

网络出版时间:2024-03-21 17:25:47 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.006

环状 RNA_PLEKHM3 通过 miR-320/KLF4 轴 调控宫颈癌细胞上皮间质转化

张亚男,崔莹,王天娇,杜忠蕾

摘要 **目的** 探讨环状 RNA 含普列克底物蛋白同源域家族 M3 成员 (PLEKHM3) (circRNA_PLEKHM3) 通过调控微小 RNA-320 (miR-320)/畸变样因子 4 (KLF4) 轴在宫颈癌细胞上皮间质转化 (EMT) 行为中的作用与机制。**方法** 采用实时定量 PCR (qRT-PCR) 法检测宫颈癌细胞 HeLa 和 CaSki 中 circRNA_PLEKHM3 的表达水平; RNA 荧光原位杂交检测 circRNA_PLEKHM3 在人宫颈癌上皮细胞 CaSki 中的定位; 双荧光素酶报告基因实验检测 circRNA_PLEKHM3 和 miR-320 的靶向关系, 以及 miR-320 和 KLF4 的靶向关系; 对 CaSki 细胞过表达 circRNA_PLEKHM3; 另外设置三组, 分别为在过表达 circRNA_PLEKHM3 的基础上过表达 miR-320、沉默 KLF4, 以及在过表达 miR-320 的基础上沉默 KLF4。qRT-PCR 检测 CaSki 中 miR-320 的表达水平; Western blot 检测 CaSki 细胞中 KLF4 和 EMT 标志物上皮钙黏蛋白 (E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、基质金属蛋白酶 (MMP)-2 和 MMP-9 的表达; Transwell 实验检测细胞迁移数和侵袭细胞数。**结果** circRNA_PLEKHM3 在 HeLa 和 CaSki 中的表达均降低 ($P < 0.05$), 其主要定位在细胞质中; 双荧光素酶报告基因实验显示 miR-320 和 circRNA_PLEKHM3 存在靶向关系, KLF4 和 miR-320 存在靶向关系; 过表达 circRNA_PLEKHM3 抑制 miR-320 和 N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 的蛋白表达, 上调 E-cadherin 的蛋白表达, 减少细胞迁移和侵袭数 ($P < 0.05$); 在过表达 circRNA_PLEKHM3 的基础上过表达 miR-320 或沉默 KLF4 均能够促进 miR-320 和 N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达, 上调 E-cadherin 蛋白的表达, 减少迁移和侵袭细胞数 ($P < 0.05$); 然而在过表达 miR-320 的基础上沉默 KLF4, KLF4 和 N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 蛋白的表达受到抑制, E-cadherin 蛋白的表达上调, 细胞迁移和侵袭数减少 ($P < 0.05$)。**结论** circRNA_PLEKHM3 过表达可能通过 miR-320/KLF4 轴调控宫颈癌细胞的 EMT。

关键词 circRNA_PLEKHM3; miRNA-320; 畸变样因子 4; 宫

颈癌细胞; 上皮间质转化; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0403-10
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.006

宫颈癌转移的分子机制十分复杂, 其中包括多种与转移相关基因的突变和细胞的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[1], 阐明宫颈癌细胞 EMT 的内在分子机制对宫颈癌的治疗具有重要价值。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一种具有共价闭环的非编码 RNA, 不受 RNA 外切酶的影响, 因此 circRNA 的表达稳定, 不易被降解^[2]。研究^[3]表明, circRNA 在宫颈细胞中可能扮演肿瘤激活因子或抑制因子。circRNA 的主要机制是通过作为一种分子海绵来调控微小 RNA (microRNA, miRNA) 的表达和功能, 其作为一种分子支架调控 miRNA 与靶蛋白相互作用, 从而发挥其生物学效应^[4]。研究^[5]表明 circRNA-含 Pleckstrin 同源结构域家族 M 成员 3 (Pleckstrin homology domain-containing family M member 3, PLEKHM3) 具有抑制癌症的潜力, 可以扮演抑癌基因的角色, 如 circRNA_PLEKHM3 过表达可以起到增强姜黄素对卵巢癌细胞的抗凋亡作用以及对卵巢癌细胞恶性行为的抑制作用。但 circRNA_PLEKHM3 在宫颈癌中的作用尚不清楚。该研究旨在从细胞水平阐明 circRNA_PLEKHM3 在宫颈癌 EMT 中的作用机制, 为宫颈癌的诊断和治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器 circRNA_PLEKHM3 过表达载体 (pcDNA3.1-circRNA_PLEKHM3, circRNA_PLEKHM3) (货号: C01001)、空载体 Vector (货号: C01001)、miR-320 的模拟物 (miR-320 mimics) (货号: C09001)、miR-320 的模拟物的阴性对照 (mimics NC) (货号: C09001)、miR-320 的抑制剂 (miR-320 inhibitor) (货号: C09004)、miR-320 的抑制剂的阴性对照 (inhibitor NC) (货号: C09004), 小干扰 RNA

2024-01-27 接收

基金项目: 黑龙江省卫生健康委科研项目 (编号: 2020-408)

作者单位: 牡丹江医学院附属红旗医院妇产科妇科病区, 牡丹江 157000

作者简介: 张亚男, 女, 主治医师;

杜忠蕾, 女, 副主任医师, 责任作者, E-mail: 492302621@qq.com

(siRNA) 沉默畸变样因子 4 (kruppel-like factor 4, KLF4) 的重组质粒 (si-KLF4) (货号: G04003)、si-KLF4 的阴性对照 (si-NC) (货号: G04003)、含 circRNA_PLEKHM3 野生型 (circRNA_PLEKHM3-WT) 或突变型 (circRNA_PLEKHM3-MUT) 结合位点 DNA 片段的重组质粒 (货号: G05002)、含有 KLF4 3' UTR 野生型 (KLF4 3' UTR WT) 或突变型 (KLF4 3' UTR MUT) 结合位点的 DNA 片段的重组质粒 (货号: G05002) (上海吉玛公司)。双荧光素酶试剂盒 (美国 promega 公司, 货号: E1910)。人宫颈鳞状细胞系 Hela (货号: Delf-10469) 和人宫颈癌上皮细胞系 CaSki (货号: Delf-10473) (美国 ATCC 公司), 人体正常上皮细胞系 HaCat (苏州北纳创联生物技术有限公司, 货号: T25)。KLF4 激活剂 APTO-253 (美国 MCE 公司, 货号: HY-16291)。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (货号: A5669701)、杜氏改良培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养基 (货号: 12491015) (美国 Gibco 公司)。兔抗 KLF4 (货号: ab222235)、上皮钙黏蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin) (货号: ab40772)、神经钙黏蛋白 (neural cadherin, N-cadherin) (货号: ab245117)、波形蛋白 (Vimentin) (货号: ab92547)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2 (货号: ab92536)、MMP-9 (货号: ab76003)、磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (货号: ab181603) 的一抗及辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 偶联的山羊抗兔 IgG 二抗 (货号: ab205718) (英国 Abcam 公司)。生理盐水 (saline) (货号: ST341)、结晶紫染色液 (货号: C0121)、Lipofectamine[®] 3000 转染试剂盒 (货号: C0526FT)、BCA 蛋白检测试剂盒 (货号: P0009)、RIPA 裂解缓冲液 (货号: P0013B)、免疫荧光原位杂交试剂盒 (货号: R0306S)、FITC 标记的 circRNA_PLEKHM3 探针设计与合成 (货号: R0306S) (上海碧云天生物技术有限公司)。异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的抗小鼠二抗 (货号: ZF-0312)、FITC 标记的抗兔二抗 (货号: ZB-2301) (北京中杉金桥生物技术公司)。Transwell 小室 (美国 SigmaAldrich 公司, 货号: 32011202)。二脒基苯基吲哚 (diaminidine phenyl indole, DAPI) (北京 Solaribo 公司, 货号: 28718-90-3)。pMIR-GLO 荧光素酶载体 (德国 Promega 公司, 货号: E1330)。荧光显微镜 (德国蔡司公司, 型号: Axio Imager A2); 实时荧光定量 PCR 仪 (型号: CFX96)、Western blot 成像分

析仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: CFX96); (美国伯乐公司, 型号: ChemiDoc)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养分组和转染 Hela、CaSki、HaCat 细胞分别用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基培养, 并置于 37 °C、含有 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。CaSki 细胞的分组和转染: 分别将 circRNA_PLEKHM3 过表达载体 pcDNA3.1-circRNA_PLEKHM3 (circRNA_PLEKHM3 组)、空载体 Vector (Vector 组) 转染至 CaSki 细胞, 24 h 后通过 qRT-PCR 检测 CaSki 细胞 PLEKHM3 mRNA 表达以检测细胞过表达 circRNA_PLEKHM3 的效果; 分别将 mimics NC (mimics NC 组)、miR-320 mimics (miR-320 mimics 组) 以及 inhibitor NC (inhibitor NC 组) 和 miR-320 inhibitor (miR-320 inhibitor 组) 转染至 CaSki 细胞, 24 h 后通过 qRT-PCR 法检测 miR-320 表达; 此外, 在转染 circRNA_PLEKHM3 的同时分别将 mimics NC (circRNA_PLEKHM3 + mimics NC 组) 和 miR-320 mimics (circRNA_PLEKHM3 + miR-320 mimics 组) 转染至 CaSki 细胞, 孵育 24 h。在转染 circRNA_PLEKHM3 的同时分别将 si-NC (circRNA_PLEKHM3 + si-NC 组) 和 si-KLF4 (circRNA_PLEKHM3 + si-KLF4 组) 转染至 CaSki 细胞, 孵育 24 h。在转染 miR-320 mimics 的同时分别加入 saline (mimics + saline 组) 和 APTO-253 (miR-320 mimics + APTO-253 组) 处理 CaSki 细胞, 孵育 24 h。

1.2.2 原位荧光杂交技术 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 染色实验检测 circRNA_PLEKHM3 在 Hela、HaCat 和 CaSki 细胞中的分布 将正常培养且无处理的 Hela、HaCat 和 CaSki 细胞固定在 4% 多聚甲醛中, 与含有 circRNA_PLEKHM3 探针的杂交缓冲液在 37 °C 暗处杂交过夜。用 DAPI 染细胞核。用荧光显微镜获取图像。

1.2.3 qRT-PCR 检测 circRNA_PLEKHM3、KLF4 mRNA 和 miR-320 的表达 收集 HaCat、Hela 和 CaSki 细胞的总 RNA, 逆转录为 cDNA, 行 PCR 扩增。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 circRNA_PLEKHM3、miR-320、KLF4 mRNA 的相对表达量。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 1。

1.2.4 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-320 和 circRNA_PLEKHM3 以及 miR-320 和 KLF4 的靶向关系 通过三个生物信息公共数据库, starbase (starbase.sysu.edu.cn/)、target scan (targetscan.org/

表1 PCR引物列表

基因名称	序列
<i>circRNA_PLEKHM3</i>	正向:5'-AGCTCCGACCGGATTTAGC-3' 反向:5'-TTCATCTCAACTGGGCACG-3'
<i>KLF4</i>	正向:5'-CTACCGATATTTAGGATC-3' 反向:5'-AGTTTAACTGAAGCAGCTTCC-3'
<i>miR-320</i>	正向:5'-TCAATCCGGGACGTGGACTT-3' 反向:5'-CAGGTCCACGGTTCGCCATTG-3'
<i>GAPDH</i>	正向:5'-TTCCGACAGGATGCAGA-3' 反向:5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'
<i>U6</i>	正向:5'-TCACTCCACGGTCTGACTT-3' 反向:5'-GCAGATCCTCACCGATTACGG-3'

vert_70/)和 circBase (<http://www.circbase.org/>) 筛选出与 *circRNA_PLEKHM3* 有可能有相互作用的 miRNA; 同时在癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) (<portal.gdc.cancer.gov>) 和 ENCORI pan-cancer (<https://rnasysu.com/encori/panCancer.php>) 数据库中选择在宫颈癌表达前 100 的 miRNA, 取 miRNA 的交集, 筛选出 *circRNA_PLEKHM3* 可能的下游靶标是 *miR-320*。

为检测 *miR-320* 和 *circRNA_PLEKHM3* 的靶向调控作用, 本研究合成了含有 *circRNA_PLEKHM3* 野生型 (*circRNA_PLEKHM3-WT*) 或突变型 (*circRNA_PLEKHM3-MUT*) 结合位点的 DNA 片段, 并将其克隆到 pMIR-GLO 荧光素酶载体。分离重组质粒并测序。分别将 mimics NC、miR-320 mimics、inhibitor NC、miR-320 inhibitor 按照 Lipofectamine® 3000 转染试剂盒的说明书使用 Lipofectamine® 3000 与 *circRNA_PLEKHM3-WT/circRNA_PLEKHM3-MUT* 片段共转染 CaSki 细胞。转染 4 h 后, 更换培养基, 将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 废弃培养基, PBS 洗涤细胞 3 次。用双荧光素酶试剂盒检测各组的荧光素酶活性。以萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值作为荧光素酶活性。另外, 本研究还合成含有 KLF4 3' UTR 野生型 (KLF4 3' UTR WT) 和突变型 (KLF4 3' UTR MUT) 结合位点的 DNA 片段, 并将其克隆到 pMIR-GLO 荧光素酶载体。分离重组质粒并测序。分别将 mimics NC、miR-320 mimics、inhibitor NC、miR-320 inhibitor 按照 Lipofectamine® 3000 转染试剂盒的说明书与 KLF4 3' UTR WT/KLF4 3' UTR MUT 片段共转染 CaSki 细胞, 以检测 *miR-320* 和 *KLF4* 的结合作用, 其余方法与 *circRNA_PLEKHM3* 一致。

1.2.5 Western blot 实验 用 RIPA 裂解缓冲液从各组细胞中提取总蛋白质, 采用 BCA 蛋白检测试剂

盒检测总蛋白浓度。SDS-PAGE 分离蛋白: 70 V、30 min 转 120 V、90 min, 将蛋白条带以 300 mA 转移到 PVDF 膜上。室温下 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 将膜与一抗在 4 °C 下孵育过夜: KLF4 (1 : 800)、E-cadherin (1 : 1 000)、N-cadherin (1 : 600)、Vimentin (1 : 1 000)、MMP-2 (1 : 1 000)、MMP-9 (1 : 500)、GAPDH (1 : 3 000), 随后将膜与 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG (1 : 2 000) 于室温下一起孵育 1 h。用 ECL 检测试剂显示蛋白条带, 并采用 ImageJ 软件分析每个条带的灰度值。

1.2.6 Transwell 侵袭和迁移实验 在细胞侵袭实验中预先在上室膜 (膜的孔径为 8 μm) 上涂基质胶, 将各组的细胞 (5×10^4 个/组) 悬浮在无血清培养基的 Transwell 上室中, 下室充满 20% 含 FBS 的培养基, 37 °C 下孵育 48 h 后, 将上表面的剩余细胞去除, 固定膜下表面上的细胞, 然后用结晶紫染色, 并在光学显微镜下计数, 从而测定细胞侵袭情况。在细胞迁移实验中, 上室膜不涂基质胶, 其余步骤与细胞侵袭实验一致。

1.3 统计学处理 本研究的数据均采用 GraphPad PRISM 5.01 进行数据录入和统计学分析, 正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两组间的数据的比较采用 *t* 检验; 单因素方差分析 (ANOVA) 评估多组之间的差异, 并利用 LSD-*t* 检验进行两两比较; 检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circRNA_PLEKHM3 在宫颈癌细胞中的定位和表达 经 FISH 染色观察到 *circRNA_PLEKHM3* 和细胞核分别为绿色和蓝色, *circRNA_PLEKHM3* 定位于 CaSki 细胞的细胞质内 (图 1A)。qRT-PCR 检测结果显示, 与 HaCat 细胞相比, *circRNA_PLEKHM3* 在 HeLa 细胞和 CaSki 细胞中的表达均降低, 差异有统计学意义 ($t = 16.254, 21.842$, 均 $P < 0.05$) (图 1B)。

2.2 CaSki 细胞中 circRNA_PLEKHM3 对 miR-320 和 KLF4 表达的影响以及 circRNA_PLEKHM3 对 miR-320 的靶向调控 qRT-PCR 检测显示, 与 HaCat 细胞相比, 在 CaSki 细胞中 *miR-320* 的 mRNA 表达上调 ($t = 118.589$, $P < 0.05$), 而 *KLF4* 中的 mRNA 表达下调 ($t = 35.549$, $P < 0.05$)。见图 2A-B。CaSki 细胞转染过表达 *circRNA_PLEKHM3* 的载体, 与 Vector 组比, *circRNA_PLEKHM3* 组的 *circRNA_PLEKHM3* 上调 ($t = 141.362$, $P < 0.05$), *miR-*

320 的表达下调 ($t = 23.514, P < 0.05$), KLF4 蛋白表达上调 ($t = 37.498, P < 0.05$)。见图 2C-D。提示在 CaSki 细胞中过表达 *circRNA_PLEKHM3* 可以抑制 miR-320 的表达,促进 KLF4 蛋白的表达。双荧光素酶报告基因实验结果显示,在 *circRNA_PLEKHM3*-WT 转染的 CaSki 细胞中,与 mimics NC 组比,miR-320 mimics 组的荧光素酶活性下降 ($t = 16.558, P < 0.05$),与 inhibitor NC 组比,inhibitor 组的荧光素酶活性上调 ($t = 21.577, P < 0.05$)。而在 *circRNA_PLEKHM3*-MUT 转染的 CaSki 细胞中,各组之间荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2E。提示 *miR-320* 是 *circRNA_PLEKHM3* 的靶点,*circRNA_PLEKHM3* 可通过靶向调控 *miR-320* 抑制 miR-320 的表达。

2.3 miR-320 靶向调控 KLF4 并抑制 KLF4 的表达 用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-320 是否靶向调控 KLF4。结果显示,在 KLF4 3' UTR-WT 转染的 CaSki 细胞中,与 mimics NC 组比,miR-320 mimics 组荧光素酶活性下降 ($t = 23.063, P < 0.05$),与 inhibitor NC 组比,inhibitor 组的荧光素酶活性上调 ($t = 17.364, P < 0.05$)。而在 KLF4 3' UTR-MUT 转染的 CaSki 细胞中,各组荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3A。说明 *miR-320* 能够靶向调控 *KLF4*。此外,qRCT 和 Western blot 检测结果显示,与 mimics NC 组比,miR-320 mimics 组的 miR-320 的 mRNA 表达上调 ($t = 18.639, P < 0.05$),KLF4 的 mRNA 和蛋白表达下降 ($t = 16.603、21.558, 均 P < 0.05$);与 inhibitor NC 组比,miR-320 inhibitor 组的 miR-320 的 mRNA 表达

下调 ($t = 14.557, P < 0.05$),KLF4 的 mRNA 和蛋白表达升高 ($t = 21.512、17.611, 均 P < 0.05$)。见图 3B-D。提示 CaSki 细胞中 *miR-320* 能够通过靶向调控 *KLF4* 并抑制 KLF4 的表达。

2.4 过表达 circRNA_PLEKHM3 抑制宫颈癌细胞的迁移、侵袭和 EMT Transwell 细胞迁移和细胞侵袭实验结果显示,与 Vector 组比较,*circRNA_PLEKHM3* 组迁移细胞数和侵袭细胞数均下降 ($t = 16.554、18.204, 均 P < 0.05$)。见图 4A-C。提示过表达 *circRNA_PLEKHM3* 抑制宫颈癌细胞的迁移和侵袭。Western blot 法检测 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 的表达,结果显示,与 Vector 组比较,*circRNA_PLEKHM3* 组的 E-cadherin 的表达增加 ($t = 20.714, P < 0.05$),N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 的表达均降低 ($t = 15.603、24.880、18.562、14.069, 均 P < 0.05$)。见图 4C-H。以上结果提示过表达 *circRNA_PLEKHM3* 抑制宫颈癌细胞的 EMT。

2.5 过表达 circRNA_PLEKHM3 通过抑制 miR-320 抑制宫颈癌细胞的迁移、侵袭、EMT Transwell 细胞迁移和细胞侵袭实验结果显示,与 *circRNA_PLEKHM3* + mimics NC 组比较,*circRNA_PLEKHM3* + miR-320 mimics 组的迁移细胞数和侵袭细胞数均上调 ($t = 18.602、15.266, 均 P < 0.05$)。见图 5A-C。提示过表达 *circRNA_PLEKHM3* 通过抑制 miR-320 抑制宫颈癌细胞的迁移和侵袭。Western blot 法检测 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 的表达,结果显示,与 *circRNA_PLEKHM3* + mimics NC 组比较,*circRNA_PLEKHM3* +

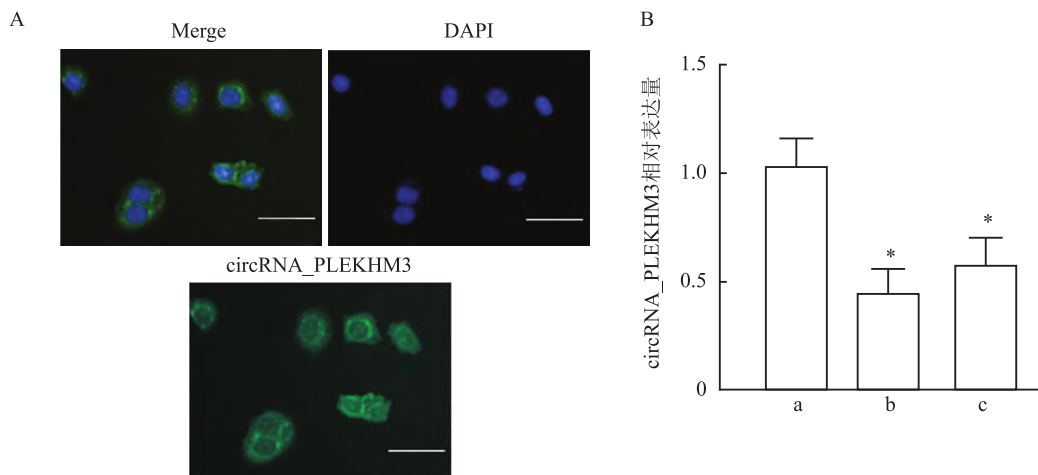


图1 *circRNA_PLEKHM3* 在 HaCat、CaSki 和 HeLa 细胞中表达的比较

A: FISH 实验检测 *circRNA_PLEKHM3* 在 CaSki 细胞中的定位 $\times 200$; B: qRT-PCR 法检测 *circRNA_PLEKHM3* 在细胞中的相对表达; a: HaCat 细胞; b: HeLa 细胞; c: CaSki 细胞; 与 HaCat 细胞比较: * $P < 0.05$

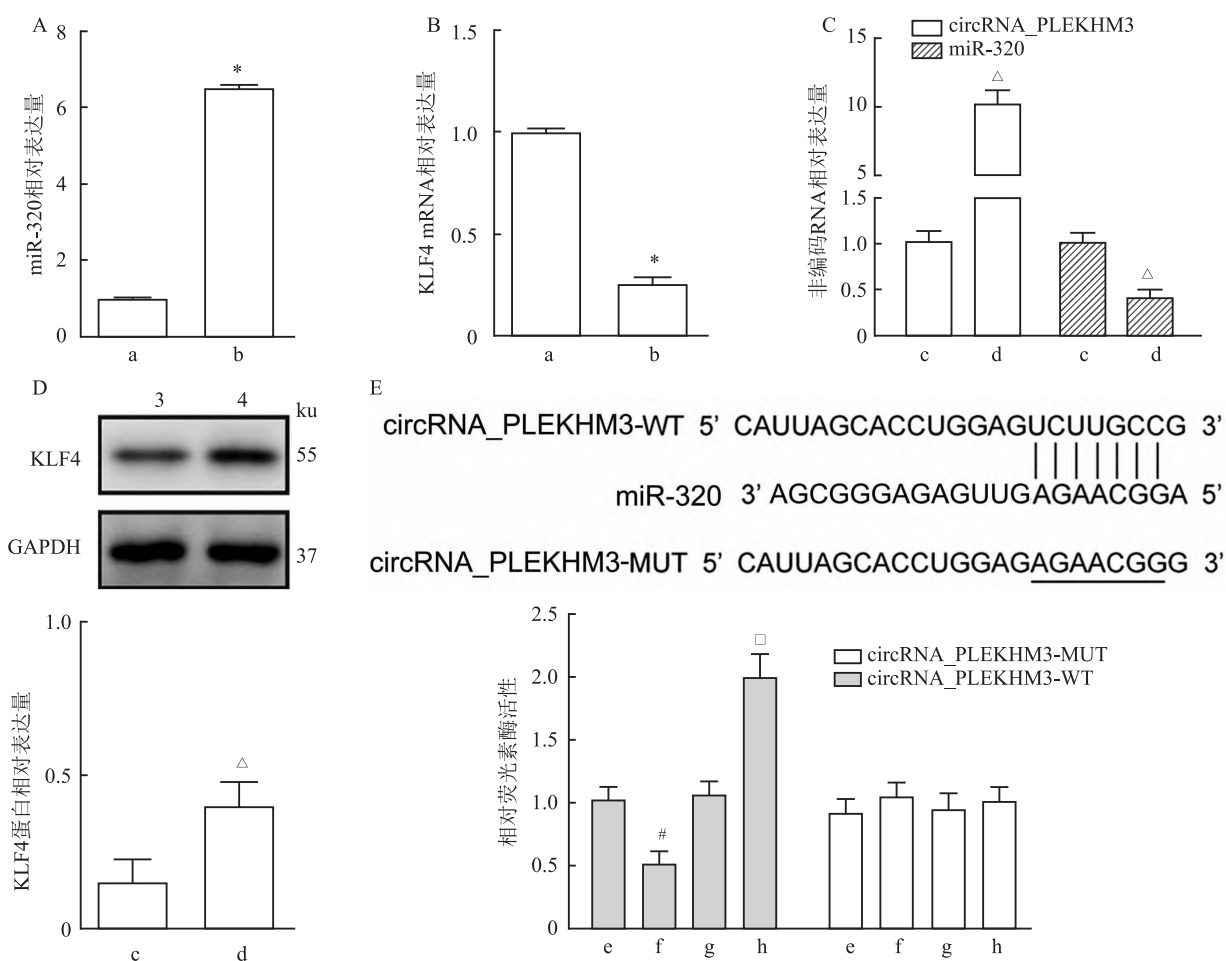


图2 CaSki 细胞中 *circRNA_PLEKHM3* 对 *miR-320* 和 *KLF4* 表达的影响以及 *circRNA_PLEKHM3* 对 *miR-320* 的靶向调控

A、B: qRT-PCR 实验检测在 HaCat 和 CaSki 细胞中 *miR-320* 和 *KLF4* mRNA 的表达; C: qRT-PCR 实验检测 *circRNA_PLEKHM3* 和 *miR-320* 的表达; D: Western blot 实验检测 *KLF4* 的蛋白表达; E: 双荧光素酶报告基因实验检测 *circRNA_PLEKHM3* 和 *miR-320* 在 CaSki 细胞中的靶向关系; a: HaCat 细胞; b: CaSki 细胞; c: Vector 组; d: *circRNA_PLEKHM3* 组; e: mimics NC 组; f: *miR-320* mimics 组; g: inhibitor NC 组; h: inhibitor 组; 与 HaCat 细胞比较: * $P < 0.05$; 与 Vector 组比较: $\Delta P < 0.05$; 与 mimics NC 组比较: # $P < 0.05$; 与 inhibitor NC 组比较: $\square P < 0.05$

miR-320 mimics 组的 E-cadherin 的表达减少 ($t = 24.187, P < 0.05$), N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 的表达均增加 ($t = 17.629, 11.984, 16.332, 19.045$, 均 $P < 0.05$)。见图 5D-I。提示过表达 *circRNA_PLEKHM3* 通过抑制 *miR-320* 抑制宫颈癌细胞的 EMT。

2.6 过表达 *circRNA_PLEKHM3* 通过上调 *KLF4* 抑制宫颈癌细胞的迁移、侵袭、EMT Transwell 细胞迁移和细胞侵袭实验结果显示,与 *circRNA_PLEKHM3* + si-NC 组比, *circRNA_PLEKHM3* + si-KLF4 组的迁移细胞数和侵袭细胞数均上调 ($t = 23.252, 14.936$; 均 $P < 0.05$)。见图 6A-C。提示过表达 *circRNA_PLEKHM3* 通过上调 *KLF4* 抑制宫颈癌细胞的迁移和侵袭。Western blot 法检测 EMT 标志物 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 的表

达,结果显示,与 *circRNA_PLEKHM3* + si-NC 组比, *circRNA_PLEKHM3* + si-KLF4 组的 E-cadherin 的表达减少 ($t = 15.423, P < 0.05$), N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 的表达均增加 ($t = 18.409, 15.663, 21.087, 16.052$, 均 $P < 0.05$)。见图 6D-I。提示过表达 *circRNA_PLEKHM3* 通过上调 *KLF4* 抑制宫颈癌细胞的 EMT。

2.7 过表达 *miR-320* 通过抑制 *KLF4* 促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭、EMT Transwell 实验检测结果显示,与 mimics NC 组比, *miR-320* mimics 组的迁移细胞数和侵袭细胞数均上升 ($t = 19.677, 16.375$, 均 $P < 0.05$), 与 *miR-320* mimics + saline 组比, *miR-320* mimics + APTO-253 组的迁移细胞数和侵袭细胞数均下调 ($t = 21.065, 24.316$, 均 $P < 0.05$)。见图 7A-C。提示激活 *KLF4* 可以削弱 *miR-320* mimics 对

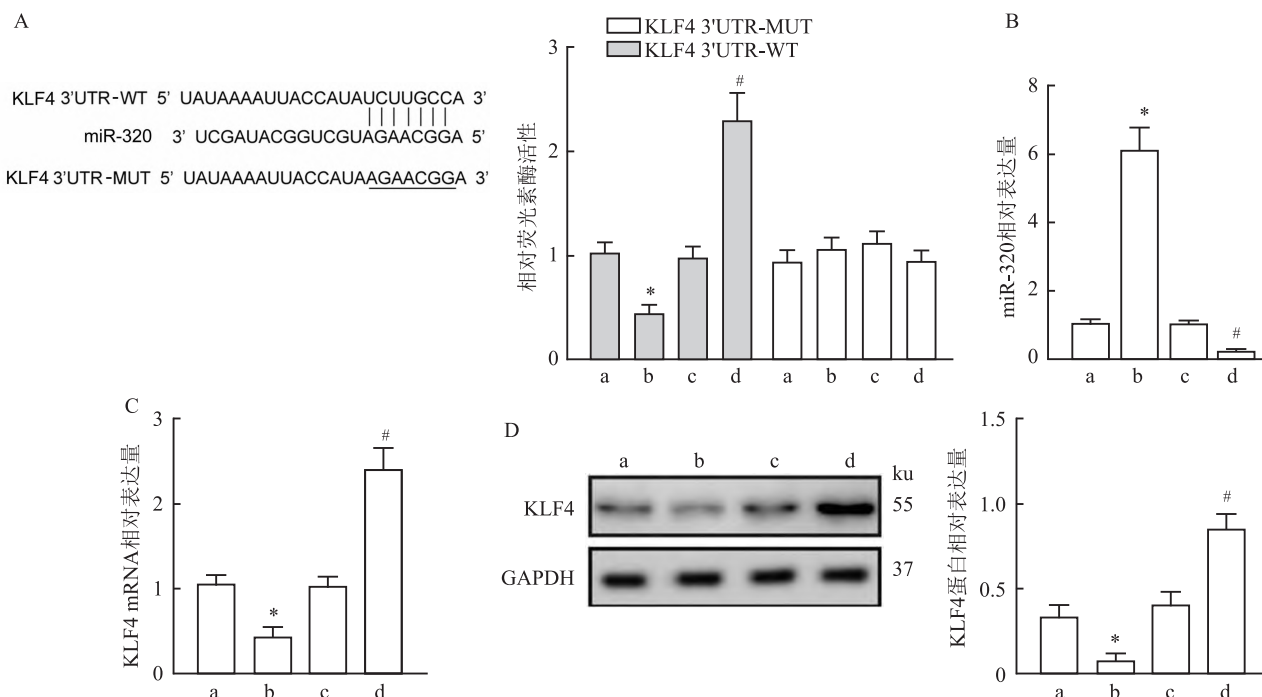


图3 miR-320 靶向调控 KLF4 并抑制 KLF4 的表达

A: 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-320 和 KLF4 在 CaSki 细胞中的靶向关系; B、C: qRT-PCR 实验检测 miR-320 和 KLF4 在 CaSki 细胞中的表达; D: Western blot 实验检测 KLF4 在 CaSki 细胞中的表达; a: mimics NC 组; b: miR-320 mimics 组; c: inhibitor NC 组; d: inhibitor 组; 与 mimics NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 inhibitor NC 组比较: # $P < 0.05$

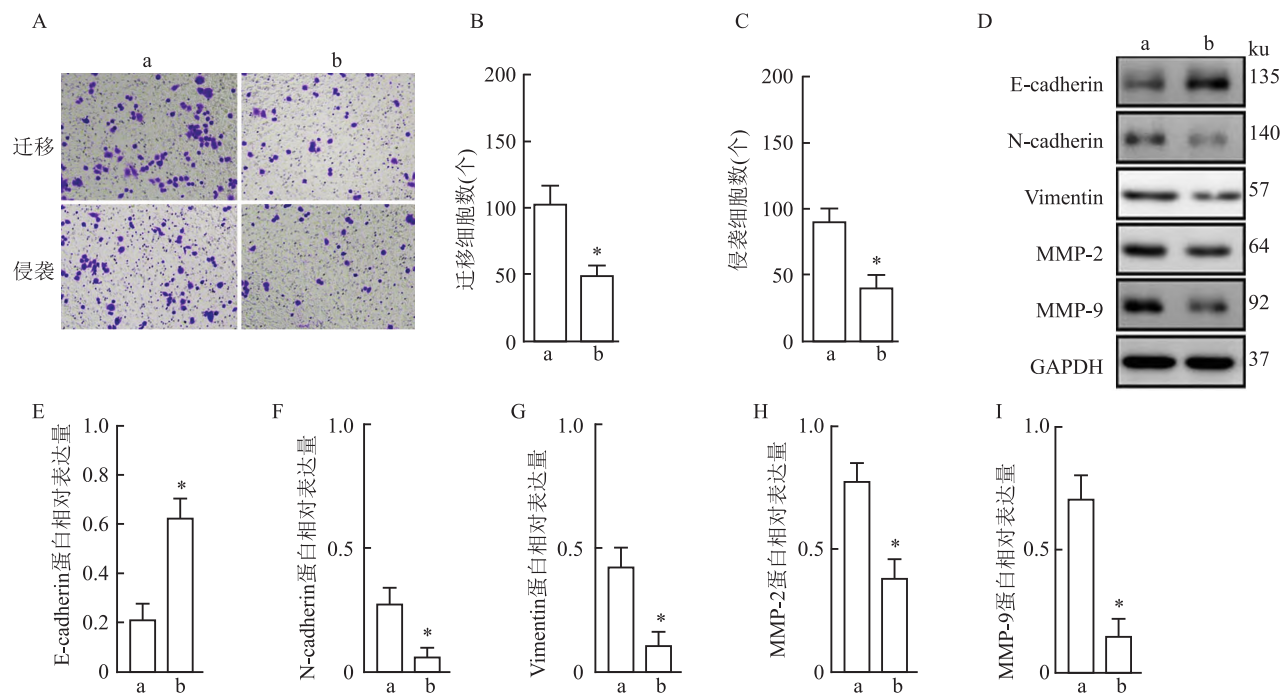


图4 过表达 circRNA_PLEKHM3 对宫颈癌细胞迁移、侵袭和 EMT 标志物的影响

A: Transwell 实验检测 CaSki 细胞迁移和侵袭的镜下图 $\times 100$; B: 迁移细胞数的统计图; C: 侵袭细胞数的统计图; D-I: Western blot 实验检测 CaSki 细胞中 EMT 标志物蛋白表达的比较; a: Vector 组; b: circRNA_PLEKHM3 组; 与 Vector 组比较: * $P < 0.05$

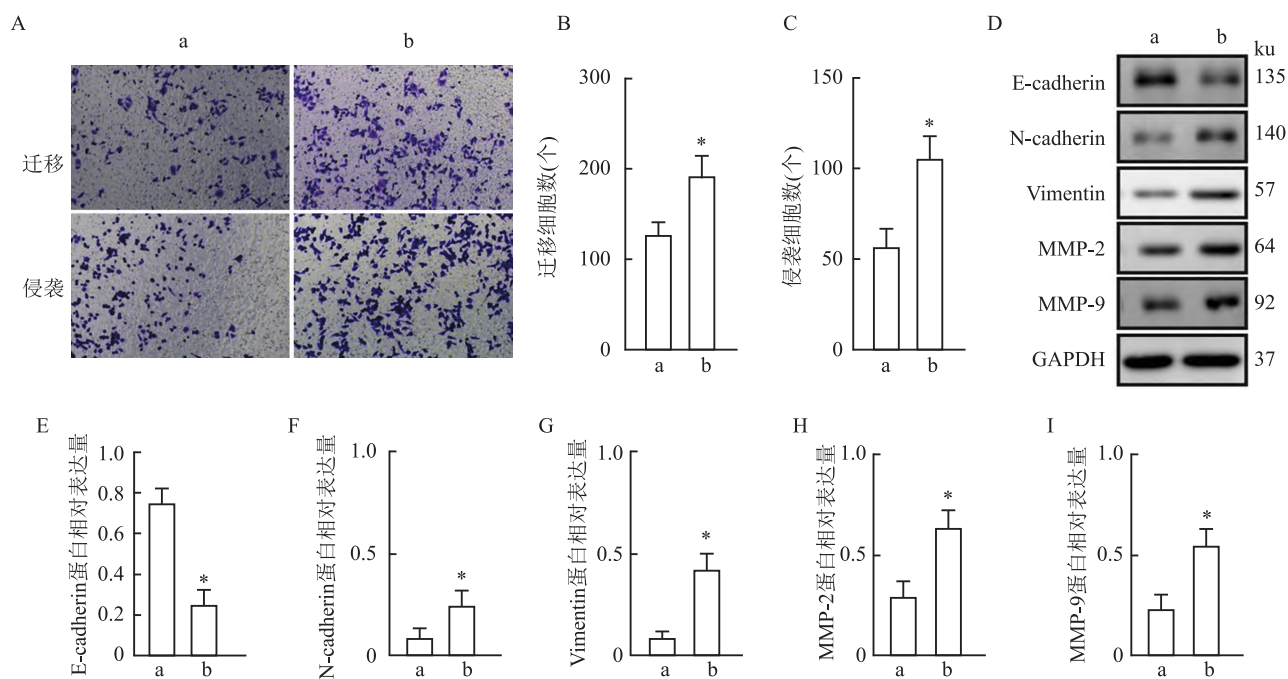


图5 过表达 *circRNA_PLEKHM3* 通过抑制 *miR-320* 对宫颈癌细胞迁移、侵袭和 EMT 标志物的影响

A:Transwell 实验检测 CaSki 细胞迁移和侵袭的镜下图 ×100;B:迁移细胞数的统计图;C:侵袭细胞数的统计图;D-I:Western blot 实验检测 EMT 的标志物在 CaSki 细胞中的表达;a:*circRNA_PLEKHM3* + mimics NC 组;b:*circRNA_PLEKHM3* + *miR-320* mimics 组;与 *circRNA_PLEKHM3* + mimics NC 组比较;* $P < 0.05$

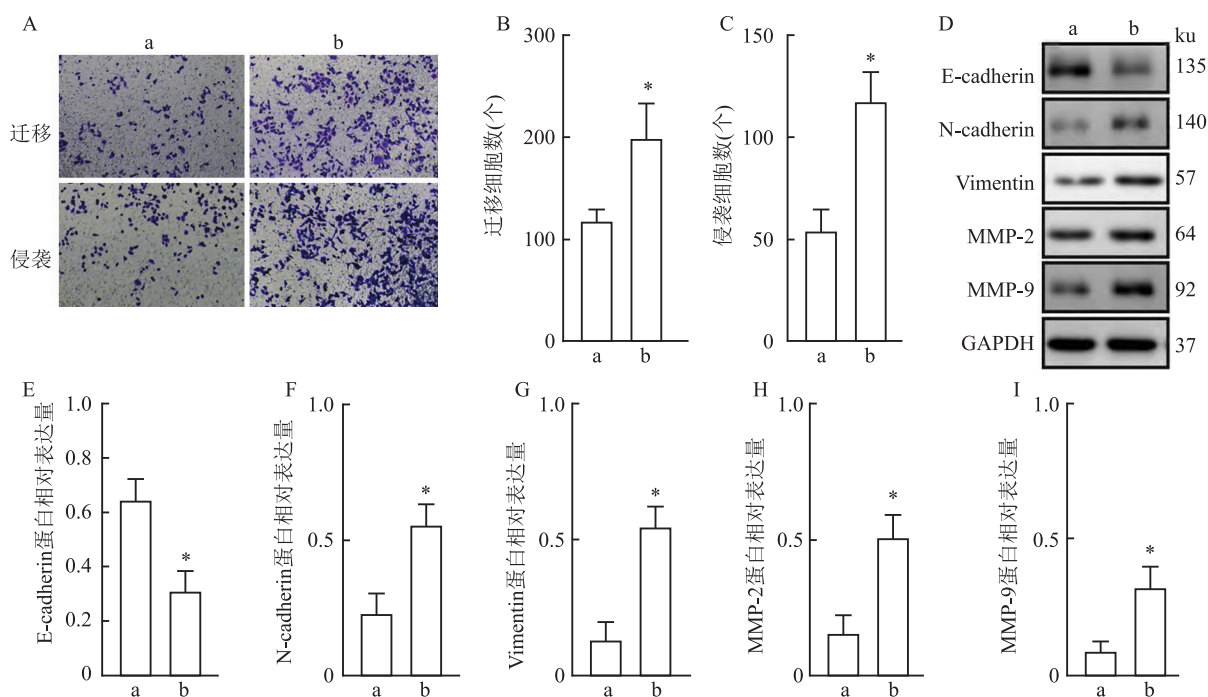


图6 过表达 *circRNA_PLEKHM3* 通过上调 *KLF4* 对宫颈癌细胞迁移、侵袭和 EMT 标志物的影响

A:Transwell 实验检测 CaSki 细胞迁移和侵袭的镜下图 ×100;B:迁移细胞数的统计图;C:侵袭细胞数的统计图;D-I:Western blot 实验检测 EMT 的标志物在 CaSki 细胞中的表达;a:*circRNA_PLEKHM3* + si-NC 组;b:*circRNA_PLEKHM3* + si-*KLF4* 组;与 *circRNA_PLEKHM3* + si-NC 组比较;* $P < 0.05$

宫颈癌细胞的迁移和侵袭的促进作用。Western blot 检测结果显示,与 mimics NC 组比,miR-320 mimics 组的 E-cadherin 的表达减少 ($t = 16.394, P < 0.05$),N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 的表达均增加($t = 18.662, 25.213, 21.809, 15.364$, 均 $P < 0.05$);与 miR-320 mimics + saline 组比,miR-320 mimics + APTO-253 组的 E-cadherin 的表达增加($t = 14.801, P < 0.05$),N-cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 的表达均降低($t = 25.450, 18.468, 16.212, 22.866$, 均 $P < 0.05$)。见图 7D-I。提示过表达 miR-320 通过抑制 KLF4 促进宫颈癌细胞的 EMT。

3 讨论

circRNA 在癌症发生和发展中的生物学作用越来越受到关注^[6]。本研究表明 circRNA_PLEKHM3

在宫颈癌细胞中低表达,其定位于细胞质内,提示 circRNA_PLEKHM3 在宫颈癌的发展中可能扮演重要角色;同时发现在宫颈癌细胞中过表达 circRNA_PLEKHM3 可抑制宫颈癌细胞的 EMT、细胞增殖、细胞侵袭和迁移,这些结果提示,宫颈癌中 circRNA_PLEKHM3 可能是一种关键的抑癌靶点。此外,本研究还验证了 circRNA_PLEKHM3 与 miR-320 之间的关系。过表达 circRNA_PLEKHM3 抑制了 miR-320 的表达。本实验双荧光素酶报告基因实验的数据表明,miR-320 是 circRNA_PLEKHM3 的靶点,miR-320 mimics 抑制过表达 circRNA_PLEKHM3 对 CaSki 细胞迁移、侵袭以及 EMT 的抑制作用。

circRNA 参与调控多种细胞生物学过程^[7],也与宫颈癌密切相关^[8]。本研究中, circRNA_PLEKHM3 在宫颈癌细胞中低表达,过表达 circRNA_

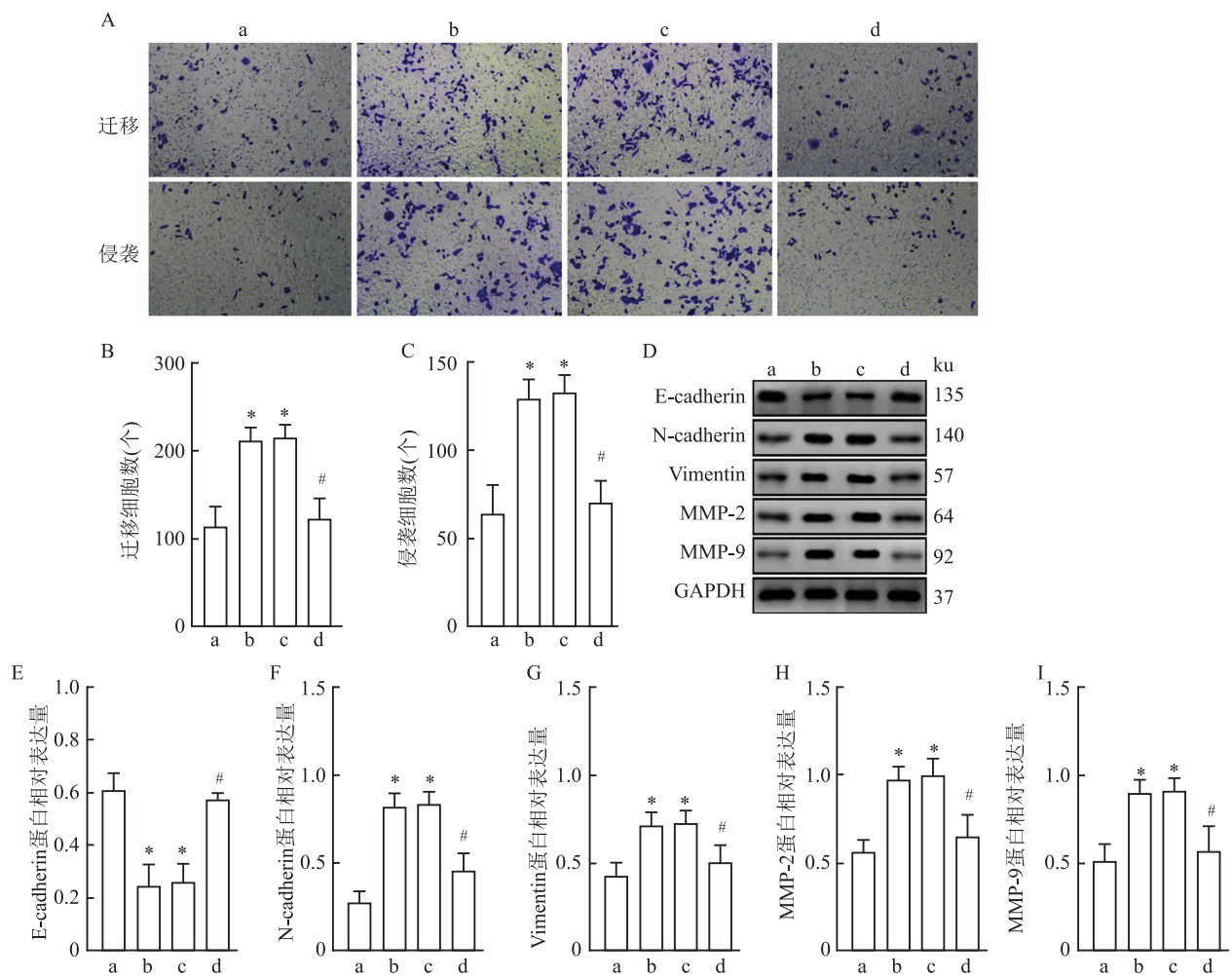


图7 过表达 miR-320 通过抑制 KLF4 对宫颈癌细胞的迁移、侵袭、EMT 的影响

A:Transwell 实验检测 CaSki 细胞的迁移和侵袭 ×100;B:迁移细胞数的统计图;C:侵袭细胞数的统计图;D-I:Western blot 实验检测 EMT 的标志物在 CaSki 细胞中的表达;a:mimics NC 组;b:miR-320 mimics 组;c:miR-320 mimics + saline 组;d:miR-320 mimics + APTO-253 组;与 mimics NC 组比较: * $P < 0.05$;与 miR-320 mimics + saline 组比较: # $P < 0.05$

PLEKHM3 后,宫颈癌细胞的迁移和侵袭能力均下降,提示 *circRNA_PLEKHM3* 具有抑制宫颈癌细胞转移的作用。

肿瘤转移是宫颈癌预后不良的主要原因^[9]。EMT 是肿瘤细胞迁移和侵袭的关键步骤^[9]。在 EMT 过程中,E-cadherin 的降低会导致细胞连接被破坏,具有抑制癌细胞 EMT、迁移和侵袭的作用,而 N-cadherin 的增加参与了 EMT 过程的发生,可促进细胞的迁移和侵袭^[9]。E-cadherin 和 N-cadherin 被报道^[10]与恶性肿瘤和转移有关。本研究表明,过表达 *circRNA_PLEKHM3* 能够降低 N-cadherin 的蛋白表达并增加 E-cadherin 的蛋白表达,表明 *circRNA_PLEKHM3* 具有抑制宫颈癌细胞的 EMT、转移和侵袭的潜力。此外,Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 等蛋白也是 EMT 过程的关键参与因子^[11]。本研究结果显示,过表达 *circRNA_PLEKHM3* 抑制了 Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 的表达,这些发现进一步证明了 *circRNA_PLEKHM3* 在宫颈癌 EMT 调控中的重要性。

许多 *circRNA* 通过调节 miRNA 的表达来实现其调控功能。miR-320 作为促癌 miRNA 分子,在肿瘤组织中表达上调^[5]。本研究表明 miR-320 是 *circRNA_PLEKHM3* 在宫颈癌细胞中的靶分子,*circRNA_PLEKHM3* 过表达明显抑制了宫颈癌细胞中 miR-320 的表达,细胞迁移和侵袭实验也揭示了 miR-320 的模拟物逆转了 *circRNA_PLEKHM3* 对宫颈癌细胞迁移、侵袭、EMT 的抑制作用,这就证明 miR-320 参与了 *circRNA_PLEKHM3* 对宫颈癌细胞恶性进展的负调控作用。近年来发表的文章^[5]支持了本研究结果,如在卵巢癌细胞中 *circRNA_PLEKHM3* 与 miR-9 或 miR-320 都具有靶向调节关系,*circRNA_PLEKHM3* 可明显抑制 miR-9 或 miR-320 的表达,当过表达 miR-9 或 miR-320 后,*circRNA_PLEKHM3* 对卵巢癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭的调作用被逆转。

miRNA 通过靶向调控基因的表达来对肿瘤细胞进行调控。之前的研究^[5]显示 miR-320 在卵巢癌中是促癌 miRNA。本研究中的结果表明 miR-320 的靶基因是 *KLF4*。作为一个关键抑癌基因,*KLF4* 在多种肿瘤中的蛋白表达缺失,过表达 *KLF4* 表现出明显的抗肿瘤特征^[12]。本研究进一步观察到 miR-320 mimics 可以抑制 *KLF4* 的表达,而 *KLF4* 的激活剂 APTO-253 则抑制了 miR-320 mimics 对宫颈癌细胞迁移、侵袭和 EMT 过程中的促进作用。提示

KLF4 是 miR-320 的功能性下游靶基因。此外,本研究还证明 *circRNA_PLEKHM3* 过表达可以促进 *KLF4* 的表达,而沉默 *KLF4* 能够明显恢复细胞迁移、侵袭和 EMT 过程。由此可见,*circRNA_PLEKHM3* 通过抑制 miR-320 的上调来抑制 *KLF4* 的表达,从而调控宫颈癌细胞的 EMT 过程。

综上所述,本研究结果表明 *circRNA_PLEKHM3* 在宫颈癌细胞的 EMT 中具有抑制作用。通过调节 miR-320 的表达,*circRNA_PLEKHM3* 能够对 *KLF4* 的表达进行调控。这些发现为进一步了解和干预宫颈癌的转移和侵袭提供了重要的理论依据,也为开发新的治疗策略和靶向药物提供了潜在的方向。然而,还需要更多的研究来深入探究 *circRNA_PLEKHM3*、miR-320 和 *KLF4* 之间的调控网络,以及它们在宫颈癌发生与发展中的具体作用机制。

参考文献

- [1] Brabletz T, Kalluri R, Nieto M A, et al. EMT in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*,2018,18(2):128-34.
- [2] Zhang H, Jiang L, Sun D, et al. CircRNA: a novel type of biomarker for cancer[J]. *Breast Cancer*, 2018,25:1-7.
- [3] Zhang C, Liu P, Huang J, et al. Circular RNA hsa_circ_0043280 inhibits cervical cancer tumor growth and metastasis via miR-203a-3p/PAQR3 axis[J]. *Cell Death Dis*,2021,12(10):888.
- [4] Chen S, Yang X, Yu C, et al. The potential of circRNA as a novel diagnostic biomarker in cervical cancer[J]. *J Oncol*, 2021: 1-6.
- [5] Sun S, Fang H. Curcumin inhibits ovarian cancer progression by regulating circ-*PLEKHM3*/miR-320a/SMG1 axis[J]. *J Ovarian Res*,2021,14(1):1-13.
- [6] Kristensen L S, Jakobsen T, Hager H, et al. The emerging roles of circRNAs in cancer and oncology[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(3): 188-206.
- [7] 胡志,付桥,徐律,等. circ-RACGAP1 在膀胱癌组织中的表达及对膀胱癌细胞增殖、迁移和侵袭的作用机制[J]. *安徽医科大学学报*,2023,58(11):1878-84.
- [8] Huang P, Qi B, Yao H, et al. Circular RNA cSMARCA5 regulates the progression of cervical cancer by acting as a microRNA-432 sponge[J]. *Mol Med Rep*,2020,21(3):1217-23.
- [9] Wang T, Li W, Ye B, et al. FTO-stabilized lncRNA HOXC13-AS epigenetically upregulated FZD6 and activated Wnt/ β -catenin signaling to drive cervical cancer proliferation, invasion, and EMT[J]. *J BUON*,2021,26:1279-91.
- [10] Li Y, Zhang T, Qin S, et al. Effects of UPF1 expression on EMT process by targeting E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Twist in a hepatocellular carcinoma cell line[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 2137-43.
- [11] Usman S, Waseem N H, Nguyen T K N, et al. Vimentin is at the heart of epithelial mesenchymal transition (EMT) mediated metas-

tasis[J]. *Cancers*, 2021, 13(19):4985.

[12] Ma X, Wang L, Shi G, et al. The deubiquitinase OTUD1 inhibits

non-small cell lung cancer progression by deubiquitinating and stabilizing KLF4[J]. *Thorac Cancer*, 2022, 13(5):761–70.

CircRNA_PLEKHM3 regulates epithelial mesenchymal transformation of cervical cancer cells through the miR-320/KLF4 axis

Zhang Yanan, Cui Ying, Wang Tianjiao, Du Zhonglei

(*Obstetrics and Gynecology Ward, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157000*)

Abstract *Objective* To investigate the role and mechanism of circular RNA containing pleckstrin homology domain of Pleckstrin homology domain family M member 3 (circRNA_PLEKHM3) in regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) behavior in cervical cancer cells through the miR-320 and KLF4. *Methods* The expression levels of circRNA_PLEKHM3 in cervical cancer cells Hela and CaSki were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). RNA fluorescence in situ hybridization was used to determine the localization of circRNA_PLEKHM3 in human cervical cancer epithelial cells CaSki. Dual luciferase reporter gene experiments were conducted to investigate the targeting relationship between circRNA_PLEKHM3 and miR-320, as well as the targeting relationship between miR-320 and KLF4. CaSki cells were overexpressed with circRNA_PLEKHM3. Additionally, three groups were set up: overexpression of miR-320 on the basis of circRNA_PLEKHM3 overexpression, silencing of KLF4 on the basis of circRNA_PLEKHM3 overexpression, and silencing of KLF4 on the basis of miR-320 overexpression. qRT-PCR was performed to detect the expression levels of miR-320 in CaSki. Western blot experiments were conducted to determine the expression of KLF4 and EMT markers including E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP-2, and MMP-9 in CaSki cells. Transwell assays were performed to measure cell migration and invasion. *Results* The expression of circRNA_PLEKHM3 decreased in Hela and CaSki cells ($P < 0.05$), mainly localized in the cytoplasm. The dual luciferase reporter gene experiment demonstrated a targeting relationship between miR-320 and circRNA_PLEKHM3, as well as between KLF4 and miR-320. Overexpression of circRNA_PLEKHM3 inhibited the protein expression of miR-320, N-cadherin, Vimentin, MMP-2, and MMP-9, up-regulated the protein expression of E-cadherin, and reduced cell migration and invasion ($P < 0.05$). Overexpression of miR-320 or silencing of KLF4 on the basis of circRNA_PLEKHM3 overexpression both promoted the protein expression of miR-320, N-cadherin, Vimentin, MMP-2, and MMP-9, down-regulated the protein expression of E-cadherin, and increased cell migration and invasion ($P < 0.05$). However, silencing of KLF4 on the basis of miR-320 overexpression inhibited the protein expression of KLF4, N-cadherin, Vimentin, MMP-2, and MMP-9, up-regulated the protein expression of E-cadherin, and reduced cell migration and invasion ($P < 0.05$). *Conclusion* Overexpression of circRNA_PLEKHM3 regulates EMT in cervical cancer cells through the miR-320/KLF4 axis.

Key words circular RNA_PLEKHM3; miRNA-320; krüppel-like factor 4; cervical cancer cells; epithelial-mesenchymal transition; migration; invasion