

结直肠癌特征性环状 RNA 筛选

邵婧娴¹, 朱利芹¹, 马晶晶², 杜楠¹, 何敬东^{1*}

(¹南京医科大学附属淮安第一医院肿瘤内科,²血液科,江苏 淮安 223300)

[摘要] 目的:检测环状 RNA(circularRNA, circRNA)在结直肠癌组织及对应癌旁组织中的表达谱变化。方法:应用高通量 circRNA 芯片技术筛选 6 例人结直肠癌组织及对应癌旁组织中 circRNA 表达谱差异,经过对原始数据进行预处理、归一化后,筛选出差异常表达的 circRNA,并对其进行聚类分析。结果:结直肠癌组织与癌旁组织之间存在 892 种 circRNA 的差异表达,其中在肿瘤组织中高表达的有 412 条,低表达的有 480 条(变化>2 倍且 $P < 0.05$)。结论:结直肠癌组织与对应癌旁组织比较, circRNA 表达谱发生了显著变化,提示这些差异表达的 circRNA 可能与结直肠癌的发生发展密切相关。

[关键词] 结直肠癌;环状 RNA;环状 RNA 芯片

[中图分类号] R735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1542-05

doi:10.7655/NYDXBNS20151109

Expression profile of circular RNA in colorectal cancer

Shao Jingxian¹, Zhu Liqin¹, Ma Jingjing², Du Nan¹, He Jingdong^{1*}

(¹Department of Oncology, ²Department of Hematology, the First People's Hospital of Huai'an Affiliated to NJMU, Huai'an 223300, China)

[Abstract] Objective: To analyze the expression profile variation of circular RNA (circRNA) between normal colorectal tissues and colorectal cancer (CRC) tissues. **Methods:** Human circRNA microarray was performed to detect the difference of circRNA expression between 6 cases of CRC tissues and 6 cases of normal colorectal tissues. After pretreatment and homogenization of raw data, the circRNAs with differential expression were screened out and then analyzed by hierarchical clustering and scatter volcano diagram. **Results:** Compared with normal colorectal tissues, there were 892 circRNAs differentially expressed which have more than 2 times variation and significant difference ($P < 0.05$). Among them, 412 increased and change's fold more than 2 times, while 480 reduced and change's fold more than 2 times. **Conclusion:** The circRNA expression profile of CRC changed significantly in comparison with the normal colorectal tissues, the different circRNAs may be associated with the development of CRC.

[Key words] colorectal cancer; circular RNA; circRNA microarray

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1542-1546]

结直肠癌是世界上最常见的消化道恶性肿瘤之一,严重威胁到人类的生命和健康,其发病率居常见恶性肿瘤的第 3 位,其病死率也居癌症死亡的第 3 位^[1]。结直肠癌的发生发展是一个多步骤、多阶段以及多基因参与的疾病,其中基因异常表达在结直肠癌发生发展过程中又起着重要作用。研究表明 circRNA 是一类广泛存在于哺乳动物细胞中的内源性 RNA 分子,在转录后水平具有调控基因表达的

作用^[2-3]。circRNA 作为重要的调控因子为进一步阐明结直肠癌的发病机制提供了新的方向。本研究应用高通量 circRNA 芯片技术,筛选出结直肠癌组织与对应癌旁组织中差异表达的 circRNA,为深入探讨 circRNA 在结直肠癌发生发展中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 6 例 2014 年 8—11 月于南京医科大学附属淮安第一医院进行结直肠癌手术患者的切除标本,男 4 例,女 2 例;年龄 23~74 岁,平均年龄 46 岁;

[基金项目] 江苏省卫生厅面上科研项目(H201313)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hjddoctor@yahoo.com.cn

根据 TNM 分期,标本分为 I/II 期 3 例、III/IV 期 3 例;按术后病理分为高分化、中分化、低分化各 2 例。每例标本分别取结直肠原发肿瘤组织、癌旁组织(距肿瘤边缘 ≥ 5 cm)。新鲜标本离体后立即置于含 RNA 保护液的冻存管中,于 -20°C 保存。每位患者经病理检查确诊,无其他肿瘤病史,且术前未接受化疗或放疗。标本采集均已告知患者及其家属,并签署知情同意书,且该过程经本院伦理委员会审核通过。

RNA 提取试剂 TRIzol 及 ds-cDNA 合成试剂盒(Invitrogen 公司,美国),ds-cDNA 标记试剂盒(NimbleGen 公司,美国),核酸外切酶(RNase R, Epicentre 公司,美国),circRNA 芯片的选择、探针设计、图像采集、数据分析等由上海康成生物公司提供,芯片的探针设计为 40 mer 的长寡核苷酸。

1.2 方法

1.2.1 样品总 RNA 提取与检测

按照 TRIzol 试剂盒说明,分别提取 6 例临床结直肠癌组织与对应癌旁组织中的总 RNA,使用 Nanodrop ND-1000 测定 RNA 在分光光度计 260、280、230 nm 的吸光度值,计算浓度并估测纯度。采用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度及完整性。

1.2.2 ds-cDNA 合成、标记与杂交

应用 RNaseR 除去 RNA 质量检测合格样品中的线性 RNA,按照美国 Arraystar 公司的 Super RNA Labeling 标记方法对 RNA 进行 cDNA 扩增和荧光标记。标记后的样品,使用 Nanodrop ND-1000 检测荧光标记效率。将标记后的样品于美国 Agilent 公司提供的杂交系统进行排列杂交,然后用 Agilent 清洗液试剂盒进行清洗。

1.2.3 芯片数据分析

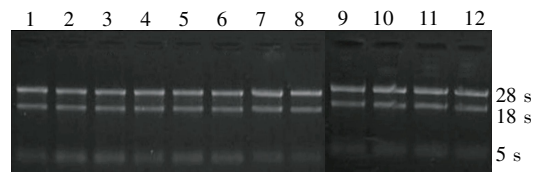
利用 Axon 基因芯片 4000B 芯片扫描仪扫描各标本 Cy3 荧光强度,然后将图像输入 Axon GenePix Pro 6.0 Software 进行网格对齐与表达数据分析。采用 R 软件包对数据进行归一化处理。两组样本间差异表达的 circRNA 通过变化倍数和 P 值进行筛选,取变化倍数 > 2 倍, t 检验以 P 值 < 0.05 作为阳性结果。根据芯片筛选出的差异表达的 circRNA 绘制散点图和火山图,并对所得数据进行监督性层次聚类分析。每条 circRNA 均用美国 Arraystar 公司的 miRNA 结合位点预测软件预测有 5 个高匹配值的 miRNA 结合位点。

2 结果

2.1 总 RNA 的质量与纯度

分光光度计结果显示,6 组标本中提取的

RNA 的 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 比值均在 1.8~2.0 之间, $D(260\text{ nm})/D(230\text{ nm})$ 均 > 1.8 。琼脂糖凝胶电泳(图 1)显示总 RNA 的 28 s、18 s 条带清晰,且 28 s 条带亮度是 18 s 的 2 倍以上,5 s 条带模糊。这些结果表明所得 RNA 的质量与纯度可靠,可用于进一步实验分析。



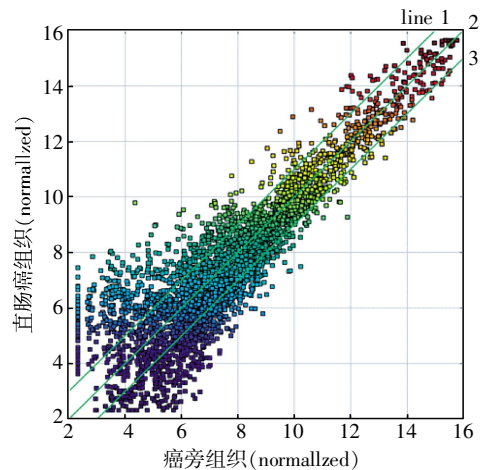
1~6:结直肠癌肿瘤组织;7~12:癌旁组织。

图 1 组织样本的总 RNA 电泳图

Figure 1 RNA integrity test by denaturing agarose gel electrophoresis

2.2 利用散点图和火山图分析表达谱变化

根据芯片筛选出差异常表达的 circRNA 绘制散点图和火山图。如图 2 所示,分布于线 1(line 1)上方和线 3(line 3)下方的 circRNA 差异倍数达 2 倍以上,且有统计学意义($P < 0.05$)。如图 3 所示,红色区域代表的 circRNA 差异倍数达 2 倍以上,且有统计学意义($P < 0.05$)。



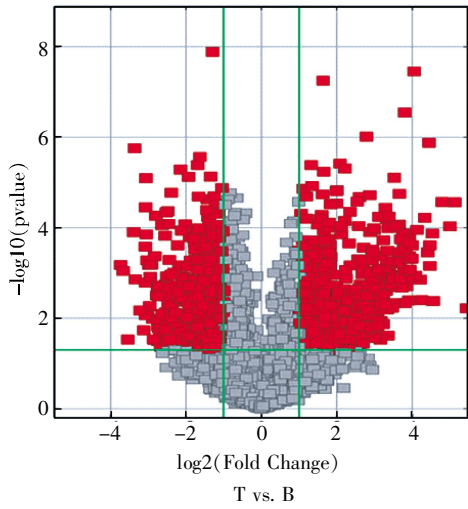
线 1(line 1)上方和线 3(line 3)下方散点代表的 circRNA 差异倍数达 2 倍以上且 $P < 0.05$ 。

图 2 结直肠癌组织与癌旁组织差异表达的 circRNA 绘制的散点图

Figure 2 Scatter plot for visualizing the circRNA between the CRC tissues and normal colorectal tissues

2.3 监督性层次聚类分析

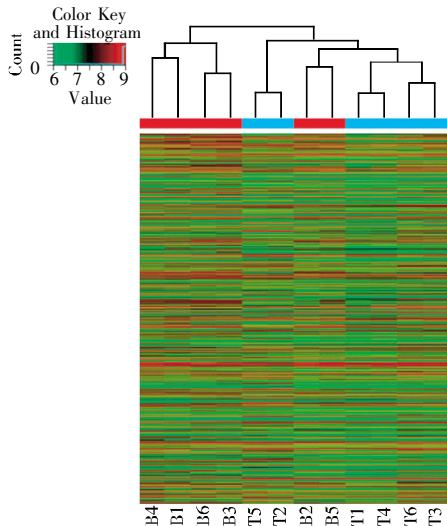
依据 circRNA 表达水平不同,将所检测的 circRNA 和各组标本进行监督性分层聚类分析(图 4),红色代表表达量相对高,绿色代表表达量相对低。结果显示差异表达的 circRNA 能正确区分结直肠癌肿瘤组织与癌旁组织。



红色区域代表的 circRNA 差异倍数达 2 倍以上且 $P < 0.05$ 。

图 3 结直肠癌组织(T)与癌旁组织(B)差异表达的circRNA 绘制的火山图

Figure 3 Volcano plot for visualizing the circRNA between the CRC tissues and normal colorectal tissues



T1~T6: 结直肠癌组织, B1~B6: 癌旁组织。

图 4 6 例结直肠癌组织(T)与对应癌旁组织(B)差异表达的 circRNA 微阵列芯片检测

Figure 4 Differentially expressed circRNA between 6 cases of CRC tissues and 6 cases of normal colorectal tissues were analyzed using hierarchical clustering

2.4 circRNA 在结直肠癌组织和癌旁组织中的差异表达

比较肿瘤组织及癌旁组织中的 circRNA 表达水平,筛选出差异表达至 2 倍以上且具有统计学意义的 circRNA 共 892 条,其中肿瘤组织相对癌旁组织高表达的有 412 条,表达差异达 10 倍以上的 40 条;低表达的有 480 条,表达差异达 10 倍以上的有 6 条(表 1,2)。每条 circRNA 均预测有 5 个 miRNA 的结合位点(表 3)。

3 讨论

circRNA 是一种头对尾剪接的环形闭合结构的 RNA 分子。早在 20 世纪 70 年代,人们就在 RNA 病毒中发现了 circRNA^[4-5],然而来源于其他生物体的

表 1 肿瘤组织相对癌旁组织升高表达差异 10 倍以上的 circRNA

Table 1 Differentially upregulating expressed circRNAs with fold change >10

编号	circRNA 名	差异倍数	circRNA 类型	染色体定位
1	hsa_circ_0000072	43.4572990	exonic	chr1
2	hsa_circ_0008812	32.0813360	exonic	chr9
3	hsa_circ_0085923	23.5020249	exonic	chr8
4	hsa_circ_0020397	20.1137180	exonic	chr10
5	hsa_circ_0001461	18.9844074	exonic	chr4
6	hsa_circ_0000073	18.4512950	exonic	chr1
7	hsa_circ_0050516	17.3715970	exonic	chr19
8	hsa_circ_0058048	16.9457442	exonic	chr2
9	hsa_circ_0006590	16.5579523	exonic	chr19
10	hsa_circ_0067434	15.9603581	exonic	chr3
11	hsa_circ_0007905	15.8361048	exonic	chr1
12	hsa_circ_0061891	15.3249578	exonic	chr21
13	hsa_circ_0006415	15.2619755	exonic	chr1
14	hsa_circ_0005533	15.0766980	exonic	chr2
15	hsa_circ_0003598	14.9808095	exonic	chr15
16	hsa_circ_0001746	14.8832907	exonic	chr7
17	hsa_circ_0003079	14.3599790	exonic	chr19
18	hsa_circ_0006420	14.1044214	exonic	chr12
19	hsa_circ_0002151	13.9124923	exonic	chr15
20	hsa_circ_0087531	13.9027694	exonic	chr9
21	hsa_circ_0000592	13.7545928	exonic	chr15
22	hsa_circ_0003511	13.5194952	exonic	chr7
23	hsa_circ_0006987	13.3279056	exonic	chr19
24	hsa_circ_0002500	13.1904200	exonic	chr16
25	hsa_circ_0000997	13.1131348	exonic	chr2
26	hsa_circ_0050518	12.9407265	exonic	chr19
27	hsa_circ_0070039	12.6509149	exonic	chr4
28	hsa_circ_0003557	12.5413683	exonic	chr11
29	hsa_circ_0004964	12.6273117	exonic	chr2
30	hsa_circ_0004592	12.3869369	exonic	chr8
31	hsa_circ_0084615	12.3436296	exonic	chr8
32	hsa_circ_0002451	11.7762166	exonic	chr7
33	hsa_circ_0001771	11.6994025	exonic	chr7
34	hsa_circ_0001747	11.4557071	exonic	chr7
35	hsa_circ_0002157	11.2363811	exonic	chr8
36	hsa_circ_0005036	11.0677101	exonic	chr15
37	hsa_circ_0005379	10.8774248	exonic	chr10
38	hsa_circ_0054404	10.5861640	exonic	chr2
39	hsa_circ_0000290	10.2166478	exonic	chr13
40	hsa_circ_0052858	10.0766778	exonic	chr2

表 2 肿瘤组织相对癌旁组织降低表达差异 10 倍以上的 circRNA

Table 2 Differentially downregulating expressed circRNAs with fold change >10

编号	circRNA 名	差异倍数	circRNA 类型	染色体定位
1	hsa_circ_0072279	13.3423300	exonic	chr5
2	hsa_circ_0001704	12.7785132	intragenic	chr7
3	hsa_circ_0035626	11.6798310	exonic	chr15
4	hsa_circ_0001525	10.4992623	intronic	chr5
5	hsa_circ_0005904	10.3297310	exonic	chr2
6	hsa_circ_0008367	10.1830790	exonic	chr 9

表 3 差异表达的 circRNA 的 miRNA 结合位点

Table 3 miRNA interactions of circRNAs differentially expressed

circRNA	表达	miRNA 结合位点
hsa_circ_0000072	上调	miR-136-5p、miR-606、miR-145-5p、miR-153-5p、miR-302d-5p
hsa_circ_0000073	上调	miR-606、miR-145-5p、miR-153-5p、miR-302d-5p、miR-302b-5p
hsa_circ_0020397	上调	miR-132-3p、miR-196a-5p、miR-138-2-3p、miR-136-5p、miR-103a-2-5p
hsa_circ_0058049	上调	miR-302d-5p、miR-515-3p、miR-573、miR-302b-5p、miR-302c-5p、
hsa_circ_0002968	上调	miR-205-3p、miR-433-3p、miR-153-5p、miR-556-5p、miR-30e-5p
.....		
hsa_circ_0087305	下调	miR-892b、miR-762、miR-214-5p、miR-30b-3p、miR-29b-1-5p
hsa_circ_0001601	下调	let-7f-5p、miR-218-1-3p、let-7g-5p、let-7a-5p、miR-29b-1-5p
hsa_circ_0054248	下调	miR-511-5p、miR-452-3p、miR-130b-5p、miR-142-5p、miR-29a-5p
hsa_circ_0041148	下调	miR-22-3p、miR-671-3p、miR-519e-5p、miR-515-5p、miR-877-3p
hsa_circ_0030062	下调	miR-301a-3p、miR-520f-3p、miR-148a-5p、miR-520c-3p、miR-520b
.....		

更稳定,不易被核酸外切酶 RNase R 降解,大部分是非编码 RNA^[3,8]。有些 circRNA 具有微小 RNA (microRNA, miRNA) 应答元件,能与 miRNA 相互作用,从而调控靶基因的表达^[8-9]。多年来,人们对人类基因组的关注主要集中在编码蛋白的基因和蛋白本身。基因组学的研究揭示出人类和其他高级真核生物的遗传物质只有极少一部分编码蛋白质,超过 98% 的遗传物质不编码蛋白质,但会转录成非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)^[10]。近年来,大量研究表明非编码 RNA 在表观遗传学、转录调控及转录后调控中扮演了重要角色,能在基因组水平及染色体水平对基因表达进行调控^[11]。circRNA 作为一类特殊的非编码 RNA 分子,通过与疾病关联的 miRNA 相互作用,参与疾病的发生发展。

2011 年 Hansen 等^[9]发现小脑变性相关蛋白 1 (cerebellar degeneration-related protein1, CDR1) 基因的环状天然反义转录物 (natural antisense transcript, NAT) 小脑变性相关蛋白 1 反义转录物 (antisense to the cerebellar degeneration-related protein1 transcript, CDR1as) 含有大约 70 个 miR-7 的应答原件。2013 年 Memczak 等^[3]发现当 CDR1as 高表达时,它

circRNA 尚无报道。1979 年,研究者第一次在显微镜下观察到一些 RNA 以环状的形式存在于真核细胞中^[6]。1993 年研究者又在人体细胞中发现了 circ RNA^[7]。早期,由于技术等方面的限制,关于 circRNA 的研究报道很少,在很长一段时间内并未引起学术界的重视。随着测序技术和生物信息学技术的飞速发展, circRNA 的神秘面纱才被逐渐揭开,并作为一个崭新领域,成为国际生命科学研究的前沿与热点。最近几项有关 circRNA 的突破性研究发现, circRNA 通常由 1 个以上外显子构成,没有 3' 和 5' 端,比线性 RNA

能大量结合 miR-7,从而抑制 miR-7 的活性,导致 miR-7 靶基因的表达水平升高;当 CDR1as 低表达时,miR-7 靶基因的表达水平也相应降低。同时在斑马鱼中表达人的 CDR1as 会破坏中脑发育,与 miR-7 的缺失相似。这些研究结果表明 CDR1as 是 miR-7 的环状抑制剂,对 miR-7 起到负调控作用,发挥了天然 miRNA 海绵的作用。另有研究发现^[12-13],Y 染色体性别决定区基因外显子的反向重复序列可被转录成 circRNA 分子,具有与 CDR1as 类似的功能,可结合 miR-138,从而抑制 miR-138 的活性,影响 miR-138 靶基因的表达水平。综上所述,有些 circ RNA 可与 miRNA 结合,降低 miRNA 的活性,从而在 miRNA 调控的疾病中发挥重要作用。

许多 miRNA 在结直肠癌的发病机制中发挥重要作用。例如,miR-34 在结直肠癌组织中表达水平下降,其下游基因广泛参与细胞周期调节、细胞增殖、转移、凋亡、DNA 修复及血管生成等^[14-15];miR-145 作为一种肿瘤抑制因子已被证实能够靶向结合 IRS-1 的 3'UTR 并显著抑制结直肠癌细胞的生长^[16]。本研究芯片对筛选出的每条差异表达 circRNA 均预测有 5 个 miRNA 的结合位点,那么这些 circRNA 是否也

是通过结合相关 miRNA 从而影响结直肠癌的发生发展有待进一步研究。

越来越多的研究发现 circRNA 参与一些疾病的发展,如动脉粥样硬化、神经系统紊乱等^[17-18]。但是 circRNA 是否在肿瘤中行使生物学功能还知之甚少。Li 等^[19]发现 hsa_circ_002059 (ID:hsa_circ_0000140 in CircBase)在胃癌组织中表达水平下调。患者术前血浆与术后血浆相比 hsa_circ_002059 也发生了显著变化。这与患者的临床 TNM 分期和远处转移等密切相关,可作为胃癌诊断的一种潜在的新型分子标志物。

本研究借助 Arraystar 公司的 circRNA 芯片筛选出结直肠癌组织与对应癌旁组织表达谱变化。结果表明,差异表达的 circRNA (变化>2 倍且 $P < 0.05$)共有 892 条,肿瘤组织相对癌旁组织高表达的 circRNA 有 412 条,低表达的有 480 条,其中升高差异 10 倍以上的 40 条,降低差异 10 倍以上的有 6 条。初步分析有 20 条 circRNA 具有 miR-34 的潜在位点,有 15 条 circRNA 具有 miR-145 的潜在位点。其中,hsa_circ_0000072 在癌组织(相对于癌旁组织)中上调倍数(43.46)最为显著,它是一种外显子形成的环状 RNA,通过生物信息学分析,本文推测 hsa_circRNA_0000072 可能通过影响 miR-145 的活性,从而调控靶基因的表达,在结直肠癌的发生发展过程中发挥重要作用。截至目前,尚无 circRNA 与结直肠癌的相关研究报道。深入探讨参与结直肠癌发生发展过程的 circRNA 及其作用机制,可能对结直肠癌的早期诊断、靶向治疗以及预后判断等具有重要意义。今后,将从前期工作基础上挑选出部分 circRNA 进一步研究,为结直肠癌的诊治提供新思路。

[参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29
- [2] Salzman J, Gawad C, Wang PL, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733
- [3] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338
- [4] Wilusz JE, Sharp PA. Molecular biology. A circuitous route to noncoding RNA [J]. *Science*, 2013, 340(6131): 440-441
- [5] Wu Q, Wang Y, Cao M, et al. Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(10): 3938-3943
- [6] Hsu MT, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells [J]. *Nature*, 1979, 280(5720): 339-340
- [7] Cocquerelle C, Mascrez B, Hetuin D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules [J]. *FASEB J*, 1993, 7(1): 155-160
- [8] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. *RNA*, 2013, 19(2): 141-157
- [9] Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA [J]. *EMBO J*, 2011, 30(21): 4414-4422
- [10] Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project [J]. *Nature*, 2007, 447(7146): 799-816
- [11] Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs [J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 339-346
- [12] Jeske YW, Bowles J, Greenfield A, et al. Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge [J]. *Nat Genet*, 1995, 10(4): 480-482
- [13] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-388
- [14] Misso G, Di MMT, De Rosa G, et al. Mir-34: a new weapon against cancer? [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e194
- [15] Gao J, Li N, Dong Y, et al. miR-34a-5p suppresses colorectal cancer metastasis and predicts recurrence in patients with stage II/III colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 34(31): 4142-4152
- [16] Su J, Liang H, Yao W, et al. MiR-143 and MiR-145 regulate IGF1R to suppress cell proliferation in colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114420
- [17] Burd CE, Jeck WR, Liu Y, et al. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(12): e1001233
- [18] Chen YT, Rettig WJ, Yenamandra AK, et al. Cerebellar degeneration-related antigen: a highly conserved neuroectodermal marker mapped to chromosomes X in human and mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(8): 3077-3081
- [19] Li P, Chen S, Chen H, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 132-136