

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.10.007

· 临床研究 ·

Hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织及血清中的异常高表达及其临床意义

王万平¹, 任明君¹, 闭婉英¹, 龙涌文¹, 王伟吉^{2a}, 蒙毅军^{2b,2c,2d}, 唐石伏^{2b,2c,2d}, 蒙秋杏^{2b,2c,2d}, 邓耀明^{2b,2c,2d}(1. 广西中医药大学 研究生院, 广西 南宁 530000; 2. 柳州市人民医院 a. 胃肠外科; b. 检验科; c. 柳州市病毒性疾病精准医学重点实验室; d. 广西壮族自治区卫生健康委员会广西临床疾病生物技术研究重点实验室, 广西 柳州 545006)

[摘要] **目的:** 探究 hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织和患者血清中的表达水平及其与结直肠癌患者临床病理特征的关系, 评价其能否作为结直肠癌潜在的分子诊断标志物及治疗靶标。 **方法:** 收集 2018 年 6 月至 2022 年 1 月于柳州市人民医院胃肠外科接受结直肠癌切除手术患者的 58 对癌及癌旁组织标本, 收集 2020 年 1 月至 2022 年 12 月于柳州市人民医院初次确诊的结直肠癌患者、结直肠息肉患者及健康体检血清共 152 例; 从结直肠癌差异表达 circRNA 谱中挑选特异性高表达的 hsa_circ_0078607 作为候选标志物, 采用 qPCR 法检测其在结直肠癌细胞、组织、患者血清及结直肠息肉患者血清中的相对表达量, 分析其与临床病理特征的关系。采用 ROC 曲线评估 hsa_circ_0078607 对结直肠癌及结直肠息肉的诊断价值。通过 Circular RNA Interactome 数据库预测与 hsa_circ_0078607 结合的 miRNA, 并用 Cytoscape 3.9.1 软件构建 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络, 同时通过 GO/KEGG 富集分析进一步了解其功能。 **结果:** 与癌旁组织或健康人血清相比, hsa_circ_0078607 在结直肠癌细胞、组织和血清及息肉患者血清中呈高表达 ($P < 0.001$), 其中有 52 例 (89.7%) 患者癌组织中表达上调, 6 例 (10.3%) 表达下调。结直肠癌组织中 hsa_circ_0078607 的相对表达量与肿瘤位置 ($P = 0.029$)、分化程度 ($P = 0.046$) 和远处转移 ($P = 0.043$) 有关联。ROC 结果显示, 在结直肠癌组织和血清中其诊断结直肠癌的 AUC 分别为 0.845 7 [95%CI (0.772 8, 0.918 6)], $P < 0.000 1$ 和 0.868 3 [95%CI (0.790 7, 0.945 9)], $P < 0.000 1$; 在息肉患者血清中, hsa_circ_0078607 诊断结直肠息肉的 AUC 为 0.710 1 [95%CI (0.610 0, 0.810 1)]。GO/KEGG 富集分析结果表明, hsa_circ_0078607 下游的 miRNA 可能参与 RNA 聚合酶 II 启动子转录调控、蛋白 K48-连锁泛素化、Wnt、Hippo 及 MAPK 信号通路调控等多个生物过程。 **结论:** Hsa_circ_0078607 在结直肠癌细胞、组织和血清中呈高表达, 其在结直肠癌组织中的表达水平与肿瘤位置、分化程度和远处转移有关联, 提示其可作为结直肠癌潜在的分子诊断标志物; 其还可能介导结直肠癌的发生发展过程, 对发现结直肠癌潜在的治疗靶点有重要意义。

[关键词] 结直肠癌; circRNA; hsa_circ_0078607; 诊断; 分子标志物

[中图分类号] R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)10-0893-09

The aberrant overexpression of hsa_circ_0078607 in colorectal cancer tissues and serum and its clinical significance

WANG Wanping¹, REN Mingjun¹, BI Wanying¹, LONG Yongwen¹, WANG Weiji^{2a}, MENG Yijun^{2b,2c,2d}, TANG Shifu^{2b,2c,2d}, MENG Qiuxing^{2b,2c,2d}, DENG Yaoming^{2b,2c,2d}(1. Graduate School of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi, China; 2. a. Department of Gastrointestinal Surgery; b. Department of Laboratory; c. Liuzhou Key Laboratory of Precision Medicine for Viral Diseases; d. Guangxi Health Commission Key Laboratory of Clinical Biotechnology, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545006, Guangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression level of hsa_circ_0078607 in colorectal cancer tissues and patients' serum, and its correlation with clinicopathological characteristics of colorectal cancer patients, and to evaluate whether it can be used as a potential molecular diagnostic marker and therapeutic target for colorectal cancer. **Methods:** 58 pairs of colorectal cancer tissue and paracancerous tissue specimens were collected from patients undergoing colorectal cancer resection surgery in the Department of Gastrointestinal Surgery of Liuzhou People's Hospital between June 2018 and January 2022. The serum of 152 colorectal cancer patients and colorectal polyp patients first diagnosed in Liuzhou People's Hospital between January 2020 and December 2022 and physical examination personnel was collected. The specifically highly expressed hsa_circ_0078607 was selected from the differentially expressed circRNAs profile of colorectal cancer as a candidate marker, qPCR was used to detect its relative expression levels in

[基金项目] 柳州市人民医院高层次人才引进项目 (No. LRYGCC202206); 柳州市科技计划项目 (No. 2020NBAB0827); 广西研究生教育创新项目 (No. YCSZ2020014; YCSZ2022023; YCSW2023373)

[作者简介] 王万平 (1996—), 女, 硕士生, 初级检验师, 主要从事肿瘤标志物相关研究, E-mail: 3203728478@qq.com

[通信作者] 邓耀明, E-mail: 3536127841@qq.com; 唐石伏, E-mail: 385152159@qq.com

colorectal cancer cell lines, tissues and serum and the serum of colorectal polyp patients, and analyze its correlation with clinicopathological characteristics. The diagnostic value of hsa_circ_0078607 for colorectal cancer and colorectal polyp was evaluated by ROC curve. The miRNA binding to hsa_circ_0078607 was predicted by Circular RNA Interactome database, and the circRNA-miRNA-mRNA regulatory network was constructed by Cytoscape 3.9.1 software. At the same time, GO/KEGG enrichment analysis was used to further understand its function. **Results:** Compared with paracancerous tissue or serum from healthy people, hsa_circ_0078607 was highly expressed in colorectal cancer cells, tissues and serum and the serum of colorectal polyp patients ($P < 0.001$). Its expression was up-regulated in the cancer tissues of 52 patients (89.7%), and was down-regulated in 6 patients (10.3%). The relative expression of hsa_circ_0078607 in colorectal cancer tissues was correlated with tumor location ($P = 0.029$), degree of differentiation ($P = 0.046$) and distant metastasis ($P = 0.043$). The ROC results showed that the AUC of hsa_circ_0078607 for the diagnosis of colorectal cancer in tissue and serum was 0.845 7 (95%CI [0.772 8, 0.918 6], $P < 0.000 1$) and 0.8683 (95%CI [0.790 7, 0.945 9], $P < 0.000 1$), respectively; and in the serum of colorectal polyp patients, the AUC of hsa_circ_0078607 for the diagnosis of colorectal polyps was 0.710 1 (95%CI [0.610 0, 0.810 1]). GO/KEGG enrichment analysis results indicated that hsa_circ_0078607 downstream miRNAs may be involved in various biological processes, such as RNA polymerase II promoter transcription regulation, protein K48-linked ubiquitination, Wnt, Hippo, and MAPK signaling pathway regulation. **Conclusion:** Hsa_circ_0078607 is highly expressed in colorectal cancer cells, tissues and serum, and its expression level in colorectal cancer tissues is correlated with tumor location, degree of differentiation and distant metastasis, suggesting that it can be used as a potential molecular diagnostic marker for colorectal cancer. At the same time, it may also mediate the occurrence and development of colorectal cancer, which is of great significance for discovering potential therapeutic targets of colorectal cancer.

[Key words] colorectal cancer; circRNA; hsa_circ_0078607; diagnosis; molecular marker

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(10): 893-901. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.10.007]

结直肠癌是全球第三大常见恶性肿瘤,也是导致癌症相关死亡的第三大因素^[1]。预计2035年全球结直肠癌新增病例数将突破250万^[2]。在中国,结直肠癌仍在升高的发病率和逐渐年轻化的发病人群是目前医疗领域重点关注的问题。然而,由于缺乏灵敏、特异的筛查指标,结直肠癌诊出率低,多数患者就诊时已属中晚期,预后差、生存期短,因而及时发现是预防和改善结直肠癌患者生存质量的关键^[3]。目前,大便隐血实验和肠镜是临床一线筛查结直肠癌的常用手段,前者虽然操作简便,但存在结果不稳定、漏诊率高、灵敏度较差等问题;后者则侵入性强,漏诊率较高,并发症风险较大。因此,为有效降低结直肠癌发病率和病死率,寻找高效、灵敏的结直肠癌肿瘤筛查诊断标志物至关重要。环状RNA(circular RNA, circRNA)是通过mRNA前体反向剪接形成的一类单链闭环非编码RNA分子^[4],已被证明在mRNA海绵、基因剪接和转录调控等方面发挥重要作用^[5-6],因其特有的组织、结构、空间、时间特异性,具有成为许多疾病尤其是肿瘤诊断的分子标志物和治疗靶点的潜能。近年来,已在肿瘤中发现大量有诊断标志物潜能的circRNA,如胃癌中的 hsa_circ_0005230^[7]、非小细胞肺癌中的 hsa_circ_0072309^[8]及结直肠癌中的 hsa_circ_0066351^[9]。Hsa_circ_0078607已被证实可通过Fas抑制卵巢癌细胞的增殖和侵袭,是卵巢癌潜在的肿瘤标志物和治疗靶点^[10],但尚未在结直肠癌中得到证实。本研究旨在探讨 hsa_circ_0078607 在结直肠癌

中差异表达的临床意义、诊断价值及其潜在的生物学功能。

1 资料与方法

1.1 病例选择

收集2018年6月至2022年1月于柳州市人民医院胃肠外科进行结直肠癌切除手术患者的58对癌及癌旁组织(距肿瘤边缘5 cm以上)标本,其中男性患者35例、女性23例,年龄中位数为63岁;收集2020年1月至2022年12月于柳州市人民医院初次确诊的结直肠癌患者、结直肠息肉患者及体检健康人血清共152例。纳入标准为(1)实验组:①病理检查诊断为结直肠癌或息肉;②术前无放、化疗史及手术治疗;③无其他类型肿瘤或转移性肿瘤;④无外伤、怀孕、糖尿病和自身免疫性疾病;⑤临床资料完整。(2)健康对照组:①无癌症病史;②大便隐血试验阴性;③结肠镜检查阴性;④肝肾功能均正常;⑤无外伤、怀孕、糖尿病和自身免疫性疾病。排除标准为(1)出现器官损伤者;(2)哺乳期患者;(3)合并心脑血管器官病变患者。本研究中各研究对象均已签署知情同意书,患者临床信息可向医院信息中心提取(包括但不限于性别、年龄、TNM分期、淋巴转移情况),研究方案经柳州市人民医院伦理委员会批准(审批号:KY2021-008-02)。

1.2 主要试剂与仪器

TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂NovoScript Reverse Transcriptase、实时荧光定量

PCR 试剂 NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus 均购自苏州 Novoprotein Scientific Inc 公司,琼脂糖、5×上样缓冲液、Marker I DNA Ladder 均购自北京索莱宝公司,Goldview 核酸染料、TBE 缓冲液均购自广州艾斯金生物科技有限公司。全波长酶标仪、ABI 7500 均购自美国 Thermo 公司,凝胶成像系统购自美国 Azure 公司。

1.3 qPCR 实验检测 hsa_circ_0078607 的表达水平

从高通量测序的 circRNA 特异性表达谱中筛选出差异表达明显 ($|\text{Fold Change}| > 2, P < 0.05$) 的 hsa_circ_0078607。引物采用 circPrimer 软件设计后,送至北京六合华大基因科技有限公司合成,选用

β -actin 为内参引物,引物序列见表 1。采用 TRIzol 法提取组织和血清总 RNA,对提取的总 RNA 进行浓度检测 (D_{260}/D_{280} 比值 1.8~2.0),通过水平非变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。参照逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA,再根据 qPCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增,每个样本设置 3 个复孔。两步法 qPCR 扩增反应条件及程序 (20 μ L 反应体系): 95 °C 预变性 60 s; 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火延伸 60 s, 40 个循环。根据熔解曲线的峰形分析 qPCR 产物的特异性,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 hsa_circ_0078607 的表达水平。

表 1 qPCR 引物序列

基 因	引物序列	目的基因长度/bp
β -actin	上游引物 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'	140
	下游引物 5'-AAGGGACTTCCTGTAAACAAT-3'	
hsa_circ_0078607	上游引物 5'-AGATCCTGAGACGCATTGCT-3'	177
	下游引物 5'-CGATCCTGCCATACCTGTCT-3'	

1.4 琼脂糖凝胶电泳验证 qPCR 产物长度

称取 1 g 琼脂糖置于锥形瓶中,加入 50 mL 1×TBE 溶液,微波炉加热煮沸 3 次,使琼脂糖完全融化、液体变澄清后,加入 5 μ L 核酸染料 Goldview 并充分混匀。待琼脂糖冷却至 65 °C 左右时,缓慢倒入洗净晾干的制胶板中,插上梳子,避免产生气泡。室温下静置至凝胶完全凝固后垂直取下梳子,将凝胶放入电泳槽中,加入 1×TBE 电泳缓冲液。取 5 μ L qPCR 产物与 1 μ L 上样缓冲液充分混匀后加入点样孔,同时加入 5 μ L DNA marker。115 V 恒压电泳 40 min。电泳完毕,在凝胶成像系统中观察电泳条带及其位置,与 Marker 比较确定产物大小。

1.5 Sanger 测序验证 qPCR 产物序列

将扩增产物送至华大公司进行 Sanger 测序。加热使 DNA 双链变性后与引物结合,将其等量加入含有 DNA 聚合酶和 dNTP 的体系中,再分别加入一种有荧光标记的去 3' 端 OH 的特殊 ddNTP。反应结束后将四个体系进行尿素变性的凝胶电泳,在测序仪上读取序列。所得序列与 circBase 数据库进行比对,证实 qPCR 扩增产物为目的 circRNA hsa_circ_0078607。

1.6 miRNA 预测及 GO/KEGG 富集分析

通过 Circular RNA Interactome 数据库预测与 hsa_circ_0078607 结合的 miRNA,再利用 Targetscan/ENCORI/miRanda 三个数据库预测 miRNA 下游的 mRNA,将三组预测结果在韦恩图中取交集,筛选交集中关联性强的 mRNA,用 Cytoscape 3.9.1 软件构建

circRNA-miRNA-mRNA 调控网络图。同时,利用 DAVID 数据库对 miRNA 的靶基因进行 GO 富集分析,挑选 GO 富集程度前 10 的 term 和 KEGG 结果在微生信网站 (www.bioinformatics.com.cn/login) 绘制富集分析条形图。

1.7 统计学处理

采用 IBM SPSS 21 和 Prism 8.0.2 软件对数据结果进行统计分析与作图。计量资料若为正态分布且方差齐时,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本总体均数的比较采用两独立样本 t 检验,多样本比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA); 非正态分布且方差不齐时,数据以中位数表示,两样本采用 Mann-Whitney U 检验。采用 Mann-Whitney U 检验分析 58 例结直肠癌患者不同临床病理特征 hsa_circ_0078607 表达水平之间的差异是否具有统计学意义。受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 评估 hsa_circ_0078607 对结直肠癌的诊断价值。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

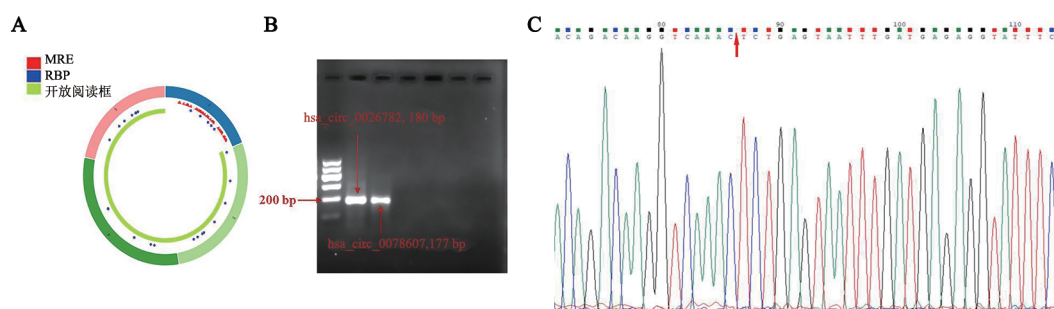
2.1 结直肠癌组织中 hsa_circ_0078607 表达真实存在
课题组已证实结直肠癌组织中存在差异表达的 circRNA 表达谱^[1]。重分析前期实验数据发现, hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织中表达上调,从结直肠癌差异表达 circRNA 谱中筛选出表达差异显著的部分 circRNA (表 2)。

Hsa_circ_0078607由SLC22A3基因的第2到第5外显子反向剪接成环。从CSCD数据库中获取其结构模式图(图1A),可见其环上有多个miRNA反应原件(microRNA response element, MRE)和RNA结合蛋白(RNA binding protein, RBP)。通过qPCR、琼脂糖凝胶电泳及Sanger测序验证了hsa_circ_0078607在结直肠癌组织中表达的准确性与真实性。qPCR实验中熔解曲线呈单峰;扩增产物琼脂糖凝胶电泳

结果为一条带清晰明亮的条带(图1B),长度与目的产物一致;qPCR产物经华大基因Sanger测序所得序列与circBase数据库进行比对,结果显示其扩增序列跨越目的基因反向剪接位点(图1C),与hsa_circ_0078607序列完全一致,与预期设计相符。以上结果证实了hsa_circ_0078607在结直肠癌组织中表达且呈环状结构。

表2 结直肠癌组织-癌旁组织中部分差异表达(上/下调)的circRNA

CircBase_id	基因	Log ₂ Fold Change	P	表达差异
hsa_circ_0078607	SLC22A3	1.992 426 641	0.005 704	上调
hsa_circ_0064735	FBXL2	1.635 630 199	0.021 372	上调
hsa_circ_0006855	TAF6L	1.602 451 641	0.024 027	上调
hsa_circ_0005379	GDI2	1.593 786 571	0.021 539	上调
hsa_circ_0130852	REPS1	1.584 962 501	0.025 538	上调
hsa_circ_0026782	ITGA7	-3.844 199 813	<0.000 001	下调
hsa_circ_0105076	NDE1	-2.788 774 071	0.000 113	下调
hsa_circ_0002398	DYNC1H1	-2.785 263 849	0.000 082	下调
hsa_circ_0001312	CCDC66	-2.766 402 673	0.000 085	下调
hsa_circ_0125513	LRBA	-2.761 800 740	0.000 104	下调



A: hsa_circ_0078607结构模式图; B: 凝胶电泳实验验证qPCR产物长度; C: qPCR产物的测序结果。

图1 结直肠癌组织中 hsa_circ_0078607 序列的验证

2.2 Hsa_circ_0078607在结直肠癌组织、血清及细胞中呈高表达

qPCR实验分析58对结直肠癌组织及其癌旁正常组织中hsa_circ_0078607的表达水平,结果显示,与癌旁组织相比,hsa_circ_0078607在结直肠癌组织中表达水平明显上调,差异具有统计学意义($Z = -6.422, P < 0.001$;图2A);其中,在89.7%(52/58)的病例中hsa_circ_0078607表达上调($-\Delta\Delta Ct > 0$),10.3%(6/58)表达下调($-\Delta\Delta Ct < 0$)(图2D)。检测50例结直肠癌患者、49例息肉患者和53例健康对照者血清中的表达情况发现,与健康对照者血清相比,hsa_circ_0078607在结直肠癌及息肉患者血清中表达水平明显上调,且差异具有统计学意义($Z_{\text{结直肠癌}} = -6.427, Z_{\text{息肉}} = -3.654, \text{均} P < 0.001, \text{图} 2B$)。在细胞中的验证

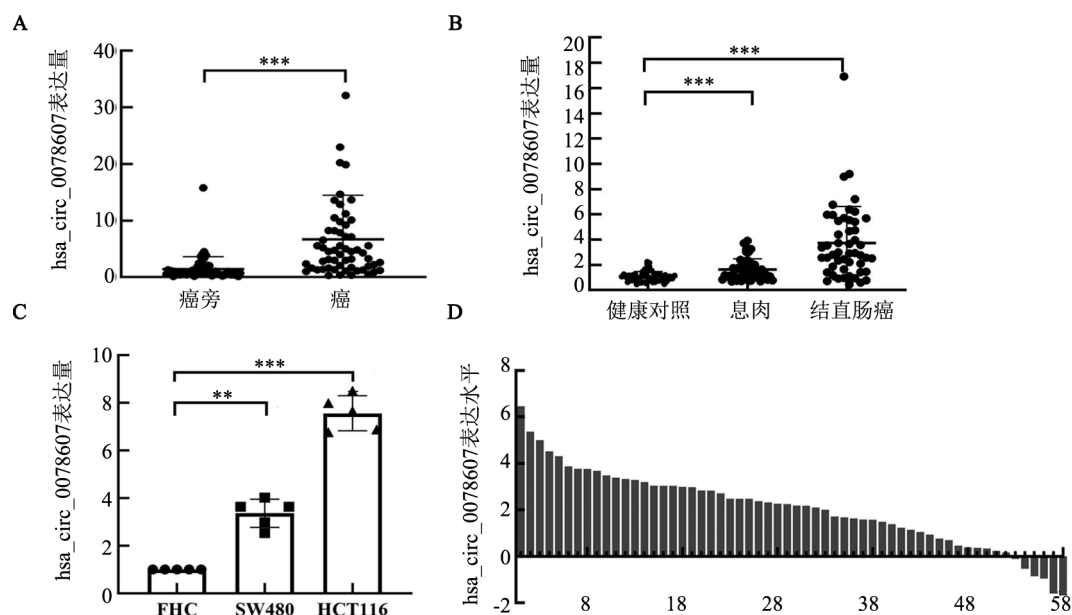
也与以上结果一致,hsa_circ_0078607在结直肠癌HCT116、SW480细胞中表达水平明显上调,差异有统计学意义($t_{\text{HCT116}} = -18.331, P < 0.001; t_{\text{SW480}} = -8.913, P < 0.01$;图2C)。组织及血清中hsa_circ_0078607具体表达情况见表3。结果均证实,hsa_circ_0078607在结直肠癌组织、血清、细胞及息肉患者血清中表达均显著上调。

2.3 不同临床病理特征结直肠癌样本中 hsa_circ_0078607 的表达水平

为了初步探索 hsa_circ_0078607 在结直肠癌发生发展过程的作用,采用 Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis 检验分析不同结直肠癌临床病理特征 hsa_circ_0078607 表达水平之间的差异是否具有统计学意义。结果表明,hsa_circ_0078607 的表达水平在

结直肠癌患者肿瘤的分化程度($H=8.000, P=0.046$)、位置($Z=-0.879, P=0.029$)和远处转移($Z=-1.981, P=0.043$)之间的差异有统计学意义,而在患者性别、

TNM分期、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移等差异无统计学意义。可见,hsa_circ_0078607 与结直肠癌的发生发展有着密切的联系。



A: qPCR 法检测结直肠癌组织和癌旁组织中 hsa_circ_0078607 的表达水平量化图; B: qPCR 检测结直肠癌患者、结直肠癌息肉患者和健康人血清中 hsa_circ_0078607 的表达水平量化图; C: qPCR 检测正常结直肠细胞 FHC 和结直肠癌细胞 HCT116、SW480 中 hsa_circ_0078607 的表达水平量化图; D: hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织中的相对表达量。* $P<0.01$, ** $P<0.001$ 。

图2 Hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织、血清和细胞中表达上调

表3 Hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织及血清中表达上调

分组	n	hsa_circ_0078607 表达水平	Z	P
组织				
癌	58	4.405	-6.422	$P<0.001$
癌旁	58	0.817		
血清				
癌	50	2.916	-6.427	$P<0.001$
息肉	49	1.452	-3.654	$P<0.001$
正常	53	1.010		

2.4 组织和血清中 hsa_circ_0078607 水平具有结直肠癌的诊断价值

绘制 ROC 曲线,评价 hsa_circ_0078607 对结直肠癌的诊断价值。结果显示,在结直肠癌组织和血清中 hsa_circ_0078607 诊断结直肠癌的 AUC 分别为 0.845 7 [95%CI(0.772 8, 0.918 6)], $P<0.000 1$; 图 3A] 和 0.868 3 [95%CI(0.790 7, 0.945 9)], $P<0.000 1$; 图 3B]。在组织中,参照约登指数,以 hsa_circ_0078607 相对表达量为 1.066 时取截断值,敏感度和特异度分别为 89.7% 和 67.2%,差异具有统计学意义。同时,在结直肠息肉患者血清中,hsa_circ_0078607 诊断

结直肠息肉的 AUC 为 0.710 1 [95%CI (0.610 0, 0.810 1)], $P=0.000 3$; 图 3C]。以上结果均提示,hsa_circ_0078607 对临床结直肠癌及结直肠息肉有一定的诊断价值。

2.5 hsa_circ_0078607 的 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络及 GO 富集分析

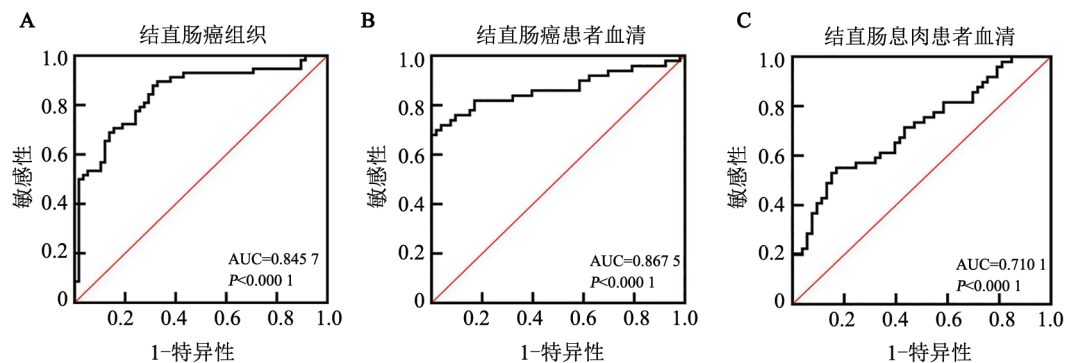
为了进一步了解 hsa_circ_0078607 的生物学功能,对其结合的 miRNA 和下游 mRNA 进行预测,综合多个数据库预测到与 hsa_circ_0078607 结合的 10 个 miRNA: hsa-miR-153、hsa-miR-1257、hsa-miR-1294、hsa-miR-155-5p、hsa-miR-346、hsa-miR-186-5p、hsa-miR-188-3p、hsa-miR-338-3p、hsa-miR-502-5p、hsa-miR-582-3p。基于竞争性内源 RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA) 假说构建 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络 (图 4), 分析 circRNA、miRNA、mRNA 的相互作用关系。对预测的 miRNA 下游靶基因进行 GO 富集分析,得到在生物学过程、细胞组分及分子功能各部分排名前十的 GO 富集分析图 (图 5A), 注释结果表明,靶基因广泛存在于细胞组分中,以细胞核最为显著; 主要参与 RNA 聚合酶 II 启动子转录调控、经典 Wnt 信号通路正向调控、蛋白 K48-连锁泛素化及同种型转换为 IgE 同种型负调控

等生物过程,同时,还具有RNA聚合酶II转录因子活性、特异性结合双链DNA、泛素结合酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性及Hsp70蛋白结合等分子功能。KEGG富集分析的前14个条目显示,靶基因可能参与调控TGF-β、Wnt、MAPK及Hippo等信号通

路,还介导肝癌、乳腺癌和结直肠癌等肿瘤的进展(图5B)。以上研究进一步预测了hsa_circ_0078607可能的生物学功能,也为后续深入研究结直肠癌发生发展相关分子机制提供重要信息。

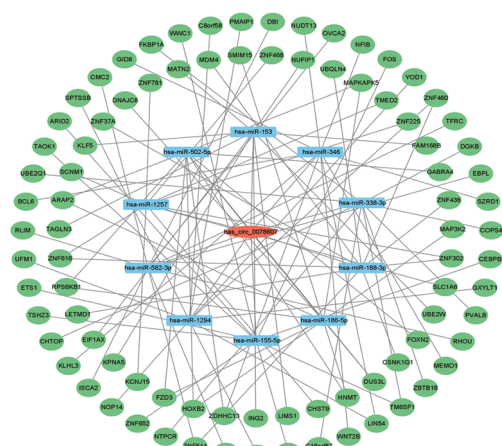
表4 结直肠癌患者组织中hsa_circ_0078607表达水平与其临床病理特征的关系

临床病理参数	n	hsa_circ_0078607表达水平	Z/H	P
性别			-1.298	0.194
男	35	3.603		
女	23	5.048		
年龄/岁			-0.691	0.489
<60	23	4.524		
≥60	35	3.105		
TNM分期			-1.099	0.272
早期(I-II)	34	4.753		
晚期(III-IV)	24	2.989		
肿瘤位置			-0.879	0.029
直肠	29	4.809		
结肠	29	2.989		
肿瘤直径/cm			-0.453	0.650
<5	32	3.145		
≥5	26	4.902		
分化程度			8.000	0.046
黏液腺癌	2	24.500		
低分化	2	4.107		
中分化	49	3.191		
高分化	5	8.222		
淋巴结转移			-0.338	0.736
有	25	3.105		
无	33	4.544		
远处转移			-1.981	0.043
有	5	8.191		
无	53	4.015		



A: 结直肠癌组织中hsa_circ_0078607诊断结直肠癌的ROC曲线; B: 结直肠癌血清中hsa_circ_0078607诊断结直肠癌的ROC曲线; C: 结直肠息肉患者血清中hsa_circ_0078607诊断结直肠息肉的ROC曲线。

图3 Hsa_circ_0078607诊断结直肠癌和结直肠息肉的ROC曲线图



橙色代表 circRNA, 蓝色代表 miRNA, 绿色代表 mRNA, 节点之间连线表示分子间的靶向关系。

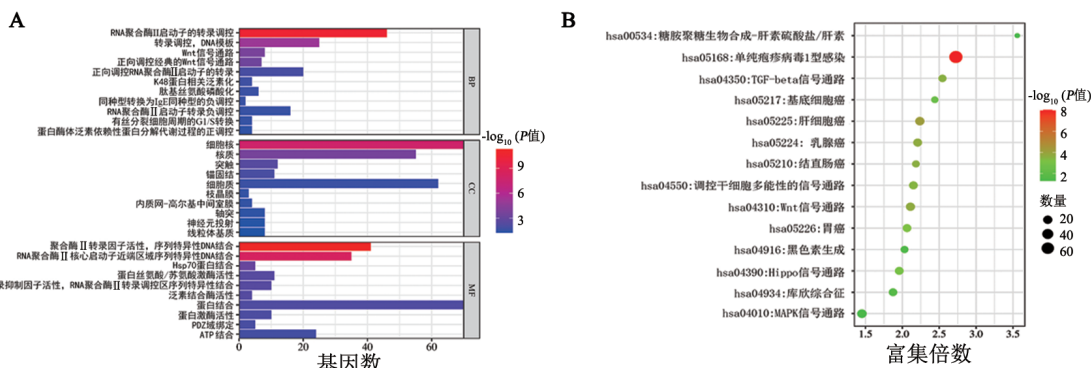
图4 CircRNA-miRNA-mRNA 调控网络

3 讨论

结直肠癌是全球最常见的恶性肿瘤之一^[12]。每年约有 120 万例患者被诊断为结直肠癌, 与结直肠癌相关的死亡人数超过 60 万人^[13]。可见, 结直肠癌对人类的危害越来越大, 但其防治形势不容乐观, 目前临床医学上尚缺少高敏感性和特异性的指标, 寻找诊断结直肠癌的新型标志物迫在眉睫。CircRNA 广泛存在于哺乳动物体内^[14-15], 其结构稳定, 进化保守

且能较好抵抗核酸酶的降解^[16], 具有理想肿瘤标志物的特性。近年来, 许多 circRNA 作为人类疾病诊断的潜在分子标志物和治疗靶点而被报道^[17-18]。ZHANG 等^[10]发现, hsa_circ_0078607 在卵巢癌中差异表达, 并能抑制卵巢癌的进展, 是其潜在的诊断标志物和治疗靶点。而尚未见在结直肠癌中的相关报道。本研究首次报道 hsa_circ_0078607 可用于诊断结直肠癌, 有望成为辅助结直肠癌诊断的新型临床诊断分子标志物, 并有可能成为治疗结直肠癌的潜在靶点。

Hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织和血清中稳定表达。本课题组前期研究^[11]证实了, 结直肠癌组织中存在大量差异表达的 circRNA。本研究中通过 qPCR 及其产物进行凝胶电泳实验及 Sanger 测序证实了 hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织中表达的真实性及准确性; 同时, 在 58 对结直肠癌及癌旁组织和 50 例结直肠癌患者血清中验证了 hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织和血清中稳定表达且表达水平显著上调, 在结直肠癌细胞中的检测也得到了一致的结果, hsa_circ_0078607 在 HCT116 和 SW480 细胞中表达明显上调; 在 49 例结直肠息肉患者血清中也发现其表达水平显著上调。以上结果均表明 hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织、血清和细胞中真实存在且稳定表达上调。



A: miRNA 靶基因 GO 富集分析(纵坐标代表富集的 GO 名称, 颜色表示统计学差异显著程度, 颜色越红表示统计学差异越显著); B: miRNA 靶基因 KEGG 通路分析气泡图(气泡颜色表示统计学差异, 大小表示基因数)。

图5 CircRNA/miRNA/mRNA 调控网络及功能富集分析

Hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织中的差异化表达与肿瘤的发生发展密切相关。大量研究结果^[19-21]表明, 种类繁多、含量丰富的 circRNA 在癌症的发生、发展和耐药性中都发挥着关键作用。研究也发现了多个能影响结直肠癌进展的 circRNA, 如 JING 等^[22]发现在结直肠癌患者中高表达的 hsa_circ_0044556, 与淋巴结转移和肿瘤分期呈正相关, 在结直肠癌细胞中进一步验证发现, 下调

hsa_circ_0044556 的表达可抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 进而促进结直肠癌的进展; circTP53 在结直肠癌组织中高表达, 并通过调控 miR-876-3p/CDKL3 轴促进结直肠癌的恶性表型, 是结直肠癌新的生物标志物和治疗靶点^[23]; 更有趣的是, HSHAO 等^[24]通过检测健康个体、结直肠息肉、肿瘤组织中 circCCDC66 的表达水平, 发现其在结直肠息肉组织中较健康个体中表达水平升高, 在肿瘤组织中表达更高, 且与患

者临床病理特征相关。本研究发现,在结直肠癌组织、血清及息肉患者血清中 hsa_circ_0078607 表达上调,且结直肠癌血清中的表达量高于息肉患者血清中的表达量,在健康对照者-结直肠息肉-结直肠癌的发展过程中 hsa_circ_0078607 的表达水平呈现升高趋势,这一动态改变提示 hsa_circ_0078607 具有预测结直肠恶性转化的潜能;而其在组织中的表达水平在结直肠癌患者肿瘤的不同分化程度、位置和远处转移之间差异有统计学意义,这也提示了 hsa_circ_0078607 在结直肠癌恶性进展过程中有着重要意义。根据 ceRNA 理论, circRNA 可通过靶向相应的 mRNA 来调节下游靶基因的表达,从而参与调控细胞增殖、迁移和凋亡等多个生物过程^[25-26]。近期研究发现, circTP53^[23]、circ_0006089^[17]、circ_0000798^[27] 分别在结直肠癌、胃癌和肾癌组织中异常表达,并可作用于不同的 miRNA 来调控肿瘤的生长。CircRNA 能够充当“miRNA 海绵”,结合 miRNA 后调控下游靶基因表达水平,进而在肿瘤中发挥调控作用^[28]。YAO 等^[29]通过功能实验证实, circEZH2 可作为 miR-133b 的海绵,诱导 IGF2BP2 基因表达上调,进一步促进结直肠癌细胞的增殖和迁移,这是调节结直肠癌进展中的关键机制。本研究发现, hsa_circ_0078607 上有多个 miRNA 结合位点,其中 hsa-miR-338-3p 在结直肠癌中的作用机制已初步阐明, hsa-miR-338-3p 可通过靶向调控 smoothed 蛋白,进而抑制结直肠癌细胞的侵袭和迁移^[30]。对预测 miRNA 的靶基因进行 GO/KEGG 富集分析,注释结果表明这些 miRNA 可能参与调控 RNA 聚合酶 II 启动子转录调控、Wnt、Hippo 信号通路调控、蛋白 K48-连锁泛素化等多个生物过程。这与 BAYAT 等^[31]的研究结果一致,在结直肠癌中, miR-186-5p 作为细胞周期抑制因子,可通过抑制 SMAD6 和 SMAD7 基因的表达,从而抑制结直肠癌细胞增殖和迁移、促进细胞凋亡,是结直肠癌治疗的抑瘤生物标志物和治疗靶点。本研究通过分析 circRNA-miRNA-mRNA 调控网络进一步了解了 hsa_circ_0078607 的生物学功能,为其在结直肠癌中作用机制研究提供重要信息。综合分析以上实验结果,均提示 hsa_circ_0078607 在结直肠癌起始与发生发展中发挥重要作用,有望成为结直肠癌潜在的治疗靶点。

Hsa_circ_0078607 是潜在的结直肠癌诊断标志物。有研究报道, hsa_circ_0011536 在结直肠癌组织中表达下调,其诊断结直肠癌的 ROC 曲线下面积为 0.885^[18]。本研究发现, hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织和血清中表达上调对结直肠癌具有较好的诊断价值(AUC 分别为 0.8457 和 0.8683),组织中准确率

为 89.7%;同时,对结直肠息肉也有一定的诊断价值(AUC 为 0.7101)。这是首次报道癌组织和血清中表达上调的 hsa_circ_0078607 对结直肠癌具有较好的诊断价值。

尽管本研究证实了 hsa_circ_0078607 对结直肠癌及结直肠息肉患者的诊断价值,但仍存在一定局限性。本研究为单中心研究,样本量有限, hsa_circ_0078607 对结直肠癌的诊断作用有待多中心大样本量的前瞻性研究进一步验证。同时由于受到资源和时间的限制,还缺乏外部组验证,研究结果的泛化性未能得到进一步证实。在今后的研究中将争取加入上述验证步骤进一步确保研究结果的可靠性和泛化性。以上问题的解决将为结直肠癌和结直肠息肉患者血清及组织 circRNA 诊断标志物检测走向临床应用提供有力的实验依据。

综上所述,本研究证实 hsa_circ_0078607 在结直肠癌组织、血清、细胞以及结直肠息肉患者血清中表达上调,并与结直肠癌肿瘤位置、分化程度和远处转移有关联,对结直肠癌有较好的诊断价值。而 hsa_circ_0078607 在健康对照者-结直肠息肉-结直肠癌的发展过程中的表达水平呈上升的动态改变,提示着 hsa_circ_0078607 具有预测结直肠恶性转化的潜能;同时,通过生物学功能分析也发现, hsa_circ_0078607 可能参与调控结直肠癌的发生发展过程,这一发现对于深入了解结直肠癌的发生机制和寻找潜在的治疗靶点具有重要意义。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, GODING SAUER A, *et al.* Colorectal cancer statistics, 2020[J]. CA A Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145-164. DOI: 10.3322/caac.21601.
- [2] XIE Y H, CHEN Y X, FANG J Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer[J/OL]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 22 [2023-07-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32296018/>. DOI: 10.1038/s41392-020-0116-z.
- [3] 张伟, 温珍平. piRNA 在结直肠癌中的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2022, 35(12): 2020-2022. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2022.12.012.
- [4] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, *et al.* Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2): 141-157. DOI: 10.1261/rna.035667.112.
- [5] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. Nature, 2013, 495(7441): 384-388. DOI: 10.1038/nature11993.
- [6] 郑帅龙, 李利, 张红平. 环状 RNA 翻译能力研究进展[J]. 遗传, 2020, 42(5): 423-434. DOI:10.16288/j.ycz.19-354.
- [7] PENG Y Y, SUN D, XIN Y. Hsa_circ_0005230 is up-regulated and promotes gastric cancer cell invasion and migration via regulating the miR-1299/RHOT1 axis[J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 5046-

5063. DOI: 10.1080/21655979.2022.2036514.
- [8] ZHOU Y, TONG Z K, ZHU X X, *et al.* hsa_circ_0072309 expression profiling in non-small-cell lung carcinoma and its implications for diagnosis and prognosis[J/OL]. *Front Surg*, 2022, 9: 842292[2023-07-01]. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2022.842292>. DOI: 10.3389/fsurg.2022.842292.
- [9] GAO Y, ZHOU Y L, WEI L, *et al.* Hsa_Circ_0066351 acts as a prognostic and immunotherapeutic biomarker in colorectal cancer [J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 927811[2023-07-01]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.927811>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.927811.
- [10] ZHANG N, JIN Y, HU Q B, *et al.* Circular RNA hsa_circ_0078607 suppresses ovarian cancer progression by regulating miR-518a-5p/Fas signaling pathway[J]. *J Ovarian Res*, 2020, 13(1): 1-10. DOI: 10.1186/s13048-020-00664-1.
- [11] 任明君, 邢利, 王万平, 等. hsa_circ_0006867 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(21): 3924-3929. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2022.21.017.
- [12] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [13] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al.* Cancer statistics, 2021[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21654.
- [14] ABBASZADEH-GOUDARZI K, RADBAKHS S, POURHANIFEH M H, *et al.* Circular RNA and diabetes: epigenetic regulator with diagnostic role[J]. *Curr Mol Med*, 2020, 20(7): 516-526. DOI: 10.2174/1566524020666200129142106.
- [15] SHABANINEJAD Z, VAFADAR A, MOVAHEDPOUR A, *et al.* Circular RNAs in cancer: new insights into functions and implications in ovarian cancer[J/OL]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 84[2023-07-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31481095/>. DOI: 10.1186/s13048-019-0558-5.
- [16] HALLAJZADEH J, AMIRANI E, MIRZAEI H, *et al.* Circular RNAs: new genetic tools in melanoma[J]. *Biomark Med*, 2020, 14(7): 563-571. DOI: 10.2217/bmm-2019-0567.
- [17] LIN G R, CHEN W R, ZHENG P H, *et al.* Circular RNA circ_0006089 promotes the progression of gastric cancer by regulating the miR-143-3p/PTBP3 axis and PI3K/AKT signaling pathway[J]. *J Dig Dis*, 2022, 23(7): 376-387. DOI: 10.1111/1751-2980.13116.
- [18] YIN T F, DU S Y, ZHAO D Y, *et al.* Identification of circ_0000375 and circ_0011536 as novel diagnostic biomarkers of colorectal cancer[J]. *World J Clin Cases*, 2022, 10(11): 3352-3368. DOI: 10.12998/wjcc.v10.i11.3352.
- [19] 邹晓莉, 王慧敏, 曹碧月, 等. hsa_circ_0026782 对肺腺癌细胞的增殖、迁移及凋亡作用[J]. *医学研究生学报*, 2021, 34(12): 1244-1251. DOI: 10.16571/j.cnki.1008-8199.2021.12.003.
- [20] BORRAN S, AHMADI G, REZAEI S, *et al.* Circular RNAs: new players in thyroid cancer[J/OL]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(10): 153217[2023-07-01]. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153217>. DOI: 10.1016/j.prp.2020.153217.
- [21] WU L X, GAO J, LIU S B, *et al.* CircRNA circ_0005273 contributes to the cisplatin resistance of cervical cancer cells by sponging miR-133b [J]. *J Obstet Gynaecol*, 2022, 42(7): 3086-3093. DOI: 10.1080/01443615.2022.2099257.
- [22] JING L, WU J H, TANG X C, *et al.* Identification of circular RNA hsa_circ_0044556 and its effect on the progression of colorectal cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 1-13. DOI: 10.1186/s12935-020-01523-1.
- [23] YAN S, WEI H, LI Q, *et al.* CircTP53 promotes colorectal cancer by acting as a miR-876-3p sponge to increase cyclin-dependent kinase-like 3 expression[J/OL]. *Cell Signal*, 2021, 78: 109845 [2023-07-01]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109845>. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109845.
- [24] HSIAO K Y, LIN Y C, GUPTA S K, *et al.* Noncoding effects of circular RNA CCDC66 promote colon cancer growth and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2339-2350. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1883.
- [25] ZHONG Y X, DU Y J, YANG X, *et al.* Circular RNAs function as ceRNAs to regulate and control human cancer progression[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 79[2023-07-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29626935/>. DOI: 10.1186/s12943-018-0827-8.
- [26] YANG X Q, YE T, LIU H R, *et al.* Expression profiles, biological functions and clinical significance of circRNAs in bladder cancer[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 1-25. DOI: 10.1186/s12943-020-01300-8.
- [27] LI Z M, ZHENG J Z, XU J, *et al.* Knockdown of Circ_0000798 impedes cell growth and motility of renal cell carcinoma cells through functioning as miRNA sponge for miR-589-5p[J]. *Biochem Genet*, 2023, 61(1): 279-298. DOI: 10.1007/s10528-022-10248-x.
- [28] LI J, SUN D, PU W C, *et al.* Circular RNAs in cancer: biogenesis, function, and clinical significance[J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(4): 319-336. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.01.012.
- [29] YAO B, ZHANG Q L, YANG Z, *et al.* CircEZH2/miR-133b/IGF2BP2 aggravates colorectal cancer progression via enhancing the stability of m⁶A-modified CREB1 mRNA[J/OL]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 140[2023-07-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35773744/>. DOI: 10.1186/s12943-022-01608-7.
- [30] XUE Q, SUN K, DENG H J, *et al.* MicroRNA-338-3p inhibits colorectal carcinoma cell invasion and migration by targeting smoothened[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2014, 44(1): 13-21. DOI: 10.1093/jjco/hyt181.
- [31] BAYAT Z, GHAEMI Z, BEHMANESH M, *et al.* Hsa-miR-186-5p regulates TGF β signaling pathway through expression suppression of SMAD6 and SMAD7 genes in colorectal cancer[J]. *Biol Chem*, 2021, 402(4): 469-480. DOI: 10.1515/hsz-2019-0407.

[收稿日期] 2023-07-03

[修回日期] 2023-10-11

[本文编辑] 黄静怡