 稳定敲低对照组; lv_sh_circFAM169A: 稳定敲低组)。使用 pLCDH-ciR 载体慢病毒(广州吉赛生物科技有限公司, lv_vector: 过表达对照组; lv_circ-

FAM169A: 过表达组)构建 circFAM169A 过表达细胞系。

1.3.5 qPCR 使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为互补脱氧核糖核酸, 使用 qPCR 试剂盒按说明书配制反应体系。以 18S rRNA 为内参进行标准化。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物对名称	正向引物(5'-3')	反向引物(3'-5')	产物大小(bp)
circFAM169A	TCATGTATACAGAGGATGGCATT	TTCAGGGTCCCCACACCTTA	—
FAM169A	GTGGATATGCTGGAAAATTGCAG	CAGGGTCCCCACACCTTAAAT	85
18S	CAGCCACCCGAGATTGAGCA	TAGTAGCGACGGCGGTGTG	324
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	123
U1	ATACAGTGGTCAGGAAGGG	CATGTGGAGAAATCGCAGG	85
53BP1	ATGGACCCTACTGGAAGTCAG	TTTCTTTGTGCGTCTGGAGATT	166
RNF8	CCCGGCTTCTTCGTCACAG	ACCTCGCACCCATCTTCCA	104
RAD51	CAACCCATTTACAGGTTAGAGC	TTCTTTGGCGCATAGGCAACA	107
RAD50	TTTGTTGGACCAATGGGG	CAGGAGGAAATCTCCAGTACAA	80
CDK6	TCTTCATTACACCGAGTAGTGC	TGAGGTTAGAGCCATCTGAAA	130

注: —表示无数据。

1.3.6 亚细胞定位分析 使用 PARIS Kit(上海赛默飞世尔公司)分离 HepG2 细胞的细胞质和细胞核组分, 提取 RNA 后进行 qPCR。以 18S rRNA 和 GAPDH mRNA 为细胞质标志物, U1 snRNA 为细胞核标志物, 计算 circFAM169A 的相对富集情况。

1.3.7 细胞凋亡检测 对于瞬转敲减 circFAM169A 细胞和对照细胞, 取 50 000~100 000 重悬细胞, 1 000×g 离心 5 min, 弃上清液, 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC, 轻轻混匀。加入 10 μL 碘化丙啶(PI)染色液, 轻轻混匀。室温避光孵育 20 min, 随后置于冰浴中并避光, 用于流式细胞仪检测。

1.3.8 克隆形成实验 取处于对数生长期的细胞, 用 0.25% 胰酶消化后, 制成单细胞悬液, 进行细胞计数, 将敲低对照组细胞和敲低组细胞按照每孔 500 个细胞密度接种于 24 孔板, 每组设 3 个复孔。连续培养 7~10 d, 至产生肉眼可见的细胞克隆团时终止培养, 期间可补充适量培养基维持细胞生长。弃去每孔培养基, 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次, 每孔加入适量 4% 多聚甲醛, 室温固定 15 min; 弃去固定液, 用 PBS 清洗 2 次, 每孔加入适量 0.1% 结晶紫溶液, 室温染色 20 min。染色完成后用流水清洗, 晾干, 对每个孔单独拍照。

1.3.9 CCK-8 实验 取处于对数生长期的细胞, 用 0.25% 胰酶消化后, 制成单细胞悬液, 进行细胞计数,

将敲低对照组细胞和敲低组细胞按照每孔 1 000 个细胞/100 μL 完全培养基的密度接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔。培养过夜至细胞贴壁后, 弃去培养基, 新鲜配制 CCK-8 工作液, 按每孔 10 μL CCK-8 溶液和 90 μL 新鲜完全培养基比例, 每孔 100 μL 工作液加入 96 孔板中, 37 °C 孵育 2 h 后, 于 450 nm 波长处检测每孔吸光度值(A)₄₅₀, 即为第 0 天数值; 之后每隔 24 h 检测一次, 连续检测至第 4~6 天, 绘制细胞增殖曲线。

1.3.10 免疫印迹法 使用细胞裂解液将细胞在冰上裂解 30 min。预冷离心机至 4 °C, 以 12 000×g 离心 10 min, 收集上清液。使用二辛可宁酸(BCA)法蛋白定量试剂盒测量蛋白质浓度。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质提取物, 并转印到硝酸纤维素膜上。将膜在 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 并分别与目标蛋白抗体及 GAPDH(1:1 000)一抗于 4 °C 孵育过夜; 使用磷酸盐-吐温缓冲液(PBST)于 2D 摇摆式摇床上摇摆清洗 10 min, 重复 3 次, 随后与相应二抗(1:1 000)室温孵育 1 h, 以同样方式 PBST 清洗 3 次。用增强型化学发光显影液对条带进行显影, 检测目的蛋白表达水平。

1.3.11 裸鼠成瘤实验 选取无特定病原体级 BALB/C-nu 无胸腺雄性裸鼠(以避免雌性激素对肿瘤生长的潜在影响), 共 6 只, 4~6 周龄, 于同一小鼠左右两侧腹股沟中上部分别接种 500 万个稳定敲低对照细胞和 circFAM169A 稳定敲低 HUH6 细胞。

自接种后第 7 天起,每 4 天测量一次肿瘤体积并绘制生长曲线。实验终点时处死裸鼠并剥离肿瘤,分别对小鼠及肿瘤拍照,量取肿瘤重量。肿瘤的体积(V)由长径(L)与短径(W)按照如下公式计算: $V(\text{mm}^3) = 1/2(L \times W^2)$ 。本研究实验动物福利伦理理由上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心实验动物福利伦理委员会审查批准(批准号 SCMC-LAWEC-2021-111)。

1.3.12 双荧光素酶报告基因实验 包含 miR-1253、miR-583 和 miR-136-5p 结合位点的 circ-FAM169A 全长序列、CDK6 的 3'-非翻译区(3'-UTR)野生型和突变型序列,在双荧光素酶质粒 psi-CHECK2 载体(擎科生物)中克隆至海肾荧光素酶基因下游,分别构建 psiCHECK2-circFAM169A 载体、psiCHECK2-CDK6-3'-UTR 野生型和突变型载体。293T 细胞在转染前 24 h 接种于 24 孔板,加入 $0.8 \mu\text{g}$ psiCHECK2-circFAM169A 载体、psiCHECK2-CDK6-3'-UTR 载体,并加入 20 pmol 的 miRNA 模拟物或阴性对照(miR-NC),使用 Lipofectamine 2000 共转染入细胞。转染 48 h 后,使用双荧光素酶报告基因实验检测试剂盒检测萤火虫和海肾荧光素酶信号,分析海肾/萤火虫荧光信号比值。

1.4 统计学处理 使用 GraphPad Prism9.5 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t 检验,不符合正态分布时,以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用 Wilcoxon 检验;方

差不齐时,采用 Welch's t 检验,其余计量资料两组间比较采用独立样本 t 检验,3 组及以上数据采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circFAM169A 在 HB 中异常高表达 FAM169A 基因定位于人类 5 号染色体,493 个碱基对的 circFAM169A 由其反向剪接形成,其环化位点预测见图 1。qPCR 结果显示,在 26 对配对 HB 及癌旁非肿瘤肝组织中,相比于癌旁组织[0.13(0.01, 0.57)],HB 组织[16.08(2.44, 56.24)]中 circ-FAM169A 表达水平较高($U = 56.000, P < 0.05$)。在人 HB 细胞系 HUH6(141.39 ± 21.93)和 HepG2(928.61 ± 53.19)中,其表达水平均高于人正常肝细胞 QSG-7701($t = 8.795, 24.560$, 均 $P < 0.05$)。相较于人正常肝细胞 QSG-7701[0.94(0.87, 1.23)],circ-FAM169A 的亲本基因 FAM169A 信使 RNA(mRNA)水平在 HB 细胞系 HUH6[1.15(0.81, 1.20)]、HepG2[1.22(0.14, 1.47)]中比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。在亚细胞定位分析中,内参基因 18S 与 GAPDH 多分布于细胞质(占比分别为 77.8%、73.9%),而 U1 主要定位于细胞核(占比 82.3%)。circFAM169A 在 HepG2 细胞中呈核、质双定位模式,其中细胞核组分占比 55.4%,细胞质组分占比 44.6%。

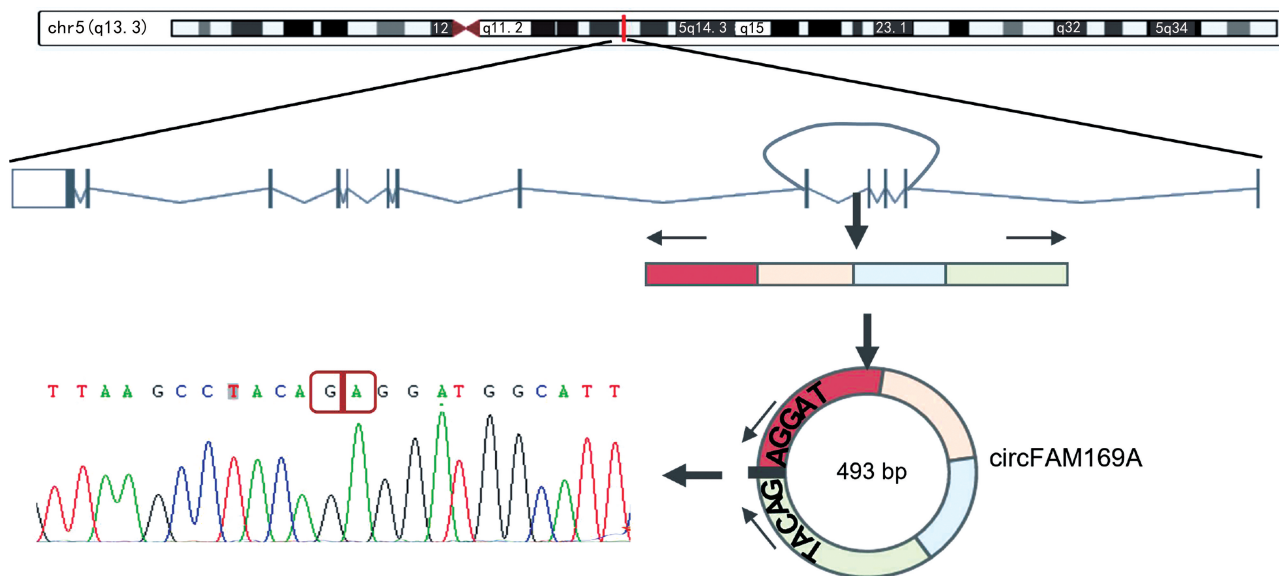


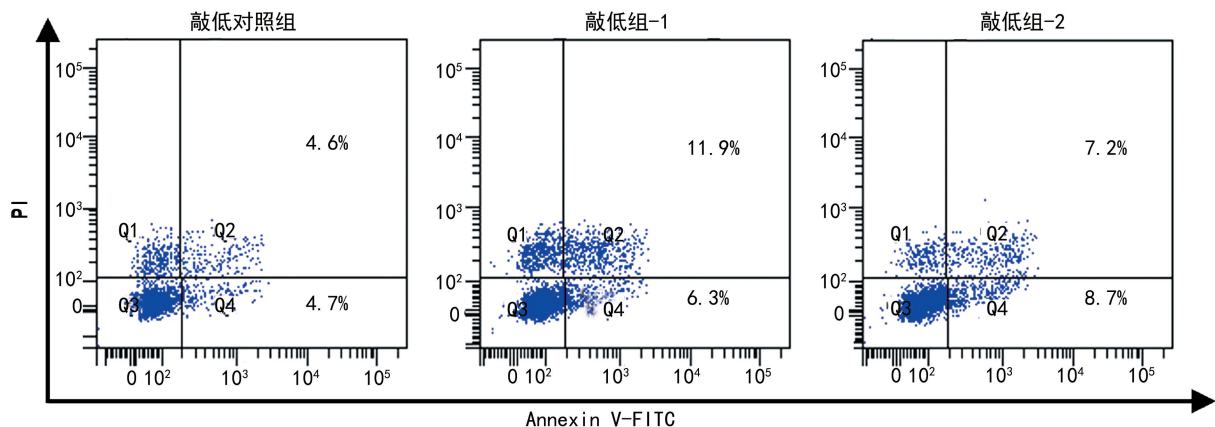
图 1 FAM169A 基因定位及 circFAM169A 剪接环化位点示意图

2.2 circFAM169A 促进 HB 细胞增殖并抑制凋亡 qPCR 结果显示,在 HepG2 细胞中,相较于敲低对照组(1.00 ± 0.10),敲低组-1(0.07 ± 0.02)和敲低组-2(0.12 ± 0.01)的 circFAM169A 表达水平降低($t =$

$13.20, 12.62$, 均 $P < 0.05$),而线性 FAM169A mRNA 水平比较差异均无统计学意义(敲低对照组: 1.00 ± 0.09 ; 敲低组-1: $1.28 \pm 0.06, t = 3.423, P = 0.076$; 敲低组-2: $0.82 \pm 0.03, t = 3.849, P = 0.061$)。

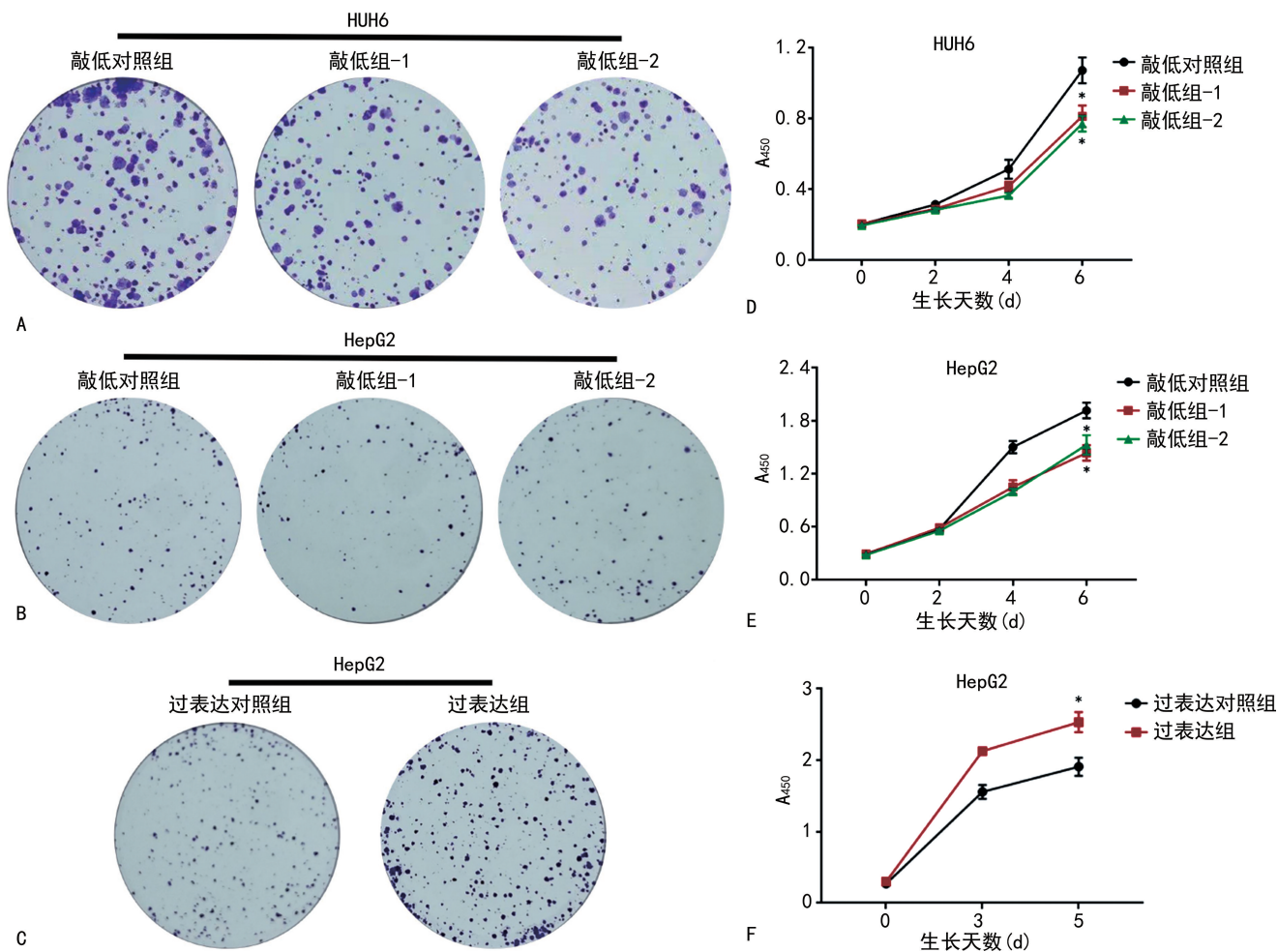
同时, HepG2 细胞过表达组 (17.95 ± 0.80) 的 circ-FAM169A 表达水平相较于过表达对照组 (0.98 ± 0.02) 升高 ($t = 36.760, P < 0.05$)。流式细胞术检测发现, circFAM169A 敲低组细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$), 见图 2。克隆形成实验进一步表明, circ-

FAM169A 敲低组克隆形成能力削弱, 而过表达组克隆形成能力增强。CCK-8 实验的结果与之一致, circ-FAM169A 敲低组细胞增殖被抑制, 而过表达组细胞增殖增强。见图 3。



注: FITC 标记的 Annexin V 作为检测磷脂酰丝氨酸的探针, 使早期凋亡细胞显示绿色荧光; PI 标记死细胞, 即活细胞呈 Annexin V-FITC/PI 双阴性(Q3), 早期凋亡细胞呈 Annexin V-FITC 单阳性(Q4), 晚期凋亡细胞和坏死细胞呈 Annexin V-FITC/PI 双阳性(Q2), 裸细胞核呈 PI 单阳性(Q1)。

图 2 circFAM169A 抑制 HepG2 细胞凋亡

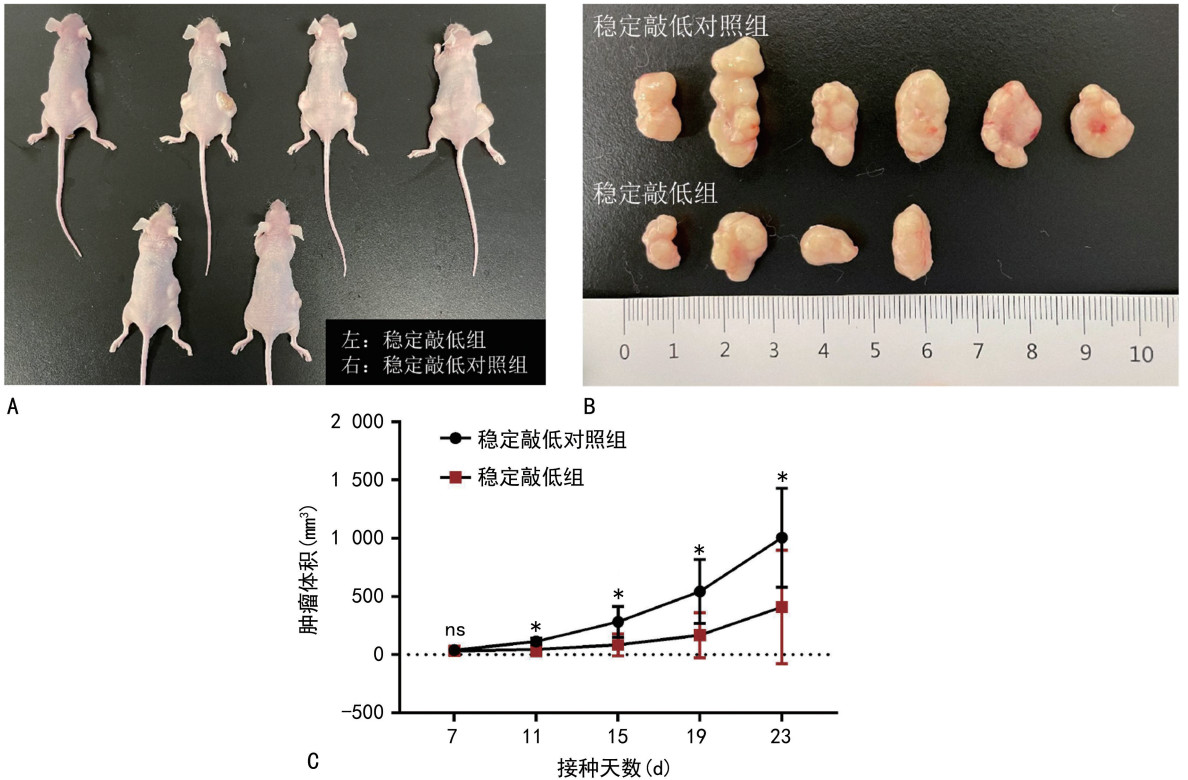


注: A、B、C 为克隆形成实验结果, D、E、F 为 CCK-8 实验统计结果; 与相应对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 circFAM169A 促进 HB 细胞增殖

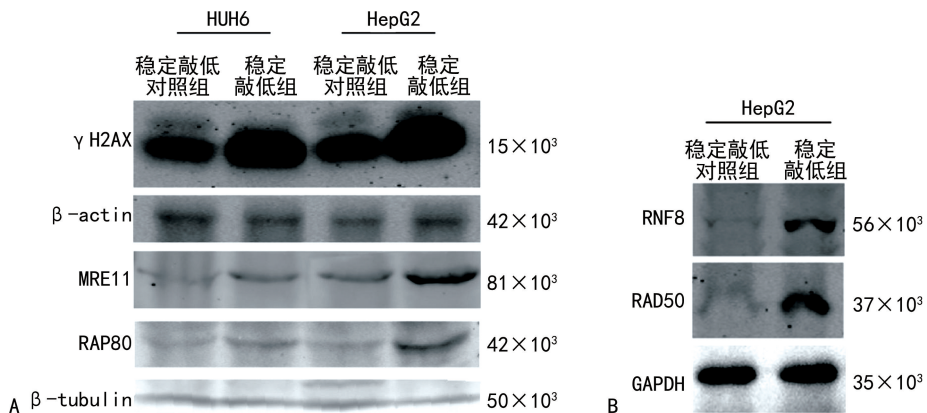
2.3 干扰 circFAM169A 抑制 HB 细胞体内增殖 通过 qPCR 验证 HUH6 细胞的 circFAM169A 敲低效率, 稳定敲低对照组相对表达量 (1.01 ± 0.10), 稳定敲低组 (0.07 ± 0.01) ($t = 12.800, P < 0.05$)。用这两组 HUH6 细胞进行裸鼠成瘤实验, 稳定敲低对照组肿瘤体积明显大于稳定敲低组。肿瘤生长曲线显示, 从接种后第 11 天起, 稳定敲低对照组肿瘤体积大于稳定敲低组 ($P < 0.05$), 且此差异持续至实验终点。实验结束时, 稳定敲低对照组 [$(0.62 \pm 0.16)g$] 的肿瘤重量也高于稳定敲低组 [$(0.26 \pm 0.20)g, t = 4.634, P < 0.05$]。见图 4。

2.4 HB 中 circFAM169A 与 DNA 损伤有关 免疫印迹法结果显示, 稳定敲低组 HB 细胞中, DNA 双链断裂标志物磷酸化组蛋白 H2AX (γ H2AX)、同源重组修复通路核心蛋白 RAD51 和双链断裂修复核酸酶 (MRE11), 以及介导损伤信号传导与修复因子招募的受体相关蛋白 80 (RAP80) 和无名指蛋白 8 (RNF8) 表达均上调, 见图 5。在转录水平上, qPCR 结果显示, 稳定敲低组 HepG2 细胞中肿瘤蛋白 p53 结合蛋白 1 (53BP1) 及 RNF8 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$), 见表 2。



注: A 为成瘤裸鼠照片, 每一裸鼠靠照片左侧接种稳定敲低组 HUH6 细胞, 右侧接种稳定敲低对照组细胞; B 为剥离肿瘤照片; C 为肿瘤生长曲线, 与稳定敲低对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 干扰 circFAM169A 抑制 HB 细胞体内增殖



注: A、B 为稳定敲低对照组和 circFAM165A 稳定敲低组 HB 细胞中相应蛋白的免疫印迹条带; 图 A 中 γ H2AX 以 β -actin 作为内参, MRE11、RAP80 以 β -tubulin 作为内参。

图 5 HB 中 circFAM165A 与 DNA 损伤相关标志物分析

2.5 circFAM169A 是多种 miRNA 的分子海绵 运用在线工具 CircInteractome 进行预测,初步筛选出 miR-1253、miR-583 和 miR-136-5p 作为 circFAM169A 的潜在结合 miRNA。双荧光素酶报告基因实验结果显示,相较于阴性对照组(miR-NC, 荧光信号比值为 1.26 ± 0.11), miR-1253 组(0.73 ± 0.03 , $t = 6.718, P < 0.05$)、miR-583 组($0.66 \pm 0.03, t = 7.598, P < 0.05$)和 miR-136-5p 组($0.70 \pm 0.04, t = 6.693, P < 0.05$)的荧光信号比值降低。通过 TargetScan 预测上述 miRNA 的潜在靶基因,并在稳定敲低 circFAM169A 的 HUH6 细胞中,通过 qPCR 检测了 9 个候选靶基因的表达。结果显示,多个候选靶基因在稳定敲低组中表达下调($P < 0.05$),见表 3。qPCR 结果显示,相较于癌旁组织 [$0.04 (0.03,$

$0.07)$], miR-1253 的预测靶基因周期蛋白依赖性激酶 6 (CDK6) mRNA 水平在 HB 肿瘤组织中升高 [$24.51(117.49, 137.50), U < 0.001, P < 0.05$]。

双荧光素酶报告基因实验显示,与 miR-1253 模拟物共转染后,CDK6-3' UTR 突变型载体 (0.59 ± 0.02)的荧光信号比值相较于野生型载体 (0.34 ± 0.02)升高($t = 11.51, P < 0.05$)。在 HB 细胞中过表达 miR-1253 后,CDK6 蛋白表达水平下降,见图 6。

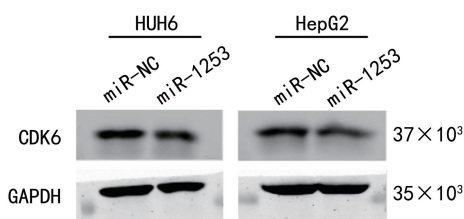
表 2 DNA 损伤相关基因表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	53BP1	RNF8	RAD50
稳定敲低对照组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.01 ± 0.10
稳定敲低组	2.12 ± 0.03	2.00 ± 0.03	1.23 ± 0.10
<i>t</i>	29.790	44.300	2.197
<i>P</i>	<0.001	<0.001	0.093

表 3 候选靶基因相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	HuR	BTRC	CBX4	AGO1
稳定敲低对照组	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.01
稳定敲低组	0.85 ± 0.02	0.59 ± 0.03	1.19 ± 0.02	0.65 ± 0.01
<i>t</i>	8.076	14.160	6.339	34.600
<i>P</i>	0.001	<0.001	0.003	<0.001

组别	MAPK1	TET3	TPNO1	SRSF1	CDK6
稳定敲低对照组	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04
稳定敲低组	0.78 ± 0.02	0.70 ± 0.01	0.70 ± 0.01	0.57 ± 0.04	0.60 ± 0.02
<i>t</i>	5.130	14.430	6.530	10.770	11.680
<i>P</i>	0.007	<0.001	0.003	<0.001	<0.001



注:图为 HepG2、HUH6 细胞系中转染相应 miRNA 后的 CDK6 免疫印迹条带。

图 6 miR-1253 负调控 CDK6

3 讨论

HB 是儿童期最常见的肝脏恶性肿瘤,全球发病率约为每年 1.5/1 000 000 例,呈逐年上升趋势^[1],其发生发展机制复杂,目前仍缺乏高灵敏度与高特异度的诊断与预后监测标志物。有学者致力于整合大规模队列数据(如监测、流行病学和结局数据库、儿童肝病国际协作组织及其他特定人群队列),旨在基于临床特征开发预测图谱以提升 HB 的诊断效能^[14-17]。尽管目前研究取得了一些进展,仅基于临床特征的诊断模型虽能提供宝贵的统计学见解,但却无法准确预

测个体预后的情况。本研究系统性地揭示了 circFAM169A 在 HB 中的关键致癌作用,并深入阐释了其通过充当“分子海绵”吸附 miR-1253 从而解除对 CDK6 抑制的全新分子轴,为理解 HB 的发病机制及开发新的诊疗策略提供了重要依据。

本研究结果发现 circFAM169A 在 HB 组织及细胞系中的特异性高表达,确立了 circFAM169A 作为 HB 致癌分子的基础,而且其作用可能独立于 FAM169A。亚细胞定位分析结果揭示 circFAM169A 在细胞质和细胞核中的富集程度较为相当(44.6% vs. 55.4%),这为其功能研究提供了定位基础。在功能上,实验证实 circFAM169A 是驱动 HB 细胞恶性生长的关键分子,干扰其表达可显著抑制细胞增殖、克隆形成并诱导细胞凋亡,而在体内则能有效遏制肿瘤生长;其高表达可增强 HB 细胞的增殖活力,这确立了 circFAM169A 的致癌基因身份。在机制层面,一方面, circFAM169A 的促 HB 作用可能与抑制细胞内的 DNA 损伤应答有关,干扰 circ-

FAM169A 后, DNA 损伤标志物 γ H2AX、RAD50、MRE11 及其上游调控分子 RNF8、53BP1 等均在转录或蛋白水平上调。这提示在 circFAM169A 高表达的 HB 中, 基础的 DNA 损伤修复能力可能受到抑制, 从而导致基因组不稳定性的累积, 加速肿瘤演进。另一方面, circFAM169A 通过吸附 miR-1253、miR-583 和 miR-136-5p 等多种 miRNA, 扮演了“分子海绵”的角色。考虑到干扰 circFAM169A 可激活 DNA 损伤应答通路, 笔者进一步聚焦于细胞周期调控蛋白 CDK6 和 circFAM169A/miR-1253/CDK6 信号轴进行了深入验证。双荧光素酶报告基因实验证实了 circFAM169A 与 miR-1253, 以及 miR-1253 与 CDK6 3'-UTR 之间的靶向关系。功能上, circFAM169A 可作为竞争性内源 RNA (ceRNA) 与 miRNA 竞争结合 CDK6 mRNA。干扰 circFAM169A 解除了其对 miR-1253 的吸附, 使游离的 miR-1253 得以抑制其下游靶基因 CDK6 的表达。CDK6 作为关键的细胞周期调控蛋白, 其表达下调可直接导致 G₁ 期阻滞, 从而抑制细胞增殖^[18], 这解释了为何敲低 circFAM169A 会抑制肿瘤生长。这种机制关联为理解 circFAM169A 高表达为何与肿瘤恶性进展相关提供了分子解释, 也提示未来可以将 circFAM169A 与基因组不稳定性评分等指标联合, 构建更为精准的预后预测模型。因此, ceRNA 机制是 circFAM169A 促进 HB 进展的核心途径之一。

此外, ceRNA 机制与 DNA 损伤应答激活之间可能存在关联。已知细胞周期检查点与 DNA 损伤应答紧密关联, 细胞周期进程的异常往往是引发 DNA 损伤应激的重要原因^[19]。CDK6 作为细胞周期的核心驱动因子, 其表达受 miR-1253 调控, 可能间接影响细胞周期的运行。因此, circFAM169A/miR-1253/CDK6 轴的紊乱可能通过干扰细胞周期稳态, 间接导致 DNA 损伤的累积与修复通路的激活, 从而遏制肿瘤进展。当然, circFAM169A 是否还通过吸附其他 miRNA (如 miR-583、miR-136-5p) 来影响不同的信号网络, 从而共同协调其促癌效应, 是未来需要深入探索的方向。

上述结论表明 circFAM169A 可作为一种极具潜力的新型分子生物标志物。circFAM169A 在 HB 中独立于其亲本基因特异性高表达, 极大地增加了其作为诊断标志物的特异性, 能够有效避免线性转录本带来的背景干扰, 从而在区分癌组织与正常组织时提供更高的信噪比。此外, 其相对均衡的细胞核/细胞质定位特性不仅提示了其可能通过“海绵吸附”miRNA 等方式行使其促癌功能, 也预示着其更容易被分泌到

细胞外环境中, 为后续开发基于血液或其他体液的液体活检技术提供了理论依据。circRNA 本身固有的结构稳定性, 使其在临床标本的储存、运输和检测过程中更具优势, 进一步提升了其转化为实用诊断工具的可行性。

当然, 本研究仍存在一定局限性。circFAM169A 在 HB 中具体的下游作用靶点, 例如其直接相互作用的 miRNA 或蛋白质, 仍需进一步鉴定。此外, 其在血清或血浆中的实际检出效能, 与临床分期、AFP 水平的相关性及独立预后价值, 有待在前瞻性、大规模临床队列中进行验证。

综上所述, 本研究不仅从功能与机制上阐明了 circFAM169A 在 HB 中的致癌作用, 更着重凸显了其作为一种理想的新型诊断与预后生物标志物的巨大潜力, 其肿瘤特异性、表达独立性、结构稳定性及与核心恶性表型的强关联性, 共同构成了其迈向临床转化的坚实基础。后续研究将致力于开发便捷的 circFAM169A 检测方法, 并深入评估其在 HB 患儿个体化诊疗中的应用价值。

参考文献

- [1] PIO L, O'NEILL A F, WOODLEY H, et al. Hepatoblastoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2025, 11: 36.
- [2] SRINIVASAN S, PRASAD M, PARAMBIL B C, et al. Treatment outcomes and prognostic factors in children with hepatoblastoma using a risk-stratified approach[J]. Pediatr Blood Cancer, 2023, 70(7): e30302.
- [3] XIE Y, CUI Z, FANG S, et al. Anti-ferroptotic PRKAA2 serves as a potential diagnostic and prognostic marker for hepatoblastoma[J]. J Gastrointest Oncol, 2023, 14(4): 1788-1805.
- [4] FAZLOLLAHI L, HSIAO S J, KOCHHAR M, et al. Malignant rhabdoid tumor, an aggressive tumor often misclassified as small cell variant of hepatoblastoma[J]. Cancers, 2019, 11(12): 1992.
- [5] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINIOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. Nature, 2013, 495(7441): 333-338.
- [6] ASHWAL-FLUSS R, MEYER M, PAMUDURTI N R, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. Mol Cell, 2014, 56(1): 55-66.
- [7] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495(7441): 384-388.
- [8] DU W W, YANG W, LIU E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44

(6);2846-2858.

- [9] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(3):256-264.
- [10] BAI L, GAO Z, JIANG A, et al. Circular noncoding RNA circ_0007334 sequesters miR-577 to derepress KLF12 and accelerate colorectal cancer progression [J]. *Anticancer Drugs*, 2022, 33(1):e409-e422.
- [11] TANG Y, YUAN F, CAO M, et al. CircRNA-mTOR promotes hepatocellular carcinoma progression and lenvatinib resistance through the PSIP1/c-myc axis [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(20):2410591.
- [12] XIE M, YU T, JING X, et al. Exosomal circSHKBP1 promotes gastric cancer progression via regulating the miR-582-3p/HUR/VEGF axis and suppressing HSP90 degradation [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):112.
- [13] ZHEN N, GU S, MA J, et al. CircHMGCS1 promotes hepatoblastoma cell proliferation by regulating the IGF signaling pathway and glutaminolysis [J]. *Theranostics*, 2019, 9(3):900-919.
- [14] WANG S, FU S, LI R, et al. Construction and validation of nomogram prognostic model for predicting survival in hepatoblastoma patients: a population-based study [J].

Updates Surg, 2024, 76(4):1223-1234.

- [15] MEYERS R L, MAIBACH R, HIYAMA E, et al. Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(1):122-131.
- [16] YANG Y, ZHOU Z, LI Y. MRI-based deep learning model for differentiation of hepatic hemangioma and hepatoblastoma in early infancy [J]. *Eur J Pediatr*, 2023, 182(10):4365-4368.
- [17] WANG K, DONG S S, ZHANG W, et al. Incidence trends and a nomogram for predicting overall survival in children with hepatoblastoma: a population-based analysis [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2025, 51(6):109694.
- [18] GOEL S, BERGHOLZ J S, ZHAO J J. Targeting CDK4 and CDK6 in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(6):356-372.
- [19] FAN H, LIU W, ZENG Y, et al. DNA damage induced by CDK4 and CDK6 blockade triggers anti-tumor immune responses through cGAS-STING pathway [J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1):1041.

(收稿日期:2025-06-21 修回日期:2025-11-19)

(上接第 1031 页)

- [30] HUANG Q, CHEN B, SHEN J, et al. Encoding fluorescence anisotropic barcodes with DNA frameworks [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(28):10735-10742.
- [31] CAO X, CHEN F, XUE J, et al. Hierarchical DNA branch assembly-encoded fluorescent nanoladders for single-cell transcripts imaging [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(3):e13.
- [32] DENG R, ZHANG K, WANG L, et al. DNA-sequence-encoded rolling circle amplicon for single-cell RNA imaging [J]. *Chem*, 2018, 4(6):1373-1386.
- [33] LIN C, JUNGSMANN R, LEIFER A M, et al. Submicrometre geometrically encoded fluorescent barcodes self-assembled from DNA [J]. *Nat Chem*, 2012, 4(10):832-839.
- [34] DIRKS R M, PIERCE N A. Triggered amplification by hybridization chain reaction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(43):15275-15278.
- [35] ZHAO Y, CHEN F, LI Q, et al. Isothermal amplification of nucleic acids [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(22):12491-12545.
- [36] ASKARY A, SANCHEZ-GUARDADO L, LINTON J M, et al. In situ readout of DNA barcodes and single base edits facilitated by in vitro transcription [J]. *Nat Biotech-*

nol, 2020, 38(1):66-75.

- [37] SUNDAH N R, HO N R Y, LIM G S, et al. Barcoded DNA nanostructures for the multiplexed profiling of subcellular protein distribution [J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(9):684-694.
- [38] WEI W, DAI W, YANG F, et al. Spatially resolved, error-robust multiplexed microRNA profiling in single living cells [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61(20):e202116909.
- [39] CHEN F, XUE J, BAI M, et al. Lighting up nucleic acid modifications in single cells with DNA-encoded amplification [J]. *Acc Chem Res*, 2022, 55(16):2248-2259.
- [40] SAKA S K, WANG Y, KISHI J Y, et al. Immuno-SABER enables highly multiplexed and amplified protein imaging in tissues [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(9):1080-1090.
- [41] AKHOUNDOVA D, RUBIN M A. Clinical application of advanced multi-omics tumor profiling: shaping precision oncology of the future [J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(9):920-938.
- [42] RAMANI N, FIGG C A, ANDERSON A J, et al. Spatially-encoding hydrogels with DNA to control cell signaling [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(36):e2301086.

(收稿日期:2025-07-02 修回日期:2025-10-30)