

hsa_circ_0000231 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路影响舌癌细胞的增殖和迁移

陈庆文¹ 王东琴¹ 丁必骁¹ 汤明明² 李晓光³ 周杰玉⁴ 徐克⁵ 方峥嵘⁶
韩靓² 吴昊¹

¹南通大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科,南通 226000;²南通大学附属肿瘤医院头颈外科,南通 226361;³上海交通大学医学院附属第九人民医院颌面头颈肿瘤科,南通 200011;⁴上海交通大学医学院附属第九人民医院耳鼻咽喉头颈外科,南通 200011;⁵南通大学附属医院口腔颌面外科,南通 226000;⁶南通瑞慈医院耳鼻咽喉头颈外科,南通 226010

陈庆文现在南通大学附属肿瘤医院头颈外科,南通 226361

通信作者:韩靓,Email: hl61697@126.com;吴昊,Email: entwuhao@163.com

【摘要】目的 探讨 hsa_circ_0000231 在舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)发生、发展中的作用机制。**方法** 收集 2014 年 12 月至 2017 年 12 月在南通大学附属医院和南通大学附属肿瘤医院收治并进行手术的舌癌患者 60 例(男 32 例,女 28 例,年龄 36~84 岁),唾液标本来自同时期的 10 例舌癌患者,以及 10 名健康志愿者(男 5 名,女 5 名,年龄 40~75 岁),3 株舌癌细胞为 TSCC 常用工具细胞(CAL-27、Tca-8113、HN-4)。采用实时荧光定量反转录聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 60 对新鲜配对 TSCC 组织、10 对唾液标本及 3 株 TSCC 细胞系中的 hsa_circ_0000231 的表达;结合随访资料,分析 hsa_circ_0000231 相对表达量与患者临床病理特征及预后的关系。选择敲低效率最高的细胞行蛋白免疫印迹法(WB)、细胞计数试验(cell counting kit-8, CCK-8)、克隆形成、Transwell 侵袭和划痕试验,研究 TSCC 细胞的增殖、侵袭、转移及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的能力;使用 Wnt/ β -catenin 通路激活剂 LiCl 与 TSCC 细胞共培养, WB 检测并研究 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达变化。裸鼠成瘤实验比较皮下移植瘤的生长。使用 SPSS 25.0 统计分析软件行数据分析,组间比较采用 t 检验和 χ^2 检验。**结果** hsa_circ_0000231 在 TSCC 患者组织、唾液标本及细胞系 CAL-27、Tca-8113 和 HN-4 中高表达,配对癌旁组织、健康人唾液标本及正常人类口腔黏膜细胞(human oral keratinocytes, HOK)中低表达(P 值均 <0.05)。单因素分析显示 hsa_circ_0000231 表达水平、肿瘤分化程度和 T 分级与 TSCC 患者的生存预后相关(P 值均 <0.05)。多因素 Cox 风险回归模型分析显示 hsa_circ_0000231 表达水平($\chi^2=5.77, P=0.016$)和 T 分级($\chi^2=5.27, P=0.029$)是 TSCC 患者预后不良的独立影响因子。WB 显示,敲低 hsa_circ_0000231 表达可以显著提高 CAL-27 和 Tca-8113 细胞中 EMT 相关蛋白即 E-钙黏蛋白的表达,并降低 Snail、N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达。与阴性对照组相比,干扰组细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白 β -catenin、C-myc、Bcl-2、MMP-9 和 CyclinD1 的表达被抑制,使用 Wnt/ β -catenin 通路激活剂 LiCl 与干扰组 TSCC 细胞共培养后,干扰组细胞中上述蛋白的表达趋势被逆转;细胞功能学证实敲低 hsa_circ_0000231 表达可以显著抑制 CAL-27 和 Tca-8113 细胞增殖、侵袭和转移能力;使用 LiCl 逆转了 hsa_circ_0000231 促进 CAL-27 和 Tca-8113 细胞迁移和侵袭的能力。裸鼠成瘤实验显示使用 LiCl 处理过的皮下移植瘤的质量和体积明显大于 hsa_circ_0000231 敲低组。**结论** hsa_circ_0000231 是

DOI: 10.3760/cma.j.cn115330-20211209-00790

收稿日期 2021-12-09 本文编辑 武琼

引用本文:陈庆文,王东琴,丁必骁,等. hsa_circ_0000231 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路影响舌癌细胞的增殖和迁移[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2022, 57(10): 1230-1239. DOI: 10.3760/cma.j.cn115330-20211209-00790.



中华医学会杂志社
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



TSCC 的独立预后因子, hsa_circ_0000231 可以通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进舌癌细胞的增殖、侵袭和转移。

【关键词】 舌肿瘤; 环状 RNA; hsa_circ_0000231; 非侵入性; 预后

基金项目: 南通市社会民生科技计划重点项目 (MS22018011); 南通市科技计划项目 (MS12021097); 南通市基础科学研究项目 (JCZ2022069)

hsa_circ_0000231 affects the progression of tongue squamous cell carcinoma by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway

Chen Qingwen¹, Wang Dongqin¹, Ding Bixiao¹, Tang Mingming², Li Xiaoguang³, Zhou Jieyu⁴, Xu Ke⁵, Fang Zhengrong⁶, Han Liang², Wu Hao¹

¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, China; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Tumor Hospital of Nantong University, Nantong 226361, China; ³Department of Maxillofacial Head and Neck Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; ⁴Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; ⁵Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, China; ⁶Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Nantong Rich Hospital, Nantong 226010, China
Chen Qingwen is working at the Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Tumor Hospital of Nantong University, Nantong 226361, China

Corresponding author: Han Liang, Email: hl61697@126.com; Wu Hao, Email: entwuhao@163.com

【Abstract】 Objective To explore the action mechanism of hsa_circ_0000231 in the occurrence and development of tongue squamous cell carcinoma (TSCC). **Methods** Tissue samples of 60 TSCC patients were examined. The patients, including 32 males and 28 females, aged from 36 to 84 years old, underwent surgery in the Affiliated Hospital of Nantong University and Affiliated Tumor Hospital of Nantong University from December 2014 to December 2017. Saliva samples were obtained from healthy volunteers (5 males and 5 females, aged from 40 to 75 years old) and 10 TSCC patients. The TSCC cell lines (CAL-27, Tca-8113 and HN-4) were used. The expression levels of hsa_circ_0000231 in 60 pairs of freshly matched TSCC and para-carcinoma tissue samples, 10 pairs of saliva samples and 3 TSCC cell lines were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). hsa_circ_0000231 gene interference and lentiviral transfection were constructed, hsa_circ_0000231 in TSCC cell lines CAL-27 and Tca-8113 was knocked down, and the expressions of hsa_circ_0000231 in hsa_circ_0000231 interference group (sh-circ) and no-load lentivirus group (negative control) were tested with qRT-PCR. Cells with the highest knock-down efficiency were selected for CCK-8 test, colony formation assay, transwell invasion assay and scratch assay. The expressions of EMT-related proteins including E-cadherin, snail protein, N-cadherin and vimentin and proteins related to Wnt/ β -catenin signaling pathway including β -catenin, C-myc, Bcl-2, MMP-9 and Cyclin D1 were measured by western blot. After TSCC cells in the interference group were co-cultured with Wnt/ β -catenin pathway activator LiCl, the expressions of above proteins were re-measured by western blot. TSCC cells in interference group and control group were subcutaneously injected into nude mice to compare the effect of hsa_circ_0000231 knockdown on the growths of the tumors grafted subcutaneously in the nude mice. Statistical analysis software 25.0 was used for data analysis, and *t*-test or chi-square test was used for comparison between groups. **Results** hsa_circ_0000231 was highly expressed in the tissue and saliva samples of TSCC patients and cell lines CAL-27, Tca-8113 and HN-4, but lowly expressed in paired para-carcinoma tissues, saliva samples of healthy people and normal human oral keratinocytes (all $P < 0.05$). Log-rank univariate analysis showed that hsa_circ_0000231 expression level, tumor differentiation degree and T stage were related to the survival of TSCC patients (all $P < 0.05$). Multivariate Cox risk regression model analysis suggested that hsa_circ_0000231 expression level ($\chi^2 = 5.77, P = 0.016$) and T stage ($\chi^2 = 5.27, P = 0.029$) were independent factors for the poor prognosis of TSCC patients. Western blot showed the expressions of snail protein, N-cadherin and vimentin were down-regulated, but E-cadherin was up-regulated in interference group compared with control group. In interference group, the expressions of β -catenin, C-myc, Bcl-2, MMP-9 and CyclinD1 were down-regulated, which were reversed after TSCC cells were co-cultured with LiCl. The knockdown of hsa_circ_0000231 reduced the proliferation, invasion and metastasis abilities of CAL-27 and Tca-8113 cells, which were



reversed after TSCC cells were co-cultured with LiCl. The growth rate and volume of the tumors grafted subcutaneously in interference group using LiCl were greater than those in negative control group. **Conclusion** hsa_circ_0000231 is an independent prognostic factor of TSCC. Highly expressed hsa_circ_0000231 can promote the proliferation, invasion and metastasis of TSCC cells.

【Key words】 Tongue neoplasms; Circular RNA; hsa_circ_0000231; Non-invasive; Prognosis

Fund program: Nantong Social Science and Technology Key Project (MS22018011); Nantong Science and Technology Plan Project (MS12021097); Nantong Science and Technology Plan Project (JCZ2022069)

舌癌是恶性程度高、治疗效果差的头颈部恶性肿瘤,如能通过较为简易的临床采样获得敏感的针对性生物标志物,对于该疾病的诊断、治疗意义重大,临床应用前景广阔。环状 RNA (circRNA) 是一类广泛存在于哺乳动物体内的非编码转录调节物^[1],其性质稳定,不易降解,大多数可以在转录或转录后发挥调控作用^[2]。在前期研究中,我们通过第二代高通量测序在 3 对新鲜配对的舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)组织中共检测到 12 156 个 circRNA,使用 circBase 数据库和 circ2Trait 疾病数据库对所检测的 circRNA 进行注释并将测序结果上传至 GEO 公共数据库^[3](编号: GSE118750)。以倍数变化 ≥ 2.0 、 P 值 <0.05 作为差异 circRNA 的阈值筛选出 322 个差异表达的 circRNA。hsa_circ_0000231 不仅表达差异明显,对其宿主基因进行基因本体论(gene ontology, GO)功能及京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析,发现其富集于 Wnt 信号通路,由于该通路可促进上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)并与多种恶性肿瘤的发生密切相关,因此我们选定 hsa_circ_0000231 作为研究对象,探讨其在 TSCC 发生、发展过程中的作用及机制。

资料与方法

一、患者和标本

收集 2014 年 12 月至 2017 年 12 月在南通大学附属医院和南通大学附属肿瘤医院收治并进行手术的 60 例舌癌患者的新鲜 TSCC 组织标本和相对应的癌旁组织标本,其中男 32 例,女 28 例,年龄 36~84 岁,唾液标本来自同时期的 10 例舌癌患者,以及 10 名健康志愿者(男 5 名,女 5 名,年龄 40~75 岁)。所有组织标本均由两名病理科主任医师诊断,无其他肿瘤病史,术前未接受化学疗法或放射疗法治疗。标本取材后立即冷冻并储存在液氮

里直至总 RNA 的提取。本研究得到南通大学附属肿瘤医院伦理审查委员会审核并批准(审批号: LW2022017),患者及其家属签署知情同意书。所有动物研究均经南通大学动物实验伦理委员会批准(审批号: S20210130-906)。

二、细胞株和主要试剂

人正常口腔角质细胞(human oral keratinocytes, HOK)购于通派(上海)生物科技有限公司,人 TSCC 细胞 CAL-27 购于吉凯基因(上海),人 TSCC 细胞 Tca-8113 和 HN-4 由上海交通大学医学院附属第九人民医院馈赠。胎牛血清、MEM 培养基、DMEM 培养基和 RPMI-1640 培养基(Gibco, 美国),TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国),反转录试剂盒(Thermo scientific, 上海),ECL 试剂盒(Santa Cruz Biotechnology, 北京),短发卡 RNA(吉凯, 上海),E-钙黏蛋白(CST, 美国)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、Snail、N-钙黏蛋白和波形蛋白(Santa Cruz Biotechnology, 北京),Bcl-2 和 β -catenin(CST, 美国)、MMP-9 和 C-myc(abcam, 英国),CyclinD1(Proteintech, 美国),以上试剂均由南通大学肿瘤医院中心实验室统一采购。

三、唾液样本的收集和总 RNA 的提取

晨起收集唾液样本,收集前禁食、禁酒和禁烟,2 h 内未刷牙、漱口或用牙线洁牙。将唾液样本在 4℃、3 000×g 离心 15 min,收集上清液,将上清液在 4℃、12 000×g 离心 10 min,再次取上清液保存在 -80℃ 下直至提取总 RNA。根据说明书使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。

四、细胞培养

HOK 细胞传代培养于含 10% 胎牛血清的 MEM, CAL-27 和 HN-4 于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, Tca-8113 传代培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中常规培养,所用细胞株传代均未超过 6 个月。



五、实时荧光定量反转录聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试验

采用 Trizol 试剂提取总 RNA, Nanodrop 2000/2000C 分光光度计检测 RNA 浓度和纯度, 使用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA, 分别以 hsa_circ_0000231 和 GAPDH 的特异引物行 qRT-PCR。hsa_circ_0000231 上游引物序列为 5'-GACACGCTCATTTGGTCAT-3', 下游引物序列为 5'-CCCCTTCTGTCAGCCATT-3'; GAPDH 上游引物序列为 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', 下游引物序列为 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 hsa_circ_0000231 的表达, GAPDH 基因的表达作数据标准化参考。根据 qRT-PCR 结果以 hsa_circ_0000231 相对表达量的平均值为界, 等于或大于 hsa_circ_0000231 相对表达量的平均值定义为“高表达”, 低于则被定义为“低表达”^[4], 结合随访资料分析 hsa_circ_0000231 表达与临床病理特征及 TSCC 患者预后的关系。

六、细胞转染

短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 靶向 hsa_circ_0000231 连接区, 靶向序列为 5'-CTGAACAGATAAGGGTTTAAA-3'。添加完全培养基制备的密度为 4×10^4 个/ml 细胞悬液 2 ml 于 6 孔板中。37 °C 培养 24 h, 至细胞汇合度为 20%~30%, 加入病毒和 Hlitrans G 感染增强液 (25 \times), 混匀继续培养 12 h 后更换完全培养基。通过 qRT-PCR 检测和电子荧光显微镜观察选取转染后敲低效率最高的 shRNA 进行后续细胞功能研究。

七、细胞计数 (cell counting kit-8, CCK-8) 试验

以 2×10^3 个细胞/孔接种到 96 孔板, 分别常规培养 1、2、3、4、5 d 后, 每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 试剂。在 37 °C、5% CO₂ 下孵育 2 h 后, 使用 Infinite M200 酶标仪 (Tecan Infinite, 瑞士) 检测 450 nm 处的吸光度值。

八、克隆形成试验

6 孔板覆盖一层 0.6% 的琼脂, 将含有 10^3 个细胞及 0.3% 的琼脂添加到 6 孔板, 37 °C、5% CO₂ 下培养 2 周。固定每孔的菌落数, 用结晶紫染色, 成像并计数。

九、划痕试验

CAL-27 和 Tca-8113 细胞以 5×10^4 /ml 细胞浓度接种于 6 孔板。待细胞融合度达到 80%, 用 10 μ l 移液器枪头划一条直线, 8 h 后拍照。

十、Transwell 侵袭实验

用预冷的无血清培养基以 1:8 的体积比稀释基质胶, 取 100 μ l 加入到预冷的 Transwell 小室中, 37 °C 孵育 2 h 使基质胶凝固。将处理过的细胞重悬于 200 μ l 无血清培养基中, 上室、下室分别加入 600 μ l 完全培养基, 温育 24 h 后, 将膜下侧细胞固定、染色、拍照和计数。

十一、蛋白免疫印迹法 (WB)

使用蛋白裂解缓冲液提取总蛋白, 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜, 与单克隆抗体在 4 °C 封闭过夜, 将膜在室温下二抗孵育 2 h。使用增强化学发光法进行可视化。E-钙黏蛋白、Snail 蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白、GAPDH、 β -catenin、C-myc、Bcl-2、MMP-9 (稀释比例 1:1 000) 和 CyclinD1 (稀释比例 1:5 000)。

十二、裸鼠皮下成瘤实验

4 周龄雌性 BALB/C 裸鼠来源于南通大学动物实验中心。选取 CAL-27、Tca-8113 2 株细胞系进行实验, 裸鼠皮下分别注射浓度为 2×10^7 个/ml 的 sh-NC (舌癌细胞转染空载病毒组)、sh-circ (hsa_circ_0000231 干扰组) 或 sh-circ-LiCl (LiCl 处理干扰组) 癌细胞悬液 100 μ l (每组 4 只小鼠), 每周测量一次瘤块的长径 (a) 和短径 (b), 6 周后终止观察处死裸鼠, 完整解剖裸鼠体内肿瘤组织, 称量肿瘤重量 (g), 并通过以下公式计算肿瘤体积: 体积 = $(a \times b^2)/2$ (mm³)。

十三、统计学分析

使用 SPSS 25.0 统计分析软件行数据分析, 组间比较采用 *t* 检验和 χ^2 检验; Kaplan-Meier 生存分析绘制总生存期和无病生存期曲线; Log-rank 单因素分析单个临床病理参数与 TSCC 患者生存期; 各临床病理参数间的多因素分析采用 Cox 比例风险回归模型, Pearson 相关检验分析成对表达相关性。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、hsa_circ_0000231 在 TSCC 与癌旁组织、唾液标本及细胞系中表达

qRT-PCR 结果显示 hsa_circ_0000231 在 TSCC 组织中的表达显著高于配对癌旁组织。相对于健

康对照, TSCC 患者唾液中 hsa_circ_0000231 呈现高表达。CAL-27、Tca-8113 和 HN-4 细胞中 hsa_circ_0000231 表达均高于 HOK(图 1)。

二、TSCC 患者 hsa_circ_0000231 表达与临床病理参数及预后的关系

qRT-PCR 结果显示 TSCC 组织中 hsa_circ_0000231 相对表达量高于等于均值 1.37 的样本数为 36 例, 低于均值的有 24 例; hsa_circ_0000231 表达与肿瘤大小、T 分级、淋巴结转移和分化程度呈正相关, 而与年龄和性别无关(表 1)。60 例 TSCC 患者中, hsa_circ_0000231 低表达组 3 年总生存率为 83.34%, 3 年无病生存率为 77.92%, 均显著高于 hsa_circ_0000231 高表达组(3 年总生存率为 36.11%, 3 年无病生存率为 33.33%), Kaplan-Meier 生存函数可见高表达 hsa_circ_0000231 的 TSCC 患者预后较差(图 2)。Log-rank 单因素分析显示, 分化程度、T 分级和 hsa_circ_0000231 的表达和 TSCC 患者预后相关; 多变量分析显示 hsa_circ_0000231 表达上调和 T 分级是 TSCC 患者预后不良的独立预后因素(表 2)。

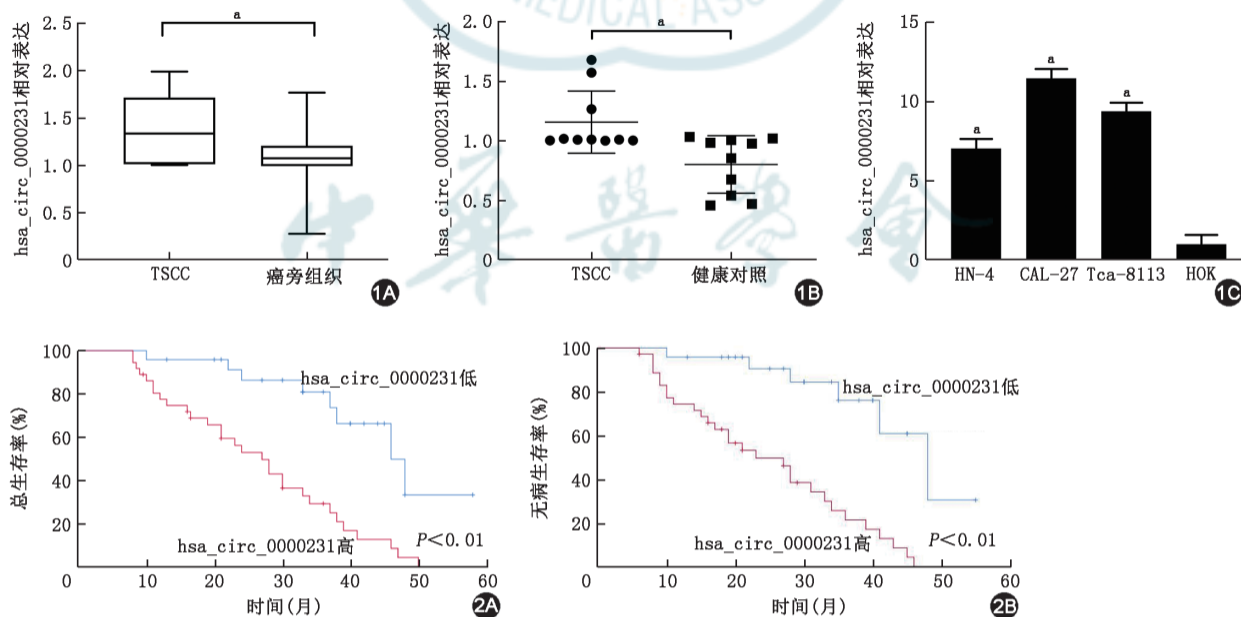
三、hsa_circ_0000231 表达对 TSCC 细胞表型的影响

构建 shRNA 敲低 hsa_circ_0000231 表达的

CAL-27 和 Tca-8113 细胞模型, qRT-PCR 和荧光电子显微镜检测 shRNA 转染后的敲低效率, 结果显示 sh-circ-2 可达到的最高敲除效率为 85%, 选取 sh-circ-2 行后续实验。CCK8 和克隆形成实验显示敲低 hsa_circ_0000231 表达可以显著降低 CAL-27 和 Tca-8113 细胞增殖和集落形成能力(图 3)。划痕实验和 Transwell 侵袭实验显示敲低 hsa_circ_0000231 表达抑制了 CAL-27 和 Tca-8113 细胞的迁移和侵袭能力。WB 检测 EMT 相关蛋白结果显示敲低 hsa_circ_0000231 表达可以显著增加 CAL-27 和 Tca-8113 细胞中 E-钙黏蛋白的表达, 降低 Snail、N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达(图 4)。

四、hsa_circ_0000231 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路影响 TSCC 细胞的表型

敲低 hsa_circ_0000231 表达后 CAL-27 和 Tca-8113 细胞中 β -catenin、C-myc、Bcl-2、MMP-9 和 CyclinD1 的表达均降低。应用 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活剂——20mM LiCl 处理干扰组细胞 24 h 后, WB 检测结果显示, 与干扰组相比, LiCl 处理后的细胞中上述蛋白的表达上调, LiCl 逆转了敲低 hsa_circ_0000231 表达所引起的 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达下调的趋势(图 5A、5B)。划痕实验和 Transwell 侵袭实验显示使用 Wnt/



注: 实时荧光定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)数据通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行分析, 用 GAPDH 基因的表达作数据标准化的参考, 数据表示为平均值 \pm 标准误, TSCC 为舌鳞状细胞癌, * $P < 0.05$

图 1 qRT-PCR 验证 hsa_circ_0000231 的差异表达 A: TSCC 组织和癌旁组织中 hsa_circ_0000231 的相对表达; B: 10 例 TSCC 患者和 10 例健康对照者唾液中 hsa_circ_0000231 的表达; C: hsa_circ_0000231 在 TSCC 细胞系和人正常口腔角质细胞(HOK)中的相对表达
图 2 hsa_circ_0000231 表达水平与 TSCC 患者生存预后的关系函数 A: hsa_circ_0000231 的表达和 TSCC 患者总生存率的关系; B: hsa_circ_0000231 的表达和 TSCC 患者无病生存率的关系



表 1 临床病理指标与舌鳞状细胞癌组织中 hsa_circ_0000231 表达的关系

临床参数	例数(n=60)	hsa_circ_0000231 表达[n(%)]		t 值	P 值
		低(n=24)	高(n=36)		
性别				-0.75	0.454
男	32	12(37.5)	20(62.5)		
女	28	12(42.9)	16(57.1)		
年龄(岁)				0.31	0.760
<60	22	10(45.4)	12(55.6)		
≥60	38	14(36.8)	24(63.2)		
肿瘤大小(cm)				-7.19	0.032
≤2	52	23(44.2)	29(55.8)		
>2	8	1(12.5)	7(87.5)		
T 分级				-7.19	0.018
T1-2	36	21(58.3)	15(41.7)		
T3-4	24	3(12.5)	21(87.5)		
淋巴结转移				-3.60	0.020
无	38	22(57.9)	16(42.1)		
有	22	2(9.1)	20(90.9)		
分化程度				-2.40	0.010
高中分化	32	22(68.8)	10(31.2)		
低分化	28	2(7.1)	26(92.9)		

注:以相对表达量是否高于等于均值 1.37 分为高表达和低表达

表 2 hsa_circ_0000231 及各临床病理参数与生存预后的关系

临床病理因素	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
性别(男比女)	1.31	0.66~2.57	0.439	1.22	0.51~2.93	0.657
年龄(≥60 岁比<60 岁)	1.62	0.81~3.21	0.172	0.72	0.33~1.71	0.489
T 分级(T3-4 比 T1-2)	0.24	0.11~0.52	<0.001	0.24	0.69~17.92	0.029
淋巴结转移(有比无)	0.67	0.34~1.34	0.254	2.49	0.68~9.15	0.169
分化程度(低分化比高中分化)	0.38	0.19~0.78	0.008	1.04	0.33~3.29	0.952
hsa_circ_0000231 表达(高比低)	0.18	0.07~0.44	<0.001	0.19	0.05~0.74	0.016

β-catenin 信号通路激活剂逆转了敲低 hsa_circ_0000231 表达抑制 CAL-27 和 Tca-8113 细胞迁移和侵袭的能力(图 5C、5D)。

五、hsa_circ_0000231 通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路影响裸鼠皮下移植瘤生长

裸鼠成瘤实验显示成瘤率 100%, has_circ_0000231 敲低组皮下移植瘤的体积明显小于对照组,使用 Wnt/β-catenin 信号通路激活剂处理过的皮下移植瘤的体积及重量明显大于敲低组,与对照组无明显差异(图 6)。

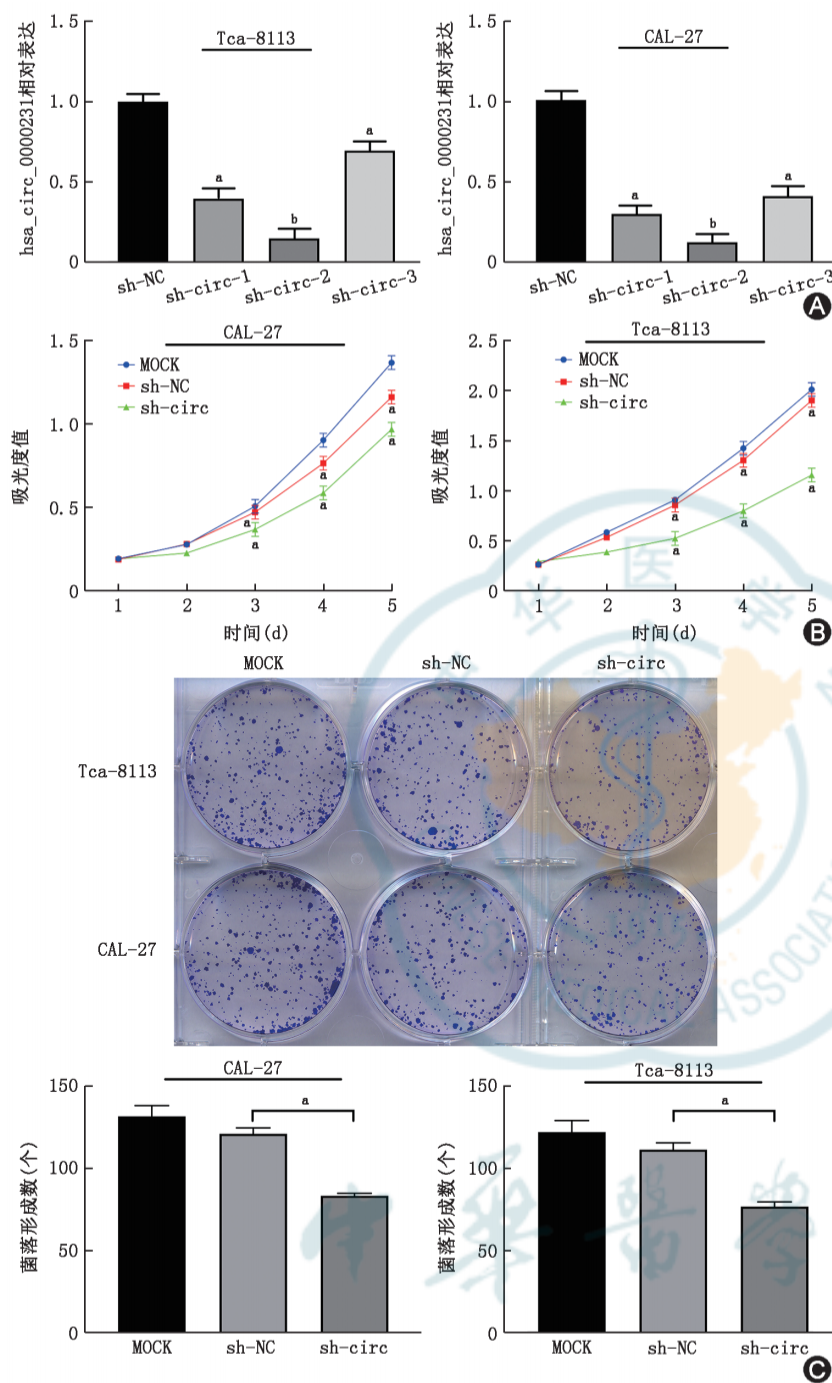
讨 论

TSCC 是口腔颌面部最常见的肿瘤,约占其恶性性肿瘤的 50%~60%,占全身恶性肿瘤的 0.8%~

2%^[5]。舌是涉及吞咽、言语、呼吸等功能的特殊器官,血供丰富,恶性肿瘤易于出现侵袭性生长和早期转移^[6]。近年来,虽然 TSCC 在诊断、手术技术及放化疗治疗上取得了较大的进展,但大范围的外科手术切除导致术后患者的舌功能大部或全部缺失,治疗后患者生活质量差,5 年生存率仍低于 50%^[7]。缺乏准确而敏感的早期筛查指标,是导致该肿瘤难以早发现、早干预的重要原因。因此,研究性质稳定、特异性强、获取方便的分子生物标志物对于 TSCC 的早诊、早治意义重大。

circRNA 是一种内源性非编码 RNA,稳定且广泛地存在于细胞中,与传统的线性 RNA 不同, circRNA 具有共价键形成的封闭环状结构,无 5' 和 3' 末端,不易被核酸酶降解,半衰期可超过 48 h,远较半衰期为 10 h 的线性 mRNA 稳定^[8]。目前已知,





注: MOCK 为舌癌细胞组, sh-NC 为舌细胞转染空载病毒组, sh-circ 为 hsa_circ_0000231 干扰组, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

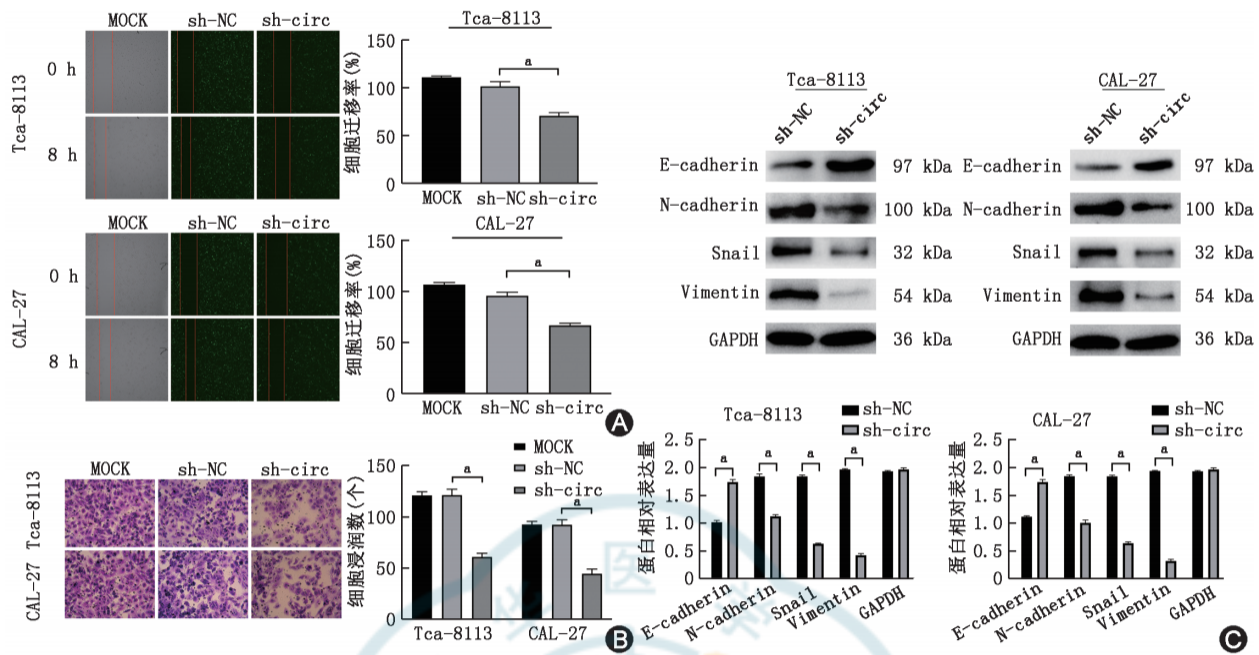
图 3 hsa_circ_0000231 调控舌癌细胞增殖能力 A: 实时荧光定量反转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 Tca-8113 和 CAL-27 细胞的转染效率; B: 细胞计数试验 (CCK-8) 测定空白对照、阴性对照和干扰组细胞的增殖能力; C: 克隆形成实验检测 hsa_circ_0000231 对 Tca-8113 和 CAL-27 细胞增殖能力的影响

部分 circRNA 的异常表达可导致正常组织中的基因表达失调, 发生克隆性异常增生而形成癌变^[9-12]。Qian 等^[13]发现 hsa_circ_0000003 与 hsa_circ_0043265 可通过内源性竞争结合 miRNA 调控肿瘤信号通路进而影响 TSCC 的发生与发展。本研究

中, 我们通过 qRT-PCR 检测 hsa_circ_0000231 在新鲜配对 TSCC 组织、唾液标本及 TSCC 细胞系中的表达, 发现其在 TSCC 组织、TSCC 患者的唾液以及 TSCC 细胞系中高表达, 与测序结果相一致。结合临床资料分析证实了 hsa_circ_0000231 的表达水平与 TSCC 患者的肿瘤大小、T 分级、分化程度及淋巴结转移呈正相关; 与 TSCC 患者的生存时间负相关, 是 TSCC 患者预后不良的独立因素。临床常用的分子标记物通常存在于血清中, 唾液作为口腔中的一种天然体液, 富含一系列如蛋白质、mRNA 及 DNA 等生物标记物, 健康人的唾液脱落细胞里存在 400 种以上的 circRNAs^[14]。由于唾液的获得较患者的血清或切除的标本更为容易, 因此唾液中性质稳定且高表达的 hsa_circ_0000231 则具有作为 TSCC 分子诊断标志物的巨大潜力。

本研究中的体外细胞学实验 CCK-8、克隆形成、Transwell 侵袭、划痕实验证实了敲低 hsa_circ_0000231 的表达可以抑制 CAL-27 及 Tca-8113 细胞的增殖、侵袭及转移。EMT 是上皮细胞失去其细胞特性并获得间充质表型的生物学过程, 通常发生在机体发育、伤口愈合和组织纤维化过程中, 与抵抗凋亡、获得组织侵袭性、肿瘤干细胞特征和肿瘤治疗的耐药性有关^[15]。EMT 程序激活可以促进肿瘤细胞的侵袭、扩散和转移^[16], 主要特征为增加 Snail、N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达, 降低 E-钙黏蛋白的表达。我们发现, 敲低 hsa_circ_0000231 的表达可抑制 TSCC 细胞的 EMT 进程, 降低 TSCC 细胞的侵袭和转移能力, 进而我们设想 hsa_circ_0000231 可通过某些信号通路调控 TSCC 的恶性行为。

Wnt/ β -catenin 信号通路被称为典型的 Wnt 信号通路^[9, 17], 该信号通路的活性取决于细胞中 β -catenin 的数量, 通路激活导致 β -catenin 降解发生



注:MOCK 为空白对照,sh-NC 为舌癌细胞转染空载体病毒组,sh-circ 为 hsa_circ_0000231 干扰组,* $P < 0.05$,cadherin 为钙黏蛋白,vimentin 为波形蛋白

图 4 hsa_circ_0000231 调节细胞迁移、侵袭和 EMT 转化 A:划痕实验检测 hsa_circ_0000231 在细胞迁移中的作用;B:Transwell 测定法检测 hsa_circ_0000231 对 Tca-8113 和 CAL-27 细胞侵袭能力的影响;C:Western blot 检测 hsa_circ_0000231 对 Tca-8113 和 CAL-27 细胞中 Snail、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白和波形蛋白表达的影响

障碍,从细胞质易位聚集于细胞核中,并与 DNA 结合的转录因子(transcription factor,TCF)结合,调节靶基因的表达^[18]。Wang 等^[19]发现 lncRNA AFAP1-AS1 可能通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路影响 TSCC 细胞的增殖和迁移能力;Wei 等^[20]证实 miR-223 可以通过 Wnt/ β -catenin 信号传导途径调节口腔鳞状细胞癌的转移;Wnt 信号传导可以诱导 EMT 转录因子的表达进而促进 EMT^[17]。结合上述报道及我们实验中 hsa_circ_0000231 表达抑制了 TSCC 细胞的 EMT,且 KEGG 通路分析发现 hsa_circ_0000231 富集于 Wnt 信号通路。我们推测 hsa_circ_0000231 发挥作用可能和 Wnt/ β -catenin 信号通路相关,结果发现敲低 hsa_circ_0000231 后,TSCC 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白的表达均下调,使用 Wnt/ β -catenin 信号通路激活剂能够逆转上述表达趋势,并且能够逆转敲低 hsa_circ_0000231 表达抑制 TSCC 细胞的迁移、侵袭及转移能力。同样,裸鼠成瘤实验中,使用 Wnt/ β -catenin 信号通路激活剂能够逆转敲低 hsa_circ_0000231 表达抑制 CAL-27 及 Tca-8113 细胞在裸鼠体内的增殖能力。因此,实验组认为 hsa_circ_0000231 可以通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路调控 TSCC 细胞恶性行为。

综上所述,本研究发现了在 TSCC 组织、唾液标

本及 TSCC 细胞系中表达上调的 hsa_circ_0000231,其是影响 TSCC 患者预后的独立影响因子。hsa_circ_0000231 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 TSCC 细胞的增殖、侵袭、转移,有成为新型的非侵入性临床诊断标志物和治疗靶点的巨大潜力。本研究的局限性在于样本量相对较小;TSCC 的发生发展中可能有多个通路参与其中,hsa_circ_0000231 与其他通路的作用关系尚未研究;hsa_circ_0000231 是通过何种机制调控 Wnt/ β -catenin 信号通路尚需深入研究。

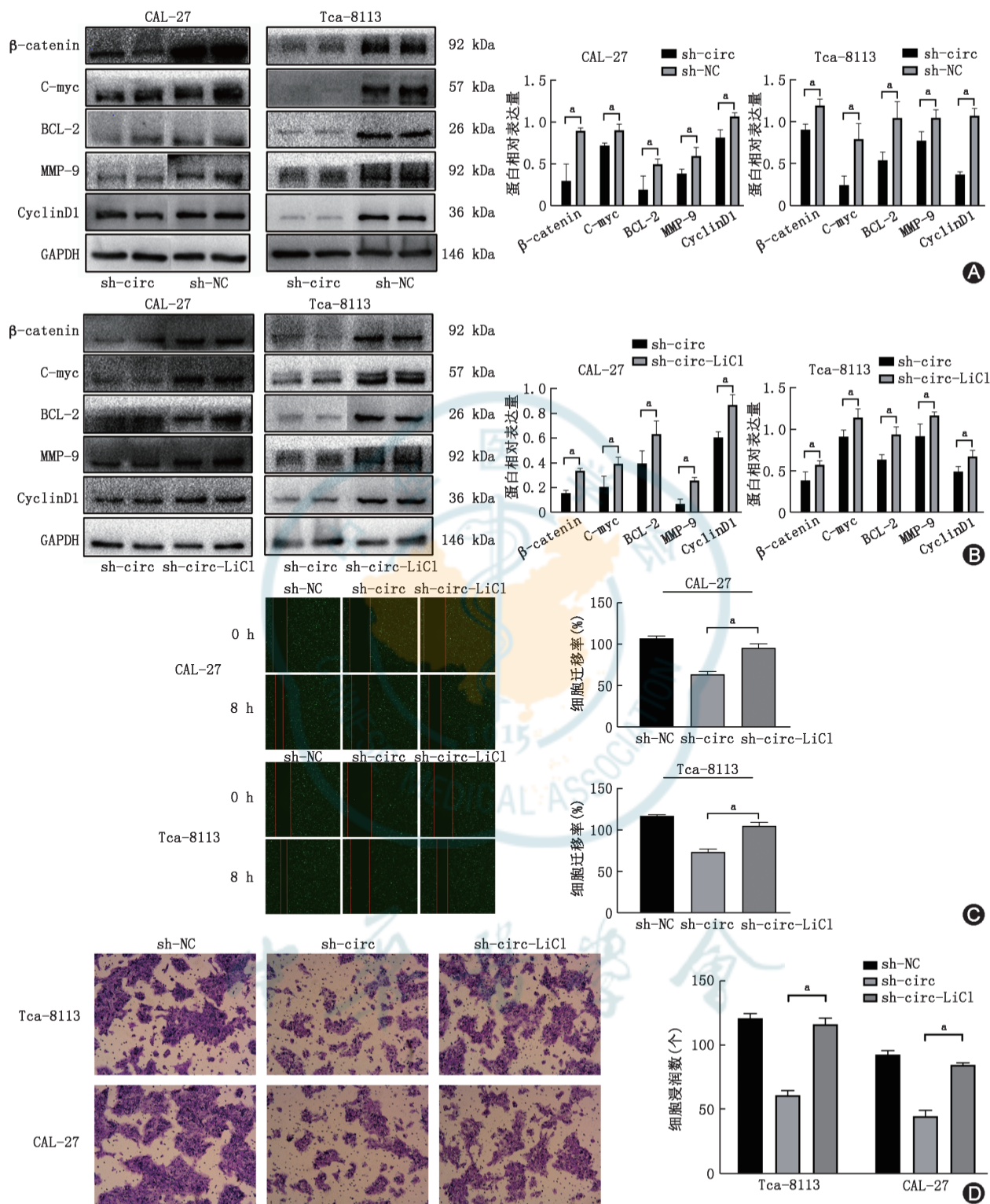
利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 陈庆文:患者资料收集、实验操作、数据处理、统计学分析、论文撰写;王东琴、丁必骁、汤明明、徐克、方峥嵘:标本采集及部分实验操作;李晓光、周杰玉:细胞系捐赠、对文章知识性内容作批评性审阅;韩靓:研究指导、经费支持;吴昊:研究设计及指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(5): 453-461. DOI: 10.1038/nbt.2890.
- [2] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. Cancer Lett, 2015, 365(2): 141-148. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.06.003.
- [3] Qiu X, Ke X, Ma H, et al. Profiling and bioinformatics





注: sh-NC 为舌癌细胞转染空载体病毒组, sh-circ 为 hsa_circ_0000231 干扰组, sh-circ-LiCl 为 LiCl 处理干扰组, * $P < 0.05$

图 5 hsa_circ_0000231 激活 Wnt/β-catenin 信号通路影响 Tca-8113 和 CAL-27 细胞生物学活性 A: 干扰组和阴性对照组 Tca-8113 和 CAL-27 细胞的 Wnt/β-catenin 相关蛋白的表达; B: LiCl 处理干扰组和干扰组 Tca-8113 和 CAL-27 细胞 Wnt/β-catenin 相关蛋白的表达; C: 划痕实验检测 hsa_circ_0000231 激活 Wnt/β-catenin 信号通路影响 Tca-8113 和 CAL-27 细胞的迁移能力; D: Transwell 测定法检测 hsa_circ_0000231 激活 Wnt/β-catenin 信号通路影响 Tca-8113 和 CAL-27 细胞的侵袭能力 低倍放大

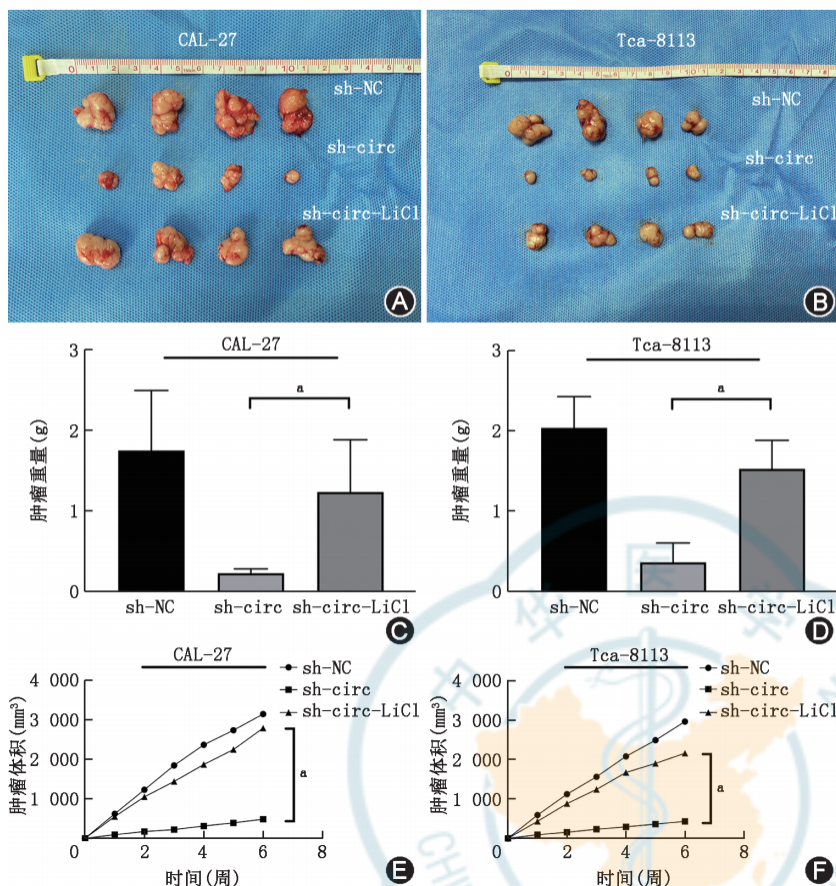
analyses reveal differential expression of circular RNA in tongue cancer revealed by high-throughput sequencing

[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 4102-4112. DOI: 10.1002/jcb.27695.



中华医学杂志
Chinese Medical Association Publishing House

版权所有 违者必究



注: sh-NC 为舌癌细胞转染空载体病毒组, sh-circ 为 hsa_circ_0000231 干扰组, sh-circ-LiCl 为 LiCl 处理干扰组, * $P < 0.05$

图 6 裸鼠成瘤实验验证 hsa_circ_0000231 通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路影响 CAL-27 和 Tca-8113 细胞在体内的增殖能力 A: CAL-27 细胞、LiCl 处理组和干扰组及对照组裸鼠移植瘤大体外观对比; B: Tca-8113 细胞、LiCl 处理组和干扰组及对照组裸鼠移植瘤大体外观对比; C: CAL-27 细胞, 3 组皮下移植瘤的重量比较; D: Tca-8113 细胞, 3 组皮下移植瘤的重量比较; E: CAL-27 细胞, 3 组皮下移植瘤的体积比较; F: Tca-8113 细胞, 3 组皮下移植瘤的体积比较

- [4] Liu Z, Zhou Y, Liang G, et al. Circular RNA hsa_circ_001783 regulates breast cancer progression via sponging miR-200c-3p[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 55. DOI: 10.1038/s41419-018-1287-1.
- [5] 王健, 闫广鹏, 郭超, 等. microRNA-125b 在舌鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. 华西口腔医学杂志, 2020, 38(1): 11-16. DOI: 10.7518/hxkq.2020.01.003.
- [6] Sun J, Lu Z, Deng Y, et al. Up-regulation of INSR/IGF1R by C-myc promotes TSCC tumorigenesis and metastasis through the NF- κ B pathway[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(5 Pt A): 1873-1882. DOI: 10.1016/j.bbdis.2018.03.004.
- [7] Safi AF, Grandoch A, Nickenig HJ, et al. The importance of lymph node ratio for locoregional recurrence of squamous cell carcinoma of the tongue[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2017, 45(7): 1058-1061. DOI: 10.1016/j.jcms.2017.04.008.
- [8] Sanger HL, Klotz G, Riesner D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976, 73(11): 3852-3856. DOI: 10.1073/pnas.73.11.3852.
- [9] Li X, Ding J, Wang X, et al. NUDT21 regulates circRNA cyclization and ceRNA crosstalk in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2020, 39(4): 891-904. DOI: 10.1038/s41388-019-1030-0.
- [10] Hu X, Wu D, He X, et al. circGSK3 β promotes metastasis in esophageal squamous cell carcinoma by augmenting β -catenin signaling[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 160. DOI: 10.1186/s12943-019-1095-y.
- [11] Xiang T, Jiang HS, Zhang BT, et al. CircFOXO3 functions as a molecular sponge for miR-143-3p to promote the progression of gastric carcinoma via upregulating USP44[J]. Gene, 2020, 753: 144798. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144798.
- [12] Feng Y, Wang Q, Shi C, et al. Does circular RNA exert significant effects in ovarian cancer? [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2019, 29(2): 161-170. DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2019025941.
- [13] Qian C, Chen S, Li S, et al. Circ_0000003 regulates glutamine metabolism and tumor progression of tongue squamous cell carcinoma via the miR-330-3p/GLS axis[J]. Oncol Rep, 2021, 45(4): 45. DOI: 10.3892/or.2021.7996.
- [14] Bahn JH, Zhang Q, Li F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva [J]. Clin Chem, 2015, 61(1): 221-230. DOI: 10.1373/clinchem.2014.230433.
- [15] Georgakopoulos-Soares I, Chartoumpekis DV, Kyriazopoulou V, et al. EMT factors and metabolic pathways in cancer[J]. Front Oncol, 2020, 10: 499. DOI: 10.3389/fonc.2020.00499.
- [16] Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 117-134. DOI: 10.1007/s10911-010-9178-9.
- [17] Sebjo A, Kahn M, Lenz HJ. The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2014, 18(6): 611-615. DOI: 10.1517/14728222.2014.906580.
- [18] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.016.
- [19] Wang ZY, Hu M, Dai MH, et al. Upregulation of the long non-coding RNA AFAP1-AS1 affects the proliferation, invasion and survival of tongue squamous cell carcinoma via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 3. DOI: 10.1186/s12943-017-0752-2.
- [20] Wei Z, Wang Y, Jiang L, et al. miR-223 regulates oral squamous cell carcinoma metastasis through the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Oral Oncol, 2020, 109: 104941. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2020.104941.

