

# 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

胡志<sup>1</sup>,付桥<sup>1</sup>,徐律<sup>1</sup>,张炜<sup>1</sup>,盖强强<sup>2</sup>,孙伟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 分析 circ-RACGAP1 在膀胱癌组织中的表达与临床意义,探究 circ-RACGAP1 对膀胱癌细胞恶性生物学行为的影响及作用机制。方法 通过 TCGA 数据库探究 circ-RACGAP1 在膀胱癌组织中的表达,分析 circ-RACGAP1 表达与膀胱癌患者临床病理特征的关系。通过实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)法分析细胞系 5637、T24、J82、RT-4、UM-UC-3 中 circ-RACGAP1 表达。通过脂质体转染技术将 circ-RACGAP1 敲降质粒转染 T24 细胞。克隆形成实验、划痕实验和 Transwell 实验分别分析敲降 circ-RACGAP1 对 T24 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。采用 deepBase、Circbank、CircInteractome、circRNABase 数据库和荧光报告系统验证 circ-RACGAP1 和 miR-4324 之间的靶向结合。qPCR 检测敲降 circ-RACGAP1 对 T24 细胞中 miR-4324 表达的影响。采用 Western blot 法检测敲降 circ-RACGAP1 对 T24 细胞中 Rac-GTP 酶激活蛋白 1(RACGAP1)蛋白和磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路蛋白表达的影响。**结果** 膀胱癌组织中 circ-RACGAP1 呈高表达( $P < 0.01$ ),其表达随着患者临床分期恶性程度增高而升高( $P < 0.01$ )。膀胱癌细胞系中 circ-RACGAP1 表达明显高于人正常膀胱上皮细胞(均  $P < 0.01$ )。与对照组比较,sh-sh-circ-RACGAP1 组 T24 细胞增殖、迁移和侵袭能力均明显降低(均  $P < 0.01$ )。circ-RACGAP1 可靶向抑制 miR-4324 的表达( $P < 0.01$ )。与对照组比较,sh-circ-RACGAP1 组 T24 细胞中 RACGAP1 蛋白表达水平降低( $P < 0.01$ ),PI3K/AKT 信号通路蛋白磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)、核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)表达水平均降低(均  $P < 0.01$ )。**结论** 膀胱癌组织和细胞系中 circ-RACGAP1 呈高表达,敲降 circ-RACGAP1 能够抑制 T24 细胞的恶性生物学行为, circ-RACGAP1 是通过抑制 miR-4324 表达激活 PI3K/AKT 信号通路来发挥作用。

**关键词** 膀胱癌;环状 RNA;circ-RACGAP1;miR-4324

2023-06-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82103284);中国博士后科学基金面上项目(编号:2019M662640)

作者单位:<sup>1</sup> 武汉市第三医院(武汉大学附属同仁医院)泌尿外科,武汉 430000

<sup>2</sup> 华中科技大学附属同济医院泌尿外科,武汉 430030

作者简介:胡志,男,硕士,主治医师;

盖强强,男,博士,副研究员,责任作者,E-mail:viphuzhi@163.com

中图分类号 R 737.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)11-1878-07  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.013

膀胱癌是人类常见的恶性肿瘤之一,发病率及病死率均居泌尿系统肿瘤第一位<sup>[1]</sup>。随着医疗水平的进步,膀胱癌患者的预后得到改善,但是膀胱癌的发病率呈增加趋势,并且其复发率非常高<sup>[2]</sup>。探究膀胱癌发病的分子机制,明确新的诊断标志物和治疗靶点是膀胱癌研究的当务之急。环状 RNA(circular RNA, circRNA)是一种没有蛋白编码功能的 RNA 转录产物,参与细胞的分化、应激、损伤修复等过程,是关键转录调控因子<sup>[3]</sup>。circRNA 在多种肿瘤包括输尿管癌、胆管癌、淋巴瘤、膀胱癌中呈现异常表达,发挥促癌或抑癌的作用<sup>[4-6]</sup>。根据 circBase 数据库显示, circ-RACGAP1 来源于 RACGAP1 基因的第 19、20、21 和 22 外显子,经剪接后形成的环状转录本, circ-RACGAP1 在膀胱癌中的作用及机制并不清楚。该研究主要探究 circ-RACGAP1 在膀胱癌中的表达水平及其与膀胱癌患者临床资料的关系,明确 circ-RACGAP1 在膀胱癌细胞中的作用和分子机制,意在为膀胱癌的诊疗、预后评估提供新的标志物和靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人正常膀胱上皮细胞 SV-HUC-1、人膀胱癌细胞系 5637、T24、J82、RT-4、UM-UC-3 购自美国 ATCC 公司。一抗兔抗 Rac-GTP 酶激活蛋白 1(rac-GTPase activating protein 1, RACGAP1)、磷酸化磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, p-PI3K)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)、核因子  $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)均购自美国 Santa Cruz 公司。RPMI-1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Life Technologies 公司。DMEM 培养基、双荧光素酶报告检测试剂盒购自以

色列 Biological Industries 公司。Transwell 小室、circ-RACGAP1 敲降质粒 (sh-circ-RACGAP1; AACACTCCTAGAAATCACAGA) 和对照质粒购自美国 Millipore 公司。miR-NC、miR-4324 购自美国 BD 公司。逆转录试剂盒购自北京天根生化公司。circ-RACGAP1 双荧光素酶报告载体野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 购自上海碧云天生物技术公司。

**1.2 生物信息学分析** 通过 TCGA 数据库分析膀胱癌组织和正常膀胱组织中 circ-RACGAP1 的表达水平及其与患者临床分期的关系。circ-RACGAP1 与 miR-4324 的靶向关系采用 deepBase、Circbank、CircInteractome、circRNABase 数据库进行分析。

**1.3 细胞培养与分组** 将 5637、T24、J82、RT-4 细胞置于含 12% FBS 的 RPMI-1640 培养基, 将 SV-HUC-1、UM-UC-3 细胞置于含 12% FBS 的 DMEM 培养基, 在加湿培养箱中常规培养。将 T24 细胞接种于 12 孔板, 分为对照组 (转染对照质粒) 和 sh-circ-RACGAP1 组 (转染 circ-RACGAP1 敲降质粒)。T24 细胞汇合度至 70%, 每组均采用 Lipofectamine™ 3000 试剂转染 0.6 μg 质粒至 T24 细胞。

**1.4 qPCR 法检测 circ-RACGAP1、miR-4324 表达水平** 以 TRIzol 法提取膀胱癌细胞总 RNA, 进行逆转录合成 cDNA。qPCR 反应条件: 93 °C 预变性 3 min, 93 °C 40 s, 56 °C 40 s, 71 °C 40 s, 总共进行 34 次循环。引物序列: circ-RACGAP1 正向引物: CCTGTGACCACTCCTGAACA, 反向引物: CATGGCAGC-TATGCTGTTGT; miR-4324 正向引物: CAGGTCCTTGCTCTCCAACCTTGC, 反向引物: TGATCACATTTAA-CAGCTTCCG; GAPDH 正向引物: TGCCACTCAGAA-GACTGTGG, 反向引物: TTCAGCTCTGGGATGAC-CTT。circ-RACGAP1、miR-4324 表达水平计算采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式。

**1.5 克隆形成实验检测 sh-circ-RACGAP1 对 T24 细胞增殖的影响** 将 circ-RACGAP1 敲降质粒转染 T24 细胞 48 h 后, 采用胰酶消化并用移液器吹打, 将单细胞悬液以每孔 2 000 个接种 6 孔板, 保证 T24 细胞均匀分布, 在加湿培养箱中培养。待 11 d 后出现克隆时, 吸去培养基, PBS 溶液漂洗 4 次。加入甲醛固定 50 min, PBS 溶液漂洗 4 次, 加入结晶紫染色 40 min, PBS 溶液漂洗 4 次, 超净台内晾干后计数克隆形成数。

**1.6 划痕实验检测 sh-circ-RACGAP1 对 T24 细胞迁移的影响** 将 circ-RACGAP1 敲降质粒转染 T24 细胞 48 h 后, 采用胰酶消化并用移液器吹打, 将单

细胞悬液以每孔  $2 \times 10^5$  个接种 6 孔板, 在加湿培养箱中培养。细胞汇合度为 90% 左右, 取无菌移液器枪头, 于板底均匀划痕, 用显微镜取 4 个视野测距。在加湿培养箱中培养 24 h, 用显微镜取 4 个视野测距, 计算 T24 细胞的迁移率。

**1.7 Transwell 实验检测 sh-circ-RACGAP1 对 T24 细胞侵袭的影响** 将基质胶加入 Transwell 上室, 保证基质胶均匀分布。将 circ-RACGAP1 敲降质粒转染 T24 细胞 48 h 后, 采用胰酶消化并用移液器吹打, 将无血清的单细胞悬液以每孔  $2 \times 10^4$  个加入上室, 下室加含 20% FBS 的培养基, 在加湿培养箱中培养 48 h。棉签擦去基质胶和未穿膜 T24 细胞, 多聚甲醛固定 50 min, 结晶紫染色 50 min。用显微镜取 4 个视野, 计数细胞侵袭数。

**1.8 双荧光素酶报告基因实验检测 circ-RACGAP1 和 miR-4324 间的靶向关系** 将 T24 细胞接种于 12 孔板, 分为 circ-RACGAP1-WT + miR-NC 组、circ-RACGAP1-WT + miR-4324 组、circ-RACGAP1-MUT + miR-NC 组、circ-RACGAP1-MUT + miR-4324 组。T24 细胞汇合度至 70%, 每组均采用 Lipofectamine™ 3000 试剂转染 0.9 μg 质粒至 T24 细胞。在加湿培养箱中培养 46 h 后, 用双荧光素酶报告检测试剂盒分析每组 T24 细胞的荧光素酶活性。

**1.9 Western blot 法检测 sh-circ-RACGAP1 对 T24 细胞 RACGAP1 及 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达的影响** 将 circ-RACGAP1 敲降质粒转染 T24 细胞 48 h 后, 采用 RIPA 试剂裂解。加入适量上样缓冲液煮沸 7 min, 行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 低温转膜。加入一抗兔抗 RACGAP1 (1:3 000)、p-PI3K (1:2 000)、p-AKT (1:1 000)、GAPDH (1:3 000)、NF-κB (1:3 000), 加入山羊抗兔二抗 (1:7 000)。滴加在化学发光试剂, 在 Bio-rad 成像仪中显影, 利用 Quantity One 软件进行灰度值统计分析。

**1.10 统计学处理** 利用 SPSS 22.0 软件进行统计, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  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及 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 膀胱癌组织中 circ-RACGAP1 表达及其临床意义** 如图 1 所示, circ-RACGAP1 来源于 RACGAP1 基因的第 19、20、21 和 22 外显子, 经剪接后形成的环状转录本。经 TCGA 数据库分析 (图 2) 显

示,膀胱癌组织中 circ-RACGAP1 表达显著高于正常膀胱组织 ( $P < 0.01$ );在膀胱癌组织中 circ-RACGAP1 表达水平随着膀胱癌患者分期恶性程度的增加而升高 ( $P < 0.01$ ),见图 3。

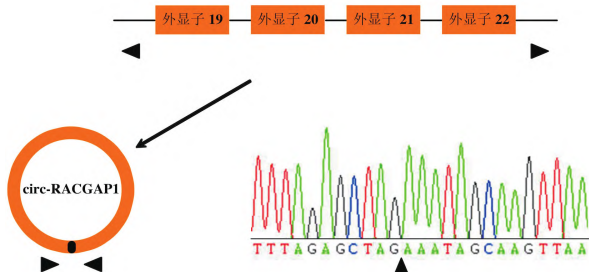


图 1 circ-RACGAP1 的结构示意图

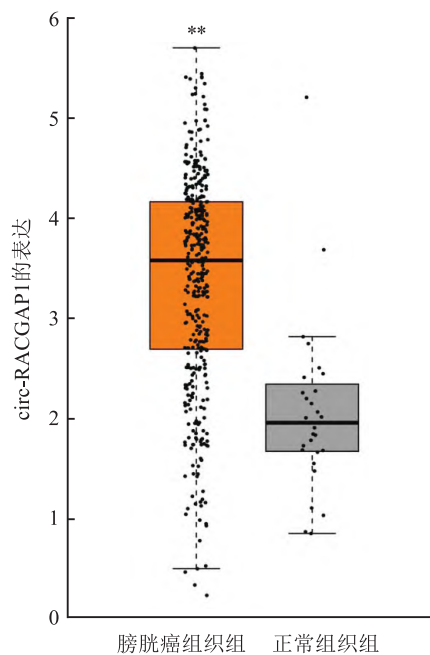


图 2 TCGA 数据库显示膀胱癌组织中 circ-RACGAP1 的表达与正常组织组比较: \*\*  $P < 0.01$

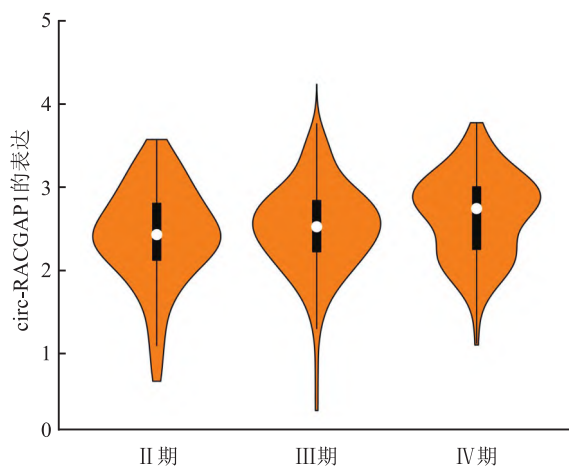


图 3 circ-RACGAP1 在不同临床分期膀胱癌患者组织中的表达

## 2.2 膀胱癌细胞系中 circ-RACGAP1 的表达水平

qPCR 检测(图 4)显示,与 SV-HUC-1 细胞相比, circ-RACGAP1 在膀胱癌细胞系 5637、T24、J82、RT-4、UM-UC-3 中均呈高表达 ( $F = 39.46, P < 0.05$ ), circ-RACGAP1 在 T24 细胞中表达丰度最高 ( $F = 17.03, P < 0.01$ ),故选择 T24 细胞为该研究的工具细胞。

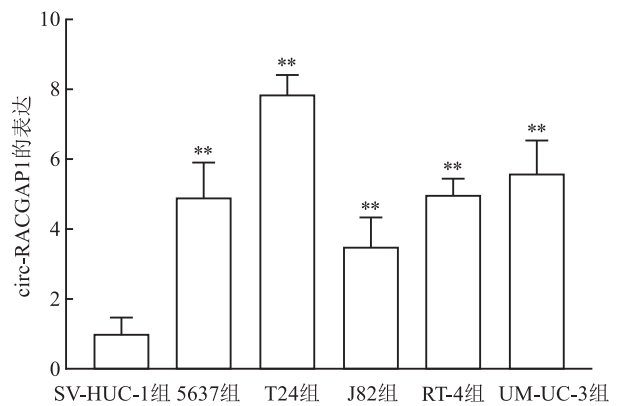


图 4 qPCR 检测膀胱癌细胞系中 circ-RACGAP1 的表达与 SV-HUC-1 细胞组比较: \*\*  $P < 0.01$

## 2.3 各组 T24 细胞中 circ-RACGAP1、miR-4324 的表达

qPCR 检测显示,sh-circ-RACGAP1 组 T24 细胞中 circ-RACGAP1 表达水平较对照组显著下调 ( $t = 12.44, P < 0.01$ ),而 sh-circ-RACGAP1 组 T24 细胞中 miR-4324 表达水平较对照组显著上调 ( $t = 6.91, P < 0.01$ )。

## 2.4 低表达 circ-RACGAP1 对 T24 细胞增殖的影响

克隆形成实验(图 5)显示,对照组和 sh-circ-RACGAP1 组 T24 细胞克隆形成数分别为 ( $66.45 \pm 6.44$ ) 个和 ( $29.88 \pm 5.55$ ) 个,sh-circ-RACGAP1 组细胞活性明显低于对照组 ( $t = 4.30, P < 0.01$ )。

## 2.5 低表达 circ-RACGAP1 对 T24 细胞迁移的影响

划痕实验(图 6)显示,对照组和 sh-circ-RACGAP1 组 T24 细胞迁移率分别为 ( $64.81 \pm 4.85$ )% 和 ( $30.58 \pm 7.06$ )%,sh-circ-RACGAP1 组细胞迁移能力明显低于对照组 ( $t = 4.00, P < 0.01$ )。

## 2.6 低表达 circ-RACGAP1 对 T24 细胞侵袭的影响

Transwell 实验(图 7)显示,对照组和 sh-circ-RACGAP1 组细胞侵袭数分别为 ( $104.90 \pm 11.75$ ) 个和 ( $23.98 \pm 7.24$ ) 个,sh-circ-RACGAP1 组细胞侵袭能力明显低于对照组 ( $t = 5.59, P < 0.01$ )。

## 2.7 circ-RACGAP1 与 miR-4324 的靶向关系

deepBase、Circbank、CircInteractome、circRNABase 生



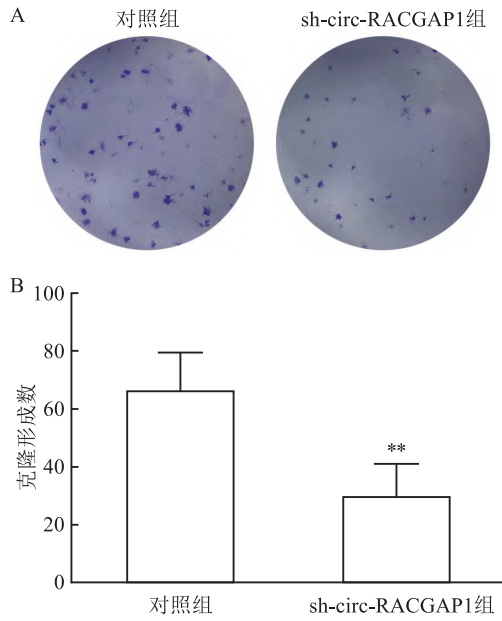


图5 克隆形成实验检测下调 circ-RACGAP1 对 T24 细胞增殖的影响

A: 克隆形成实验; B: 克隆形成数定量分析; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

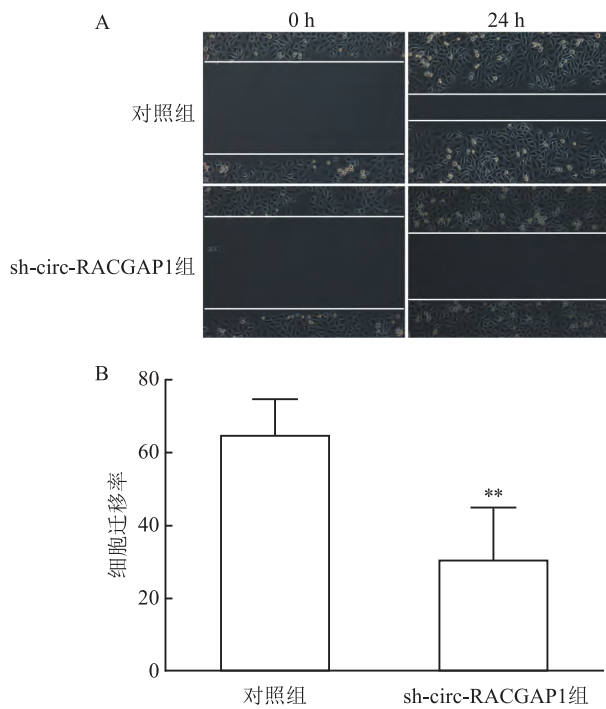


图6 划痕实验检测下调 circ-RACGAP1 对 T24 细胞迁移的影响

A: 划痕实验  $\times 40$ ; B: 细胞迁移率定量分析; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

物信息学数据库预测(图8A)显示, miR-4324 与 circ-RACGAP1 之间存在潜在的相互结合位点。双荧光素酶报告载体(图8B)实验显示, 与 miR-NC 组相比, miR-4324 能够明显下调 circ-RACGAP1-WT 的

荧光素酶活性( $t = 9.66, P < 0.01$ )。

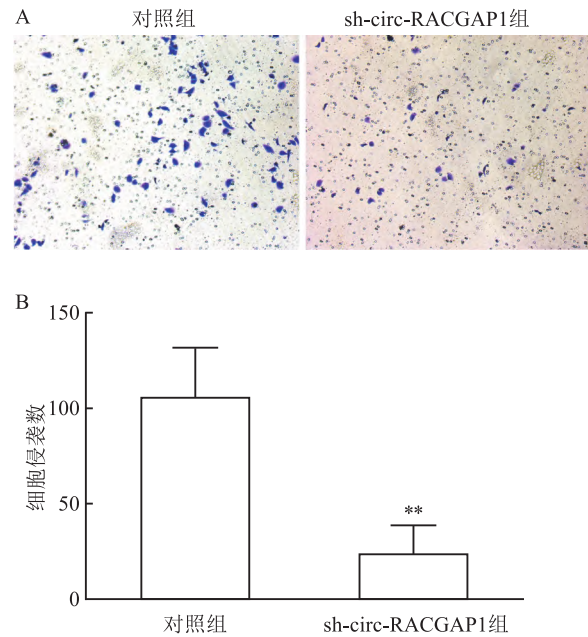


图7 Transwell 实验检测下调 circ-RACGAP1 对 T24 细胞侵袭的影响

A: Transwell 实验  $\times 40$ ; B: 细胞侵袭数定量分析; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

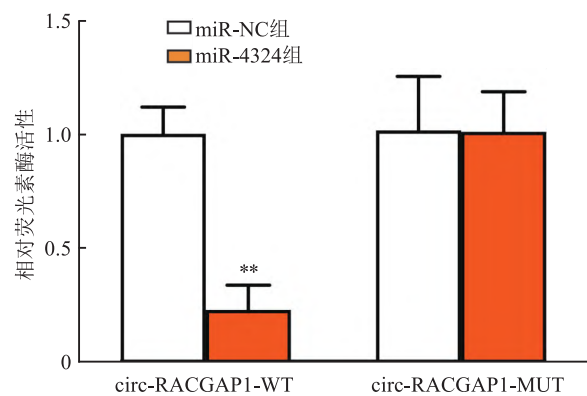
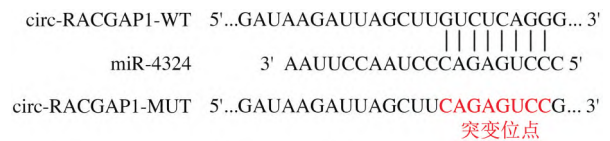


图8 circ-RACGAP1 与 miR-4324 的靶向关系

与 miR-NC 组比较: \*\*  $P < 0.01$

## 2.8 低表达 circ-RACGAP1 对目的蛋白表达的影响

Western blot 检测(图9)显示, sh-circ-RACGAP1 组 T24 细胞中 RACGAP1 蛋白表达较对照组降低( $t = 14.71, P < 0.01$ ), PI3K/AKT 信号通路蛋白 p-PI3K、p-AKT、NF- $\kappa$ B 表达水平均降低( $t = 8.71, P < 0.01$ ;  $t = 5.76, P < 0.01$ ;  $t = 15.49, P < 0.01$ )。

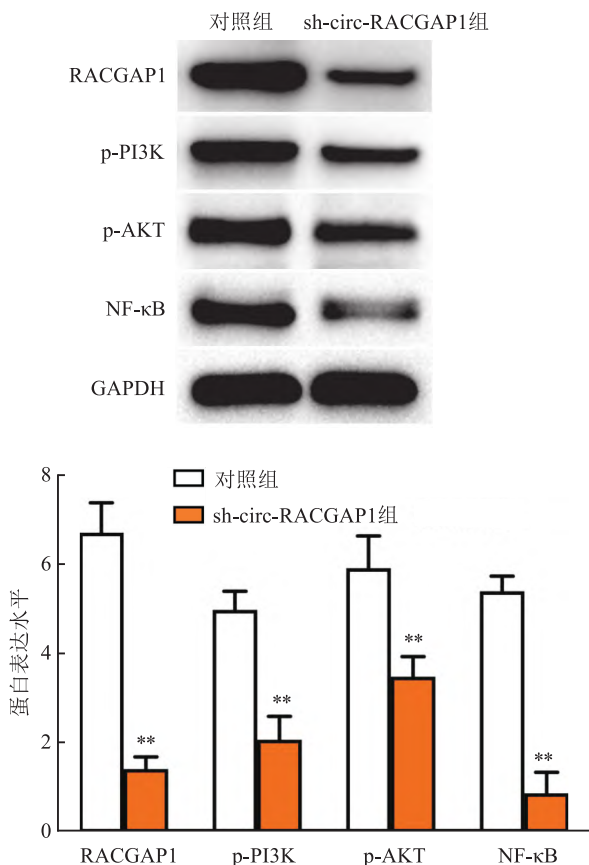


图9 Western blot 法检测 RACGAP1 和 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

circRNA 是细胞内转录组的关键组成部分,负责调节各种信号调节通路的转导,影响细胞的黏附、糖酵解、发育等过程<sup>[7]</sup>。目前已有报道<sup>[8]</sup>显示, circRNA 广泛参与肿瘤细胞内癌基因的激活与抑癌基因的失活,在肿瘤的发病中起到关键作用。相关研究<sup>[9]</sup>表明,膀胱癌细胞中存在多个 circRNA 的高表达或低表达,其对膀胱癌的诊疗和复发监测具有重要价值。例如, circ-LONP2 在膀胱癌组织和细胞中表达上调,敲降 circ-LONP2 表达抑制膀胱癌细胞的活力和侵袭, miR-584-5p 是 circ-LONP2 的下游靶标<sup>[10]</sup>。例如,膀胱癌组织中的 circ-SHPRH 表达明显降低,其低水平表达与膀胱癌患者的高级别病理分期、淋巴转移和不良预后呈正相关,沉默 circ-SHPRH 可上调 miR-942 表达,进而增加膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力<sup>[11]</sup>。然而, circ-RACGAP1 表达改变与膀胱癌发生、进展的关系尚不明确。该研究表明, circ-RACGAP1 在膀胱癌组织和细胞中呈

高表达,其表达与膀胱癌患者的临床分期呈正相关, circ-RACGAP1 可能与膀胱癌的恶性程度有关。另外,低表达 circ-RACGAP1 能够抑制膀胱癌 T24 细胞增殖、迁移和侵袭能力。该实验结果显示, circ-RACGAP1 作为促癌因子在膀胱癌的发生发展中可能发挥重要作用。

近年来大量研究<sup>[12]</sup>表明, circRNA 通过识别下游 miRNA, 干扰 miRNA 的功能, 以表观遗传调节的方式影响特定基因的表达, 从而参与细胞的各种活动。该研究通过 deepBase、Circbank、CircInteractome、circRNABase 生物信息学数据库预测, miR-4324 可能是 circ-RACGAP1 的靶标。双荧光素酶报告载体实验表明 circ-RACGAP1 能够直接结合 miR-4324。miR-4324 是 miRNA 家族成员, 其在包含卵巢癌、食管鳞状细胞癌等在内的肿瘤组织和细胞系中低表达, 参与抑制肿瘤的增殖、迁移和侵袭, 其低表达预示着肿瘤患者生存率低<sup>[13-14]</sup>。miR-4324 在膀胱癌组织和细胞系中下调, 恢复 miR-4324 表达有助于抑制膀胱癌的进展。qPCR 结果显示, 低表达 circ-RACGAP1 可上调 miR-4324 的表达。因此, circ-RACGAP1 通过调节 miR-4324 表达发挥作用。有研究<sup>[15]</sup>表明, miR-4324 通过抑制膀胱癌细胞中的 RACGAP1 基因表达和 PI3K/AKT 信号通路转导发挥抑癌作用。该研究通过 Western blot 实验显示, 低表达 circ-RACGAP1 后的 T24 细胞中 RACGAP1 蛋白和 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达均降低。以上结果表明, circ-RACGAP1 通过靶向抑制 miR-4324 从而调节 RACGAP1/PI3K/AKT 信号通路。

综上所述, circ-RACGAP1 在膀胱癌中高表达, 其表达水平与膀胱癌的恶性程度有关。 circ-RACGAP1 通过靶向抑制 miR-4324 调控 RACGAP1/PI3K/AKT 信号通路发挥促癌作用, circ-RACGAP1 可能是膀胱癌治疗的新靶点。

### 参考文献

- [1] Martin A, Woolbright B L, Umar S, et al. Bladder cancer, inflammation and microbiomes [J]. Nat Rev Urol, 2022, 19(8): 495-509.
- [2] Compérat E, Amin M B, Cathomas R, et al. Current best practice for bladder cancer: a narrative review of diagnostics and treatments [J]. Lancet, 2022, 400(10364): 1712-21.
- [3] Fang P, Jiang Q, Liu S, et al. Circ\_0002099 is a novel molecular therapeutic target for bladder cancer [J]. Drug Dev Res, 2022, 83(8): 1890-905.
- [4] An M, Zheng H, Huang J, et al. Aberrant nuclear export of circ-NCOR1 underlies SMAD7-mediated lymph node metastasis of

- bladder cancer [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(12): 2239–53.
- [5] Wu X, Cao W, Lu C, et al. circ3323 motivates host gene to promote the aggressiveness of bladder cancer [J]. *Biochem Genet*, 2022, 60(6): 2327–45.
- [6] Lu P, Jiang Y, Xia Z. Hsa\_circ\_0003221 facilitates the malignant development of bladder cancer cells *via* resulting in the upregulation of DHCR24 by targeting miR-892b [J]. *Investig Clin Urol*, 2022, 63(5): 577–88.
- [7] 李华玲, 杨迪, 韦俊杰, 等. 过表达环状 RNA 泛素连接酶 E3 (circHERC4/hsa\_circ\_0007113) 抑制细胞衰老的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(7): 1100–5.
- [8] Yang C, Wu S, Mou Z, et al. Exosome-derived circTRPS1 promotes malignant phenotype and CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion in bladder cancer microenvironments [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(3): 1054–70.
- [9] Wang L, Wu S, He H, et al. CircRNA-ST6GALNAC6 increases the sensitivity of bladder cancer cells to erastin-induced ferroptosis by regulating the HSPB1/P38 axis [J]. *Lab Invest*, 2022, 102(12): 1323–34.
- [10] Zhang X, Xiong H, Zhao Y, et al. Circular RNA LONP2 regulates proliferation, invasion, and apoptosis of bladder cancer cells by sponging microRNA-584-5p [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 8823–35.
- [11] Zuo L, Zhu Y, Han J, et al. Circular RNA circSHPRH inhibits the malignant behaviors of bladder cancer by regulating the miR-942/BARX2 pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(4): 1891–909.
- [12] 王玉孝, 李俊, 汪生毅, 等. 基于 circNRG-1/miR-193b-5p/NRG-1 探讨肥胖性高血压发生的分子机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(9): 1367–73.
- [13] Wu H, Yan Y, Yuan J, et al. miR-4324 inhibits ovarian cancer progression by targeting FEN1 [J]. *J Ovarian Res*, 2022, 15(1): 32.
- [14] Zhou J, Zhu J, Jiang G, et al. Downregulation of microRNA-4324 promotes the EMT of esophageal squamous-cell carcinoma cells *via* upregulating FAK [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 4595–604.
- [15] Ge Q, Lu M, Ju L, et al. miR-4324-RACGAP1-STAT3-ESR1 feedback loop inhibits proliferation and metastasis of bladder cancer [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(12): 3043–55.

## Expression of circ-RACGAP1 in bladder cancer tissue and its mechanism of action on proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells

Hu Zhi<sup>1</sup>, Fu Qiao<sup>1</sup>, Xu Lv<sup>1</sup>, Zhang Wei<sup>1</sup>, Gai Qiangqiang<sup>2</sup>, Sun Wei<sup>1</sup>

[<sup>1</sup>Dept of Urology, Wuhan Third Hospital (Tongren Hospital Affiliated to Wuhan University), Wuhan 430000; <sup>2</sup>Dept of Urology, Tongji Hospital Affiliated to Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030]

**Abstract Objective** To analyze the expression and clinical significance of circ-RACGAP1 in bladder cancer tissues, and to explore the influence and mechanism of circ-RACGAP1 on the malignant biological behavior of bladder cancer cells. **Methods** The expression of circ-RACGAP1 in bladder cancer tissues was explored through the TCGA database, and the relationship between the expression of circ-RACGAP1 and the clinicopathological features of bladder cancer patients was analyzed. The expression of circ-RACGAP1 in cell lines 5637, T24, J82, RT-4 and UM-UC-3 was analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR). The circ-RACGAP1 knockdown plasmid was transfected into T24 cells by lipofection technology. Colony formation assay, scratch assay and Transwell assay were used to analyze the effects of knocking down circ-RACGAP1 on the proliferation, migration and invasion of T24 cells, respectively. The targeted binding between circ-RACGAP1 and miR-4324 was verified using deepBase, Circbank, CircInteractome, circRNABase databases and a fluorescent reporter system. The effect of knocking down circ-RACGAP1 on the expression of miR-4324 in T24 cells was detected by qPCR. Western blot was used to detect the effect of knocking down circ-RACGAP1 on the expression of recombinant rac-GTPase activating protein 1 (RACGAP1) protein and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway proteins in T24 cells. **Results** circ-RACGAP1 was highly expressed in bladder cancer tissues ( $P < 0.01$ ), and its expression increased with the clinical stage of the patients ( $P < 0.01$ ). The expression of circ-RACGAP1 in bladder cancer cell lines was significantly higher than that in normal human bladder epithelial cells (all  $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the proliferation, migration and invasion abilities of T24 cells in the sh-circ-RAC-

# 新疆维吾尔自治区妇女宫颈感染人乳头瘤病毒 16 型 E4 和 L2 的遗传变异分析

程豪政<sup>1</sup>, 妥静<sup>1</sup>, 董杨柳<sup>1</sup>, 王乐<sup>1</sup>, 者湘漪<sup>2</sup>, 李洪涛<sup>2</sup>, 李冬妹<sup>1</sup>, 潘泽民<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨人乳头瘤病毒 16 (HPV16) E4、L2 基因变异及氨基酸变化,分析 HPV16 的进化特征。方法 从医院收集 40 例 HPV16 感染阳性的宫颈脱落细胞样本和 40 例宫颈组织细胞样本,提取样本的病毒 DNA,对 40 例宫颈脱落细胞的 DNA 进行 HPV16 E4 和 L2 Sanger 测序及对 40 例宫颈组织细胞 DNA 高通量测序,构建 HPV16 E4 和 L2 基因系统进化树,分析 HPV16 E4 和 L2 基因的变异特征。结果 有 72 个 HPV16 E4 变异样本,10 个核苷酸变异位点(4 种错义变异和 7 种同义变异),74 个 HPV16 L2 变异样本,40 个核苷酸变异位点(23 种错义变异和 18 种同义变异)。宫颈癌(CC)中 T4177C、A4288C、A4654C 变异频率明显高于非宫颈癌,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 ① 新疆维吾尔自治区主要流行病毒株为欧洲株,少数为亚洲株。② HPV16 L2 基因中 T4177C、A4288C、A4654C 在宫颈癌中的变异频率高于非宫颈癌,且 G4181A 与亚洲株相关。

**关键词** 人乳头瘤病毒 16; 基因变异; 宫颈癌; E4 和 L2 基因; 单核苷酸多态性

**中图分类号** R 373.9

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1884-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.014

2023-07-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82060518、U1503125);新疆生产建设兵团国际科技合作计划项目(编号:2019BC007)

作者单位:<sup>1</sup> 石河子大学医学院生物化学教研室,新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室,石河子 832002

<sup>2</sup> 石河子大学医学院人体解剖学与组织胚胎学教研室,石河子 832002

作者简介:程豪政,男,硕士研究生;

潘泽民,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: panteacher89@sina.com

宫颈癌(cervical cancer, CC)是妇女恶性肿瘤死亡的第四大因素<sup>[1]</sup>。据报道<sup>[2]</sup>,中国新疆维吾尔自治区宫颈癌发病率与病死率很高,该地区人乳头瘤病毒(Human Papillomavirus, HPV)阳性率为 14.02%,其中多为 HPV52、HPV53、HPV16 和 HPV18。

研究<sup>[3]</sup>表明,感染 HPV16 具有更强的致病性和致癌性。HPV16 分为 A 谱系、B 谱系、C 谱系和 D 谱系 4 种变异谱系<sup>[4]</sup>,中国新疆维吾尔自治区女性感染 HPV16 以欧洲病毒株为主<sup>[5]</sup>。HPV16 E4 基因产物 E4 蛋白质,是 HPV 表达量最高的蛋白质,其氨基酸主要来源于 E4 开放阅读框(open reading frame, ORF),且 E4 ORF 包含在 E2 ORF 内<sup>[6-7]</sup>。E4 蛋白质可增强病毒复制和病毒粒子的排出<sup>[8-10]</sup>。HPV 衣壳蛋白质在病毒进入细胞与细胞核的过程中起关键作用<sup>[11-12]</sup>。L2 促进了病毒基因组的逆行运输,促进细胞间期将病毒基因组整合到宿主基因<sup>[13-14]</sup>。新疆维吾尔自治区 HPV16 E4 和 L2 基因的变异及分布特征尚不清楚,因此,研究 HPV16 E4 和 L2 基因变异,有助于发现 HPV16 基因变异位点与宫颈癌的发生和发展的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 样本的采集** 在伊犁州友谊医院、喀什地区人民医院和石河子大学附属医院共收集了 80 例患者的 HPV16 感染阳性的宫颈细胞样本(脱落细胞 40 例,组织细胞 40 例);样本收集取得了所有患者的知情同意。所有患者都无外地的长期旅居史,收集

GAP1 group significantly decreased (all  $P < 0.01$ ). circ-RACGAP1 could target and inhibit the expression of miR-4324 ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the expression level of RACGAP1 protein in T24 cells in the sh-circ-RACGAP1 group decreased ( $P < 0.01$ ), and the expression levels of PI3K/AKT signaling pathway proteins phosphatidylinositol-3-kinase (p-PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-AKT), nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) decreased (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** circ-RACGAP1 is highly expressed in bladder cancer tissues and cell lines, knocking down circ-RACGAP1 can inhibit the malignant biological behavior of T24 cells, and circ-RACGAP1 plays a role by inhibiting the expression of miR-4324 and activating the PI3K/AKT signaling pathway.

**Key words** bladder cancer; circular RNA; circ-RACGAP1; miR-4324