

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.02.007

circAGFG1 靶向 miR-4429 对胆管癌 QBC939 细胞增殖、迁移与侵袭的影响及其可能的机制

王全晖, 袁守信, 张元浩(联勤保障部队第九八八医院 肿瘤科, 河南 郑州 450042)

[摘要] **目的:**探讨 circAGFG1 对胆管癌 QBC939 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及可能机制。**方法:**收集 2017 年 4 月至 2019 年 10 月于联勤保障部队第九八八医院接受手术的 33 例胆管癌患者的癌组织及对应癌旁组织, qPCR 法检测组织中 circAGFG1 和 miR-4429 表达水平。体外培养胆管癌 QBC939 细胞, 分别转染 si-circAGFG1、miR-4429 mimic、共转染 si-circAGFG1 与 anti-miR-4429 后, 采用 CCK-8 法和克隆形成实验检测对细胞增殖的影响, 划痕实验和 Transwell 法分别检测对细胞迁移和侵袭的影响, WB 法检测对细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达的影响。双荧光素酶报告基因实验验证 circAGFG1 和 miR-4429 之间的靶向调控关系。**结果:**胆管癌组织中 circAGFG1 的表达量高于癌旁组织 (3.89 ± 0.26 vs 1.00 ± 0.08 , $P < 0.05$), 而 miR-4429 的表达量低于癌旁组织 (0.28 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.05 , $P < 0.05$)。干扰 circAGFG1 或过表达 miR-4429 后, QBC939 细胞增殖水平、克隆形成数、划痕愈合率、侵袭细胞数及细胞中 N-cadherin 蛋白表达均显著降低 (均 $P < 0.05$), 而 E-cadherin 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。circAGFG1 可靶向结合 miR-4429, 且干扰 circAGFG1 会促进 QBC939 细胞中 miR-4429 表达 (均 $P < 0.05$)。下调 miR-4429 表达能够逆转干扰 circAGFG1 对 QBC939 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 (均 $P < 0.05$)。**结论:**circAGFG1 在胆管癌组织中表达升高, 其可能通过靶向抑制 miR-4429 促进胆管癌 QBC939 细胞的增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 胆管癌; QBC939 细胞; circAGFG1; miR-4429; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.8; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2022)02-0128-07

Effect of circAGFG1 targeting miR-4429 on the proliferation, migration and invasion of cholangiocarcinoma QBC939 cells and its possible mechanism

WANG Quanhui, YUAN Shouxin, ZHANG Yuanhao (Department of Oncology, the 988th Hospital of the Joint Logistics Support Force, Zhengzhou 450042, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of circAGFG1 on the proliferation, migration and invasion of cholangiocarcinoma QBC939 cells and its possible mechanism. **Methods:** The tumor tissues and corresponding paracancerous tissues of 33 patients with cholangiocarcinoma who underwent surgical resection at the 988th Hospital of the Joint Logistics Support Force from April 2017 to October 2019 were collected. qPCR was used to detect the expression level of circAGFG1 and miR-4429 in the tissues. Cholangiocarcinoma QBC939 cells were cultured *in vitro* and transfected with si-circAGFG1 and miR-4429 mimics respectively, or co-transfected with si-circAGFG1 and anti-miR-4429. Then, cell proliferation was detected by CCK-8 method and clone formation test, cell migration and invasion were detected by scratch test and Transwell, and the protein expression of E-cadherin and N-cadherin in cells was determined by Western blotting. Dual-luciferase reporter gene experiment was adopted to verify the regulatory relationship between circAGFG1 and miR-4429. **Results:** The expression of circAGFG1 was higher (3.89 ± 0.26 vs 1.00 ± 0.08 , $P < 0.05$) while the expression of miR-4429 (0.28 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.05 , $P < 0.05$) was lower in cholangiocarcinoma tissue than those in paracancerous tissues. After the interference with circAGFG1 or over-expression of miR-4429, the cell proliferation level, number of clone formation, scratch healing rate, number of invaded cells, and the protein expression of N-cadherin in QBC939 cells were reduced (all $P < 0.05$), but the protein expression of E-cadherin was elevated ($P < 0.05$). circAGFG1 could targetedly bind with miR-4429, and interfering circAGFG1 promoted the expression of miR-4429 in QBC939 cells (all $P < 0.05$). Down-regulation of miR-4429 reversed the effect of interference with circAGFG1 on the proliferation, migration and invasion of QBC939 cells (all $P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of circAGFG1 is up-regulated in cholangiocarcinoma tissues, which may promote the proliferation, migration and invasion of cholangiocarcinoma QBC939 cells by targetedly inhibiting the expression of miR-4429.

[作者简介] 王全晖(1976—)男, 博士, 副主任医师, 主要从事肝胆胰相关肿瘤的研究, E-mail: jmlq87@163.com

[通信作者] 王全晖, E-mail: jmlq87@163.com

[Key words] cholangiocarcinoma; QBC939 cell; circAGFG1; miR-4429; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(2): 128-134. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.02.007]

胆管癌起源于胆道上皮细胞,其发病率呈增长趋势。由于胆管癌发病隐匿,且临床缺乏特异性症状,80%以上的患者确诊时已发生远处转移或邻近组织浸润,错失最佳手术时间,预后不佳^[1]。探究胆管癌发生发展的分子机制对该肿瘤的治疗具有积极作用。环状 RNA AGFG1 (circular RNA ArfGAP with FG repeats 1, circAGFG1) 的异常表达与多种肿瘤的发展进程有关,其在宫颈癌、非小细胞肺癌等肿瘤中表达升高,促进肿瘤细胞恶性表型,进而促进肿瘤的发展进程^[2-3]。然而, circAGFG1 对胆管癌细胞发生发展的影响和机制还未知。StarBase 靶基因在线软件预测显示, circAGFG1 可能靶向调控 miR-4429。miR-4429 是一种在多种肿瘤如子宫内膜癌^[4]、结直肠癌^[5]、胃癌^[6]和乳头状甲状腺癌^[7]中呈低表达的 miRNA,上调 miR-4429 表达抑制这些肿瘤细胞的恶性生物学行为,miR-4429 为这些肿瘤的治疗提供了潜在分子靶点。目前,少见 miR-4429 影响胆管癌细胞恶性表型的相关报道。因此,本研究首先检测了 33 例胆管癌组织中 circAGFG1 和 miR-4429 的表达,并以胆管癌 QBC939 细胞为研究对象,探究了 circAGFG1 和 miR-4429 对 QBC939 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及 circAGFG1 是否通过靶向 miR-4429 发挥作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2017 年 4 月至 2019 年 10 月于本院行手术切除并经病理证实的 33 对胆管癌组织及癌旁组织标本,液氮中保存。33 例胆管癌患者中,19 例为男性、14 例为女性,平均年龄(59.28±7.45)岁。按照美国癌症学会肝外胆管癌 TNM 分期 2006 版进行分期,I 期、II 期、III 期和 IV 期患者分别有 5 例、14 例、11 例和 3 例。依据组织分化程度不同,高、中、低分化患者分别为 6 例、12 例和 15 例。纳入标准:首次确诊;术前未行放、化疗治疗。排除标准:合并重要脏器如心、肝、肾功能障碍者;合并慢性病如糖尿病、高血压患者;合并其他恶性肿瘤。本研究方案经医院伦理委员会批准,且患者或家属签署知情同意书。

1.2 细胞和试剂

QBC939 细胞购自中国科学院上海细胞库,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒、

RPMI 1640 培养基和双荧光素酶活性检测试剂盒均购自北京索莱宝公司, RNA 抽提试剂盒、PCR 检测试剂盒均购自大连宝生物公司,引物序列、miR-4429 模拟物(mimic)、模拟对照序列(miR-NC)、circAGFG1 小干扰 RNA(si-circAGFG1)、小干扰 RNA 阴性对照(si-NC)、miR-4429 抑制剂(anti-miR-4429)及抑制剂阴性序列(anti-miR-NC)均由上海生工公司合成,兔抗人上皮钙黏素(epithelial cadherin, E-cadherin)、神经钙黏素(neural cadherin, N-cadherin)和 GAPDH 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司, Lipofectamine™ 2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 qPCR 法检测 circAGFG1 和 miR-4429 在胆管癌组织中的表达

于研钵中研磨新鲜组织样本,该过程必须在液氮保护下进行。用 RNA 抽提试剂盒提取组织总 RNA,经逆转录生成 cDNA 后行 qPCR 扩增。引物序列: circAGFG1 上游 5'-CCAGTTGTAGGTCGTTCTCAAG-3',下游 5'-GGATTAAATCCTCGCCTGCATG-3'; miR-4429 上游 5'-GGCCAGGCAGTCTGAGTTG-3',下游 5'-GGGAGAAAAGCTGGGCTGAG-3'; GAPDH 上游 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'; U6 上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 circAGFG1 相对 GAPDH、miR-4429 相对 U6 的表达量。

1.4 QBC939 细胞培养与分组转染

用完全培养基(含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基)培养 QBC939 细胞。将 QBC939 细胞按 1.0×10^5 个/孔接种至 6 孔板中培养 24 h,将 Lipofectamine™ 2000 试剂分别与 si-NC(si-NC 组)、si-circAGFG1(si-circAGFG1 组)、miR-NC(miR-NC 组)、miR-4429 mimic(miR-4429 组)、si-circAGFG1 和 anti-miR-NC(si-circAGFG1+anti-miR-NC 组)、si-circAGFG1 和 anti-miR-4429(si-circAGFG1+anti-miR-4429 组)混和均匀,加至 6 孔板中(100 μ L/孔),孵育细胞 12 h。更换为新鲜完全培养基,培养 24 h 后, qPCR 法检测细胞中 circAGFG1 或 miR-4429 表达,验证转染效果后用于后续实验。

1.5 CCK-8 法检测 circAGFG1 和 miR-4429 表达对 QBC939 细胞增殖的影响

将各组细胞均按 2.5×10^4 个/孔接种至 96 孔板中培养 24 h,加 CCK-8 液(10 μ L/孔),孵育 2 h 后,将 96

孔板放于酶标仪卡槽中,检测在450 nm波长处的光密度(D)值,以 D 值代表细胞增殖水平。

1.6 克隆形成实验检测 circAGFG1 和 miR-4429 表达对 QBC939 细胞克隆形成能力的影响

将各组细胞均按 1.0×10^4 个/孔接种至6孔板中,培养14 d,在培养期间每2 d换1次新鲜培养基。弃培养基,对细胞进行固定和染色后,显微镜下观察,统计克隆数。

1.7 划痕愈合实验检测 circAGFG1 和 miR-4429 表达对 QBC939 细胞迁移的影响

将各组细胞均按 1.0×10^5 个/孔接种至6孔板中,培养4 h,弃培养基,在培养板底部划两条平行线,并去除划痕间细胞,测量划痕间距(d),记为 d_{0h} 。重新加新鲜培养基并培养细胞24 h后,测量划痕间距,记为 d_{24h} 。划痕愈合率 = $(d_{0h} - d_{24h}) / d_{0h} \times 100\%$ 。

1.8 Transwell 法检测 circAGFG1 和 miR-4429 表达对 QBC939 细胞侵袭的影响

铺人工基膜(matrigel)至Transwell小室的上室,干燥后,接种各组细胞,各组细胞均按为 1.0×10^4 个接种;在下室加500 μ L完全培养基。培养24 h后,弃培养基,对下室侧细胞进行固定和染色,显微镜观察,计数。

1.9 WB 法检测 circAGFG1 和 miR-4429 表达对 QBC939 细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达的影响

将各组细胞均按 1.0×10^5 个/孔接种至6孔板中,培养24 h,用RIPA试剂对各组细胞中总蛋白进行提取,经BCA定量、SDS-PAGE分离、转膜和封闭后,分别加入抗E-cadherin(1:500)、抗N-cadherin(1:500)和抗GAPDH(1:1 000)一抗于4℃冰箱中过夜,洗膜后,再于37℃摇床中用山羊抗兔二抗(1:1 000)处理2 h,加显影液显影,曝光拍照,Image J 软件分析E-cadherin、N-cadherin相对GAPDH的表达量。

1.10 双荧光素酶报告基因实验验证 circAGFG1 与 miR-4429 之间的靶向关系

根据StarBase靶基因在线软件(<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)预测显示的 circAGFG1 与 miR-4429 的核苷酸序列的结合位点构建野生型(WT)和突变型(MUT)circAGFG1 荧光素酶报告基因载体。将QBC939细胞接种至6孔板中培养24 h,细胞接种起始密度为 1.0×10^5 个/孔。将Lipofectamine™2000试剂分别与miR-4429 mimic和WT-circAGFG1、miR-NC和WT-circAGFG1、miR-4429 mimic和MUT-circAGFG1、miR-NC和MUT-circAGFG1混合均匀,加至6孔板中(100 μ L/孔),孵育细胞12 h。收集细胞并充分裂解,将裂解液离

心(3 500 r/min、10 min)。取20 μ L上清液,将其与100 μ L 1×萤火虫或海肾荧光素酶反应工作液混合均匀,检测萤火虫或海肾的荧光强度。细胞荧光素酶活性以萤火虫与海肾荧光强度的比值表示。

1.11 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circAGFG1 和 miR-4429 在胆管癌组织中的表达

qPCR检测结果显示, circAGFG1 在胆管癌组织中的表达量显著高于癌旁组织(3.89 ± 0.26 vs 1.00 ± 0.08 , $t = 61.029$, $P < 0.05$), miR-4429 在胆管癌组织中的表达量显著低于癌旁组织(0.28 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.05 , $t = 70.933$, $P < 0.05$)。

2.2 干扰 circAGFG1 表达抑制 QBC939 细胞增殖

qPCR检测结果显示,转染si-circAGFG1的胆管癌QBC939细胞中 circAGFG1 表达量明显低于转染si-NC的QBC939细胞(0.37 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.00 , $t = 63.000$, $P < 0.05$),表明干扰 circAGFG1 表达的QBC939细胞构建成功。si-circAGFG1组QBC939细胞 D 值(0.43 ± 0.04 vs 0.92 ± 0.07 , $t = 18.233$, $P < 0.05$)、克隆形成数(47.44 ± 4.43) vs (108.14 ± 11.11)个, $t = 15.225$, $P < 0.05$;图1]均显著低于si-NC组,说明干扰 circAGFG1 表达抑制胆管癌QBC939细胞增殖。

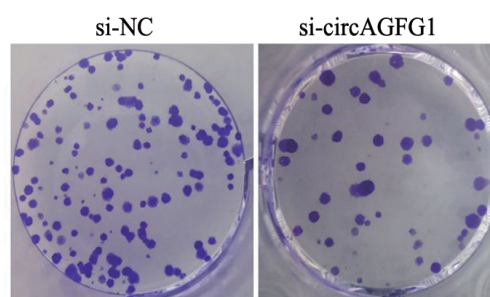


图1 干扰 circAGFG1 表达对 QBC939 细胞克隆形成的影响

2.3 干扰 circAGFG1 表达抑制 QBC939 细胞的迁移和侵袭

WB法检测结果(图2)显示,与si-NC组相比,si-circAGFG1组QBC939细胞中N-cadherin蛋白表达水平显著降低(0.24 ± 0.02 vs 0.64 ± 0.05 , $t = 22.283$, $P < 0.05$),而E-cadherin蛋白表达水平显著升高(0.74 ± 0.06 vs 0.31 ± 0.03 , $t = 19.230$, $P < 0.05$)。

划痕愈合实验(图3A)、Transwell 侵袭实验

(图 3B)检测结果显示, si-circAGFG1 组 QBC939 细胞划痕愈合率 $[(25.23 \pm 2.18) \% \text{ vs } (66.92 \pm 5.05) \%, t=22.738, P<0.05]$ 、侵袭细胞数 $[(34.47 \pm 3.45) \text{ vs } (92.06 \pm 7.76) \text{ 个}, t=20.344, P<0.05]$ 均显著低于 si-NC 组, 说明干扰 circAGFG1 表达抑制胆管癌 QBC939 细胞迁移和侵袭。

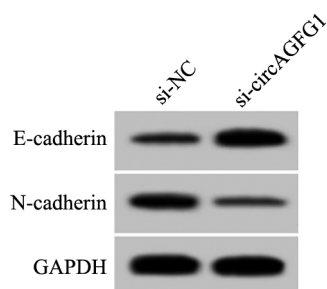
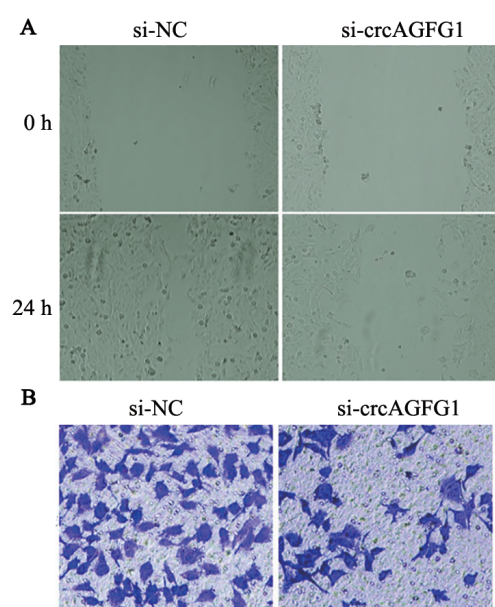


图 2 干扰 si-circAGFG1 表达对 QBC939 细胞中 N-cadherin 和 E-cadherin 表达的影响



A: 划痕愈合实验检测干扰 circAGFG1 表达对 QBC939 细胞迁移的影响; B: Transwell 侵袭实验检测干扰 circAGFG1 表达对 QBC939 细胞侵袭的影响 ($\times 200$)

图 3 干扰 circAGFG1 表达对 QBC939 细胞迁移和侵袭的影响

2.4 circAGFG1 靶向调控 miR-4429 的表达

StarBase 软件预测显示, circAGFG1 与 miR-4429 的核苷酸序列存在的连续结合位点, 见图 4。miR-4429 与 WT-circAGFG1 共转染组的 QBC939 细胞荧光素酶活性显著低于 miR-NC 与 WT-circAGFG1 共转染组 $(0.55 \pm 0.04 \text{ vs } 1.04 \pm 0.07, t=18.233, P<0.05)$; miR-4429 与 MUT-circAGFG1 共转染组 QBC939 细胞荧光素酶活性与 miR-NC 与 MUT-circAGFG1 共转染组比较差异无统计学意义 $(1.01 \pm 0.07 \text{ vs } 1.02 \pm 0.08, t=0.282, P=0.781)$, 说明 circAGFG1 可与 miR-

4429 靶向结合 ($P>0.05$)。同时, si-circAGFG1 组 QBC939 细胞中 miR-4429 表达明显高于 si-NC 组 $(2.98 \pm 0.27 \text{ vs } 1.00 \pm 0.00, t=22.000, P<0.05)$, 说明干扰 circAGFG1 表达促进 QBC939 细胞中 miR-4429 表达。

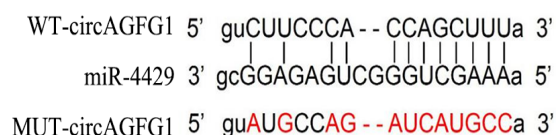


图 4 circAGFG1 的序列中含有与 miR-4429 互补的核苷酸序列

2.5 过表达 miR-4429 抑制 QBC939 细胞的增殖、迁移和侵袭

qPCR 检测结果显示, 转染 miR-4429 mimic 的 QBC939 细胞中 miR-4429 表达量明显高于转染 miR-NC 的 QBC939 细胞 $(2.82 \pm 0.23 \text{ vs } 1.00 \pm 0.00, t=23.739, P<0.05)$, 表明过表达 miR-4429 的 QBC939 细胞构建成功。

WB 检测结果(图 5)显示, 与 miR-NC 组相比, miR-4429 组 QBC939 细胞中 N-cadherin 蛋白表达水平显著降低 $(0.30 \pm 0.03 \text{ vs } 0.65 \pm 0.05, t=18.007, P<0.05)$, 而 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 $(t=20.065, P<0.05)$ 。

CCK-8 法、克隆形成实验、划痕愈合实验和 Transwell 侵袭实验检测结果(图 6)显示, miR-4429 组 QBC939 细胞 D 值 $(0.51 \pm 0.04 \text{ vs } 0.96 \pm 0.07, t=16.745, P<0.05)$ 、克隆形成数 $[(55.45 \pm 5.19) \text{ vs } (105.97 \pm 12.32) \text{ 个}, t=11.337, P<0.05]$ 、划痕愈合率 $[(35.02 \pm 4.18) \% \text{ vs } (67.84 \pm 4.84) \%, t=15.396, P<0.05]$ 、侵袭细胞数 $[(46.07 \pm 4.16) \text{ vs } (95.61 \pm 7.15) \text{ 个}, t=17.966, P<0.05]$ 均显著低于与 miR-NC 组。

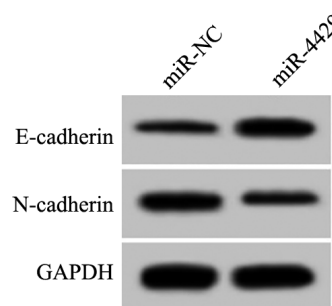


图 5 过表达 miR-4429 对 QBC939 细胞中 N-cadherin 和 E-cadherin 表达的影响

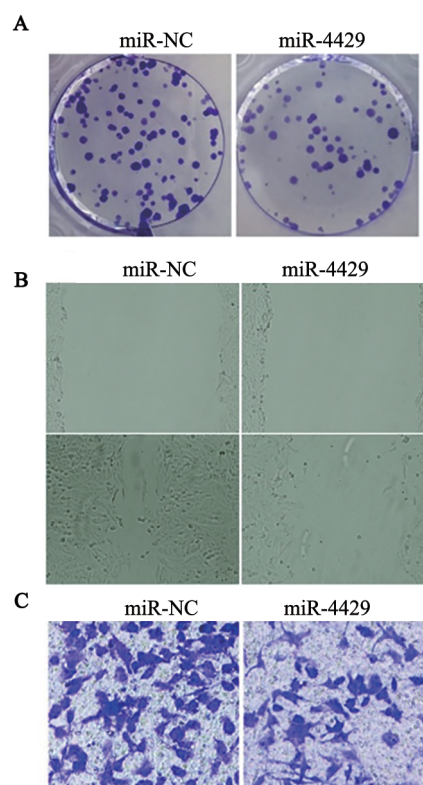
2.6 下调 miR-4429 降低干扰 circAGFG1 表达对胆管癌 QBC939 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

si-circAGFG1+anti-miR-4429 组 QBC939 细胞中

miR-4429 表达量明显低于 si-circAGFG1+anti-miR-NC 组 (0.25 ± 0.02 vs 1.00 ± 0.00 , $t_{\text{克隆}} = 112.500$, $P < 0.05$), 细胞增殖水平 (D 值)、克隆形成数、划痕愈合率、侵袭数及细胞中 N-cadherin 蛋白表达均显著高于 si-circAGFG1+anti-miR-NC 组 ($t_D = 17.804$, $P < 0.05$; $t_{\text{克隆}} = 15.323$, $P < 0.05$; $t_{\text{划痕}} = 18.292$, $P < 0.05$; $t_{\text{侵袭}} = 20.925$, $P < 0.05$; $t_{\text{N-cadherin}} = 22.808$, $P < 0.05$)。si-circAGFG1+anti-miR-4429 组 E-cadherin 蛋白表达显著低于 si-circAGFG1+anti-miR-NC 组 ($t = 16.100$, $P < 0.05$)。说明下调 miR-4429 逆转了干扰 circAGFG1 表达对胆管癌 QBC939 细胞增殖、迁移和侵袭的影响, 见图 7。

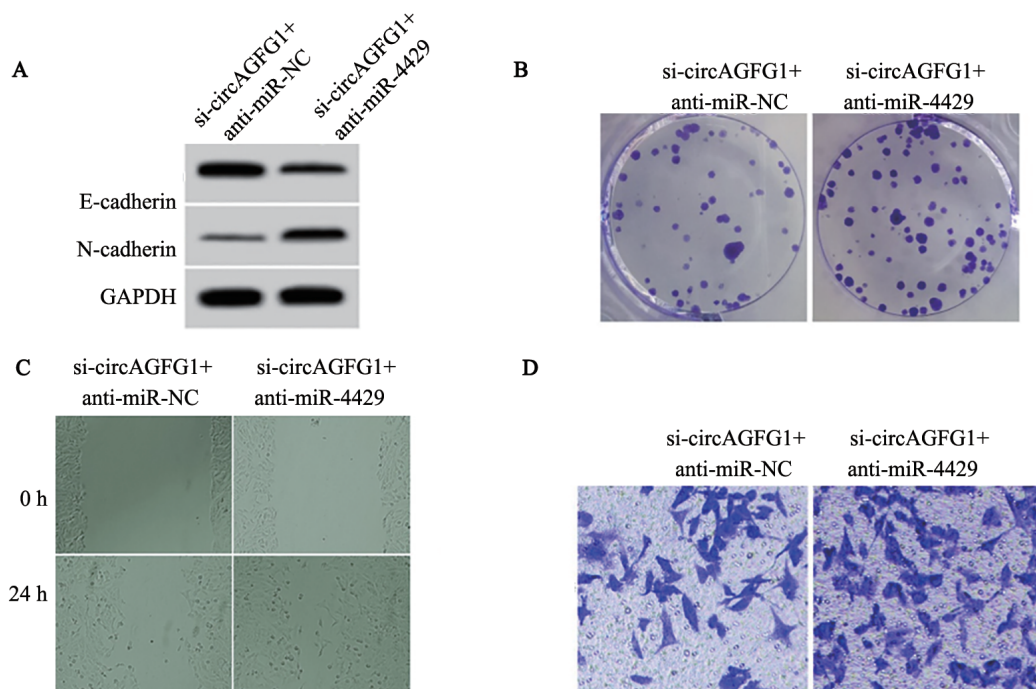
3 讨论

circRNA 的异常表达与人类多种肿瘤的发生发展密切相关^[8-10]。circ_0000673^[11]、circ_0000284^[12]、circ_0005230^[13] 等多种 circRNA 在胆管癌中表达升高, 促进胆管癌的发展。circAGFG1 是近年来新发现的一种 circRNA, 其在结直肠癌^[14]、宫颈癌^[15]、三阴性乳腺癌^[16] 等肿瘤中表达升高, 对肿瘤增殖、迁移和侵袭等恶性表型发挥促进作用, 进而促进肿瘤的发生发展。目前尚少见 circAGFG1 参与胆管癌发展进程的相关报道, 本研究初步探究 circAGFG1 对胆管癌发生发展的影响。



A: 克隆形成实验检测过表达 miR-4429 对 QBC939 细胞克隆形成的影响; B: 划痕愈合实验检测过表达 miR-4429 对 QBC939 细胞迁移的影响 ($\times 50$); C: Transwell 侵袭实验检测过表达 miR-4429 对 QBC939 细胞侵袭的影响 ($\times 200$)

图 6 过表达 miR-4429 抑制 QBC939 细胞的增殖、迁移和侵袭



A: 同时下调 miR-4429 和 circAGFG1 表达对 QBC939 细胞 E-cadherin 和 N-cadherin 表达的影响; B: 下调 miR-4429 逆转干扰 circAGFG1 对 QBC939 细胞克隆形成的影响; C: 下调 miR-4429 逆转干扰 circAGFG1 对 QBC939 细胞迁移的影响 ($\times 50$); D: 下调 miR-4429 逆转干扰 circAGFG1 对 QBC939 细胞侵袭的影响 ($\times 200$)

图 7 下调 miR-4429 逆转干扰 circAGFG1 对 QBC939 细胞恶性生物学行为的影响

本研究结果显示, circAGFG1 在胆管癌组织中的表达量明显高于癌旁组织, 提示其可能也促进胆管癌的发生发展; 通过干扰胆管癌 QBC939 细胞中 circAGFG1 的表达发现, 干扰 circAGFG1 可显著降低胆管癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 提示 circAGFG1 有可能成为胆管癌治疗的分子靶点。EMT 是细胞失去上皮极性而获得间质细胞特性的过程, E-cadherin 在细胞发生 EMT 过程中表达降低, 而间质标志物如 N-cadherin 是 EMT 过程中的间质标志物, 其在该过程中表达升高^[17]。当肿瘤细胞发生 EMT 后, 其骨架发生改变, 细胞与细胞间的黏附作用减弱, 造成肿瘤细胞迁移和侵袭性增强^[18]。本研究结果显示, 干扰 circAGFG1 导致 QBC939 细胞中 N-cadherin 蛋白表达降低, E-cadherin 蛋白表达升高, 提示 circAGFG1 可能通过促进胆管癌细胞 EMT 过程来促进其迁移和侵袭。

为了进一步探究 circAGFG1 参与调控胆管癌细胞恶性表型的分子机制, 本研究证实了 circAGFG1 可靶向结合 miR-4429; 同时发现, 干扰 si-circAGFG1 促进了 QBC939 细胞中 miR-4429 的表达, 说明 circAGFG1 靶向结合并负调控 miR-4429。miR-4429 是卵巢癌中表达下调的 miRNA, 且 miR-4429 低表达与卵巢癌患者淋巴转移和远处转移密切相关, 过表达 miR-4429 显著降低卵巢癌细胞的迁移能力, miR-4429 抑制卵巢癌的恶性发展^[19]; 宫颈癌细胞中 miR-4429 表达下调, 上调 miR-4429 可增强宫颈癌细胞的放射敏感性, miR-4429 可能改善宫颈癌放疗抵抗的分子靶点^[20]。本研究结果显示, miR-4429 在胆管癌组织中呈低表达, 过表达 miR-4429 可有效阻碍 QBC939 细胞的增殖、迁移和侵袭, 提示 miR-4429 对胆管癌的发展起抑制作用, 其也具有成为胆管癌治疗的分子靶标的潜力。此外, 本研究利用恢复实验发现, 下调 miR-4429 部分逆转了干扰 circAGFG1 对胆管癌细胞增殖、迁移和侵袭的阻碍作用, 进一步提示 circAGFG1 通过靶向负调控 miR-4429 来影响胆管癌细胞的恶性表型。

综上, circAGFG1 在胆管癌组织中呈高表达, 而 miR-4429 表达降低; 干扰 circAGFG1 可削弱胆管癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, circAGFG1 有可能成为胆管癌治疗的分子靶点。本课题组将进一步对 miR-4429 下游靶基因及信号通路对胆管癌发生发展的影响进行探究, 并在体内实验中验证 circAGFG1/miR-4429 轴对胆管癌发生发展的影响。

[参 考 文 献]

- [1] 雷珊, 曾智锐, 张金娟, 等. 长链非编码 RNA 00460 表达下调对胆管癌 HuCCT1 细胞生物学行为的影响[J]. 广东医学, 2019, 40(18): 2573-2577. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.20184233.
- [2] WU F Q, ZHOU J J. CircAGFG1 promotes cervical cancer progression via miR-370-3p/RAF1 signaling[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 1067-1076. DOI:10.1186/s12885-019-6269-x.
- [3] XUE Y B, DING M Q, XUE L, et al. CircAGFG1 sponges miR-203 to promote EMT and metastasis of non-small-cell lung cancer by upregulating ZNF281 expression[J]. Thorac Cancer, 2019, 10(8): 1692-1701. DOI:10.1111/1759-7714.13131.
- [4] CAI P Y, WU M X, ZHANG B, et al. Long non-coding RNA SNHG12 regulates cell proliferation, invasion and migration in endometrial cancer by targeting miR-4429[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(4): 2842-2850. DOI:10.3892/mmr.2020.11370.
- [5] PENG P, WANG Y, WANG B L, et al. LncRNA PSMA3-AS1 promotes colorectal cancer cell migration and invasion via regulating miR-4429[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(22): 11594-11601. DOI:10.26355/eurrev_202011_23802.
- [6] HE H B, WU W, SUN Z E, et al. miR-4429 prevented gastric cancer progression through targeting METTL3 to inhibit m6A-caused stabilization of SEC62[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 517(4): 581-587. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.07.058.
- [7] WU W J, YIN H, HU J J, et al. Long noncoding RNA LINC00313 modulates papillary thyroid cancer tumorigenesis via sponging miR-4429[J]. Neoplasia, 2018, 65(6): 933-942. DOI: 10.4149/neo_2018_180219N125.
- [8] HUANG C Q, YANG P, LIU J Y, et al. Circular RNA circ_0000423 promotes gastric cancer cell proliferation, migration and invasion via the microR-582-3p/Dishevelled-Axin domain containing 1 axis [J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 12755-12766. DOI: 10.1080/21655979.2021.1997696.
- [9] CHEN H, WANG L S, XIE P, et al. Hsa_circ_0074298 promotes pancreatic cancer progression and resistance to gemcitabine by sponging miR-519 to target SMOC1[J]. J Cancer, 2022, 13(1): 34-50. DOI:10.7150/jca.62927.
- [10] CHEN M, HU G S, ZHOU X, et al. Hsa_circ_0016788 regulates glycolysis and proliferation via miR-506-3p/PARP14 axis of hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2021, 36(12): 3457-3468. DOI:10.1111/JGH.15635.
- [11] ZHAO X, ZHANG X X, ZHANG Z G, et al. Comprehensive circular RNA expression profiling constructs a CeRNA network and identifies hsa_circ_0000673 as a novel oncogene in distal cholangiocarcinoma[J]. Aging, 2020, 12(22): 23251-23274. DOI: 10.18632/aging.104099.
- [12] WANG S M, HU Y L, LV X R, et al. Circ-0000284 arouses malignant phenotype of cholangiocarcinoma cells and regulates the biological functions of peripheral cells through cellular communication[J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(18): 1935-1953. DOI:10.1042/CS20190589.
- [13] XU Y, YAO Y, LIU Y P, et al. Elevation of circular RNA circ_0005230 facilitates cell growth and metastasis via sponging miR-1238 and miR-1299 in cholangiocarcinoma[J]. Aging, 2019, 11(7): 1907-1917. DOI:10.18632/aging.101872.
- [14] ZHANG L, DONG X Q, YAN B, et al. CircAGFG1 drives metastasis and stemness in colorectal cancer by modulating YY1/CTNBN1[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(7): 542-557. DOI: 10.1038/

- s41419-020-2707-6.
- [15] WANG X H, LI J. CircAGFG1 aggravates the progression of cervical cancer by downregulating p53[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(4): 1704-1711. DOI:10.26355/eurev_202002_20345.
- [16] YANG R, XING L, ZHENG X Y, *et al.* The circRNA circAGFG1 acts as a sponge of miR-195-5p to promote triple-negative breast cancer progression through regulating CCNE1 expression[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 4-22. DOI:10.1186/s12943-018-0933-7.
- [17] ZHANG W Q, ZHOU K L, ZHANG X, *et al.* Roles of the H19/microRNA-675 axis in the proliferation and epithelial-mesenchymal transition of human cutaneous squamous cell carcinoma cells[J/OL]. *Oncol Rep*, 2021, 45(4): 39[2021-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33649811/>. DOI:10.3892/or.2021.7990.
- [18] LI F Y, FAN T Y, ZHANG H, *et al.* Demethylation of miR-34a upregulates expression of membrane palmitoylated proteins and promotes the apoptosis of liver cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(6): 470-486. DOI:10.3748/wjg.v27.i6.470.
- [19] ZHU Y M, CHEN P, SHI L, *et al.* miR-4429 suppresses the malignant development of ovarian cancer by targeting YOD1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(17): 8722-8730. DOI: 10.26355/eurev_202009_22809.
- [20] SUN H B, FAN G M, DENG C X, *et al.* miR-4429 sensitized cervical cancer cells to irradiation by targeting RAD51[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 185-193. DOI:10.1002/jcp.28957.
- [收稿日期] 2021-09-16 [修回日期] 2022-01-13
[本文编辑] 黄静怡