

hsa_circ_0006950 调控 miR-124-3p/EZH2 轴促进胰腺癌细胞增殖与迁移的机制研究

王军堂^{1a}, 齐普良^{1a}, 张金刚^{1a}, 阿吉德^{1b}, 何 婧²

(1. 青海省人民医院 a. 急诊外科; b. 普外科, 西宁 810007; 2. 武警青海省总队医院内二科, 西宁 810014)

摘要: **目的** 检测环状核糖核酸(circular RNA, circRNA) hsa_circ_0006950在胰腺癌(pancreatic cancer, PC)中的表达, 探讨其对胰腺癌细胞增殖、迁移的影响及其潜在分子作用机制。**方法** 利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测 hsa_circ_0006950在胰腺癌组织及细胞中的相对表达水平; 转染 hsa_circ_0006950 干扰载体构建低表达细胞系, 通过 CCK-8 实验、克隆斑点形成实验和 Transwell 实验检测 hsa_circ_0006950 对胰腺癌细胞增殖、克隆形成及迁移的影响; 利用生物信息学网站预测 hsa_circ_0006950 的 miRNA 分子靶标及其调控网络(hsa_circ_0006950-miR-124-3p-EZH2), 双荧光素酶基因报告实验验证 hsa_circ_0006950 和 miR-124-3p, miR-124-3p 和 EZH2 的靶向结合关系; 转染过表达/干扰 miR-124-3p 和过表达 EZH2 细胞系, 探究 miR-124-3p 和 EZH2 及 hsa_circ_0006950 调控 miR-124-3p/EZH2 轴对胰腺癌细胞克隆形成及迁移的影响。**结果** 胰腺癌组织中 hsa_circ_0006950 表达明显高于癌旁正常组织(3.57 ± 0.52 vs 1.01 ± 0.03), 差异有统计学意义($t=21.980$, $P < 0.001$)。胰腺癌细胞 PANC-1 (7.51 ± 0.62), AsPC-1 (5.26 ± 0.45), Capan-2 (3.69 ± 0.38), SW1990 (3.25 ± 0.32) and BXPC-3 (3.86 ± 0.35) 中 hsa_circ_0006950 相对表达明显高于正常胰腺导管上皮细胞 HPDE6-C7 (1.00 ± 0.01) 中的表达, 差异有统计学意义($F=88.585$, $P < 0.001$)。与对照组相比, 干扰 hsa_circ_0006950 表达组细胞增殖能力(0.79 ± 0.17 vs 1.83 ± 0.42), 克隆形成率($51.42\% \pm 5.84\%$ vs $78.76\% \pm 13.65\%$) 和迁移数目(104.64 ± 24.73 vs 218.21 ± 31.57) 明显降低, 差异均有统计学意义($t=3.976, 3.190, 4.905$, $P=0.016, 0.033, 0.008$)。miR-124-3p 是 hsa_circ_0006950 的下游靶基因, EZH2 是 miR-124-3p 的直接靶标。hsa_circ_0006950 靶向负调控 miR-124-3p, miR-124-3p 靶向负调控 EZH2。与对照组相比, 过表达 miR-124-3p 组 PC 细胞增殖(0.21 ± 0.16 vs 1.75 ± 0.47), 克隆形成率($47.85\% \pm 4.13\%$ vs $81.54\% \pm 2.33\%$) 和细胞迁移数目(118.74 ± 24.65 vs 202.36 ± 31.45) 明显降低, 差异均有统计学意义($t=5.378, 14.317, 3.390$, 均 $P < 0.001$); 共转染过表达 EZH2 后, miR-124-3p 对细胞增殖、克隆形成率及迁移能力的抑制作用被逆转。在干扰 hsa_circ_0006950 组细胞中同时下调 miR-124-3p 或过表达 EZH2 后, hsa_circ_0006950 对细胞克隆形成及迁移的抑制作用被逆转恢复。**结论** 胰腺癌中 hsa_circ_0006950 显著高表达, 抑制其表达可以抑制胰腺癌细胞的增殖及迁移; hsa_circ_0006950 可能通过靶向下调 miR-124-3p 表达, 进而上调 EZH2 表达来发挥作用, 参与胰腺癌的发生发展。

关键字: 胰腺癌; hsa_circ_0006950; 微小核糖核酸-124-3p; EZH2; 增殖; 克隆形成; 迁移
中图分类号: R736.7; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 05-093-07
doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.05.019

Mechanism of hsa_circ_0006950 Regulating miR-124-3p /EZH2 Axis to Promote the Proliferation and Migration of Pancreatic Cancer Cells

WANG Jun-tang^{1a}, QI Pu-liang^{1a}, ZHANG Jin-gang^{1a}, A Ji-de^{1b}, HE Jing²

(1a.Department of Emergency Surgery; 1b.Department of General Surgery, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, China; 2.the Second Department of Internal Medicine, Qinghai Provincial Armed Police Corps Hospital, Xining 810014, China)

Abstract: objective To detect the expression of circRNA hsa_circ_0006950 in pancreatic cancer (PC) and investigate the effect of circRNA hsa_circ_0006950 on the proliferation and migration of PC cells and its potential molecular mechanism. **Methods** QRT-PCR was used to detect the relative expression level of hsa_circ_0006950 in pancreatic cancer tissues and cells. Low expression cell lines were constructed by transfection of hsa_circ_0006950 interference vector, and the effects of hsa_circ_0006950 on PC cell proliferation, clonal formation and migration were detected by CCK-8, clone spot formation assay and

基金项目: 青海省卫生计生系统科研项目 (2017-wjzdx-23); 青海省卫生健康系统指导性科研项目 (2020-wjzdx-27)。

作者简介: 王军堂 (1977-), 男, 本科, 主治医师, 研究方向: 胰腺肿瘤的临床治疗与基础研究, E-mail: wang87632@163.com。

通讯作者: 阿吉德 (1979-), 男, 博士, 主治医师, E-mail: ye19790309@126.com。

Transwell assay. Predicted miRNA molecular target and regulatory network of hsa_circ_0006950 (hsa_circ_0006950-miR-124-3p-EZH2) by bioinformatics website, targeted binding relationship between hsa_circ_0006950 and miR-124-3p, miR-124-3p and EZH2 was verified by double luciferase gene report experiment. Over expression/interference of miR-124-3p and over expression of EZH2 cell lines were transfected to explore the effects of miR-124-3p, EZH2 and hsa_circ_0006950 regulating miR-124-3p/EZH2 axis on the formation and migration of PC cell clones. **Results** The expression of Hsa_circ_0006950 in PC tissues (3.57 ± 0.52 vs 1.01 ± 0.03) was significantly higher than that in adjacent normal tissues, the difference was statistically significant ($t=21.980$, $P < 0.001$). In PC cell PANC-1 (7.51 ± 0.62), AsPC-1 (5.26 ± 0.45), Capan-2 (3.69 ± 0.38), SW1990 (3.25 ± 0.32), the relative expression of hsa_circ_0006950 in BXPc-3 (3.86 ± 0.35) was significantly higher than that in HPDE6-C7 (1.00 ± 0.01) in normal pancreatic duct epithelial cells, the difference was statistically significant ($F=88.585$, $P < 0.001$). Compared with the control group, the proliferation ability and clone formation rate of hsa_circ_0006950 expression group were 0.79 ± 0.17 vs 1.83 ± 0.42 , and 51.42 ± 5.84 vs 78.76 ± 13.65 and the number of migrations (104.64 ± 24.73 vs 218.21 ± 31.57) were significantly decreased, the differences were statistically significant ($t=3.976$, 3.190 , 4.905 , $P=0.016$, 0.033 , 0.008). MiR-124-3p is the downstream target gene of hsa_circ_0006950, and EZH2 is the direct target of miR-124-3p. Hsa_circ_0006950 negatively regulates miR-124-3p, and miR-124-3p negatively regulates EZH2. Compared with the control group, PC cell proliferation in miR-124-3p overexpressed group (0.21 ± 0.16 vs 1.75 ± 0.47), the clone formation rate ($47.85\% \pm 4.13\%$ vs $81.54\% \pm 2.33\%$) and the number of cell migration (118.74 ± 24.65 vs 202.36 ± 31.45) were significantly decreased, the differences were statistically significant ($t=5.378$, 14.317 , 3.390 , $P < 0.001$). After co-transfection and over expression of EZH2, the inhibition of miR-124-3p on cell clonal formation rate and migration ability was reversed. After down-regulation of miR-124-3p or over expression of EZH2 in hsa_circ_0006950 group, the inhibition of hsa_circ_0006950 on cell cloning and migration was reversed and restored. **Conclusion** Hsa_circ_0006950 was highly expressed in pancreatic cancer, and inhibition of its expression could inhibit the proliferation and migration of pancreatic cancer cells. hsa_circ_0006950 may play a role in the occurrence and development of pancreatic cancer by down-regulating the expression of miR-124-3p and then up-regulating the expression of EZH2.

Keywords: pancreatic cancer; hsa_circ_0006950; miR-124-3p; EZH2; proliferation; clone formation; migration

胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 是临床常见的消化道恶性肿瘤, 恶性程度高、预后差, 患者 5 年生存率不到 5%^[1]。由于胰腺位置隐蔽, 早期胰腺癌很难被发现, 多数患者确诊时已是晚期, 加之病死率极高, 因此被称为“癌中之王”^[1-2]。目前越来越多的研究发现, 非编码 RNA 在对疾病的调控中发挥重要作用, 其中包括环状核糖核酸 (circular RNA, circRNA) 和微小核糖核酸 (microRNA, miRNA)^[3]。circRNA 是通过部分基因外显子环化而成, 由于没有 3'-尾巴和 5'-帽子结构, 进而避免了 RNA 酶消化, 可稳定存在于细胞内, 因此 circRNA 可被用作肿瘤的诊断探针^[3-4]。相关研究发现, circRNA 可通过靶向吸附 miRNA 来调控基因表达, 被称为“miRNA 海绵分子”, 在癌症相关的各种生物学过程中充当重要调节剂, 如细胞的增殖、侵袭和转移等, 进而影响疾病进程^[5-6]。近年在对 PC 的研究中发现, circ_03955 通过靶向 miR-3662/HIF-1 α 轴促进 PC 的发生和 Warburg 效应^[7]; circ-ciRS-7 可通过吸附 miR-7 调控 EGFR/STAT3 信号轴, 促进胰腺癌增殖^[8]。越来越多的 circRNA 在胰腺癌中被探究证实异常表达, 参与了胰腺癌的恶性发展进程。因此对 circRNA 的研究或许能揭示胰腺癌的发生机制, 为胰腺癌的防治提供新的理论基础和治疗靶点。本

次研究的 circRNA 为 hsa_circ_0006950, 源自基因 TRPS1, 也被命名为 circ-TRPS1。hsa_circ_0006950 是课题组前期通过高通量筛选出来的一个表达异常的 circRNA, 发现其在胰腺癌中表达上调, 然其在肿瘤中的具体作用机制尚不清楚, 且有关研究报道鲜少。所以本研究通过体外细胞实验拟探究了 hsa_circ_0006950 的分子属性及其在胰腺癌中的作用机制, 希望为胰腺癌的研究提供新的生物靶标。

1 材料与方法

1.1 研究对象 胰腺癌细胞系 PANC-1, AsPC-1, Capan-2, SW1990, BXPc-3 和人正常胰腺导管上皮细胞系 HPDE6-C7 均由中国科学院上海细胞提供, 培养在 DMEM 培养液中, 其中含有 10g/dl 胎牛血清, 37℃ 培养在含 5ml/dl CO₂ 细胞培养箱中。选取 2021 年 5 月 ~ 8 月青海省人民医院病理科留存的 20 例胰腺癌患者癌组织及对应癌旁正常组织样本, 组织标本经病理确诊后保存于低温液氮中; 术前未接受任何相关放化疗及新辅助治疗, 未并发其他恶性肿瘤。

1.2 试剂及仪器 DMEM 培养液, 胎牛血清, 0.25g/dl 胰酶 (美国 Gibco 公司); Lip2000 转染试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司); miR-124-3p inhibitor 抑制剂, miR-124-3p mimic 模拟物, hsa_circ_0006950

干扰 siRNA 载体, EZH2 过表达载体 (上海吉玛基因生物); CCK-8 试剂盒 (上海碧云天); TRIzol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); RNA 逆转录试剂盒 (Aidlab, Beijing, China); 酶标仪 (美国 BioTek 公司); 7500 Fast Real-Time PCR 仪 (瑞士 Roche 公司); 凝胶成像分析系统 (美国 Azure 公司); Transwell 小室, Matrigel 基质胶 (美国 Corning 公司); EZH2-3'UTR-wt 野生型和 3'UTR-mut 突变型, hsa_circ_0006950-3'UTR-wt 野生型和 3'UTR-mut 突变型荧光质粒 (南京科佰生物科技有限公司设计合成)。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染及分组: 按照 Lip2000 转染试剂盒说明书进行转染, 将转染片段与 Lip2000 混和后加入无血清 OptiMEM (美国 Gibco 公司) 培养液培养细胞 6 h, 换成正常的 DMEM 培养液继续培养转染 48 h 后进行后续实验。分组: 转染 miR-124-3p inhibitor 为 miR-124-3p 抑制组 (inhibitor 组), 转染 miR-124-3p mimic 为 miR-124-3p 过表达组 (mimic 组), 转染 hsa_circ_0006950 干扰 siRNA 载体为 hsa_circ_0006950 低表达组 (si-circRNA 组), 转染 EZH2 过表达载体为 EZH2 过表达组 (EZH2 组)。

1.3.2 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验: 利用 TRIzol 试剂提取细胞及组织中总 RNA, 通过逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA, 并以此为模板配置 PCR 反应体系, 利用 PCR 仪进行 qRT-PCR。反应条件: 95℃ 30s; 95℃ 15s, 72℃ 10s, 循环 40 次。引物序列如下, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因相对表达。

表 1	qRT-PCR 反应引物序列
基因	引物序列 (5'-3')
hsa_circ_0006950	F:CTAAATGGGACCTATG
	R:CAATTGCTCTAGAAGACGCTC
EZH2	F:GCCATTATGGACATCGCGGTGC
	R:CTTCGCGCTCGCGTGCCG
miR-124-3p	F:CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGTCAATTGAGATTCA
	R:ACACTCCAGCTGGGTAAGGCACGCGGTGAATGCC
GAPDH	F:TGTTTCCTCATGGGTGTGAAC
	R:ATGGCATGGACTGTGGTCAT
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCACA
	R:AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.3.3 CCK-8 实验: 取对数生长期待测细胞重悬, 接种于 96 孔板, 37℃, 5ml/dl CO₂ 孵育待细胞贴壁后, 每孔加入 10 μ l CCK-8 液孵育继续孵育 0, 24, 48 和 72h, 吸除培养基, 酶标仪上在 450nm 处

检测吸光度值 (A 值), 绘制细胞增殖曲线图, 每孔设 3 个复孔, 实验重复 3 次取平均值。

1.3.4 克隆斑点形成实验: 取对数生长期各组细胞, 胰酶消化, 以每孔 200 个细胞铺于 6 孔板, 每孔设 3 个复孔, 37℃, 5ml/dl CO₂ 培养至出现肉眼可见的克隆时收集细胞, 4g/dl 多聚甲醛固定 20 min, 0.1g/dl 结晶紫染色 30 min, 观察拍照分析。

1.3.5 Transwell 细胞迁移实验: 根据 Transwell 细胞迁移检测试剂盒说明书进行, 无血清 DMEM 培养液重悬细胞至浓度 1×10^5 /ml, 在 Transwell 小室上室加入细胞悬液, 下室加入含 15ml/dl 胎牛血清的 DMEM 培养液 500 μ l, 培养 24 h, 取出小室, 吸干上室培养液, 4g/dl 多聚甲醛固定 30 min, 0.05g/dl 结晶紫染色 30 min, 擦除上室多余细胞, 晾干, 倒置光学显微镜下观察细胞并计数。

1.3.6 双荧光素酶报告基因实验: 取对数生长期各组细胞接种到 6 孔板, 将含有 miR-124-3p 结合位点的 hsa_circ_0006950-3'UTR-wt 野生型和 3'UTR-mut 突变型荧光质粒及 EZH2-3'UTR-wt 野生型和 3'UTR-mut 突变型荧光质粒分别转染至待测细胞中, 采用荧光素酶测定系统测量各组细胞荧光素酶活性, 实验重复 3 次取平均值。

1.3.7 蛋白免疫印迹 (Western blot) 实验: 取转染后各组待测细胞加入细胞裂解液置于冰上裂解, 提取总蛋白, BCA 法检测其浓度; 取蛋白样品约 20mg, 通过 SDS-PAGE 凝胶试剂盒进行电泳分离, 转膜, 5g/dl 脱脂牛奶封闭 2 h, 洗膜 3 次, 加入相应一抗, 4℃孵育过夜; 次日加入二抗, 孵育 2 h, 洗膜 3 次, ECL 化学显色, 凝胶成像系统观察拍照。

1.3.8 生物信息学分析: circRNA 和 miRNA 之间的靶向作用关系通过 Circular RNA Interactome 网站进行预测。miRNAs 和 mRNAs 之间的靶向作用关系利用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 网站进行预测。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析, 实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间差异比较采用独立样本 *t* 检验, 癌组织及癌旁正常组织中差异比较采用配对 *t* 检验; 多组间差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌组织及细胞中 hsa_circ_0006950 表达检测 qRT-PCR 检测发现, 20 例临床胰腺癌组织及癌旁对应正常组织中 hsa_circ_0006950 相对表达分别为 3.57 ± 0.52 和 1.01 ± 0.03 , 差异有统计学意义 ($t=21.980$, $P < 0.001$)。同时检测发现, 相对人正常胰腺导管上皮细胞系 HPDE6-C7 (1.00 ± 0.01),

PC细胞PANC-1(7.51±0.62),AsPC-1(5.26±0.45),Capan-2(3.69±0.38),SW1990(3.25±0.32)和BXP-3(3.86±0.35)中hsa_circ_0006950相对表达均显著上调,差异有统计学意义($F=88.585$, $P<0.001$),提示胰腺癌组织及细胞中hsa_circ_0006950表达显著上调。PANC-1细胞表达上调最为显著,故选择其进行后续研究。

2.2 干扰hsa_circ_0006950抑制PC细胞的增殖、克隆形成及迁移 qRT-PCR检测发现,相比NC对照组(1.01±0.03),si-circRNA组细胞中hsa_circ_0006950相对表达(0.24±0.02)明显降低,差异有统计学意义($t=36.990$, $P<0.001$),提示干扰hsa_circ_0006950表达的细胞系构建成功,可用于后续实验。CCK-8法、克隆斑点形成实验和Transwell实验检测(见表2)显示:转染si-circRNA组细胞增殖A值、克隆形成率及细胞迁移数目均较对照组明显降低,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。提示干扰hsa_circ_0006950表达能够显著抑制胰腺癌细胞的增殖、克隆形成及迁移。

表2 干扰hsa_circ_0006950对PC细胞增殖、克隆形成及迁移的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

项目	NC组	si-circRNA组	t	P
增殖A值	1.83±0.42	0.79±0.17	3.976	0.016
克隆形成率(%)	78.76±13.65	51.42±5.84	3.190	0.033
细胞迁移数目(个)	218.21±31.57	104.64±24.73	4.905	0.008

2.3 hsa_circ_0006950和miR-124-3p靶向调控关系验证 检索生物信息学数据库发现,miR-124-

表3 hsa_circ_0006950和miR-124-3p靶向调控关系验证($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

基因	NC组	mimic组	inhibitor组	si-circRNA组	si-circRNA+inhibitor组	F	P
miR-124-3p	1.02±0.02	2.73±0.67	0.25±0.04	3.52±0.41	2.89±0.53	30.560	<0.001

2.4 miR-124-3p对PC细胞增殖、克隆形成及迁移的影响 见表4。细胞实验检测显示,与NC组相比miR-124-3p过表达明显抑制了PC细胞的增殖、克隆形成和迁移($t=5.378$, 14.317, 3.390, 均 $P<0.05$);下调miR-124-3p表达则明显促进了细胞的增殖、克隆形成和迁移($t=5.867$, 6.663, 2.523, 均 $P<0.05$)。

2.5 miR-124-3p和EZH2靶向调控关系验证 经检索数据库发现,EZH2与miR-124-3p的3'UTR区存在结合位点,见图2A,推测其可能是miR-124-3p的下游靶标。研究将包含miR-124-3p结合位点在内的EZH2 3'UTR-wt野生型和3'UTR-mut突变型荧光素酶报告载体与过表达miR-124-3p mimic片段共转染到PANC-1细胞中,通过双荧光素酶报告基因

3p与hsa_circ_0006950的3'UTR区存在结合位点,见图1。推测其可能是hsa_circ_0006950的下游靶点。研究将包含miR-124-3p结合位点在内的hsa_circ_0006950 3'UTR-wt野生型和3'UTR-mut突变型荧光素酶报告载体与过表达miR-124-3p mimic片段共转染到PANC-1细胞中,经双荧光素酶报告基因实验检测显示,转染miR-124-3p mimic组hsa_circ_0006950野生型荧光素酶活性为42.56±3.66,较转染miR-NC组(100.01±6.12)明显降低($t=13.954$, $P<0.001$);而hsa_circ_0006950突变型荧光素酶活性为98.79±4.97,较转染miR-NC组(100.02±5.35)无明显变化($t=0.292$, $P=0.785$),证实miR-124-3p是hsa_circ_0006950的下游靶基因。

进一步通过qRT-PCR检测显示,与NC组相比,转染miR-124-3p mimic组miR-124-3p表达明显升高($t=4.937$, $P<0.001$);转染miR-124-3p inhibitor组miR-124-3p表达明显降低($t=2.338$, $P<0.001$);转染干扰si-circRNA组miR-124-3p表达明显升高($t=7.217$, $P<0.001$);共转染inhibitor后si-circRNA对miR-124-3p表达的促进作用被逆转($t=2.281$, $P<0.05$),见表3。表明hsa_circ_0006950靶向负调控miR-124-3p。

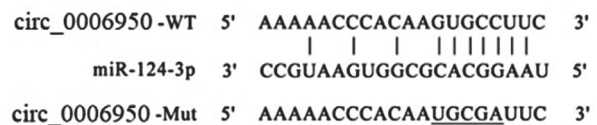


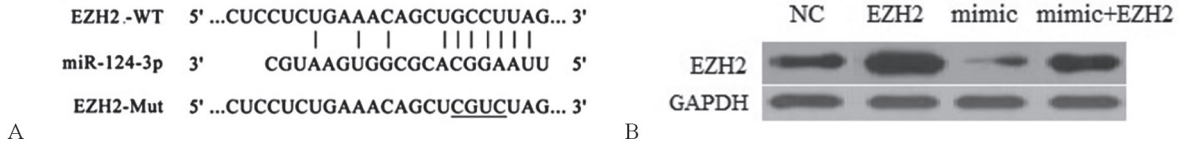
图1 生物信息学数据库检索hsa_circ_0006950和miR-124-3p存在结合位点

实验检测显示,转染miR-124-3p mimic组EZH2野生型荧光素酶活性为49.57±5.62,较转染miR-NC组(100.02±8.24)明显降低($t=8.761$, $P<0.001$);EZH2突变型荧光素酶活性为99.02±6.74,较转染miR-NC组(100.01±6.89)无明显变化($t=0.178$, $P=0.867$),证实EZH2是miR-124-3p的下游靶基因。

进一步通过qRT-PCR和Western blot检测显示,与NC组相比,EZH2过表达组EZH2表达明显升高($t=5.391$, $P<0.001$);miR-124-3p过表达组EZH2表达明显降低($t=3.076$, $P<0.001$);在miR-124-3p过表达组共转染过表达EZH2后,EZH2表达被逆转恢复($t=6.890$, $P<0.001$),见图2B和表5。表明miR-124-3p靶向负调控EZH2表达。

表4 miR-124-3p对PC细胞增殖、克隆形成及迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	NC组	mimic组	inhibitor组	F	P
增殖A值	1.75 ± 0.47	0.21 ± 0.16	3.43 ± 0.35	63.262	<0.001
克隆形成率(%)	81.54 ± 2.33	47.85 ± 4.13	97.22 ± 1.56	229.838	<0.001
细胞迁移数目(个)	202.36 ± 31.45	118.74 ± 24.65	264.61 ± 33.79	17.608	0.003



A. 生物信息学数据库检索 miR-124-3p 和 EZH2 存在结合位点; B. Western blot 检测 EZH2 蛋白表达

图2 miR-124-3p 靶基因的预测及调控关系验证

表5 miR-124-3p 和 EZH2 靶向调控关系验证 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

基因	NC组	EZH2组	mimic组	mimic+EZH2组	F	P
EZH2	1.01 ± 0.01	3.24 ± 0.83	0.16 ± 0.02	2.96 ± 0.58	26.226	< 0.001

注:与NC组相比,***补充值 $P < 0.001$;与mimic组相比,补充值# $P < 0.001$ 。

2.6 miR-124-3p 调控 EZH2 对 PC 细胞增殖、克隆形成及迁移的影响 见表6。细胞实验检测显示, EZH2 过表达明显促进了 PC 细胞的增殖、克隆形成及迁移能力 ($P < 0.001$); 在 miR-124-3p 过表

达组共转染过表达 EZH2 后, miR-124-3p 对 PC 细胞增殖、克隆形成及迁移的抑制作用被逆转 ($P < 0.001$), 说明过表达 EZH2 可逆转过表达 miR-124-3p 对胰腺癌细胞生物学行为的影响。

表6 miR-124-3p 调控 EZH2 对 PC 细胞增殖、克隆形成及迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	NC组	EZH2组	mimic组	mimic+EZH2组	F	P
增殖A值	1.75 ± 0.47	3.64 ± 0.57	0.21 ± 0.16	2.38 ± 0.36	34.810	<0.001
克隆形成率(%)	81.54 ± 2.33	98.39 ± 1.31	47.85 ± 4.13	69.52 ± 3.41	151.292	<0.001
细胞迁移数目(个)	202.36 ± 31.45	268.05 ± 24.79	118.74 ± 24.65	195.35 ± 27.27	15.229	0.001

2.6 hsa_circ_0006950 调控 miR-124-3p/EZH2 参与 PC 细胞克隆形成及迁移 见表7。克隆形成实验及 Transwell 实验检测显示, 在 si-circRNA 组细胞中同时下调 miR-124-3p 或过表达 EZH2 后, 干扰 hsa_circ_0006950 对细胞克隆形成及迁移的抑制作用被

逆转恢复, 表明 hsa_circ_0006950 可能通过靶向下调 miR-124-3p 表达, 从而上调 EZH2 表达, 促进胰腺癌细胞的增殖、克隆形成及迁移, 参与胰腺癌的发生发展。

表7 hsa_circ_0006950 调控 miR-124-3p/EZH2 对克隆形成率及迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

项目	NC组 ^①	si-circRNA组 ^②	si-circRNA+inhibitor组 ^③	si-circRNA+EZH2组 ^④	F	P
克隆形成率(%)	78.76 ± 13.65	51.42 ± 5.84***	80.68 ± 2.25#	77.89 ± 4.76#	9.335	0.005
细胞迁移数目(个)	218.21 ± 31.57	104.64 ± 24.73***	216.34 ± 37.85#	220.69 ± 33.58#	9.325	0.005

注:① vs ②: $t_{\text{克隆率}}=4.251, t_{\text{迁移数目}}=4.309$, 均 $P < 0.01$; ② vs ③: $t_{\text{克隆率}}=4.550, t_{\text{迁移数目}}=4.238$, 均 $P < 0.01$; ② vs ④: $t_{\text{克隆率}}=4.116, t_{\text{迁移数目}}=4.403$, 均 $P < 0.01$ 。

3 讨论

近年对分子生物学的研究为肿瘤的诊治探寻了新的方向, 发现肿瘤的发生发展过程中非编码 RNA 发挥重要作用, circRNA 能够通过 miRNA 海绵, RNA 结合蛋白等形式作为竞争性内源 RNA (ceRNA) 参与肿瘤多种生物学行为, 使得 circRNA 和 miRNA 的研究成为肿瘤相关机制的研究重点和热点^[9-10]。越来越多的研究也表明,

circRNA/miRNA/mRNA 调控系统在包括胰腺癌在内的多种人类恶性肿瘤进展中起着重要的调控作用^[11-12], 例如肿瘤细胞的增殖、转移及化疗耐药等多个过程。如既往研究发现, circRNA_0005529 通过调控 miR-527/Sp1 轴促进了胃癌的生长和转移^[13]。circCDYL 调控 miRNA-105-5p 参与了结肠癌细胞的发生发展^[14]。circRNA-UCK2 增加 TET1 通过海绵 miRNA-767-5p 抑制前列腺癌细胞的增

殖和侵袭^[15]。circRNA_101237作为miRNA-490-3p海绵吸附MAPK1表达促进了非小细胞肺癌(NSCLC)进展^[16]。胰腺癌研究中, circ-PDE8A通过miR-338/MACC1/MET信号轴促进PC侵袭^[17];抑制hsa_circ_0000977促进了miR-874-3p表达,进而抑制了PLK1介导的胰腺癌发展^[18]。hsa_circRNA_0007334通过作为miRNA海绵促进胰腺癌中MMP7和COL1A1的表达,参与调控癌细胞的增殖、迁移及凋亡^[19]。证实circRNA作为miRNA海绵,通过调控miRNA表达并影响miRNA与其靶基因的结合,可引起基因表达失调,诱发肿瘤,是重要的肿瘤研究分子标志物^[9,11]。因此积极探究circRNA发挥作用的机制及其途径,对癌症的防治意义显著。

hsa_circ_0006950是研究通过高通量筛选出来的胰腺癌异常表达circRNA,本研究发现,胰腺癌组织及细胞系中hsa_circ_0006950显著上调,下调其表达明显抑制了胰腺癌细胞的增殖、克隆形成及迁移能力。竞争内源性RNA(ceRNA)假说认为,环状RNA, lncRNA可通过与miRNA元件结合来调控基因表达,提供了一种新的转录后调控网络机制^[20-21]。研究利用生物信息学分析发现,hsa_circ_0006950下游结合靶点有很多,包括miR-1180, miR-1184, miR-1205, miR-1229, miR-1238, miR-127-5p, 146b-3p, miR-192和miR-124-3p等,其中miR-124-3p与hsa_circ_0006950之间的结合位点具有高度保守性。研究表明,miR-124-3p也是重要的肿瘤基因,其表达失调与肿瘤的发生发展有关,证实在众多恶性肿瘤中miR-124-3p是重要的肿瘤抑制基因,对多种肿瘤增殖、迁移具有抑制作用^[22-23]。有证据显示,肝癌中miR-124-3p特异性沉默会阻滞细胞周期在G1期,引起肝癌细胞凋亡^[24]。XU等^[25]报道,鼻咽癌中miR-124-3p靶向STAT3可抑制癌细胞生长和转移。miR-124-3p通过靶向MGAT5调控FGF2/EGFR通路抑制肺腺癌细胞培美曲塞耐药^[26]。本研究经荧光素酶报告实验证实miR-124-3p是hsa_circ_0006950的结合靶点,hsa_circ_0006950靶向负调控miR-124-3p表达;同时发现miR-124-3p过表达抑制了胰腺癌细胞的克隆形成及迁移,miR-124-3p下调能够恢复干扰hsa_circ_0006950对胰腺癌细胞增殖、迁移的抑制作用。表明胰腺癌发生发展过程中miR-124-3p作为抑癌基因存在,hsa_circ_0006950可通过靶向调控miR-124-3p表达发挥作用,促进胰腺癌恶性进展。

研究证实, circRNA通过充当ceRNA可调控miRNA表达, miRNA则可通过调控不同靶基因影响疾病进展^[11]。miRNA通过与靶mRNA的3'

端非翻译区直接作用,在转录后水平调控肿瘤细胞生物学过程,参与肿瘤的发生^[10]。基于circRNA/miRNA/mRNA调控网络,本研究利用TargetScan网站预测并经荧光素酶报告实验证实EZH2是miR-124-3p的作用靶点之一。据报道, EZH2作为一种致癌基因,可调节肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭等生物学行为,且可调控Wnt, NF- κ B/ JAK2/STAT3等多个重要信号通路,被证实在多种癌组织中异常高表达,与肿瘤恶性程度及预后关系密切,是重要的肿瘤预后标志物及治疗靶点^[27-28]。而本研究证实, miR-124-3p靶向负调控EZH2,以miR-124-3p为中心三者间存在两两结合位点,即组成了hsa_circ_0006950/miR-124-3p/EZH2靶向调控网络;且证实在干扰hsa_circ_0006950或过表达miR-124-3p条件下,过表达EZH2可以逆转恢复hsa_circ_0006950和miR-124-3p对PC细胞增殖、迁移的抑制作用,提示hsa_circ_0006950在胰腺癌中发挥作用的分子机制可能是通过下调miR-124-3p表达而上调EZH2表达来完成,miR-124-3p/EZH2轴在hsa_circ_0006950调控PC发生发展的过程中发挥重要作用。然而肿瘤发生发展机制复杂,其中涉及信号通路的激活或失活,故更具体的作用机制还需进一步研究阐明。

综上,胰腺癌中hsa_circ_0006950表达上调,抑制其表达能够抑制胰腺癌细胞的增殖和迁移,其可能通过靶向下调miR-124-3p表达,进而上调EZH2表达来发挥作用参与PC的发生发展。下调hsa_circ_0006950是一个潜在的胰腺癌防治靶点,对hsa_circ_0006950/miR-124-3p/EZH2轴进一步的研究可能为开发新的PC治疗策略提供基础。

参考文献:

- [1] BESSELINK M. The value of international collaboration in pancreatic cancer research: EURECCA[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2019, 26(3): 705-706.
- [2] MCGUIGAN A, KELLY P, TURKINGTON R C, et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2018, 24(43): 4846-4861.
- [3] CHEN Liang, SHAN Ge. CircRNA in cancer: Fundamental mechanism and clinical potential[J]. *Cancer Letters*, 2021, 505(11): 49-57.
- [4] 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.
- [5] ZHANG Zhen, PAN Qing, LIU Xu, et al. Research progress of the relationship between circular RNA and tumorigenesis [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2018, 33(02): 157-159, 164.
- [5] CHEN Yan, LI Zhonghu, ZHANG Mengyun, et al.

- Circ-ASH2L promotes tumor progression by sponging miR-34a to regulate Notch1 in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1): 466.
- [6] QIAO Yanwei, ZHAO Xuequn, LIU Jun, et al. Epstein-Barr virus circRNAome as host miRNA sponge regulates virus infection, cell cycle, and oncogenesis[J]. *Bioengineered*, 2019, 10(1): 593-603.
- [7] LIU A, XU J. Circ_03955 promotes pancreatic cancer tumorigenesis and Warburg effect by targeting the miR-3662/HIF-1 α axis[J]. *Clinical & Translational Oncology*, 2021, 23(9): 1905-1914.
- [8] LIU Lei, LIU Fubao, HUANG Mei, et al. Circular RNA ciRS-7 promotes the proliferation and metastasis of pancreatic cancer by regulating miR-7-mediated EGFR/STAT3 signaling pathway[J]. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2019, 18(6): 580-586.
- [9] LIN Jun, ZHANG Yi, ZENG Xiaochang, et al. CircRNA circRIMS acts as a microRNA sponge to promote gastric cancer metastasis[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(36): 23237-23246.
- [10] SHANMUGAPRIYA N, SASIDHARAN S. MicroRNA deregulation and cancer and medicinal plants as microRNA regulator[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2020, 10(2): 47-53.
- [11] XIONG Dandan, DANG Yiwu, LIN Peng, et al. A circRNA-miRNA-mRNA network identification for exploring underlying pathogenesis and therapy strategy of hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2018, 16(1): 220.
- [12] KHAN S, JHA A, PANDA A C, et al. Cancer-associated circRNA-miRNA-mRNA regulatory networks: a meta-analysis[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, 8: 671309.
- [13] ZHANG Xing, YANG Hongwei, JIA Yingdong, et al. CircRNA_0005529 facilitates growth and metastasis of gastric cancer via regulating miR-527/Sp1 axis[J]. *BMC Molecular and Cell Biology*, 2021, 22(1): 6.
- [14] CUI Wei, DAI Jinhua, MA Jianbo, et al. CircCDYL/microRNA-105-5p participates in modulating growth and migration of colon cancer cells[J]. *General Physiology and Biophysics*, 2019, 38(6): 485-495.
- [15] XIANG Zhendong, XU Chengdang, WU Gang, et al. CircRNA-UCK2 increased TET1 inhibits proliferation and invasion of prostate cancer cells via sponge miRNA-767-5p[J]. *Open Medicine (Warsaw, Poland)*, 2019, 14: 833-842.
- [16] ZHANG Zhiye, GAO Xiaohui, MA Mingying, et al. CircRNA_101237 promotes NSCLC progression via the miRNA-490-3p/MAPK1 axis[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 9024.
- [17] LI Zhonghu, WU Yanfang, LI Jie, et al. Tumor-released exosomal circular RNA PDE8A promotes invasive growth via the miR-338/MACC1/Met pathway in pancreatic cancer[J]. *Cancer Letters*, 2018, 432: 237-250.
- [18] HUANG Wenjie, WANG Yunchao, LIU Songsong, et al. Silencing circular RNA hsa_circ_0000977 suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma progression by stimulating miR-874-3p and inhibiting PLK1 expression[J]. *Cancer Letters*, 2018, 422: 70-80.
- [19] YANG Jinghui, CONG Xianling, REN Ming, et al. Circular RNA hsa_circRNA_0007334 is predicted to promote MMP7 and COL1A1 expression by functioning as a miRNA sponge in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Journal of Oncology*, 2019, 2019: 7630894.
- [20] TANG Qing, HANN S S. Biological roles and mechanisms of circular RNA in human cancers[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2020, 13: 2067-2092.
- [21] CONNERTY P, LOCK R B, DE BOCK C E. Long non-coding RNAs: Major regulators of cell stress in cancer[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 285.
- [22] LIU Feng, HU Hongjuan, ZHAO Jianfu, et al. MiR-124-3p acts as a potential marker and suppresses tumor growth in gastric cancer[J]. *Biomedical reports*, 2018, 9(2): 147-155.
- [23] ZO R B, LONG Ziwei. MiR-124-3p suppresses bladder cancer by targeting DNA methyltransferase 3B[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 234(1): 464-474.
- [24] 李敬霞, 刘艳. LncRNA PTPRG-AS1 通过靶向 miR-124-3p 调控肝癌细胞凋亡和放射敏感性的研究机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(10): 1676-1682.
- LI Jingxia, LIU Yan. LncRNA PTPRG-AS1 regulates apoptosis and radiosensitivity of hepatoma cells by targeting miR-124-3p [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2021, 29(10): 1676-1682.
- [25] 许珊, 李巍, 赵宁, 等. MiRNA-124-3p 通过靶向 STAT3 抑制鼻咽癌细胞生长和转移[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(18): 2866-2874.
- XU Shan, LI Wei, ZHAO Ning, et al. MiRNA-124-3p inhibits the growth and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting STAT3[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2016, 24(18): 2866-2874.
- [26] CAI Jundong, HUANG Jiuning, WANG Wulong, et al. MiR-124-3p regulates FGF2-EGFR pathway to overcome pemetrexed resistance in lung adenocarcinoma cells by targeting MGAT5[J]. *Cancer Management and Research*, 2020, 12: 11597-11609.
- [27] PHAM V, PITTI R, TINDELL C A, et al. Proteomic analyses identify a novel role for EZH2 in the initiation of cancer cell drug tolerance[J]. *Journal of Proteome Research*, 2020, 19(4): 1533-1547.
- [28] GAN Lu, YANG Yanan, LI Qian, et al. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential[J]. *Biomarker Research*, 2018, 6: 10.

收稿日期: 2021-11-09

修回日期: 2022-02-26