

基于高通量测序技术的胰腺癌环状 RNA 差异表达谱分析

付晓伟*, 欧阳永灏*, 洪乐, 孙根, 辛万鹏, 易思清, 肖卫东

摘要 目的 筛查胰腺癌组织环状 RNA (circRNA) 差异表达谱并初步分析其潜在功能。方法 随机选取 4 对胰腺癌组织和对应癌旁胰腺组织标本进行高通量测序,按表达量差异倍数 > 2 且 $P < 0.05$ 为筛选标准,筛选差异表达的 circRNA。qRT-PCR 检测随机选取的 5 个差异表达的 circRNA 在 20 对胰腺癌组织标本中的表达,对测序结果进行验证。对差异表达的 circRNA 进行 GO 和 KEGG 富集分析,并构建 top50 circRNA-microRNA 互作网络图。进一步分析 hsa_circ_0046523 与胰腺癌临床病理特征的关系,并通过敲减试验观察其对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果 高通量测序共预测出 17 182 个 circRNA,在胰腺癌组织中差异表达的 circRNA 有 302 个,其中 137 个表达上调,165 个表达下调。qRT-PCR 结果显示,与癌旁组织相比,胰腺癌组织中 hsa_circ_0046523、hsa_circ_0004220 和 hsa_circ_0000690 表达水平上调 ($P < 0.05$), hsa_circ_0008676 和 hsa_circ_0004416 表达水平下调 ($P < 0.05$),与测序结果一致。GO 分析提示差异表达的 circRNA 主要参与底物依赖性细胞迁移、蛋白激酶复合物和细胞骨架蛋白结合等过程。KEGG 通路富集分析显示差异表达的 circRNA 主要参与蛋白消化和吸收通路、ABC 转运蛋白通路、癌症中心碳代谢通路以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路等。hsa_circ_0046523 表达水平与胰腺癌肿瘤分化程度 ($P = 0.002$)、T 分期 ($P = 0.006$)、淋巴结转移 ($P = 0.011$) 及 TNM 分期 ($P = 0.001$) 密切相关。与 HPDE6-C7 细胞相比,hsa_circ_0046523 在胰腺癌细胞 SW1990、Mia PaCa-2、BxPC-3 和 Capan-2 中的表达水平升高 ($P < 0.05$)。下调 hsa_circ_0046523 的表达可以抑制胰腺癌细胞 (Mia PaCa-2、BxPC-3) 的增殖、迁移及侵袭能力 ($P < 0.05$)。结论 胰腺癌组织中存在特征性差异表达的 circRNA,这些差异表达的 circRNA 可能参与胰腺癌的发生发展。

关键词 环状 RNA;胰腺癌;表达谱;增殖;迁移;侵袭

中图分类号 R 735.9

2022-08-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81860418);江西省自然科学基金重点项目(编号:20202ACB206007);南昌大学研究生创新专项基金项目(编号:CX2018184)

作者单位:南昌大学第一附属医院普外科,南昌 330006

作者简介:付晓伟,男,博士研究生;

肖卫东,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: frankxwd@126.com

* 对本文具有同等贡献

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)01-0101-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.017

胰腺癌是一种恶性程度高、预后差的消化系统恶性肿瘤,总体 5 年生存率仅 9% 左右^[1]。国内资料显示,胰腺癌的发病率居恶性肿瘤第 9 位,死亡率居第 6 位。据国外学者预测,到 2030 年,美国的胰腺癌死亡率将升至恶性肿瘤死亡率的第二位。大部分胰腺癌患者早期缺乏特异性临床表现,就诊时已处于中晚期,导致手术切除率不足 20%^[2]。因此,积极寻求新的有效的胰腺癌诊治靶点成为临床迫切需求。环状 RNA (circular RNA, circRNA) 是一类不具有 5' 末端帽子和 3' 末端 polyA 尾巴并以共价键形成环形结构的 RNA 分子。近年来越来越多研究^[3-4]证实, circRNA 异常表达参与恶性肿瘤的发生发展过程。然而,在胰腺癌中 circRNA 的表达及其功能目前仍不清楚。该研究旨在筛查胰腺癌组织中 circRNA 差异表达谱,并结合生物信息学方法初步分析 circRNA 在胰腺癌发生发展过程中的作用和调控机制。同时,选择 hsa_circ_0046523 进一步行功能研究,探讨其在胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭中的作用,以期寻找治疗胰腺癌的潜在诊治靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 收集 2018 年 9 月—2020 年 12 月在医院接受手术切除的 40 对胰腺癌患者的肿瘤组织和相应癌旁胰腺组织标本。其中男 16 例,女 24 例,年龄 42~73 (62.43 ± 7.348) 岁;27 例肿瘤位于胰头,13 例肿瘤位于胰体尾; I 期 8 例, II 期 23 例, III 期 9 例。入选病例符合以下纳入标准:① 术后肿瘤组织经病理证实为胰腺导管腺癌,癌旁组织经病理证实为非癌组织。② 患者术前未行放疗化疗等抗肿瘤治疗;③ 临床资料完善。排除临床资料不完整、术前行放疗化疗或合并其它肿瘤的患者。本研究纳入的所有患者均已知情并签署知情同意书,本研究经南昌大学第一附属医院伦理委员会审核通过。

1.1.2 实验主要试剂 mirVana™ miRNA 分离试剂盒 (Ambion, 美国); RNA Nano 6000 试剂盒 (Agilent, 美国); TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold 试剂盒 (Illumina, 美国); TRIzol 试剂 (Thermo Fisher Scientific, 美国); PrimeScript RT 试剂盒 (Takara, 大连); pLKO.1-EGFP-Puro (吉凯, 上海); Lipofectamine 3000 (Invitrogen, 美国); CCK8 试剂盒 (Elabscience, 武汉); Transwell 小室 (Corning, 美国)。正常胰腺导管上皮细胞 HPDE6-C7、胰腺癌细胞 SW1990、Mia PaCa-2、BxPC-3 购自中国科学院细胞库; 胰腺癌细胞 Capan-2 购自美国 ATCC 公司。hsa_circ_0046523 敲减慢病毒载体 (sh-circRNA) 及其阴性对照 (sh-NC) 由上海吉凯公司合成。

1.2 材料

1.2.1 高通量测序及差异表达 circRNA 筛选 选择 4 对胰腺癌组织标本, 采用 mirVana™ miRNA 分离试剂盒提取总 RNA。ND-1000 微量紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度; RNA Nano 6000 试剂盒评估 RNA 的完整性。RNA 完整性数 (RNA integrity number, RIN) ≥ 7 的样品才用于后续分析。根据试剂盒说明书使用 TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold 构建文库, 构建好的 RNA 文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 质检合格后, 使用 Illumina 测序仪 (HiSeq™ 2500) 进行测序。所有测序程序和分析由上海欧易生物医学科技有限公司完成。首先通过 CIRI2 软件进行 circRNA 预测, 然后通过 circBase、CIRCpedia v2 和 circ2Trait 数据库对预测的 circRNA 进行比较和注释并计算各个 circRNA 的 RPM 值。利用 DESeq 软件计算两组配对样品中 circRNA 差异倍数, 并采用 NB (负二项分布检验的方式) 对 reads 数进行差异显著性检验, 按表达量差异倍数 > 2 且 $P < 0.05$ 为筛选标准, 筛选差异表达的 circRNA。根据差异表达的 circRNA 绘制火山图和聚类图。

1.2.2 qRT-PCR 验证 circRNA 表达 随机挑选差异表达谱中 5 个 circRNAs, 在 20 对胰腺癌组织标本中进行 qRT-PCR 验证, 以 GAPDH 为内对照, 引物序列见表 1。TRIzol 试剂提取组织总 RNA, 测定浓度和纯度。将 RNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 qPCR。反应体系: cDNA 1 μ l, Ssofast EvaGreen Supermix 10 μ l, 上下游引物各 0.8 μ l, DEPC 水补充体积至 20 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 94 $^{\circ}$ C, 5 s, 60 $^{\circ}$ C, 30 s, 共 40 个循环。2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 表示目的 circRNA 的

相对表达量。

表 1 目的 circRNA 的引物序列

CircRNA ID	引物	序列(5'-3')
hsa_circ_0046523	Forward	CGCAGCCAATGATAGACCAC
	Reverse	GATCACGGCGACAACCATC
hsa_circ_0004220	Forward	CCTGCTGCATAAGACCTTGTC
	Reverse	GAGCCAGTTTACTCCCTCCA
hsa_circ_0000690	Forward	GCTGCAGAAGAAGATCTATGTCA
	Reverse	TCCGTGATGATGATAAGCACTT
hsa_circ_0008676	Forward	GCTGCATATGGGAAGACAGTC
	Reverse	AGATGAATCGGATGCGTTCTG
hsa_circ_0004416	Forward	GTTTCCTTAAAGTGCCTCGATCT
	Reverse	AATGAAGTTACAGATGGACAAGC
GAPDH	Forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	Reverse	TGGTGAAGACGCCAGTGA

1.2.3 差异 circRNA 亲本基因的 GO 和 KEGG 富集分析 对差异表达 circRNA 亲本基因进行 GO 富集分析, 统计每个 GO 条目所包含的差异基因数量, 计算每个 GO 条目中差异基因富集的显著性。利用 KEGG 数据库对差异表达的 circRNA 亲本基因进行通路分析, 计算差异表达的 circRNA 富集的每条通路的显著性。P < 0.05 为富集差异有统计学意义。

1.2.4 circRNA 与 microRNA 相互作用预测 通过 miRanda 和 Targetscan 7.2 软件结合统计分析进行 circRNA-microRNA 相互作用预测。鉴定在差异 circRNA 中影响较大的 microRNA, 使用 Cytoscape 软件绘制 circRNA-microRNA 相互作用网络。

1.2.5 hsa_circ_0046523 在胰腺癌细胞和组织中的表达 HPDE6-C7、SW1990、Mia PaCa-2、BxPC-3 和 Capan-2 细胞常规使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 或 DMEM 培养基, 置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱内孵育。取对数生长期的细胞用于实验。qRT-PCR 检测上述 5 株细胞及 40 对胰腺癌组织标本中 hsa_circ_0046523 的表达。根据 hsa_circ_0046523 相对表达量的中位值, 将 40 例胰腺癌患者分为 hsa_circ_0046523 高表达组 (\geq 中位值) 和低表达组 ($<$ 中位值), 分析其与胰腺癌临床病理特征的关系。

1.2.6 下调 hsa_circ_0046523 表达对胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响 将胰腺癌细胞株 Mia PaCa-2 及 BxPC-3 细胞接种于 24 孔板, 每孔接种 0.5 $\times 10^5$ 个。采用 Lipofectamine 3000 将 hsa_circ_0046523 敲减慢病毒载体 (sh-circRNA) 及其阴性对照载体 (sh-NC) 分别转染 BxPC-3 和 Mia PaCa-2 细胞, 转染 48 h 后 qRT-PCR 检测转染效率, 并用于后

续功能实验。CCK-8 增殖试验:将各组胰腺癌细胞种植在 96 孔板中,细胞个数为每孔 5 000 个,每组设 3 个复孔。分别在孵育 1、2、3、4 d 添加 10 μ l CCK-8 试剂,于培养箱中继续孵育 2 h。酶标仪测定波长在 450 nm 处的吸光度值。Transwell 迁移侵袭试验:调整细胞浓度至 2×10^5 个/ml,吸取 200 μ l 无血清细胞培养基加入 Transwell 上室(侵袭实验时在上室中铺一层 Matrigel 胶),下室中加入 700 μ l 含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液。培养 48 h 后取出上室,浸入甲醛中固定并用结晶紫染色,显微镜下观察并计算细胞数目,随机选取视野进行拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较用 *t* 检验;偏态分布的计量资料以 M (范围)表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。

计数资料用 *n* (%) 表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌组织差异 circRNA 表达谱 本研究共预测出 17 182 个 circRNA,各样本鉴定得到的 circRNA 数目情况见图 1A;将鉴定的 circRNA 与 circBase 数据库 (<http://www.circbase.org>) 进行比较,结果显示其中 16 669 个已有报道,其余 513 个为首次发现(图 1B)。按设定的筛选标准,共筛选出 302 个胰腺癌差异表达 circRNA,其中 137 个表达上调,165 个表达下调(图 1C)。进一步根据差异性表达的 circRNA 绘制火山图(图 1D)及热图(图 1E)。

2.2 差异表达的 circRNA 验证 为进一步验证高

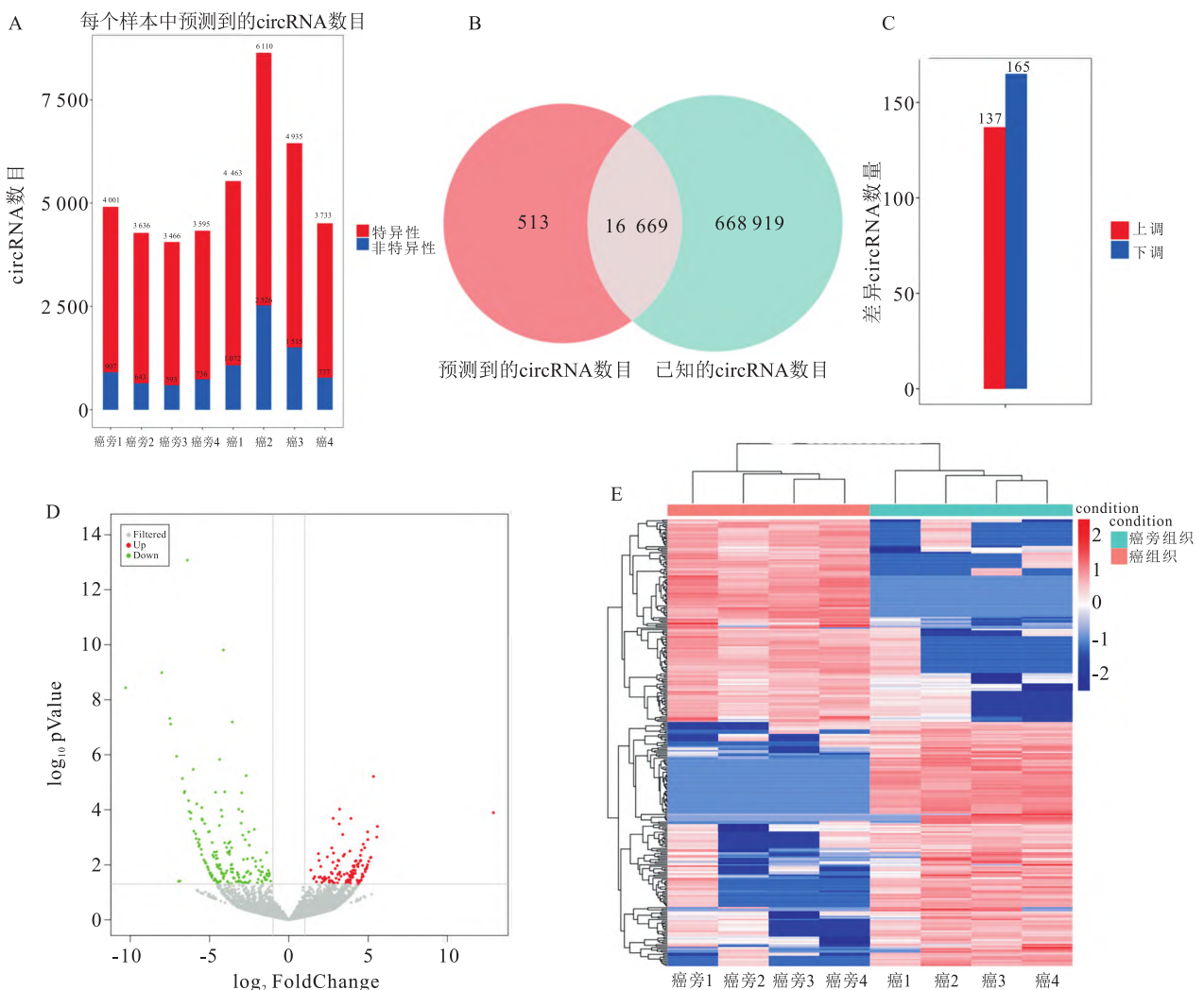


图 1 胰腺癌组织中 circRNA 表达谱分析

A:各样本中鉴定得到的 circRNAs 数目;B:测序结果中在 circBase 中已报道的 circRNAs 及本研究中新发现的 circRNAs 数目;C:差异表达 circRNAs 统计柱状图;D:差异表达 circRNAs 统计火山图;E:差异表达 circRNAs 聚类分析图

通量测序结果的准确性,本研究在差异 circRNAs 表达谱中随机选取了 5 个 circRNAs,包括 hsa_circ_0046523、hsa_circ_0004220、hsa_circ_0000690、hsa_circ_0008676 和 hsa_circ_0004416。qRT-PCR 检测该 5 个 circRNA 在 20 对胰腺癌组织中的表达。结果显示,与癌旁组织相比,hsa_circ_0046523 ($t = 3.047, P = 0.0066$)、hsa_circ_0004220 ($t = 3.935, P = 0.0009$)及 hsa_circ_0000690 ($t = 4.344, P = 0.0003$)在胰腺癌组织中表达上调,而 hsa_circ_0008676 ($t = 3.868, P = 0.0010$)和 hsa_circ_0004416 ($t = 4.260, P = 0.0004$)表达则下调。各差异性表达 circRNA 的 qRT-PCR 检测结果与高通量测序结果一致(图 2)。

2.3 差异表达 circRNA 亲本基因的 GO 分析和 KEGG 分析 GO 分析结果显示,在生物学过程(biological process, BP)分类中,差异表达 circRNA 亲本基因主要参与底物依赖性细胞迁移(substrate-dependent cell migration);在细胞组分(cellular component, CC)分类中,差异表达 circRNA 亲本基因主要富集于蛋白激酶复合物(protein kinase complex);在分子功能(molecular function, MF)分类中,差异表达 circRNA 亲本基因主要参与细胞骨架蛋白结合(cytoskeletal protein binding)。胰腺癌组织中差异表达 circRNA 亲本基因在 BP、CC 和 MF 中富集得分前 10 位 GO 条目见图 3。进一步 KEGG 通路富集分析发现差异表达 circRNA 亲本基因参与多条信号通

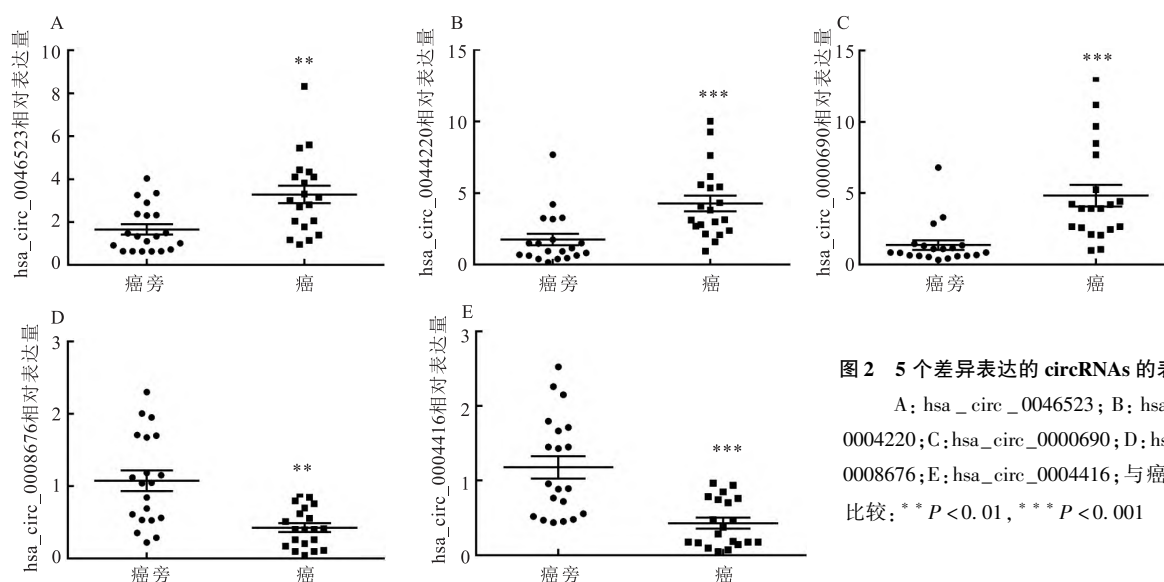


图 2 5 个差异表达的 circRNAs 的表达验证
A: hsa_circ_0046523; B: hsa_circ_0004220; C: hsa_circ_0000690; D: hsa_circ_0008676; E: hsa_circ_0004416; 与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

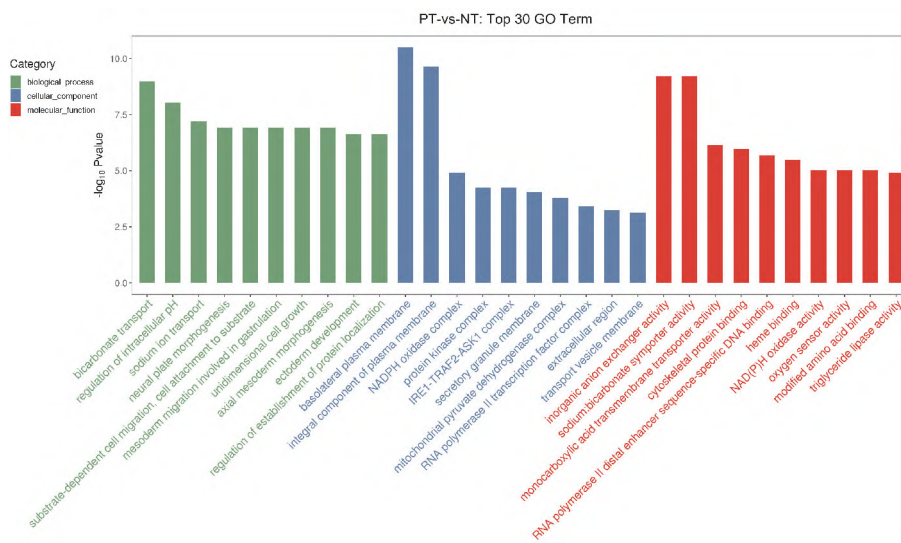


图 3 胰腺癌组织中差异表达 circRNAs 亲本基因的 GO 分析
绿色:生物学功能;蓝色:细胞成分;红色:分子功能

路,如蛋白消化和吸收通路、ABC 转运蛋白通路、癌症中心碳代谢、糖胺聚糖生物合成通路以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路等,排名前 20 的信号通路见图 4。

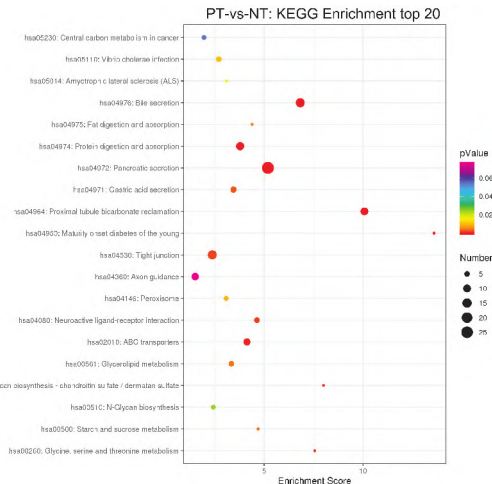


图 4 胰腺癌组织中差异表达 circRNA 亲本基因的 KEGG 富集分析

2.4 circRNA-microRNA 互作分析 选取 top50 circRNA-microRNA 相互作用对,构建调控网络图(图 5)。结果提示 circRNA 与 microRNA 有着复杂的调控关系,一个 circRNA 可以对应多个 microRNA,而一个 microRNA 也可以与多个 circRNAs 有相互作用关系。预测的与 circRNA_05392 (hsa_circ_0103136)结合的 microRNA 包括 hsa-miR-4801, hsa-miR-1269b, hsa-miR-3622a-3p 和 hsa-miR-5000-3p;而与 hsa-miR-6884-3p 结合的差异 circRNA 有 circRNA_13794 (Chr6:35781017_35788152_+), circRNA_06645 (hsa_circ_0041147), circRNA_14696 (hsa_circ_0134131), circRNA_11813 (Chr4:1056248_1113562_-), circRNA_06649 (hsa_circ_0041153) 和 circRNA_06647 (hsa_circ_0041150)。

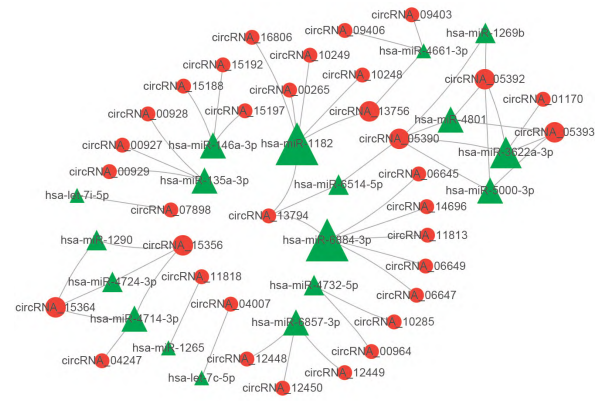


图 5 circRNA-microRNA 网络构建图

2.5 hsa_circ_0046523 在胰腺癌中的表达及其与临床病理特征的关系 hsa_circ_0046523 位于 chr17:80828099-80858607,由 5 个外显子拼接而成,剪切体长 412 bp,基因符号:TBCD (<http://www.circbase.org>),为外显子来源的 circRNA。与癌旁正常组织相比,胰腺癌组织中 hsa_circ_0046523 的相对表达水平升高 ($P < 0.05$,图 6A)。与 HPDE6-C7 相比,胰腺癌细胞株 SW1990、Mia Paca-2、BxPC-3 及 Capan-2 中 hsa_circ_0046523 的表达水平升高 ($P < 0.05$,图 6B)。hsa_circ_0046523 表达水平与胰腺癌肿瘤分化程度 ($P = 0.002$)、T 分期 ($P = 0.006$)、淋巴结转移 ($P = 0.011$) 及 TNM 分期 ($P = 0.001$) 有关,而与性别 ($P = 0.398$)、年龄 ($P = 1.000$) 及神经浸润 ($P = 0.651$) 无关(表 2)。

2.6 敲减 hsa_circ_0046523 抑制胰腺癌细胞增殖、迁移及侵袭 qRT-PCR 检测敲减 hsa_circ_0046523 后其在 BxPC-3 及 Mia PaCa-2 细胞株中的表达情况,结果显示均有明显下降 ($P < 0.05$,图 7A)。CCK8 试验结果显示,下调 hsa_circ_0046523 表达后,BxPC-3 及 Mia PaCa-2 细胞增殖活性低于对照组

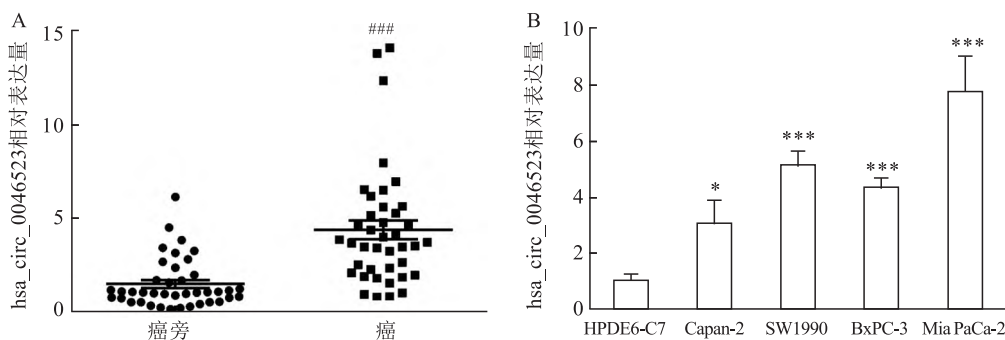


图 6 hsa_circ_0046523 在胰腺癌组织及细胞中高表达

A:胰腺癌组织;B:胰腺癌细胞;与癌旁组织比较:### $P < 0.001$;与 HPDE6-C7 比较:* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$

表2 hsa_circ_0046523 表达与胰腺癌患者
临床病理特征的关系 [n(%)]

病理特征	n	hsa_circ_0046523		χ^2	P 值
		高表达	低表达		
性别				0.714	0.398
男	16	6(37.5)	10(62.5)		
女	24	6(25.0)	18(75.0)		
年龄(岁)				0.000	1.000
≥ 60	20	6(30.0)	14(70.0)		
< 60	20	6(30.0)	14(70.0)		
T 分期				9.998	0.006*
T1	16	1(6.25)	15(93.75)		
T2	13	4(30.8)	9(69.2)		
T3	11	7(63.6)	4(36.4)		
神经浸润				0.204	0.651
是	28	9(32.1)	19(67.9)		
否	12	3(25.0)	9(75.0)		
分化程度				9.231	0.003
高	14	0(0.0)	14(100.0)		
低/中	26	12(46.2)	14(53.8)		
淋巴结转移				6.502	0.017
否	11	0(0.0)	11(100.0)		
是	29	12(41.4)	17(58.6)		
TNM 分期				12.595	0.001*
I	8	0(0.0)	8(100.0)		
II	23	5(21.7)	18(78.3)		
III	9	7(77.8)	2(22.2)		

与低表达组比较: * $P < 0.05$

($P < 0.05$, 图 7B)。Transwell 试验结果显示, 下调 hsa_circ_0046523 表达后, BxPC-3 及 Mia PaCa-2 细胞迁移及侵袭能力低于对照组($P < 0.05$, 图 7C、D)。

3 讨论

作为一类特殊的环状 RNA, circRNA 因其结构稳定, 表达丰度高, 且具有组织特异、高度保守等特性而逐渐成为目前 RNA 领域研究的最新热点^[5-6]。目前认为 circRNA 主要通过以下四种机制发挥作用: ① microRNA 的海绵作用; circRNA 可竞争性结合 microRNA, 抑制其与下游靶基因的结合, 从而间接调控其靶基因的表达; ② 顺式调控亲本基因的表达; 外显子-内含子 circRNA (exon-intron circRNA, EIciRNA) 主要定位于细胞核内, 可与 RNA 聚合酶 II 相互作用, 促进其亲本基因的转录; ③ 调节 RNA 结合蛋白 (RNA-binding proteins, RBPs); circRNA 可竞争性结合 RBPs 结合, 调节相应 RBPs 或 RNAs 的胞内运输; ④ 蛋白翻译功能; 部分 circRNA 拥有内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES), 从而发挥编码作用。

随着测序技术的发展, 越来越多的与胰腺癌相

关的 circRNA 被发现。2016 年, Li et al^[7] 率先采用 Arraystar circRNA 芯片技术检测 6 对胰腺癌组织和相应癌旁正常组织中 circRNA 的表达, 结果显示: 与癌旁组织相比, 胰腺癌组织中有 351 个 circRNA 异常表达, 其中 209 个 circRNA 表达上调。随后, Guo et al^[8] 通过测序技术检测, 发现与癌旁组织相比, 有 128 个 circRNA 表达上调, 161 个 circRNA 表达下调。此外, 另一项使用 circRNA 测序的研究发现, 169 个 circRNA 在胰腺癌细胞和胰腺上皮细胞之间存在差异表达^[9]。综上所述, 胰腺癌中有大量的 circRNA 表达异常, 这些 circRNA 可能参与了胰腺癌的发展。同样的, 本研究利用高通量测序技术对 4 对胰腺癌及其癌旁组织进行分析, 共预测出 17 182 条 circRNA, 进一步筛选出 302 个胰腺癌差异表达 circRNA, 其中 137 个表达上调, 165 个表达下调。随后, 本研究随机选择 5 个差异表达的 circRNA 进行表达验证, 证实了测序结果的可靠性及准确性。总之, 本研究结果再次证实胰腺癌组织中存在差异表达的 circRNA, 这些差异表达的 circRNA 可能参与了胰腺癌的发生发展。而现有研究中差异表达的 circRNA 种类不一致, 可能是由于检测方法和样本量不一以及胰腺癌本身的肿瘤异质性等因素所致。

近年来, 越来越多的证据表明 circRNA 在胰腺癌癌变进程中发挥着重要作用。为初步探讨差异表达 circRNA 在胰腺癌中的潜在功能, 本研究对胰腺癌差异表达 circRNA 的亲本基因进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。GO 数据库包含生物学过程, 细胞组分和分子功能三大类, 可用来定义基因产物的属性。KEGG 是系统分析基因功能, 联系基因组信息和功能信息的数据库, 可分析差异 circRNA 可能与哪些通路相关。在本次研究中, GO 分析和 KEGG 通路分析提示差异 circRNA 主要参与碳酸氢盐转运、基底外侧质膜、无机阴离子交换活性等过程, 可能与蛋白消化和吸收通路, ABC 转运蛋白通路, 糖胺聚糖生物合成通路, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路等有关。虽然差异 circRNA 参与胰腺癌中多个调控机制, 但后续研究可以针对性找寻某个有可能抑制胰腺癌发生发展的生物学过程、细胞组分或者分子功能, 专门研究某个通路过程, 以寻找新的临床诊断标志物或治疗靶点, 对胰腺癌的临床治疗具有重大的科学意义。

目前研究^[10-11] 报道的 circRNA 的主要作用机制为通过“海绵”样吸附 microRNA, 从而上调

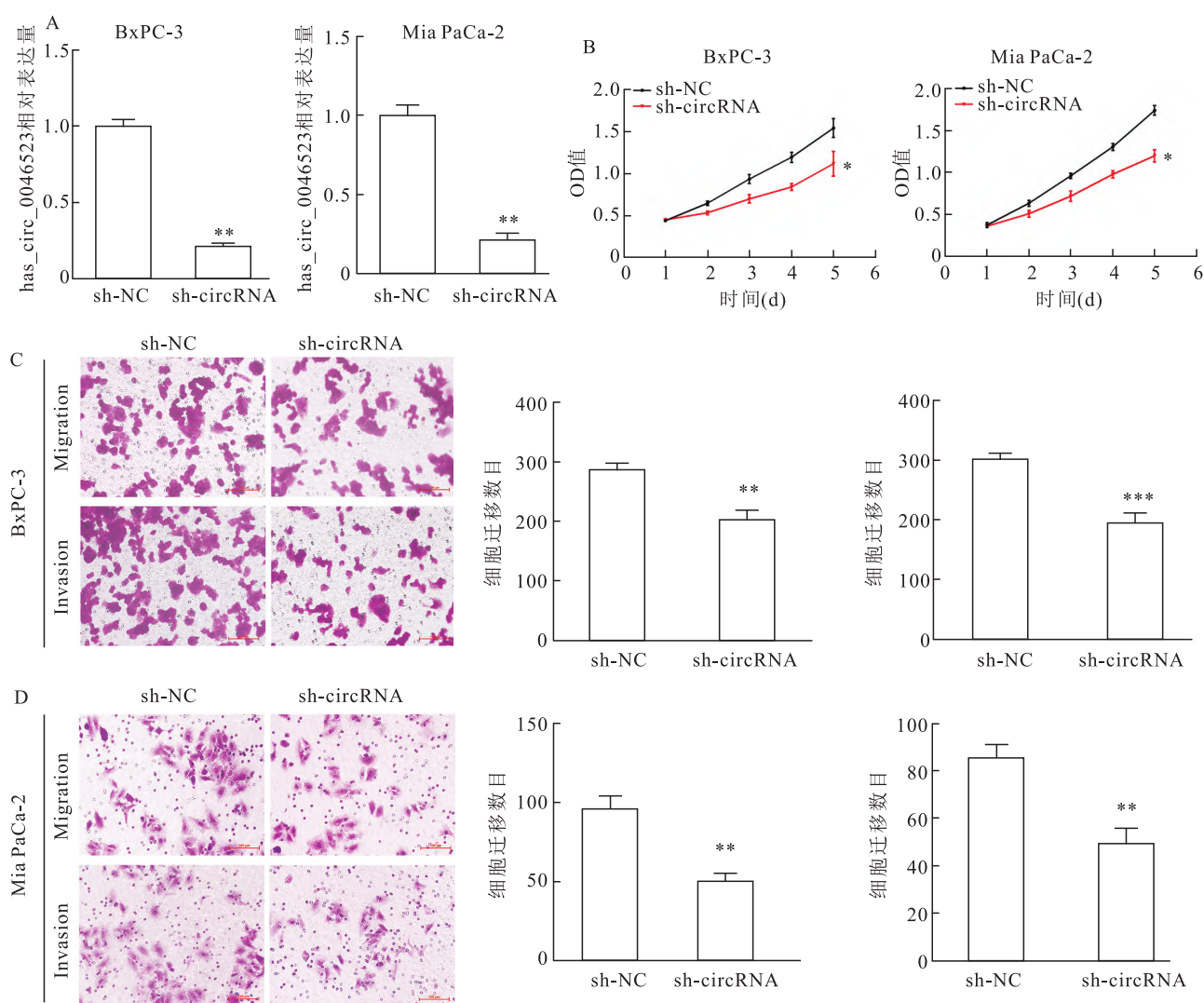


图7 敲减 hsa_circ_0046523 抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力

A: 转染效率验证; B: CCK-8 试验检测敲减 hsa_circ_0046523 后, 胰腺癌细胞 BxPC-3 及 Mia PaCa-2 增殖能力的变化; C、D: Transwell 试验检测敲减 hsa_circ_0046523 后, 胰腺癌细胞 BxPC-3 及 Mia PaCa-2 迁移及侵袭能力的变化 $\times 40$; 与 sh-NC 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

microRNA 下游的靶基因来发挥作用。在胰腺癌中亦是如此, 如 circ-ASH2L 在胰腺癌中高表达, 且通过海绵吸附 miR-34a 调控 Notch 1 信号通路, 从而促进胰腺癌侵袭、增殖和血管生成^[12]。CircNFIB1 (hsa_circ_0086375) 在胰腺癌中下调, 并与患者淋巴结转移负相关; 进一步研究^[13]显示 circNFIB1 作为 miR-486-5p 海绵调控 PIK3R1 的表达, 抑制 PI3K/Akt 通路的激活, 最终抑制胰腺癌的淋巴管生成和淋巴结转移。CircBFAR (hsa_circ_0009065) 在胰腺导管腺癌患者组织中上调, 且通过海绵吸附 miR-34b-5p, 上调间充质上皮转移因子 (MET) 的表达, 激活 MET/PI3K/Akt 信号通路, 从而促进胰腺癌的进展^[14]。为此, 本研究通过 miRanda 和 TargetScan 数据库预测与差异 circRNA 存在结合位点的 microRNA, 构建 top 50 microRNA-circRNA 靶向调控网络图

进行展示, 以期发现在胰腺癌中发挥重要作用的特征性 circRNA 及其调控机制, 为胰腺癌的诊断和治疗提供新的思路及方向。此外, 本研究还证实 hsa_circ_0046523 在胰腺癌细胞和组织中呈高表达, 且 hsa_circ_0046523 表达水平与肿瘤分化程度、T 分期、淋巴结转移及 TNM 分期有关; 下调 hsa_circ_0046523 表达可以抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力。该结果提示, hsa_circ_0046523 有望成为胰腺癌的治疗靶点及预后标志物。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, et al. Cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33
- [2] Takeda T, Sasaki T, Mie T, et al. Improved prognosis of pancreatic cancer patients with peritoneal metastasis [J]. Pancreatology, 2021, 21(5): 903-11.

- [3] Chen L, Shan G. CircRNA in cancer: Fundamental mechanism and clinical potential[J]. *Cancer Lett*, 2021,505: 49–57.
- [4] 高敏, 刘文博, 赵奇红, 等. 环状RNA hsa_circ_0010985对胃癌细胞增殖与凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(9): 1387–91.
- [5] He A T, Liu J, Li F, et al. Targeting circular RNAs as a therapeutic approach: current strategies and challenges[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 185.
- [6] Limb C, Liu D, Veno M T, et al. The role of circular RNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma and biliary-tract cancers[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(11): 3250.
- [7] Li H, Hao X, Wang H, et al. Circular RNA expression profile of pancreatic ductal adenocarcinoma revealed by microarray[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016,40(6): 1334–44.
- [8] Guo S, Xu X, Ouyang Y, et al. Microarray expression profile analysis of circular RNAs in pancreatic cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2018,17(6): 7661–71.
- [9] Wong C H, Lou U K, Li Y, et al. CircFOXK2 promotes growth and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma by complexing with RNA-binding proteins and sponging MiR-942[J]. *Cancer Res*, 2020,80(11): 2138–49.
- [10] Song N, Li X, Cui Y, et al. Hydrogen sulfide exposure induces pyroptosis in the trachea of broilers *via* the regulatory effect of circRNA-17828/miR-6631-5p/DUSP6 crosstalk on ROS production[J]. *J Hazard Mater*, 2021, 418: 126172.
- [11] Kong Y, Li Y, Luo Y, et al. circNFIB1 inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis *via* the miR-486-5p/PIK3R1/VEGF-C axis in pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 82.
- [12] Chen Y, Li Z, Zhang M, et al. Circ-ASH2L promotes tumor progression by sponging miR-34a to regulate Notch1 in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 466.
- [13] Kong Y, Li Y, Luo Y, et al. circNFIB1 inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis *via* the miR-486-5p/PIK3R1/VEGF-C axis in pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020,19(1): 82.
- [14] Guo X, Zhou Q, Su D, et al. Circular RNA circBFAR promotes the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma *via* the miR-34b-5p/MET/Akt axis[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 83.

Analysis of differential expression profile of circRNA in pancreatic cancer based on high-throughput sequencing technology

Fu Xiaowei, Ouyang Yonghao, Hong Le, Sun Gen, Xin Wanpeng, Yi Siqing, Xiao Weidong
(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006)

Abstract Objective To screen the differential expression profile of circular RNA (circRNA) in pancreatic cancer and analyze its potential function. **Methods** Four pairs of pancreatic cancer tissues and corresponding adjacent pancreatic tissues were selected for high-throughput sequencing, and the differentially expressed circRNA was screened according to fold change >2 and $P < 0.05$. qRT-PCR was used to detect the expression of 5 randomly selected differentially expressed circRNA in 20 pairs of pancreatic cancer tissue samples. GO and KEGG enrichment analysis of differentially expressed circRNA was performed, and the top 50 circRNA-microRNA interaction network was constructed. The relationship between hsa_circ_0046523 and the clinicopathological features of pancreatic cancer was further analyzed, and the effects of hsa_circ_0046523 on the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells were observed by functional experiments. **Results** A total of 17 182 circRNA were predicted by high-throughput sequencing, of which 302 circRNA were differentially expressed including 137 circRNA were upregulated and 165 circRNA were downregulated in pancreatic cancer tissues. The qRT-PCR results showed that the expression levels of hsa_circ_0046523, hsa_circ_0004220 and hsa_circ_0000690 in pancreatic cancer tissues were significantly upregulated ($P < 0.05$), while the expression levels of hsa_circ_0008676 and hsa_circ_0004416 were significantly downregulated ($P < 0.05$), which was consistent with the sequencing results. GO analysis indicated that differentially expressed circRNA were mainly involved in substrate-dependent cell migration, protein kinase complex and cytoskeletal protein binding. KEGG pathway enrichment analysis showed that differentially expressed circRNA were mainly involved in protein digestion and absorption, ABC transporters, central carbon metabolism in cancer, and glycine, serine and threonine metabolism pathways. The expression level of hsa_circ_0046523 was closely correlated with tumor differentiation ($P = 0.002$), T stage ($P = 0.006$), lymph node metastasis ($P = 0.011$) and TNM stage ($P = 0.001$). Compared with HPDE6-C7 cells, the expression of hsa_circ_0046523 significantly increased in pancreatic cancer SW1990, Mia PaCa-2, BxPC-3 and Capan-2 cells ($P < 0.05$). hsa_circ_0046523 knockdown significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer Mia PaCa-2 BxPC-3 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** There are characteristic differentially expressed circRNAs in pancreatic cancer tissues, and these differentially expressed circRNAs may be involved in the occurrence and development of pancreatic cancer.

Key words circular RNA; pancreatic cancer; expression profile; proliferation; migration; invasion