

hsa-circ-0001862对舌鳞癌细胞表型的影响研究

柳雪¹,熊辉¹,苏永志¹,王杨洋²,王鹏²,陶亚东^{2*}

(1.承德医学院附属医院,河北承德 067000;2.承德医学院附属医院)

摘要: **目的** 研究环状RNA hsa-circ-0001862对舌鳞癌细胞表型的影响及其对舌鳞癌发生发展的作用机制。**方法** 构建hsa-circ-0001862质粒,采用双荧光素酶报告基因及qRT-PCR的方法来验证hsa-circ-0001862与miR-23a-3p的相互作用关系。靶向抑制hsa-circ-0001862后,利用CCK8实验以及集落形成实验分别检测舌鳞癌细胞的细胞活性及集落形成能力;通过划痕实验以及Transwell实验检测舌鳞癌细胞的迁移及侵袭能力;通过蛋白印迹实验检测凋亡相关蛋白,反映hsa-circ-0001862对舌鳞癌细胞凋亡能力的影响。**结果** hsa-circ-0001862与miR-23a-3p能够相互作用,在舌鳞癌细胞中两者的表达呈负相关;在Tca-8113细胞中,hsa-circ-0001862能够抑制细胞的增殖、迁移和侵袭的能力($P<0.01$),并促进细胞的凋亡($P<0.01$)。**结论** hsa-circ-0001862与miR-23a-3p相互作用,并且hsa-circ-0001862在舌鳞癌的发生发展中发挥着抑制的作用,hsa-circ-0001862或可成为治疗舌鳞癌的一个新的生物标记物和靶点。

关键词: hsa-circ-0001862;舌鳞状细胞癌;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号: R739.86

文献标志码: A

文章编号: 1004-6879(2024)03-0185-05

Effect of hsa-circ-0001862 on the Phenotype of Tongue Squamous Cell

LIU Xue¹, XIONG Hui¹, SU Yong-zhi¹, WANG Yang-Yang², WANG Peng², TAO Ya-dong^{2*}

(1. The University Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China;

2. The Affiliated Hospital of Chengde Medical University)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of circular RNA hsa-circ-0001862 on the phenotype of tongue squamous cell carcinoma and its mechanism on the occurrence and development of tongue squamous cell carcinoma. **Methods** hsa-circ-0001862 plasmid was constructed, and the interaction relationship between hsa-circ-0001862 and miR-23a-3p was verified by double luciferase reporter gene and qRT-PCR. After targeted inhibition of hsa-circ-0001862, CCK8 assay and colony formation assay were used to detect the cell viability and colony formation ability of tongue squamous cell carcinoma cells. The migration and invasion ability of tongue squamous cell carcinoma cells were detected by scratch test and Transwell test. Apoptosis-related proteins were detected by Western blot to reflect the effect of hsa-circ-0001862 on the apoptosis of tongue squamous cell carcinoma cells. **Results** hsa-circ-0001862 and miR-23a-3p could interact, and their expression was negatively correlated in tongue squamous cell, carcinoma cells. In Tca-8113 cells, hsa-circ-0001862 inhibited cell proliferation, migration and invasion ($P<0.01$), and promoted cell apoptosis ($P<0.01$). **Conclusion** hsa-circ-0001862 interacts with miR-23a-3p, and hsa-circ-0001862 plays an inhibitory role in the development of tongue squamous cell carcinoma. hsa-circ-0001862 may be a new biomarker and target for the treatment of tongue squamous cell carcinoma.

Key words: hsa-circ-0001862; tongue squamous cell carcinoma; cell proliferation; cell apoptosis

口腔鳞状细胞癌在全世界常见癌症中排在第八位^[1], 占有所有头颈部鳞状细胞癌的90%以上。在口腔鳞状细胞癌中,舌鳞状细胞癌是最常见的类型^[2],具有较高的侵袭

性和淋巴结转移率。所以研究舌鳞癌的分子调控机制对于舌鳞癌的早发现、早治疗以及五年生存率提高都具有很重要的意义。

资助项目:河北省中药研究与开发重点实验室开放性课题资助(ZSKF202307);承德市科技计划项目(202006A054)

*通讯作者

circRNA在人类肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用^[3,4]。hsa_circRNA_104348能够促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制肝癌细胞凋亡^[5]。在胃癌中,circRNA_102231上调促进胃癌的进展^[6]。在乳腺癌中,circRNF20能够促进乳腺癌的进展,发挥着重要的作用^[7]。circRNA_0000140通过靶向miR-31抑制Hippo信号通路来抑制口腔鳞状细胞癌的生长和转移^[8]。circ_0000003能够通过miR-330-3p/GLS轴调节舌鳞状细胞癌的谷氨酰胺代谢和肿瘤进展^[9]。在舌鳞癌组织中circ_0001742通过miR-431-5p/ATF3轴促进舌鳞状细胞癌进展^[10]。本研究主要是研究hsa-circ-0001862对舌鳞癌细胞表型的作用。miR-23a作为前期研究已经确定的舌鳞癌致癌基因,本研究试图探索hsa-circ-0001862对舌鳞癌细胞表型的影响。

1 材料和方法

1.1 实验的主要试剂

Tca-8113细胞,293T细胞,miR-23a-3p、circ_0001862过表达和封闭质粒来自天津赛尔生物技术有限公司,胰蛋白酶,1640培养基,Opti-MEM为国产成品试剂,乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2);胎牛血清(fetal calf serum, FBS),美国GIBCO;TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒,瑞士Roche;脂质体Lipofectamine2000 Reagent,美国Invitrogen,江苏碧云天双荧光素酶报告基因检测试剂盒等。

表1 引物序列

circ_0001862-FWD	5'AGATATGGCATTGCGCCTGA3'
circ_0001862-REV	5'TGGATCAGGTGGCAAAAACG3'
GAPDH-FWD	5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3'
GAPDH-REV	5'TCCACCACCCTGTTGCTGTA3'
miR-23a-3p-3p-Fwd	5'TGCGGATCACATTGCCAGGGAT3'
U6-Fwd	5'TGCGGGTGCTCGCTTCGCGCAGC3'
Reverse	5'CCAGTGCAGGGTCCGAGGT3'

1.1.1 细胞接种及转染 细胞分组:对照组(PC组)、过表达hsa-circ-0001862组(circ_0001862组)、敲降对照组(NC组)、敲降hsa-circ-0001862组(shR-circ_0001862组),共4组。

(1)细胞接种:转染前24 h,Tca8113细胞用1×PBS漂洗一次,消化液(0.02%EDTA、0.05%胰蛋白酶)消化后,经底面积换算,将细胞300,000个/孔接种于6孔板中,加入细胞悬液3 mL,培养18~24 h后,使转染时细胞达到70%~80%板底面积。(2)转染液制备:在无菌的1.5 mL离心管中配制A、B转染液(以PC组为例)。A液:用无血清

培养基Opti-MEM稀释3 μg (20 μM)PC,终量50 μL ,轻轻混匀。B液:用无血清培养基Opti-MEM稀释3 μL 脂质体Lipofectamine2000 Reagent,终量50 μL ,轻轻混匀,室温静置5 min。将B液滴加入A液中并轻轻混匀,室温静置20 min。(3)转染:将转染液加入对应孔中,100 μL /孔,每孔补加500 μL Opti,轻晃培养板使其分布均匀后,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。(4)4 h后每孔换成10% FBS(不含抗生素)的1640培养液3 mL,继续于37 $^{\circ}\text{C}$ 含5% CO_2 的细胞培养箱中培养。

1.1.2 双荧光素酶报告基因检测 取对数生长期的293T细胞接种于48孔板,根据Lipofectamine2000说明书进行转染,将Circ-0001862-WT与Circ-0001862-mut分别与has-miR-23a-3p mimics,mimics NC、has-miR-23a-3p ASO及ASO-NC共转染至293T细胞中,48 h后,应用双荧光素酶报告基因检测盒检测293T细胞的荧光素酶活性,依据以下公式计算,相对luciferase活性=firefly luciferase活性/renilla luciferase活性 $\times 100\%$ 。

1.1.3 实时定量PCR 设定循环参数为:37 $^{\circ}\text{C}$,1 min;50 $^{\circ}\text{C}$,60 min;70 $^{\circ}\text{C}$,15 min。cDNA产物置于冰盒中待用,或-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。实时定量PCR实验:(1)按照所需用量增加配比体积,配置比例如下。Mix:引物F:引物R:水=5:0.5:0.5:2,每个反应总体积为8 μL ;(2)加入至反应板每个孔中,再按照实验分组分别加入10 μL /孔相应的cDNA;封膜,混匀,瞬离;置于冰板上备用。(3)设置如下反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$,7 min;95 $^{\circ}\text{C}$,10 s;60 $^{\circ}\text{C}$,56 s;42个循环。(4)计算结果并收集,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析数据。 $\text{Folds}=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{Ct1}-\text{Ct2})-(\text{Ct3}-\text{Ct4})$ 。

1.1.4 CCK8实验 将上述转染24 h细胞消化后计数,1000 cell/孔,分别于24 h,48 h,72 h使用CCK8法检测个时间段细胞活性。每孔加入10 μL CCK8溶液,继续培养1~2 h。在酶标仪上测量各孔450 nm处的吸光度值。

1.1.5 集落形成实验 计数各组细胞,分别取200个接种于12孔板,补足完全培养基2 mL。培养1~2周。克隆细胞约为50个以上时,肉眼清晰可辨,固定细胞,0.1%结晶紫染色10 min,冲洗晾干,拍照并计数。

1.1.6 划痕实验 将上述各组细胞培养至密度接近融合。在细胞培养板背面预先画上直线,用枪头比照直线在细胞面上制作一条划痕,清洗去掉划掉的细胞,继续培

3p的表达后,miR-23a-3p的表达水平相较于对照组的51% ($P<0.0001$)见图1E。进一步转染过表达和封闭后的miR-23a-3p检测hsa-circ-0001862的表达水平,在miR-23a-3p过表达组,hsa-circ-0001862的表达水平相较于对照组明显降低($P<0.0001$);在封闭miR-23a-3p组,hsa-circ-0001862的表达水平相较于对照组明显升高($P<0.001$),见图1F。

1.1.7 Transwell实验 彻底弃净各组细胞培养液,用磷酸缓冲液漂洗细胞,每孔加消化液(0.01% EDTA、0.2% 胰蛋白酶)消化细胞后,加入完全培养液打散并混匀细胞。提前处理好Transwell小室,底面涂抹一定浓度的纤维连接蛋白,风干后在小室内加入matrix胶,模拟血管基底膜的纤维结缔组织。每个小室中加入200 μ L无血清1640培养基重悬细胞。下层小室加入含20% Gibco血清的1640培养基。培养24 h后,观察小室内细胞穿过纤维膜的数目,固定染色后在显微镜下拍照,计数并记录各组的细胞数。

1.1.8 蛋白质印迹实验 用含1% PMSF的RIPA裂解缓冲液(SenhuiBio, 郑州, 中国)提取总蛋白。蛋白浓度用BCA蛋白检测试剂盒(SenhuiBio, 郑州, 中国)测定。蛋白质通过SDS-PAGE电泳分离并转移到PVDF膜上(SenhuiBio, 郑州, 中国)。用5%脱脂牛奶阻断后,用抗体(Saierbio, 天津, 中国)在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,然后用HRP偶联兔抗人二抗体(Saierbio, 天津, 中国)在室温下孵育1 h。GAPDH被用作内部控制。使用一种发电化学发光试剂盒(Saierbio, 天津, 中国)对蛋白条带进行可视化。相对表达量用Image J软件量化。

A

Circ-0001862-WT 5' CAUUCGCCCCUGAAAAUGUGAU 3'

miR-23a-3p CCUUUAGGGACCGUUACACUA

Circ-0001862-Mut 5' CAUUCGCCCCUGAAUUACACUU 3'

B

GTTTA AGGCA GCTGC CTAGC CTCGA GTCTA GAATTC GAGCT GCAGG

PvuII EcoRI NheI XbaI SalI SbfI AgeI StuI

MCS

Blastic acid puromycin signal

puromycin resistance gene

pucM19

ori

HIS

polyA

pcDNA3.1(+)

C

marker	WT	Mut
5000bp	-	-
3000bp	-	-
2000bp	-	-
1000bp	-	-
750bp	-	-
500bp	-	-
250bp	-	-
100bp	-	-

pmIRGL

145bp

D

Relative luciferase intensity	mimics NC	+/-	-/+	-/-
1.0	+	-	-	-
0.6	-	+	-	-
1.4	-	-	+	-
1.0	+	-	-	-
0.9	-	+	-	-
1.0	-	-	+	-
1.1	+	-	-	+

*** **** ns ns

Circ-0001862-WT Circ-0001862-Mut

E

Tca-8113

Relative miR-23a-3p expression level

mimics NC	miR-23a-3p	ASO-NC	ASO-mir-22a-3p
1.0	~2.2	~1.0	~0.4

*** ***

F

Tca-8113

Relative circ_0001862 expression level

mimics NC	miR-23a-3p	ASO-NC	ASO-mir-22a-3p
1.0	~0.6	~1.0	~1.0

*** **

图1 hsa-circ-0001862与miR-23a-3p的相互作用

A. hsa-circ-0001862与miR-23a-3p的互补结合位点;B. 构建hsa-circ-0001862质粒的模式图;C. 构建hsa-circ-0001862质粒的凝胶电泳结果;D. 双荧光素酶报告实验检测共转染后荧光酶强度;E. 验证过表达和封闭miR-23a的有效性;F. qRT-PCR检测表达和封闭miR-23a-3p后hsa-circ-0001862的表达水平;*** $P<0.0001$,** $P<0.001$

hsa-circ-0001862与miR-23a-3p的5'端存在多个连续匹配碱基对,见图1A。构建hsa-circ-0001862质粒,见图1B、D,转染miR-23a-3p模拟物和野生型hsa-circ-0001862的荧光素酶强度比转染NC模拟物和野生型hsa-circ-0001862的降低($P<0.0001$);在转染封闭miR-23a-3p模拟物和野生型hsa-circ-0001862的荧光素酶强度与对照组相比升高($P<0.0001$);这种现象在转染突变型hsa-circ-0001862后消失,见图1D。

与对照组相比,过表达hsa-circ-0001862组细胞生长活

性降低,而封闭hsa-circ-0001862组细胞活性升高,且差异有统计学意义($P<0.0001$)。相较于对照组,过表达hsa-circ-0001862组细胞集落形成能力降低,集落数减少;封闭hsa-circ-0001862组细胞集落形成能力增强,集落形成数增多,差异有统计学意义(图2B)。表达hsa-circ-0001862组的相对间隙要明显大于对照组,而对于封闭hsa-circ-0001862组的相对间隙要小于对照组(图2C)。过表达hsa-circ-0001862可以降低细胞侵袭能力,敲降hsa-circ-0001862可以提高细胞侵袭能力(图2D)。过表达hsa-circ-0001862组抗凋亡因子Bcl2的表达量相较于对照组增加,而促凋亡因子Bax的表达水平相较于对照组明显降低。封闭hsa-circ-0001862组结果正好相反,说明hsa-circ-0001862可以促进口腔鳞癌的细胞凋亡。

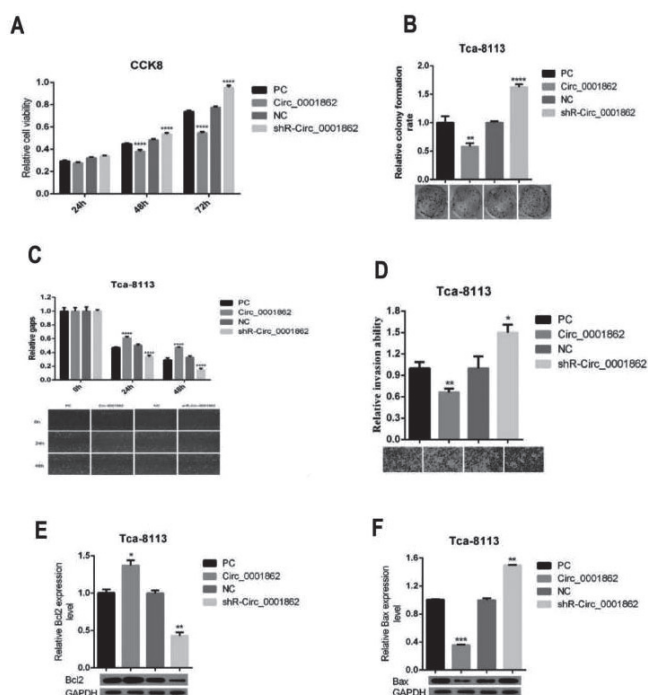


图2 hsa-circ-0001862对Tca-8113细胞表型的影响

A. hsa-circ-0001862对细胞Tca-8113细胞活性的影响;B. hsa-circ-0001862对细胞Tca-8113细胞集落形成能力的影响及结晶紫染色图片;C.hsa-circ-0001862对细胞Tca-8113细胞迁移能力的影响及划痕实验镜下图;D.hsa-circ-0001862对细胞Tca-8113细胞侵袭能力的影响及Transwell实验镜下图;E. hsa-circ-0001862对细胞Tca-8113细胞凋亡蛋白Bcl2表达的影响及蛋白质印迹图;F.hsa-circ-0001862对细胞Tca-8113细胞凋亡蛋白Bax表达的影响及蛋白质印迹图;*** $P<0.0001$,** $P<0.001$,* $P<0.01$

综上,表达hsa-circ-0001862能够抑制舌鳞癌细胞的

增殖、迁移和侵袭,并促进舌鳞癌细胞的凋亡,在封闭hsa-circ-0001862表达后能够促进舌鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制舌鳞癌细胞的凋亡.hsa-circ-0001862在舌鳞癌的发生发展中能够发挥着抑癌基因的作用。

3 讨论

大量研究表明,miR-23a-3p在多种癌症中有着异常的表达,在胃癌中,miR-23a-3p/b通过靶向胃癌中的PDCD4促进肿瘤生长和抑制细胞凋亡;在卵巢癌中miR-23a-3p过表达与卵巢癌的预后不良密切相关;在喉癌中,LncRNA MEG3通过miR-23a-3p/APAF-1轴抑制喉癌细胞增殖并诱导细胞凋亡^[11]。有研究显示^[12],miR-23a-3p在口腔鳞状细胞癌中能后促进肿瘤的进展。我们以往的研究主要针对miR-23a-3p下游的作用机制,寻找其下游的潜在靶基因IRF1以及PPP2R5E,并研究miR-23a-3p本身及其靶基因对舌鳞癌细胞表型的影响.miR-23a-3p在舌鳞癌组织及细胞中表达异常升高,而其靶基因则表达较正常组织降低,对于舌鳞癌细胞表型的影响,前者促进,后者抑制,进一步印证了miR-23a-3p是促癌基因促进了舌鳞癌的发生发展,而其靶基因则起抑癌基因作用.miR-23a-3p及其靶基因IRF1和PPP2R5E以miRNAs-靶基因轴的方式发挥促进舌鳞癌细胞恶性表型的作用。

在口腔鳞癌中,circIGHG能够促进口腔鳞癌的进展^[13]。最新的研究发现^[14,15],hsa_circ_0001742能够促进舌鳞癌的进展,circ_0001742与舌鳞癌的晚期的不良生存状况有着密切的关系。目前,对于circRNA在舌鳞癌发生发展中的作用仍有待研究。本研究主要针对hsa-circ-0001862对舌鳞癌细胞的影响,以及hsa-circ-0001862-miR-23a轴对舌鳞癌发生发展的影响。本研究采用双荧光素酶报告检测hsa-circ-0001862与miR-23a-3p相互作用,在实时定量PCR检测中发现,当在Tca-8113细胞系中过表达miR-23a-3p,hsa-circ-0001862的表达水平明显受到抑制;当敲降miR-23a-3p时,hsa-circ-0001862的表达抑制解除。为进一步研究hsa-circ-0001862对舌鳞癌的影响,本研究采用体外实验,在Tca-8113细胞中设计表达对照组、过表达hsa-circ-0001862组、敲降对照组、敲降hsa-circ-0001862组,发现hsa-circ-0001862能够抑制舌鳞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并促进肿瘤细胞的凋亡。

综上所述,hsa-circ-0001862能够与miR-23a-3p相互

作用,可能通过海绵作用调节miR-23a的表达,以hsa-circ-0001862-miR-23a-3p/靶基因轴的方式发挥作用,hsa-circ-0001862能够抑制舌鳞癌细胞的恶性表型,从而抑制舌鳞癌发生发展,起到抑癌基因的作用,可能成为新的舌鳞癌临床标志分子或新的肿瘤治疗靶点。

参考文献

- [1] Meng X, Lou QY, Yang WY, et al. The role of non-coding RNAs in drug resistance of oral squamous cell carcinoma and therapeutic potential[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(10): 981-1006.
- [2] Kim YJ, Kim JH. Increasing incidence and improving survival of oral tongue squamous cell carcinoma[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 7877.
- [3] Zanon DK, Montero PH, Migliacci JC, et al. Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015)[J]. Oral Oncol, 2019, 90: 115-121.
- [4] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted L, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(11): 675-691.
- [5] Guo Y, Yang J, Huang Q, et al. Circular RNAs and their roles in head and neck cancers[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 44.
- [6] Kristensen LS, Jakobsen T, Hager H, et al. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(3): 188-206.
- [7] Lei M, Zheng G, Ning Q, et al. Translation and functional roles of circular RNAs in human cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 30.
- [8] Huang G, Liang M, Liu H, et al. CircRNA hsa_circRNA_104348 promotes hepatocellular carcinoma progression through modulating miR-187-3p/RTKN2 axis and activating Wnt/beta-catenin pathway[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(12): 1065.
- [9] Yuan G, Ding W, Sun B, et al. Upregulated circRNA_102231 promotes gastric cancer progression and its clinical significance[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4936-4945.
- [10] Cao L, Wang M, Dong Y, et al. Circular RNA circRNF20 promotes breast cancer tumorigenesis and Warburg effect through miR-487a/HIF-1alpha/HK2[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 145.
- [11] Peng QS, Cheng YN, Zhang WB, et al. circRNA_0000140 suppresses oral squamous cell carcinoma growth and metastasis by targeting miR-31 to inhibit Hippo signaling pathway[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 112.
- [12] Qian C, Chen S, Li S, et al. Circ_0000003 regulates glutamine metabolism and tumor progression of tongue squamous cell carcinoma via the miR3303p/GLS axis[J]. Oncol Rep, 2021, 45(4): 45.
- [13] Zhang X, Wu N, Wang J, et al. LncRNA MEG3 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in laryngeal cancer via miR-23a/APAF-1 axis[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(10): 6708-6719.
- [14] Liu J, Jiang X, Zou A, et al. circIGHG-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Progression via miR-142-5p/IGF2BP3 Signaling[J]. Cancer Res, 2021, 81(2): 344-355.
- [15] Yao Y, Bi L, Zhang C. Circular RNA_0001742 has potential to predict advanced tumor stage and poor survival profiles in tongue squamous cell carcinoma management[J]. J Clin Lab Anal, 2020, 34(8): e23330.

(收稿日期:2023-09-02)

基于网络药理学验证褪黑素对急性肺损伤的抑制作用

王碧红¹,李卓越²,李秦汉²,孙燕玲²,吕建国³,林 丽^{2*}

(1.湖北科技学院医学部药学院,湖北咸宁 437100;2.湖北科技学院医学部基础医学院;3.湖北科技学院医学部临床医学院)

摘要: **目的** 本文旨在研究褪黑素(MT)对急性肺损伤(ALI)可能的干预靶点和其抑制作用。**方法** 通过数据库筛选获取MT的主要靶点及ALI的疾病作用靶点。经过Venn图的解析MT和ALI的共同靶点。利用Cytoscape 3.8.2工具构建“药物-疾病”的网络模型。借助STRING工具对蛋白质之间的相互作用进行分析,并构造PPI网络。使用R工具进行GO和KEGG的富集分析。同时,构建ALI动物模型并进行MT治疗干预,观察肺组织病理学的变化,气管切开插管检测各组肺功能Ri-area、Re-area和Cldyn-area水平。**结果** 经筛选后获得196个MT靶点、3948个ALI靶点及118个药物-疾病共同靶点。EGFR、HIF1A和ERBB2等均为MT靶向ALI疾病的关键核心点。在GO

资助项目:湖北省大学生创新训练项目(S202110927022);湖北省大学生创新训练项目(S202210927035)

*通讯作者