

临床细胞生物学

circCALN1/miR-143-3p/BCL-2调控轴影响鼻咽癌 细胞增殖与侵袭的分子机制研究

江浩^{1*} 廖金龙¹ 陈舒华² 鲁芒¹ 杨瑞亮¹ 何金花³

(¹南方医科大学附属佛山医院/佛山市第二人民医院病理科, 佛山 528000; ²南方医科大学附属佛山医院/佛山市第二人民医院耳鼻喉科, 佛山 528000; ³广州市番禺区中心医院检验科, 广州 511400)

摘要 该文探讨circCALN1(circular RNA calneuron 1)在鼻咽癌中的表达及调控分子机制。运用生物信息软件预测circCALN1调控的miRNA及miRNA调控的靶基因; 运用RT-PCR检测鼻咽癌组织及细胞株中的基因表达水平; 常规培养鼻咽癌细胞株(CNE1、HNE1、SUNE-1、5-8F、6-10B), 鼻咽永久上皮分化细胞株NP69, 人肾小管上皮细胞株293T; 设计针对circCALN1接头处的及BCL-2的siRNA序列, 运用脂质体转染细胞株; Transwell检测细胞侵袭能力; MTT检测细胞增殖抑制率; Western blot检测蛋白的相对表达水平; 构建双荧光报告基因载体验证基因之间的结合作用。circCALN1、BCL-2在鼻咽癌组织及细胞株的相对表达水平上调, 而miR-143-3p表达水平下调; 其中, 在CNE1、HNE1、SUNE-1、5-8F细胞株中, circCALN1、BCL-2在CNE1细胞株的表达水平最高, 而miR-143-3p在CNE1细胞株的表达水平最低; 有效降低circCALN1、BCL-2在鼻咽癌细胞株CNE1的表达水平24、48、72 h之后, 抑制率分别为(16.3±1.65)%、(29.6±2.6)%、(63±3.6)%; (26.3±2.9)%、(32.6±3.8)%、(59.6±3.9)%; 过表达miR-143-3p 24、48、72 h之后, 抑制率为(9.6±3.6)%、(13.6±5.6)%、(36.8±2.3)%; 过表达miR-143-3p及降低circCALN1、BCL-2的表达, 其侵袭细胞个数分别为185±13、200±15、183±18; 生物信息学结果提示: miR-143-3p与circCALN1存在结合位点, miR-143-3p与BCL-2存在结合位点。circCALN1、BCL-2-3'UTR双荧光报告基因载体质粒与miR-143-3p mimics共转染293T细胞, 荧光活性降低。降低circCALN1的表达促进miR-143-3p的表达上调, 而BCL-2的表达下调。circCALN1/miR-143-3p/BCL-2调控轴影响了鼻咽癌细胞的增殖与侵袭。

关键词 环状RNA; circCALN1; 鼻咽癌; 增殖; 侵袭; miR-143-3p; BCL-2

Study on the Molecular Mechanism of the Influence of circCALN1/miR-143-3p/BCL-2 Regulatory Axis on the Proliferation and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cells

JIANG Hao^{1*}, LIAO Jinlong¹, CHEN Shuhua², LU Mang¹, YANG Ruiliang¹, HE Jinhua³

(¹Foshan Hospital Affiliated to Southern Medical University/Pathology Department of Foshan Second People's Hospital, Foshan 528000, China; ²Foshan Hospital Affiliated to Southern Medical University/Otolaryngology Department of Foshan Second People's Hospital, Foshan 528000, China; ³Laboratory Department of Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, China)

收稿日期: 2020-04-20 接受日期: 2020-08-03

广州市番禺区重大医疗卫生科技项目(批准号: 2017-Z04-18、2018-Z04-59)、广东省科技厅科技计划项目(批准号: 2017ZC0372)和广州市科技局科技计划项目(批准号: 201904010044)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18138310086, E-mail: fsjgy@126.com

Received: April 20, 2020 Accepted: August 3, 2020

This work was supported by the Medical and Health Science and Technology Project of Panyu District, Guangzhou (Grant No.2017-Z04-18, 2018-Z04-59), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (Grant No.2017ZC0372) and Guangzhou Science and Technology Plan Project (Grant No.201904010044)

*Corresponding author. Tel: +86-18138310086, E-mail: fsjgy@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5360>

Abstract This study was to investigate the molecular mechanism of circCALN1 expression in NPC (nasopharyngeal carcinoma). The miRNA regulated by circCALN1 and the target gene regulated by miRNA were predicted by the bioinformatics software and the relative gene expression levels in NPC tissues and cell lines were detected by RT-PCR; CNE1, HNE1, SUNE-1, 5-8F, 6-10B, NP69, 293T cell lines were cultured in conventional culture; the siRNA sequences for the junction of circCALN1 and BCL-2 were designed and transfected with liposome; Transwell assay was used to detect cell invasion ability, MTT assay was used to detect cell proliferation inhibition rate, Western blot was used to detect the relative expression of protein, and double fluorescent reporter gene vector was constructed to verify the binding site between genes; the expression of circCALN1, BCL-2 were up-regulated in NPC tissues and cell lines; after 24, 48 and 72 h when knock down the expression of circCALN1 and BCL-2, the inhibition rates were (16.3±1.65)%, (29.6±2.6)%, (63±3.6)%, (26.3±2.9)%, (32.6±3.8)% and (59.6±3.9)%, respectively; after overexpression of miR-143-3p for 24, 48 and 72 h, the inhibition rates were (9.6±3.6)%, (13.6±5.6)%, (36.8±2.3)%; Overexpression of miR-143-3p and decreased expression of circCALN1 and BCL-2, the number of invasive cells were 185±13, 200±15, 183±18; bioinformatics results showed that there were binding sites between miR-143-3p and circCALN1, and between miR-143-3p and BCL-2. The plasmid of circCALN1, BCL-2-3'UTR double fluorescent reporter gene vector and miR-143-3p mimics were co-transfected into 293T cells, and the fluorescent activity was decreased. The knock down expression of circCALN1 promoted the up-regulation of miR-143-3p, while down regulated expression level of BCL-2. The regulatory axis of circCALN1/miR-143-3p/BCL-2 affects the proliferation and invasion of NPC.

Keywords circular RNA; circCALN1; NPC; proliferation; invasion; miR-143-3p; BCL-2

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种起源于鼻咽部黏膜的恶性肿瘤。其起病隐蔽、恶性程度高,严重威胁患者的身心健康^[1]。随着放射治疗设施和放疗技术不断地改进,以及以放化疗为主的多种治疗手段在鼻咽癌中的综合运用,治疗效果不断提高,然而鼻咽癌的5年生存率依然只有60%~70%。局部区域复发和远处转移仍然是造成鼻咽癌治疗效果不佳甚至失败的主要原因^[2-3]。因此,更深入地了解鼻咽癌发生发展尤其远处转移的机制,寻找新的生物标志物,并阐明其分子机制,可能会为鼻咽癌的治疗发展提供新的机遇。

环状RNA(circular RNA, circRNA)是由反向剪接(back-splicing)过程产生的共价闭环状RNA。circRNA在真核细胞中表达丰富,进化上保守,并具有组织特异性表达及高度稳定的特性^[4]。circRNA在人体细胞中广泛表达,并在肿瘤的发生过程中起着较为重要的作用^[5]。circRNA在细胞中起到miRNA分子的“海绵”作用,从而解除miRNA对靶基因的抑制作用。深入研究circRNA的表达及调控机制可提高相关疾病的预防和诊断水平。circCALN1来源于母基因CALN1(calneuron 1),定位于chr7:71.571,135-71,571,279(<http://www.circbase.org/>)。CALN1是一个蛋白编码基因,CALN1参与鼻咽癌的发生与发展^[6]。为

了研究circCALN1潜在的调控机制,运用生物信息学软件预测到circCALN1与miR-143-3p、miR-143-3p与BCL-2之间的相互结合作用,我们推测,circCALN1/miR-143-3p/BCL-2调控通路会影响鼻咽癌侵袭转移,本研究运用过表达与阻断表达等方法,验证这一推测,旨在阐明circCALN1促进鼻咽癌转移的分子机制,并为以circCALN1为靶点,设计抑制转移的策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病人资料

收集我院2019年1月~2020年1月经鼻内镜活检组织,未经任何放疗与化疗,经病理形态学和免疫组化明确诊断的鼻咽癌组织50例(男性34例,女性16例,其中未分化型非角化性癌45例,分化型非角化性癌4例,角化性鳞状细胞癌1例)及慢性鼻炎黏膜组织20例(男性10例,女性10例)。所有病人均签署知情同意书,且本研究经广东省佛山市第二人民医院伦理委员会审查批准。

1.2 试剂

TRIzol试剂、RIPA细胞裂解液购自北京赛默飞生物科技有限公司;miRcute miRNA提取分离试剂盒、miRcute miRNA cDNA第一链合成试剂盒、

miRcute miRNA荧光定量检测试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司; DMEM/F12培养基购自HyClone公司; RIPA细胞裂解液购自北京塞默飞生物科技有限公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司; 实时定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.3 细胞培养及siRNA序列转染

鼻咽癌细胞(CNE1, HNE1, SUNE-1, 5-8F, 6-10B)、鼻咽永生化上皮细胞(NP69)、293T细胞购于广州海纳生物科技生物公司, 细胞培养参照标准操作规程传代, 在37 °C、5% CO₂条件下培养。其中鼻咽原代培养细胞、鼻咽永生化上皮细胞用KSMF培养基培养, 鼻咽癌细胞用5% FBS、RPMI-1640培养基培养, 每2~3天传代培养。实验选用对数生长期、锥虫蓝拒染率>95%的细胞。Si-circCALN1序列(5'-GGA CAT GGA CGA AAT CCG AGA-3'); 阴性对照序列(negative control, NC)(5'-CGG GAA TTG GCG GAT TAA GCC-3'), si-BCL-2序列(5'-GAT TGT GGC CTT CTT TGA GTT-3')。siRNA序列转染严格按照LipofectamineTM2000转染试剂盒说明书操作进行。实验分组: 空白对照组; NC(阴性对照序列+LipofectamineTM2000); si-circCALN1(siRNA circCALN1+LipofectamineTM2000); si-BCL-2(siRNA BCL-2+LipofectamineTM2000); miR-143-3p(miR-143-3p mimics+LipofectamineTM2000)。

1.4 生物信息学分析

运用在线软件(<http://www.circbase.org/>)分析circCALN1的定位及基因序列; 运用在线软件(<http://www.circbank.cn/searchCirc.html>)预测与circCALN1结合的miRNAs。运用在线软件(<http://www.targetscan.org/>)预测与miRNAs结合的靶基因。

1.5 RT-PCR

采取TRIzol试剂提取RNA, 采用M-MLV逆转录酶将RNA逆转录为cDNA, 作为PCR反应的模板。反

应体系: 5.0 μL cDNA, 0.5 μL上游引物, 0.5 μL下游引物, 10 μL 2× SYBR Green qPCR SuperMix, 4.0 μL ddH₂O, 总体积20 μL。反应条件: 55 °C 2 min; 93 °C 2 min, 93 °C 15 s, 60 °C 32 s读板, 35个循环; 熔解曲线分析: 温度60 °C, 94 °C, 每个样本重复3次。以GAPDH为内参, 以2^{-ΔΔC_t}计算基因的相对表达量, 引物序列见表1。

1.6 MTT法

取对数生长期细胞, 用无血清的RPMI-1640培养液调细胞浓度为10⁵个/mL, 接种于96孔板, 每孔100 μL, 分别培养24、48、72 h后, 每孔加MTT溶液(5 mg/mL用PBS配制) 20 μL。继续孵育4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 对于悬浮细胞需要离心后再吸弃孔内培养上清液。每孔加150 μL DMSO, 振荡10 min, 使结晶物充分溶解。选择490 nm波长, 在酶标仪上测定各孔吸光度(D)值。

1.7 Transwell 实验

用预冷的无血清培养基以1:3的体积比稀释Matrigel, 取40 μL加入到预冷的Transwell小室中, 37 °C孵育2 h使Matrigel凝固。吸走小室中多余的液体, 并在上室、下室分别加入100 μL、600 μL无血清培养基, 37 °C平衡过夜。细胞转染第2天, 计数1×10⁵个细胞, 用100 μL无血清DMEM-F12培养基重悬, 加入到Transwell小室上室, 在下室加入600 μL完全培养基。在37 °C、5% CO₂条件下孵育24、48 h后, 取出小室, 用棉签擦去上室的细胞, 倒置显微镜下观察小室中细胞并拍照。将结晶紫染色的上室下表面细胞, 用33%醋酸洗脱后, 用酶标仪测定吸光度(D₅₇₀)值。

1.8 Western blot检测

收集不同实验组CNE1细胞, 用Nuclear Extraction Kit分步抽提细胞蛋白, 用BCA法测定蛋白浓度。100 μg蛋白上样, 10%的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转移至PVDF膜上。PVDF膜于含5%脱脂奶粉的PBS溶液室温孵育2 h, 4 °C过夜以封闭非特异结合位点。对应抗体室温孵育3 h, 以PBST洗涤3次,

表1 基因引物序列表

Table 1 Primer sequence for gene

基因 Gene	正向(5'→3') Forward (5'→3')	反向(5'→3') Reverse (5'→3')
GAPDH	GTT GGT GGT GCA GGA GGC A	CTC GCT TCG GCA GCA CA
circCALN1	ATGC GCT CTT TGG GGT ACA T	AGC TCC TGC TTG GAG ATG AA
miR-143-3p	TGA GAT GAA GCA CTG TAG CTC	GGT GTC GTG GAG TCG
BCL-2	GAT GTG ATG CCT CTG CGA AG	CAT GCT GAT GTC TCT GGAATC T

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的鼠二抗室温孵育1 h, 化学增强发光法显影, Alpha-EaseFC软件分析蛋白条带灰度变化。

1.9 双荧光报告基因载体的构建

细胞分组: 空白对照组; miR-143-3p组(miR-143-3p mimics+psiCHECK-2-circCALN1/psiCHECK-2-circCALN1-mut)、(miR-143-3p mimics+psiCHECK-2-BCL-2-3'UTR/psiCHECK-2-BCL-2-3'UTR-mut); miR-143-3p抑制剂组(miR-143-3p抑制剂+psiCHECK-2-circCALN1/psiCHECK-2-circCALN1-mut)、(miR-143-3p抑制剂+psiCHECK-2-BCL-2-3'UTR/psiCHECK-2-BCL-2-3'UTR-mut+miR-143-3p抑制剂); 阴性对照组(NC, 阴性对照序列+psiCHECK-2-circCALN1/psiCHECK-2-circCALN1-mut)、(阴性对照序列+psiCHECK-2-BCL-2-3'UTR/psiCHECK-2-BCL-2-3'UTR-mut); 阴性对照抑制剂组(NCI, 阴性对照抑制剂+psiCHECK-2-circCALN1/psiCHECK-2-circCALN1-mut)、(阴性对照抑制剂+psiCHECK-2-BCL-2-3'UTR/psiCHECK-2-BCL-2-3'UTR-mut)。

以基因组DNA为模板扩增circCALN1的全长序列及BCL-2的3'UTR序列, 引入*Xho* I、*Not* I酶切位点及保护碱基。PCR产物胶回收后亚克隆到psiCHECK-2质粒海肾荧光素基因的下游, 重组载体命名为psiCHECK-2-circCALN1。对上述重组质

粒“种子区”的碱基进行定点突变, 突变后的质粒为psiCHECK-2-circCALN1-mut, 构建的表达质粒经双酶切和测序鉴定, 使用双荧光素酶报告系统试剂盒(Promega, Madison, WI)检测荧光活性, 在Tecan M200发光仪上读取荧光值, 具体实验方法, 参照文献[7]。

1.10 统计学处理

统计学方法以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, SPSS 20.0统计软件处理数据, 采用完全随机设计的单因素方差分析(One-Way ANOVA)分析组间差异的显著性。

2 结果

2.1 生物信息学预测circCALN1与miR-143-3p、miR-143-3p与BCL-2之间的相互结合作用

运用在线软件预测到circCALN1与miR-143-3p存在结合作用, *BCL-2*是miR-143-3p调控的靶基因(表2和表3)。

2.2 circCALN1、BCL-2在鼻咽癌组织及细胞株中呈高表达, miR-143-3p在鼻咽癌组织及细胞株中呈低表达

收集临床上初发的经病理确诊的鼻咽癌组织及慢性鼻炎黏膜组织。同时, 培养鼻咽癌细胞株CNE1、HNE1、SUNE-1、5-8F、6-10B、NP69, RT-PCR检测到circCALN1与*BCL-2*在鼻咽癌组织及细胞株中表达水平

表2 生物信息学预测circCALN1结合的miRNAs

Table 2 Bioinformatics predicts miRNAs binding with circCALN1

环状RNA库身份 circBank ID	环状RNA数据库身份 circbase ID	长度/bp Length /bp	微小RNA身份 miRNA ID (miR_ID)	结合位点 Binding site (positions)	TargetsCan结合位点 TargetsCan binding site (positions)
hsa_circCALN1_008	hsa_circ0080433	144	hsa-miR-1272	99	116 118; 121 124
hsa_circCALN1_008	hsa_circ0080433	144	hsa-miR-143-3p	33	46 52
hsa_circCALN1_008	hsa_circ0080433	144	hsa-miR-432-5p	33	50 56
hsa_circCALN1_008	hsa_circ0080433	144	hsa-miR-4770	36	46 52
hsa_circCALN1_008	hsa_circ0080433	144	hsa-miR-6088	34	46 52
hsa_circCALN1_008	hsa_circ0080433	144	hsa-miR-7843-3p	27	42 48

表3 生物信息学预测miR-143-3p与BCL-2之间的相互结合作用

Table 3 Bioinformatics predicts the interaction between miR-143-3p and BCL-2

基因 Gene	结合位点 Binding site	位点类型 Site type	分值 Context score	分值百分数 Context score percentage
<i>BCL-2</i> -3'UTR	5'-CAAUCAUGAAAUAUGCAUCUCAC	Mer-A1	-0.08	70%
MiR-143-3p	3'-CUCGAUGUCACGAA GUAGAGU			

加粗代表配对碱基

Bold indicates paired bases

上调, 而miR-143-3p表达水平下调(图1)。其中, circ-CALN1、*BCL-2*在CNE1细胞株的表达水平最高, miR-143-3p在CNE1细胞株的表达水平最低, 因此, 将在CNE1细胞株中进一步探讨circCALN1的分子机制。

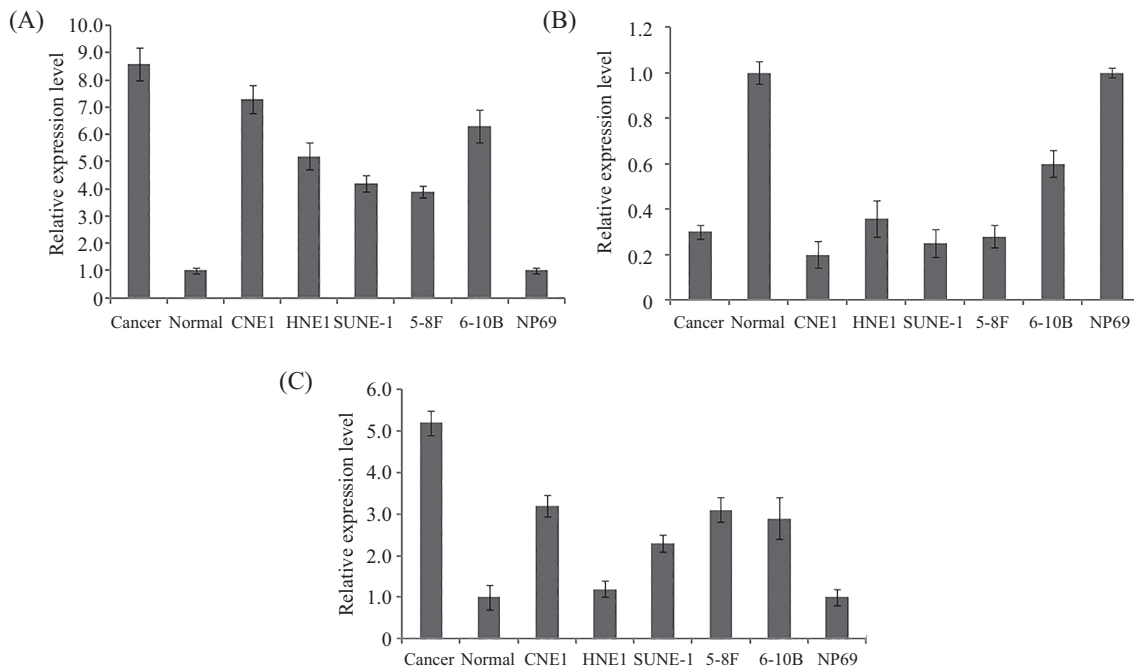
2.3 降低 circCALN1、BCL-2的表达, 过表达 miR-143-3p均抑制CNE1细胞株增殖

运用 si-circCALN1、si-BCL-2、miR-143-3p mimics转染CNE1细胞24、48、72 h后, MTT法检

测细胞增殖抑制率。结果显示: si-circCALN1、si-BCL-2、miR-143-3p组抑制率较NC组比较明显增加, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明: 降低 circCALN1、*BCL-2*的表达, 过表达miR-143-3p均抑制CNE1细胞株增殖(图2)。

2.4 降低 circCALN1、BCL-2的表达, 过表达 miR-143-3p均抑制CNE1细胞株侵袭

运用 si-circCALN1、si-BCL-2、miR-143-3p

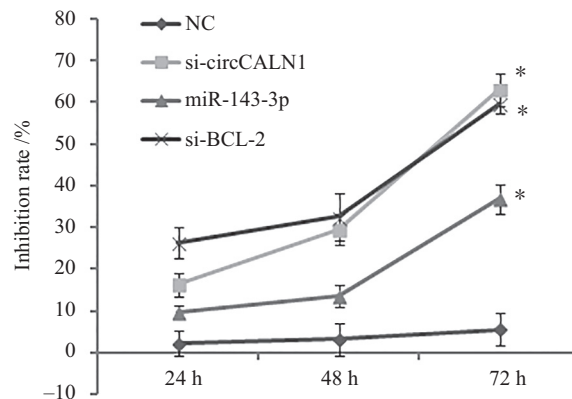


A: circCALN1在鼻咽癌组织及细胞株中呈高表达; B: miR-143-3p在鼻咽癌组织及细胞株中呈低表达; C: *BCL-2*在鼻咽癌组织及细胞株中呈高表达。

A: circCALN1 was highly expressed in NPC tissues and cell lines; B: miR-143-3p was lowly expressed in NPC tissues and cell lines; C: *BCL-2* was highly expressed in NPC tissues and cell lines.

图1 RT-PCR检测基因的相对表达水平

Fig.1 RT-PCR assay detect the relative expression levels of genes

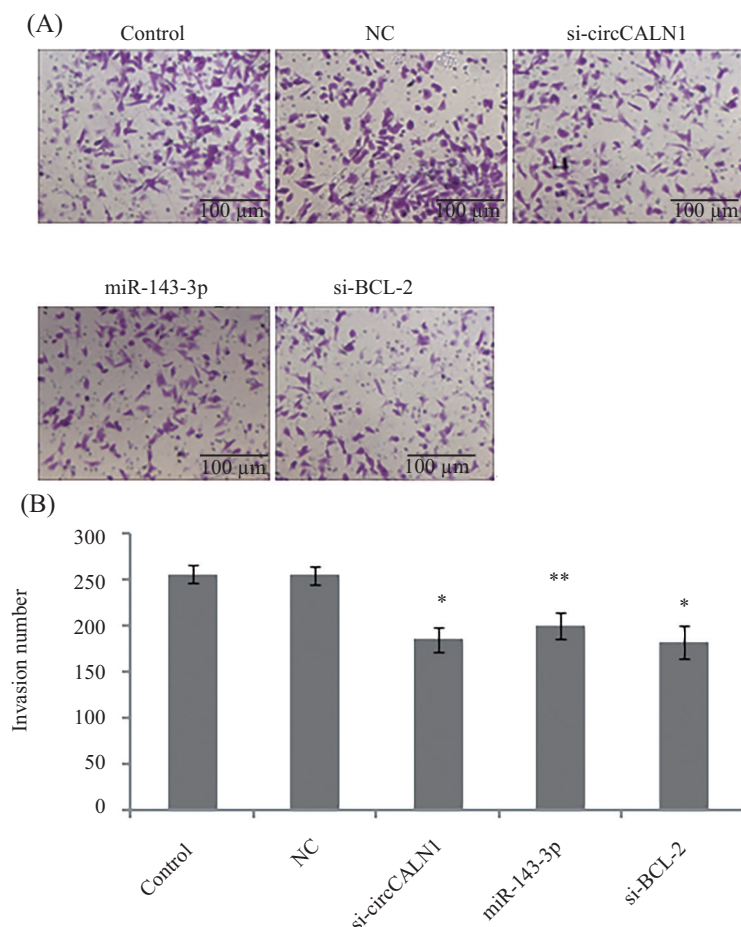


* $P < 0.05$, 与阴性对照组比较。

* $P < 0.05$ compared with negative control group.

图2 MTT检测细胞增殖抑制率

Fig.2 Inhibition rate of cell proliferation detected by MTT



A: CNE1细胞侵袭拍照图; B: CNE1细胞侵袭个数统计图, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白对照组和阴性对照组比较。

A: picture of CNE1 cell invasion; B: statistics of CNE1 cell invasion number, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with blank control group and negative control group.

图3 Transwell检测细胞侵袭能力

Fig.3 Detection of cell invasion by Transwell assay

mimics转染CNE1细胞48 h后, Transwell法检测细胞侵袭率。结果显示: si-circCALN1、si-BCL-2、miR-143-3p组细胞侵袭个数较NC组比较明显减少, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明: 降低circCALN1、BCL-2的表达, 过表达miR-143-3p均抑制CNE1细胞株侵袭(图3)。

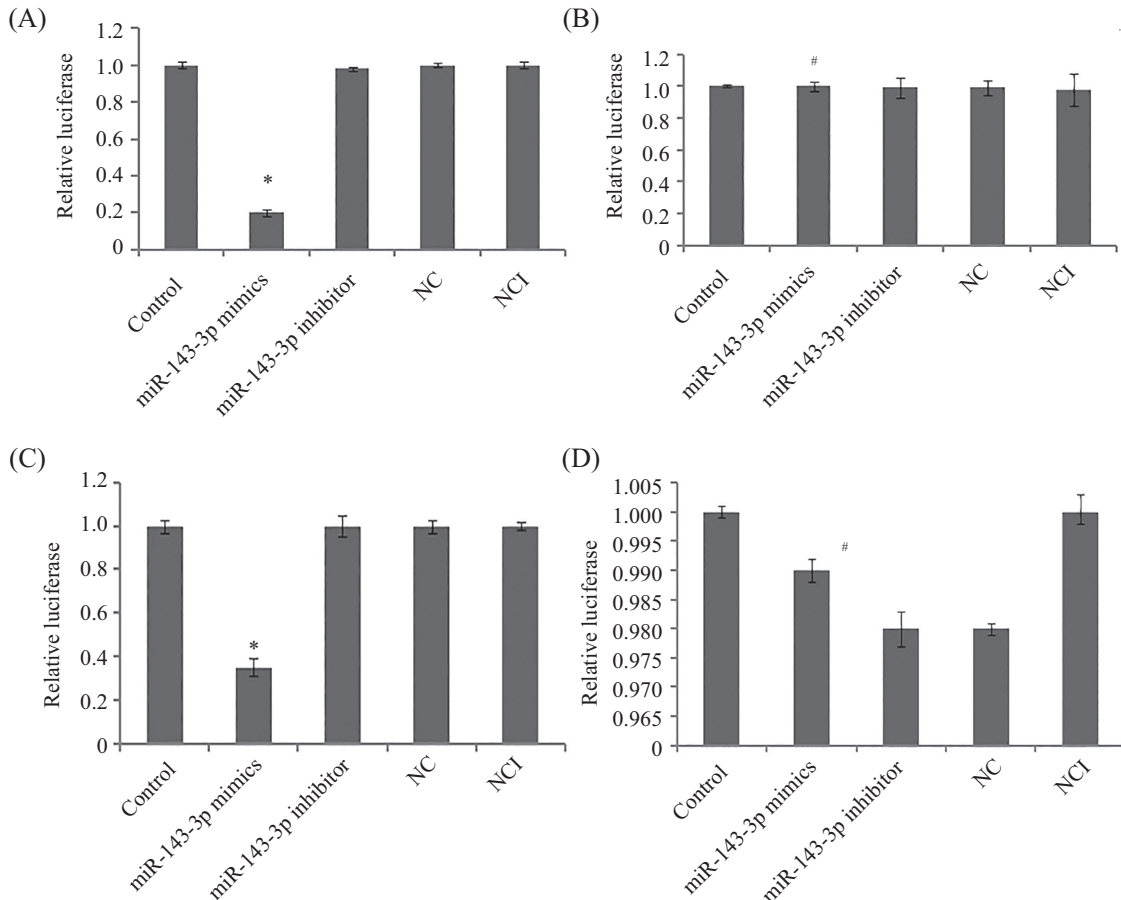
2.5 circCALN1与miR-143-3p、miR-143-3p与BCL-2之间存在相互结合作用

为了研究circCALN1的调控机制, 构建circCALN1全长序列及BCL-2的3'UTR野生型与突变型双荧光报告基因载体质粒与miR-143-3p mimics共转染293T细胞, 并检测了荧光活性。结果显示, circCALN1全长序列及BCL-2的3'UTR野生型的双荧光报告基因载体质粒与miR-143-3p mimics共转染293T细胞, 荧光活性明显减弱, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而circCALN1全长序列及BCL-2的

3'UTR突变型的双荧光报告基因载体质粒与miR-143-3p mimics共转染293T细胞, 荧光活性较其他组无明显改变, 不具有统计学意义($P > 0.05$)。结果表明: circCALN1与miR-143-3p、miR-143-3p与BCL-2之间存在相互结合作用(图4)。

2.6 降低circCALN1的表达, 促进miR-143-3p的表达, 从而下调BCL-2的表达

为了验证circCALN1与miR-143-3p、miR-143-3p与BCL-2之间存在的调控关系, 运用一定浓度的si-circCALN1转染CNE1细胞株之后, RT-PCR检测了miR-143-3p与BCL-2的表达水平。结果显示: 降低circCALN1的表达之后, miR-143-3p的表达水平上调, BCL-2表达水平下调, 与空白组、阴性对照组比较具有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明: 降低circCALN1的表达, 促进miR-143-3p的表达, 从而下调BCL-2的基因与蛋白的相对表达水平(图5)。



A: circCALN1野生型双荧光报告基因载体质粒与miR-143-3p mimics共转染293T细胞, 荧光活性的比较, $*P<0.05$, 与NC、NCI、control、miR-143-3p inhibitor组比较; B: circCALN1突变型双荧光报告基因载体质粒与miR-143-3p mimics共转染293T细胞, 荧光活性的比较; $^{\#}P>0.05$, 与NC、NCI、control、miR-143-3p inhibitor组比较; C: BCL-2的3'UTR野生型双荧光报告基因载体质粒与miR-143-3p mimics共转染293T细胞, 荧光活性的比较, $*P<0.05$, 与NC、NCI、control、miR-143-3p inhibitor组比较; D: BCL-2的3'UTR突变型双荧光报告基因载体质粒与miR-143-3p mimics共转染293T细胞, 荧光活性的比较, $^{\#}P>0.05$, 与NC、NCI、control、miR-143-3p inhibitor组比较。

A: wild-type double fluorescence reporter gene vector plasmid of circCALN1 and miR-143-3p mimics co-transfected 293T cells, comparison of fluorescence activity, $*P<0.05$, compared with NC, NCI, control, miR-143-3p inhibitor groups; B: comparison of the fluorescence activity of 293T cells co-transfected with miR-143-3p mimics and plasmid containing circCALN1 mutant double fluorescence reporter gene; $^{\#}P>0.05$, compared with NC, NCI, control, miR-143-3p inhibitor groups; C: wild-type double fluorescence reporter gene vector plasmid of BCL-2-3'UTR and miR-143-3p mimics co-transfected 293T cells, comparison of fluorescence activity, $*P<0.05$, compared with NC, NCI, control, miR-143-3p inhibitor groups; D: mutant double fluorescence reporter gene vector plasmid of BCL-2-3'UTR and miR-143-3p mimics co-transfected 293T cells, comparison of fluorescence activity, $^{\#}P>0.05$, compared with NC, NCI, control, miR-143-3p inhibitor groups.

图4 双荧光活性的比较

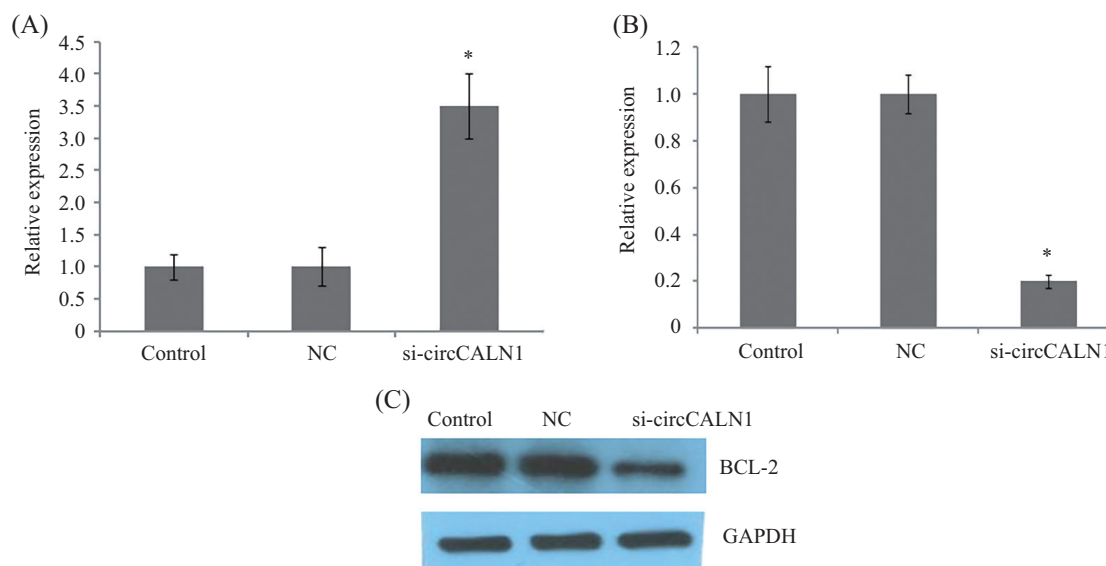
Fig.4 Comparison of double fluorescence activity

3 讨论

鼻咽癌是一种发生于鼻咽腔顶部和侧壁的恶性肿瘤。鼻咽癌主要在亚洲发病率最高, 鼻咽癌的发病原因与多种因素有关, 包括病毒、环境和遗传因素^[8-9]。尽管在临床治疗上取得了重大进展, 鼻咽癌仍然是最难发现和治疗的癌症类型之一。直到最近, NPC的发病分子机制还不清楚。越来越多的证据表明, 异常表达的非编码RNA(non-coding RNA, ncRNAs)包括 miRs(microRNAs)、长ncRNAs和一些环状RNAs(circRNAs)在内是肿瘤发生和发展的原

因, 包括NPC^[10]。circRNAs的解除调控可使其作为肿瘤抑制因子或癌基因, 控制细胞增殖、迁移和转移^[11]。进一步检查和验证circRNAs在鼻咽癌中的作用及其调控机制, 将有助于为鼻咽癌的治疗指明新的方向。

CircRNA分子富含miRNA结合位点, 能竞争内源性RNA, 阻断或降低miRNA对基因的抑制作用, 从而促进靶基因的表达^[12]。BCL-2蛋白质家族是影响凋亡程序平衡天平倾斜方向的重要调节因素。该家族包含促凋亡和促生存蛋白, 将平衡移向后者



A: miR-143-3p相对表达水平, $*P < 0.05$, 与control、NC组比较; B: BCL-2相对表达水平, $*P < 0.05$, 与control、NC组比较; C: Western blot检测BCL-2蛋白相对表达水平。

A: the relative expression of miR-143-3p, $*P < 0.05$ compared with control group and NC group; B: BCL-2 relative expression level, $*P < 0.05$ compared with control group and NC group; C: Western blot was used to detect the relative expression level of BCL-2 protein.

图5 RT-PCR检测基因的相对表达水平

Fig.5 Relative expression levels of genes detected by RT-PCR

是癌细胞逃避凋亡的既定机制。越来越多的学者的研究结果显示, BCL-2的差异表达与人类多种肿瘤密切相关, 并直接或间接地影响到肿瘤细胞发展的各个阶段, 包括增殖、迁移、侵袭和凋亡等^[13-14]。BCL-2在鼻咽癌组织中呈高表达^[15]。miR-143-3p可能经MAPK7途径抑制食管癌细胞的增殖、迁移与侵袭^[16]。miR-143-3p在肺癌组织中低表达, 同样地, miR-143-3p在肺癌细胞中的表达也显著低于正常肺上皮细胞; 过表达miR-143-3p抑制了肺癌细胞的增殖活性、迁移和侵袭能力, 过表达miR-143-3p显著抑制TAK1的表达^[17]。miR-143-3p是否在鼻咽癌表达, 目前, 尚未见报道。在本研究中, 为了研究circCALN1潜在的调控机制, 运用生物信息学软件预测到circCALN1与miR-143-3p、miR-143-3p与BCL-2之间的相互结合作用。构建双荧光报告基因载体验证了circCALN1调控miR-143-3p的表达, BCL-2是miR-143-3p调控的靶基因。而降低circCALN1的表达, 促进miR-143-3p的表达, 从而下调BCL-2的表达。结果表明, circCALN1、miR-143-3p、BCL-2三者组成了调控通路。由于circCALN1、BCL-2在鼻咽癌组织及细胞株中呈高表达, miR-143-3p在鼻咽癌组织及细胞株中呈低表达, 运用过表达及阻断表达技术证明, circCALN1、miR-143-3p、BCL-2

三者均影响鼻咽癌细胞株增殖与侵袭。这就说明, circCALN1/miR-143-3p/BCL-2调控通路影响鼻咽癌增殖与侵袭。关于circRNA的作用机制, 研究最为成熟的是其作为miRNA分子“海绵”发挥的作用^[12]。CircRNA_000543抑制靶向miR-9/血小板衍生生长因子受体B轴增强对鼻咽癌的放疗作用^[13]。circHIPK3通过保护ELF3免受miR-4288介导的沉默而促进鼻咽癌的进展, 提示circHIPK3-miR-4288-ELF3调控环可能是鼻咽癌预防的潜在靶点^[14]。CircZNF609通过与Sp1竞争吸附miR-150-5p促进鼻咽癌的生长和转移。circRPMS1通过诱导多个miRNA和促进上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进而促进鼻咽癌的发生。miR-203、miR-31和miR-451抑制剂可逆转circRPMS1基因敲除对鼻咽癌细胞的影响^[15]。circTCF25通过抑制miR-103a-3p或miR-107, 正向调控CDK6的功能, 从而促进细胞增殖^[16]。

总之, 我们的研究首次证明, circCALN1/miR-143-3p/BCL-2调控通路影响鼻咽癌增殖与侵袭, 这为临床上鼻咽癌的治疗提供了新的干预靶点, 也为鼻咽癌的早期诊断与预后指明了方向, 但是, 由于研究未在动物实体瘤中证明这一现象, 存在一定的不足之处。今后, 我们将增加临床样本量及构建动物模型, 进行论证。

参考文献 (References)

- [1] YOU R, LIU Y P, LIN M, et al. Relationship of circulating tumor cells and Epstein-Barr virus DNA to progression-free survival and overall survival in metastatic nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(10): 2873-83.
- [2] DENG J, HE Y, SUN X S, et al. Construction of a comprehensive nutritional index and its correlation with quality of life and survival in patients with nasopharyngeal carcinoma undergoing IMRT: a prospective study [J]. *Oral Oncol*, 2019, 98: 62-8.
- [3] AMELIA F I, YUSUF M, ARTONO. Correlation between β -Catenin expression and staging in nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 2019, 71(Suppl 1): 384-9.
- [4] JEREMY E, WILUSE J E, SHARP P A. Molecular biology. A circuitous route to noncoding RNA [J]. *Science*, 2013, 340(6131): 440-1.
- [5] GUTTMAN M, RINN J L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs [J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 339-46.
- [6] 黄静, 李欣晓, 吴伟豪, 等. 人鼻咽癌组织环状RNA差异表达分析[J]. 医学生研究生报(HUAGNG J, LI X X, WU W H, et al. Differential expression analysis of cyclic RNA in human nasopharyngeal carcinoma [J]. *Journal of Medical Students*), 2018, 31(8): 807-9.
- [7] HE J H, HAN Z P, YU G L, et al. CDX2/mir-145-5p/SENP1 pathways affect LNCaP cells invasion and migration [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 477-87.
- [8] CHOW J C, NGAN R K, CHEUNG K M, et al. Immunotherapeutic approaches in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(11): 1165-72.
- [9] SPENCE T, BRUCE J, YIP K W, et al. MicroRNAs in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin Clin Oncol* 2016, 5(2): 1-11.
- [10] MING X, SHUANG J W. Upregulation of circRNA_0000285 serves as a prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma and is involved in radiosensitivity [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6495-501.
- [11] ZHAO J M, LI L, WANG Q, et al. CircRNA expression profile in early-stage lung adenocarcinoma patients [J]. *Cell Physiol Biochem* 2017, (44): 2138-46.
- [12] LI Y, ZHENG Q P, BAO C Y, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis [J]. *Cell Res*, 2015, 25(8): 981-4.
- [13] LETAI A G. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(2): 121-32.
- [14] ROBERTS A W, SEYMOUR J F, BROWN J R, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease [J]. *J Clin Oncol*, 2012; 30: 488-96.
- [15] LU Q L, FLIA G, LUCAS S, et al. Bcl-2 proto oncogene expression in Epsteinbarr virus associated nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 1993, 53(1): 29-35.
- [16] HE Y, FENG H L, JIAO J B, et al. Mechanism of miR-143-3p inhibiting proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells by targeting MAPK7 [J]. *Artif Cell Nanomed B*, 2019, 47(1): 2065-71.
- [17] 康亮亮, 齐书山, 袁洪志. miR-143-3p通过靶向TAK1抑制肺癌增殖和侵袭[J]. 生物技术通讯(LIAN L L, QI S S, YUAN H Z. miR-143-3p inhibits the proliferation and invasion of lung cancer by targeting TAK1 [J]. *Biotechnology Communications*), 2019, 30(3): 332-7.
- [18] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-8.
- [19] LI C, HAO Z, ZHEN G G. CircRNA_000543 knockdown sensitizes nasopharyngeal carcinoma to irradiation by targeting miR-9/platelet-derived growth factor receptor B axis [J]. *Biochem Bioph Res*, 2019, 512(4): 786-92.
- [20] KE Z Y, XIE F, ZHENG C P, et al. CircHIPK3 promotes proliferation and invasion in nasopharyngeal carcinoma by abrogating miR-4288-induced ELF3 inhibition [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1699-706.
- [21] LIU Q W, SHUAI M X, XIA Y. Knockdown of EBV-encoded circRNA circRPMS1 suppresses nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and metastasis through sponging multiple miRNAs [J]. *Cancer Mang Res*, 2019, 11: 8023-31.