

·基础研究·

DOI: [10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.006](https://doi.org/10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.006)

circ_0091579/miR-330-3p/RNF126 轴影响结直肠癌 LoVo 细胞的增殖、侵袭和凋亡

杨兴广, 艾可为, 杨继武, 程伟, 赵鹏举 (大理大学第一附属医院 普通外科, 云南 大理 671000)

[摘要] **目的:** 探讨环状 RNA circ_0091579 作为分子海绵吸附 miR-330-3p 介导环指蛋白 126 (ring finger protein 126, RNF126) 对结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 细胞增殖、凋亡、侵袭的影响。**方法:** 选取 2019 年 2 月至 2020 年 5 月在大理大学第一附属医院行手术治疗的 60 例 CRC 患者的癌组织和癌旁组织。构建 circ_0091579、miR-330-3p 的过表达或敲减的 CRC LoVo 细胞, qPCR 检测 CRC 组织和细胞中 circ_0091579、miR-330-3p 和 RNF126 的表达; MTT、Transwell、流式细胞术分别检测细胞的增殖、侵袭、凋亡情况; 生物信息学方法预测 circ_0091579 和 miR-330-3p、miR-330-3p 和 RNF126 的靶向关系并用双荧光素酶报告实验和 RNA 免疫沉淀实验验证。**结果:** CRC 组织和多种细胞 (HCT116、SW620、CW-2、LoVo 细胞) 中, circ_0091579 和 RNF126 均高表达、miR-330-3p 均低表达 (均 $P < 0.05$)。敲减 circ_0091579 可以抑制 LoVo 细胞的增殖、侵袭而促进其凋亡 (均 $P < 0.05$), 但该影响在加入 miR-330-3p-inhibitor 后被逆转; 过表达 miR-330-3p 使 LoVo 细胞增殖和侵袭能力减弱但凋亡程度加强 (均 $P < 0.05$), 该影响在加入 RNF126 后被抵消。circ_0091579、miR-330-3p 和 RNF126 之间存在靶向作用关系。**结论:** circ_0091579 通过 miR-330-3p/RNF126 轴促进 LoVo 细胞增殖、侵袭而抑制其凋亡。

[关键词] circ_0091579; miR-330-3p; 环指蛋白 126; 结直肠癌; LoVo 细胞; 增殖; 侵袭; 凋亡

[中图分类号] R735.3; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)05-0460-09

circ_0091579/miR-330-3p/RNF126 axis affects the proliferation, invasion and apoptosis of colorectal cancer LoVo cells

YANG Xingguang, AI Kewei, YANG Jiwu, CHENG Wei, ZHAO Pengju (Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, Yunan, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the effect of circRNA circ_0091579 on the proliferation, apoptosis and invasion of colorectal cancer (CRC) cells by functioning as a molecular sponge of miR-330-3p and mediating ring finger protein 126 (RNF126). **Methods:** Sixty pairs of cancer tissue and adjacent normal tissue of CRC patients receiving surgical treatment in the First Affiliated Hospital of Dali University from February 2019 to May 2020 were collected. CRC LoVo cells with over-expression or knockdown of circ_0091579 and miR-330-3p were constructed. The expression of circ_0091579, miR-330-3p and RNF126 in CRC tissue and cell lines (HCT116, SW620, CW-2 and LoVo cells) was detected by qPCR. The proliferation, invasion and apoptosis were measured by MTT assay, Transwell assay and Flow cytometry, respectively. The targeting relationship between circ_0091579 and miR-330-3p, miR-330-3p and RNF126 was predicted by bioinformatics tool and verified by Dual luciferase reporter assay and RNA immunoprecipitation experiments. **Results:** In CRC tissues and cell lines, circ_0091579 and RNF126 were both highly expressed, and miR-330-3p was lowly expressed (all $P < 0.05$). Knockdown of circ_0091579 could inhibit the proliferation and invasion, but promote the apoptosis of CRC cells ($P < 0.05$); however, this effect was reversed by miR-330-3p-inhibitor. Over-expression of miR-330-3p could suppress the ability of proliferation and invasion, but enhance the apoptosis of LoVo cells ($P < 0.05$), and this effect was rescued after the participation of RNF126. There is a targeting relationship among circ_0091579, miR-330-3p and RNF126. **Conclusion:** circ_0091579 promotes the proliferation and invasion, and inhibits the apoptosis of LoVo cells via miR-330-3p/RNF126 axis.

[Key words] circ_0091579; miR-330-3p; ring finger protein 126 (RNF126); colorectal cancer (CRC); LoVo cell; proliferation; invasion; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(5): 460-468. DOI: [10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.006](https://doi.org/10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.006)]

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (No. 2019J0767)。Project supported by the Scientific Research Fund of the Education Department of Yunnan Province (No. 2019J0767)

[作者简介] 杨兴广 (1986-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事普外科相关疾病的临床和基础研究, E-mail: yingtian008133@163.com

[通信作者] 艾可为 (AI Kewei, corresponding author), 本科, 主任医师, 主要从事普外科及肿瘤相关疾病的研究, E-mail: 13577880176@139.com; 杨继武 (YANG Jiwu, co-corresponding author), 本科, 教授、主任医师, 主要从事普外科相关疾病的研究, E-mail: yangjiwu64@126.com

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 俗称大肠癌,是消化系统常见的恶性肿瘤,中老年男性为多发群体^[1-4]。circRNA 在疾病中的作用近年来被逐渐揭示,如 circRNA-UBAP2 被证实能够加速卵巢癌的进展, circ_0007766 能促进胃癌的进展^[5-7]。同样, circRNA 也参与到了 CRC 中,如 circAGFG1 在 CRC 中表达上调,能促进其癌细胞的转移; circ_0038646 通过 miR-331-3p/GRIK3 促进 CRC 细胞的增殖和侵袭^[8-9]。但是还有很多 circRNA 在 CRC 中的功能仍有待进一步探讨。circ_0091579 被证明在肝癌中上调,沉默 circ_0091579 可以抑制肝癌细胞的增殖、侵袭及转移^[10]。本研究探讨 circ_0091579 在 CRC 中的生物学作用。研究^[11]发现,向大肠癌细胞中转染 miR-330-3p 抑制剂能够促进大肠癌细胞的增殖、转移和侵袭。miR-330-3p 也被发现在胃癌中发挥抑癌作用^[12]。环指蛋白 126 (ring finger protein 126, RNF126) 是一种 E3 泛素连接酶,其作为 miR-330-3p 的作用靶点,被发现能够诱导胃癌细胞的增殖^[13],但是对其在 CRC 中的作用研究尚不充分。本研究旨在进一步明确 circ_0091579/miR-330-3p/RNF126 轴在 CRC 中的作用,为 CRC 的预防以及诊断治疗找到新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (货号: C11965 500BT) 购自北京优健萌威医药科技有限公司, Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂 (货号: 13778075)、qPCR 仪 (7500)、NE-PERTM 核和细胞质提取试剂 (78833) 均购自 Thermo 公司, Invitrogen TRIzol 试剂盒 (货号: 15596026) 购自北京明阳华生物科技有限公司, 逆转录试剂盒 II (货号: RP1400) 购自香港基因有限公司, qPCR 试剂盒 (货号: SR1110) 购自北京索莱宝科技有限公司, RNase R 酶 (货号: R0301) 购自广州吉赛生物有限公司, 共聚焦显微镜 (型号: STELLARIS 8) 购自徕卡显微系统公司, pMIR-REPORT 载体 (货号: VT1399) 购自优宝生物科技有限公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (货号: RG027) 购自上海碧云天生物科技有限公司, RIP 试剂盒 (货号: KT102-01) 购自广州赛诚生物科技有限公司, MTT 试剂盒 (货号: E606334) 购自上海生工生物工程有限公司, 酶标分析仪 (型号: HBS-1096C) 购自南京德铁实验设备有限公司, 一抗 [抗 Ago2 (货号: ab186733)、抗 IgG (货号: ab186233)] 均购自英国 Abcam 公司, Transwell 小室 (货号: 353090) 购自北京科恩堡生物科技有限公司, Annexin V-FITC/PI 荧光双染细胞凋亡检测试剂盒 (货号: E-CK-A211) 购自武汉 Elabscience 生物科

技有限公司, 流式细胞仪 (型号: CytoFLEX) 购自 Beckman Coulter 公司。

1.2 样本资料和实验用细胞

60 组 CRC 组织和癌旁组织 (至少距离原发灶边缘 3 cm) 均取自 2019 年 2 月至 2020 年 5 月在大理大学第一附属医院行手术治疗的 CRC 患者, 其中男性 33 例、女性 27 例, 中位年龄 44.4 岁, 平均年龄 (47.8±8.2) 岁, 在手术前未接受过其他抗癌治疗。所有入组的患者均签署了书面知情同意书。本研究得到大理大学第一附属医院伦理委员会的批准。CRC 细胞 (HCT116、SW620、CW-2、LoVo) 和结肠上皮细胞 (NCM460) 均来自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。各细胞均使用 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基进行培养, 并置于含有 5% CO₂、37 °C 的培养箱中常规培养。

1.3 细胞转染

将 LoVo 细胞分为以下组别: si-NC, si-circ_0091579, si-circ_0091579+anti-miR-NC, si-circ_0091579+miR-330-3p-inhibitor, miR-NC, miR-330-3p-mimic, miR-330-3p-mimic+vector 和 miR-330-3p-mimic+RNF126 组。所使用的质粒及核酸片段均由广州云舟生物科技有限公司设计并构建、合成。使用 Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂完成质粒的转染, 详细的操作步骤按照转染试剂盒内说明书进行。

1.4 qPCR 检测 CRC 组织和细胞中 circ_0091579、miR-330-3p 和 RNF126 mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂盒从 CRC 组织、癌旁组织及多种 CRC 细胞中提取出总 RNA, 采用逆转录试剂盒 II 把总 RNA 逆转录合成 cDNA, 用 qPCR 对 circ_0091579、miR-330-3p 和 RNF126 进行定量检测, 反应条件: 95 °C (10 min); 95 °C (20 s)、60 °C (30 s)、72 °C (60 s), 循环 45 次。详细操作步骤均按照各个试剂盒说明书进行, GAPDH 和 U6 作为标准化参考。收集数据并用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式进行分析。反应体系内使用的引物由北京博尔迈生物技术有限公司设计并合成。序列见表 1。

1.5 RNase R 酶切实验

从 CRC 组织、癌旁组织及各 CRC 细胞中分离出总 RNA, 使总 RNA 和 RNase R 酶在 37 °C 环境下反应 15 min, 采用 qPCR 实验检测组织和细胞中 circ_0091579 的含量。

1.6 细胞核质分离后检测细胞核与细胞质中 circ_0091579 的表达

选取对数生长期的 LoVo 细胞, 分离出单个细胞。使用 NE-PERTM 细胞核和细胞质提取试剂从细胞中分离出细胞质和细胞核, qPCR 试剂盒分别检测细胞核与细胞质中 circ_0091579 的表达。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

| Target | Sequence (5'-3') |
|--------------|--|
| circ_0091579 | F: TGAGCCAGTGGT CAGTCAAA R: GTGGAGTCAGGCTTGG GTAG |
| miR-330-3p | F: GCAGAGATTCCGTTGTCGT R: GCGAGCACAGAATTAATACGAC |
| RNF126 | F: AAAAGAATTCGCCGAGGCGTCGCCGCATCC R: AAAACTCGAGTCACGAGTTGCTTGTTGCGCTTCTCG |
| GAPDH | F: CTTTGGTATCGTGAAGGACTC R: GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT |
| U6 | F: CTTCGGCAGCACATATACTA R: AACTGGTGTCTGGAGTC |

1.7 双荧光素酶报告实验检测 circ_0091579、miR-330-3p 与 RNF126 之间的靶向关系

在 Circular RNA Interactome 网站 (<https://circinteractome.nia.nih.gov>) 中进行预测分析, 结果显示 circ_0091579 和 miR-330-3p 之间存在结合位点, 将预测的 circ_0091579 序列片段和突变片段分别克隆到 pMIR-REPORT 载体中, 构建 circ_0091579-WT、circ_0091579-MUT 两种报告质粒。将报告质粒和 miR-330-3p mimic 或 miR-NC 共转染 293T 细胞, 用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。TargetScan 网站 (http://targetscan.org/vert_72/) 预测到 miR-330-3p 与 RNF126 的结合序列, 构建 RNF126-WT、RNF126-MUT 两种报告质粒用于检测 miR-330-3p 与 RNF126 的靶向关系, 其余步骤同上。

1.8 RNA 免疫共沉淀实验 (RIP) 检测 circ_0091579 和 miR-330-3p、miR-330-3p 和 RNF126 的结合

采用 RIP 试剂盒进行实验, 收集对数生长的 LoVo 细胞, PBS 清洗, 加入裂解液吹打均匀, 于 4 °C 下孵育 1 h。备好磁珠, 将磁珠与待测抗体混合物反应 6 h, 最后将产物进行纯化。详细步骤按照试剂盒说明书进行。用 qPCR 检测目标 RNA 的相对表达水平, 抗体分别为 Ago2 抗体 (1 : 1 000) 和 IgG 抗体 (1 : 5 000)。

1.9 MTT 法检测细胞的增殖

各组细胞接种到 96 孔板中, 每孔中加 2×10^3 个细胞、体积为 100 μ l, 在 DMEM 中培养 (含有 10% 胎牛血清), 24 h 后弃上清液, 向孔中加入 MTT 溶液, 摇匀后在 5%CO₂、37 °C 培养箱中培养 4 h。每孔加入 100 μ l 溶解试剂, 振荡器震荡 10 min 至甲臞完全溶解。用酶标分析仪检测 570 nm 处每孔光密度 (D) 值, 以 D 值代表细胞增殖水平。

1.10 Transwell 实验检测细胞的侵袭能力

将各组 LoVo 细胞用胰蛋白酶消化, PBS 洗涤, 弃掉上清液, 细胞重悬制备成细胞悬液, 接种到

Transwell 小室中, 上腔预铺 Matrigel 后加入细胞悬液, 下腔加含有 20% 胎牛血清的培养基, 置于培养箱中 24 h。使用 0.5% 结晶紫对上腔细胞进行染色, 用棉签擦拭上腔内侧的细胞, 15 min 后在显微镜下观察细胞入侵数量。

1.11 流式细胞术检测细胞凋亡

各组 LoVo 细胞转染 48 h 后, 收集并用 PBS 洗涤, 用 Annexin V-FITC/PI 荧光双染细胞凋亡检测试剂盒对细胞进行染色, 该过程在暗室中进行。用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。具体步骤均按照试剂盒说明书进行。

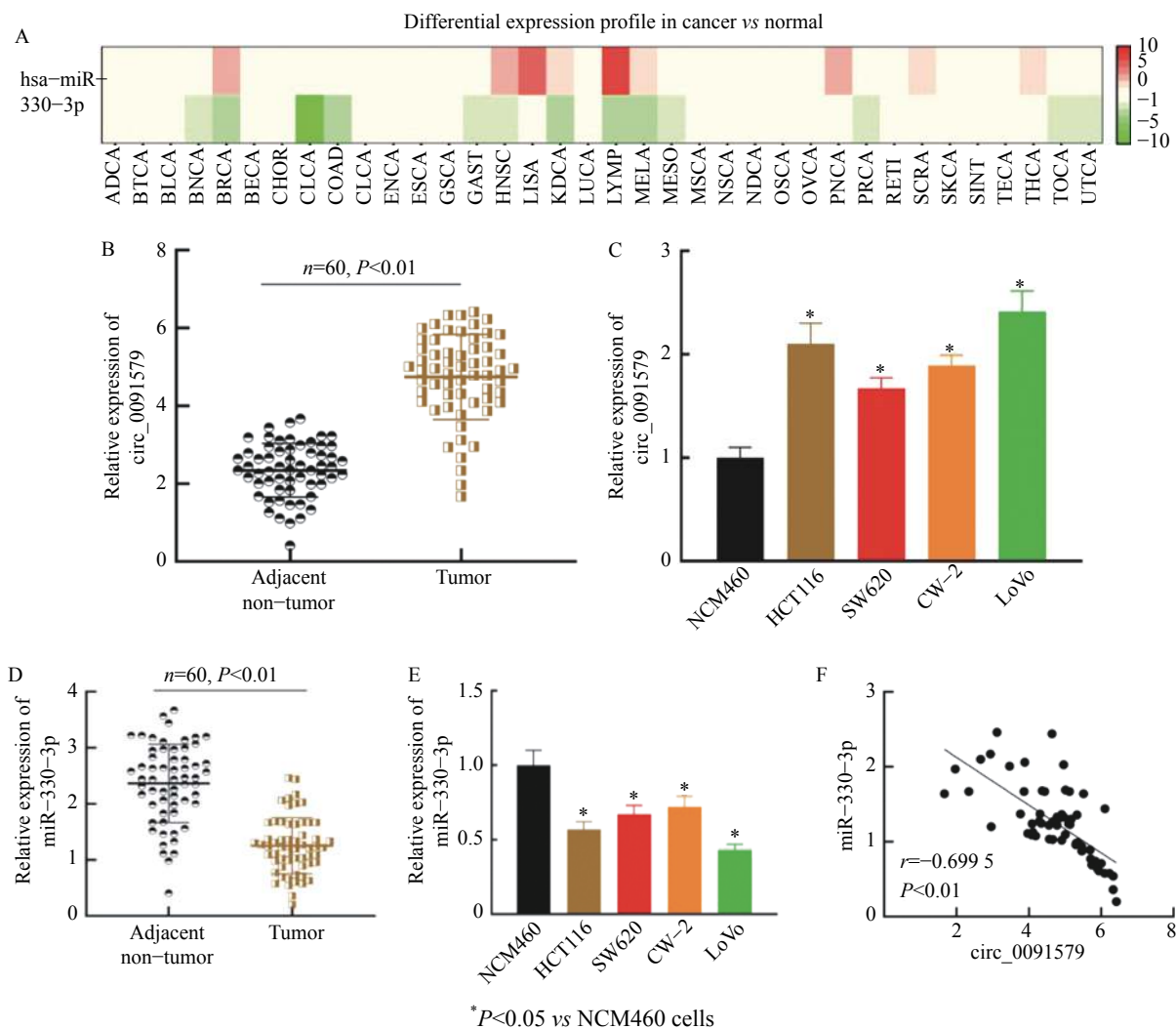
1.12 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件分析, 所有实验独立重复 3 次, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 相关性分析采用 Pearson 相关性检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CRC 组织和细胞中 circ_0091579 与 miR-330-3p 的表达水平

DbDEMC 网站 (<https://www.picb.ac.cn/dbDEMC/index.html>) 预测结果 (图 1A) 显示, miR-330-3p 在结肠腺癌 (colorectal adenocarcinoma, COAD) 组织中呈低表达。qPCR 检测结果显示, 相较于正常组织和细胞, circ_0091579 在 CRC 组织和细胞中均呈高表达 (均 $P < 0.05$, 图 1B、C), 而 miR-330-3p 则呈低表达 (均 $P < 0.05$, 图 1D、E), 选择表达水平差异最显著的 LoVo 细胞进行后续实验。相关性分析显示, circ_0091579 和 miR-330-3p 表达呈负相关 ($r = -0.6995$, $P < 0.01$, 图 1F)。分析 circ_0091579 表达与患者临床病理参数之间的关系发现, circ_0091579 高表达和 CRC 患者的 TNM 分期、肿瘤大小以及分化程度有关 (表 2)。



A: The expression level of miR-330-3p in different cancer tissues predicted by the dbDEMC website; B, C: circ_0091579 expression was increased in CRC tissues and cells; D, E: miR-330-3p expression was decreased in CRC tissues and cells; F: There is a negative correlation between the expression levels of circ_0091579 and miR-330-3p

图 1 circ_0091579、miR-330-3p 在 CRC 组织和细胞中的相对表达量

Fig.1 Relative expressions of circ_0091579 and miR-330-3p in CRC tissues and cells

2.2 鉴定证实 circ_0091579 在 LoVo 细胞质中可能是具有 ceRNA 潜能的环状结构

RNase R 酶切实验结果 (图 2A) 显示, circ_0091579 对 RNase R 酶具有抗性 ($P < 0.05$), 证明 circ_0091579 具有环状结构, 比线性 RNA 更加稳定。通过核质分离实验检测到 circ_0091579 在 LoVo 细胞质中高表达 ($P < 0.05$) (图 2B), 因此 circ_0091579 可能发挥 ceRNA 的功能。

2.3 miR-330-3p 与 circ_0091579 存在靶向结合关系

生物学信息数据库分析发现 circ_0091579 和 miR-330-3p 存在结合位点 (图 3A), 通过 RNA 和双荧光素酶报告实验进一步验证, 结果 (图 3B、C) 显示, 与对照组相比, circ_0091579-WT 和 miR-330-3p mimic 共转染的细胞双荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$), 相比 IgG 抗体, Ago2 抗体中 RNA 富集得更多 ($P < 0.05$)。以上结果充分说明 circ_0091579

和 miR-330-3p 具有靶向结合关系。

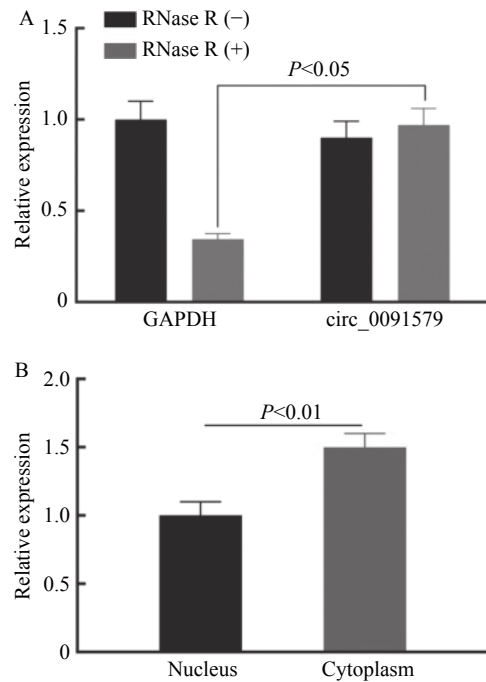
2.4 敲降 circ_0091579 通过 miR-330-3p 抑制 LoVo 细胞的增殖和侵袭并促进其凋亡

MTT 检测结果 (图 4A) 显示, 48 h 起, si-circ_0091579 组的 LoVo 细胞增殖水平显著低于 si-NC 组 ($P < 0.05$); Transwell 实验和流式细胞术检测结果 (图 4B、C) 显示, 与 si-NC 组相比, si-circ_0091579 组侵袭细胞数显著下降 [(62±5) vs (103±9) 个, $P < 0.05$], 凋亡率显著升高 [(10.7±1.0) % vs (5.2±0.5) %], $P < 0.05$ 。与 si-circ_0091579+anti-miR-NC 组相比, si-circ_0091579+miR-330-3p-inhibitor 组的细胞增殖 ($P < 0.05$) 和侵袭 [(110±10) vs (70±6) 个, $P < 0.05$] 能力增强, 而凋亡率降低 [(6.1±0.6) % vs (9.2±0.9) %], $P < 0.05$], 说明敲除 circ_0091579 可以抑制 LoVo 细胞的增殖和侵袭、促进其凋亡, 但共转染 miR-330-3p-inhibitor 后该影响被抵消。

表 2 circ_0091579 表达与 CRC 患者临床病理参数相关性分析

Tab.2 Correlation between circ_0091579 expression and clinicopathological parameters of patients with CRC

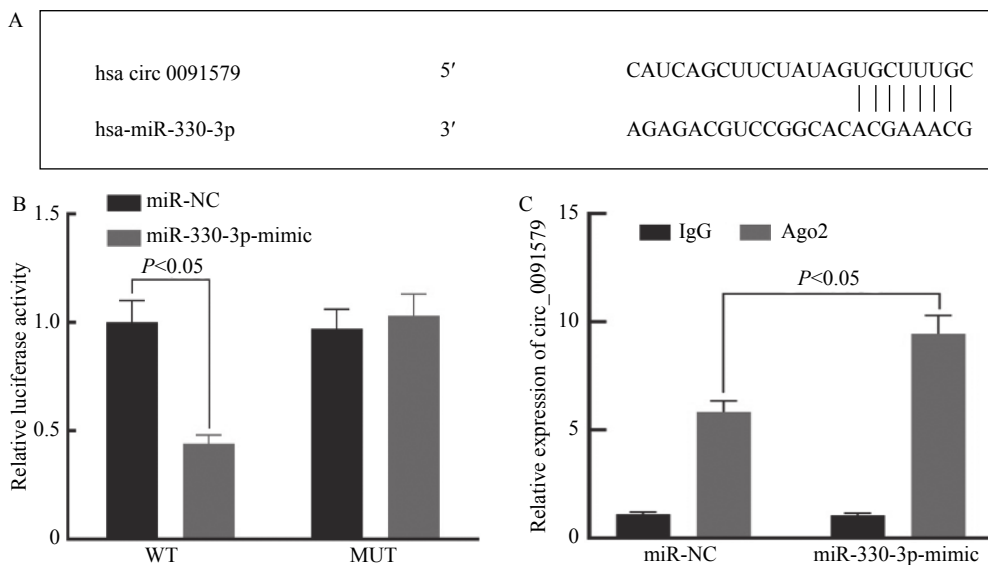
| Parameter | N | circ_0091579 expression (n) | | P |
|-----------------------|----|-----------------------------|------|---------|
| | | Low | High | |
| Total case | 60 | 26 | 34 | |
| Age (t/a) | | | | |
| <65 | 28 | 9 | 19 | 0.123 2 |
| ≥65 | 32 | 17 | 15 | |
| Gender | | | | |
| Male | 20 | 7 | 13 | 0.416 2 |
| Female | 40 | 19 | 21 | |
| TNM | | | | |
| 0- II | 22 | 17 | 5 | 0.000 1 |
| III -IV | 38 | 9 | 29 | |
| Tumor size (d/cm) | | | | |
| <5 | 24 | 18 | 9 | 0.001 5 |
| ≥5 | 36 | 8 | 25 | |
| Lymph node metastasis | | | | |
| Yes | 49 | 22 | 27 | 0.741 9 |
| No | 11 | 4 | 7 | |
| Differentiation grade | | | | |
| Medium/Low | 42 | 14 | 28 | 0.023 8 |
| High | 18 | 12 | 6 | |



A: circ_0091579 can not be digested by RNase R; B: Results of nucleus-cytoplasm separation

图 2 qPCR 检测 circ_0091579

Fig.2 Characteristics of circ_0091579 detected by qPCR



A: There were binding sites between circ_0091579 and miR-330-3p predicted by online website; B: The targeting relationship between circ_0091579 and miR-330-3p was confirmed by Dual luciferase reporter assay; C: The targeting relationship

between circ_0091579 and miR-330-3p was confirmed by RIP assay

图 3 circ_0091579 和 miR-330-3p 靶向关系验证结果

Fig.3 Verification of the targeting relationship between circ_0091579 and miR-330-3p

2.5 RNF126 在 CRC 组织和细胞中高表达且是 miR-330-3p 的靶基因

UALCAN 网站 (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 预测结果 (图 5A) 显示, 相对于正常组织, RNF126 在 COAD 组织中表达增强。qPCR 检测结果 (图 5B、C) 显示, 相对于正常组织和细胞, CRC 组织和细胞中 RNF126 表达更高 (均 $P < 0.05$)。

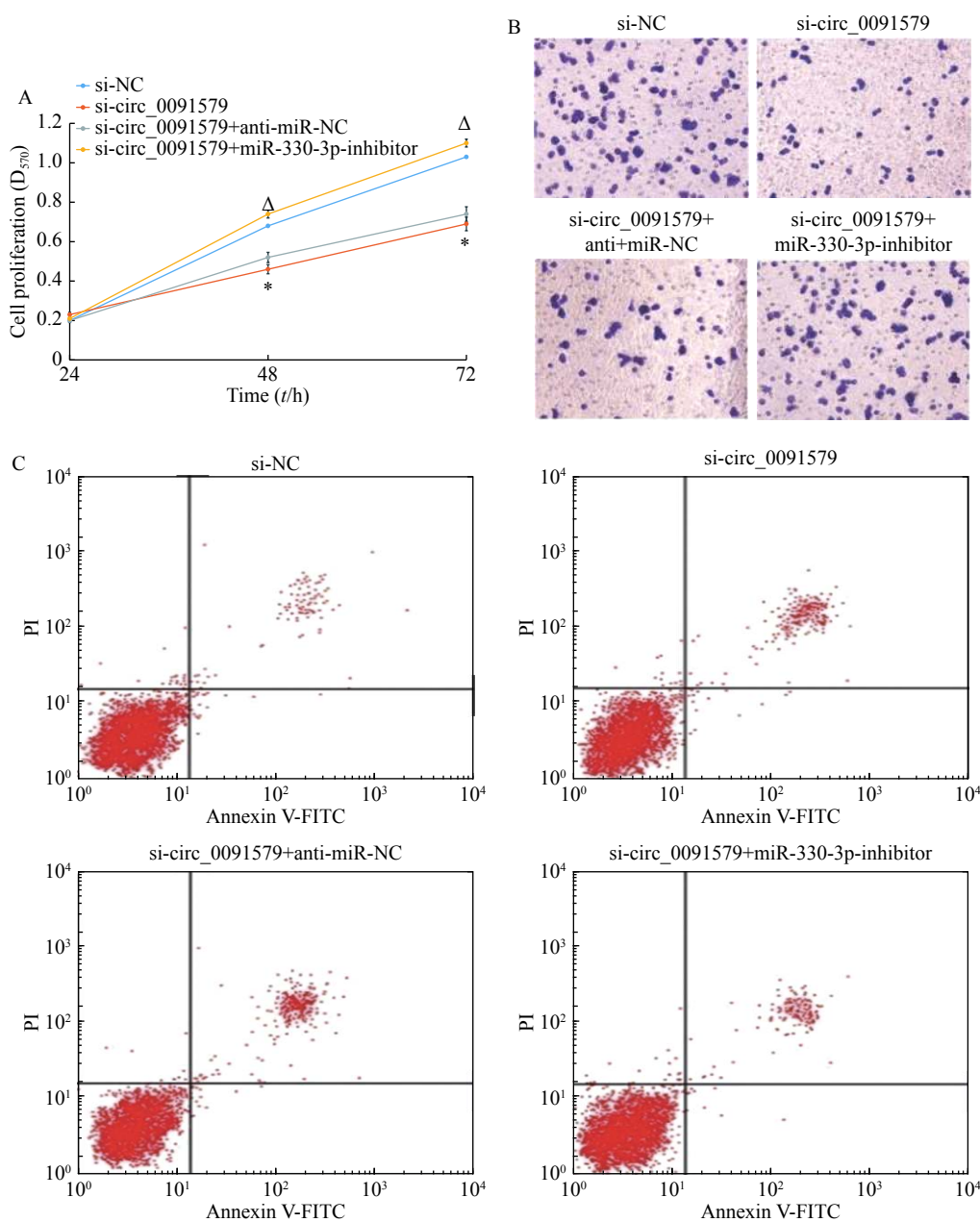
RNF126 和 miR-330-3p 的表达之间呈负相关 ($r = -0.7167$, $P < 0.01$, 图 5D)。靶向关系预测网站 Target Scan (http://targetscan.org/vert_72/) 预测结果 (图 5E) 显示, RNF126 和 miR-330-3p 存在结合位点, 双荧光素酶报告实验结果 (图 5F) 结果显示, 转染 RNF126-WT 报告质粒后, 过表达 miR-330-3p 组细胞中相对荧光强度较对照组更高 ($P < 0.05$), 而转染

RNF126-MUT 报告质粒后两组的相对荧光强度无显著差异; RIP 实验结果 (图 5G) 显示, 过表达 miR-330-3p 组中 RNF126 水平显著高于对照组 ($P<0.05$)。以上结果进一步证实了 miR-330-3p 与 RNF126 之间的靶向关系。

2.6 miR-330-3p 过表达通过靶向 RNF126 抑制 LoVo 细胞的增殖和侵袭并促进其凋亡

MTT、Transwell 和流式细胞术结果 (图 6) 显示, 与 miR-NC 组相比, miR-330-3p-mimic 组 LoVo

细胞增殖 ($P<0.05$) 和侵袭 [(48 ± 4) vs (112 ± 10) 个, $P<0.05$] 能力减弱、凋亡能力增强 [$(13.2\pm1.1)\%$ vs $(6.7\pm0.6)\%$, $P<0.05$]; 与 miR-330-3p-mimic+vector 组相比, miR-330-3p-mimic+RNF126 组 LoVo 细胞增殖 ($P<0.05$) 和侵袭 [(105 ± 9) vs (52 ± 4) 个, $P<0.05$] 能力变强、凋亡程度减弱 [$(7.2\pm0.7)\%$ vs $(12.4\pm1.1)\%$, $P<0.05$]。以上数据结果说明, miR-330-3p 过表达能抑制 LoVo 细胞增殖和侵袭并促进其凋亡, 但是加入 RNF126 后该效果被逆转。

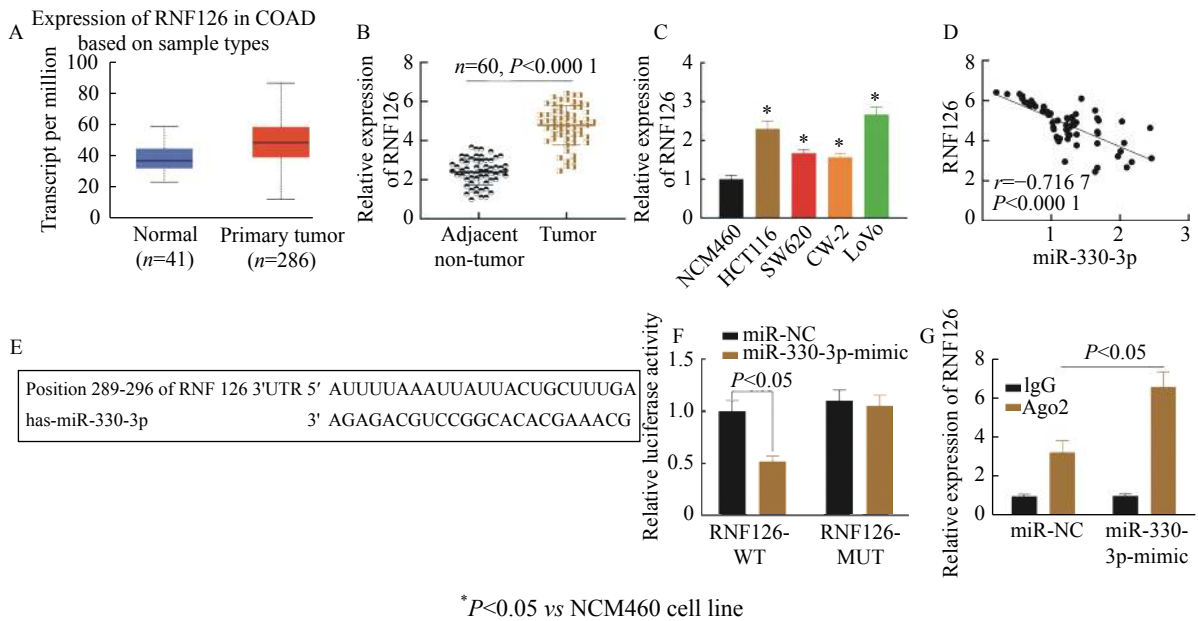


* $P<0.05$ vs si-NC group, $\Delta P<0.05$ vs si-circ_0091579+anti-miR-NC group

- A: Knockdown of circ_0091579 inhibited the proliferation of LoVo cells detected by MTT assay;
- B: Knockdown of circ_0091579 inhibited LoVo cell invasion detected by Transwell assay ($\times 100$);
- C: Knockdown of circ_0091579 promoted the apoptosis of LoVo cells detected by Flow cytometry

图 4 circ_0091579 和 miR-330-3p 的表达对 LoVo 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

Fig.4 Effects of circ_0091579 and miR-330-3p expression on the proliferation, invasion and apoptosis of LoVo cells



* $P < 0.05$ vs NCM460 cell line
 A: RNF126 expression was up-regulated in cancer tissues predicted by UALCAN website; B, C: RNF126 expression was increased in CRC tissues and cells; D: Correlation between RNF126 and miR-330-3p; E: There were binding sites between RNF126 and miR-330-3p; F, G: The targeting relationship between RNF126 and miR-330-3p was confirmed by Dual luciferase reporter assay and RIP assay

图 5 RNF126 和 miR-330-3p 的靶向关系验证结果

Fig.5 Verification of the targeting relationship between RNF126 and miR-330-3p

3 讨论

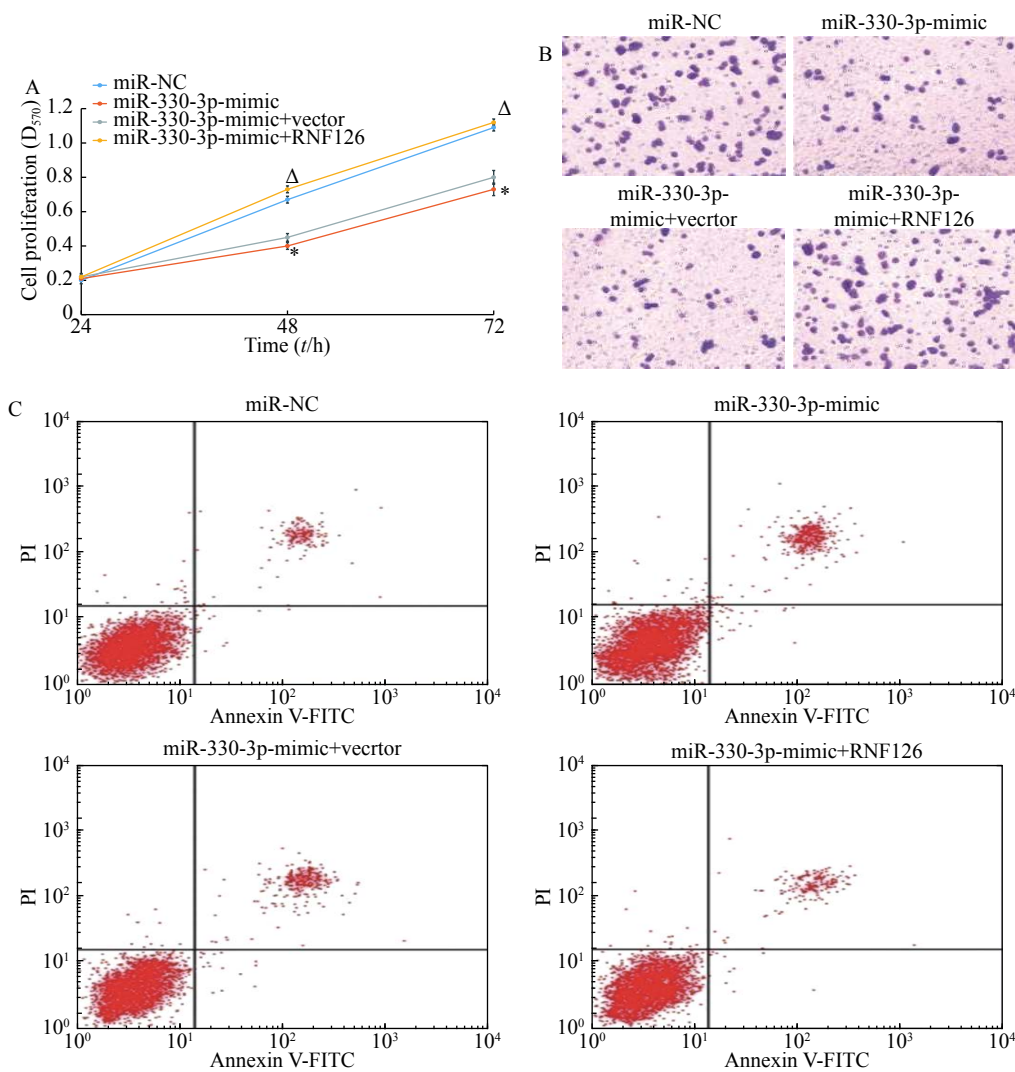
癌细胞的增殖、侵袭和迁移等均是癌症进展中的常见现象^[14-15]。如研究^[16-17]发现, circMBOAT2 过表达可以促进前列腺癌细胞的增殖、侵袭和转移, 促进肿瘤的发生和发展; circ_0032627 通过调节 miR-502-5p 的表达促进胃癌细胞的增殖。在 CRC 中也发现了很多异常表达的 circRNA^[18-20]。本研究发现, 敲低 circ_0091579 的表达可以抑制 CRC 细胞的增殖、迁移、侵袭, 促进其凋亡。另外, 本课题组在生物信息学网站上发现 circ_0091579 和 miR-330-3p 存在结合位点, 并用双荧光素酶实验证实了两者的靶向关系。同时, 通过实验发现, 在 CRC 组织和细胞中, circ_0091579 呈高表达而 miR-330-3p 呈低表达。

研究^[21]发现, miR-330-3p 过表达促进了非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化, 促进了肿瘤的发生。在胰腺癌中也有研究^[22]发现 miR-330-3p 作为肿瘤基因发挥作用, 沉默 miR-330-3p 可以抑制肿瘤的发展。但是在肝癌中却有研究^[23]发现 miR-330-3p 是下调的, 过表达 miR-330-3p 可以抑制肝癌细胞的迁移。MANSOORI

等^[24]发现 miR-330 通过下调 HMGA2 诱导 CRC 细胞凋亡。

泛素分子是指一类低分子量的蛋白质, 可以在特殊酶的作用下将蛋白质进行分类, 该过程称为泛素化^[25]。泛素化在对蛋白质进行修饰的过程中, 间接参与了细胞周期、增殖、分化、基因表达等过程中, 与癌症有密切的关系^[26-27]。RNF126 是泛素化连接酶中的一种, 在多种癌症研究中都曾有报道, 如发现 RNF126 可以促进舌癌的进展^[28]; 在乳腺癌中 RNF126 表达升高且可以作为浸润性乳腺癌预后不良的生物标志物^[29]。而在 CRC 中却未曾有过报道, 本研究发现, RNF126 与 miR-330-3p 存在靶向关系, 并且 RNF126 在 CRC 中呈现出高表达。功能实验结果显示, 过表达 miR-330-3p 可以抑制 CRC 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并促进其凋亡, 但是该影响在加入 RNF126 以后被反转, 所以 RNF126 和 miR-330-3p 在 CRC 中具有相反的作用。

综上, 本研究证实 circ_0091579 可以通过 miR-330-3p/RNF126 轴影响 CRC LoVo 细胞的增殖、侵袭和凋亡(图 7), 对于 circ_0091579 和 RNF126 在 CRC 中作用的发现, 可能为 CRC 的治疗提供新的靶点。



* $P < 0.05$ vs miR-NC group, $\Delta P < 0.05$ vs miR-330-3p-mimic+vector group

A: Results of MTT experiment in each group of cells; B: Transwell assay results in each group ($\times 100$); C: Results of Flow cytometry

图 6 miR-330-3p 和 RNF126 的表达对 LoVo 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

Fig.6 Effects of miR-330-3p and RNF126 expression on the proliferation, invasion and apoptosis of LoVo cells

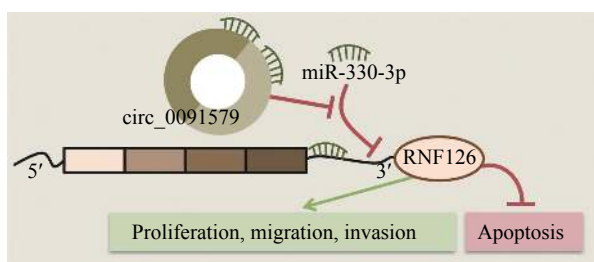


图 7 circ_0091579/miR-330-3p/RNF126 轴参与 CRC 进展并影响 CRC 细胞生物学行为的示意图

Fig.7 Schematic diagram of circ_0091579/miR-330-3p/RNF126 axis participate in the progression of CRC and affect the biological characteristics of CRC cells

【参考文献】

[1] WU G H, XUE M, ZHAO Y J, et al. Long noncoding RNA ZEB1-AS1 acts as a sponge of miR-141-3p to inhibit cell proliferation in

colorectal cancer[J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(11): 1589-1597. DOI: 10.7150/ijms.46698.

[2] DU F, CAO T, XIE H H, et al. KRAS mutation-responsive miR-139-5p inhibits colorectal cancer progression and is repressed by Wnt Signaling[J/OL]. *Theranostics*, 2020, 10(16): 7335-7350[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7330859/>. DOI: 10.7150/thno.45971.

[3] WANG J P, LIU S D, WANG H, et al. Robust performance of a novel stool DNA test of methylated SDC2 for colorectal cancer detection: a multicenter clinical study[J/OL]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 162[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7602331/>. DOI: 10.1186/s13148-020-00954-x.

[4] LIU R, SHEN L, LIN C, et al. MiR-1587 regulates DNA damage repair and the radiosensitivity of CRC cells via targeting LIG4[J]. *Dose Response*, 2020, 18(2): 1559325820936906. DOI: 10.1177/1559325820936906.

[5] CHEN X Q, JIANG J, ZHAO Y X, et al. Circular RNA circNTRK2 facilitates the progression of esophageal squamous cell carcinoma through up-regulating NR1P1 expression via miR-140-

- 3p[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 133[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7353745/>. DOI: 10.1186/s13046-020-01640-9.
- [6] XU Q, DENG B, LI M L, et al. circRNA-UBAP2 promotes the proliferation and inhibits apoptosis of ovarian cancer through miR-382-5p/PRPF8 axis[J/OL]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 81[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7372761/>. DOI: 10.1186/s13048-020-00685-w.
- [7] XU W G, ZHOU B, WU J, et al. Circular RNA hsa-circ-0007766 modulates the progression of Gastric Carcinoma via miR-1233-3p/GDF15 axis[J/OL]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(11): 1569-1583[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7359391/>. DOI: 10.7150/ijms.46261.
- [8] ZHANG L, DONG X Q, YAN B, et al. CircAGFG1 drives metastasis and stemness in colorectal cancer by modulating YY1/CTNBN1[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(7): 542[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7367849/>. DOI: 10.1038/s41419-020-2707-6.
- [9] DU H, HE Z, FENG F, et al. Hsa_circ_0038646 promotes cell proliferation and migration in colorectal cancer via miR-331-3p/GRIK3[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(1): 266-274. DOI: 10.3892/ol.2020.11547.
- [10] NIU W Y, CHEN L, ZHANG P, et al. Circ_0091579 promotes proliferative ability and metastasis of liver cancer cells by regulating microRNA-490-3p[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(23): 10264-10273. DOI: 10.26355/eurrev_201912_19664.
- [11] HUANG Y G, SUN H, MA X, et al. HLA-F-AS1/miR-330-3p/PFN1 axis promotes colorectal cancer progression[J]. *Life Sci*, 2020, 254: 117180. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117180.
- [12] WANG Z H, QU H J, GONG W J, et al. Up-regulation and tumor-promoting role of SPHK1 were attenuated by miR-330-3p in gastric cancer[J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(11): 1164-1176. DOI: 10.1002/iub.1934.
- [13] MIGITA K, MATSUMOTO S, WAKATSUKI K, et al. RNF126 as a marker of prognosis and proliferation of gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(3): 1367-1374. DOI: 10.21873/anticancer.14078.
- [14] SHAHZAD N, MUNIR T, JAVED M, et al. SHISA3, an antagonist of the Wnt/ β -catenin signaling, is epigenetically silenced and its ectopic expression suppresses growth in breast cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e0236192[2020-12-12]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0236192>. DOI: 10.1371/journal.pone.0236192.
- [15] PAN Q H, FAN Y H, WANG Y Z, et al. Long noncoding RNA NNT-AS1 functions as an oncogene in breast cancer via repressing ZFP36 expression[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(3): 795-805. DOI: 10.23812/20-100-a-13.
- [16] SHI J, LIU C, CHEN C, et al. Circular RNA circMBOAT2 promotes prostate cancer progression via a miR-1271-5p/mTOR axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(13): 13255-13280. DOI: 10.18632/aging.103432.
- [17] YIN H F, WANG Q, HUANG X T, et al. Circ_0032627 accelerates proliferation of gastric cancer cells through regulating miR-502-5p expression[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(12): 6674-6681. DOI: 10.26355/eurrev_202006_21654.
- [18] LIU Y H, LI H, YE X Y, et al. Hsa_circ_0000231 knockdown inhibits the glycolysis and progression of colorectal cancer cells by regulating miR-502-5p/MYO6 axis[J/OL]. *World J Surg Oncol*, 2020, 18(1): 255[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7526375/>. DOI: 10.1186/s12957-020-02033-0.
- [19] WANG X M, TAO G, HUANG D H, et al. Circular RNA NOX4 promotes the development of colorectal cancer via the microRNA-485-5p/CKS1B axis[J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(5): 2009-2020. DOI: 10.3892/or.2020.7758.
- [20] LI S, WENG J, SONG F, et al. Circular RNA circZNF566 promotes hepatocellular carcinoma progression by sponging miR-4738-3p and regulating TDO2 expression[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 452. DOI: 10.1038/s41419-020-2616-8.
- [21] WEI C H, ZHANG R G, CAI Q, et al. MicroRNA-330-3p promotes brain metastasis and epithelial-mesenchymal transition via GRIA3 in non-small cell lung cancer[J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(17): 6734-6761[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6756898/>. DOI: 10.18632/aging.102201.
- [22] XIONG X, SHI Q, YANG X, et al. LINC00052 functions as a tumor suppressor through negatively modulating miR-330-3p in pancreatic cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 15619-15626. DOI: 10.1002/jcp.28209.
- [23] JIN Z, JIA B, TAN L, et al. miR-330-3p suppresses liver cancer cell migration by targeting MAP2K1[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(1): 314-320. DOI: 10.3892/ol.2019.10280.
- [24] MANSOORI B, MOHAMMADI A, NAGHIZADEH S, et al. miR-330 suppresses EMT and induces apoptosis by downregulating HMGA2 in human colorectal cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 920-931. DOI: 10.1002/jcp.29007.
- [25] YOKOO H, OHOKA N, NAITO M, et al. Design and synthesis of peptide-based chimeric molecules to induce degradation of the estrogen and androgen receptors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(15): 115595. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115595.
- [26] ALIX E, GODLEE C, CERNY O, et al. The tumour suppressor TMEM127 is a Nedd4-family E3 ligase adaptor required by Salmonella SteD to ubiquitinate and degrade MHC class II molecules[J/OL]. *Cell Host Microbe*, 2020, 28(1): 54-68. e7[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7342019/>. DOI: 10.1016/j.chom.2020.04.024.
- [27] KHAN S, HE Y, ZHANG X, et al. PROteolysis TARgeting Chimeras (PROTACs) as emerging anticancer therapeutics[J]. *Oncogene*, 2020, 39(26): 4909-4924. DOI: 10.1038/s41388-020-1336-y.
- [28] WANG L N, WANG X, ZHAO Y H, et al. E3 Ubiquitin ligase RNF126 regulates the progression of tongue cancer[J/OL]. *Cancer Med*, 2016, 5(8): 2043-2047[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4971932/>. DOI: 10.1002/cam4.771.
- [29] YANG X S, PAN Y, QIU Z J, et al. RNF126 as a biomarker of a poor prognosis in invasive breast cancer and CHEK1 inhibitor efficacy in breast cancer cells[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(7): 1629-1643[2020-12-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5884735/>. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2242.

[收稿日期] 2020-11-11

[修回日期] 2021-03-26

[本文编辑] 黄静怡