

敲低CARMA3对非小细胞肺癌中增殖、迁移以及侵袭能力的影响

张苗苗¹, 陈亮^{1*}, 舒增怡²

¹四川省什邡市人民医院检验科, 四川 德阳

²四川省什邡市人民医院病理科, 四川 德阳

收稿日期: 2026年7月4日; 录用日期: 2026年7月28日; 发布日期: 2026年8月7日

摘要

目的: 探讨凋亡酶招募域和膜相关鸟苷酸激酶样蛋白3(CARMA3)在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达及临床意义, 以及敲低CARMA3对NSCLC细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的影响以及对NF- κ B信号通路(总NF- κ B p65及磷酸化NF- κ B p65)的调控作用。方法: 采用免疫组化检测NSCLC(10例: 5例肺腺癌和5例肺鳞癌)及癌旁组织中CARMA3的表达水平, 分析其与临床病理特征的关系; 以肺鳞癌细胞H1975和肺腺癌细胞H520为研究对象, 分别敲低和过表达改变CARMA3表达水平, 利用细胞增殖、划痕、侵袭及细胞凋亡等实验检测其生物学功能, Western blot检测NF- κ B信号通路核心蛋白磷酸化p65 (p-p65)的表达变化。结论: CARMA3在NSCLC组织中呈高表达, 敲低CARMA3可抑制NSCLC细胞增殖、迁移和侵袭, 并促进细胞凋亡, 其作用机制与抑制NF- κ B信号通路活化有关, 可能成为NSCLC治疗的潜在分子靶点。

关键词

凋亡酶招募域和膜相关鸟苷酸激酶样蛋白3, 非小细胞肺癌, NF- κ B信号通路, 细胞增殖, 细胞凋亡

The Effects of CARMA3 Downregulation on Proliferation Migration, and Invasion in Non-Small Cell Lung Cancer

Miaomiao Zhang¹, Liang Chen^{1*}, Zengyi Shu²

¹Department of Laboratory Medicine, Shifang People's Hospital, Deyang Sichuan

²Department of Pathology, Shifang People's Hospital, Deyang Sichuan

Received: July 4, 2026; accepted: July 28, 2026; published: August 7, 2026

*通讯作者。

文章引用: 张苗苗, 陈亮, 舒增怡. 敲低 CARMA3 对非小细胞肺癌中增殖、迁移以及侵袭能力的影响[J]. 临床医学进展, 2026, 16(8): 536-547. DOI: 10.12677/acm.2026.1682824

Abstract

Objective: To investigate the expression and clinical significance of the apoptosis enzyme recruitment domain and membrane-associated guanylate kinase-like protein 3 (CARMA3) in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues, as well as the effects of CARMA3 knockdown on NSCLC cell proliferation, apoptosis, migration, and invasion capabilities, as well as its regulatory role in the NF- κ B signaling pathway (total NF- κ B p65 and phosphorylated NF- κ B p65). **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect CARMA3 expression levels in NSCLC (10 cases: 5 cases of lung adenocarcinoma and 5 cases of lung squamous cell carcinoma) and peritumoral tissues, and to analyze its relationship with clinical and pathological characteristics; using the lung squamous cell carcinoma cell line H1975 and the lung adenocarcinoma cell line H520 as study models, we knocked down and overexpressed CARMA3, respectively, to alter its expression levels. We assessed its biological functions using assays for cell proliferation, the scratch assay, invasion, and apoptosis, and used Western blot analysis to detect changes in the expression of phosphorylated p65 (p-p65), a core protein of the NF- κ B signaling pathway. **Conclusion:** CARMA3 is highly expressed in NSCLC tissues. Knocking down CARMA3 inhibits NSCLC cell proliferation, migration, and invasion, and promotes apoptosis. Its mechanism of action is associated with the inhibition of NF- κ B signaling pathway activation, and it may serve as a potential molecular target for NSCLC treatment.

Keywords

CARMA3, NSCLC, NF- κ B Signaling Pathway, Cell Proliferation, Cell Apoptosis

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

CARMA3 是 CARMA 家族的成员,该家族包括 CARMA1、CARMA2 和 CARMA3 蛋白。三种 CARMA 蛋白由不同的基因编码,并在不同的组织中表达。CARMA1 由 CARD11 基因编码,主要在淋巴组织和造血组织中表达;CARMA2 由 CARD14 基因编码,在黏膜组织和皮肤组织中表达。而 CARMA3 由 CARD10 编码,在造血细胞以外的多种组织中广泛表达[1]。CARD 结构域含 MAGUK 蛋白 3 (CARMA3), 又称 CARD10, 是 CARD 蛋白家族的成员。针对大多数逆转录激酶(RTKs), CARMA3 会激活核因子 κ B (NF- κ B) 通路,产生 p65 和 p50 蛋白,最终参与转录过程。CARMA3 还通过参与磷酸化过程与蛋白激酶 C(PKC) 家族协同作用,从而在不同情境下激活 NF- κ B 通路[2] [3]。NF- κ B 信号通路在肿瘤发生发展中发挥着关键调控作用,参与调控细胞增殖、凋亡抑制、血管生成、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及侵袭转移等多种恶性生物学行为[4]。Jiang [5]等研究发现, CARMA3 是表皮生长因子受体(EGFR)介导的 NF- κ B 活化和肿瘤进展的关键节点分子。然而,上述研究主要基于临床标本的统计分析或单一细胞系的功能学实验,缺乏系统的体外功能学验证,且未对 CARMA3 在 NSCLC 不同病理亚型(肺腺癌与肺鳞癌)中的功能差异以及其下游分子机制进行深入探讨。Li [6]等首次报道 CARMA3 在 NSCLC 组织中呈高表达(阳性率 68.8%),且与 TNM 分期、T 分期及 EGFR 表达水平显著相关。大量研究证实, CARMA3 在乳腺癌[4]、卵巢癌[7]、结直肠癌[8]和肾癌组织[9]中过度表达[10]。使其在肿瘤生物学中的发生发展中发挥重要功能。这些报告表明, CARMA3 可能是癌症治疗中一个极具潜力的靶点。

肺癌是全球最常见的癌症死因, 每年夺走 180 万人的生命[11]。从组织学的角度来看, 这种疾病可以被划分为两种类型: 小细胞肺癌(SCLC)与非小细胞肺癌(NSCLC), 后者又分为肺腺癌(LUAD)、肺鳞状细胞癌(LUSC)以及大细胞肺癌(LCLC) [12]。过去二十年间取得了巨大进展, 包括肺癌基因组计划的完成以及靶向治疗和免疫疗法的开发[13]。作为信号转导的中介, CARMA3 通过传递不同信号改变细胞状态或微环境, 从而促进肿瘤细胞存活[14] [15]。尽管 CARMA3 诱导的表型已基本确立, 但其在不同肿瘤相中的分子调控机制仍存在诸多未解之谜[1] [16]。然而, 目前关于 CARMA3 在 NSCLC 中的功能研究仍较为有限, 尤其是在不同病理亚型(肺腺癌与肺鳞癌)中 CARMA3 生物学功能的系统比较尚未见报道。本研究以 EGFR 突变型肺腺癌细胞株 H1975 和肺鳞癌细胞株 H520 为模型, 通过 siRNA 技术敲低 CARMA3 表达, 系统观察其对细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的影响, 并进一步通过 Western blot 检测 NF- κ B 信号通路核心蛋白(p-p65、p-65)的变化以探讨其下游分子机制。结合临床组织标本中 CARMA3 的表达检测, 初步探讨 CARMA3 在不同类型 NSCLC 中的功能意义及调控机制, 为后续靶向治疗研究提供实验依据。此外, 利用 TCGA 公共数据库进一步验证 CARMA3 在 NSCLC 不同亚型中的表达特征, 为研究结果提供大样本生物信息学证据支持。

2. 材料与方法

2.1. 病人样本

所有 NSCLC 样本均在病人知情同意下获取。10 例 NSCLC 组织样本(其中肺腺癌 5 例, 肺鳞癌 5 例)均从什邡市人民医院获取。将癌和癌旁组织作为实验组和对照组。

2.2. 实验细胞、耗材与试剂

人肺鳞癌细胞系 NCI-H520 细胞与人肺腺癌细胞系 NCI-H1975 细胞, 均购自湖南丰晖。所有细胞常规使用 RPMI-1640 培养基(含 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素)培养于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中。RPMI-1640 高糖培养基(不含双抗)购自丰晖生物(货号 SJO18); Card10 过表达质粒(hCARD10-pcDNA3.1-3xFlag-C)及空载体对照质粒(pcDNA3.1-3 × Flag)由湖南丰晖合成; Card10 小干扰 RNA (si-#1、si-#2)及阴性对照 siRNA(siNC)由 GenScript 合成; Card10 兔多克隆抗体(WB 稀释比 1:1000, IHC 稀释比 1:100)购自腾科生物(货号 TKAB2283); Beta Actin 单克隆抗体(WB 稀释比 1:20,000)购自 Proteintech (货号 66009-1-Ig); HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(稀释比 1:5000)购自 Abbkine (货号 A21020); CCK8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自 BIOSHARP。

2.3. 实验方法

2.3.1. 细胞培养、传代

使用 NCI-H520 和 NCI-H1975 两种人肺癌细胞系。细胞常规培养于含 10%胎牛血清、1%青霉素 - 链霉素双抗溶液的 RPMI-1640 高糖培养基中, 置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。每 2 d 传代培养一次。

2.3.2. 质粒构建体和细胞转染

为研究 CARMA3 基因的功能, 根据制造商提供的使用说明书操作, 本研究采用瞬时转染策略, 分别进行基因敲低(siRNA)和基因过表达(质粒)实验。

2.3.3. 免疫组织化学分析

切片脱蜡至水(二甲苯 2 × 10 min, 梯度乙醇各 5 min), 蒸馏水洗。柠檬酸修复液微波中高火 30 min, 自然冷却, PBS 洗 3 × 5 min。3% H₂O₂ 室温避光 10 min, PBS 洗。3% BSA 封闭 30 min。一抗 4℃过夜,

复温 30 min, PBS 洗。HRP 二抗室温 30 min, PBS 洗。DAB 显色 2 min, 水终止。苏木素复染 2 min, 分化返蓝。梯度乙醇脱水(75%→80%→95%各 3 min, 无水乙醇 2 × 5 min), 二甲苯透明(2 × 5 min), 封片扫描。

2.3.4. 蛋白质免疫印迹分析

转染 48 h 后收集细胞, RIPA 裂解液(含蛋白酶/磷酸酶抑制剂)提取总蛋白, BCA 法定量。每孔上样 20 μg 蛋白, SDS-PAGE 电泳, 转 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭, 分别加入一抗, 4℃过夜。TBST 洗膜后加 HRP 二抗(1:[XX])室温孵育 1 h, ECL 显影。ImageJ 分析灰度值, 以目的蛋白/GAPDH 比值表示相对表达量。

2.3.5. 细胞划痕迁移实验

为研究 CARMA3 对肺癌细胞迁移的影响, 采用细胞划痕实验: 将 WT、OE、Si 组细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板(3 复孔), 长满单层后划痕, PBS 洗净, 加 1% FBS 培养基, 于 0 h 和 24 h 固定位置拍照, Image J 测量划痕面积并计算迁移率[(0 h 面积 - 24 h 面积)/0 h 面积 × 100%]。

2.3.6. 细胞流式凋亡实验

转染 48 h 后收集细胞, 预冷 PBS 洗涤, Binding Buffer 重悬, 加 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL, 避光孵育 15 min, 1 h 内流式细胞仪检测。早期凋亡 + 晚期凋亡合计为总凋亡率。实验重复 3 次。

2.3.7. 细胞 Transwell 实验

采用 Transwell 法检测细胞侵袭能力。取对数生长期 NCI-H520 细胞, 调整至 1×10^5 /mL, 上室底部铺 50 μL 稀释 Matrigel, 37℃凝固 30~60 min; 下腔加 600 μL 含 10% FBS 培养基, 上室加 200 μL 细胞悬液, 培养后擦去未穿膜细胞, 4%多聚甲醛固定 15 min, 结晶紫染色 15~20 min, 显微镜下随机取 5 个视野计数穿膜细胞并统计分析。

2.3.8. CCK-8 实验

取对数生长期细胞以 60%密度接种于 96 孔板(100 μL/孔), 设试验孔(As, 含细胞 + CCK8 + 毒性物质)、对照孔(Ac, 含细胞 + CCK8)、空白孔(Ab, 含培养基 + CCK8)。每孔加 10 μL CCK8, 37℃培养 4 h 后, 酶标仪测定 450 nm 吸光度。细胞活力 = $[(As - Ab)/(Ac - Ab)] \times 100\%$ 。

2.3.9. 生物信息学分析

基于 TCGA 数据库(cBioPortal, <https://www.cbioportal.org/>), 提取 TCGA 肺腺癌(LUAD, n = 517)和肺鳞癌(LUSC, n = 501) RNA-seq V2 mRNA 表达数据[17] [18]。分析 CARD10 (CARMA3 编码基因)在两种亚型肿瘤组织中的表达水平, 采用 Mann-Whitney U 检验进行组间差异比较, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

所有实验均独立重复至少三次。数据以均值±标准差表示。使用 GraphPad Prism10.1.2 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为具有统计学差异。

3. 实验结果

3.1. CARMA3 在非小细胞肺癌和癌旁组织中的表达

我们通过对 10 例非小细胞肺癌(NSCLC)标本(5 例肺腺癌和 5 例肺鳞癌)及其对应的癌旁组织进行免疫组化染色, 分析 CARMA3 蛋白表达水平。结果如图 1 所示, CARMA3 蛋白主要定位于肿瘤细胞的胞浆和胞膜, 呈强阳性染色, 且在肿瘤细胞密集区域表达尤为显著。CARMA3 的 IHC 染色结果显示, 在癌

组织与癌旁组织中存在显著的表达差异：在癌旁组织中，CARMA3 的表达水平极低，仅在少数散在的炎症细胞或支气管上皮细胞中可见微弱的阳性信号，整体呈阴性或弱阳性表达。10 例 NSCLC 组织中，7~8 例呈 CARMA3 高表达，高表达率为[70~80]%，而配对癌旁正常组织中仅[1~2]例呈弱阳性表达。肺腺癌组(5 例)中 4 例高表达，肺鳞癌组(5 例)中 3~4 例高表达。

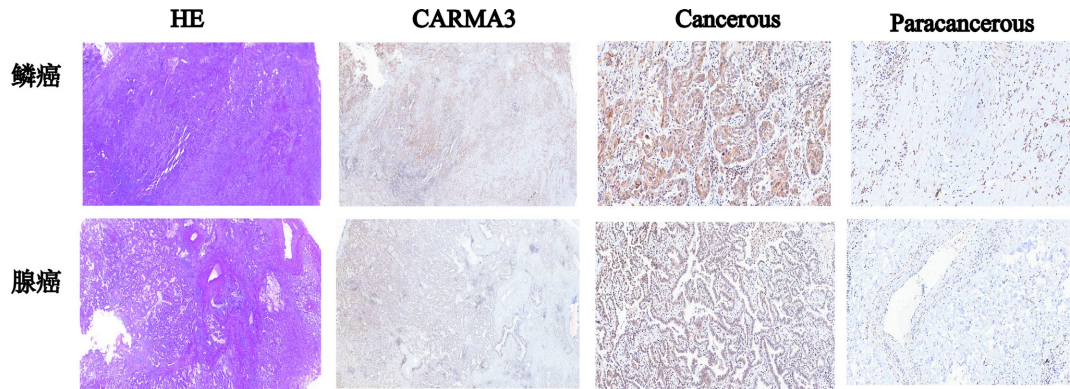


Figure 1. HE staining of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma, and CARMA3 immunohistochemical expression in tumor and peritumoral tissues

图 1. 鳞癌和腺癌 HE 染色以及免疫组化 CARMA3 在癌和癌旁的表达情况

3.2. SiCARMA3 抑制 H520 细胞和 H1975 细胞系和过表达实验组中的 CARMA3 的表达

通过 Western blot 法检测 siCARMA3 抑制 H520 细胞和 H1975 细胞系和过表达实验组中的 CARMA3 的表达，如图 2 所示，与阴性对照组(WT 组)比较，利用 siCARMA3 转染的 H520 细胞和 H1975 细胞系中，CARMA3 蛋白的表达显著降低，而过表达(OE 组)实验组中的 CAMRA3 蛋白显著增高。差异有统计学意义($P < 0.01$)，提示 siCARMA3 能够抑制 CARMA3 的表达。

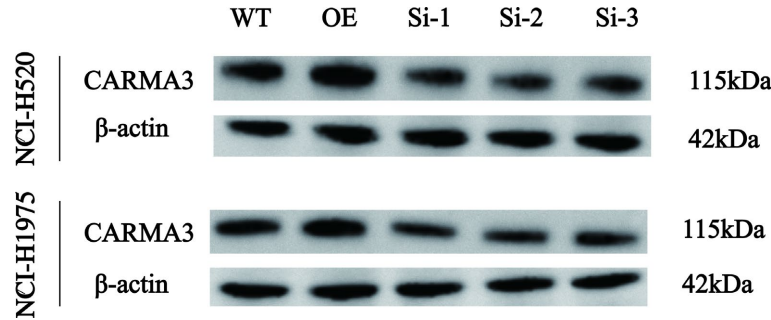


Figure 2. Western blot results showing CARMA3 inhibition in the H520 and H1975 cell lines and in the CARMA3 overexpression group

图 2. SiCARMA3 抑制 H520 细胞和 H1975 细胞系和过表达实验组中的 CARMA3 的 Western blot 结果

3.3. 敲低 H520 细胞和 H1975 细胞系中 CARMA3 的表达可以抑制其迁徙和侵袭能力

为了探讨 CARMA3 在肺鳞癌 H1975 细胞和肺腺癌 H520 细胞中的表达和 NSCLC 迁徙和侵袭能力之间的关系，我们进行了细胞划痕实验和 Transwell 实验。在 NCI-H520 细胞中，如图 3 所示，我们通过细胞划痕实验和 Transwell 迁移实验评估了 CARMA3 表达水平对细胞迁移能力的影响。在细胞划痕实验中，培养 24 小时后，CARMA3 过表达(OE)组的划痕愈合率显著高于野生型(WT)对照组($**P < 0.01$)，而 CARMA3 敲低(Si)组的愈合率则明显低于 WT 组($*P < 0.05$)。

Transwell 迁移实验进一步验证了这一趋势：OE 组穿过小室膜的迁移细胞数量显著多于 WT 组，而 Si 组的迁移细胞数则显著少于 WT 组。这两项实验的结果相互印证，表明在 NCI-H520 细胞中，CARMA3 的表达水平与细胞迁移能力呈正相关，即过表达 CARMA3 可显著促进细胞的迁移与伤口愈合能力，而敲低 CARMA3 则显著抑制这些过程(**** $P < 0.0001$)。在 NCI-H1975 细胞中，在图 4 中所示，CARMA3 过表达可显著促进细胞迁移与伤口愈合，敲低 CARMA3 抑制了该过程，以上结果表明，敲低 CARMA3 可显著抑制 NSCLC 细胞的迁移能力和侵袭能力。

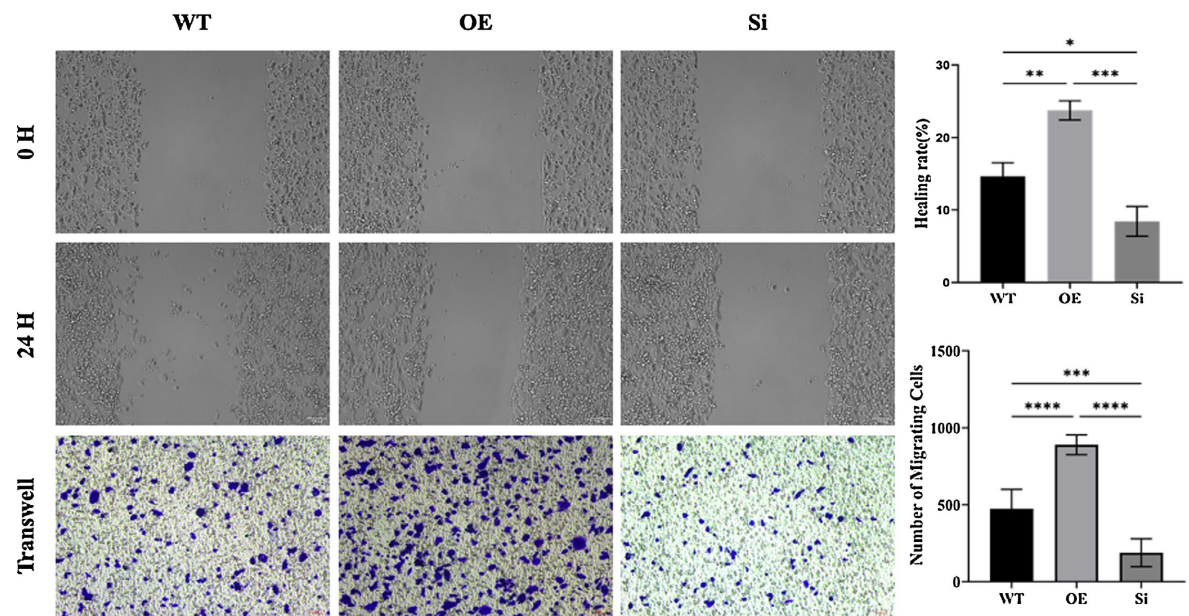


Figure 3. Results of the cell scratch assay and Transwell migration assay in NCI-H520 cells
图 3. NCI-H520 细胞中的细胞划痕实验和 Transwell 迁移实验结果

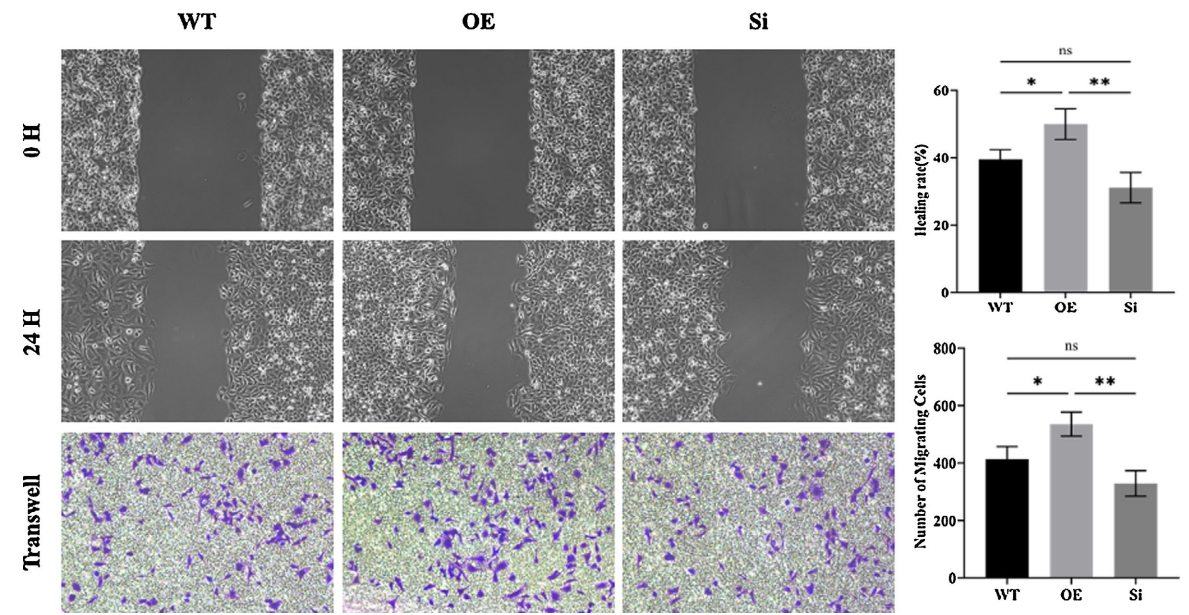


Figure 4. Results of the cell scratch assay and Transwell migration assay in NCI-H1975 cells
图 4. NCI-H1975 细胞中的细胞划痕实验和 Transwell 迁移实验结果

3.4. 敲低 H520 细胞和 H1975 细胞系中 CARMA3 的表达可以促进其凋亡

我们使用流式细胞仪对三组细胞的凋亡情况进行了分析, 结果展示, 在 NCI-H520 细胞中, 如图 5 所示, CARMA3 的表达水平与细胞凋亡率呈负相关: 过表达 CARMA3 能够显著抑制细胞凋亡($*P < 0.05$), 而敲低 CARMA3 则显著促进细胞凋亡($**P < 0.01$), 这与之前观察到的 CARMA3 对细胞迁移的正向调控作用相呼应。在 NCI-H1975 细胞中, 图 6 结果显示 CARMA3 敲低可显著促进细胞凋亡($**P < 0.01$), 结果显示, 敲低 CARMA3 可能诱导 NSCLC 细胞发生凋亡。

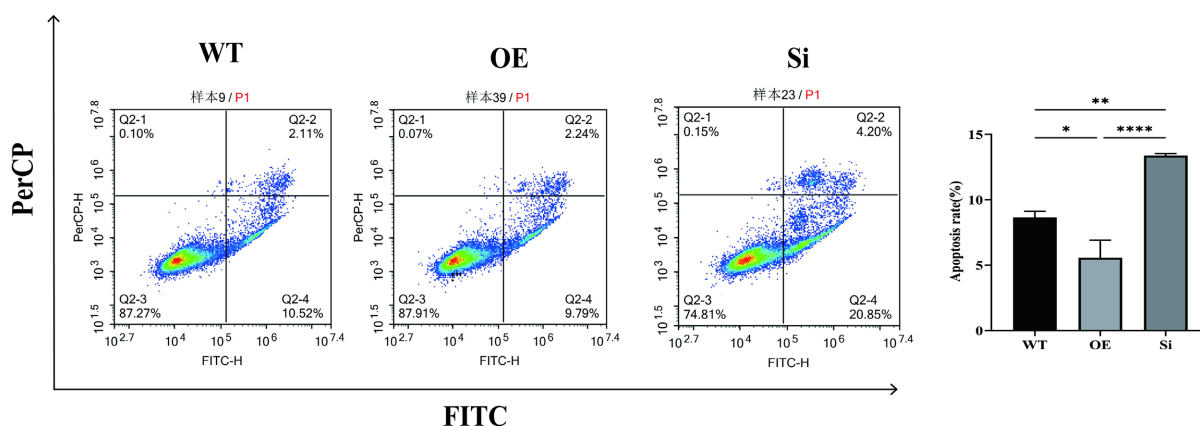


Figure 5. Results of the flow cytometry-based apoptosis assay in NCI-H520 cells

图 5. NCI-H520 细胞的流式凋亡实验结果

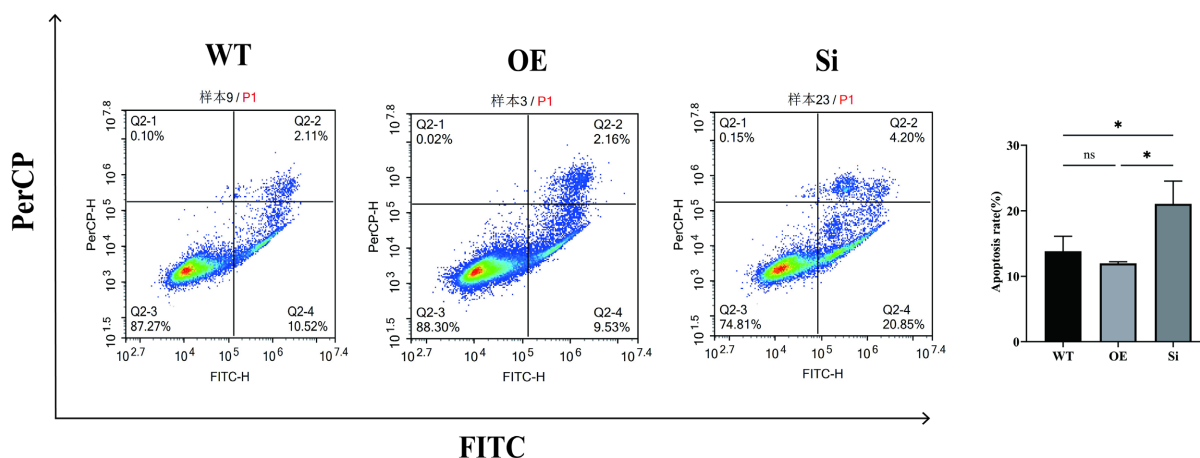


Figure 6. Results of the flow cytometry-based apoptosis assay in NCI-H1975 cells

图 6. NCI-H1975 细胞的流式凋亡实验结果

3.5. 敲低 H520 细胞和 H1975 细胞系中 CARMA3 的表达可以抑制细胞增殖

通过 CCK-8 实验, 结果显示, 在图 7(A)中, NCI-H520 细胞中, 目的基因过表达可显著增强细胞增殖活力, 较 WT 对照组升高具有统计学意义($**P < 0.01$); 目的基因敲低则显著抑制细胞增殖, 活力水平显著低于 WT 对照组($***P < 0.001$); 同时过表达组与敲低组间的细胞增殖活力存在极显著差异($***P < 0.0001$)。在图 7(B)中, NCI-H1975 细胞中, 目的基因过表达同样发挥促增殖作用, 细胞活力较 WT 对照组显著升高($*P < 0.05$), 而过表达组的细胞增殖活力极显著高于敲低组($***P < 0.001$), 敲低组相比于 WT 对照组, 也抑制了细胞的增殖能力。上述结果表明, 敲低 CARMA3 可明显抑制肺腺癌和肺鳞癌细

胞的增殖能力。

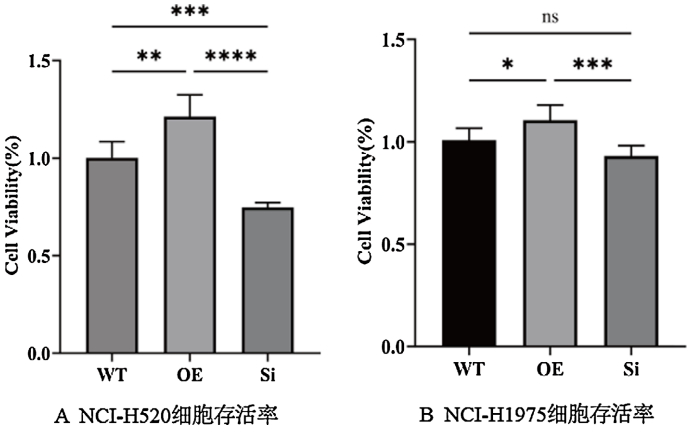


Figure 7. (A) NCI-H520 cell viability; (B) NCI-H1975 cell viability
图 7. (A) NCI-H520 细胞存活率; (B) NCI-H1975 细胞存活率

3.6. 敲低 CARMA3 对 NF-κB 信号通路核心蛋白的影响

为探讨 CARMA3 调控 NSCLC 细胞生物学行为的分子机制，本研究通过 Western blot 检测了 si-CARMA3 转染后 H1975 和 H520 细胞中 NF-κB 信号通路核心蛋白的表达变化。结果如图 8 所示，与 si-NC 组相比，si-CARMA3 组 H1975 和 H520 细胞中总 NF-κB p65 蛋白未见明显变化(P > 0.05)，而磷酸化 NF-κB p65 蛋白水平显著降低(P < 0.05)，以 p-NF-κB p65/总 NF-κB p65 比值进行校正后，si-CARMA3 组磷酸化水平仍显著低于 si-NC 组(P < 0.05)，排除了总蛋白量变化对磷酸化信号的干扰。上述结果在 H1975 (肺腺癌)和 H520 (肺鳞癌)两株细胞中趋势一致，说明 CARMA3 在两种 NSCLC 亚型中均通过促进 p65 磷酸化来激活 NF-κB 信号通路，敲低 CARMA3 可有效阻断该通路的活化。

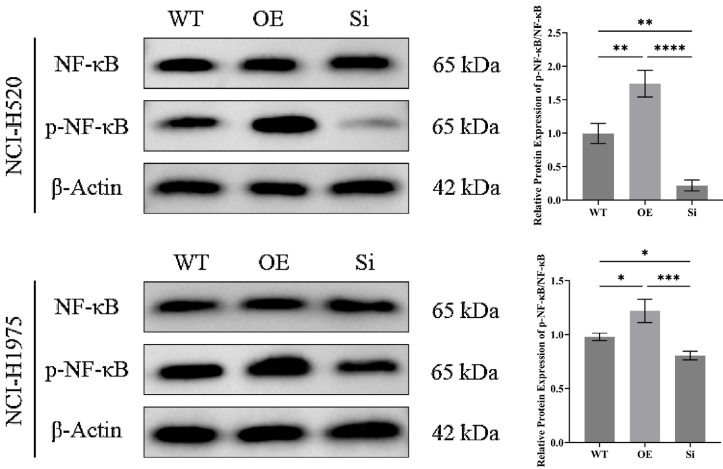


Figure 8. Western blot results showing the inhibition of NF-κB and p-NF-κB by SiCARMA3 in the H520 and H1975 cell lines and in the overexpression group
图 8. SiCARMA3 抑制 H520 细胞和 H1975 细胞系和过表达实验组中的 NF-κB 和 p-NF-κB 的 Western blot 结果

3.7. TCGA 数据库中 CARD10 在 NSCLC 不同亚型中的表达分析

基于 TCGA 数据库的生物信息学分析，结果如图 9 所示，CARD10(CARMA3 编码基因)在 LUAD(n

= 517)和 LUSC (n = 501)肿瘤组织中均持续表达(所有样本均有检出)。CARD10 在 LUAD 中表达水平(中位数 = 524.69 RSEM, 均值 = 618.21 RSEM)显著高于 LUSC (中位数 = 378.96 RSEM, 均值 = 488.01 RSEM, Mann-Whitney U 检验, $P = 5.07 \times 10^{-12}$)。尽管两亚型间表达量存在统计学差异, 但两种亚型中均观察到 CARMA3 的广泛表达, 从大队列数据层面进一步支持 CARMA3 在 NSCLC 不同亚型中均有显著生物学活性。

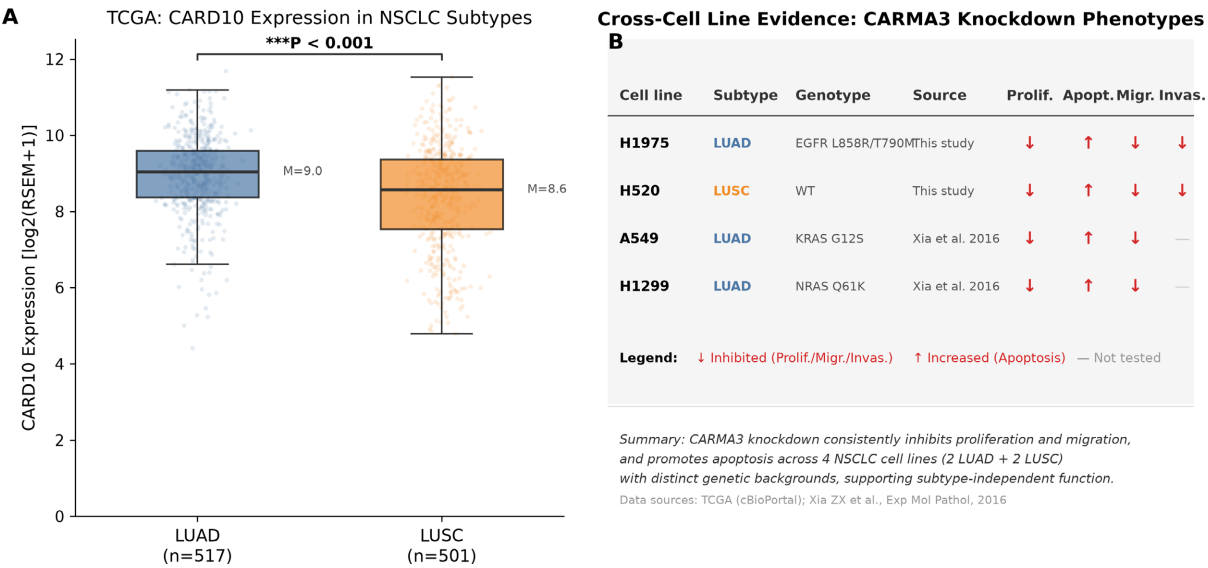


Figure 9. Summary of CARD10 expression patterns in LUAD and LUSC from the TCGA database and evidence supporting its functional validation across cell lines

图 9. TCGA 数据库中 CARD10 在 LUAD 与 LUSC 中的表达分布及跨细胞系功能验证证据汇总

4. 讨论

肺癌的高侵袭转移特性是导致患者预后不良的核心难题, 探寻驱动 NSCLC 恶性进展的关键分子是肿瘤研究的重要方向。本研究从临床组织表达和体外细胞功能两个层面, 探讨了 CARMA3 在 NSCLC 中的作用。免疫组化结果初步显示 CARMA3 在大多数 NSCLC 组织中呈高表达, 而癌旁正常组织仅微弱表达, 与 Li 等[6]报道的 68.8%阳性率趋势一致, 提示 CARMA3 可能参与 NSCLC 的发生发展过程。更重要的是, 本研究系统证实了敲低 CARMA3 可同时抑制 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 并促进凋亡, 且这一效应在肺腺癌细胞 H1975 和肺鳞癌细胞 H520 中均得到验证。

在增殖调控方面, 本研究发现敲低 CARMA3 后 H1975 和 H520 细胞的增殖能力均显著受抑。这与已有的 CARMA3 在其他肿瘤中的研究结果一致[19]。Jiang [5]等的研究直接证实 CARMA3 是 EGFR 介导的 NF- κ B 活化的关键衔接分子——EGFR 通过激活 PKC 进而磷酸化 CARMA3 的 Linker 区域, 触发 CBM 复合体组装和 NF- κ B 活化。值得注意的是, 本研究所用的 H1975 细胞携带 EGFR L858R/T790M 双突变, 其 EGFR 信号处于持续活化状态, 这为本研究结果赋予了额外的临床相关性: CARMA3 可能参与 EGFR 突变型肺腺癌中 EGFR 信号向 NF- κ B 通路的传导, 其高表达或许与 EGFR-TKI 获得性耐药中 NF- κ B 旁路活化有关[20]。但这一推测需要进一步实验验证。

在凋亡调控方面, 本研究流式细胞术检测显示敲低 CARMA3 可显著诱导 NSCLC 细胞凋亡。NF- κ B 通路的经典功能之一就是转录激活一系列抗凋亡基因, 如 Bcl-2、Bcl-xL、cIAP1/2、Survivin 和 XIAP 等[21]。当 CARMA3 被敲低后, CBM 复合体功能受损, NF- κ B 活性下降, 下游抗凋亡蛋白表达减少, 从而

降低凋亡阈值,使肿瘤细胞更容易进入凋亡程序。这一发现提示,CARMA3可能成为增强NSCLC化疗敏感性的潜在干预靶点。

迁移和侵袭是肿瘤转移的关键步骤。本研究中划痕实验和Transwell实验分别从二维迁移和三维侵袭两个层面证实,敲低CARMA3可显著削弱NSCLC细胞的运动能力和侵袭能力。CARMA3调控侵袭转移的分子机制可能涉及多个层面:其一,NF- κ B直接转录调控基质金属蛋白酶MMP-2和MMP-9,促进细胞外基质降解和肿瘤浸润[22];其二,NF- κ B参与EMT程序的启动,调控E-cadherin下调及N-cadherin、Vimentin、Snail和Twist等间质标志物的上调[17];其三,有研究提示CARMA3还可能通过不依赖NF- κ B的方式参与MAPK/ERK信号通路的调控[18]。值得注意的是,Xia等[23]在肺腺癌细胞A549和H1299中同样证实敲低CARMA3可抑制细胞侵袭和迁移、下调MMP-9表达,并增加Bax和Caspase-3表达、下调Bcl-2,与本研究结果高度一致。A549为KRAS突变型肺腺癌细胞,H1299为NRAS突变型,携带与H1975截然不同的驱动基因突变,却在敲低CARMA3后表现出与本研究一致的增殖、迁移和凋亡表型变化,从文献旁证角度支持CARMA3促癌功能在NSCLC不同分子背景中的普遍性。本研究中H1975(腺癌)和H520(鳞癌)在敲低CARMA3后均表现出迁移和侵袭能力的减弱,初步提示CARMA3在两种病理类型的NSCLC中可能发挥促侵袭转移的功能。但鉴于每种亚型仅采用了一株细胞系,尚不能完全排除细胞系特异性偏倚的影响,该结论有待在更多细胞系中进一步验证。

研究Western blot结果显示,敲低CARMA3后总NF- κ B p65蛋白水平无明显变化,而磷酸化NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65)水平显著降低,从蛋白水平直接证实了CARMA3对NF- κ B通路活化的正向调控作用,且该调控发生在磷酸化修饰层面而非蛋白总量层面,与前述功能表型变化形成良好的机制呼应。

为进一步从公共数据库层面验证CARMA3在NSCLC中的表达特征,本研究基于TCGA(The Cancer Genome Atlas)数据库进行了生物信息学分析。利用cBioPortal数据库提取TCGA肺腺癌(LUAD, n = 517)和肺鳞癌(LUSC, n = 501)的RNA-seq V2表达数据,分析CARD10(CARMA3编码基因)在两种亚型中的表达水平。Mann-Whitney U检验显示,CARD10在LUAD中表达水平(中位数 = 524.69 RSEM,均值 = 618.21 RSEM)显著高于LUSC(中位数 = 378.96 RSEM,均值 = 488.01 RSEM, $P = 5.07 \times 10^{-12}$)。所有1018例肿瘤样本中均检测到CARD10表达,进一步证实CARMA3在NSCLC两种主要病理亚型中均有显著表达,支持其作为NSCLC研究靶点的生物学合理性。该分析表明,尽管LUAD和LUSC中CARMA3的表达量存在统计学差异,但CARMA3在两种亚型中均为活跃表达的基因,与本研究免疫组化结果及功能实验的发现方向一致。

然而,本研究存在一定的局限性。首先,临床组织标本量仅为10例,限制了将IHC结果与其临床病理参数进行有意义的统计学关联分析,结论的普适性需更大样本验证。其次,体外功能实验虽覆盖了增殖、凋亡、迁移和侵袭等多个表型,但未对CARMA3下游的具体效应分子(如Cyclin D1、Bcl-2、MMP-2/9等)进行表达水平的直接检测,机制的深入程度有待加强。再次,缺乏体内动物实验(如裸鼠皮下成瘤模型)验证CARMA3敲低对肿瘤生长的抑制效应。此外,本研究每种病理亚型仅采用了一株细胞系(H1975和H520),虽两株细胞分别代表腺癌和鳞癌且分子背景差异显著,但仍无法完全排除细胞系特异性偏倚的可能。未来研究拟引入更多NSCLC细胞系(如肺腺癌细胞A549、H1299、PC9,肺鳞癌细胞H226、SK-MES-1等)重复关键功能学实验,以验证CARMA3促癌功能的亚型普遍性。

综上所述,本研究初步证实CARMA3在NSCLC组织中高表达,且敲低CARMA3可抑制NSCLC细胞增殖、迁移与侵袭,促进凋亡,表明CARMA3是NSCLC的促癌因子。后续研究拟在扩大样本量验证CARMA3与临床病理特征及预后关系的基础上,进一步通过裸鼠成瘤实验和信号通路磷酸化检测,深入阐明CARMA3调控NSCLC恶性进展的分子机制,为以CARMA3为靶点的NSCLC治疗策略提供更充分的实验依据。

声 明

本研究获得四川省什邡市人民医院伦理委员会批准(伦理审批号: 202450)。

基金项目

德阳市科技计划项目(2024SZY120)。

参考文献

- [1] Zhang, S. and Lin, X. (2019) CARMA3: Scaffold Protein Involved in NF- κ B Signaling. *Frontiers in Immunology*, **10**, Article ID: 176. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00176>
- [2] Staal, J., Driege, Y., Haegman, M., Kreike, M., Iliaki, S., Vanneste, D., *et al.* (2021) Defining the Combinatorial Space of PKC::CARD-CC Signal Transduction Nodes. *The FEBS Journal*, **288**, 1630-1647. <https://doi.org/10.1111/febs.15522>
- [3] Zhu, L., Li, Y., Xie, X., Zhou, X., Gu, M., Jie, Z., *et al.* (2019) TBKBP1 and TBK1 Form a Growth Factor Signalling Axis Mediating Immunosuppression and Tumorigenesis. *Nature Cell Biology*, **21**, 1604-1614. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0429-8>
- [4] Ekambaram, P., Lee, J.-Y., Hubel, N.E., Hu, D., Yemini, S., Campbell, P.G., *et al.* (2018) The CARMA3-Bcl10-MALT1 Signalingosome Drives NF- κ B Activation and Promotes Aggressiveness in Angiotensin II Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Research*, **78**, 1225-1240. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-1089>
- [5] Jiang, T., Grabiner, B., Zhu, Y., Jiang, C., Li, H., You, Y., *et al.* (2011) CARMA3 Is Crucial for EGFR-Induced Activation of NF- κ B and Tumor Progression. *Cancer Research*, **71**, 2183-2192. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-3626>
- [6] Li, Z., Qu, L., Dong, Q., Huang, B., Li, H., Tang, Z., *et al.* (2012) Overexpression of CARMA3 in Non-Small-Cell Lung Cancer Is Linked for Tumor Progression. *PLOS ONE*, **7**, e36903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036903>
- [7] Xie, C., Han, Y., Fu, L., Li, Q., Qiu, X. and Wang, E. (2014) Overexpression of CARMA3 Is Associated with Advanced Tumor Stage, Cell Cycle Progression, and Cisplatin Resistance in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Tumor Biology*, **35**, 7957-7964. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2070-2>
- [8] Chang, T., Wu, C., Sheu, M., Yang, R. and Liu, S. (2021) CARMA3 Promotes Colorectal Cancer Cell Motility and Cancer Stemness via Yap-Mediated NF- κ B Activation. *Cancers*, **13**, Article 5946. <https://doi.org/10.3390/cancers13235946>
- [9] Shi, D., Zhang, Z. and Kong, C. (2021) CARMA3 Transcriptional Regulation of STMN1 by NF- κ B Promotes Renal Cell Carcinoma Proliferation and Invasion. *Technology in Cancer Research & Treatment*, **20**. <https://doi.org/10.1177/15330338211027915>
- [10] Gao, F., Zhang, Y., Yang, F., Wang, P., Wang, W., Su, Y., *et al.* (2014) Survivin Promotes the Invasion of Human Colon Carcinoma Cells by Regulating the Expression of MMP-7. *Molecular Medicine Reports*, **9**, 825-830. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1897>
- [11] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [12] Zhou, G. (2019) Tobacco, Air Pollution, Environmental Carcinogenesis, and Thoughts on Conquering Strategies of Lung Cancer. *Cancer Biology & Medicine*, **16**, 700-713. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0180>
- [13] George, J., Lim, J.S., Jang, S.J., Cun, Y., Ozretić, L., Kong, G., *et al.* (2015) Comprehensive Genomic Profiles of Small Cell Lung Cancer. *Nature*, **524**, 47-53. <https://doi.org/10.1038/nature14664>
- [14] Man, X., Liu, T., Jiang, Y., Zhang, Z., Zhu, Y., Li, Z., *et al.* (2019) Silencing of CARMA3 Inhibits Bladder Cancer Cell Migration and Invasion via Deactivating B-Catenin Signaling Pathway. *OncoTargets and Therapy*, **12**, 6309-6322. <https://doi.org/10.2147/ott.s191502>
- [15] Zhang, S., Pan, D., Jia, X., Lin, X. and Zhao, X. (2017) The CARMA3-BCL10-MALT1 (CBM) Complex Contributes to DNA Damage-Induced NF- κ B Activation and Cell Survival. *Protein & Cell*, **8**, 856-860. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0441-3>
- [16] McAuley, J.R., Freeman, T.J., Ekambaram, P., Lucas, P.C. and McAllister-Lucas, L.M. (2018) CARMA3 Is a Critical Mediator of G Protein-Coupled Receptor and Receptor Tyrosine Kinase-Driven Solid Tumor Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, **9**, Article No. 1887. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01887>
- [17] Huber, M.A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., *et al.* (2004) NF- κ B Is Essential for Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in a Model of Breast Cancer Progression. *Journal of Clinical Investigation*, **114**, 569-581. <https://doi.org/10.1172/jci200421358>

-
- [18] Sun, J. (2010) CARMA3: A Novel Scaffold Protein in Regulation of NF- κ B Activation and Diseases. *World Journal of Biological Chemistry*, **1**, 353-361. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i12.353>
- [19] Du, S., Jia, L., Zhang, Y., Fang, L., Zhang, X. and Fan, Y. (2014) CARMA3 Is Upregulated in Human Pancreatic Carcinoma, and Its Depletion Inhibits Tumor Proliferation, Migration, and Invasion. *Tumor Biology*, **35**, 5965-5970. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1791-6>
- [20] Bivona, T.G., Hieronymus, H., Parker, J., Chang, K., Taron, M., Rosell, R., *et al.* (2011) FAS and NF- κ B Signalling Modulate Dependence of Lung Cancers on Mutant EGFR. *Nature*, **471**, 523-526. <https://doi.org/10.1038/nature09870>
- [21] Karin, M. and Lin, A. (2002) NF- κ B at the Crossroads of Life and Death. *Nature Immunology*, **3**, 221-227. <https://doi.org/10.1038/ni0302-221>
- [22] Yan, M., Xu, Q., Zhang, P., Zhou, X., Zhang, Z. and Chen, W. (2010) Correlation of NF- κ B Signal Pathway with Tumor Metastasis of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *BMC Cancer*, **10**, Article No. 437. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-437>
- [23] Xia, Z.X., Li, Z.X., Zhang, M., Sun, L.M., Zhang, Q.F. and Qiu, X.S. (2016) CARMA3 Regulates the Invasion, Migration, and Apoptosis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Activating NF- κ B and Suppressing the P38 MAPK Signaling Pathway. *Experimental and Molecular Pathology*, **100**, 353-360. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.10.004>