

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.02.003

· 专栏论著 ·

口腔鳞状细胞癌组织中环状RNA的差异表达谱分析

赵思语¹, 欧阳少波¹, 王军², 黄自坤³, 罗清³, 廖岚¹

1. 南昌大学附属口腔医院修复科, 江西省口腔生物医学重点实验室, 江西南昌(330006); 2. 南昌大学第二附属医院口腔颌面外科, 江西南昌(330006); 3. 南昌大学第一附属医院检验科, 江西南昌(330006)



【通信作者简介】 廖岚, 教授, 主任医师, 博士生导师。现任南昌大学附属口腔医院党委书记,《口腔疾病防治》杂志副主编。江西省百千万人才、江西省巾帼建功标兵、江西省高等学校中青年骨干教师、江西省卫生系统学术和技术带头人培养对象、江西省医学领先学科成员。中华口腔医学会第一届口腔科研管理分会委员、江西省口腔医师分会常委、江西省医学科普学会常委、江西省口腔医学会理事、江西省口腔修复专委会副主任委员、江西省研究型医院学会第一届科研管理和学科建设分会副主任委员、江西省口腔医学会口腔医学教育专委会主任委员、江西省研究型医院口腔分会主任委员。主要研究方向: 口腔疾病基础与临床、口腔生物材料。主持国家自然科学基金及省部级科研项目10余项。发表专业学术论文20余篇, 其中SCI源刊物6篇, 参编专著3部。

【摘要】 目的 分析环状RNA(circular RNA, circRNA)在口腔鳞状细胞癌组织及癌旁组织中表达谱的差异及临床意义。方法 利用高通量芯片技术检测3例口腔鳞状细胞癌患者癌组织和配对癌旁组织中的差异表达circRNA, 采用实时定量PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)方法验证所筛选的部分circRNA分子在45对口腔鳞状细胞癌组织与癌旁组织中的表达情况。分析上调明显的circRNA表达水平与口腔鳞状细胞癌临床病理特征的关系, 采用Arraystar公司circRNA靶基因分析软件, 预测可能与上调明显的circRNA相互作用的靶miRNA分子。结果 口腔鳞状细胞癌患者癌组织与癌旁组织样本间差异表达的circRNA共155个, 其中上调45个, 下调110个。所挑选的在口腔鳞状细胞癌组织上调或下调差异表达最显著的3条circRNA中RT-qPCR验证结果显示, 与癌旁组织相比, 口腔鳞状细胞癌组织中hsa_circ_0001874、hsa_circ_0001971、hsa_circ_0067934表达上调, hsa_circ_0000520、hsa_circ_0023944、hsa_circ_0000140表达下调, 与芯片检测结果一致。在上述芯片筛选的口腔鳞状细胞癌组织特征circRNA表达谱中, hsa_circ_0001874上调表达最明显, hsa_circ_0001874的表达在不同临床分期及细胞分化程度存在显著差异; circRNA靶基因分析软件预测结果提示, miR-103a-3p、miR-107、miR-593-5p、miR-661和miR-662可能是hsa_circ_0001874的潜在靶基因。结论 多种circRNA在口腔鳞状细胞癌组织中呈异常表达, 这些表达差异的circRNA及其潜在的靶基因可能与口腔鳞状细胞癌的发生、发展密切相关。

【关键词】 环状RNA; 口腔; 鳞状细胞; 癌; 癌旁组织; 基因芯片; RT-qPCR; 靶基因

【中图分类号】 R739.8 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)02-0083-07

【引用著录格式】 赵思语, 欧阳少波, 王军, 等. 口腔鳞状细胞癌组织中环状RNA的差异表达谱分析[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(2): 83-89.

【收稿日期】 2017-12-06; **【修回日期】** 2017-12-15

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81660444); 江西省自然科学基金项目(20171BAB205050); 江西省重点研发计划项目(20161BBG70149); 江西省卫生和计生委科技项目(20175296)

【作者简介】 赵思语, 医师, 硕士研究生在读, Email: 531909402@qq.com

【通信作者】 廖岚, 主任医师, 博士生导师, Email: liaolan5106@163.com

Differential expression of circular RNA in oral squamous cell carcinoma ZHAO Siyu¹, OUYANG Shaobo¹, WANG Jun², HUANG Zikun³, LUO Qing³, LIAO Lan¹. 1. Department of Oral Prosthodontics, Affiliated Stomatological Hospital of Nanchang University, the Key Laboratory of Oral Biomedicine in Jiangxi Province, Nanchang 330006, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: LIAO Lan, Email: liaolan5106@163.com, Tel: 0086-791-86235863

【Abstract】 Objective To analyze circular RNA (circRNA) expression profiles in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its clinical significance. **Methods** The expression of circRNA was detected with circRNA microarray assay in three samples of OSCC tumor and matched adjacent tissues. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used to verify the expression of circRNA in 45 pair OSCC tissues and normal adjacent tissues. The relationship between the expression of circRNA and the clinicopathological characteristics of OSCC was analyzed. circRNAs/miRNAs interaction were predicted using Arraystar's home-made miRNA target prediction software. **Results** 155 circRNAs were differentially expressed between the OSCC tissues and matched adjacent tissues, of which 45 circRNAs were up-regulated and 110 circRNAs were down-regulated in OSCC tissues (fold changes ≥ 1.5 and $P < 0.05$). In the selected three circRNAs that were most significantly upregulated or downregulated in OSCC, the RT-qPCR results showed that hsa_circ_0001874, hsa_circ_0001971 and hsa_circ_0067934 were increased, while hsa_circ_0000520, hsa_circ_0023944 and hsa_circ_0000140 were decreased in OSCC tissues versus normal adjacent tissues ($P < 0.001$). The results were generally consistent with the microarray data. Among the circRNA expression profiles in OSCC, the up-regulation of hsa_circ_0001874 was the highest and the expression of hsa_circ_0001874 was significantly correlated with TNM stage and tumor grade. The result of Arraystar's home-made miRNA target prediction software indicated that miR-103a-3p, miR-107, miR-593-5p, miR-661 and miR-662 may be potential target genes of hsa_circ_0001874. **Conclusion** The differentially expressed circRNAs in OSCC tissues and normal adjacent tissues were identified, and these dysregulated circRNAs and their potential target genes may play important roles in the development of OSCC.

【Key words】 Circular RNA; Oral; Squamous cell; Carcinoma; Matched adjacent tissues; Microarray; Quantitative real-time PCR; Target genes

口腔鳞状细胞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全球呈逐年上升趋势^[1]。因其易发生淋巴结转移且预后差等特点,5年整体生存率仅约为50%^[2]。目前认为,口腔鳞状细胞癌的病因复杂多样,包括吸烟在内的环境因素及遗传等内在因素均可造成口腔鳞状细胞癌的发生发展,但其确切发病机制尚不明确^[3]。环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类具有稳定闭合环状结构的内源性RNA分子,主要分布于细胞质中,序列高度保守,在哺乳动物大量并稳定存在,具有一定的组织、时序和疾病特异性,在蛋白质合成、基因表达以及转录后修饰等细胞生物学功能中发挥重要的调节作用^[4]。越来越多的证据表明, circRNA的异常表达与肺癌、胃癌、肝癌、结直肠癌等多种肿瘤的发生、发展密切相关^[5-7]。目前, circRNA在口腔鳞状细胞癌中的研究刚起步。为了更好了解 circRNA在口腔鳞状细胞癌中的表达情况,本研究利用高通量芯片技术检测3例口腔鳞状细胞癌患者癌组织和配对癌旁组织中的差异表达 circRNA,采用实时定

量PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)方法验证所筛选的部分 circRNA分子在45对口腔鳞状细胞癌组织与癌旁组织中的表达情况。分析上调明显的 circRNA表达水平与口腔鳞状细胞癌临床病理特征的关系,采用 circRNA靶基因分析软件,预测可能与上调明显的 circRNA相互作用的靶 miRNA分子,为研究 circRNA在口腔鳞状细胞癌发病机制中的机理研究奠定前期基础。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取2016年1月—2016年10月在南昌大学附属口腔医院口腔颌面外科收治的口腔鳞状细胞癌患者48例,其中男性32例,女性16例,年龄37~72岁,中位年龄55岁,舌癌20例,牙龈癌13例,颊黏膜癌8例,唇癌4例,腭癌3例;依据TNM分期,分为I+II期组30例和III+IV期组18例;伴淋巴结转移者12例,无淋巴结转移者36例,低分化9例,中、高分化39例。口腔鳞状细胞癌患者术前均未

进行过放疗、化疗、中西医结合治疗及生物治疗,且无合并其他肿瘤、自身免疫性疾病及感染性疾病等。手术切取口腔鳞状细胞癌组织及对应的手术切缘距肿瘤边缘 2 cm 的癌旁正常口腔黏膜组织(经组织病理切片确诊)作为标本,离体后立即置于液氮保存。患者均签署知情同意书。从收集的 48 例样本中用随机数表法随机选取 3 例口腔鳞状细胞癌组织及相应癌旁组织(舌癌 2 例,牙龈癌 1 例; I + II 期 2 例, III + IV 期 1 例;伴淋巴结转移者 1 例,无淋巴结转移者 2 例;低分化 1 例,中、高分化 2 例),利用美国 Arraystar 公司人 circRNA V1.0 版本芯片(Arraystar Circular RNA Microarray Array Version 1.0)检测这 3 例口腔鳞状细胞癌患者癌组织和配对癌旁组织中的差异表达 circRNA,采用 RT-qPCR 方法验证所筛选的部分 circRNA 分子在剩余 45 对口腔鳞状细胞癌组织与癌旁组织中的表达情况。

1.2 主要试剂和仪器

Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR® Premix Ex Taq™ 购自大连宝生物 TaKaRa 公司;PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;RNeasy Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司;Applied Biosystems 7500 型荧光定量 PCR 仪器购自美国 ABI 公司;人 circRNA 芯片由美国 Arraystar 公司提供。

1.3 总 RNA 的提取和纯化

取液氮保存的口腔鳞状细胞癌组织及癌旁正常口腔黏膜组织标本,在液氮中碾碎至粉状,按 Trizol 试剂说明书提取口腔鳞状细胞癌组织和癌旁正常组织中的总 RNA,经焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理过的蒸馏水溶解,采用 RNA 纯化试剂盒纯化总 RNA。采用 NanoDrop ND-1000 分别检测样本在分光光度计 230 nm、260 nm 和 280 nm 的吸光度值,计算 RNA 的总量和质量。

1.4 circRNA 表达谱检测

根据试剂盒操作步骤,将 3 例口腔鳞状细胞癌组织和相应癌旁对照组织中的总 RNA 用 RNase R 处理,去除线性 RNA 分子,然后采用随机引物扩增、反转录为荧光标记的 cRNA,标记的 cRNAs 采用 RNeasy Mini Kit 进行纯化,用 Nano Drop ND-1000 检测其 Cy3 标记特异活性和浓度。取 1 μg 荧光标记的 cRNA,加入 5 μL 10 × Blocking Agent 和 1 μL 25 × 裂解液,混匀后,60 °C 温育 30 min,然后加入 25 μL 2 × 杂交缓冲液。将 50 μl 杂交反应液加入 Human Circular RNA Array 反应玻片上。65 °C 杂

交反应 17 h。反应结束,洗片固定后,在 Agilent G2505C 扫描仪上扫描。用 Agilent Feature Extraction Software (version 11.0.1.1) 软件对杂交图片进行分析并提取数据,最后对数据进行标准化和分析,寻找 2 组样本间差异表达的 circRNA,通过倍数变化(Fold Change)和 P 值进行筛选,采用 t 检验方法,选择差异倍数 ≥ 1.5, P < 0.05 的 circRNA 作为差异 circRNA。circRNA 芯片检测由上海康成生物有限公司完成检测及数据初步分析。

1.5 RT-qPCR 验证

根据芯片分析结果选出的差异表达 circRNA 分子中,挑选 6 个差异变化明显的 circRNA 分子,以 β-actin 作为内参,采用 SYBR Green 法进行 RT-qPCR 验证。取 1 μg RNA,按照 PrimeScript 反转录试剂盒说明书,将 RNA 逆转录为 cDNA。RT-qPCR 反应体系为 20 μL,引物序列见表 1。反应体系包括:1 × SYBR Green I master-mix、0.5 μmol/L 特异正向引物、0.5 μmol/L 特异反向引物、1 μL 反转录产物。反应条件为:预变性 95 °C 10 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,72 °C 30 s,40 个循环,通过熔解曲线检测 PCR 产物的特异性。RT-qPCR 检测使用 ABI 7500 仪器进行。每孔均设 3 个复孔,取平均 Ct 值作为该样本最后 Ct 值,以 β-actin 基因作为内参基因,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值反映 circRNA 的相对表达水平。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequence for RT-qPCR

引物名称	序列(5'-3')	片段长度 (bp)
β-actin	上游:CATGTACGTTGCTATCCAGGG	250
	下游:CTCCTTAATGTCACGCACGAT	
hsa_circ_0001874	上游:TTGGCTCTCTGCTGTGC	122
	下游:GGTCATCCACAATCAGCCCA	
hsa_circ_0001971	上游:GCTGCCTTAACCTTACATGCC	158
	下游:ACTTTGTGGCTCCTGGATAACT	
has_circ_0067934	上游:TAGCAGTTCCCAATCCTTG	135
	下游:CACAAATTCCTCATCTCC	
hsa_circ_0000520	上游:GGAAGTCTGAGACTAGGGCCA	122
	下游:AAGGGACATGGGAGTGGAGTG	
hsa_circ_0023944	上游:AATAGTAGTTGGGTGGTGGTCT	120
	下游:CTGCCAACTGTGGGATGTT	
hsa_circ_0000140	上游:CCGGCATTACCTACTGGAGTC	161
	下游:CCTCCACCTTCTCTTGACA	

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,经 Kolmogorov-Smirnov 检验数据呈正态分布,结果以均数 ± 标准差表示,两样本均数比较用 t 检验, P < 0.05 为差

异具有统计学意义。

2 结果

2.1 样本总RNA和标记cRNA的质量检测

经分光光度计检测,口腔鳞状细胞癌癌旁对照组织和口腔鳞状细胞癌组织样本RNA的

A260/280值均为1.8~2.0,说明总RNA具有较高的纯度,样本提取RNA总量均 $\geq 0.5 \mu\text{g}$,均达到质控标准,符合检测要求(表2)。每份样本采用荧光染料标记,标记RNA总量均 $\geq 1.65 \mu\text{g}$,Cy3标记特异活性均 $\geq 9 \text{ pmol Cy3}/\mu\text{g}$,符合实验要求,可用于后续芯片杂交。

表2 总RNA和合成标记cRNA的质控

Table 2 Quality assurance of total RNA and cRNA quantification

样本	总 RNA				cRNA				
	OD260/280 比值	OD260/230 比值	浓度 (ng/ μL)	体积 (μL)	总量 (ng)	cRNA 浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Cy3 标记特异活性 (pmol Cy3/ μg)	体积 (μL)	总量 (μg)
T1	1.87	2.21	1 092.80	50	54 640.00	0.432 6	32.91	10	4.33
T2	1.96	2.16	1 134.67	50	56 734.00	0.485 1	32.14	10	4.85
T3	1.85	2.22	1 066.94	50	53 347.00	0.454 3	29.80	10	4.54
N1	1.94	2.13	993.61	50	49 680.50	0.518 0	28.73	10	5.18
N2	1.86	2.20	1 391.44	50	55 657.60	0.568 1	26.54	10	5.68
N3	1.92	2.06	1 360.94	50	54 437.60	0.454 7	29.99	10	4.55

注 T1~T3为口腔鳞癌组织,N1~N3为癌旁对照组织。

2.2 芯片结果分析

选择相对表达量比值在1.5倍以上,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)的circRNA作为表达差异的circRNA。芯片检测结果显示,与癌旁对照组织相比较,口腔鳞状细胞癌组织中相对表达量比值在1.5倍以上变化的circRNA有155条,其中上调

45条,下调110条(图1)。统计分析后筛选表达上调和下调的前15位circRNA(表3、表4),其中hsa_circ_0001874是上调倍数最大的circRNA,上调倍数为6.23;hsa_circ_0000520是下调倍数最大的circRNA,下调倍数为8.17。

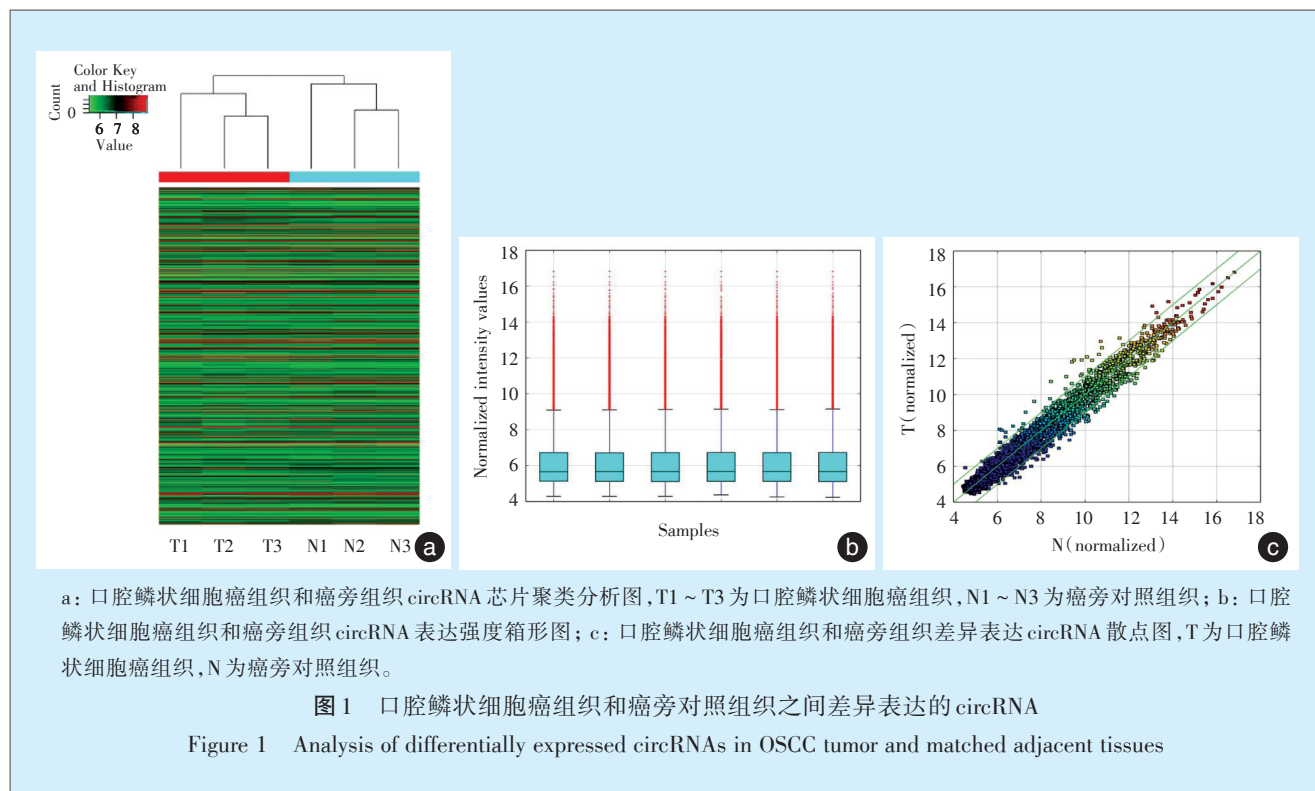


表3 口腔鳞状细胞癌组织和癌旁对照组织相比有显著上调的前15个circRNA

Table 3 Top 15 up-regulated expressed circRNAs between OSCC tissues and matched adjacent tissues

circRNA	上调倍数	circRNA 类型	染色体定位	基因定位
hsa_circ_0001874	6.2251323	intronic	chr9	BICD2
hsa_circ_0001971	5.0196834	exonic	chr7	FAM126A
has_circ_0067934	4.6755761	exonic	chr3	PRKCI
hsa_circ_0009910	4.3988596	exonic	chr1	MFN2
hsa_circ_0000069	4.2901026	exonic	chr1	STIL
hsa_circ_0008068	4.0083441	exonic	chr13	KATNAL1
hsa_circ_0008609	3.9761604	exonic	chr2	MRPL30
hsa_circ_0001221	3.8211575	intronic	chr22	SEC14L6
hsa_circ_0000284	3.2614234	exonic	Chr11	HIPK3
hsa_circ_0001772	3.0316954	exonic	chr7	RBM33
hsa_circ_0009541	2.9467732	exonic	chr1	CAMTA1
hsa_circ_0000711	2.9083351	exonic	chr16	NFATC3
hsa_circ_0000272	2.7267515	sense overlapping	chr11	MOB2
hsa_circ_0003258	2.6864864	exonic	chr17	ZNF652
hsa_circ_0000685	2.6704982	intronic	chr16	BOLA2

表4 口腔鳞状细胞癌组织和癌旁对照组织相比有显著下调的前15个circRNA

Table 4 Top 15 down-regulated expressed circRNAs between OSCC tissues and matched adjacent tissues

circRNA	下调倍数	circRNA 类型	染色体定位	基因定位
hsa_circ_0000520	8.1739243	sense overlapping	chr14	RPPH1
hsa_circ_0023944	7.5087552	exonic	chr11	PICALM
hsa_circ_0000140	6.3588978	exonic	chr1	KIAA0907
hsa_circ_0001649	5.5033948	exonic	chr6	SHPRH
hsa_circ_0003570	4.4506524	exonic	chr10	FAM53B
hsa_circ_0002632	4.0537517	exonic	chr1	STIL
hsa_circ_0000708	3.6528857	intronic	chr16	FAM65A
hsa_circ_0004968	3.5888536	exonic	chr3	DCBLD2
hsa_circ_0007158	3.4608936	exonic	chr5	FAM169A
hsa_circ_0001638	3.3768596	exonic	chr6	KIAA1919
hsa_circ_0006570	3.2942557	exonic	chr9	C9orf129
hsa_circ_0008792	3.1611478	exonic	chr9	PAPPA
hsa_circ_0003645	3.1408427	exonic	chr16	C16orf62
hsa_circ_0002074	3.0570988	exonic	chr3	TAMM41
hsa_circ_0000191	3.0266706	intronic	chr1	PSEN2

2.3 RT-qPCR 对部分 circRNA 进行验证

笔者挑选口腔鳞状细胞癌组织上调差异表达最显著的3条circRNA (hsa_circ_0001874、hsa_circ_0001971 和 has_circ_0067934) 和下调差异表达最显著的3条circRNA (hsa_circ_0000520、hsa_circ_0023944 和 hsa_circ_0000140) 在45对口腔鳞状细胞癌组织与癌旁组织中进行RT-qPCR验证。结果显示,口腔鳞状细胞癌组织中 hsa_circ_0001874、hsa_circ_0001971 和 has_circ_0067934 的表达明显上调,同时 hsa_circ_0000520、hsa_circ_0023944 和 hsa_circ_0000140 的表达明显下调,与芯片数据趋势基本一致(表5)。

2.4 Hsa_circ_0001874 表达水平与口腔鳞状细胞癌临床病理特征的关系

在上述芯片筛选的口腔鳞状细胞癌组织特征

circRNA 表达谱中,hsa_circ_0001874 上调表达最明显,本研究进一步将口腔鳞状细胞癌患者按临床病理参数进行分组,分析患者肿瘤组织 hsa_circ_0001874 表达水平与性别、年龄、肿瘤部位病理、大小、临床分期、分化程度及颈淋巴结是否转移的关系。结果显示,hsa_circ_0001874 的表达在不同临床分期及细胞分化程度存在显著差异,TNM III + IV 期患者的 hsa_circ_0001874 表达水平 (6.67 ± 1.71) 明显高于 TNM I + II 期患者 (3.74 ± 1.44) ($t = 6.11, P < 0.05$);低分化组的 hsa_circ_0001874 表达水平 (7.25 ± 1.20) 要明显高于中、高分化组 (4.33 ± 1.87) ($t = 4.42, P < 0.05$)。hsa_circ_0001874 在不同性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小及淋巴结转移情况等各组间的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表5 RT-qPCR 检测差异性表达的 circRNA 表达量

Table 5 RT-qPCR validation of some differentially expressed circRNA

$n = 45, \bar{x} \pm s$

组别	hsa_circ_0001874	hsa_circ_0001971	hsa_circ_0067934	hsa_circ_0000520	hsa_circ_0023944	hsa_circ_0000140
口腔鳞状细胞癌	4.92 ± 2.10	4.35 ± 1.46	3.82 ± 1.23	0.12 ± 0.04	0.27 ± 0.09	0.39 ± 0.08
癌旁配对组织	1.12 ± 0.53	1.07 ± 0.49	1.17 ± 0.40	1.03 ± 0.35	1.09 ± 0.28	1.01 ± 0.25
<i>t</i> 值	11.36	9.54	7.21	-6.14	-5.23	-4.79
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

2.5 Hsa_circ_0001874 相互作用 miRNAs 的生物信息学分析

采用 Arraystar 公司 circRNA 靶基因分析软件, 预测可能与 hsa_circ_0001874 相互作用的靶 miRNA

分子。结果如图 2 所示, 发现 miR-103a-3p、miR-107、miR-593-5p、miR-661 和 miR-662 可能是 hsa_circ_0001874 的潜在靶基因。

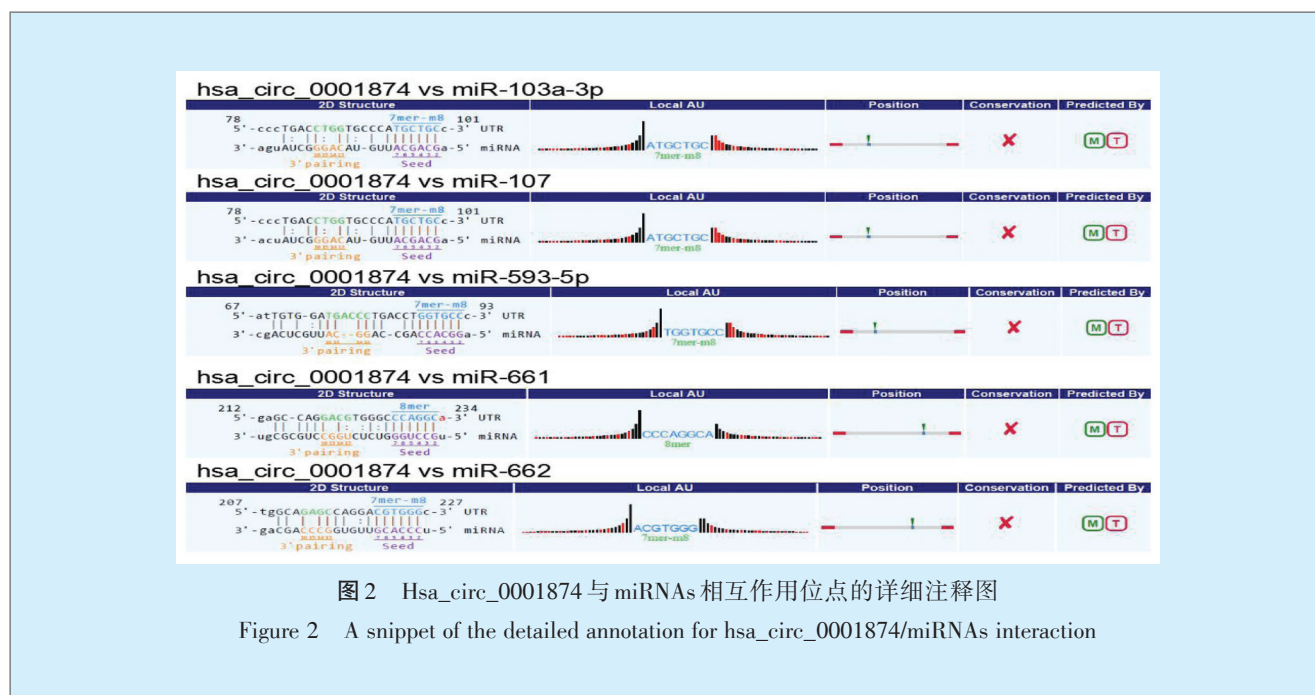


图2 Hsa_circ_0001874 与 miRNAs 相互作用位点的详细注释图

Figure 2 A snippet of the detailed annotation for hsa_circ_0001874/miRNAs interaction

3 讨论

circRNA 是区别于传统线性 RNA 的一类新型 RNA, 通常由前体 mRNA (pre-mRNA) 经可变剪切产生, 具有闭合环状结构^[8-9]。近年大量研究证实, circRNA 在多种人类肿瘤的发生、发展过程中发挥重要的调控作用^[10]。Yang 等^[11]研究发现 circ-Amot1 能够通过诱导 c-Myc 入核促进肿瘤生成。Zhu 等^[12]研究发现 circ-BANP 在结肠癌中表达上调, 并与患者预后相关, 敲低 circ-BANP 可明显影响结肠癌细胞的增殖。在胃癌研究中发现 hsa_circ_002059 显著下调, 经证实其表达水平与胃癌的远处转移、TNM 分期、性别、年龄均相关^[13]。以上研究表明, 某些特定的 circRNA 在肿瘤的恶性进展中发挥着重要的作用。

与其他恶性肿瘤一样, 口腔鳞状细胞癌的发生发展也是由编码和非编码基因共同参与的一系列复杂的细胞生物学过程^[14]。最近, circRNA 在口腔鳞状细胞癌中的调控作用也开始引起人们的关注。Chen 等^[15]研究发现 circRNA_100290 可通过内源竞争结合 miR-29, 从而解除 miR-29 对 CDK6 的抑制, 促进口腔鳞状细胞癌细胞增殖。目前, circRNA 在口腔鳞状细胞癌中的研究刚起步, 仍有必要继续寻找口腔鳞状细胞癌特异性表达的 circRNA。本研究通过高通量 circRNA 芯片技术筛查口腔鳞状细胞癌患者癌组织中差异表达的 circRNA, 结果与癌旁对照组织进行比较, 发现口腔鳞状细胞癌癌组织中相对表达量比值在 1.5 倍以上变化的 circRNA 有 155 条, 1.5 倍以上上调的 circRNA 共 45 条, 1.5 倍以

上下调的 circRNA 共 110 条。RT-qPCR 验证的结果与 circRNA 芯片检测结果一致,表明芯片数据的可靠性。本研究不仅鉴定出已报道的 has_circ_0067934^[16]和 has_circ_0000520^[17],亦筛选出多个未见报道的差异表达 circRNA,如 has_circ_0001874 等,本研究进一步发现 has_circ_0001874 的表达水平与肿瘤临床分期及分化程度相关,分化低的口腔鳞状细胞癌组织中 has_circ_0001874 表达水平明显高于中、高分化的口腔鳞状细胞癌组织;TNM 分期 III/IV 期口腔鳞状细胞癌组织的 has_circ_0001874 表达水平明显高于 I/II 期的标本。

已有研究表明,circRNA 作为一种新型竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA),具有 miRNA 海绵作用,能够通过与 miRNA 相互作用,导致 miRNA 及其靶基因表达失调,进而参与癌症进程^[18]。Zhong 等^[19]研究发现,circRNA MYLK 可作为 ceRNA 竞争抑制 miR-29a 活性,上调 miR-29a 靶基因 VEGFA 的表达,并导致 EMT 及 Ras/ERK 信号通路的激活,促进膀胱癌发生发展。Li 等^[20]研究发现,circHIPK3 可作为 ceRNA 竞争抑制 miR-558 活性,从而解除对其靶基因乙酰肝素酶的抑制,影响膀胱癌细胞的增殖与转移。本研究发现,has_circ_0001874 在口腔鳞状细胞癌组织中显著高表达,可能参与了口腔鳞状细胞癌发生发展过程,笔者采用 Arraystar 公司 circRNA 靶基因分析软件,预测 has_circ_0001874 的潜在靶 miRNA 分子,发现 miR-103a-3p、miR-107、miR-593-5p、miR-661 和 miR-662 可能是 has_circ_0001874 的潜在靶基因。已有研究表明 miR-103a-3p 和 miR-107 在多种实体肿瘤中异常表达,其异常表达与肿瘤的发生发展密切相关,并可作为判断不良预后的分子指标^[21]。在后续研究中将通过分子生物学实验进一步研究 has_circ_0001874 对口腔鳞状细胞癌的调控机制,探讨这些 circRNA 对口腔鳞状细胞癌发生发展的调节作用及其机制,以期为口腔鳞状细胞癌的临床治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] Keshavarzi M, Darijani M, Momeni F, et al. Molecular imaging and oral cancer diagnosis and therapy[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(10): 3055-3060.
- [3] 张焕东. Gli1 调控口腔鳞状细胞癌上皮-间充质转化的研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(5): 327-330.
- [4] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. Cancer Lett, 2015, 365(2): 141-148.
- [5] Zhang Y, Liang W, Zhang P, et al. Circular RNAs: emerging cancer biomarkers and targets[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 152.
- [6] Wang Y, Mo Y, Gong Z, et al. Circular RNAs in human cancer[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 25.
- [7] Yang Z, Xie L, Han L, et al. Circular RNAs: regulators of cancer-related signaling pathways and potential diagnostic biomarkers for human cancers[J]. Theranostics, 2017, 7(12): 3106-3117.
- [8] Huang Z, Su R, Deng Z, et al. Identification of differentially expressed circular RNAs in human monocyte derived macrophages response to mycobacterium tuberculosis infection[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13673.
- [9] 罗清,姚芳苒,邓楨,等. LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症反应中环状 RNA 表达谱变化分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(6): 405-411.
- [10] He J, Xie Q, Xu H, et al. Circular RNAs and cancer[J]. Cancer Lett, 2017, 396: 138-144.
- [11] Yang Q, Du WW, Wu N, et al. A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(9): 1609-1620.
- [12] Zhu M, Xu Y, Chen Y, et al. Circular BANP, an upregulated circular RNA that modulates cell proliferation in colorectal cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88: 138-144.
- [13] Li P, Chen S, Chen H, et al. Using circular RNA as a novel type of biomarker in the screening of gastric cancer[J]. Clin Chim Acta, 2015, 444: 132-136.
- [14] Momen-Heravi F, Bala S. Emerging role of non-coding RNA in oral cancer[J]. Cell Signal, 2017, 42: 134-143.
- [15] Chen L, Zhang S, Wu J, et al. CircRNA_100290 plays a role in oral cancer by functioning as a sponge of the miR-29 family[J]. Oncogene, 2017, 36(32): 4551-4561.
- [16] Xia W, Qiu M, Chen R, et al. Circular RNA has_circ_0067934 is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma and promoted proliferation[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35576.
- [17] Sun H, Tang W, Rong D, et al. Hsa_circ_0000520, a potential new circular RNA biomarker, is involved in gastric carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2017(1): 1-8.
- [18] Rong D, Sun H, Li Z, et al. An emerging function of circRNA-miRNAs-mRNA axis in human diseases[J]. Oncotarget, 2017, 8(42): 73271-73281.
- [19] Zhong Z, Huang M, Lv M, et al. Circular RNA MYLK as a competing endogenous RNA promotes bladder cancer progression through modulating VEGFA/VEGFR2 signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2017, 403: 305-317.
- [20] Li Y, Zheng F, Xiao X, et al. CircHIPK3 sponges miR-558 to suppress heparanase expression in bladder cancer cells[J]. EMBO Rep, 2017, 18(9): 1646-1659.
- [21] Zhong ZY, Lv MX, Chen JX. Screening differential circular RNA expression profiles reveals the regulatory role of circTCF25-miR-103a-3p/miR-107-CDK6 pathway in bladder carcinoma[J]. Sci Rep, 2016, 6: 30919.

(编辑 罗燕鸿,曾曙光)