

· 肿瘤专题研究 ·

环状RNA hsa_circ_0001479在胃癌中的表达及功能研究

施欣^{1,2}, 景蓉蓉¹, 王洁^{1,2}, 刘思楠^{1,2}, 崔明^{1*}

¹南通大学附属医院检验科, 江苏 南通 226001; ²南通大学医学院, 江苏 南通 226001

[摘要] 目的:探讨 hsa_circ_0001479 在胃癌(gastric cancer, GC)组织中的表达情况及其对胃癌细胞生物学行为的影响。方法:建立实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测 hsa_circ_0001479 表达量的方法并进行方法学性能评价;通过 RT-qPCR 检测 76 对胃癌组织和配对癌旁组织中 hsa_circ_0001479 的表达水平并分析其表达量与临床病理参数的关系;构建针对 hsa_circ_0001479 的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)和过表达载体,转染至胃癌细胞株,通过 CCK-8 实验、克隆形成实验检测细胞增殖能力,流式细胞术检测细胞周期分布,划痕实验检测细胞横向迁移能力,Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移能力。结果:RT-qPCR 检测 hsa_circ_0001479 表达量的方法具有良好的精密度、正确度和线性;hsa_circ_0001479 在胃癌组织中表达增高且表达水平与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期和 CA19-9 水平有关;细胞功能实验显示,在胃癌细胞株中干扰 hsa_circ_0001479 的表达可抑制胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移,过表达 hsa_circ_0001479 则呈现相反的结果。结论:胃癌组织中高表达的 hsa_circ_0001479 具有促进胃癌细胞增殖、侵袭和迁移的功能。

[关键词] 胃癌;环状RNA;hsa_circ_0001479;分子功能

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)05-617-09

doi: 10.7655/NYDXBNS20230505

Expression and function of hsa_circ_0001479 in gastric cancer

SHI Xin^{1,2}, JING Rongrong¹, WANG Jie^{1,2}, LIU Sinan^{1,2}, CUI Ming^{1*}

¹Department of Laboratory Medicine, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001; ²Medical School of Nantong University, Nantong 226001, China

[Abstract] **Objective:** The current study aims to explore the expression of hsa_circ_0001479 in gastric cancer (GC) tissues and its effect on biological behavior of GC cells. **Methods:** The method for detecting the expression of hsa_circ_0001479 with real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was established and evaluated. Expression level of hsa_circ_0001479 in 76 pairs of GC and para-cancerous tissues was measured by RT-qPCR and relationship between the expression level and clinicopathological factors was analyzed. Small interfering RNA (siRNA) and overexpression vector of hsa_circ_0001479 were constructed and transfected into GC cell lines. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay and clone formation assay. Cell cycle distribution was detected by flow cytometry. Cell migration was detected by wound healing assay and Transwell assay. Cell invasion was detected by transwell assay. **Results:** Using RT-qPCR to detect the expression of hsa_circ_0001479 possessed good precision, accuracy and linear range. Hsa_circ_0001479 was upregulated in GC tissues and the expression level was related to tumor size, depth of invasion, lymph node metastasis, TNM stage and CA19-9. Silencing of hsa_circ_0001479 inhibited the proliferation, invasion and migration of GC cells while overexpression of hsa_circ_0001479 showed the opposite results. **Conclusion:** The current study found that hsa_circ_0001479 was upregulated in GC tissues and could promote GC cell proliferation, invasion and migration.

[Key words] gastric cancer; circular RNA; hsa_circ_0001479, molecular function

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(05):617-625]

[基金项目] 中国博士后科学基金资助项目(2020M681688)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wscm163@163.com

胃癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,是全球第四大癌症死亡原因,仅次于肺癌、结直肠癌和肝癌^[1]。尽管近年来胃癌发病率有所下降,但由于缺乏有效的早期诊断指标,胃癌患者的治疗效果不佳,预后差,死亡率较高^[2-3]。目前,手术治疗是胃癌唯一的根治性治疗方法,放化疗或其他治疗方法常作为辅助治疗手段与手术结合使用^[4-5]。因此,对胃癌发生发展的分子机制进行更广泛和深入的研究对寻找新的诊断指标和治疗靶点,改善胃癌患者预后,提高存活率有重要意义。环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类具有闭合环状结构且多不具有蛋白编码能力的RNA^[6]。由于具有稳定的环状结构,不易降解,且表达具有组织和疾病特异性,CircRNA有望成为新型肿瘤标志物和治疗靶点的潜力^[7]。为探寻新的胃癌差异 circRNA,本文结合文献 circRNA 芯片结果^[8]并经实时荧光定量PCR(RT-qPCR)初步验证发现 hsa_circ_0001479 可能在胃癌组织中高表达,因此选择该分子进行更深入的研究。本研究首次验证了 hsa_circ_0001479 在胃癌组织中表达增高并探究了其对胃癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响,从而初步阐明其在胃癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

收集2017年6月—2020年7月在南通大学附属医院手术的胃癌及配对远端癌旁组织76例(男57例,女19例),年龄37~82岁。组织标本一经取出立即置于-80℃冰箱保存。所有标本均在放化疗前采集,并经病理确诊。本研究经南通大学附属医院伦理委员会批准。4株胃癌细胞株(MGC-803、SGC-7901、MKN-45和BGC-823)及1株正常胃黏膜上皮细胞株(GES-1)均购自中国科学院上海生命科学研究细胞资源库。

本研究使用的试剂为TRIzol(Invitrogen公司,美国);逆转录试剂盒(Thermo公司,美国);DEPC水、18s rRNA引物和ZNF131引物(上海生工生物工程股份有限公司);hsa_circ_0001479引物(广州锐博生物科技有限公司);SYBR Green I mix(北京百泰克生物技术有限公司);核糖核酸酶R(Rnase R)(Epicentre公司,美国);RPMI 1640培养基和Matrigel胶(Corning公司,美国);Lonsera特级胎牛血清(上海双洙生物科技有限公司);siNC、hsa_circ_0001479 siRNA和GP-transfect-Mate转染试剂(上海

吉玛制药技术有限公司);空载体、hsa_circ_0001479 pcDNA(广州吉赛生物科技有限公司);CCK-8试剂盒(Dojindo公司,日本);Transwell小室(BD公司,美国);细胞周期检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 RT-qPCR

根据说明书使用TRIzol试剂从胃癌及癌旁组织或细胞中提取总RNA。用分光光度计测定每个RNA样本的浓度。参照说明书用逆转录试剂盒将总RNA反转录成互补DNA(cDNA),反应条件为25℃ 5 min,42℃ 1 h,70℃ 5 min,4℃保存。在Light Cycler 480 PCR仪(Roche公司,美国)上使用SYBR Green I mix通过RT-qPCR检测 circRNA 的表达量,反应条件为95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共45个循环。以18s rRNA作为内参,hsa_circ_0001479的引物序列为F:5'-ATCTTC-GAAAACATACAGAGCAGC-3'和R:5'-AACTCCT-GAAGGCATTCCATC-3';18s rRNA的引物序列为F:5'-GTAACCCGTTGAACCCCATC-3'和R:5'-CCATC-CAATCGGTAGTAGCG-3';ZNF131的引物为F:5'-ACACGTGTGCAAACCTGAACC-3'和R:5'-CCTG-GAGCAGATCTGGATGG-3'。用2^{-ΔΔCt}法对目的分子和内参分子进行相对定量分析。

1.2.2 RT-qPCR方法学性能评价实验

精密度评价:依据EP15-A2文件制定的定量检测方法精密度性能评价标准,选用6 μg组织RNA和3 μg细胞RNA逆转录得到的高低2个浓度的cDNA作为实验样本,每天检测1个批次,2份样本,每份样本重复测定4次,连续检测5 d。

正确度评价:收集目的分子的RT-qPCR产物50 μL并送测序公司进行测序,得到的测序结果与Circbase数据库提供的分子序列进行比对,观察碱基顺序是否一致,扩增片段中是否包含环化位点;将目的分子与内参分子的RT-qPCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察产物片段大小与预期是否一致。

线性范围评价:将细胞RNA逆转录得到的cDNA以10倍倍比稀释,设立5~7个浓度梯度,通过RT-qPCR检测线性范围,用GraphPad Prism 7软件进行线性回归分析并作图。

1.2.3 转染与细胞增殖、迁移和侵袭能力检测

转染:将MKN-45、BGC-823和SGC-7901细胞株分别培养于6孔板中,分为对照组和干扰或过表达组,使用GP-transfect-Mate转染试剂将siNC和

hsa_circ_0001479 siRNA 转染至 MKN-45、BGC-823 细胞株,空载体和 hsa_circ_0001479 pcDNA 转染至 SGC-7901 细胞株。转染 48 h 后通过 RT-qPCR 测定转染后表达。

细胞增殖能力检测:①CCK-8 实验:取转染 48 h 后的细胞接种于 96 孔板中,每组设立 4 个复孔,按说明书操作后,用酶标仪上测定 450 nm 处各孔的吸光度值,连续检测 5 d 并绘制折线图;②克隆形成实验:取转染 48 h 后的细胞以每孔 1 000 个细胞接种于 6 孔板中,培养 2 周后出现肉眼可见的细胞克隆斑,用甲醛固定 30 min,结晶紫染色 15 min,PBS 洗涤、晾干后拍照并计数。

细胞周期检测:取转染 48 h 后的细胞,按试剂盒说明书操作后通过流式细胞仪检测。

细胞迁移和侵袭能力检测:①细胞划痕实验:细胞转染 48 h 后,在各孔中央用 100 μL 枪头十字划线,用 PBS 洗涤后加入培养基,放入培养箱,分别在培养的第 0 h、12 h 及 24 h 在显微镜下拍照。②Transwell 实验:取转染 48 h 后的细胞,以 50 000 个/室接种于 Transwell 小室的上室中(侵袭实验需预先铺一层 Matrigel 胶),在下室(24 孔板)中加入 600 μL 含 20% 胎牛血清的完培,培养 48 h 后取出,经 PBS 洗涤,甲醛固定 30 min,结晶紫染色 15 min,PBS 洗涤、晾干后在显微镜下拍照并计数。

1.3 统计学方法

用 GraphPad Prism 7 和 SPSS 20.0 软件分析实验数据并绘制统计图。采用 *t* 检验分析两组数据的组间差异性;采用卡方检验分析 hsa_circ_0001479 表达水平与临床病理参数的关系;采用单因素方差分析(one-way ANOVA)分析多组数据的组间差异性;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-qPCR 检测 hsa_circ_0001479 的方法学性能评价

精密度评价:连续 5 d 通过 RT-qPCR 检测 2 份不同浓度的 cDNA 标本,结果发现 RT-qPCR 检测目的分子 hsa_circ_0001479 和内参分子 18s rRNA 均有良好的批内和批间精密度(表 1)。

正确度评价:采用 RT-qPCR 检测胃癌组织中 hsa_circ_0001479 的表达,发现目的分子和内参分子熔解曲线呈单峰,说明扩增产物的特异性良好(图 1A)。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果发现目的分子和内参分子的条带单一,片段大小与预期相符

(图 1B)。收集扩增产物进行桑格测序,测序结果见图 1C,将其与 Circbase 数据库中 hsa_circ_0001479 的序列进行比对,比对结果 100%一致。

线性范围评价:通过 RT-qPCR 检测 5~7 个浓度梯度的样本中 hsa_circ_0001479 和 18 s rRNA 的 CT 值,统计分析结果显示,hsa_circ_0001479 线性方程为 $Y=-2.831X+23.65$, $r^2=0.999\ 4$;18 s rRNA 的线性方程为 $Y=-2.918X+6.958$, $r^2=0.999\ 2$,该定量检测方法线性良好(图 2)。

表 1 RT-qPCR 检测 hsa_circ_0001479 和 18s rRNA 的精密度评价

Table 1 Precision evaluation for detection of hsa_circ_0001479 and 18s rRNA via RT-qPCR (%)		
指标	hsa_circ_0001479	18s rRNA
cDNA(高浓度)		
批内 CV	0.95	0.45
批间 CV	2.77	2.31
cDNA(低浓度)		
批内 CV	1.65	0.88
批间 CV	4.17	3.42

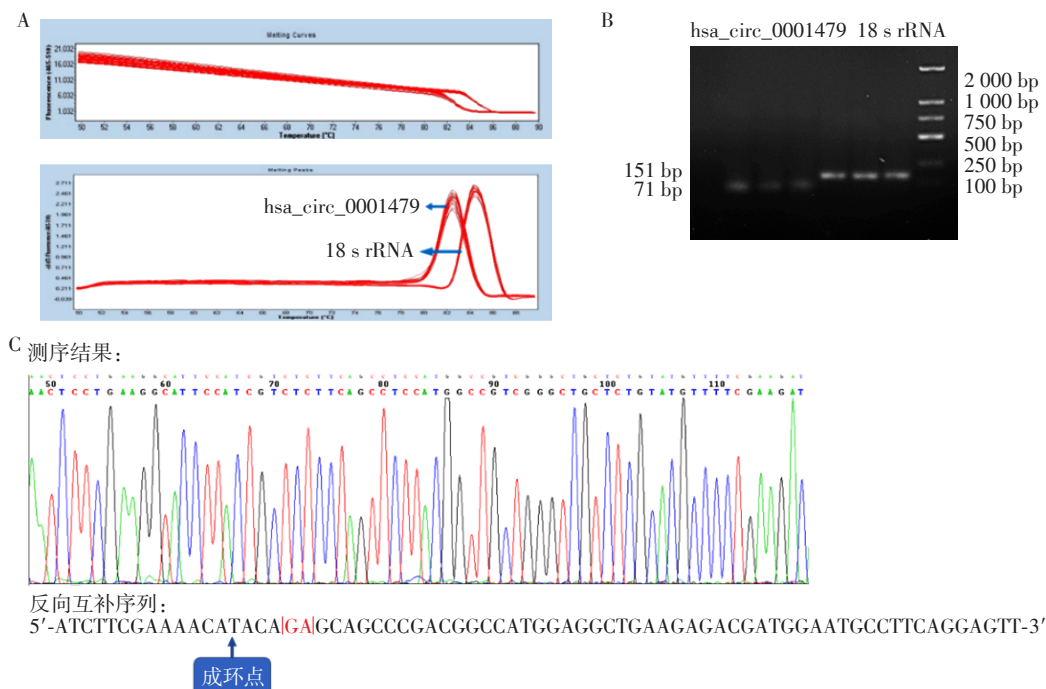
CV:变异系数。

2.2 Hsa_circ_0001479 成环性和稳定性验证

Hsa_circ_0001479 的分子结构示意图来源于 CISC 数据库(图 3A)。其环化位点的位置见测序结果图上的箭头标示(图 3B)。通过 RT-qPCR 检测发现,RNase R 处理后 hsa_circ_0001479 的来源基因 ZNF131 的 mRNA 表达水平显著下降,而 hsa_circ_0001479 的表达水平仅略有下降(图 3C),说明 hsa_circ_0001479 具有较好的稳定性。此外,以 cDNA 和 gDNA 为模板扩增 hsa_circ_0001479 和 ZNF131,琼脂糖凝胶电泳结果显示,ZNF131 可以在 cDNA 和 gDNA 中被扩增,而 hsa_circ_0001479 只能在 cDNA 中被扩增(图 3D)。以上实验证明了 hsa_circ_0001479 为结构稳定的闭环环状 RNA。

2.3 Hsa_circ_0001479 在胃癌组织中的表达及其与临床病理参数的关系

RT-qPCR 结果显示,hsa_circ_0001479 在胃癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织(*P* < 0.000 1,图 4)。结合患者的病理资料,分析 hsa_circ_0001479 表达水平与各临床病理参数之间的关系, χ^2 检验分析结果显示,hsa_circ_0001479 表达水平与肿瘤大小(*P*=0.039)、浸润深度(*P*=0.044)、淋巴结转移(*P*=0.011)、TNM 分期(*P*=0.021)和 CA19-9(*P*=0.042)有关(表 2);以上结果提示胃癌组织中高表达



A: 荧光定量 PCR 熔解曲线; B: 荧光定量 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图; C: hsa_circ_0001479 PCR 产物测序图, 测序结果的反向互补序列与 Circbase 数据库提供的 hsa_circ_0001479 分子序列一致。

图1 RT-qPCR检测 hsa_circ_0001479 和 18 s rRNA 的正确度评价

Figure 1 Accuracy evaluation for detection of hsa_circ_0001479 and 18 s rRNA via RT-qPCR

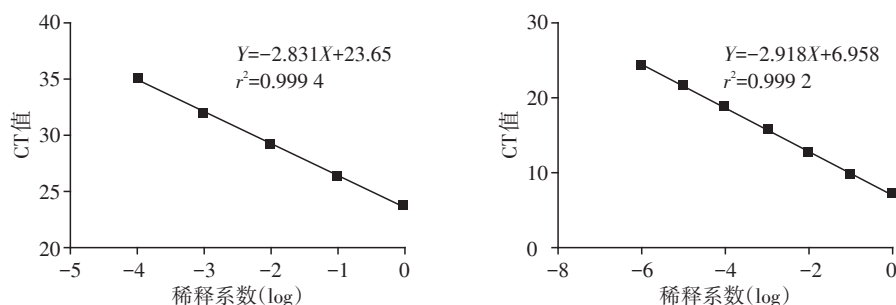
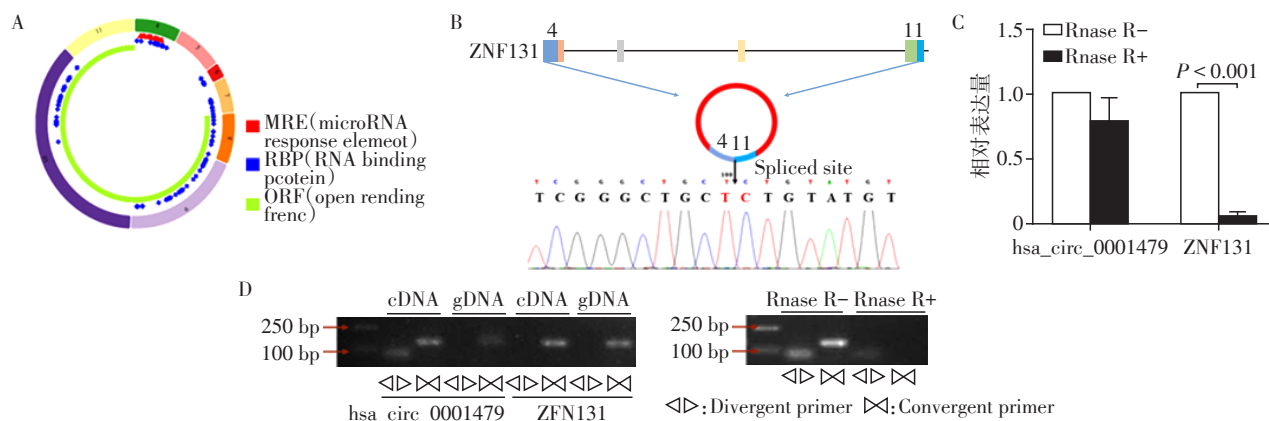


图2 RT-qPCR检测 hsa_circ_0001479(A)和 18 s rRNA(B)的线性范围评价

Figure 2 Linear range evaluation for detection of hsa_circ_0001479(A) and 18 s rRNA(B) via RT-qPCR



A: CSDC 数据库下载的 hsa_circ_0001479 结构图; B: hsa_circ_0001479 环化位点及其所对应的测序结果; C: Rnase R 实验验证 hsa_circ_0001479 稳定性; D: 琼脂糖凝胶电泳显示 hsa_circ_0001479 仅可在 cDNA 中被扩增。

图3 Hsa_circ_0001479 的成环性和稳定性验证

Figure 3 Ring structure and stability of hsa_circ_0001479

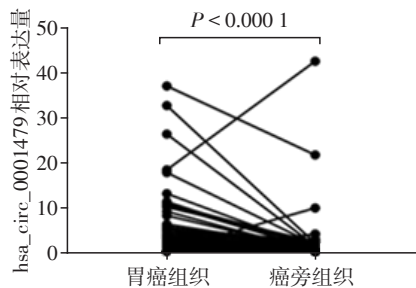


图4 hsa_circ_0001479在胃癌及癌旁组织的表达水平
Figure 4 Level of hsa_circ_0001479 in 76 GC and paired paracancerous tissues

表2 Hsa_circ_0001479表达水平与临床病理参数的关系
Table 2 Relationship between hsa_circ_0001479 expression and clinicopathological factors

临床病理参数	例数	hsa_circ_0001479 表达水平		P 值
		高水平组 (n=38)	低水平组 (n=38)	
性别				0.427
男	57	27	30	
女	19	11	8	
年龄				0.442
<60	21	12	9	
≥60	55	26	29	
肿瘤大小(cm)				0.039
<4	39	15	24	
≥4	37	23	14	
分化程度				0.238
高/中分化	29	12	17	
低分化	47	26	21	
浸润深度				0.044
T1+T2	15	4	11	
T3+T4	61	34	27	
淋巴结转移				0.011
Yes	54	32	22	
No	22	6	16	
TNM分期				0.021
I ~ II A	21	6	15	
II B~III C	55	32	23	
CEA(ng/mL)				0.387
≤5.0	61	29	32	
>5.0	15	9	6	
CA19-9(U/mL)				0.042
≤37.0	66	30	36	
>37.0	10	8	2	

hsa_circ_0001479可能参与胃癌的恶性进展。
2.4 Hsa_circ_0001479在胃癌细胞株中的表达、定位及转染效率检测

RT-qPCR 结果显示,与 GES-1 相比,hsa_circ_

0001479在4株胃癌细胞株中的表达增高,其中,在MKN-45、BGC-823细胞株中表达增高较为显著($P < 0.05$)。选用MKN-45细胞株进行核浆分离操作,通过RT-qPCR检测发现hsa_circ_0001479主要定位于细胞质中(图5)。选取表达较高的MKN-45、BGC-823进行干扰实验,表达较低且细胞大小适中的SGC-7901进行过表达实验。

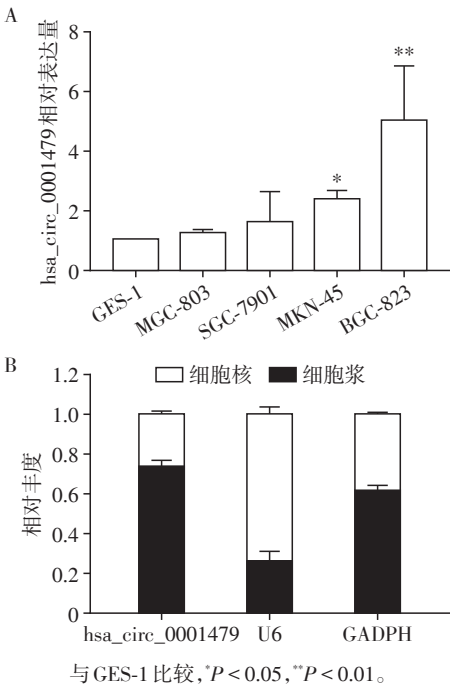
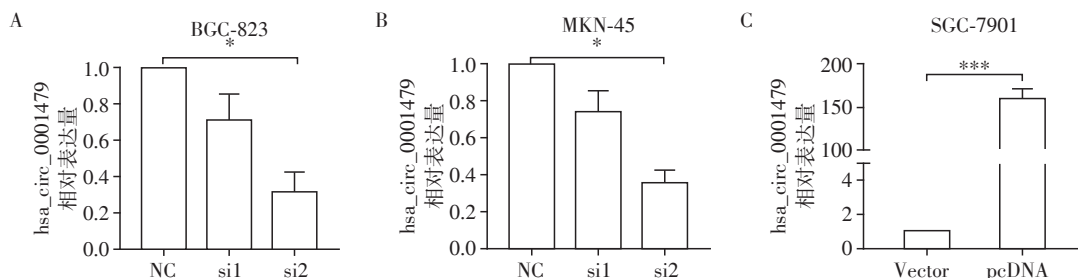


图5 胃癌细胞株 hsa_circ_0001479 表达水平(A)及核浆分布情况(B)
Figure 5 Level of hsa_circ_0001479 in GC cell lines (A) and distribution of hsa_circ_0001479 in GC cells (B)

在转染干扰片段 si1 和 si2 后检测 hsa_circ_0001479 表达水平发现,si2 片段干扰效率达 60% 以上,而 si1 片段几乎无干扰效果,选 si2 片段进行后续实验(图 6A,B)。转染 pcDNA hsa_circ_0001479 后,胃癌细胞株中 hsa_circ_0001479 表达量显著增高(图 6C)。

2.5 Hsa_circ_0001479 对胃癌细胞生物学行为的影响

CCK-8 实验结果显示,与对照组相比,转染 hsa_circ_0001479 干扰片段的胃癌细胞增殖能力减弱(图 7A,B),转染 hsa_circ_0001479 过表达载体的胃癌细胞增殖能力显著增加(图 7C);克隆形成实验结果显示,与对照组相比,转染 hsa_circ_0001479 干扰片段的胃癌细胞克隆斑数量明显减少(BGC-823:



A、B:转染干扰片段后 hsa_circ_0001479 在 BGC-823(A)和 MKN-45(B)细胞株中的表达;C:转染过表达载体后 hsa_circ_0001479 在 SGC-7901 细胞株中的表达。两组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。

图6 RT-qPCR检测转染后 hsa_circ_0001479 的表达水平

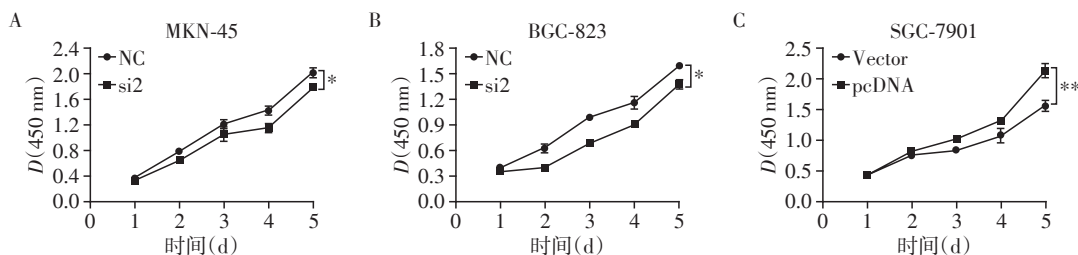
Figure 6 Expression of hsa_circ_0001479 in GC cells after transfection

$P=0.017$, MKN-45: $P=0.027$, 图 8A), 转染 hsa_circ_0001479 过表达载体的胃癌细胞克隆斑数量明显增加($P=0.038$, 图 8B), 以上实验结果表明 hsa_circ_0001479 可促进胃癌细胞增殖。

流式细胞仪检测细胞周期结果显示,与对照组相比,转染 hsa_circ_0001479 干扰片段的胃癌细胞 S 期所占比例下降,细胞周期阻滞于 G1 期(图 9A),转

染 hsa_circ_0001479 过表达载体的胃癌细胞 S 期所占比例上升(图 9B),说明 hsa_circ_0001479 具有加速细胞 DNA 的复制,促进胃癌细胞由 G1 期向 S 期转变,从而增强细胞增殖能力的作用。

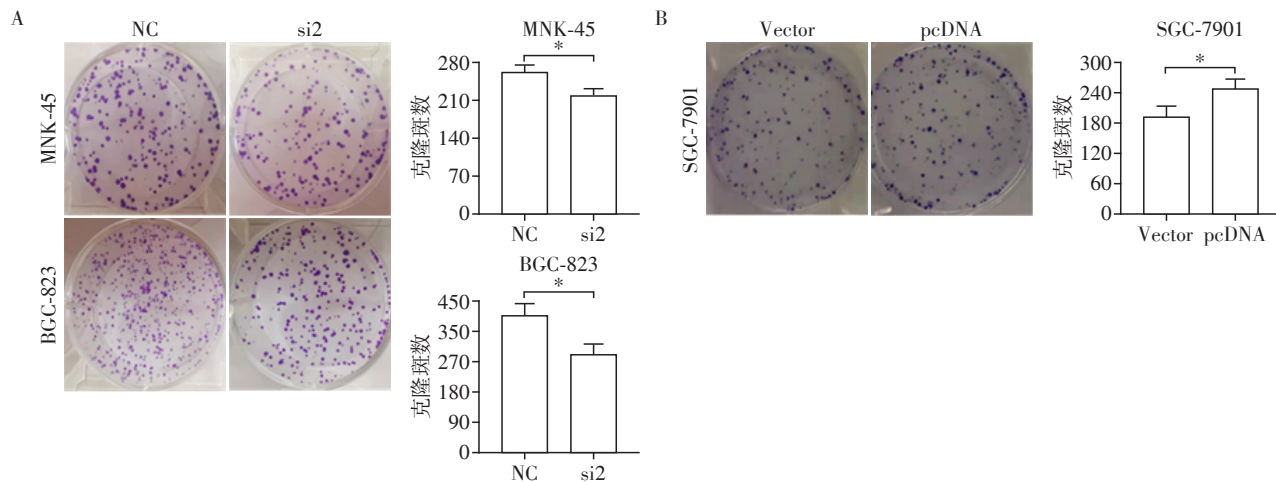
划痕实验结果显示,与对照组相比,转染 hsa_circ_0001479 干扰片段的胃癌细胞横向迁移距离减少(图 10A),转染 hsa_circ_0001479 过表达载体



A、B:干扰 MKN-45(A)和 BGC-823(B)细胞株中 hsa_circ_0001479 表达对胃癌细胞增殖能力的影响;C:在 SGC-7901 细胞株中过表达 hsa_circ_0001479 对胃癌细胞增殖能力的影响。两组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。

图7 CCK-8法检测 hsa_circ_0001479 对胃癌细胞增殖能力的影响

Figure 7 Detection of the effect of hsa_circ_0001479 on the proliferation of GC cells via CCK-8 assay



A:干扰 MKN-45 和 BGC-823 细胞株中 hsa_circ_0001479 表达对胃癌细胞克隆形成能力的影响;B:在 SGC-7901 细胞株中过表达 hsa_circ_0001479 后对胃癌细胞克隆形成能力的影响。两组比较,* $P < 0.05$ 。

图8 克隆形成实验检测 hsa_circ_0001479 的对胃癌细胞增殖能力的影响

Figure 8 The evaluation of the function of hsa_circ_0001479 on proliferation of GC cells via colony formation assay

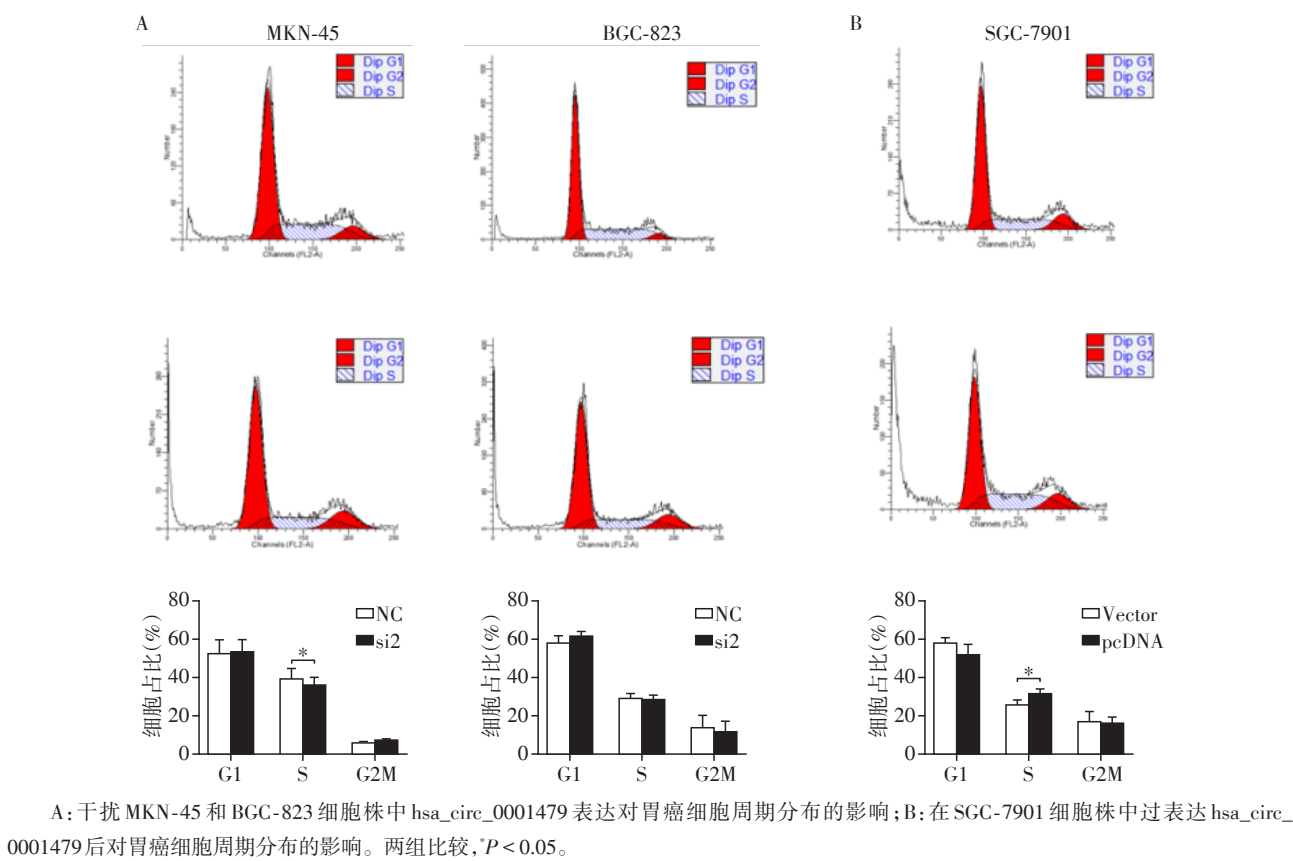
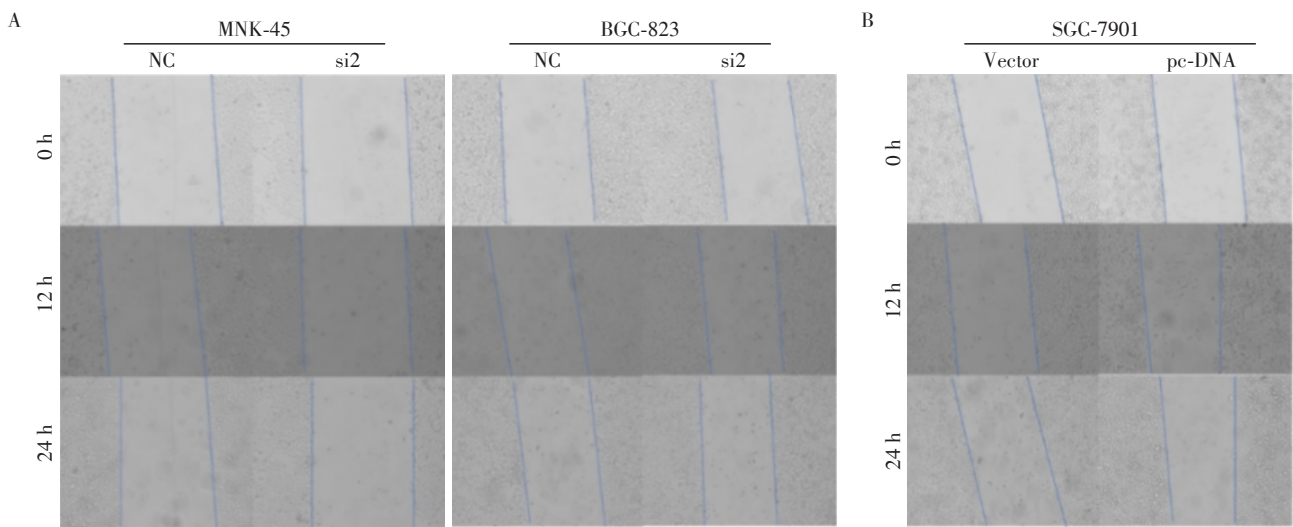


图9 流式细胞仪检测 hsa_circ_0001479 对胃癌细胞周期分布的影响

Figure 9 The dection of the function of hsa_circ_0001479 on cell cycle distribution via flow cytometry analysis

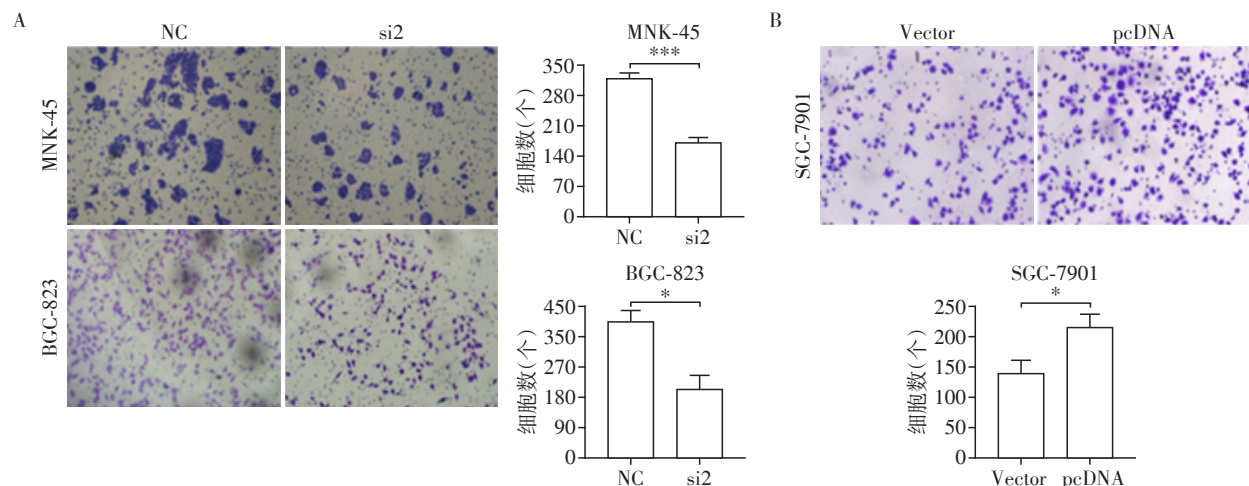


A: 干扰 MKN-45 和 BGC-823 细胞株中 hsa_circ_0001479 表达对胃癌细胞侧向迁移能力的影响; B: 在 SGC-7901 细胞株中过表达 hsa_circ_0001479 对胃癌细胞侧向迁移能力的影响。

图10 划痕法检测 hsa_circ_0001479 对胃癌细胞迁移能力的影响(×100)

Figure 10 The evalution of the function of hsa_circ_0001479 on migration ability of GC cells via wound healing assay (×100)

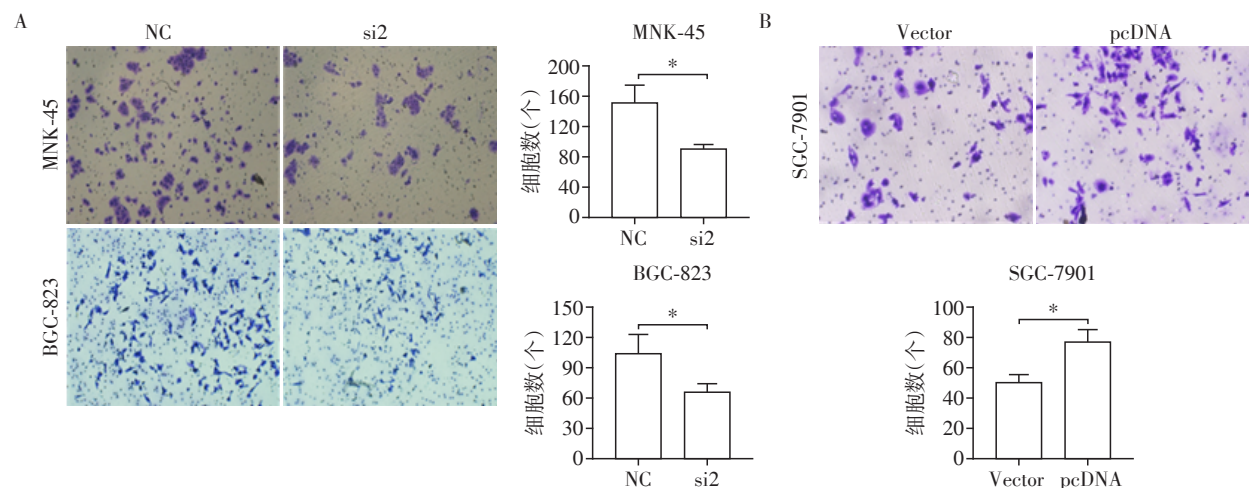
的胃癌细胞横向迁移距离增加(图 10B), Transwell 实验结果显示, 与对照组相比, 转染 hsa_circ_0001479 干扰片段的胃癌细胞迁移和侵袭能力下降(图 11A、12A), 转染 hsa_circ_0001479 过表达载体的胃癌细胞迁移和侵袭能力增强(图 11B、图 12B), 以上实验结果表明 hsa_circ_0001479 可促进胃癌细



A: 干扰 MKN-45 和 BGC-823 细胞株中 hsa_circ_0001479 表达后对胃癌细胞迁移能力的影响; B: 在 SGC-7901 细胞株中过表达 hsa_circ_0001479 后对胃癌细胞迁移能力的影响。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 11 Transwell 法检测 hsa_circ_0001479 对胃癌细胞迁移能力的影响($\times 100$)

Figure 11 The evaluation of the function of hsa_circ_0001479 on migration ability of GC cells via Transwell assay ($\times 100$)



A: 干扰 MKN-45 和 BGC-823 细胞株中 hsa_circ_0001479 表达后对胃癌细胞侵袭能力的影响; B: 在 SGC-7901 细胞株中过表达 hsa_circ_0001479 后对胃癌细胞侵袭能力的影响。两组比较, * $P < 0.05$ 。

图 12 Transwell 法检测 hsa_circ_0001479 对胃癌细胞侵袭能力的影响($\times 100$)

Figure 12 The evaluation of the function of hsa_circ_0001479 on invasion ability of GC cells via Transwell assay ($\times 100$)

胞的迁移和侵袭。

综上, hsa_circ_0001479 具有促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的功能。

3 讨论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,也是死亡率较高的癌症之一^[1]。研究发现,细胞内遗传物质的改变通过细胞周期、DNA 修复、细胞与基质、凋亡、免疫等多个途径促进了肿瘤的发生发展^[9]。CircRNA 是一种特殊的非编码 RNA,由 mRNA 前体反向剪接而成,曾被认为是由错误剪接形成的副产物,而近

年的研究陆续发现它们在疾病的病理过程起到了非常重要的作用^[10,11]。在胃癌中,一些表达异常的 circRNA 已被证明对胃癌细胞的增殖、侵袭、迁移、周期及凋亡等生物学行为具有一定影响。例如,在最新的一项研究中, circVAPA 在胃癌组织中表达上调,在胃癌细胞株中敲减 circVAPA 使细胞增殖、侵袭和迁移能力减弱并促进细胞的凋亡^[12]。在另一项研究中, hsa_circ_0009172 在胃癌组织和细胞系中表达下调,在细胞实验中,过表达 hsa_circ_0009172 可抑制胃癌细胞的增殖、侵袭、迁移能力以及上皮-间质转化过程^[13]。

虽然目前研究者们对 circRNA 的研究已取得了一定进展,但对于 circRNA 在胃癌中的研究仍处于初步阶段,大量表达异常和功能未知的胃癌相关 circRNA 有待发现。本研究结合文献芯片结果选定了 hsa_circ_0001479 作为目的分子,对 RT-qPCR 检测 hsa_circ_0001479 进行了精密度、正确度以及线性范围评价,并通过 Rnase R 实验验证了其成环性和稳定性后,通过 RT-qPCR 检测了 76 对胃癌及癌旁组织中 hsa_circ_0001479 的表达水平,结果显示, hsa_circ_0001479 在胃癌组织中显著高表达且表达水平与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期及 CA19-9 水平有关。为了进一步探究 hsa_circ_0001479 对胃癌细胞生物学功能的影响,通过 RT-qPCR 测定了 hsa_circ_0001479 在胃癌细胞株 MKN-45、BGC-823、SGC-7901、MGC-803 和胃粘膜上皮细胞株 GES-1 的表达,发现其在 4 株胃癌细胞株中表达量均高于 GES-1,并选择表达丰度较高 MKN-45、BGC-823 进行干扰试验,丰度较低的 SGC-7901 进行过表达试验。通过一系列细胞功能实验发现,敲减 hsa_circ_0001479 后,细胞增殖能力降低、细胞周期阻滞于 G1 期,细胞迁移和侵袭能力降低。过表达 hsa_circ_0001479 则呈现出相反的结果,提示 hsa_circ_0001479 可促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。此外,本研究还通过 RT-qPCR 分别检测了细胞核和细胞浆中 hsa_circ_0001479 的表达,发现该分子主要分布于胞浆中。总结以往文献发现, circRNA 的作用机制和其细胞亚定位有一定关系,如定位于胞质的 circRNA 多含有 miRNA 反应元件(MRE),可能通过与 mRNA 竞争性结合 miRNA,抑制 miRNA 表达从而调节细胞功能^[14]。因此,在后续研究中,将进一步研究 hsa_circ_0001479 促进胃癌恶性进展的分子机制。

综上所述,胃癌组织和细胞中高表达的 hsa_circ_0001479 具有促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力的功能。

【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

[2] THRUMURTHY S G, CHAUDRY M A, CHAU I, et al. Does surgery have a role in managing incurable gastric cancer? [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2015, 12(11):676-682

[3] ABBAS M, FAGGIAN A, SINTALI D N, et al. Current and future biomarkers in gastric cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103:1688-1700

[4] SONG Z, WU Y, YANG J, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer [J]. Tumour Biol, 2017, 39(7):1010428317714626

[5] LIANG X, ZHU J, LI Y, et al. Treatment strategies for metastatic gastric cancer: chemotherapy, palliative surgery or radiotherapy? [J]. Future Oncol, 2020, 16(5):91-102

[6] TANG X, REN H, GUO M, et al. Review on circular RNAs and new insights into their roles in cancer [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2021, 19:910-928

[7] 程 龙, 王 攀. circRNA 的功能及其与胃癌关系的研究进展 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2019, 26(7):892-896

[8] LI T, SHAO Y, FU L, et al. Plasma circular RNA profiling of patients with gastric cancer and their droplet digital RT-PCR detection [J]. J Mol Med (Berl), 2018, 96(1):85-96

[9] FIGUEIREDO C, CAMARGO M C, LEITE M, et al. Pathogenesis of gastric cancer: genetics and molecular classification [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2017, 400:277-304

[10] 夏世金, 高 文, 胡明冬, 等. 环状 RNA 的研究现状及展望 [J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2014, 6:55-58

[11] CHEN X, YANG T, WANG W, et al. Circular RNAs in immune responses and immune diseases [J]. Theranostics, 2019, 9(2):588-607

[12] DENG P, SUN M, ZHAO W Y, et al. Circular RNA circVAPA promotes chemotherapy drug resistance in gastric cancer progression by regulating miR-125b-5p/STAT3 axis [J]. World J Gastroenterol, 2021, 27(6):487-500

[13] WANG H, WANG N, ZHENG X, et al. Circular RNA hsa_circ_0009172 suppresses gastric cancer by regulation of microRNA-485-3p-mediated NTRK3 [J]. Cancer Gene Ther, 2021, 28(12):1312-1324

[14] Belousova E A, Filipenko M L, Kushlinskii N E. Circular RNA: new regulatory molecules [J]. Bull Exp Biol Med, 2018, 164(6):803-815

【收稿日期】 2023-02-16
(本文编辑:唐 震)