

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2020.03.003

· 基础研究 ·

敲低 circ_0001273 抑制口腔鳞癌细胞增殖、迁移及侵袭的研究

曾藩韬¹, 余东升²

1. 广州医科大学附属第二医院口腔科, 广东 广州(510260); 2. 中山大学附属口腔医院·光华口腔医学院·广东省口腔医学重点实验室, 广东 广州(510055)

【摘要】 目的 探讨 circ_0001273 对口腔鳞癌细胞增殖、迁移及侵袭的作用, 为口腔鳞癌的靶向治疗研究提供相关的研究基础。方法 收集 12 例临床诊断为口腔鳞癌患者肿瘤标本及癌旁组织, qRT-PCR 检测 circ_0001273、circ_0018569 和 circ_0027152 的表达, 选取在癌及癌旁组织中表达差异最大的 circ_0001273; 在 UM1 及 CAL27 两种口腔鳞癌细胞株中使用 siRNA 敲低 circ_0001273, 以 MTS、Transwell 实验分别检测对 UM1 及 CAL27 细胞增殖、迁移及侵袭的影响。结果 circ_0001273 在 12 例口腔鳞癌组织中表达异常升高 ($P < 0.05$), 在 UM1 及 CAL27 细胞中敲低 circ_0001273 后, UM1 及 CAL27 细胞的增殖、迁移及侵袭能力均显著下降 ($P < 0.05$)。结论 敲低 circ_0001273 可以抑制口腔鳞癌的增殖、迁移及侵袭。

【关键词】 口腔鳞癌; 鳞状细胞; 癌; 环状 RNA; circ_0001273; 口腔鳞癌细胞株 UM1; 口腔鳞癌细胞株 CAL27; 增殖; 迁移; 侵袭

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2020)03-0153-05

【引用著录格式】 曾藩韬, 余东升. 敲低 circ_0001273 抑制口腔鳞癌细胞增殖、迁移及侵袭的研究[J]. 口腔疾病防治, 2020, 28(3): 153-157.



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

Knockdown of circ_0001273 inhibits the proliferation, migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells ZENG Fantao¹, YU Dongsheng².

1. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China; 2. Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China

Corresponding author: YU Dongsheng, Email: yudsh@mail.sysu.edu.cn, Tel: 86-13763362933

【Abstract】 Objective To explore the effect of circ_0001273 on the proliferation, migration and invasion of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and to provide a relevant research basis for the use of targeted therapy in OSCC.

Methods Data from twelve patients with a clinical diagnosis of OSCC were collected from tumor specimens and adjacent tissues. qRT-PCR was used to detect the expression levels of circ_0001273, circ_0018569, circ_0027152, and circ_0001273 which had the highest difference in expression in cancer and adjacent tissues was selected. siRNA was used for the knockdown of circ_0001273 in two types of OSCC cell lines, UM1 and CAL27, and the effects on the proliferation, migration, and invasion of UM1 and CAL27 cells were measured by MTS and Transwell experiments, respectively. **Results** The expression of circ_0001273 was abnormally increased in the 12 OSCC tissues ($P < 0.05$). After knocking down circ_0001273 in UM1 and CAL27 cells, the proliferation, migration and invasion abilities of UM1 and CAL27 cells were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** The knockdown of circ_0001273 can inhibit the proliferation, migration and invasion of OSCC cells.

【Key words】 oral squamous cell carcinoma cells; squamous cell; carcinoma; circRNA; circ_0001273; OSCC cell lines UM1; OSCC cell lines CAL27; proliferation; migration; invasion

J Prev Treat Stomatol Dis, 2020, 28(3): 153-157.

【收稿日期】 2019-09-10; **【修回日期】** 2019-11-07

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81472526)

【作者简介】 曾藩韬, 主治医师, 硕士研究生在读, Email: guangzhou0729@163.com

【通信作者】 余东升, 主任医师, 博士, Email: yudsh@mail.sysu.edu.cn, Tel: 86-13763362933

近年来口腔鳞癌及其他恶性肿瘤相关研究有了一定进展,但是口腔鳞癌患者的预后没有明显的改善,口腔鳞癌的5年生存率在过去30年中仍保持在55%~60%左右^[1]。因此进一步探索口腔鳞癌的发生发展机制以及潜在分子靶点在口腔鳞癌研究中十分重要。环状RNA(circular RNA, circRNA)是一种以共价配对形成的环状非编码RNA分子,其不具有游离5'端帽子和3'端poly尾巴,前体RNA可变剪接后直接成环,且不被核酸外切酶RNase R降解^[2]。环状RNA也被发现与多种人类疾病有关,例如癌症和自身免疫性疾病等,这提示环状RNA可能成为新的肿瘤分子标志物或治疗靶点。在口腔鳞癌中,Chen等^[3]发现circ_100290在口腔鳞癌中异常高表达,其可以海绵性吸附miR-29家族成员来调节相关基因表达水平,并最终影响了口腔鳞癌细胞在体内及体外的增殖能力。但口腔鳞癌中circ_0001273的功能尚未见报道。本研究探讨circ_0001273对口腔鳞癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,为口腔鳞癌发生发展机制的研究提供了新的研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和仪器

口腔鳞癌及癌旁组织来源中山大学附属口腔医院2018年收集病例;本研究获得中山大学附属口腔医院伦理委员会批准。口腔鳞癌UM1和CAL27细胞株(ScienCell,美国);circ_0001273 siRNA由上海吉玛生物设计并合成;Trizol Universal(天根生化,中国);cell Titer 96AQ单溶液细胞增殖检测试剂(Promega,美国);Transwell细胞培养板及Matrigel胶(BD,美国);酶标仪(Thermo Fisher Scientific,美国);ABI7500荧光PCR仪(ABI,美国)。

1.2 细胞培养

口腔鳞癌UM1细胞株在含10%胎牛血清的DMEM-F12培养基(含100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素)中培养;口腔鳞癌CAL27细胞株在含10%胎牛血清的DMEM-H培养基(含100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素)中培养。置于37℃、5%CO₂和95%相对湿度的细胞培养箱中进行培养。每48 h换液传代1次,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 细胞转染

转染前一天将细胞传代,使其融合度为40%左右。吸去完全培养基,用PBS洗两遍后每孔加入1 mL 20%胎牛血清的DMEM高糖培养基。用无

RNA酶的去离子水溶解siRNA使其浓度用20 μM,再将其溶于500 μL opti-MEM培养基中。另取5 μL LipofectaminRNAiMAX混匀于500 μL opti-MEM培养基中。将两份液体混匀后静置20 min即可分别加入各细胞培养孔中。将24孔细胞培养板放入细胞培养箱4~6 h后,即可换为正常培养基。

1.4 qRT-PCR

提取总RNA,在无RNA酶的PCR管中加入1 μg总RNA及11 μL纯水,混匀后至于85℃保温5 min,使RNA变性,随后立即置于冰上,以防RNA复性,随后在此PCR管中加入0.5 μL Oligo(dT)、0.5 μL Random primer、2 μL 10 mM dNTP、RNase inhibitor、5×buffer及M-MLV,混匀后置于30℃保温10 min,置于42℃60 min,置于85℃10 min。逆转录完成后,在PCR仪上设置反应条件为50℃2 min、95℃2 min、95℃15 s、60℃32 s、40个循环,并于60℃~95℃分析溶解曲线。引物序列如表1所示。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

circRNA	Sequence(5'→3')
hsa_circ_0001273-F	CCACCTCCAATGACAGACTT
hsa_circ_0001273-R	CACACCTTAGCTGCTGACAC
hsa_circ_0018569-F	TCAAGGACGCACTATCATCT
hsa_circ_0018569-R	CCGCTGTAAACATGATGGAA
hsa_circ_0027152-F	CTGCGACGGGGACAATGACTG
hsa_circ_0027152-R	GGCCCATCGTCCCTCCAGTAC
18srRNA-F	CCTGGATACCGCAGCTAGGA
18srRNA-R	GCGGCGCAATACGAATGCCCC

1.5 细胞增殖

消化细胞后将细胞吹打散开,细胞计数,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL,96孔板中每孔100 μL即 1×10^4 个细胞。待细胞贴壁后,收集0、12、24、48 h 4个时间点的细胞,加入MTS试剂,每100 μL培养基加入10 μL检测试剂。孵育4 h后,使用酶标仪读板,读取OD490数据。

1.6 细胞迁移

细胞计数 1×10^5 个细胞,使用100 μL无血清培养基重悬,加入Transwell小室的上室,并在下室加入600 μL完全培养基。置于37℃、5%CO₂细胞培养箱孵育48 h后,取出小室,用棉签擦去上室的细胞,用4%多聚甲醛固定15 min后PBS缓冲液洗1次,结晶紫染色10 min后PBS缓冲液洗1次,拍照统计细胞穿过小孔的数量。

1.7 细胞侵袭

4 ℃溶解 Matrigel 胶过夜,后预冷的无血清培养基以 1:3 体积比稀释 Matrigel 胶,取 40 μL 加入预冷的 Transwell 小室中,37 ℃孵育 2 h,使 Matrigel 胶凝固。吸走 Transwell 小室中多余的液体,在上室加入 100 μL 无血清培养基,在下室加入 600 μL 无血清培养基,37 ℃过夜。每组细胞计数 1×10^5 个细胞,使用 100 μL 无血清培养基重悬,加入 Transwell 小室的上室,并在下室加入 600 μL 完全培养基。置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱孵育 48 h 后,取出小室,用棉签擦去上室的细胞,用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后 PBS 缓冲液洗 1 次,结晶紫染色 10 min 后 PBS 缓冲液洗 1 次,拍照统计细胞穿过小

孔的数量。

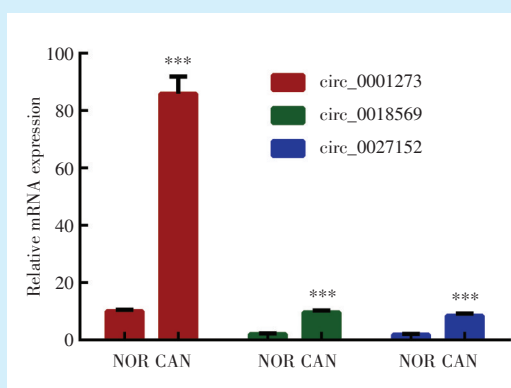
1.8 统计学统计

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间对比采用独立 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 12 例组织中检测 3 种 circRNA 表达水平结果

在 12 例口腔鳞癌及癌旁组织中,相对于癌旁组织, circ_0001273 (*t* = 9.054)、circ_0018569 (*t* = 5.306)、circ_0027152 (*t* = 7.232) 3 种 circRNA 在口腔鳞癌组织中均显著高表达 (*P* < 0.05),其中 circ_0001273 差异最为显著,平均差异为 8.5 倍(图 1)。



***: *P* < 0.001. NOR: adjacent tissues; CAN: cancer tissues

Figure 1 Relative expression of circ_0001273, circ_0018569, circ_0027152 in 12 oral squamous cell carcinoma and adjacent tissues

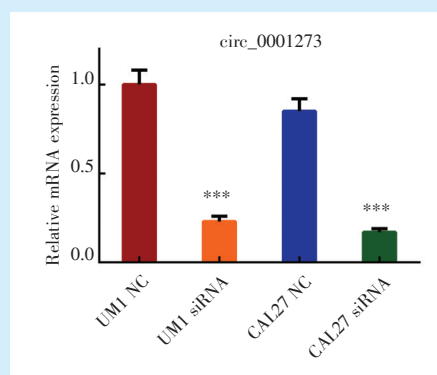
图 1 12 例口腔鳞癌及癌旁组织中 circ_0001273, circ_0018569, circ_0027152 的相对表达

2.2 敲低 circ_0001273 后口腔鳞癌细胞株中 circ_0001273 的表达水平

UM1 及 CAL27 细胞株中分别转染 siRNA NC 及 siRNA 后, circ_0001273 表达水平如图 2 所示。和转染 siRNA NC 的细胞组相比,转染 siRNA 的 UM1 (*t* = 50.408) 及 CAL27 (*t* = 23.556) 中 circ_0001273 表达均明显降低 (*P* < 0.05), circ_0001273 siRNA 敲低对 UM1 细胞株中 circ_0001273 表达的抑制率为 73%,对 CAL27 细胞株的抑制率为 80%。

2.3 敲低 circ_0001273 对口腔鳞癌细胞株增殖功能的影响

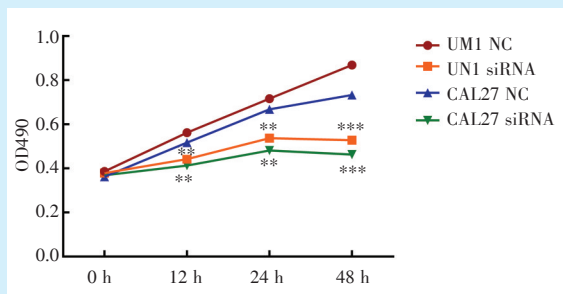
UM1 及 CAL27 细胞株中分别转染 siRNA NC 及 siRNA 后,各组细胞增殖能力如图 3 所示。和转染 siRNA NC 的细胞组相比,转染 siRNA 的细胞组 UM1 (*t* = 14.735) 及 CAL27 (*t* = 23.383) 增殖能力显著降低 (*P* < 0.05)。



***: *P* < 0.001

Figure 2 Relative expression of circ_0001273 in 4 groups of oral squamous cell carcinoma cells after knockdown of circ_0001273

图 2 敲低 circ_0001273 后 4 组口腔鳞癌细胞中 circ_0001273 的相对表达



** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$

Figure 3 Effect of circ_0001273 siRNA on the proliferation of UM1 and CAL27 cells

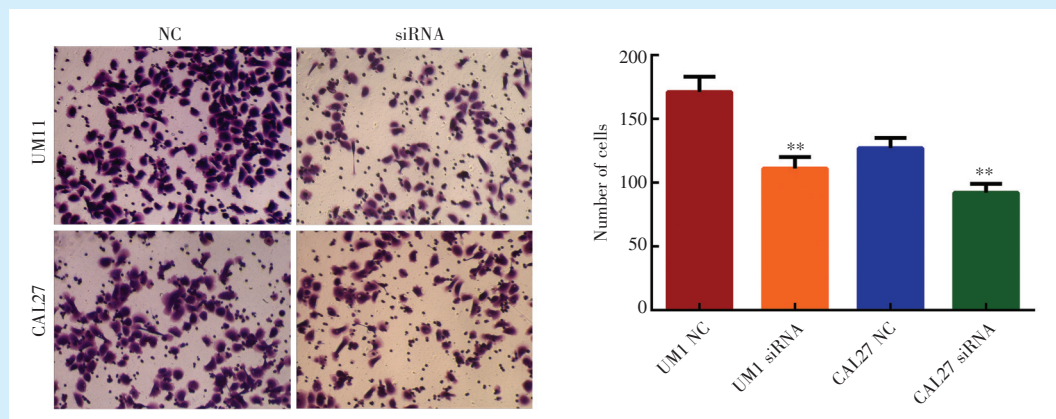
图3 circ_0001273 siRNA对UM1及CAL27细胞增殖能力的影响

2.4 敲低 circ_0001273 对口腔鳞癌细胞株迁移功能的影响

UM1及CAL27细胞株中分别转染 siRNA NC及 siRNA后,各组细胞迁移水平如图4所示。和转染 siRNA NC的细胞组相比,转染 siRNA的细胞组 UM1 ($t = 34.641$)及 CAL27 细胞株 ($t = 60.622$)细胞迁移能力表达均显著降低 ($P < 0.05$)。

2.5 敲低 circ_0001273 对口腔鳞癌细胞株侵袭功能的影响

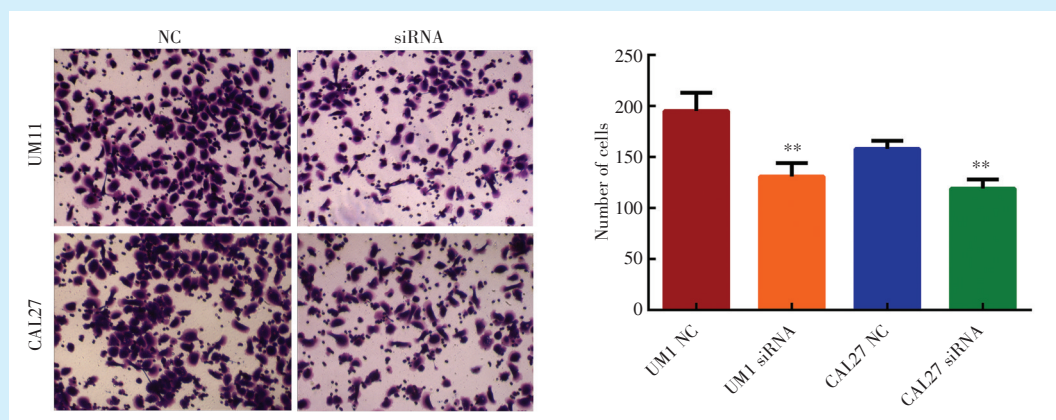
UM1及CAL27细胞株中分别转染 siRNA NC及 siRNA,各组细胞侵袭水平如图5所示。和转染 siRNA NC的细胞组相比,转染 siRNA的细胞组 UM1 ($t = 22.17$)及 CAL27 ($t = 33.005$)细胞侵袭能力均显著降低 ($P < 0.05$)。



** : $P < 0.01$. Magnification: $\times 100$

Figure 4 Effect of circ_0001273 siRNA on the migration ability of UM1 and CAL27 cells

图4 circ_0001273 siRNA对UM1及CAL27细胞株迁移能力的影响



** : $P < 0.01$. Magnification: $\times 100$

Figure 5 Effect of circ_0001273 siRNA on the invasion ability of UM1 and CAL27 cells

图5 circ_0001273 siRNA对UM1及CAL27细胞侵袭能力的影响

3 讨 论

circRNA 早期被认为是一类基因剪切副产物而没有实际作用,如今被发现与多种人类疾病相关,如骨关节炎^[4]、自身免疫疾病^[5]及动脉粥样硬化^[6]等。研究表明 circRNA 可以海绵式吸附 miRNAs,以此阻止 miRNA 对 mRNA 的抑制效果^[7],并且 circRNA 能够作为肿瘤的生物标志物^[8]。circRNA 成为了近几年肿瘤研究中的热门研究对象,在胃癌^[9]、骨肉瘤^[10]、肺腺癌^[11]、肝癌^[12]、食管鳞癌^[13]及三阴性乳腺癌^[14]中,均有相关 circRNA 在肿瘤的发生发展中发挥了重要作用。而在口腔鳞癌中,有研究用 TNF- α 诱导口腔鳞癌细胞株 CAL27 构建凋亡模型,通过生物信息学预测并在细胞模型上验证,发现 circDOCK1 可以靶向结合 miR-196a-5p,间接调控了 miR-196a-5p 的靶基因 BIRC3,从而抑制了口腔鳞癌细胞凋亡^[15]。结合 circ_0001273 在口腔鳞癌中高表达的情况,circ_0001273 可能的作用机制是与促癌基因竞争结合 miRNA,海绵式吸附 miRNA 导致促癌基因的活化,从而参与了口腔鳞癌的发生。

目前 circRNA 在口腔鳞癌的相关研究仍然较少,因此继续探索口腔鳞癌相关 circRNA 的研究十分重要。本研究在 12 例口腔鳞癌及癌旁组织中通过 qRT-PCR 检测了 circ_0001273、circ_0018569、circ_0027152 三个 circRNA,并选取了差异最大的 circ_0001273 来进行后续研究,实际上另两个 circRNA 也在口腔鳞癌中异常高表达($P < 0.05$),也是值得进一步研究的。研究中发现 circ_0001273 的高表达,提示 circ_0001273 可能是口腔鳞癌的生物标志分子,进一步研究需要加大样本量,并可以在患者外周血中进行检测,以验证其作为口腔鳞癌生物标志物的潜力。敲低 circ_0001273 可以使口腔鳞癌细胞株 UM1 及 CAL27 的增殖、迁移及侵袭能力显著下降($P < 0.05$),这提示 circ_0001273 可能参与了促进口腔鳞癌肿瘤的生长及转移,然而 circ_0001273 对口腔鳞癌细胞具体的调控机制仍需要进一步研究。

敲低 circ_0001273 可以抑制口腔鳞癌细胞株中的增殖、迁移及侵袭,表明其在口腔鳞癌的发生发展中可能发挥重要的作用,circ_0001273 可能成为新的口腔鳞癌治疗靶点。

参考文献

[1] Rhodus NL, Kerr AR, Patel K. Oral cancer: leukoplakia, premalignancy, and squamous cell carcinoma[J]. Dent Clin North Am,

- 2014, 58(2): 315-340.
- [2] Salzman J, Gawad C, Wang PL, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30733.
- [3] 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.
- [4] Wu Y, Zhang Y, Zhang Y, et al. CircRNA hsa_circ_0005105 up-regulates NAMPT expression and promotes chondrocyte extracellular matrix degradation by sponging miR-26a[J]. Cell Biol Int, 2017, 41(12): 1283-1289.
- [5] Cardamone G, Parabschi EM, Rimoldi V, et al. The characterization of GSDMB splicing and back splicing profiles identifies novel isoforms and a circular RNA that are dysregulated in multiple sclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): e576.
- [6] Burd CE, Jeck WR, Liu Y, et al. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk[J]. PLoS Genet, 2010, 6(12): e1001233.
- [7] Momen-Heravi F, Bala S. Emerging role of non-coding RNA in oral cancer[J]. Cell Signal, 2018, 42: 134-143.
- [8] 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.
- [9] Li C, Li M, Xue Y. Downregulation of circRNA CDR1 as specifically triggered low-dose diosbulbin-B induced gastric cancer cell death by regulating miR-7-5p/REG γ axis[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109462.
- [10] Li B, Li X. Overexpression of hsa_circ_0007534 predicts unfavorable prognosis for osteosarcoma and regulates cell growth and apoptosis by affecting AKT/GSK-3 β signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 860-866.
- [11] Yao Y, Hua Q, Zhou Y. CircRNA has_circ_0006427 suppresses the progression of lung adenocarcinoma by regulating miR-6783-3p/DKK1 axis and inactivating Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(1): 37-45.
- [12] Xie B, Zhao Z, Liu Q, et al. CircRNA has_circ_0078710 acts as the sponge of microRNA-31 involved in hepatocellular carcinoma progression[J]. Gene, 2019, 683: 253-261.
- [13] Cao S, Chen G, Yan L, et al. Contribution of dysregulated circRNA_100876 to proliferation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 7385-7394.
- [14] Wang S, Li Q, Wang Y, et al. Upregulation of circ-UBAP2 predicts poor prognosis and promotes triple-negative breast cancer progression through the miR-661/MTA1 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 505(4): 996-1002.
- [15] Wang L, Wei Y, Yan Y, et al. CircDOCK1 suppresses cell apoptosis via inhibition of miR-196a-5p by targeting BIRC3 in OSCC[J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 951-966.

(编辑 张琳,张兆强)



官网



公众号