·环境与职业卫生·

环状 RNA hsa_circ_0058493 在砷诱导肺细胞凋亡中的机制研究

段婷芝，杨雪飞，陈斌，杨净超，杨欣达，赵青云，何越峰
云南省公共卫生与生物安全重点实验室，昆明医科大学公共卫生学院，云南 昆明 650500

摘要：目的　本研究旨在探讨环状 RNA hsa_circ_0058493 在砷暴露诱导肺细胞凋亡中的作用机制。**方法**　以 A549 和 BEAS-2B 细胞为研究对象，用不同浓度亚砷酸钠（$NaAsO_2$）染毒细胞，通过 CCK-8 法测定 $NaAsO_2$ 的半抑制浓度（half-maimal inhibitory concentration,IC_{50}）。采用 RT-qPCR 检测三种砷形态（$NaAsO_2$、MMA、DMA）对 hsa_circ_0058493 表达的影响。利用 siRNA 下调 hsa_circ_0058493 后，采用 CCK-8、JC-1 染色、Hoechst 33342/PI 双染法检测细胞活力、线粒体膜电位及细胞凋亡情况，Western blotting 检测 JAK2/STAT3 通路及相关蛋白表达。**结果**　$NaAsO_2$ 显著降低细胞存活率（A549 IC_{50}=35.03 μmol/L，BEAS-2B IC_{50}=7.809 μmol/L），并且 $NaAsO_2$ 可诱导 hsa_circ_0058493 表达升高（$P<0.05$），而 MMA 和 DMA 处理未见显著影响。下调 hsa_circ_0058493 可导致细胞活力下降、线粒体膜电位去极化、细胞凋亡率升高（$P<0.05$）。蛋白检测结果显示，下调 hsa_circ_0058493 抑制 JAK2/STAT3 通路磷酸化水平，并下调 c-Myc、CyclinD1、XIAP、BCL-2 蛋白表达（$P<0.05$）。下调 hsa_circ_0058493 后用 $NaAsO_2$ 处理细胞，细胞存活率进一步降低，且 STAT3 蛋白表达在两个细胞中不同。**结论**　下调 hsa_circ_0058493 可引起细胞活力下降和凋亡，这些效应与 JAK2/STAT3 通路活性抑制相关。hsa_circ_0058493 可能通过调控 JAK2/STAT3 信号通路参与砷诱导肺细胞凋亡。

关键词：砷；hsa_circ_0058493；细胞凋亡；STAT3 信号通路
中图分类号：Q522；R734.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1003-8507（2026）01-53-09
DOI：10.20043/j.cnki.MPM.202505155

Mechanistic study of circular RNA hsa_circ_0058493 in arsenic-induced apoptosis of lung cells

DUAN Ting-zhi, YANG Xue-fei, CHEN Bin, YANG Jing-chao, YANG Xin-da, ZHAO Qing-yun, HE Yue-feng
Yunnan Provincial Key Laboratory of Public Health and Biosecurity & School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China

Abstract: Objective This study aims to investigate the mechanism by which circular RNA hsa_circ_0058493 mediates arsenic exposure-induced apoptosis in lung cells. **Methods** A549 and BEAS-2B cells were exposed to different concentrations of sodium arsenite ($NaAsO_2$), and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of $NaAsO_2$ was determined by the CCK-8 assay. The effects of three arsenic species ($NaAsO_2$, MMA, DMA) on hsa_circ_0058493 expression were analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). After silencing hsa_circ_0058493 with siRNA, cell viability, mitochondrial membrane potential, and apoptosis were evaluated using CCK-8, JC-1 staining, and Hoechst 33342/PI double staining, respectively. The JAK2/STAT3 signaling pathway and related protein expression were assessed by Western blotting. **Results** $NaAsO_2$ significantly reduced cell viability (IC_{50}: 35.03 μmol/L for A549, 7.809 μmol/L for BEAS-2B) and specifically induced the upregulation of hsa_circ_0058493 ($P<0.05$), while MMA and DMA showed no significant effects. Downregulating hsa_circ_0058493 reduced cell viability, depolarized mitochondrial membrane potential, and increased apoptosis ($P<0.05$). Western blotting showed that depleting hsa_circ_0058493 suppressed JAK2/STAT3 phosphorylation and downregulated c-Myc, CyclinD1, XIAP, and BCL-2 expression levels ($P<0.05$). After downregulating hsa_circ_0058493, cells were treated with $NaAsO_2$, resulting in a further decrease in cell viability, and STAT3 protein expression differed between the two cell lines. **Conclusion** Downregulation of hsa_circ_0058493 induced decreased cell viability and apoptosis, which were associated with inhibition of JAK2/STAT3 pathway activity, suggesting that hsa_circ_0058493 may be involved in arsenic-induced lung cell apoptosis by regulating the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Keywords: Arsenic; hsa_circ_0058493; Apoptosis; STAT3 signaling pathway

基金项目：国家自然科学基金(82160607)；云南省科技研究计划(202401AT070177)；云南省创新团队(202405AS350016)；昆明医科大学创新团队(CXTD202201)；昆明医科大学硕士研究生教育创新基金(J114150330366)

作者简介：段婷芝（2000—），女，硕士在读，研究方向：劳动与环境卫生
通信作者：何越峰，E-mail:heyuefeng@kmmu.edu.cn

砷是一种广泛存在于自然环境中的有毒类金属，长期暴露可导致呼吸系统损伤甚至肺癌等严重疾病[1-2]。流行病学数据表明，即使低至中等浓度（＜150 μg/L）的砷暴露也可显著增加肺癌发病与死亡风险[3]，这已成为全球范围内重大的公共卫生问题。现有研究表明，砷可通过诱发氧化应激、破坏线粒体功能、引起内质网应激以及异常激活信号通路等多种机制诱导细胞凋亡[4-5]。其中，氧化应激介导的 DNA 损伤和 p53 通路激活等机制已较为明确[6]，但非编码 RNA［尤其是环状 RNA（circRNA）］在砷诱导肺细胞凋亡过程中的调控作用与分子机制仍缺乏研究。

circRNA 是一类具有共价闭合环状结构的 RNA 分子，其高稳定性和组织特异性表达特征使其在多种疾病的发生发展中发挥重要作用。hsa_circ_0058493 是由 *RHBDD1* 基因的第 4 和第 5 外显子区域反向剪接形成，其序列长度为 656 bp，定位于 chr2:227729319-227732034[7]。目前已发现 hsa_circ_0058493 在多种疾病中发挥重要作用：在慢性粒细胞白血病中，hsa_circ_0058493 通过分子海绵效应参与耐药表型调控，为疾病的诊疗提供潜在靶点[7]；在肝细胞癌中，hsa_circ_0058493 经 m^6A 修饰及核质转运调控定位于细胞质，通过激活促癌信号通路加速肿瘤增殖与转移[8]；hsa_circ_0058493 在肺纤维化患者血清中高表达，提示该 circRNA 可能作为疾病的潜在诊断标志物[9]。目前尚未有研究探讨 hsa_circ_0058493 在砷暴露诱导肺细胞凋亡中的作用机制，hsa_circ_0058493 在砷毒性中是否存在其他功能模式也值得深入探索。

JAK-STAT 信号通路广泛参与免疫调控、细胞增殖与凋亡、肿瘤发生等过程[10]。已有研究证实，砷暴露可通过 METTL3 介导的 SOCS3 m^6A 修饰、或直接激活受体酪氨酸激酶等途径，异常上调 STAT3 水平，进而影响细胞存活[11]。值得注意的是，近年研究发现 circRNA 常通过直接或间接调控 JAK2/STAT3 通路影响疾病进程，例如 Circ_0072088 通过 miR-375 激活 JAK2/STAT3 信号通路促进肝癌进展[12]。而下调 CircRNA 104633 可抑制 JAK2/STAT3 通路减轻痛风性关节炎炎症与高凝状态[13]。据此，我们推测 hsa_circ_0058493 可能通过调控 JAK2/STAT3 通路参与砷诱导的肺细胞凋亡过程。

基于上述研究背景，本研究以 A549 和 BEAS-2B 细胞为模型，通过体外实验明确 $NaAsO_2$ 暴露对 hsa_circ_0058493 表达的影响，探究其在砷诱导肺细胞凋亡中的功能及可能的分子机制，旨在填补相关研究空白、拓展砷毒理学研究维度，为砷致肺疾病的诊疗提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人肺腺癌细胞系（A549 细胞，中国科学院昆明动物研究所）、人支气管上皮细胞系（BEAS-2B 细胞，中国科学院昆明动物研究所）。

1.2 主要仪器与试剂 恒温培养箱（美国 Thermo Forma 公司）；酶标仪（美国 Bio Tek 公司）；研究级荧光倒置显微镜（江西凤凰 phenix 光学股份有限公司）；聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）仪（美国 Bio-Rad 公司）；实时荧光定量 PCR 反应仪（德国 Roche 公司）；蛋白显影成像仪（上海嘉鹏科技有限公司）；1640 培养基、MEM 培养基（美国 Corning 公司）；亚砷酸钠（$NaAsO_2$）（纯度≥99.0%，成都西亚试剂公司）；一甲基胂酸（MMA）、二甲基胂酸（DMA）（纯度均≥99.0%，美国 AccuStandard 公司）；逆转录试剂（康为世纪生物科技有限公司）；RFect 试剂（常州百代生物公司）；siRNA 片段（吉玛公司）；β-actin 单克隆抗体、c-Myc 鼠单克隆抗体、STAT3 鼠单克隆抗体、BCL-2 鼠单克隆抗体、XIAP 鼠单克隆抗体（Proteintech 公司）；p-JAK2（Y1007+Y1008）兔单克隆抗体、JAK2 兔单克隆抗体、p-STAT3（Y705）兔单克隆抗体、CyclinD1 兔单克隆抗体（杭州华安生物科技有限公司）。

1.3 细胞传代与培养 用 T25 瓶培养 A549 和 BEAS-2B 细胞，恒温培养箱条件：5%CO_2，37℃。A549 细胞使用 1640 完全培养基（包含 10%胎牛血清和 1%青链霉素混合液），BEAS-2B 细胞使用 MEM 完全培养基。每日观察细胞生长状态，当细胞生长密度达到 80%左右时，使用胰酶消化细胞进行传代操作。

1.4 细胞染毒及活力检测 取对数生长期细胞，接种于 96 孔板，接种密度为 3 000 个 / 孔，培养 26 h 后加 $NaAsO_2$ 染毒处理，分别以终浓度为 0、10、20、30、40、60 和 80 μmol/L 的 $NaAsO_2$ 处理 A549 细胞，以终浓度为 0、2、4、6、8 和 10 μmol/L 的 $NaAsO_2$ 处理 BEAS-2B 细胞，设空白组，染毒 48 h 后加入 CCK-8 试剂，酶标仪测定吸光度值，计算细胞存活率，并计算两个细胞的 $NaAsO_2$ 半抑制浓度（half-maximal inhibitory concentration，IC_{50}）。取对数生长期细胞，接种于 6 孔板，接种密度为 2.0×10^5 个 / 孔，培养 26 h 后分组染毒。以 $NaAsO_2$ 终浓度为 10、20 和 30 μmol/L 以及 DMA（30 μmol/L）、MMA（30 μmol/L）分别对 A549 细胞进行染毒，以 $NaAsO_2$ 终浓度为 2、4 和 6 μmol/L 以及 DMA（6 μmol/L）、MMA（6 μmol/L）分别对 BEAS-2B 细胞进行染毒，仅加培养液处理组作为对照组，染毒 48 h 后提取 RNA。

1.5 cDNA 合成和目的基因表达检测 根据 1.4 步骤将细胞接种于 6 孔板并分组染毒处理后，使用

Trizol 裂解液提取总 RNA，使用逆转录试剂合成 cDNA，反应条件为：26℃预热 5 min，42℃孵育 45 min，85℃孵育 5 min，10℃冷却 2 min。以上述制备的 cDNA 为模板，使用 RT-qPCR 法检测目的基因表达，内参基因为管家基因 β- 肌动蛋白（ACTB），条件为 95℃预变性 520 s；95℃变性 10 s、60℃退火 10 s、72℃延伸 10 s，扩增 40 个循环，以 $2^{-\triangle\triangle ct}$ 计算目的基因的相对表达量，引物序列见表 1。

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequences

基因	正向引物序列（5 ' ~3 ' ）	反向引物序列（5 ' ~3 ' ）
β-actin	GCCGAGGACTTTGATTGCAC	TGGACTTGGGAGAGGACTGG
*hsa_circ*_0058493	GCAACGGAGATCAAGAGGGA	TATTCTCACCAGGGTTCAGC

1.6　细胞转染及 siRNA 沉默效率验证　取对数生长期细胞分别接种于 96 孔板（接种密度为 2 000 个 / 孔）或 6 孔板（接种密度为 1.0×10^5 个 / 孔），培养 18 h，使用 RFect 转染试剂转染 siRNA 片段，序列见表 2，分别设置对照（negative control，NC）组、siRNA#1 组、siRNA#2 组，转染 24 h 后换完全培养基，继续培养 48 h 进行后续实验。将细胞接种于 6 孔板转染后，同 1.5 步骤对 hsa_circ_0058493 表达进行检测，验证 siRNA 沉默效率。

表 2　siRNA 干扰片段序列

Table 2　siRNA interference fragment sequence

基因	正义链（5 ' ~3 ' ）	反义链（5 ' ~3 ' ）
Negative control	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
siRNA#1	UUAUUCUCACCAGGGUUCATT	UGAACCCUGGUGAGAAUAATT
siRNA#2	AUUCUCACCAGGGUUCAGCTT	GCUGAACCCUGGUGAGAAUTT

1.7　细胞活力检测及线粒体膜电位检测　接种 96 孔板，细胞密度：2 000 个 / 孔，同 1.6 步骤转染后，检测细胞存活率。同上，将细胞接种于 96 孔板并转染后，以 1 μl 的 JC-1（100X）试剂加入 1 ml 空白培养基的比例配制 JC-1 工作液，每孔加入 60 μl 的 JC-1 工作液，37℃孵育 15 min，酶标仪测定荧光强度，计算红 / 绿荧光强度比。

1.8　Hoechst 33342/ 碘化丙啶（propidiumiodide，PI）染色　接种 6 孔板（接种密度为 1×10^5 个 / 孔），同 1.6 步骤转染后，配置 HO-PI 工作液（HO 与 PI 的比例为 1 ∶ 1）对细胞进行染色，每孔加入 1 ml 的 HO-PI 工作液，常温避光孵育 15 min，观察细胞凋亡情况用荧光显微镜，每个视野分别记录可见光、蓝色和红色荧光下细胞形态，拍照结束后选取 3 个视野计算不同组细胞凋亡率，凋亡率 =（凋亡细胞数 / 视野内总细胞数）× 100%。

1.9　蛋白免疫印记法　将细胞接种于 6 孔板并转染后，加入蛋白酶抑制剂和裂解液提取细胞总蛋白，测定蛋白浓度并计算上样量。将蛋白样品与上样缓冲液混合，加热变性后进行 SDS-PAGE 电泳分离。电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上，使用快速封闭液封闭 20 min。使用针对目标蛋白的一抗进行孵育，（p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3、c-Myc、CyclinD1、XIAP、BCL-2、β-actin）一抗 4℃过夜孵育，之后加入二抗孵育 2 h。使用化学发光检测试剂盒进行显影图像采集。对显影后的条带进行灰度值分析，通过灰度值计算蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值 / 内参蛋白灰度值。

1.10　下调 hsa_circ_0058493 后给予 $NaAsO_2$ 处理　为探究下调 hsa_circ_0058493 对 $NaAsO_2$ 诱导肺细胞凋亡的调控作用，设置两个分组：（1）单独 hsa_circ_0058493 下调组（si-circ 组）：分别将细胞接种于 96 孔板或 6 孔板，A549/BEAS-2B 细胞培养 18 h 后转染 siRNA，24 h 后换完全培养基，继续培养 48 h；（2）hsa_circ_0058493 下调 +$NaAsO_2$ 处理组（si-circ+$NaAsO_2$ 组）：A549/BEAS-2B 细胞培养 18 h 后转染 siRNA，24 h 后更换含 $NaAsO_2$（A549：30 μmol/L；BEAS-2B：6 μmol/L）的培养基，继续培养 48 h。培养结束后检测细胞存活率及目的蛋白表达。

1.11　数据统计分析　采用 SPSS 软件对数据统计分析。计量资料满足正态分布，采用两独立样本 t 检验，多组间比较，采用单因素方差分析，并进一步两两比较。样本率的比较使用 χ^2 检验。检验水准 α=0.05。

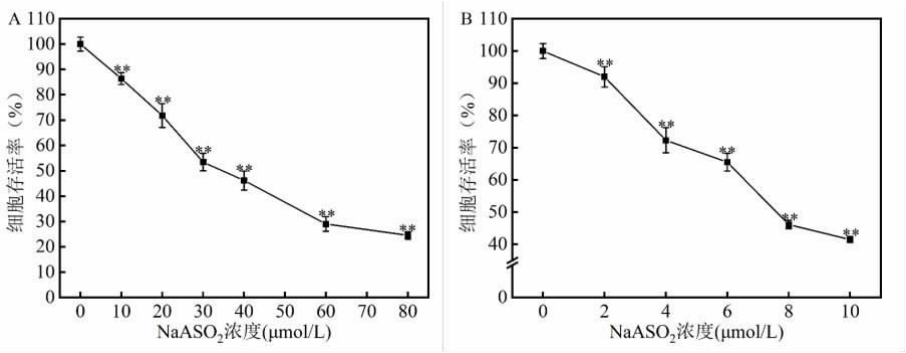
2　结　果

2.1　不同浓度 $NaAsO_2$ 对 A549、BEAS-2B 细胞活力影响　在 A549 细胞中，与对照组（$NaAsO_2$ 浓度 =0 μmol/L）相比，$NaAsO_2$ 浓度为 10 ~ 80 μmol/L 组，细胞存活率降低，差异具有统计学意义（10 ~ 80 μmol/L 组：P<0.001），见图 1A。在 BEAS-2B 细胞中，与对照组相比，$NaAsO_2$ 浓度为 2 ~ 10 μmol/L 组，细胞存活率降低，差异具有统计学意义（2 μmol/L 组：P=0.006，

4 ~ 10 μmol/L 组：$P<0.001$），见图 1B。经计算，A549 细胞 IC_{50}=35.03 μmol/L，95% *CI*：33.48 ~ 36.65 μmol/L。BEAS-2B 细胞 IC_{50}=7.809 μmol/L，95% *CI*：7.349 ~ 8.341 μmol/L。后续将在此基础上选取适宜浓度进行实验。

2.2　$NaAsO_2$、MMA、DMA 对 A549、BEAS-2B 细胞中 hsa_circ_0058493 表达影响　用不同浓度 $NaAsO_2$ 及 MMA、DMA 处理 A549 和 BEAS-2B 细胞，结果显示，A549 细胞中，与对照组相比，10、20 和 30 μmol/L $NaAsO_2$ 处理组，hsa_circ_0058493 表达升高，差异具有统计学意义（P=0.012、0.003、<0.001），见图 2A。BEAS-2B 细胞中，与对照组相比，2 μmol/L $NaAsO_2$ 处理组 hsa_circ_0058493 表达无明显变化（P=0.204），4 和 6 μmol/L $NaAsO_2$ 处理组 hsa_circ_0058493 表达升高，差异具有统计学意义（P=0.027、0.002），见图 2B。MMA、DMA 处理两组细胞后，hsa_circ_0058493 表达与对照组相比均无明显变化（A549 细胞：P=0.058、0.197；BEAS-2B 细胞：P=0.676、0.909），见图 2C、D。

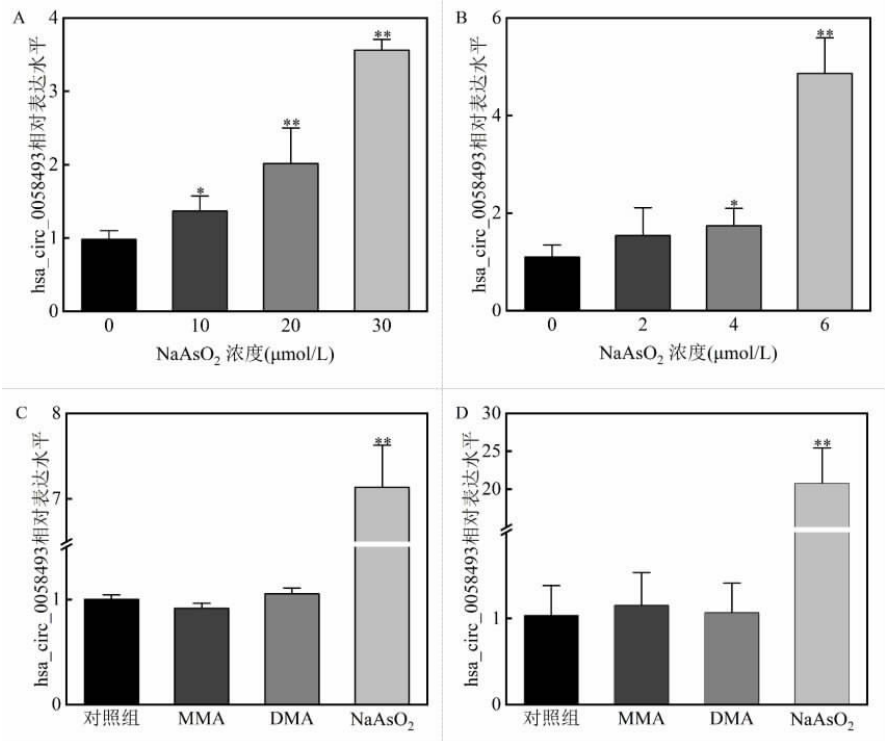
2.3　siRNA 沉默效率验证　使用 siRNA 下调 hsa_circ_0058493，通过 RT-qPCR 检测 hsa_circ_0058493 相对表达量，结果显示，在 A549 和 BEAS-2B 细胞中，与对照组相比，siRNA#1 组和 siRNA#2 组 hsa_circ_0058493 相对表达量显著降低，见图 3A、B，差异具有统计学意义（A549 细胞：P<0.001、<0.001；BEAS-2B 细胞：P<0.001、<0.001）。



注：A 为不同浓度 $NaAsO_2$ 对 A549 细胞存活率的影响；B 为不同浓度 $NaAsO_2$ 对 BEAS-2B 细胞存活率的影响；与对照组比，* 表示 P<0.05；** 表示 P<0.01。

图 1　不同浓度 $NaAsO_2$ 染毒对 A549 和 BEAS-2B 细胞存活率的影响

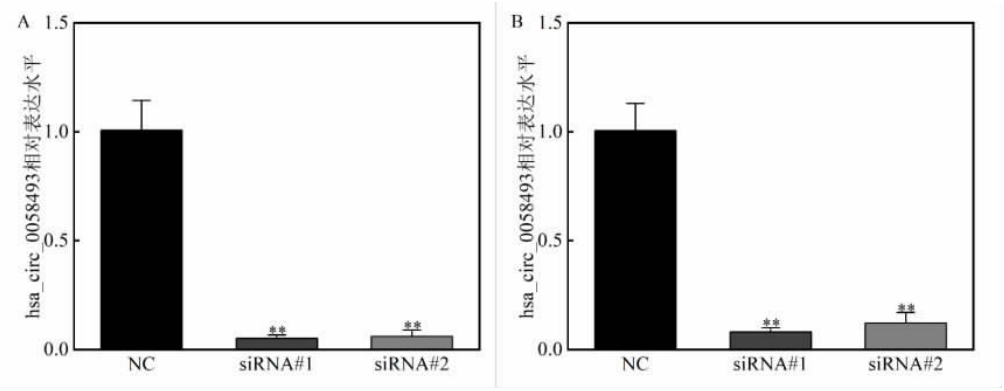
Figure 1　Effects of different concentrations of $NaAsO_2$ on the viability of A549 and BEAS-2B cells



注：A 为不同浓度 $NaAsO_2$ 对 A549 细胞中 hsa_circ_0058493 表达的影响；B 为不同浓度 $NaAsO_2$ 对 BEAS-2B 细胞中 hsa_circ_0058493 表达的影响；C 为 MMA、DMA 和 $NaAsO_2$（30 μmol/L）对 A549 细胞中 hsa_circ_0058493 表达的影响；D 为 MMA、DMA 和 $NaAsO_2$（6 μmol/L）对 BEAS-2B 细胞中 hsa_circ_0058493 表达的影响；* 表示 P<0.05；** 表示 P<0.01。

图 2　$NaAsO_2$、MMA、DMA 对 A549 和 BEAS-2B 细胞中 hsa_circ_0058493 表达的影响

Figure 2　Effects of $NaAsO_2$, MMA, and DMA on the expression of hsa_circ_0058493 in A549 and BEAS-2B cells

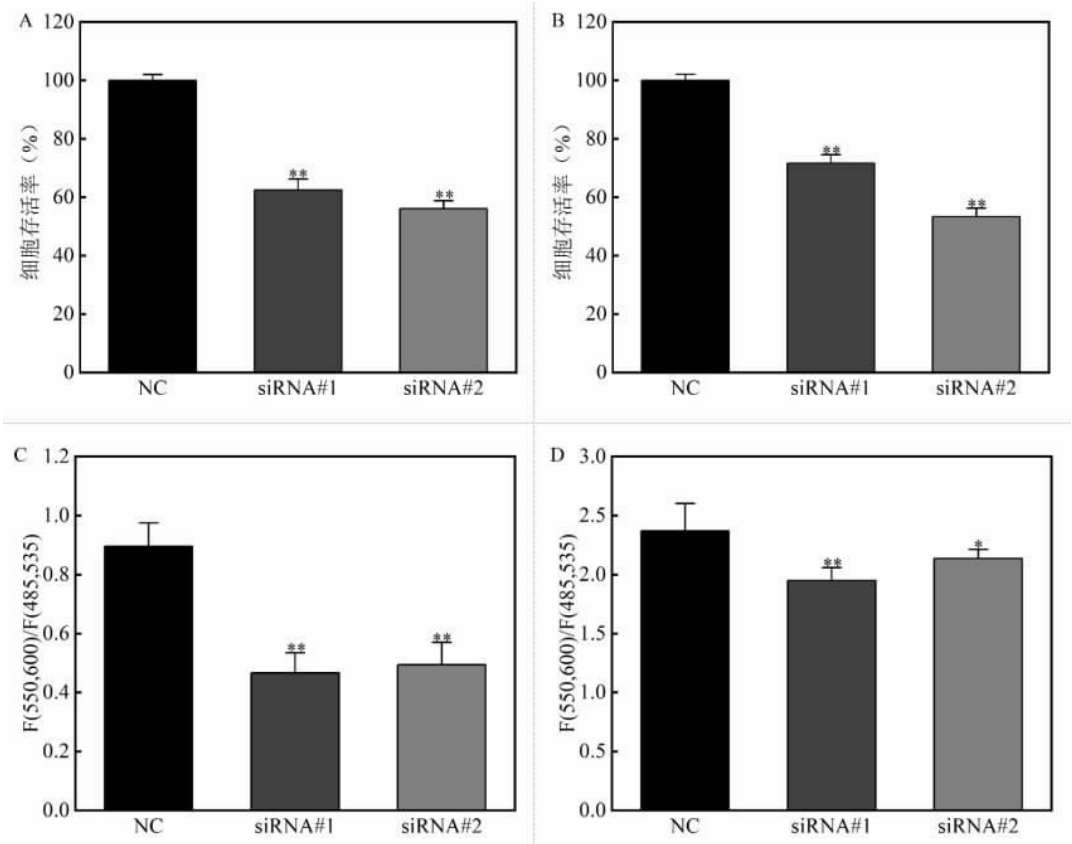


注：A 为 A549 细胞中 siRNA 沉默效率验证；B 为 BEAS-2B 细胞中 siRNA 沉默效率验证；* 表示 $P<0.05$；** 表示 $P<0.01$。

图 3　A549 和 BEAS-2B 细胞中 siRNA 沉默效率验证

Figure 3　Validation of the silencing efficiency of siRNA in A549 and BEAS-2B cells

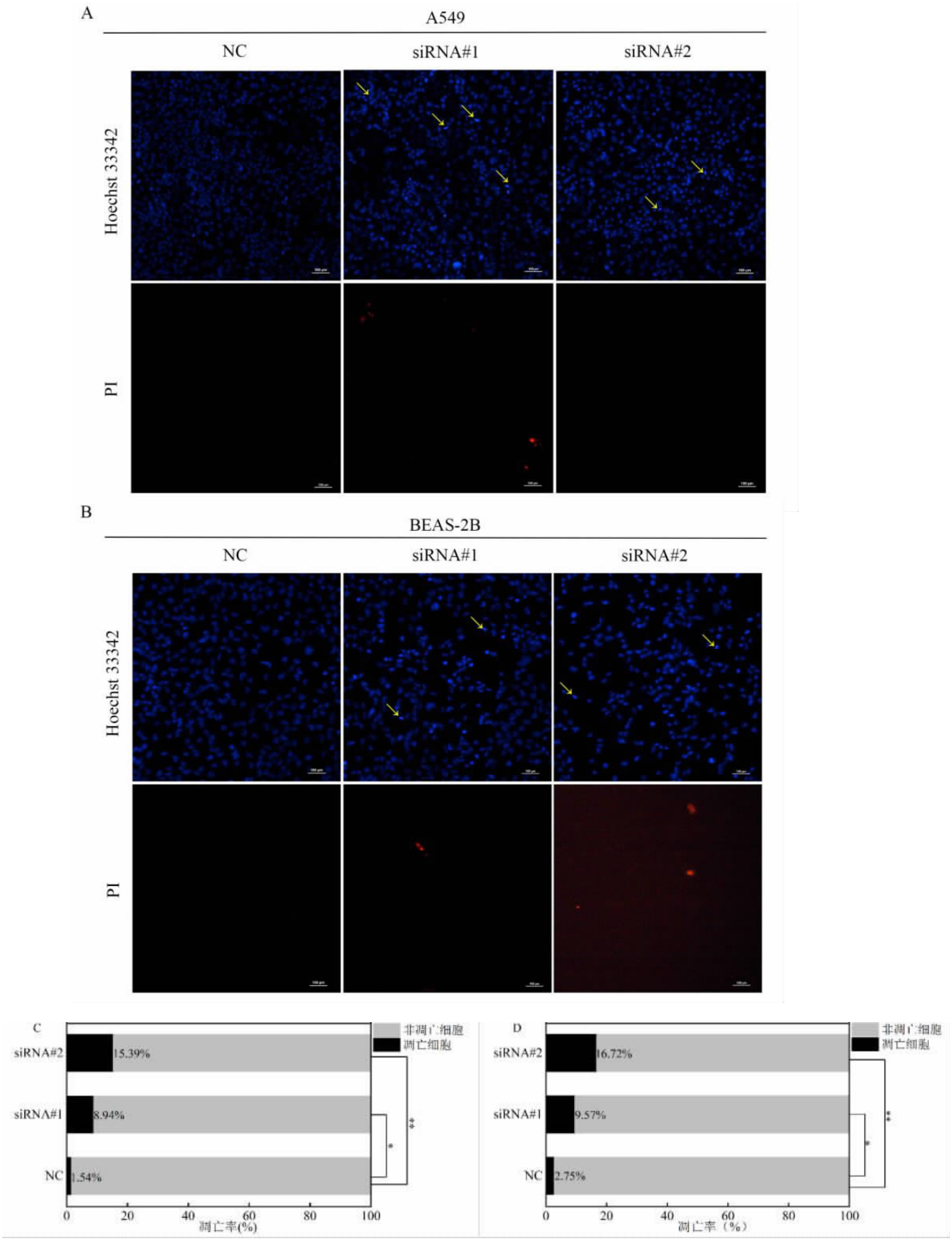
2.4　下调 hsa_circ_0058493 对 A549 和 BEAS-2B 细胞活力、线粒体膜电位、凋亡影响　下调 hsa_circ_0058493 后，通过 CCK-8 实验对细胞活力进行检测，在 A549 细胞中，各组细胞活力分别为 100%、62.5%、56.05%，BEAS-2B 细胞中分别为 100%、71.63%、53.34%。与对照组相比，siRNA#1 组和 siRNA#2 组细胞活力降低，差异具有统计学意义（A549 细胞：$P<0.001$、<0.001；BEAS-2B 细胞：$P<0.001$、<0.001），见图 4A、B。通过 JC-1 实验检测细胞线粒体膜电位变化情况，结果表明下调 hsa_circ_0058493 组（siRNA#1、siRNA#2）线粒体膜电位和对照组相比降低，差异有统计学意义（A549 细胞：$P<0.001$、<0.001；BEAS-2B 细胞：$P=0.003$、0.041），见图 4C、D。经 Hoechst 33342/PI 双染后，与对照组相比，下调 hsa_circ_0058493 组呈现出更多亮蓝色和红色的细胞，见图 5A、B，早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞占比增加，见图 5C、D，差异有统计学意义（$P<0.001$、<0.001；$P<0.001$、<0.001）。



注：A 为下调 hsa_circ_0058493 对 A549 细胞存活率的影响；B 为下调 hsa_circ_0058493 对 BEAS-2B 细胞存活率的影响；C 为下调 hsa_circ_0058493 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响；D 为下调 hsa_circ_0058493 对 BEAS-2B 细胞线粒体膜电位的影响；* 表示 $P<0.05$；** 表示 $P<0.01$。

图 4　下调 hsa_circ_0058493 对 A549 和 BEAS-2B 细胞活力及线粒体膜电位的影响

Figure 4　Effects of hsa_circ_0058493 downregulation on cell viability and mitochondrial membrane potential in A549 and BEAS-2B cells



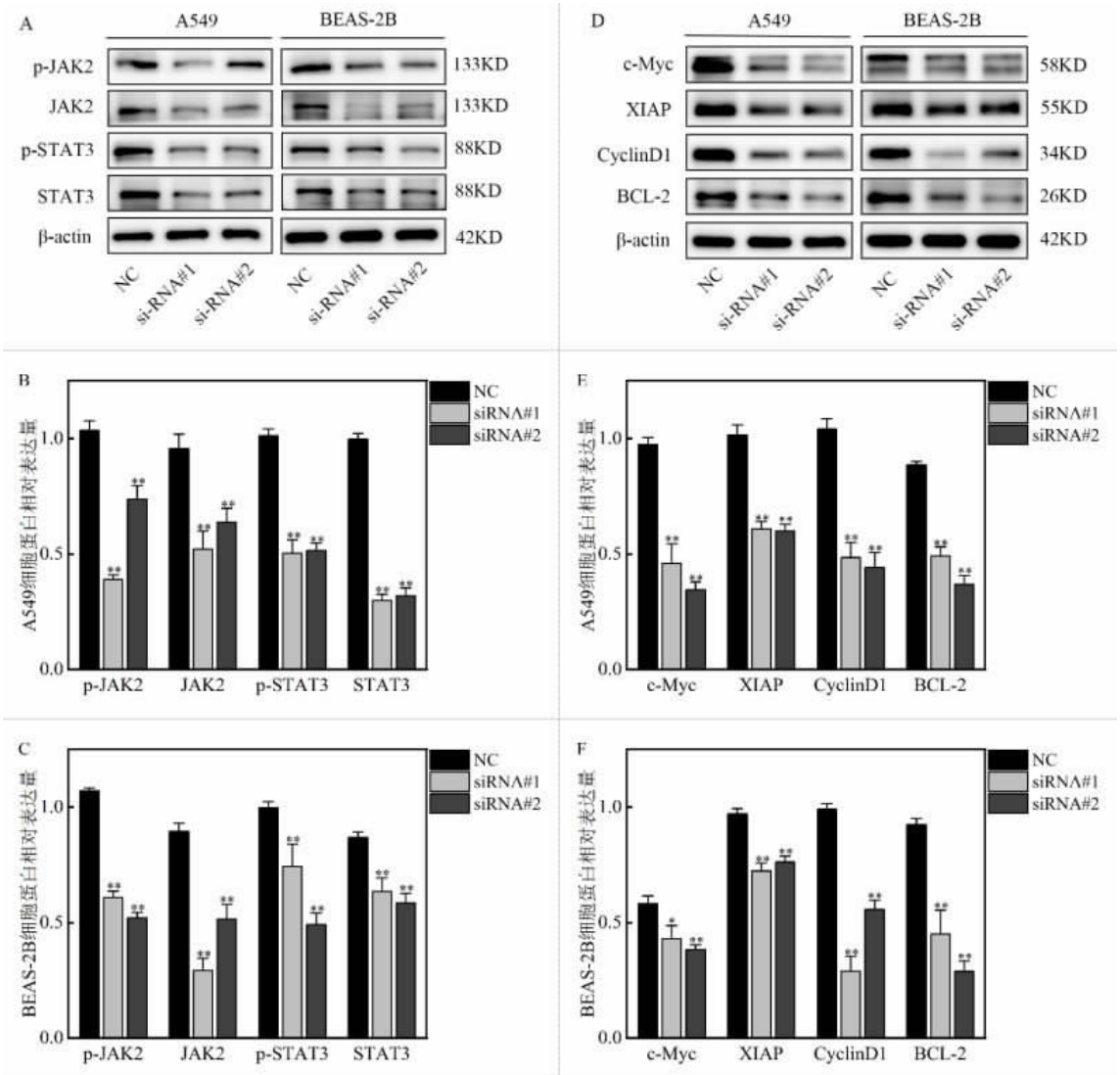
注：A 为 A549 细胞 Hoechst 33342/PI 双染结果（黄色箭头示早期凋亡细胞），放大倍数为 200 倍；B 为 BEAS-2B 细胞 Hoechst 33342/PI 双染结果；C 为 A549 细胞凋亡率统计；D 为 BEAS-2B 细胞凋亡率统计；* 表示 $P<0.05$；** 表示 $P<0.01$。

图 5 下调 hsa_circ_0058493 对 A549 和 BEAS-2B 细胞凋亡的影响

Figure 5 Effects of hsa_circ_0058493 downregulation on apoptosis in A549 and BEAS-2B cells

2.5 下调 hsa_circ_0058493 对 A549 和 BEAS-2B 细胞中 STAT3 通路相关蛋白表达影响 与对照组相

比，下调 hsa_circ_0058493 组（siRNA#1、siRNA#2），p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3 蛋白相对表达量降低（图 6A），差异具有统计学意义（$P<0.05$）（图 6B、C）。此外，下调 hsa_circ_0058493 组（siRNA#1、siRNA#2）中 c-Myc、XIAP、CyclinD1 和 BCL-2 蛋白的相对表达量也呈现降低趋势（图 6D），与对照组相比，差异具有统计学意义（$P<0.05$）（图 6E、F）。



注：A、D 为 Western blot 检测 A549 和 BEAS-2B 细胞中蛋白表达变化；B、E 为 A549 细胞中相关蛋白相对表达量；C、F 为 BEAS-2B 细胞中相关蛋白相对表达量；* 表示 $P<0.05$；** 表示 $P<0.01$。

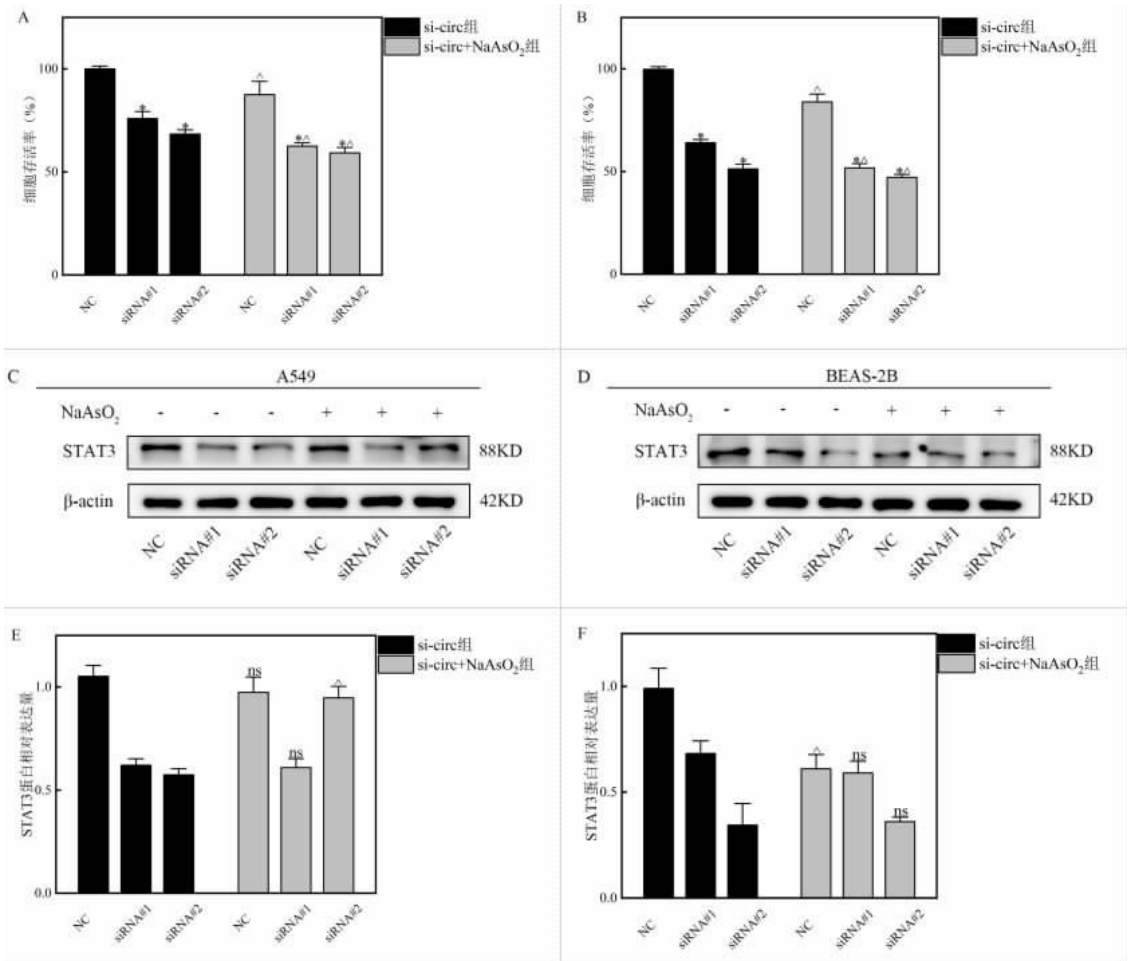
图 6　下调 hsa_circ_0058493 对 A549 和 BEAS-2B 细胞相关蛋白表达的影响

Figure 6　Effects of hsa_circ_0058493 downregulation on related protein expression in A549 and BEAS-2B cells

2.6　下调 hsa_circ_0058493 对 $NaAsO_2$ 诱导细胞凋亡的调控作用　下调 hsa_circ_0058493（siRNA#1、siRNA#2）后，A549 和 BEAS-2B 细胞存活率与对照组相比均显著降低（$P<0.05$）。下调 hsa_circ_0058493 后给予 $NaAsO_2$ 处理，各组的细胞存活率较单独下调 hsa_circ_0058493 组进一步降低（$P<0.05$），见图 7A、B。Western blot 检测 A549 和 BEAS-2B 细胞中 STAT3 蛋白表达变化如图 7C、D，在 A549 细胞中，与单独下调 hsa_circ_0058493 组相比，下调 hsa_circ_0058493 后给予 $NaAsO_2$ 处理时，NC、siRNA#1 分组 STAT3 蛋白相对表达量无明显变化（$P>0.05$），siRNA#2 分组 STAT3 蛋白相对表达量升高（$P<0.05$），见图 7E。在 BEAS-2B 细胞中，上述处理后，NC 分组 STAT3 蛋白相对表达量降低（$P<0.05$），siRNA#1 和 siRNA#2 分组的 STAT3 蛋白相对表达量无明显变化（$P>0.05$），见图 7F。

3　讨　论

细胞凋亡是砷致肺损伤的关键过程，尽管氧化应激、DNA 损伤等经典通路已被证实参与其中[14-15]，但 circRNA 在这一过程中的作用仍有待深入探究。本研究发现 hsa_circ_0058493 可能通过调控 STAT3 通路参与砷诱导的肺细胞凋亡，这为揭示砷毒性的表观遗



注：A 为下调 hsa_circ_0058493 后给予 $NaAsO_2$ 处理对A549 细胞存活率的影响；B 为下调 hsa_circ_0058493 后给予 $NaAsO_2$ 处理对 BEAS-2B 细胞存活率的影响；C 为 Western blot 检测 A549 细胞中 STAT3 蛋白表达变化；D 为 Western blot 检测 BEAS-2B 细胞中 STAT3 蛋白表达变化；E 为 A549 细胞中蛋白相对表达量；F 为 BEAS-2B 细胞中蛋白相对表达量；* 表示在同一处理组内与对照组比较存在统计学差异（$P<0.05$）；^ 表示 si-circ+$NaAsO_2$ 组的 NC、siRNA#1、siRNA#2 与对应 si-circ 组的 NC、siRNA#1、siRNA#2 比较存在统计学差异（$P<0.05$）。

图 7 下调 hsa_circ_0058493 后给予 $NaAsO_2$ 处理对 A549 和 BEAS-2B 细胞存活率及相关蛋白的影响

Figure 7 Effects of $NaAsO_2$ treatment following downregulation of hsa_circ_0058493 on cell viability and related proteins in A549 and BEAS-2B cells

传调控机制提供了新的视角。我们的研究结果表明，经 $NaAsO_2$ 处理，A549 和 BEAS-2B 细胞的存活率显著降低，且呈现出剂量关系，这与之前的研究结果一致，证实了砷的细胞毒性[16]。但本研究发现仅 $NaAsO_2$ 能够上调 A549 和 BEAS-2B 细胞中 hsa_circ_0058493 的表达，而 MMA 和 DMA 无显著作用，这与砷代谢的毒性差异一致，无机砷的细胞毒性显著高于有机砷代谢产物[17-18]。推测 hsa_circ_0058493 可能参与无机砷的早期应激响应，hsa_circ_0058493 表达变化或可作为无机砷暴露的潜在生物标志物。为了研究 hsa_circ_0058493 在肺细胞中的功能，我们设计了特异性 siRNA 下调 hsa_circ_0058493。

通过 siRNA 下调 hsa_circ_0058493 后，A549 和 BEAS-2B 细胞活力显著降低，线粒体膜电位下降，细胞凋亡率增加。在 wu 等人[8]的研究中，也发现下调 hsa_circ_0058493 会增加肝癌细胞凋亡率，抑制细胞增殖。进一步机制研究显示，下调 hsa_circ_0058493 可降低 JAK2/STAT3 通路相关蛋白（p-JAK2、p-STAT3、JAK2、STAT3）及下游靶基因蛋白（c-Myc、CyclinD1、BCL-2 等）的表达。而 JAK/STAT3 通路作为调控细胞增殖与凋亡的核心信号轴，其抑制与上述表型变化吻合[19-20]，表明 hsa_circ_0058493 可能通过调控 JAK2/STAT3 通路影响细胞生理功能。

hsa_circ_0058493 下调可进一步增强 $NaAsO_2$ 的细胞毒性，提示二者在抑制细胞存活方面存在效应叠加。值得注意的是，STAT3 蛋白表达呈现细胞系特异性差异，这一现象可能与细胞背景相关。已有研究表明，不同类型肿瘤组织与正常组织间的 STAT3 表达存在显著差异，其中肺癌组织的 STAT3 表达水平高于正常肺组织[21]。据此推测，A549 作为癌细胞，其 STAT3 基础活性较高，可能部分抵消 hsa_circ_0058493 下调所致的抑制效应；而 BEAS-2B 作为正

常细胞，STAT3 活性较低，更易受 hsa_circ_0058493 下调的主导影响。这种差异提示，hsa_circ_0058493 对 STAT3 的调控可能并非单一直接路径，其复杂的作用网络有待进一步探究。

综上，本研究表明，下调 hsa_circ_0058493 可引起 A549 和 BEAS-2B 细胞活力下降、凋亡增加，这与 JAK2/STAT3 通路活性抑制相关，提示 hsa_circ_0058493 可能通过调控 JAK2/STAT3 通路参与砷诱导的肺细胞凋亡，为解析砷致肺损伤机制及相关干预提供了新视角。

利益冲突声明　本研究不存在任何利益冲突

参考文献

[1] Naujokas MF, Anderson B, Ahsan H, et al. The broad scope of health effects from chronic Arsenic exposure: update on a worldwide public health problem[J]. Environmental Health Perspectives, 2013, 121(3): 295-302.

[2] Sun HJ, Rathinasabapathi B, Wu B, et al. Arsenic and Selenium toxicity and their interactive effects in humans [J]. Environment International, 2014, 69: 148-158.

[3] Issanov A, Adewusi B, Saint-Jacques N, et al. Arsenic in drinking water and lung cancer: A systematic review of 35 years of evidence [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2024, 483: 116808.

[4] Zhong GL, Wan F, Wu SF, et al. Arsenic or/and Antimony induced mitophagy and apoptosis associated with metabolic abnormalities and oxidative stress in the liver of mice [J]. Science of the Total Environment, 2021, 777: 146082.

[5] Chen Q, Sun MJ, Cheng HR, et al. Inorganic arsenic-mediated upregulation of TUG1 promotes apoptosis in human bronchial epithelial cells by activating the p53 signaling pathway[J]. Toxicology and Industrial Health, 2023, 39(12): 700-711.

[6] Rahaman MS, Banik S, Akter M, et al. Curcumin alleviates arsenic-induced toxicity in PC12?cells via modulating autophagy/apoptosis [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 200: 110756.

[7] Zhong AN, Yin Y, Tang BJ, et al. CircRNA microarray profiling reveals hsa_circ_0058493 as a novel biomarker for Imatinib-Resistant CML[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 728916.

[8] Wu AQ, Hu YH, Xu Y, et al. Methyltransferase-Like 3-Mediated m^6A methylation of Hsa_circ_0058493 accelerates hepatocellular carcinoma progression by binding to YTH Domain-Containing protein 1[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 762588.

[9] Cheng ZN, Zhang YY, Wu SS, et al. Peripheral blood circular RNA hsa_circ_0058493 as a potential novel biomarker for silicosis and idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Ecotoxicology and Environment Safety, 2022, 236: 113451.

[10] Long L, Fei XY, Chen LC, et al. Potential therapeutic targets of the JAK2/STAT3 signaling pathway in triple-negative breast cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2024, 14: 1381251.

[11] Yang F, Zhang AH. Involvement of METTL3 in arsenite-induced skin lesions by targeting the SOCS3/STAT3/Krt signaling pathway[J]. Environmental Pollution, 2023, 316(Pt 2): 120634.

[12] Li L, Xiao C, He K, et al. Circ_0072088 promotes progression of hepatocellular carcinoma by activating JAK2/STAT3 signaling pathway via miR-375[J]. IUBMB Life, 2021, 73(9): 1153-1165.

[13] Zhang XH, Han Q, Liu J, et al. Jianpi qingre tongluo prescription (huangqin qingrechubi capsule) alleviates inflammation and hypercoagulability by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway via CircRNA 104633 downregulation in gouty arthritis [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2025, 344: 119552.

[14] Mahalanobish S, Saha SKA, Dutta S, et al. Mangiferin alleviates Arsenic induced oxidative lung injury via upregulation of the Nrf2-HO1 axis [J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 126: 41-55.

[15] Lee HY, Oh SH. Arsenite-induced cytotoxicity is regulated by p38-SQSTM1/p62 and JNK-BNIP3L/Nix signaling in lung cancer cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2022, 587: 16-23.

[16] 刘娜，江金鋆，马和，等. 砷及其代谢物对 BEAS-2B 细胞 p53 基因表达影响[J]. 环境与职业医学，2024，41(4)：431-436.
Liu N, Jiang JY, Ma H, et al. Effects of Arsenic and its metabolites on p53 gene expression in BEAS-2B cells[J]. Journal of Environmental & Occupational Medicine, 2024, 41(4): 431-436.(In Chinese)

[17] Zhou Q, Yin JY, Tan JW, et al. Up-regulation of PUMA caused the activation of p53 phosphorylation and acetylation, enhancing the interaction between PUMA and Bcl-X and mediating arsenic-induced apoptosis[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2022, 434: 115800.

[18] Vachiraarunwong A, Gi M, Kiyono T, et al. Characterizing the toxicological responses to inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells [J]. Archives of Toxicology, 2024, 98(7): 2065-2084.

[19] Rahbar farzam O, Najafi S, Amini M, et al. Interplay of miRNAs and lncRNAs in STAT3 signaling pathway in colorectal cancer progression[J]. Cancer Cell International, 2024, 24(1): 16.

[20] Zhao ZY, Yu PP, Wang Y, et al. Silencing of STEAP3 suppresses cervical cancer cell proliferation and migration via JAK/STAT3 signaling pathway[J]. Cancer & Metabolism, 2024, 12(1): 40.

[21] Tan JY, Feng RH. A pan-cancer analysis of STAT3 expression and genetic alterations in human tumors[J]. Open Med (Wars), 2023, 18 (1): 20230792.

收稿日期：2025-05-13