

CircRNA-100395 基因通过启动子区甲基化调控 miRNA-136-5p/Smad3 轴促进前列腺癌细胞增殖及侵袭的机制研究

张士保¹, 朱斐煜¹, 谢瑞玉², 尚宪平²

(1. 来安家宁医院检验科, 安徽滁州 239200; 2. 滁州市第一人民医院检验科, 安徽滁州 239200)

摘要: 目的 检测前列腺癌细胞中环状核糖核酸 (circular RNAs, CircRNA) 100395 基因启动子区甲基化状态及其表达水平, 研究 CircRNA-100395 基因去甲基化对前列腺癌细胞增殖、侵袭的影响及作用机制。方法 选择人正常前列腺上皮细胞 (RWPE) 和前列腺癌细胞系 (LNCap, PC3 和 DU145) 进行研究。采用甲基化特异性聚合酶链式反应 (methylation specific polymerase chain reaction, MSP) 检测 CircRNA-100395 基因启动子区甲基化状态。采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法检测上述细胞中 CircRNA-100395 mRNA 表达水平。应用去甲基药物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (AZA) 处理 LNCap 细胞, 检测 AZA 去甲基化处理后细胞中 CircRNA-100395 表达水平。采用 CCK-8 和 Transwell 实验检测 CircRNA-100395 基因去甲基化前后 LNCap 细胞增殖和侵袭能力。构建 CircRNA-100395 野生型和突变型质粒, 通过双荧光素酶报告分析 CircRNA-100395 与 miRNA-136-5p 之间的靶向关系; 利用 qRT-PCR 检测 CircRNA-100395 与 miRNA-136-5p 表达水平, 验证其调控关系。采用 Western blot 法检测 AZA 去甲基化和 miRNA-136-5p 过表达对 Smad3, p-Smad3 蛋白表达的影响。结果 前列腺癌细胞中 CircRNA-100395 呈高甲基化状态; LNCap, PC3 及 DU145 细胞中 CircRNA-100395 相对表达水平分别为 0.39 ± 0.08 , 0.65 ± 0.14 , 0.62 ± 0.10 , 显著低于 RWPE (1.12 ± 0.15) 细胞中表达水平, 差异有统计学意义 ($F=42.076$, $P < 0.001$)。经 AZA 去甲基化处理后, LNCap 细胞中 CircRNA-100395 表达水平为 1.02 ± 0.17 , 较未处理 LNCap 细胞 (0.42 ± 0.05) 明显升高, 差异有统计学意义 ($t=5.808$, $P < 0.01$)。AZA 去甲基化处理显著抑制了 LNCap 细胞的增殖能力 ($t=8.764 \sim 12.970$, 均 $P < 0.001$)、迁移能力 ($t=6.092$, $P < 0.01$)。miRNA-136-5 可能是 CircRNA-100395 的下游靶基因。未经 AZA 处理前 LNCap 细胞中 CircRNA-100395, miRNA-136-5p 表达水平分别为 0.39 ± 0.08 , 0.87 ± 0.15 , AZA 处理后两者表达水平分别为 1.02 ± 0.17 , 0.35 ± 0.08 , 差异有统计学意义 ($t=5.808$, 5.298 , 均 $P < 0.01$)。AZA 处理后 Smad3 和 p-Smad3 蛋白表达明显升高, 差异有统计学意义 ($t=7.394$, 11.889 , 均 $P < 0.01$); miRNA-136-5p 过表达抑制了 Smad3 和 p-Smad3 蛋白表达, 差异有统计学意义 ($t=4.996$, 5.422 , 均 $P < 0.01$)。结论 CircRNA-100395 基因启动子区的高甲基化状态可以抑制 CircRNA-100395 在前列腺癌细胞中的表达水平, 去甲基化处理后 CircRNA-100395 表达恢复, 并抑制前列腺癌细胞增殖和侵袭, 其作用机制可能与 CircRNA-100395 靶向调控 miRNA-136-5p/Smad3 轴有关。

关键词: 前列腺癌; 环状核糖核酸-100395; 甲基化状态; miRNA-136-5p/Smad3; 细胞增殖; 细胞侵袭

中图分类号: R373.19; R446 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 05-044-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.05.010

Mechanism of CircRNA-100395 Promoter Methylation Promoting Prostate Cancer Cells Proliferation and Invasion by Regulating miRNA-136-5p/Smad3 Axis

ZHANG Shi-bao¹, ZHU Fei-yu¹, XIE Rui-yu², SHANG Xian-ping²

(1. Department of Clinical Laboratory, Lai'anjianing Hospital, Anhui Chuzhou 239200, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chuzhou First People's Hospital, Anhui Chuzhou 239200, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the methylation status and expression level of CircRNA-100395 gene promoter in prostate cancer cells, and explore the effect and mechanism of CircRNA-100395 demethylation on prostate cancer cell proliferation and invasion. **Methods** Human normal prostate epithelial cells (RWPE) and prostate cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) were selected for the study. The methylation status of the promoter region of CircRNA-100395 gene was detected by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP). The mRNA expression level of CircRNA-100395 was detected by qRT-PCR. LNCaP cells were treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine (AZA), a demethylating drug, and the expression level of CircRNA-100395 in cells before and after AZA demethylation was detected. CCK-8 and Transwell experiments were

基金项目: 安徽省科技厅重点研究与开发计划项目 (201904d07020005)。

作者简介: 张士保 (1971-), 男, 大专, 主管检验技师, 研究方向: 微生物检验, 基础分子生物学实验, E-mail: ttrb68625@yeah.net。

通讯作者: 谢瑞玉 (1965-), 男, 本科, 主任技师, 研究方向: 临床免疫学, E-mail: cz2ylab@163.com。

used to detect the proliferation and invasion of LNCaP cells before and after demethylation of CircRNA-100395 gene. The wild-type and mutant plasmids of circRNA-100395 were constructed, the targeting relationship between CircRNA-10039 and miRNA-136-5p was analyzed by dual-luciferase reporter, and qRT-PCR was used to further confirm the relationship between CircRNA-10039 and miRNA-136-5p. The effects of AZA demethylation and miRNA-136-5p overexpression on the expression of Smad3 and p-smad3 proteins were detected by Western blot. **Results** CircRNA-100395 was hypermethylated in prostate cancer cells, the difference was statistically significant. The relative expression levels of CircRNA-100395 in LNCaP, PC3 and DU145 cells were 0.39 ± 0.08 , 0.65 ± 0.14 and 0.62 ± 0.10 , respectively, which were significantly lower than those in rwpe (1.12 ± 0.15) cells, the difference was statistically significant ($F=42.076$, $P<0.001$). After AZA demethylation, the expression level of CircRNA-100395 in LNCaP cells was (1.02 ± 0.17), which was significantly higher than that in untreated LNCaP cells (0.42 ± 0.05), the difference was statistically significant ($t=5.808$, $P<0.01$). AZA demethylation significantly inhibited the proliferation ($t=8.764\sim 12.970$, all $P<0.001$) and migration ($t=6.092$, $P<0.01$) of LNCaP cells. MiRNA-136-5 may be the downstream target gene of CircRNA-100395. The expression levels of CircRNA-100395 and miRNA-136-5p in LNCaP cells before AZA treatment were 0.39 ± 0.08 and 0.87 ± 0.15 , respectively. After AZA treatment, the expression levels of the two were 1.02 ± 0.17 and 0.35 ± 0.08 , respectively, with statistical significance ($t=5.808$, 5.298 , all $P<0.01$). The expression of Smad3 and p-smad3 protein increased significantly after aza treatment ($t=7.394$, 11.889 , all $P<0.01$). The overexpression of miRNA-136-5p inhibited the expression of Smad3 and p-smad3 proteins, and the difference was statistically significant ($t=4.996$, 5.422 , all $P<0.01$). **Conclusion** The abnormal hypermethylation state of the promoter region of CircRNA-100395 gene could inhibit the expression level of CircRNA-100395 in prostate cancer cells. After demethylation, it could restore the expression of CircRNA-100395 and inhibit the proliferation and invasion of prostate cancer cells. The mechanism may be related to the targeted regulation of miRNA-136-5p/Smad3 axis by circRNA-100395.

Keywords: prostate cancer; circrna-100395; methylation status; miRNA-136-5p/Smad3; cell proliferation; cell invasion

近年,我国前列腺癌 (prostate cancer) 发病率呈逐年上升趋势,目前已成为泌尿科最常见的恶性肿瘤之一^[1-2]。尽管通过手术及术后辅助放疗等使得前列腺癌的临床治疗效果取得了较大的突破,但大多患者术后五年生存率仍较低,总体预后较差^[3]。故深入研究前列腺癌发生机制,找寻新的有效的分子标志物,对前列腺癌的临床诊治具有指导意义。环状核糖核酸 (circular RNAs, CircRNAs) 是一类具有高癌症特异性表达的非编码 RNA, 目前已成为肿瘤研究领域的热点^[4]。CircRNA-100395 是位于 chr1:173726114~17374498 的一种 CircRNA, 由宿主基因 KLHL20 mRNA 中的四个外显子拼接而成^[5]。既往大量研究发现, CircRNA-100395 在乳腺癌、甲状腺乳头状癌、卵巢癌等多种肿瘤中呈低表达,上调其表达后可以抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移能力,有望成为癌症的新治疗靶点^[6-8]。但目前缺乏 CircRNA-100395 调控前列腺癌发生发展的分子作用机制相关研究,尤其是在前列腺癌细胞中 CircRNA-100395 基因启动子区是否呈异常甲基化及其甲基化状态是否对前列腺癌细胞生物学行为具有调控作用还有待深入探讨。因此,本研究旨在探索前列腺癌细胞中 CircRNA-100395 基因启动子区甲基化状态对自身表达水平的影响,并阐明 CircRNA-100395 基因去甲基化对前列腺癌细胞增殖、侵袭的影响及相关分子生物学作用机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 从中国科学院细胞库购买 1 株人正常前列腺上皮细胞 (RWPE) 和 3 株前列腺癌细胞系 (LNCap, PC3 和 DU145) 作为研究对象。

1.2 仪器与试剂 胎牛血清, DMEM 培养液, 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); RNA 提取盒, RNA 逆转录试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); CCK-8 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Smad3, p-Smad3 多克隆抗体 (美国 Abcam 公司); CO₂ 细胞培养箱 (德国 Hera cell 150 公司); Transwell 小室 (美国 Corning 公司); CircRNA-100395-3'UTR-wt 野生型和 3'UTR-MUT 突变型荧光质粒, miRNA-136-5p mimic 模拟物 (广州锐博生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养: RWPE, LNCap, PC3 和 DU145 细胞用含 100 ml/L 胎牛血清标准型培养液在 37 °C, 标准 CO₂ 孵育箱中培养,待细胞长至融合度为 80% ~ 90% 时,加入含 2.5 mg/ml 胰酶的胰蛋白酶溶液 1 ml 进行消化传代。CircRNA-100395-AZA (CircRNA-100395 去甲基化,去甲基化药物 AZA 处理细胞), CircRNA-100395-NC (CircRNA-100395 去甲基化对照,不做甲基化处理), miRNA-136-5p-mimic (miRNA-136-5p 过表达,转染 mimic 模拟物), miRNA-136-5p-NC (miRNA-136-5p 过表达对照,不做转染处理)。

1.3.2 甲基化特异性聚合酶链反应 (methylation

specific polymerase chain reaction, MSP) 检测 CircRNA-100395 基因启动子区甲基化状态: 根据 DNA 试剂盒提取细胞系总 DNA, 紫外分光光度计检测其纯度待满足实验要求后, 采用重亚硫酸盐进行 DNA 转化处理。后将转化后产物进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳溴化乙锭染色后于紫外线照射下直接观察并拍照。CircRNA-100395 基因甲基化 PCR 引物序列为 F: 5'-GGTTTTAAAGTCCGGTGTATTTC-3', R: 5'-AACTACAACCACTCCGACGTA-3', 长度 125bp; 非甲基化引物序列 F: 5'-GGGTTTTAAAGT TGGTGTATTTC-3', R: 5'-AACAACTACAACCAC TCCAACATA-3', 长度 132bp。

1.3.3 PCR 检测 CircRNA-100395 mRNA 表达水平: 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 用紫外吸光度计测定其纯度, 根据反转录试剂盒逆转录合成 cDNA, 并以此为产物进行 RT-PCR 扩增, 扩增体系为 25 μ l, PCR 条件: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 40 °C 40 s, 72 °C 1 min, 循环 35 次, 行荧光定量 PCR, 以 U6 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算目的基因相对表达, PCR 引物序列, CircRNA-100395: F: 5'-GCTGTGCAGTATATCAGGACA-3', R: 5'-CATTGGTCTGTGGATCATATC-3', 长度 190 bp; U6: F: 5'-GTCCGCGTGCTCGCTTCGGCAGC-3', R: 5'-GTGCGTGTGCTGGAGTC-3', 长度 160bp。

1.3.4 CircRNA-100395 基因去甲基化方法: 采用浓度为 3 μ mol/L 的去甲基化药物 5-氮杂-2'脱氧胞苷 (AZA) 处理 LNCap 细胞 72 h, 检测 AZA 处理前后前列腺癌细胞系中 CircRNA-100395 表达水平。

1.3.5 CCK-8 法检测 LNCap 细胞增殖能力: 将 AZA 处理后的 LNCap 细胞及对照组细胞消化后种于 96 孔培养板中, 每孔加入 100 μ l 培养液, 在 37 °C, 标准 CO₂ 条件下常规培养至细胞贴壁生长, 弃掉培养液, 每孔加入 5 μ l 的 CCK-8 溶液继续孵育 4 h, 用酶标仪在 450 nm 处测定各孔的吸光度值 (A), 每组 5 个复孔, 取平均值。

1.3.6 Transwell 实验检测 LNCap 细胞侵袭能力: 在 Transwell 上室加入无血清培养液稀释后的 Matrigel 基质胶溶液 80 μ l, 室温放置 1 h 使其形成一层基质膜, 分别将 400 μ l 无胎牛血清培养液重悬的 AZA 处理的 LNCap 细胞及对照组细胞接种于小室上层, 将 Transwell 培养小室置入 24 孔培养板中, 小室的下层加入含胎牛血清的培养液 600 μ l, 培养 24 h 后将小室取出, 弃去培养液, 将上层未侵袭的细胞小心擦去, 下层细胞用 PBS 洗涤 2 次, 经多聚甲醛固定, 加入 0.02 g/ml 的结晶紫染液 0.5ml

进行染色, 倒置晾干, 光学显微镜下随机观察 5 个视野 ($\times 200$), 计数染色的细胞数, 即为侵袭细胞数。

1.3.7 CircRNA-100395 靶向 miRNA 预测: 通过检索生物信息学数据库 (Starbase 3.0) 预测与 CircRNA-100395 存在结合位点的下游靶 miRNA 基因, 探究两者的靶向结合关系。

1.3.8 荧光素酶基因报告实验: 应用 Lipo3000 进行 CircRNA-100395 野生型 (WT) / 突变型 (MUT) 质粒与 miRNA-136-5p 双转染, 转染 48 h 后弃去培养液, 加裂解液进行充分裂解, 然后在荧光光度计中检测荧光酶活性强弱, 证实 CircRNA-100395 与 miRNA-136-5p 之间的靶向关系。

1.3.9 Western blot 检测 LNCap 细胞中 Smad3 和 p-Smad3 蛋白表达: 收集 AZA 处理前后 LNCap 细胞加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, 采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度; 取 20 mg 蛋白样品加入上样缓冲液, 沸水浴加热 10 min, 冷却至室温后进行蛋白电泳, 电泳条件为: 浓缩胶 80 V 恒压, 分离胶 120 V, 待条带跑至距分离胶底部 3 cm 处时停止电泳, 转移到聚偏二氟乙烯膜, 室温封闭 60 min, PBS 洗膜后加入 Smad3 和 p-Smad3 一抗 4 °C 孵育过夜, 次日加入二抗, 室温孵育 2 h, PBS 漂洗三次后即可在凝胶成像仪观察拍照, 并采用 Image-J 软件分析蛋白相对表达。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行实验结果分析, 所有计量数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用 one-way ANOVA 分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

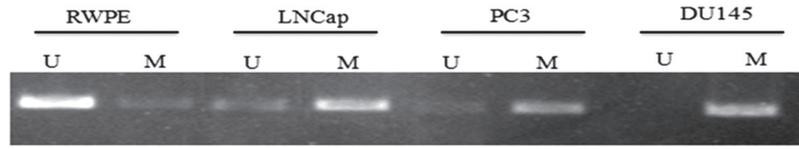
2 结果

2.1 前列腺癌细胞系中 CircRNA-100395 基因启动子区甲基化状态 见图 1。MSP 实验结果显示, CircRNA-100395 基因在 RWPE 细胞中呈非甲基化状态, 而在 LNCap, PC3 及 DU145 细胞中呈高甲基化状态。

2.2 CircRNA-100395 在前列腺癌细胞系中表达及 AZA 去甲基化处理 LNCap 细胞后 CircRNA-100395 表达水平 RT-qPCR 结果表明, CircRNA-100395 在 LNCap, PC3 及 DU145 细胞中的表达水平分别为 0.39 ± 0.08 , 0.65 ± 0.14 , 0.62 ± 0.10 , 明显低于 RWPE 细胞中表达水平 (1.12 ± 0.15), 差异有统计学意义 ($F=42.076$, $P < 0.001$), 其中以 LNCap 细胞中表达最低, 故选择该细胞进行后续实验。进一步发现经 AZA 去甲基化处理后, LNCap 细胞中 CircRNA-100395 表达水平为 1.02 ± 0.17 , 较未处理的 LNCap 细胞 (0.42 ± 0.05) 明显升高, 差异有统计学意义 ($t=5.808$, $P < 0.01$), 提示

CircRNA-100395 在前列腺癌细胞中的表达水平可

能与基因启动子区异常甲基化有关。



注：U 为非甲基化，M 为甲基化

图1 CircRNA-100395 在前列腺癌细胞系中甲基化状态

2.3 CircRNA-100395 基因去甲基化对 LNCap 细胞增殖的影响 见表1。CCK-8 法检测结果表明，AZA 处理后 LNCap 细胞各个时间点 A 值均较处理

前明显下降，差异有统计学意义 ($t=8.764\sim 12.970$ ，均 $P < 0.001$)，说明 CircRNA-100395 基因去甲基化可抑制 LNCap 细胞增殖。

表1 不同时间点细胞吸光度 (A) 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	CircRNA-100395-NC	CircRNA-100395-AZA	t 值	P 值
0	0.36 ± 0.02	0.18 ± 0.02	11.023	< 0.01
24	0.48 ± 0.03	0.32 ± 0.01	8.764	< 0.001
48	0.77 ± 0.02	0.50 ± 0.03	12.970	< 0.001
72	0.97 ± 0.03	0.72 ± 0.02	12.010	< 0.001

2.4 CircRNA-100395 基因去甲基化对 LNCap 细胞侵袭的影响 Transwell 侵袭实验表明，未经 AZA 处理前 LNCap 细胞穿膜数为 95.34 ± 11.26 个，AZA 处理后细胞穿膜数为 48.95 ± 6.87 个，差异有统计学意义 ($t=6.092$ ， $P < 0.01$)，说明 CircRNA-100395 基因去甲基化可抑制 LNCap 细胞的侵袭。

表达明显降低了 CircRNA-100395 野生型质粒的荧光素酶活性，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)；而对 CircRNA-100395 突变型质粒的荧光素酶活性无明显影响，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，说明 miRNA-136-5p 可以与 CircRNA-100395 相结合，其可能为 CircRNA-100395 的下游作用靶点。

2.5 CircRNA-100395 与 miRNA-136-5p 的靶向调控关系 见图2，表2。检索生物信息学数据库发现，miRNA-136-5p 与 CircRNA-100395 存在结合位点。双荧光素酶基因报告显示，miRNA-136-5p 过

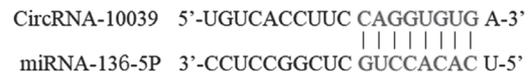


图2 生物信息学预测 CircRNA-100395 与 miRNA-136-5p 结合位点

表2 miRNA-136-5p 过表达达对 CircRNA-100395 野生型质粒荧光素酶活性的影响

类别	miR-136-5P-NC	miR-136-5P-mimics	t 值	P 值
CircRNA-100395-WT	1.00 ± 0.12	0.42 ± 0.06	7.488	< 0.01
CircRNA-100395-MUT	1.00 ± 0.15	0.97 ± 0.11	0.279	0.794

2.6 CircRNA-100395 与 miRNA-136-5p 表达关系 qRT-PCR 检测发现，去甲基化处理前 LNCap 细胞中 CircRNA-100395 和 miRNA-136-5p 表达水平为 0.39 ± 0.08 ， 0.87 ± 0.15 ；经 AZA 处理后 CircRNA-100395 与 miRNA-136-5p 表达水平分别为 1.02 ± 0.17 ， 0.35 ± 0.08 ，处理前后对比差异均有统计学意义 ($t=5.808$ ， 5.298 ，均 $P < 0.01$)。进一步证实 miRNA-136-5p 与 CircRNA-100395 表达呈负向调控，且与基因启动子甲基化状态有关。

了 Smad3 (0.82 ± 0.07 vs 1.02 ± 0.02) 和 p-Smad3 (0.66 ± 0.11 vs 1.01 ± 0.02) 蛋白表达，差异有统计学意义 ($t=4.996$ ， 5.422 ，均 $P < 0.01$)，提示 CircRNA-100395 与 miRNA-136-5p 均可调控前列腺癌细胞中 Smad3 蛋白的表达。

3 讨论

2.7 CircRNA-100395，miRNA-136-5p 对 Smad3 蛋白表达的影响 Western blot 检测结果表明，AZA 去甲基化处理后 Smad3 (1.27 ± 0.05 vs 1.00 ± 0.02) 和 p-Smad3 (1.36 ± 0.05 vs 1.01 ± 0.01) 蛋白表达明显升高，差异有统计学意义 ($t=7.394$ ， 11.889 ，均 $P < 0.01$)；而 miRNA-136-5p 过表达抑制

前列腺癌的病因及发病机制目前还未完全阐明，但随着分子生物学的深入研究，越来越多的学者发现，前列腺癌的发生发展可能与多种基因的异常表达密切相关，其中 CiccRNA 被认为是具有调控基因表达的内源性 RNA 分子^[9-10]。CircRNA-100395 作为一种新型的 CiccRNA，多项研究表明其异常表达在肿瘤的恶性演变中发挥着重要调控作用。如 CHEN 等^[11]研究发现，肺癌组织中 CircRNA-100395 表达降低，与肺癌 TNM 分

期和淋巴转移呈负相关, CircRNA-100395 表达较高的患者往往具有更好的术后无病生存时间; 同时细胞实验也证实 CircRNA-100395 过表达可显著抑制肺癌细胞增殖, 阻止细胞周期进程并减少了体外细胞迁移和侵袭。CHENG 等^[12] 探索发现, CircRNA-100395 过表达通过调节 miR-142-3p 信号通路可抑制胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 促进细胞凋亡, 可能是胃癌的潜在治疗靶点。CHEN 等^[13] 研究发现, 肝癌细胞中 CircRNA-100395 表达上调可以抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 通过沉默 EMT 通路并降低迁移和侵袭能力。以上结果均表明, CircRNA-100395 通过扮演抑癌基因角色参与调控多种人类肿瘤的发生发展, 可作为新的肿瘤研究重要靶点。因此研究 CircRNA-100395 在前列腺癌细胞中的表达状态及其对癌细胞生物学行为的影响意义显著。

近年越来越多研究表明, CircRNA-100395 异常表达与恶性肿瘤的发生发展关系密切, 但导致其异常表达发挥作用的原因尚不明确, 部分学者认为可能与基因表观遗传修饰有关^[14]。DNA 甲基化是肿瘤细胞表观遗传学改变的重要形式, 最常发生的区域为启动子区域, 该区域甲基化异常修饰可导致基因转录受到抑制, 引起 RNA 和蛋白表达水平下降, 且发现基因启动子区 DNA 甲基化是基因失活的重要原因之一, 也可使抑癌基因功能丧失^[15]。张雪梅等^[16] 研究也表明, 多种恶性肿瘤中均伴随有基因启动子区处于异常高甲基化的现象, 该现象可明显抑制某些抑癌基因的转录过程, 诱导基因转录沉默, 促进肿瘤的发生发展。通过 DNA 甲基化抑制剂促使基因去甲基化, 可降低基因甲基化水平, 逆转肿瘤细胞的异常甲基化, 能够诱导因甲基化引起的抑癌基因重新表达而发挥作用, 从而抑制肿瘤的生长^[17]。而本研究检测发现, 前列腺癌细胞系中 CircRNA-100395 明显低表达, 其启动子区呈高甲基化状态; 经采用 AZA 去甲基化处理后 CircRNA-100395 表达水平明显恢复, 推测 CircRNA-100395 低表达应是由其基因启动子区异常高甲基化所导致。此外还发现经 AZA 去甲基化处理后, 前列腺癌细胞的增殖和侵袭能力明显受到抑制, 这与 JEZIORSKA 等^[18] 报道的基因启动子区发生甲基化后, mRNA 表达水平降低, 恢复其表达后则可抑制肿瘤发生增殖和迁移的结果相吻合。

为明确 CircRNA-100395 调控前列腺癌的可能分子机制, 研究通过双荧光素酶基因报告实验分析发现, miRNA-136-5p 与 CircRNA-100395 存在结合位点, 且 miRNA-136-5p 过表达能够明显降低 CircRNA-100395 野生型质粒荧光素酶活性, 推测

其可能为 CircRNA-100395 的下游作用靶点。此外, 有研究发现在多种癌症发生进程中 miRNA-136 可直接靶向作用于 Smad3 蛋白, miRNA-136/Smad3 轴被认为是癌症的潜在治疗靶向信号通路^[19-20]。为了更深入地阐明 CircRNA-100395 是否可通过 miRNA-136/Smad3 轴来调控前列腺癌的发生发展, 本研究通过 Western blot 实验验证发现, CircRNA-100395 过表达可以显著增加 p-Smad3 和 Smad3 蛋白表达, 而 miRNA-136-5p 过表达则可显著降低 p-Smad3 和 Smad3 蛋白表达, 结合双荧光素酶基因报告结果推测 CircRNA-100395 可能通过海绵吸附 miRNA-136 来调控 Smad3 的表达, 进而在前列腺癌中发挥肿瘤调控作用, 这一发现为前列腺癌的临床筛查及靶向治疗药物的开发提供理论基础。

综上所述, CircRNA-100395 基因启动子区的异常高甲基化抑制了其在前列腺癌细胞中的表达水平, 经 AZA 去甲基化处理后 CircRNA-100395 表达恢复, 并抑制前列腺癌细胞的增殖和侵袭能力, 其可能与 CircRNA-100395 靶向调控 miRNA-136-5p/Smad3 轴有关。然而研究存在不足之处, 本研究为基础细胞体外实验, 缺乏临床数据的验证, 因此后期还需进一步验证 CircRNA-100395 在动物模型中的表达水平及分子机制。

参考文献:

- [1] PERNAR C H, EBOT E M, WILSON K M, et al. The epidemiology of prostate cancer[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2018, 8(12): Q030361.
- [2] 中国抗癌协会泌尿男生殖系肿瘤专业委员会, 中国临床肿瘤学会前列腺癌专家委员会. 中国前列腺癌患者基因检测专家共识(2020年版)[J]. 中国癌症杂志, 2020, 30(7): 551-560.
Chinese Anti-Cancer Association Genitourinary Cancer Committee, Chinese Society of Clinical Oncology Committee on Prostate Cancer. Chinese expert consensus on genomic testing of prostate cancer patients (the 2020 edition) [J]. China Oncology, 2020, 30(7): 551-560.
- [3] MCNEVIN C S, BAIRD A M, MCDERMOTT R, et al. Diagnostic strategies for treatment selection in advanced prostate cancer[J]. Diagnostics(Basel, Switzerland), 2021, 11(2):345-352.
- [4] SINHA T, PANIGRAHI C, DAS D, et al. Circular RNA translation, a path to hidden proteome[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2022, 13(1): e1685.
- [5] HE Haitian, LI Jianhua, LUO Mayao, et al. Inhibitory role of circRNA_100395 in the proliferation and metastasis of prostate cancer cells[J]. J Int Med Res, 2021, 49(2): 300060521992215.
- [6] YU X P, LIU C G, QIU F, et al. CircRNA-100395 protects breast carcinoma deterioration by targeting MAPK6[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(23): 12216-12223.

- [7] 王兵兵, 杨爽. 环状 RNA-100395 对甲状腺乳头状癌潜在的诊断和治疗价值 [J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(3): 438-440.
WANG Bingbing, YANG Shuang. Potential diagnostic and therapeutic value of circular RNA-100395 in papillary thyroid carcinoma[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2021, 25(3): 438-440.
- [8] LI Xian, LIN Shuihua, MO Zhifeng, et al. CircRNA_100395 inhibits cell proliferation and metastasis in ovarian cancer via regulating miR-1228/p53/epithelial-mesenchymal transition (EMT) axis[J]. Journal of Cancer, 2020, 11(3): 599-609.
- [9] 张振, 潘晴, 刘旭, 等. circRNA 与肿瘤发生的研究进展 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2): 157-159, 164.
ZHANG Zhen, PAN Qing, LIU Xu, et al. Research progress of the relationship between circularRNA and tumorigenesis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(2): 157-159, 164.
- [10] LI Zhe, RUAN Yao, ZHANG Haiyan, et al. Tumor-suppressive circular RNAs: Mechanisms underlying their suppression of tumor occurrence and use as therapeutic targets[J]. Cancer Science, 2019, 110(12): 3630-3638.
- [11] CHEN Daishi, MA Wei, KE Zhaoyang, et al. CircRNA hsa_circ_100395 regulates miR-1228/TCF21 pathway to inhibit lung cancer progression[J]. Cell Cycle, 2018, 17(16): 2080-2090.
- [12] CHENG Zhiyi, LIU Guiyuan, HUANG Chuanjiang, et al. Upregulation of circRNA_100395 sponges miR-142-3p to inhibit gastric cancer progression by targeting the PI3K/AKT axis[J]. Oncology Letters, 2021, 21(5): 419.
- [13] CHEN Qiaming, CHEN Zhian, CAO Sai, et al. Role of CircRNAs_100395 in proliferation and metastases of liver cancer[J]. Medical Science Monitor, 2019, 25: 6181-6192.
- [14] POCZTA M, NOWAK E, BIEG D, et al. Epigenetic modifications and gene expression in cancerogenesis[J]. Annales Academiae Medicae Silesiensis, 2018, 72: 80-89.
- [15] QUAN Yuan, LIANG Fengji, DENG Simin, et al. Mining the selective remodeling of DNA methylation in promoter regions to identify robust gene-level associations with phenotype[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021, 8: 597513.
- [16] 张雪梅, 田浩, 魏微微, 等. 食管癌组织中 miRNA-375 表达及其甲基化与肿瘤发生发展的关系 [J]. 山东医药, 2019, 59(1): 9-12.
ZHANG Xuemei, TIAN Hao, WEI Weiwei, et al. Relationships of miRNA-375 expression and its methylation with tumorigenesis in esophageal carcinoma[J]. Shandong Medical Journal, 2019, 59(1): 9-12.
- [17] EBRAHIMI V, SOLEIMANIAN A, EBRAHIMI T, et al. Epigenetic modifications in gastric cancer: Focus on DNA methylation[J]. Gene, 2020, 742:144577.
- [18] JEZIORSKA D M, MURRAY R J S, DE GOBBI M, et al. DNA methylation of intragenic CpG islands depends on their transcriptional activity during differentiation and disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(36): E7526-E7535.
- [19] LENG Xiaoling, HUANG Guofu, DING Jianbing, et al. Circ_0000043 promotes proliferation, migration, invasiveness and epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cell via the miR-136/Smad3 axis[J]. Biochem Cell Biol, 2021,99(3):277-285.
- [20] KANG Weiting, WANG Qiang, DAI Yun, et al. Hypomethylation of PlncRNA-1 promoter enhances bladder cancer progression through the miR-136-5p/Smad3 axis[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(12): 1038.

收稿日期: 2022-05-31

修回日期: 2022-09-15

(上接第8页)

- TIAN Ming, LI Li, MAO Wancheng, et al. Genetic analysis and distribution characteristics of globin-producing anemia patients in Tongren Area, Guizhou Province [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(3):51-54.
- [11] 唐健, 吕梦欣, 何建萍, 等. 昆明地区 5 284 例孕妇地中海贫血基因检测分析 [J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41(7):80-84.
TANG Jian, LÜ Mengxin, HE Jianping, et al. Genetics analysis for Thalassemia in 5 284 pregnant women in Kunming [J]. Journal of Kunming Medical University, 2020, 41(7):80-84.
- [12] 何建萍, 吕梦欣, 邹婕, 等. 昆明地区新生儿血红蛋白筛查与地中海贫血基因检测结果分析 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2020, 28(4): 412-414, 476.
HE Jianping, LÜ Mengxin, ZOU Jie, et al. Analysis of the results of newborn hemoglobin screening and Thalassemia gene detection in Kunming [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2020, 28(4):412-414,476.
- [13] 陈海雷, 沈妙娜, 黄燕, 等. 广东地区地中海贫血基因筛查结果分析 [J]. 国际医药卫生导报, 2019, 25(5): 724-726.
CHEN Hailei, SHEN Miaona, HUANG Yan, et al. Genetic screening results of Thalassemia in Guangdong [J]. International Medicine and Health Guidance News, 2019, 5(25): 724-726.
- [14] 张杰, 贺静, 曾小红, 等. 云南省人群地中海贫血遗传多样性的研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(1): 28-34.
ZHANG Jie, HE Jing, ZENG Xiaohong, et al. Genetic heterogeneity of Thalassemia in Yunnan Province [J]. Journal of Kunming Medical University, 2016, 37(1):28-34.

收稿日期: 2022-02-14

修回日期: 2022-03-22