

Hsa_circ_0000745对肝癌细胞增殖、侵袭、迁移的作用及其机制

朱会芳 张晓 李晨卿 李宇龙 时开航 祝安心 贺国洋*

(新乡医学院基础医学院病理学系, 新乡 453000)

摘要 该文主要研究环状RNA hsa_circ_0000745对肝癌细胞的促肿瘤作用及其相关作用机制。首先, 采用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)方法检测不同肝癌细胞中环状RNA hsa_circ_0000745的表达; 其次, 利用siRNA干扰技术敲低HepG2细胞中的hsa_circ_0000745; 然后, 采用CCK-8和平板克隆实验检测细胞的增殖能力, 用Transwell实验和划痕愈合实验检测肝癌细胞HepG2的侵袭及迁移能力, 利用Western blot方法检测增殖、侵袭及迁移相关蛋白的表达。结果表明, 干扰hsa_circ_0000745后, 肝癌细胞的增殖及克隆形成能力降低($P<0.05$), 同时伴有增殖相关蛋白cyclin D1表达水平下降($P<0.001$), 细胞迁移和侵袭能力降低($P<0.05$), 上皮标志物E-Cadherin的表达水平上调($P<0.05$), 而间质标志物N-Cadherin和Vimentin的表达水平下调($P<0.05$)。该研究结果表明, 干扰hsa_circ_0000745显著抑制肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力和上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)。这为肝癌的诊断和治疗提供了新的潜在靶点和视角。

关键词 环状RNA; hsa_circ_0000745; 增殖; 侵袭; 迁移; EMT

Effects of hsa_circ_0000745 on Proliferation, Invasion and Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells and Its Mechanism

ZHU Huifang, ZHANG Xiao, LI Chenqing, LI Yulong, SHI Kaihang, ZHU Anxin, HE Guoyang*

(Department of Pathology, Basic Medical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

Abstract This study was to investigate tumor-promoting effect of circular RNA hsa_circ_0000745 on hepatocellular carcinoma cells and its related mechanism. Firstly, quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of circular RNA hsa_circ_0000745 in hepatocellular carcinoma cells. Secondly, hsa_circ_0000745 in HepG2 cells was knocked down by siRNA interference technology, and then CCK-8 and plate cloning experiments were used to detect the proliferation ability of cells. Transwell test and scratch healing test were used to detect cell invasion and migration ability. Western blot was used to detect the related proteins of proliferation, invasion and migration. The results showed that after interfering with hsa_circ_0000745, the proliferation and clonogenic ability of hepatocellular carcinoma cells were decreased ($P<0.05$), and the expression of cyclin D1 was downregulated ($P<0.001$). The migration and invasion abilities of cells were decreased ($P<0.05$). The expression of

收稿日期: 2020-11-25 接受日期: 2021-01-13

新乡医学院省级大学生创新创业训练计划项目(批准号: S202010472022)、国家自然科学基金(批准号: 31800658、81772524)和河南省科技攻关发展项目(批准号: 202102310621)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13523239355, E-mail: 59674800@qq.com

Received: November 25, 2020

Accepted: January 13, 2021

This work was supported by Xinxiang Medical University Provincial Students Innovation and Entrepreneurship Training Program Project (Grant No.S202010472022), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31800658, 81772524) and the Science and Technology Key Project of Henan Province (Grant No.202102310621)

*Corresponding author. Tel: +86-13523239355, E-mail: 59674800@qq.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5483>

epithelial marker E-Cadherin was up-regulated ($P<0.05$), and the expressions of interstitial markers N-Cadherin and Vimentin were down-regulated ($P<0.05$). The results showed that knockdown of circular RNA hsa_circ_0000745 significantly inhibited the proliferation, migration, invasion and EMT (epithelial-mesenchymal transition) of hepatocellular carcinoma cells, which provided a new potential target and perspective for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma.

Keywords circular RNA; hsa_circ_0000745; proliferation; invasion; migration; EMT

原发性肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其病死率在所有恶性肿瘤中居第二位,严重影响着人们的生命和健康,其高转移和高侵袭性是引起肝细胞癌高复发的重要因素^[1-3]。因此,明确肝癌的发生、发展机制,鉴定出新的特异性生物标志物和治疗靶点至关重要。

环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类新发现的内源性非编码RNA分子,与线性RNA不同的是, circRNAs是不具有5'端帽子结构和3'端poly(A)尾巴结构的共价闭环状RNA分子,其广泛存在于真核细胞内,表达丰富,结构保守且稳定,并且circRNA的表达具有组织及细胞类型的特异性,这些特征使circRNA具有作为疾病分子诊断标志物的潜能^[4-6]。最近的研究表明, circRNA在肝细胞癌进展中起重要作用,直接调控肝细胞癌的细胞增殖、凋亡和转移。例如,环状RNA-cSMARCA5的下调与肝细胞癌的侵袭性显著相关,并且cSMARCA5可抑制肝癌细胞的生长和迁移^[7];而肝癌组织中circ-IGF1R的高表达水平与肿瘤大小有关,此外, siRNA敲除circ-IGF1R可显著抑制肝癌细胞增殖,诱导细胞周期阻滞^[8]。目前关于circRNAs作用机制的研究主要有以下几个方面: (1) 在细胞中起到miRNA海绵的作用,能阻断或降低miRNA对基因的抑制作用,从而促进靶基因的表达^[9]; (2) 与蛋白结合调控下游基因的表达^[10]; (3) 少数circRNA具有蛋白翻译作用^[11]。HUANG等^[12]研究报道, circRNA hsa_circ_0000745在胃癌组织以及病人血浆中呈低表达,且与胃癌的分化程度以及淋巴结转移相关。但是JIAO等^[13]研究显示, hsa_circ_0000745在宫颈鳞癌中高表达,并且促进了宫颈癌细胞的增殖、侵袭及迁移能力。因此, hsa_circ_0000745在肿瘤发生发展中的作用及机制尚不明确。circRNA hsa_circ_0000745在肝细胞癌发生发展过程中作用及机制尚未见报道。本研究旨在分析circRNA hsa_circ_0000745在肝细胞癌中的表达及其临床意义,并探讨hsa_circ_0000745在肝细胞癌的发

生发展中的作用及机制,以期寻找肝细胞癌新的肿瘤标志物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人正常肝细胞L02和人肝细胞癌细胞株HepG2、Huh7、QGY7701、SMMC7721及MHC-C97L均由本实验室自主保存。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基、胎牛血清和青/链霉素均购自美国Gibco公司; TRIzol、逆转录试剂盒和SYBR Master Mix试剂盒均购自日本TaKaRa公司; 转染试剂Lipofectamine 3000购自苏州宇恒生物科技有限公司; 引物合成由生工生物工程科技(上海)有限公司合成; hsa_circ_0000745小干扰RNA(siRNA)及阴性对照RNA(NC)均由上海吉玛制药技术有限公司设计合成; RIPA裂解液、BCA试剂购自南京凯基生物科技有限公司; Transwell小室购自Corning公司; α -Tublin单克隆抗体、E-钙黏着蛋白(E-Cadherin)、神经型钙黏附蛋白(N-Cadherin)和波形蛋白(Vimentin)抗体购自英国Abcam公司; 细胞周期蛋白D1(cyclin D1)抗体购自CST公司; SDS-PAGE、PVDF膜和ECL发光试剂盒购自美国Merk公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人正常肝细胞L02和人肝细胞癌细胞株HepG2、Huh7、QGY7701、SMMC7721及MHCC97L用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养。在37 °C、5% CO₂培养箱中培养。待细胞融合达到80%以上时,用0.25%胰蛋白酶消化,并进行传代。

1.2.2 qRT-PCR法检测 hsa_circ_0000745的表达 取对数生长期的细胞L02和HepG2,按照TRIzol试剂盒说明书提取细胞总RNA,分光光度计测量总RNA浓度及纯度,取1 μ g RNA按照逆转录试剂盒说明书将其逆转录成cDNA。按照SYBR Master Mix试剂盒说明书,进行qRT-PCR检测。hsa_circ_0000745的引

物序列为: F5'-ATT ACT AAA GGC AAA CGG TGA-3'; R5'-ACA GTT ACT GAA AAT TCC CGT G-3'。内参 *GAPDH* 的引物序列为: F5'-ACA GTC AGC CGC ATC TTC TT-3'; R5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3'。以 *GAPDH* 为内参, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算相对表达量, 实验重复3次, 计算平均值。

1.2.3 细胞转染 取对数生长的肝癌细胞HepG2, 胰酶消化并接种于培养板中, 根据 Lipofectamine 3000 Reagent 转染试剂盒的说明书配制转染液。将 hsa_circ_0000745 的干扰片段和转染试剂按比例混匀, 室温静止20 min后加入干扰组HepG2细胞(终浓度 50 nmol/L)(命名为HepG2-si细胞), 再次用相同的实验方法将阴性对照的小干扰片段加入对照组HepG2细胞(命名为HepG2-NC细胞), 然后将转染后的不同细胞置于37 °C、5% CO₂培养箱中常规培养。

1.2.4 CCK-8细胞增殖实验检测肝癌细胞HepG2的增殖能力 用0.02%胰酶消化处于对数生长期的HepG2-si细胞以及HepG2-NC细胞, 然后将两组细胞接种于96孔板中(按 5×10^3 个/孔), 每组细胞浓度设定6个重复孔, 实验重复3次, 培养0、1、2、3、4、5天后, 于检测前更换新的完全DMEM培养基100 μ L/孔, 后每孔加入10 μ L CCK-8, 继续于37 °C、5% CO₂培养2 h后, 使用酶标仪检测波长处于450 nm处的吸光度(*D*)值。此部分实验重复3次, 其结果取各组平均值并进行统计学分析。

1.2.5 平板克隆实验检测肝癌细胞HepG2的增殖能力 用0.02%胰蛋白酶消化已转染的HepG2-si以及对照组细胞HepG2-NC, 制成单细胞悬液。然后将两组细胞接种于6孔板中(按 1×10^3 个/孔), 缓慢摇匀细胞后将不同组的细胞置于37 °C、5% CO₂培养箱中常规培养, 待6孔板中出现肉眼可见的细胞克隆后终止其培养。随后去掉培养基, 加入4%多聚甲醛固定20 min, 用PBS清洗3次, 再用苏木素染色5 min。最后用PBS清洗并晾干, 拍照进行记录。

1.2.6 Transwell实验检测肝癌细胞HepG2的侵袭能力 取对数生长期的干扰组细胞HepG2-si以及对照组细胞HepG2-NC, 用0.02%胰酶消化转染后的各组细胞, 制成单细胞悬液。按5:1比例用DMEM培养基稀释基质胶, 于小室上室每孔快速加入50 μ L上述混合物, 避免气泡的产生, 孵箱中孵育2 h待其凝固。然后在Transwell小室的上室中接种200 μ L肝癌细胞(含 1×10^5 个细胞); 用500 μ L含10%胎牛血清的

DMEM完全培养基作为趋化因子置于下室, 于37 °C、5% CO₂培养箱内孵育48 h; 4%多聚甲醛固定30 min, 苏木素染色30 min, 在正置光学显微镜下选取不同的5个视野进行计数并拍照。最后取均值并进行统计学分析。

1.2.7 划痕愈合实验检测细胞的迁移能力 取对数生长期的干扰组细胞HepG2-si以及对照组细胞HepG2-NC, 用0.02%胰酶消化转染后的各组细胞, 制成单细胞悬液。然后将两组细胞接种于6孔板中(按 5×10^5 个/孔), 将不同组的细胞置于37 °C、5% CO₂培养箱中常规培养; 待细胞的融合达到90%时, 用10 μ L的无菌枪头划线, 并吸去原培养基, 用PBS轻轻洗3次, 以去掉漂浮的细胞。最后于倒置显微镜10倍视野下取点, 分别记录划线0 h以及48 h的痕迹宽度的不同变化, 同时利用Image J软件测量其细胞的迁移距离, 并计算出细胞的迁移率。计算方法为: 细胞迁移率=(24 h划痕宽度-0 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.2.8 Western blot方法检测EMT标记物 RIPA裂解肝癌细胞HepG2-si以及对照组细胞HepG2-NC, 提取总蛋白, BCA法测定蛋白质浓度。100 °C条件下蛋白质变性10 min, 每孔上样30 μ g蛋白质, SDS-PAGE结束后, 将蛋白质转移至PVDF膜, 室温条件下5%牛奶封闭2 h, 分别用一抗[α -Tublin(1:1 000)、E-Cadherin(1:500)、N-Cadherin(1:500)和Vimentin(1:500)] 4 °C孵育过夜, HRP偶联的辣根过氧化物酶二抗室温孵育2 h, 最后使用ECL化学发光试剂进行曝光。利用Image J软件分析曝光的灰度值, 并以 α -Tublin作为内参, 进行统计分析。

1.2.9 统计学分析方法 本研究中的数据采用SPSS 19.0统计软件包进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计量资料使用 t 检验(independent-samples t test或者paired-sample t test)或单因素方差分析(One-Way ANOVA), 等级资料使用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 Hsa_circ_0000745在肝细胞癌组织和细胞中高表达

采用qRT-PCR方法检测hsa_circ_0000745在正常人肝细胞L02和不同肝癌细胞系中的表达。结果发现, hsa_circ_0000745在人肝癌细胞中的表达量显

著高于人正常肝细胞L02($P<0.001$, 图1A)。

同样用qRT-PCR方法检测了10例肝细胞癌组织及10例配对癌旁正常肝组织中hsa_circ_0000745的表达。结果发现, hsa_circ_0000745在肝细胞癌组织中的表达明显高于癌旁正常肝组织($P<0.05$, 图1B), 提示hsa_circ_0000745可能在肝细胞癌的发生发展过程中发挥作用。

2.2 干扰hsa_circ_0000745抑制肝癌细胞HepG2的增殖

首先通过qRT-PCR方法检测了干扰组细胞HepG2-si以及对照组细胞HepG2-NC细胞内hsa_circ_0000745的表达情况。结果显示, HepG2-si组细胞内hsa_circ_0000745的表达量明显低于对照组HepG2-NC细胞的表达, 说明siRNA的干扰效果较好可以用于后续实验(图2A)。

通过CCK-8细胞增殖实验检测干扰hsa_circ_0000745后HepG2细胞的生长变化。结果显示, 与对照组HepG2-NC细胞相比, 干扰组HepG2-si细胞的生长受到了明显的抑制(图2B)。另外, 通过

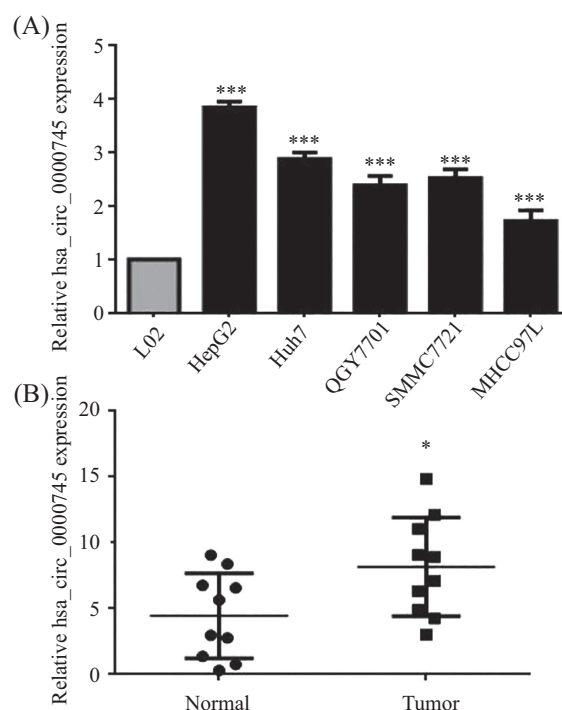
平板克隆形成实验检测了干扰hsa_circ_0000745后HepG2细胞的增殖变化, 结果发现与对照组HepG2-NC细胞相比, 干扰hsa_circ_0000745后细胞形成的克隆数目明显减少, 且形成的克隆体积也较小(图2C和图2D)。

2.3 干扰hsa_circ_0000745对HepG2细胞增殖相关蛋白表达的影响

Western blot方法检测了hsa_circ_0000745对HepG2细胞增殖相关蛋白cyclin D1表达的影响。结果显示, 与HepG2-NC对照组相比, 干扰hsa_circ_0000745后HepG2细胞中cyclin D1的表达水平降低(图3A和图3B)。已有研究证实, cyclin D1通过与周期蛋白依赖性激酶结合, 使细胞通过G₁期进入S期完成分裂增殖。Cyclin D1的过度表达缩短了G₁期的时限, 促使细胞发生恶性增殖。本结果提示, 干扰hsa_circ_0000745通过抑制cyclin D1的表达进而抑制HepG2细胞的增殖。

2.4 干扰hsa_circ_0000745对HepG2细胞侵袭和迁移能力的影响

通过Transwell侵袭实验和划痕愈合实验分别

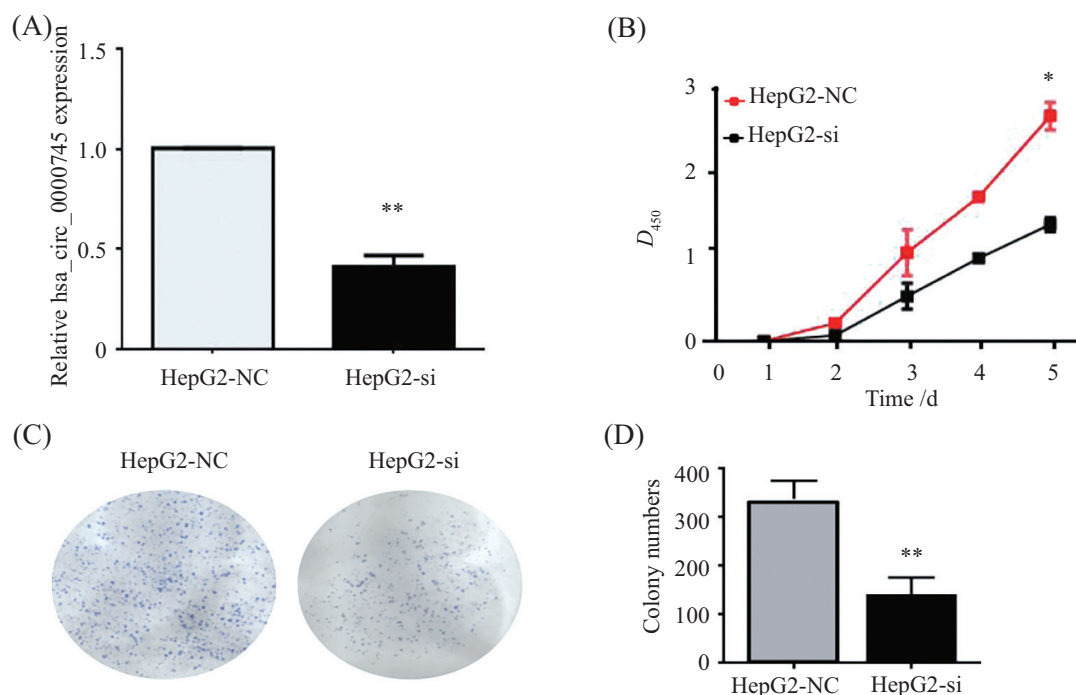


A: qRT-PCR方法检测hsa_circ_0000745在人正常肝细胞L02和不同肝癌细胞系中的表达, *** $P<0.001$, 与L02比较, $n=3$ 。B: qRT-PCR方法检测hsa_circ_0000745在肝癌组织及正常肝组织中的表达, * $P<0.05$, 与正常组相比。

A: qRT-PCR assay was used to measure hsa_circ_0000745 expression in hepatoma carcinoma cells, *** $P<0.001$ vs L02, $n=3$. B: the expression level of hsa_circ_0000745 in primary hepatoma carcinoma tissues (Tumor) adjacent normal tissues (Normal) was checked by qRT-PCR, * $P<0.05$ vs Normal group.

图1 Hsa_circ_0000745在肝细胞癌组织和细胞中高表达

Fig.1 Hsa_circ_0000745 is highly expressed in hepatoma carcinoma tissues and cells

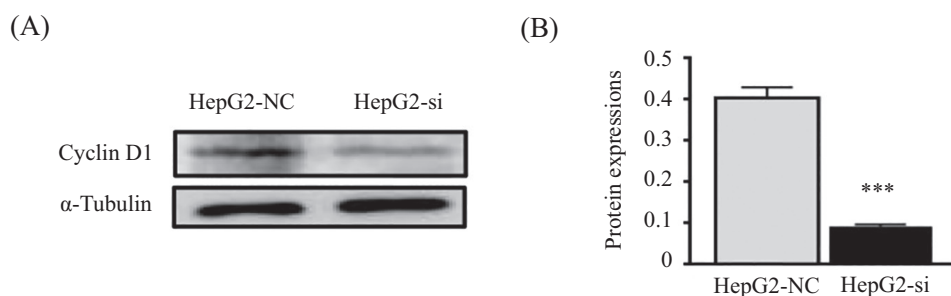


A: 靶向hsa_circ_0000745的siRNA和对照RNA转染HepG2后, qRT-PCR方法检测hsa_circ_0000745的表达; B: CCK-8实验检测hsa_circ_0000745对肝癌细胞HepG2增殖的影响; C、D: 平板克隆实验检测hsa_circ_0000745对肝癌细胞HepG2增殖的影响及统计分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与HepG2-NC组比较。

A: expression levels of hsa_circ_0000745 in HepG2 cells transfected with siRNA (HepG2-si) or negative control (HepG2-NC) were analyzed by qRT-PCR; B: the proliferative ability of HepG2 cells was detected by the CCK-8 assay; C,D: the proliferative ability of HepG2 cells was tested by plate cloning experiment and statistical analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HepG2-NC group.

图2 干扰hsa_circ_0000745抑制HepG2细胞的增殖

Fig.2 Knockdown of hsa_circ_0000745 inhibits proliferation of HepG2 cells



A、B: 靶向hsa_circ_0000745的siRNA和对照NC转染HepG2细胞后, Western blot检测细胞增殖相关蛋白cyclin D1的表达及统计分析。*** $P < 0.001$, 与HepG2-NC组比较。

A,B: after the HepG2 cells were transfected with siRNA targeting hsa_circ_0000745 and control NC, the expression of cyclin D1 was detected by Western blot and analyzed statistically. *** $P < 0.001$ vs HepG2-NC group.

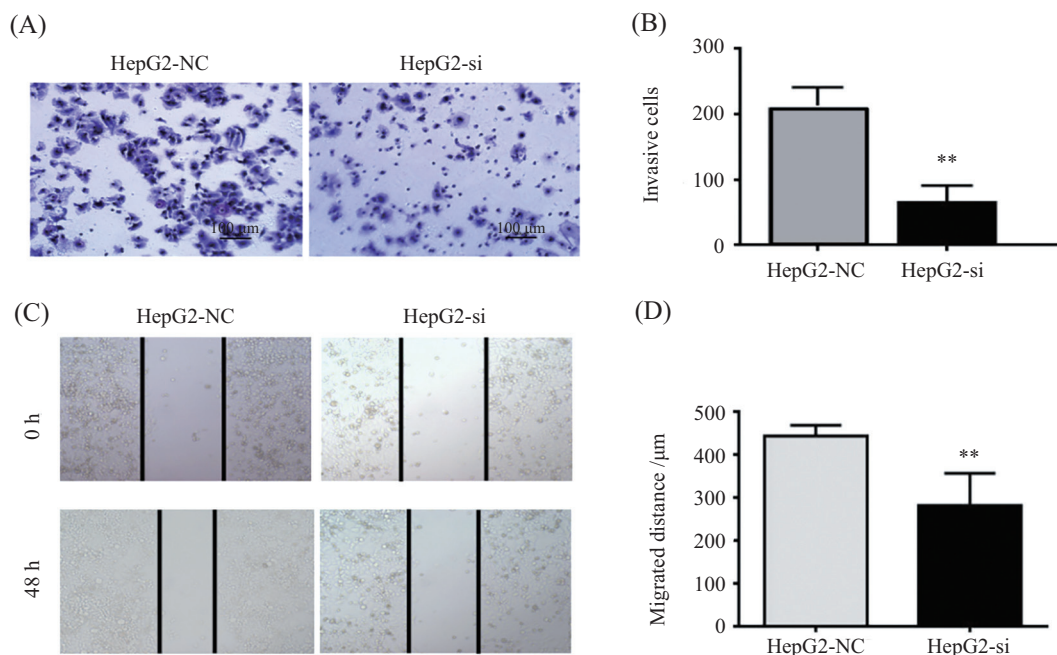
图3 干扰hsa_circ_0000745抑制HepG2细胞的增殖相关蛋白cyclin D1的表达

Fig.3 Knockdown of hsa_circ_0000745 inhibits cyclin D1 expression of HepG2 cells

检测hsa_circ_0000745对肝癌细胞HepG2侵袭和迁移功能的影响。Transwell侵袭实验和划痕愈合实验结果显示, 与对照组相比, 干扰hsa_circ_0000745后HepG2细胞的侵袭数目和迁移率均下降($P < 0.001$, 图4)。表明干扰hsa_circ_0000745可以抑制肝癌细胞HepG2的侵袭和迁移, hsa_circ_0000745的表达与肝癌细胞的侵袭及迁移具有一定的相关性。

2.5 干扰hsa_circ_0000745对HepG2细胞EMT相关蛋白表达的影响

上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)在肿瘤细胞的侵袭与转移中发挥了重要的调控作用。本文通过Western blot检测了EMT相关蛋白的表达。结果显示, 与对照组相比, 干扰hsa_circ_0000745后HepG2细胞中的上皮标志物E-Cad-

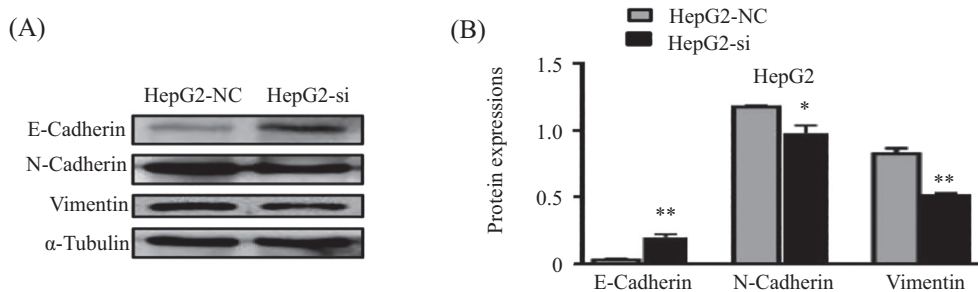


A、B: Transwell检测hsa_circ_0000745对肝癌细胞HepG2侵袭能力的影响及统计分析。C、D: 划痕实验检测各组细胞的迁移能力及统计分析; ** $P<0.01$, HepG2-NC组比较。

A,B: invasion ability was determined via Transwell assays and statistical analysis; C,D: the migrative ability of HepG2 cells was detected by the wound-healing assay and statistical analysis. ** $P<0.01$ vs HepG2-NC group.

图4 干扰hsa_circ_0000745抑制HepG2细胞的侵袭和迁移

Fig.4 Knockdown of hsa_circ_0000745 inhibits migration and invasion of HepG2 cells



A、B: 靶向hsa_circ_0000745的siRNA和对照NC转染HepG2细胞后, Western blot检测EMT指标蛋白的表达及统计分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与HepG2-NC组比较。

A,B: after the HepG2 cells were transfected with siRNA targeting hsa_circ_0000745 and control NC, the expressions of EMT markers were detected by Western blot and analyzed statistically. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs HepG2-NC group.

图5 干扰hsa_circ_0000745抑制HepG2细胞的EMT进展

Fig.5 Knockdown of hsa_circ_0000745 inhibits EMT progression of HepG2 cells

herin的表达增加, 而间叶标志物N-Cadherin和Vimentin的表达下降(图5)。提示干扰hsa_circ_0000745表达能抑制肝癌细胞的EMT。

3 讨论

CircRNAs是新分类的非编码RNA, 其是由特殊的末端反向互补的前体mRNA经过可变剪切所形成的首尾相连的闭合环状结构。CircRNAs在哺乳动物细胞中广泛存在, 抗干扰能力强, 表达量高且稳

定, 结构保守, 在物种间同源性好。CircRNAs的表达具有组织及细胞类型的特异性, 并且在血液、唾液、尿液或外泌体中也能检测到丰富的circRNAs。鉴于以上这些特征, circRNAs较适合作为疾病诊断的标志物。现已在多种肿瘤中发现具有诊断和预后判断价值的circRNAs。比如, LI等^[14]通过生物信息学分析筛选到了能够作为急性淋巴细胞白血病潜在分子标志物的circRNA(circ-0000978和hsa-circ-0000483)。另外, circHIPK3在大肠癌组织和细

胞系中显著上调,并促进了大肠癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力,具有作为大肠癌预后生物标志物的潜力^[15]。Hsa_circ_0000745来源于位于17号染色体的蛋白编码基因SPECC1,全长1 580碱基,目前对于circRNA hsa_circ_0000745在肝细胞癌中的作用及机制研究尚未见报道,因此,为了深入研究hsa_circ_0000745在肝细胞癌发生发展中的作用,本研究首先检测了肝癌组织和细胞中hsa_circ_0000745的表达,发现hsa_circ_0000745在肝癌组织和细胞中的表达均高于正常肝组织及肝细胞。因此,推测hsa_circ_0000745在肝癌细胞的发生发展中发挥着重要的调控作用。为了明确hsa_circ_0000745在肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移中的作用,本研究通过细胞体外CCK-8细胞增殖实验、平板克隆形成实验、划痕愈合实验以及Transwell小室实验发现,干扰肝癌细胞中hsa_circ_0000745的表达后肝癌细胞HepG2的增殖、侵袭和迁移能力显著下降,此结果表明,hsa_circ_0000745促进了肝癌细胞的增殖、侵袭以及迁移能力。因此,本研究利用体外实验首次证明了hsa_circ_0000745在肝细胞癌中的促癌作用。

细胞增殖是细胞的重要生理功能之一,而有丝分裂是真核生物进行增殖的主要形式,细胞的有丝分裂是有周期性的,受细胞周期所调控,正常细胞只有在相应生长需要的信号反应下才会增殖,而癌细胞的增殖基本上是不受控制的。细胞的分裂增殖,受细胞周期的严格控制,而细胞周期又受到细胞周期蛋白以及细胞周期蛋白依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的活性控制,其中细胞周期蛋白(cyclin)可分为3类: G₁期周期蛋白(cyclin C、D、E)、M期周期蛋白(cyclin B)、S期周期蛋白(cyclin A);能与cyclin结合并将cyclin作为其调节亚单位,进而表现出蛋白激酶活性的蛋白统称为CDK。其中, cyclin D-CDK4/6复合物通过不同的机制推动细胞周期由G₀/G₁期进入S期进行分裂增殖^[16-17]。有研究发现, cyclin D1的过表达增强了乳腺癌细胞的增殖^[18],因此,在本研究中我们检测了cyclin D1的表达以明确hsa_circ_0000745促进肝癌细胞增殖的调控机制。本研究通过Western blot检测了干扰hsa_circ_0000745后HepG2细胞中cyclin D1的表达,其结果发现,与对照组相比,干扰hsa_circ_0000745后HepG2细胞中cyclin D1的表达水平降低,因此,我们推测, hsa_circ_0000745通过促进cyclin D1的表达进

而促进HepG2细胞的增殖。

EMT是调控肿瘤细胞侵袭和转移过程的机制之一。在细胞发生EMT过程中,往往伴随有细胞骨架以及相关表型基因的改变,例如上皮标志物E-Cadherin表达的降低以及间质标志物N-Cadherin和Vimentin等的表达增加,使细胞紧密连接、极性丢失和间充质细胞形态转变,导致肿瘤细胞黏附作用减弱而运动能力增强,从而获得更强的迁移和侵袭能力^[19-20]。近期研究表明, circRNA在某些肿瘤中的表达异常也参与了EMT过程,进而调控肿瘤的恶性生物学行为^[21-25]。因此,本研究为了进一步探讨hsa_circ_0000745促进肝癌细胞侵袭和转移的可能机制,利用Western blot技术检测了hsa_circ_0000745对EMT重要标记蛋白表达的影响,干扰hsa_circ_0000745后发现,肝癌细胞HepG2中EMT间质标记物N-Cadherin和Vimentin的表达降低,而上皮标记物E-Cadherin表达增高。此结果提示, hsa_circ_0000745可能通过促进肝癌细胞HepG2的EMT进程进而促进细胞的侵袭和迁移能力。然而, hsa_circ_0000745如何调控EMT相关蛋白的表达,其具体调控机制尚不明确,需未来进一步深入研究。

综上所述, hsa_circ_0000745在肝癌细胞中高表达,并通过调控肝癌细胞的细胞周期以及EMT表型改变进而促进肝癌细胞的增殖、侵袭与迁移,从而参与肝癌的发生发展。本研究初步证明了hsa_circ_0000745在肝癌细胞增殖、侵袭与迁移中的功能及机制,为肝癌的诊疗提供了新靶标。但关于hsa_circ_0000745的具体分子调控机制及其在肝细胞癌患者体液中的表达仍需进一步探究。

参考文献 (References)

- [1] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-53.
- [2] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-14.
- [3] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(5): 363-85.
- [4] DU W W, YANG W, LI X, et al. A circular RNA circ-DNMT1 enhances breast cancer progression by activating autophagy [J]. *Oncogene*, 2018, 37(44): 5829-42.
- [5] LI X, LI C, LIU Z, et al. Circular RNA circ-FoxO3 inhibits myoblast cells differentiation [J]. *Cells*, 2019, 19, 8(6): 616.
- [6] LUCAS T, BONAUE A, DIMMELER S. RNA therapeutics in

- cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2018, 123(2): 205-20.
- [7] YU J, XU Q G, WANG Z G, et al. Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatology*, 2018, 68(6): 1214-27.
- [8] FU H W, LIN X, ZHU Y X, et al. Circ-IGF1R has pro-proliferative and anti-apoptotic effects in HCC by activating the PI3K/AKT pathway [J]. *Gene*, 2019, 20(16): 144031.
- [9] PIWECKA M, GLAZAR P, HERMANDEZ-MIRANDA L R, et al. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function [J]. *Science*, 2017, 357(6357): eaam8526.
- [10] DU W W, YANG W, LIU E, et al. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): 2846-58.
- [11] YANG Y, GAO X, ZHANG M, et al. Novel role of FBXW7 circular RNA in repressing glioma tumorigenesis [J]. *J Nat Cancer Ins*, 2018, 110(3): 304-15.
- [12] HUANG M, HE Y R, LIANG L C, et al. Circular RNA hsa_circ_0000745 may serve as a diagnostic marker for gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(34): 6330-8.
- [13] JIAO J, ZHANG T, JIAO X, et al. hsa_circ_0000745 promotes cervical cancer by increasing cell proliferation, migration, and invasion [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 1287-95.
- [14] LI M, MENG F, LU Q. Expression profile screening and bioinformatics analysis of circRNA, lncRNA, and mRNA in acute myeloid leukemia drug-resistant cells [J]. *Turk J Haematol*, 2020, 37(2): 104-10.
- [15] ZENG K, CHEN X, XU M, et al. CircHIPK3 promotes colorectal cancer growth and metastasis by sponging miR-7 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(4): 417.
- [16] ROMERO-POZUELO J, FIGLIA G, KAYA O, et al. Cdk4 and Cdk6 couple the cell-cycle machinery to cell growth via mTORC1 [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(2): 107504.
- [17] LEE B, SANDHU S, MCARTHUR G. Cell cycle control as a promising target in melanoma [J]. *Curr Opin Oncol*, 2015, 27(2): 141-50.
- [18] O'BRIEN N, CONKLIN D, BECKMANN R, et al. Preclinical activity of abemaciclib alone or in combination with antimetabolic and targeted therapies in breast cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(5): 897-907.
- [19] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3): 212-26.
- [20] MITTAL V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13: 395-412.
- [21] SHEN T, CHENG X, LIU X, et al. Circ_0026344 restrains metastasis of human colorectal cancer cells via miR-183 [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 4038-45.
- [22] MENG J, CHEN S, HAN J X, et al. Twist1 regulates vimentin through Cul2 circular RNA to promote EMT in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(15): 4150-62.
- [23] ZHOU L H, YANG Y C, ZHANG R Y, et al. CircRNA_0023642 promotes migration and invasion of gastric cancer cells by regulating EMT [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(8): 2297-303.
- [24] PAN Z, CAI J, LIN J, et al. A novel protein encoded by circF-NDC3B inhibits tumor progression and EMT through regulating Snail in colon cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 71.
- [25] LI Y F, PEI F L, CAO M Z. CircRNA_101951 promotes migration and invasion of colorectal cancer cells by regulating the KIF3A-mediated EMT pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(5): 3355-61.