

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.02.003

hsa_circ_0140180 通过调控 miR-1287-5p 影响食管鳞状细胞癌细胞的迁移及侵袭能力

吴佳林^{1,2}, 张若兰², 刘燕群^{1,2}, 熊蓉², 刘康², 宋桂芹^{1,2} (1. 川北医学院 基础医学和法医学研究所, 四川 南充 637000; 2. 南充市中心医院 组织工程与干细胞研究所, 四川 南充 637000)

[摘要] **目的:** 探讨 hsa_circ_0140180 在食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞中的表达水平及其对细胞恶性生物学行为的影响与分子机制。**方法:** 收集2018年11月至2019年3月间在南充市中心医院胸心外科手术切除的6对ESCC组织和对应癌旁组织并进行全转录组测序, 筛选出在ESCC组织中低表达的 hsa_circ_0140180; 建立过表达 hsa_circ_0140180 的 TE-1 和 KYSE30 细胞, qPCR 法检测 hsa_circ_0140180 在人正常食管上皮细胞、ESCC 细胞中的表达, 以及过表达 hsa_circ_0140180 后 TE-1 和 KYSE30 细胞中 miR-1287-5p 的表达; CCK-8 法和 FCM 检测过表达 hsa_circ_0140180 对 TE-1 和 KYSE30 细胞增殖和周期的影响; 划痕实验和 Transwell 实验检测过表达 hsa_circ_0140180 对 TE-1 和 KYSE30 细胞迁移和侵袭能力的影响, 双荧光素酶报告实验验证 hsa_circ_0140180 与 miR-1287-5p 的靶向关系。WB 法检测过表达 hsa_circ_0140180 对 TE-1 和 KYSE30 细胞中 EMT 相关蛋白的表达及 PI3K-Akt 通路的磷酸化水平的影响。**结果:** 转录组测序和 qPCR 结果显示, hsa_circ_0140180 在 ESCC 组织和细胞中呈低表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 并确认其闭合环状分子特征且定位于细胞质。过表达 hsa_circ_0140180 能明显抑制 ESCC 细胞的迁移及侵袭能力 ($P<0.05$), 但不影响其增殖和周期。双荧光素酶报告基因实验证实 hsa_circ_0140180 靶向结合 miR-1287-5p 并负调控其表达 ($P<0.01$)。过表达 hsa_circ_0140180 能显著上调 TE-1 和 KYSE30 细胞中 E-cadherin 的表达 ($P<0.05$), 而显著下调 Snail 的表达 ($P<0.05$) 和 PI3K-Akt 通路的磷酸化水平 ($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。**结论:** hsa_circ_0140180 在 ESCC 细胞及组织中呈低表达, 其可能通过调控 miR-1287-5p 表达来降低 PI3K-Akt 通路的磷酸化水平和抑制 EMT 进程, 从而影响 ESCC 细胞的迁移及侵袭能力。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; hsa_circ_0140180; miR-1287-5p; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)02-0114-09

hsa_circ_0140180 affects the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells by regulating miR-1287-5p

WU Jialin^{1,2}, ZHANG Ruolan², LIU Yanqun^{1,2}, XIONG Rong², LIU Kang², SONG Guiqin^{1,2} (1. Institute of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China; 2. Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, the Central Hospital of Nanchong City, Nanchong 637000, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression level of hsa_circ_0140180 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells, as well as its effect on malignant biological behavior of ESCC cells and the possible molecular mechanisms. **Methods:** Six pairs of ESCC tissues and corresponding paracarcinoma tissues resected at the Department of Thoracic Surgery, Central Hospital of Nanchong City between November 2018 and March 2019 were collected for whole-transcriptome sequencing, and hsa_circ_0140180 at a low expression in ESCC tissues was screened out. The TE-1 and KYSE30 cell lines overexpressing hsa_circ_0140180 were established. qPCR was used to detect the expression of hsa_circ_0140180 in human normal esophageal epithelial cells and ESCC cells, as well as the expression of miR-1287-5p in TE-1 and KYSE30 cells overexpressing hsa_circ_0140180. CCK-8 and FCM were used to detect the effect of hsa_circ_0140180 overexpression on the proliferation and cell cycle of TE-1 and KYSE30 cells. Scratch assay and Transwell assay were used to assess the effects of hsa_circ_0140180 overexpression on migration and invasion of TE-1 and KYSE30 cells. Dual-luciferase reporter assay was used to confirm the targeting relationship between hsa_circ_0140180 and miR-1287-5p. WB assay was used to detect the expression of EMT-related proteins and the phosphorylation level of the PI3K-Akt pathway in TE-1 and KYSE30 cells after hsa_circ_0140180 overexpression. **Results:** Transcriptome sequencing and qPCR results showed that hsa_circ_0140180 was lowly expressed in ESCC tissues and cells ($P<0.05$ or $P<0.01$) and confirmed its closed-loop molecular signature and localization in the

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 82203851); 南充市市校科技战略合作专项(No. 20SXQT0328, No. 22SXQT0336)

[作者简介] 吴佳林(1994—)女, 硕士生, 主要从事肿瘤发生机制及生物治疗的研究, E-mail: 947060122@qq.com

[通信作者] 宋桂芹, E-mail: songguiqin@nsmc.edu.cn; 刘康, E-mail: liukang@nsmc.edu.cn

cytoplasm. Overexpression of hsa_circ_0140180 could significantly inhibit the migration and invasion of ESCC cells (all $P < 0.05$) but had no significant effect on the proliferation and cell cycle. The results of dual-luciferase reporter gene assay demonstrated that hsa_circ_0140180 targets miR-1287-5p and negatively regulates its expression ($P < 0.001$). Overexpression of hsa_circ_0140180 could significantly increase the expression of E-cadherin and decrease the expression of Snail (both $P < 0.05$) and the phosphorylation level of the PI3K-Akt pathway ($P < 0.01$, $P < 0.001$) in TE-1 and KYSE30 cells. **Conclusion:** hsa_circ_0140180 is lowly expressed in ESCC cells and tissues; it reduces the phosphorylation levels of PI3K-Akt pathway and suppresses EMT process possibly through regulation of miR-1287-5p expression, thus affecting the migration and invasion abilities of ESCC cells.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); hsa_circ_0140180; miR-1287-5p; invasion; migration

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(2):114-122. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.02.003]

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是消化道最常见的恶性肿瘤之一。据2020年全球癌症统计数据,食管癌的新发病例约有60.4万例,病死约54.4万例,发病率在恶性肿瘤中排第七,病死率排第六^[1]。在中国,ESCC是主要的食管癌亚型。尽管随着医疗技术的发展,ESCC的诊断和治疗方法已有较大进步,但其5年生存率仍低于30%^[2-3],主要原因是常复发和转移,且ESCC转移方式多种多样,有着广泛的转移区域^[4]。因此,迫切需要进行进一步研究影响ESCC转移的分子机制,获得更有效的抗肿瘤治疗策略。环状RNA(circular RNA, circRNA)是由线性RNA前体经反向拼接而成的一类闭合环状结构分子^[5],有着组织特异性、疾病特异性、时序特异性以及高稳定性等特征^[6],因此circRNA可作为临床疾病的标志物。目前已有研究^[7-9]证实, circRNA在肝癌、肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中表达异常。其通过调控基因转录、充当miRNA的分子海绵、参与蛋白质翻译、与结合蛋白RBP相互作用等方式在恶性肿瘤的发生发展中发挥生物学功能^[10-14]。为了探索circRNA在ESCC组织中的表达及生物学作用,本研究通过高通量测序筛选并鉴定了在ESCC组织中显著下调的hsa_circ_0140180,并探索其在ESCC复发和转移中的分子机制,为寻找ESCC新的生物标志物及治疗靶标提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞和主要试剂

收集2018年11月至2019年3月间在南充市中心医院胸心外科手术切除的6例ESCC组织和相应癌旁组织用于全转录组测序,手术后30 min内将组织放入液氮中。所有患者手术前均未接受过任何抗肿瘤治疗。本研究获得所有患者的知情同意并签署知情同意书,研究方案获南充市中心医院伦理委员会批准[批号:2019年审(095号)]。

ESCC细胞KYSE30、KYSE410、KYSE150、KYSE70、TE-11、TE-1均购自普诺赛生物有限公司,人正常食管上皮细胞HET-1A购自上海名劭生物有

限公司。DMEM(C11965500bt)培养基、RPMI1640(C11875500bt)培养基及胎牛血清(16000044)均购自美国Gibco公司,BEGM(CC-31370)完全培养基购自上海名劭生物有限公司,人工基膜(354234 BD)购自美国BD公司,Transwell小室(Corning 3422)购自美国Corning公司。RNA提取试剂盒(RC112-01)、反转录试剂盒(R323-01)和qPCR试剂盒(Q711-02)均购自南京诺唯赞公司,BCA蛋白定量试剂盒(P0010s)购自碧云天生物公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒(E1910)购自美国Promega生物科技公司。GAPDH抗体(FNab03343)、E-cadherin抗体(FNab10112)、Snail抗体(FNab08051)均购自武汉菲恩生物科技有限公司,Akt抗体(AF6259)、p-Akt抗体(AF0016)、PI3K抗体(AF6242)、p-PI3K抗体(AF3241)均购自Affinity公司,HRP标记的IgG二抗购自华安生物有限公司。hsa_circ_0140180慢病毒过表达载体由上海吉凯公司设计合成和提供,qPCR引物由上海擎科生物公司设计合成(表1),Sanger测序由上海擎科生物公司完成,组织样本高通量全转录组测序由康成生物完成。

1.2 细胞培养与转染

人ESCC细胞KYSE410、KYSE150、KYSE510、TE-11、TE-1用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养,KYSE30和KYSE70细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养,HET-1A细胞用BEGM完全培养基培养,所有细胞均在37℃、5% CO₂的培养箱中常规培养。

根据吉凯基因慢病毒感染说明书将hsa_circ_0140180慢病毒过表达载体或空慢病毒载体转染至TE-1和KYSE30细胞,分别记作OE组和NC组,用嘌呤霉素筛选出稳定表达细胞,通过qPCR验证hsa_circ_0140180过表达后,再进行后续实验。

1.3 qPCR实验检测ESCC组织、细胞及转染后各组TE-1和KYSE30细胞中hsa_circ_0140180和miR-1287-5p的表达

采用诺唯赞RNA提取试剂盒提取ESCC细胞和组织、转染后各组细胞中的总RNA,使用分光光度计

进行RNA浓度和纯度的测定,将其反转录为cDNA。采用诺唯赞通用型qPCR检测试剂盒进行qPCR实验。qPCR采用两步法,反应条件:95℃ 3 min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 共计40个循环。以GAPDH或U6作为内参照基因,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达量。

表1 qPCR引物序列

基因名称	引物序列(5'~3')
hsa_circ_0140180	F:CTTGAGGAAGAAAACAGGCTAAT R:CTCTTTGCAGATGTTACATTGG
hsa_circ_0035443	F:CATCAAGGAGGCTGGCTTTC R:TCACACACCTGTTCTCCTGT
hsa_circ_0120232	F:GTGCCAGACCTGTTTGACAC R:TTCCCAGAGCTGCTTCAAGT
hsa_circ_0004224	F:ACGGACCCAGAGCTGAAGTA R:TGCCAGTTCAACAGCTCGAA
hsa_circ_0102860	F:TTCATTATGCCGCCCCAGAG R:TTGGCGGCTAAATCATCCCA
DMD	F:CCCCTCAGCTTTCACACGAT R:AGATCTGGGCAGGACTACGA
miR-1287-5p	F:AGTGCAGGGTCCGAGGTATT R:GCGTGCTGGATCAGTGGTT
GAPDH	F:CAATGACCCCTTCATTGACC R:TTGATTTTGAGGGATCTCG
U6	F:GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT R:CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA

1.4 划痕愈合实验检测过表达 hsa_circ_0140180 对 TE-1 和 KYSE30 细胞迁移能力的影响

取对数生长的NC组和OE组TE-1和KYSE30细胞(10^5 个/孔)接种于6孔板中,待细胞汇合度约70%时进行划线,用PBS洗3次,加入2 mL无血清培养基继续培养。分别在0、24 h时拍照记录划痕情况,计算细胞划痕愈合率[愈合率=(0 h面积-24 h面积)/0 h面积 $\times$ 100%]。实验重复进行3次。

1.5 Transwell实验检测过表达 hsa_circ_0140180 对 TE-1 和 KYSE30 细胞迁移、侵袭能力的影响

将细胞消化、离心,用无血清培养基清洗2次,重悬并计数。在Transwell下小室中加入600 μ L含20%血清的培养基,上小室加入200 μ L含 3×10^5 个细胞的无血清培养基。在侵袭实验中,在上小室中铺人工基膜,加入150 μ L含 1×10^6 个细胞的无血清培养基。在37℃、5% CO₂条件下培养24 h后,用20%的甲醇固定细胞30 min,再用0.1%的结晶紫溶液染色。用棉签轻轻擦去Transwell上小室内的细胞,拍照、计数。实验重复进行3次。

1.6 FCM检测过表达 hsa_circ_0140180 对 TE-1 和 KYSE30 细胞周期的影响

取转染后各组对数生长期的细胞铺板,培养24 h后收集细胞。用预冷的PBS洗2次,再加入预冷的75%乙醇,在-20℃下固定过夜。次日,收集固定好的细胞,用预冷PBS洗2次,加入500 μ L含50 μ g/mL溴化乙啶、100 μ g/mL RNase A和0.2% Triton X-100的PBS,4℃避光染色30 min,用FCM(BD生物公司)检测,用FlowJo软件分析细胞周期。实验重复进行3次。

1.7 CCK-8法检测过表达 hsa_circ_0140180 对 TE-1 和 KYSE30 细胞增殖能力的影响

将转染后各组对数生长期的TE-1和KYSE30细胞(5×10^3 个/孔)接种于96孔板中,培养至0、24、48、72和96 h时分别加入10 μ L CCK-8试剂,继续培养4 h。在酶标仪450 nm处检测各孔光密度(D)值,以D值表示细胞的增殖能力。实验重复进行3次。

1.8 WB法检测过表达 hsa_circ_0140180 对 TE-1 和 KYSE30 细胞中 EMT 相关蛋白表达及 PI3K-Akt 通路磷酸化的影响

收集转染后的各组TE-1和KYSE30细胞,用RIPA高强度裂解液进行裂解,提取总蛋白,使用碧云天BCA蛋白检测试剂盒测定总蛋白的浓度。蛋白样品经10% SDS-PAGE分离后转移至NC膜上。5%脱脂牛奶封闭后,加入E-caderin(1:1 000)、Snail(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:500)、PI3K(1:500)、AKT(1:500)、GAPDH(1:20 000)一抗4℃下处理过夜。PBST洗涤5次,加入HRP标记的二抗,室温下处理1 h, PBST洗涤, ECL显影。利用Image J软件分析蛋白条带的灰度值。实验重复3次。

1.9 双荧光素酶报告实验检测验证 miR-1287-5p 与 hsa_circ_0140180 之间的靶向关系

通过miRanda、Circinteractome数据库预测miR-1287-5p与hsa_circ_0140180结合的可能性最大,将含有野生型(WT)或突变型(MUT)hsa_circ_0140180的3' UTR中含miR-1287-5p结合位点的核苷酸序列克隆到荧光素酶报告基因质粒载体。按照Lipofectamine™3000转染试剂说明书方法,将含野生型(WT)和突变型(MUT)报告基因质粒与miR-1287-5 mimic或miR-NC共转染至TE-1和KYSE30细胞中,培养48 h后,用双荧光素酶活性检测试剂盒检测转染细胞中荧光素酶活性。

1.10 通过数据库预测 hsa_circ_0140180/miR-1287-5p 的下游信号通路

通过Circinteractome(<https://circinteractome.irp.nia.nih.gov/>)数据库预测可能与hsa_circ_0140180相

互作用的miRNA。将Targetscan、Starbase、miRwalk数据库预测的可能与miRNA靶向作用的基因取交集,并通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)进行相关通路富集分析。

1.11 统计学处理

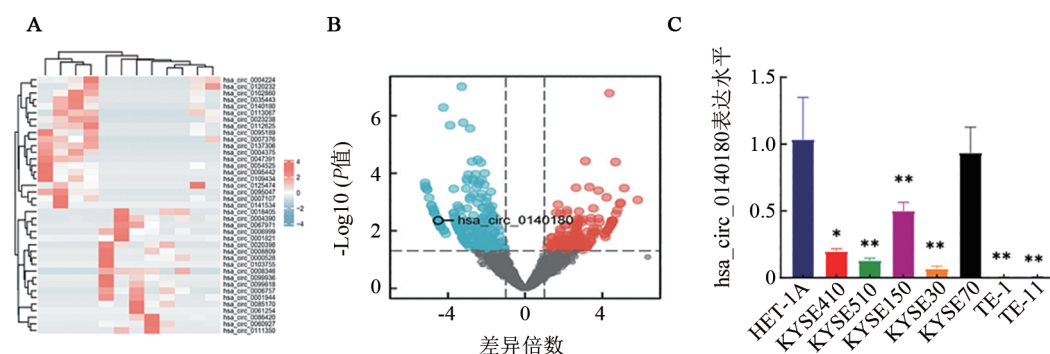
以上主要实验均独立重复3次。采用SPSS25.0统计学软件分析实验数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间均数比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转录组测序筛选出ESCC组织和细胞中低水平

表达的hsa_circ_0140180

收集6对ESCC组织及相应癌旁组织并进行全转录组测序,以 $\log_2FC < -2$ 和 $P < 0.05$ 为筛选条件,选出ESCC组织中显著下调的前5个circRNAs(hsa_circ_0004224、hsa_circ_0120232、hsa_circ_0102860、hsa_circ_0035443、hsa_circ_0140180)(图1A、B)。结合qPCR结果发现,hsa_circ0004224、hsa_circ_0120232、hsa_circ_0102860在ESCC细胞中表达差异不显著,与测序结果不一致,hsa_circ_0035443在ESCC各细胞中表达量很低;hsa_circ_0140180在ESCC细胞(KYSE410, KYSE510, KYSE150, KYSE30, TE-1, TE-11)中的相对表达量显著低于HET-1A(图1C),因此后续以hsa_circ_0140180为研究对象进行相应的细胞学研究。



与HET-1A细胞比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

A、B:ESCC组织和对应癌旁组织间差异表达circRNA的聚类分析热图及火山图;

C:hsa_circ_0140180在ESCC细胞中表达

图1 在ESCC组织和细胞中筛选低水平表达的circRNA

2.2 hsa_circ_0140180环状分子特性的验证及其在细胞中的定位

circRNA测序结果显示,hsa_circ_0140180是由肌营养不良症(dystrophin muscular dystrophy, DMD)基因的7个外显子首尾相接形成的闭合环状结构(图2A)。使用其发散引物在gDNA和cDNA中均能扩增出单一条带;而收敛引物只能在cDNA中扩增出单一条带(图2B)。与使用Oligo dT引物反转录相比,hsa_circ_0140180使用随机引物反转录后的表达量显著升高($P < 0.01$),说明hsa_circ_0140180缺乏多聚腺苷酸尾(图2C)。进一步研究发现,hsa_circ_0140180的表达量在核酸外切酶RNase R处理前后无明显变化,而线性RNA的表达量在RNase R处理后显著下降($P < 0.01$,图2D),以上实验结果证实hsa_circ_0140180是环状闭合的circRNA。用qPCR验证hsa_circ_0140180在细胞中的定位,结果显示hsa_circ_0140180主要分布于细胞质中(图2E)。

2.3 过表达hsa_circ_0140180对TE-1和KYSE30细

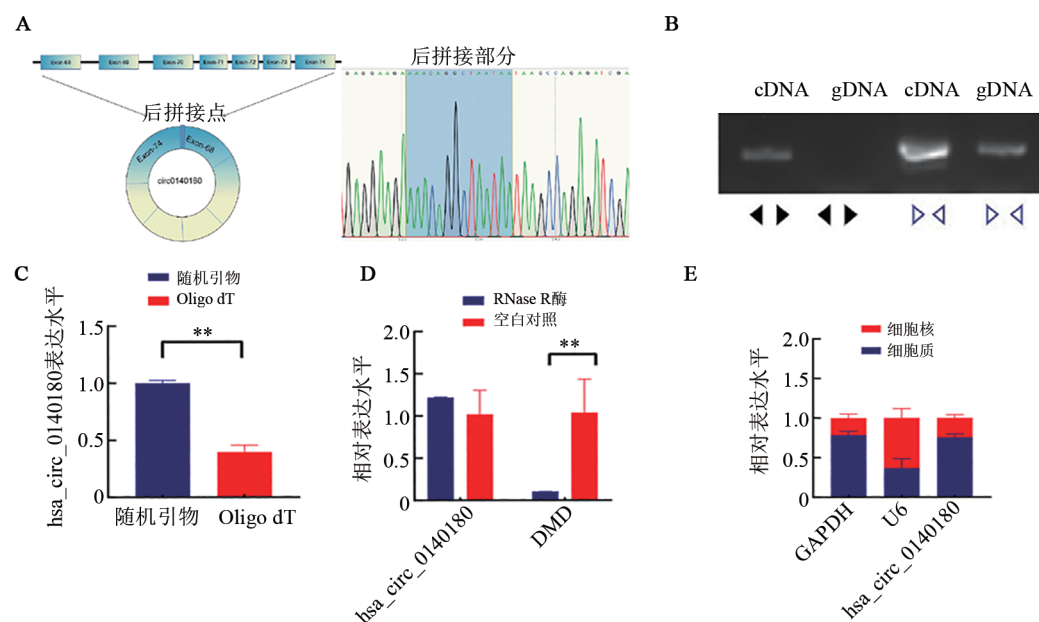
胞的增殖和细胞周期无明显影响

qPCR实验结果(图3A)显示,与NC组比较,OE组TE-1和KYSE30细胞中hsa_circ_0140180表达明显升高($P < 0.01$),说明TE-1和KYSE30细胞中成功地过表达了hsa_circ_0140180。CCK-8法(图3B)和FCM(图3C)实验结果显示,与NC组比较,OE组TE-1和KYSE30细胞的增殖能力和细胞周期均无明显变化(均 $P > 0.05$),实验结果表明,过表达hsa_circ_0140180对ESCC细胞的增殖和细胞周期无明显影响。

2.4 过表达hsa_circ_0140180可调控TE-1和KYSE30细胞的迁移和侵袭能力

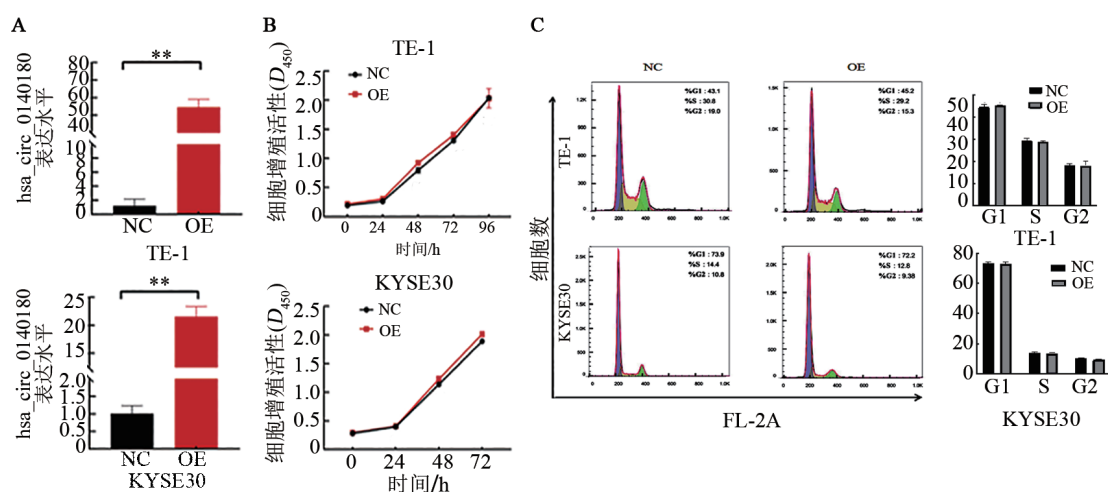
划痕愈合实验(图4A)和Tranwell(图4B)实验结果显示,与NC组比较,OE组TE-1和KYSE30细胞划痕愈合率显著降低(图4A,均 $P < 0.05$),迁移和侵袭细胞数量均明显减少(图4B,均 $P < 0.05$)。WB法检测结果(图4C)显示,与NC组比较,OE组TE-1和KYSE30细胞中EMT相关蛋白E-cadherin表达明显

增加, Snail 表达下降(均 $P < 0.05$, 图 4C)。结果表明, 细胞的迁移、侵袭能力和 EMT 进程。
过表达 hsa_circ_0140180 可以抑制 TE-1 和 KYSE30



A: 环状 RNA hsa_circ_0140180 结构图; B: 琼脂糖电泳验证扩增产物; C: hsa_circ_0140180 随机引物扩增验证;
D: hsa_circ_0140180 在 RNase R 酶处理后的验证; E: hsa_circ_0140180 主要分布于胞质

图2 hsa_circ_0140180 环状分子的特征验证及定位



A: 在转染 ESCC 细胞 hsa_circ_0140180 过表达效率验证; B: CCK-8 检测转染后细胞增殖; C: 流式细胞术检测转染后的细胞周期

图3 过表达 hsa_circ_0140180 后对 ESCC 细胞增殖和周期无明显影响

2.5 hsa_circ_0140180 可靶向结合 miR-1287-5p 并负向调控其表达

通过 miRanda 和 Circinteractome 数据库预测分析发现, miR-1287-5p 与 hsa_circ_0140180 结合的可能性最大(图 5A)。双荧光素酶报告基因实验结果(图 5B)显示,与 circWT+NC 组比较, circWT+miR-1287-5p 组荧光素酶活性明显降低 ($P < 0.01$); 与 circMUT+NC 组比较, circMUT+miR-1287-5p 组荧光素酶活性无明显变化 ($P > 0.05$)。说明 miR-1287-5p

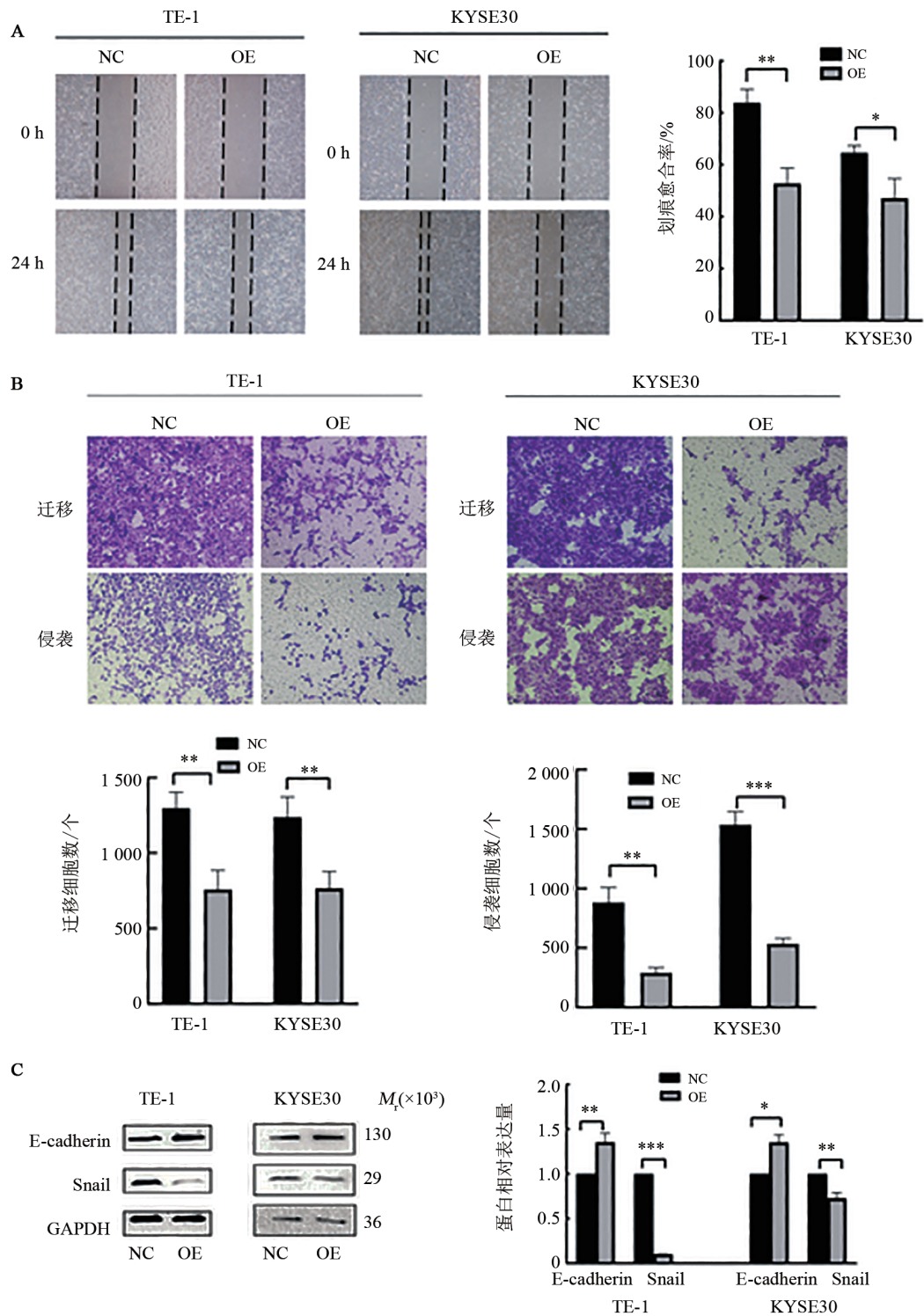
可与 hsa_circ_0140180 结合并调控其表达。qPCR 检测结果显示,与 NC 组相比, OE 组 TE-1 和 KYSE30 细胞中 miR-1287-5p 表达均明显下降(图 5C, $P < 0.05$), 说明 hsa_circ_0140180 对 miR-1287-5p 的表达有负向调控作用。

2.6 hsa_circ_0140180 抑制 ESCC 细胞中 PI3K-Akt 通路的激活

通过数据库 Targetscan、Starbase、miRwalk 将 hsa_circ_0140180/miR-1287-5p 轴的 miRNA 靶基因

取交集并通过KEGG数据库进行通路富集分析发现, 靶基因主要富集在PI3K-Akt等信号通路(图 6A、B)。为了进一步了解过表达 hsa_circ_0140180 对 ESCC 细胞 PI3K-Akt 通路的影响, 采用 WB 法检测过表达 hsa_circ_0140180 后 PI3K、p-PI3K、Akt、p-AKT 蛋白

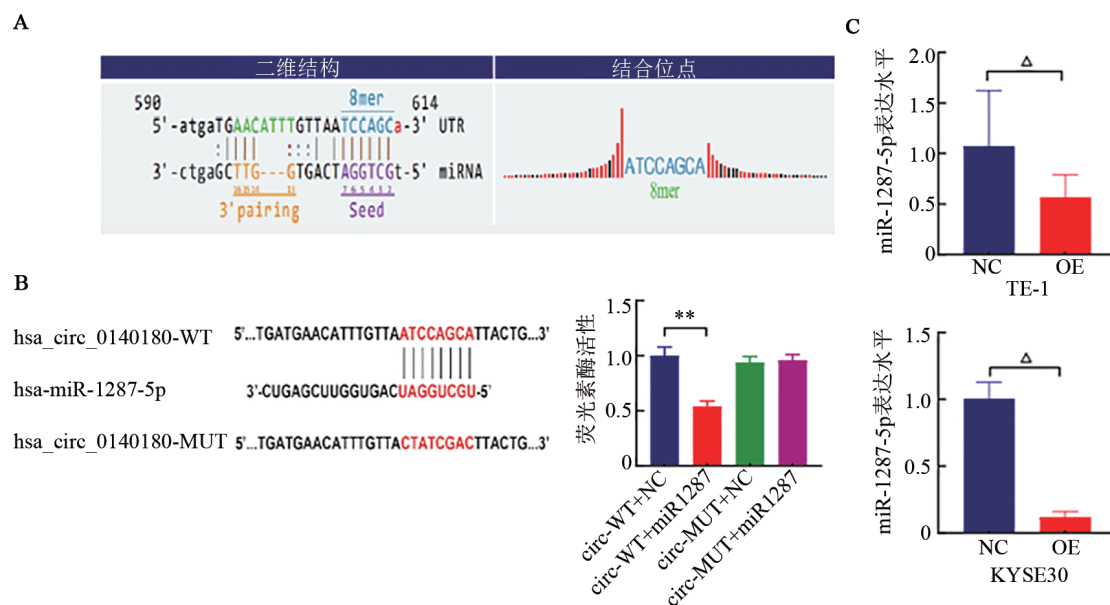
的表达, 结果显示, 与 NC 组细胞比较, OE 组细胞中 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达均显著降低(均 $P<0.01$), PI3K、Akt 蛋白表达无明显改变。结果表明, hsa_circ_0140180 可能通过调控 miR-1287-5p 表达而抑制 PI3K-Akt 通路激活(图 6C)。



与 NC 组比较, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$

A: 划痕实验检测细胞迁移能力($\times 100$); B: Transwell 迁移侵袭实验检测过表达 hsa_circ_0140180 对细胞迁移和侵袭能力的影响($\times 200$); C: WB 检测细胞 E-cadherin, Snail 蛋白变化

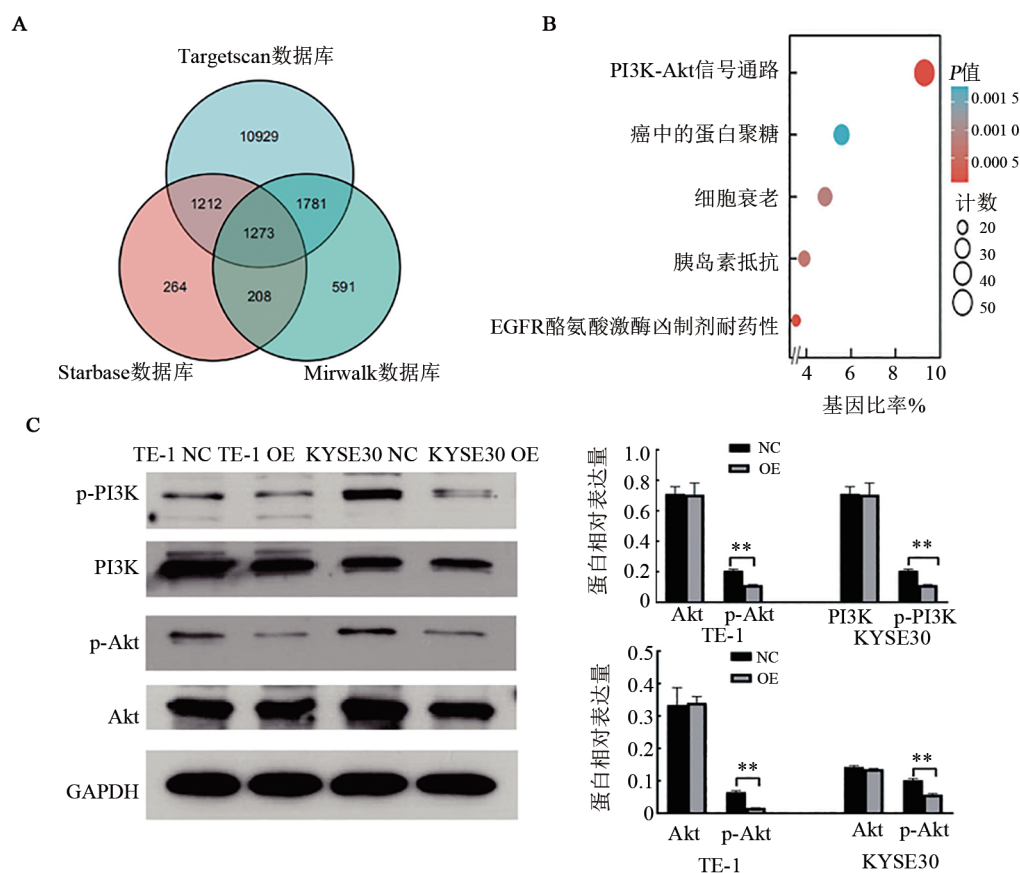
图 4 过表达 hsa_circ_0140180 对 ESCC 细胞迁移、侵袭受能力及 EMT 相关蛋白表达的影响



与circWT+NC组比较,** $P<0.01$;与NC组比较, $\Delta P<0.05$

A: hsa_circ_014180与miR-1287-5p结合位点预测示意图; B: 双荧光素酶报告基因实验验证 hsa_circ_014180和miR-1287-5p存在结合; C: qPCR检测过表达circRNA后导致miR-1287-5p表达下降

图5 hsa_circ_014180与miR-1287-5p靶向结合的验证



与NC组比较,** $P<0.01$

A: miR-1287-5p靶基因交集图; B: KEGG对靶基因聚类分析; C: WB检测过表达 hsa_circ_014180后对TE-1和KYSE30细胞中PI3K-Akt通路的影响

图6 hsa_circ_014180对ESCC细胞PI3K-Akt通路的影响

3 讨论

ESCC在中国发病率较高,侵袭性极强,但由于早期的症状隐匿,患者在确诊时大多数已发生局部浸润和远处转移,预后较差。目前ESCC靶向治疗进展缓慢,研究食管癌的发病机制、寻找新的靶点是当前研究的热点。circRNA相较于线性RNA更为稳定,因此可作为有效的生物标志物和治疗靶点。在ESCC中,已有研究证实circRNA参与调控肿瘤的恶性进展,例如circFAM120B在ESCC中通过miR-661/PPM1L轴和PKR/p38 MAPK/EMT通路发挥肿瘤抑制作用^[15]; hsa_circ_0000277吸附miR-4766-5p、上调LAMA1而促进食管癌发生发展^[16]。

本研究中,通过高通量测序及qPCR验证检测结果发现,hsa_circ_0140180在ESCC组织和细胞中呈明显低表达。目前关于hsa_circ_0140180的报道很少,根据circBase数据库可知,hsa_circ_0140180属于外显子来源的circRNA,由DMD mRNA的7个外显子反向剪接生成,DMD基因主要编码抗肌萎缩蛋白,与细胞骨架和细胞基质的连接相关,影响各种肿瘤的发生发展和患者预后^[17]。本研究采用随机引物扩增、琼脂糖电泳验证扩增产物、RNase R酶消化实验对hsa_circ_0140180分子特性进行了验证,进一步证实hsa_circ_0140180是一个典型的circRNA;在过表达hsa_circ_0140180后,虽然ESCC细胞的增殖能力及细胞周期未发生显著变化,但其迁移和侵袭能力均受到明显抑制,表明hsa_circ_0140180在抑制ESCC的转移中可能起到重要作用。

既往研究^[18]表明,位于胞质中的circRNA主要通过竞争性吸附miRNA,使miRNA不能与靶基因结合,进而协同调控靶基因的表达,发挥生物学功能。在本研究中发现,hsa_circ_0140180主要定位于胞质,并通过生信分析、qPCR和双荧光素酶实验等证实了miR-1287-5p在ESCC细胞中可被hsa_circ_0140180调控。有研究^[19-21]显示,miR-1287-5p在乳腺癌、非小细胞肺癌、结直肠癌等多种肿瘤中表达异常,能影响肿瘤发生发展,但目前罕有miR-1287-5p影响ESCC发生发展的报道。为了进一步探究hsa_circ_0140180/miR-1287-5p轴在ESCC中的生物学功能,本研究通过KEGG对miRNA靶基因进行通路富集分析,发现靶基因主要富集在PI3K-Akt等信号通路。有研究表明PI3K-Akt信号通路与肿瘤发生发展、肿瘤微血管密度增加以及癌细胞的趋化和侵袭能力密切相关^[19],通过抑制PI3K-Akt信号通路的激活明显抑制结直肠癌转移^[22],而在ESCC中,PI3K-Akt信号通路的激活与肿瘤浸润深度、淋巴结转移等显著相

关^[23]。PI3K-Akt信号通路的激活对于ESCC细胞的迁移、侵袭、细胞周期及凋亡等有着至关重要的作用,是ESCC的研究热点。本研究在ESCC细胞中检测到过表达hsa_circ_0140180后,细胞中p-PI3K, p-PAKT蛋白表达均显著降低,表明hsa_circ_0140180抑制ESCC细胞中PI3K-Akt通路的激活,推测hsa_circ_0140180可能通过海绵吸附miR-1287-5p来影响PI3K-Akt等信号通路,从而抑制ESCC细胞侵袭和迁移。

综上所述,本研究发现ESCC中hsa_circ_0140180明显下调,并可靶向结合miR-1287-5p,影响PI3K-Akt信号通路的激活,抑制ESCC细胞的迁移和侵袭能力。hsa_circ_0140180可能作为ESCC发生发展的抑癌基因,为ESCC的诊断、治疗提供了重要的实验依据。

[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 Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] LIN Y S, TOTSUKA Y, SHAN B E, *et al.* Esophageal cancer in high-risk areas of China: research progress and challenges[J]. *Ann Epidemiol*, 2017, 27(3): 215-221. DOI: 10.1016/j.annepidem.2016.11.004.
- [3] GUPTA B, KUMAR N. Worldwide incidence, mortality and time trends for cancer of the oesophagus[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2017, 26(2): 107-118. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000249.
- [4] HAGENS E R C, VAN BERGE HENEGOUWEN M I, GISBERTZ S S. Distribution of lymph node metastases in esophageal carcinoma patients undergoing upfront surgery: a systematic review [J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(6): 1592[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32560226/>. DOI: 10.3390/cancers12061592.
- [5] CHEN L L, YANG L. Regulation of circRNA biogenesis[J]. *RNA Biol*, 2015, 12(4): 381-388. DOI: 10.1080/15476286.2015.1020271.
- [6] QU S B, YANG X S, LI X L, *et al.* Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 141-148. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.003.
- [7] HUANG X Y, ZHANG P F, WEI C Y, *et al.* Circular RNA circMET drives immunosuppression and anti-PD1 therapy resistance in hepatocellular carcinoma via the miR-30-5p/snail/DPP4 axis[J/OL]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 92[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32430013/>. DOI: 10.1186/s12943-020-01213-6.
- [8] ZHANG N, NAN A R, CHEN L J, *et al.* Circular RNA circSATB2 promotes progression of non-small cell lung cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 101[2022-11-10]. <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-020-01221-6>. DOI: 10.1186/s12943-020-01221-6.
- [9] 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.

- [10] ZANG X Y, JIANG J J, GU J M, *et al.* Circular RNA EIF4G3 suppresses gastric cancer progression through inhibition of β -catenin by promoting δ -catenin ubiquitin degradation and upregulating SIK1 [J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 141[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35780119/>. DOI: 10.1186/s12943-022-01606-9.
- [11] LOUIS C, COULOUARN C. One stone, two birds: circACTN4, a nexus for a coordinated activation of Hippo and Wnt/ β -catenin pathways in cholangiocarcinoma[J]. *J Hepatol*, 2022, 76(1): 8-10. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.10.002.
- [12] CHEN Z Z, HE L Y, ZHAO L B, *et al.* circREEP3 drives colorectal cancer progression *via* activation of FKBP10 transcription and restriction of antitumor immunity[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(13): e2105160[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35233964/>. DOI: 10.1002/advs.202105160.
- [13] HEI R X, CHEN J N, ZHANG X J, *et al.* CircNRIP1 acts as a sponge of miR-1200 to suppress osteosarcoma progression *via* upregulation of MIA2[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(6): 2833-2849[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35812061/>.
- [14] LI L, LEI K, LYU Y C, *et al.* hsa_circ_0001741 promotes esophageal squamous cell carcinoma stemness, invasion and migration by sponging miR-491-5p to upregulate NOTCH3 expression[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(5): 2012-2031[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35693080/>.
- [15] SONG H, TIAN D, SUN J, *et al.* circFAM120B functions as a tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinoma *via* the miR-661/PPM1L axis and the PKR/p38 MAPK/EMT pathway [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 361[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35436983/>. DOI: 10.1038/s41419-022-04818-5.
- [16] ZHOU P L, WU Z Y, ZHANG W G, *et al.* Circular RNA hsa_circ_0000277 sequesters miR-4766-5p to upregulate LAMA1 and promote esophageal carcinoma progression[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 676[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34226522/>. DOI: 10.1038/s41419-021-03911-5.
- [17] JONES L, NAIDOO M, MACHADO L R, *et al.* The Duchenne muscular dystrophy gene and cancer[J]. *Cell Oncol*, 2021, 44(1): 19-32. DOI: 10.1007/s13402-020-00572-y.
- [18] KRISTENSEN L S, ANDERSEN M S, STAGSTED L V W, *et al.* The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675-691. DOI: 10.1038/s41576-019-0158-7.
- [19] SCHWARZENBACHER D, KLEC C, PASCULLI B, *et al.* MiR-1287-5p inhibits triple negative breast cancer growth by interaction with phosphoinositide 3-kinase CB, thereby sensitizing cells for PI3Kinase inhibitors[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 20[2022-11-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30709367/>. DOI: 10.1186/s13058-019-1104-5.
- [20] LI J W, ZHU Z B, LI S S, *et al.* circ_0089823 reinforces malignant behaviors of non-small cell lung cancer by acting as a sponge for microRNAs targeting SOX4[J]. *Neoplasia*, 2021, 23(9): 887-897. DOI: 10.1016/j.neo.2021.06.011.
- [21] FATEH A, ALI HOSSEINPOUR FEIZI M, SAFARALIZADEH R, *et al.* Diagnostic and prognostic value of miR-1287 in colorectal cancer[J]. *J Gastrointest Canc*, 2016, 47(4): 399-403. DOI: 10.1007/s12029-016-9833-5.
- [22] HUANG R Q, LI S, TIAN C, *et al.* Thermal stress involved in TRPV2 promotes tumorigenesis through the pathways of HSP70/27 and PI3K-Akt/mTOR in esophageal squamous cell carcinoma [J/OL]. *Br J Cancer*, 2022, 127(8): 1424-1439[2022-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9553907/>. DOI: 10.1038/s41416-022-01896-2.
- [23] WANG C, CHEN J X, KUANG Y Y, *et al.* A novel methylated cation channel TRPM4 inhibited colorectal cancer metastasis through Ca^{2+} /Calpain-mediated proteolysis of FAK and suppression of PI3K-Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(14): 5575-5590. DOI: 10.7150/ijbs.70504.

[收稿日期] 2022-12-15

[修回日期] 2023-02-05

[本文编辑] 向正华, 沈志超