

circHIPK3 促进鼻咽癌细胞 5-8F 迁移和侵袭的机制

邵文婷¹, 吕磊², 高劲³

摘要 目的 探讨环状 RNA HIPK3 (circHIPK3) 在鼻咽癌 (NPC) 细胞迁移和侵袭中的作用及其分子机制。方法 检索公共数据库, 运用高通量基因表达数据库 (GEO) 分析 NPC 组织及非癌组织中 circHIPK3 表达水平; 合成 circHIPK3-siRNA 转染 NPC 5-8F 细胞; 采用 RT-qPCR、Western blot、细胞划痕、CCK-8 和 Transwell 等实验方法, 研究确定 circHIPK3-siRNA 干扰效果后, 检测它对细胞增殖、迁移和侵袭及潜在下游基因 *CDH1*、*CDH2*、*MMP2*、*MMP9*、*IL-6/STAT3* 表达的影响。运用转录组测序技术分析 5-8F 细胞 circHIPK3-siRNA 干扰后显著差异表达的基因, 以期找到介导 circHIPK3 促癌作用的关键基因。**结果** 与非癌组织相比, NPC 组织中 circHIPK3 表达明显增加 ($P < 0.05$)。使用 siRNA 特异性敲低 5-8F 细胞中 circHIPK3 的表达后, 与对照组相比, si-circHIPK3 组细胞增殖速率降低 ($P < 0.05$), si-circHIPK3 组细胞划痕闭合率降低 ($P < 0.01$), 同时 si-circHIPK3 组细胞迁移和侵袭的细胞数目减少 ($P < 0.05$)。此外, 与对照组相比, si-circHIPK3 组下游基因 *CDH1* mRNA 和蛋白的表达量升高 ($P < 0.001$), *CDH2*、*MMP2*、*MMP9*、*IL-6/STAT3* mRNA 和蛋白的表达量减少 ($P < 0.05$)。进一步测序分析显示, circHIPK3-siRNA 转染的 5-8F 细胞中 AL645922.1、SCO2、ALI36295.1 和 ISY1-RAB43 表达上调 ($P < 0.05$), BIVM-ERCC5、FAM47E-STBD1、INO80B-WBP1、NAIP、C15orf38-AP3S2、BCL2L2-PABPN1 和 SMIM11B 表达下调 ($P < 0.05$)。**结论** NPC 组织中 circHIPK3 表达显著升高。circHIPK3 通过调节 E-Cadherin、N-Cadherin、MMP2、MMP9 和 IL-6/STAT3 的表达, 促进 NPC 细胞 5-8F 的增殖、迁移和侵袭。AL645922.1 和 BIVM-ERCC5 等基因可能在 circHIPK3 介导的促进 NPC 5-8F 细胞迁移和侵袭中发挥关键作用。

关键词 circHIPK3; 5-8F 细胞; 鼻咽癌; 迁移和侵袭; 转录组测序

中图分类号 R 739.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1346-08

2023-06-02 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1408085MH189); 国家癌症中心攀登基金 (编号: NCC201812B037)

作者单位: ¹ 皖南医学院研究生学院, 芜湖 241002

中国科学技术大学附属第一医院西区² 肿瘤表观遗传学实验室、³ 放射治疗科, 合肥 230031

作者简介: 邵文婷, 女, 硕士研究生;

高劲, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: gj11667@126.com

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.017

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 为高发于我国东南沿海、东南亚、北非、中东的恶性肿瘤^[1]。由于症状较为隐匿, 70% 的患者在首次确诊时往往已为中晚期。远处转移仍是治疗失败和大多数患者死亡的主要原因。从原发部位靶向那些具有高侵袭/转移潜能的肿瘤细胞可能是抗转移治疗的一个有希望的领域。环状 RNA HIPK3 (circHIPK3) 为一种表达丰度颇高的 circRNA, 被认为广泛参与了肿瘤的发生发展^[2]。据报道^[3], circHIPK3 通过调节 miR-1207-5p 和 miR-7 促进结直肠癌细胞的增殖和转移。近期有研究^[4]显示, circHIPK3 能通过拮抗 miR-4288 诱导的 E74 样转录因子 3 (E74-like factor 3, ELF3) 抑制, 来促进 NPC 细胞的增殖和侵袭。目前, 针对 circHIPK3 调节 NPC 细胞侵袭转移的研究依然匮乏, 上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 及相关因子上皮型钙黏蛋白 (E-cadherin)、神经型钙黏附蛋白 (N-cadherin) 是否参与了 circHIPK3 介导的 NPC 侵袭转移, 又涉及哪些信号通路活性的改变都还不清楚, 该研究旨在探讨 circHIPK3 通过调节这些分子的表达来参与 NPC 细胞侵袭转移的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM 培养基由美国 Hyclone 公司提供 (货号: SH30243.01); 南美胎牛血清购自美国 HyClone 公司 (货号: SH30406.05); 青链霉素双抗溶液 (货号: P1400)、anti-GAPDH 内参抗体 (兔多抗, 货号: K106389P)、IgG-HRP (羊抗兔, 货号: SE134)、IgG-HRP (羊抗鼠, 货号: SE131)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: PC0020)、ECL 显色液 (货号: PE0010) 购自北京 Solarbio 公司; RIPA 细胞裂解液 (货号: P0013B)、PMSF (货号: ST506) 购自北京碧云天生物技术公司; 抗基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 2 (兔多抗, 货号: #40994)、anti-MMP9 (兔多抗, 货号: #13667)、anti-STAT3 (兔多抗, 货号: #30835); anti-pSTAT3 (兔多抗, 货号: #

9145)购自美国 CST 公司;逆转录试剂盒(货号:AE311);SYBR-Green PCR 试剂盒(货号:AQ131)购自北京全式金生物技术有限公司;Lipofectamine 2000 转染试剂(货号:11668-019)购自美国 Invitrogen 公司;总 RNA 提取试剂盒(货号:B511321)购自上海生工生物工程股份有限公司;circHIPK3-siRNA 及各种引物均由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成。

1.2 细胞培养 人高转移鼻咽癌细胞(5-8F)购买于中国科学院上海细胞库。5-8F 用含有 100 U/ml 青链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,培养于 5% CO₂、37 °C 的培养箱中。

1.3 细胞转染及 circHIPK3-siRNA 干扰效果检测

转染分 3 组,每组 3 个重复:mock 组(空白对照组,即不做任何处理)、si-nc 组(阴性对照组,即转染无意义 RNA 序列组)、si-circHIPK3 组(即转染 circHIPK3 siRNA 干扰组,序列为 5'-CUACAGGUAUGGCCUCACA-3')。将对数期 5-8F 细胞以 6×10^5 /孔接种于 6 孔板中,过夜培养,待细胞融合度为 50%~60% 时进行转染。步骤如下:250 μ l Opti-MEM 分别稀释 nc、siRNA(终浓度为 100 nmol/L),轻轻吹吸 3~5 次混匀;轻轻颠倒混匀转染试剂,用 250 μ l Opti-MEM 稀释 5 μ l Lipofectamine 2000,轻轻吹吸 3~5 次混匀,室温下静置 5 min;混合转染试剂和 nc/siRNA 稀释液,轻轻吹吸 3~5 次混匀,室温下静置 20 min;转染复合物加入到 6 孔板中,500 μ l/孔,前后轻摇细胞板混合均匀;细胞板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后进行 RT-qPCR 检测实验。siRNA 抑制是暂时的,随着细胞不断分裂,siRNA 逐渐被稀释,其抑制效果逐渐降低。又考虑到 circHIPK3-siRNA 后下游靶基因表达改变还需一段时间,故采用转染后 48~120 h 内进行实验。

1.4 RT-qPCR 检测 circHIPK3、E-Cadherin、N-Cadherin、MMP2、MMP9、IL-6 mRNA 表达水平

使用 TRIzol 抽提试剂盒提取总 RNA,采用 cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA。参照 SYBR-Green PCR 试剂盒说明书进行 RT-qPCR 实验。GAPDH 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析目的基因在 si-nc 组和 si-circHIPK3 组之间的表达差异。引物分别为 GAPDH (F: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'; R: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3')、circHIPK3 (F: 5'-TATGTTGTTGATCCTGTTCCGCA-3'; R: 5'-TG-TGGGTAGACCAAGACTTGTGA-3')、E-Cadherin (F: 5'-TTATGATTCTCTGCTCGTGT-3', R: 5'-ATAGTCCT-

GGTCTTTGTCTG-3')、N-Cadherin (F: 5'-CATCATC-CTGCTTATCCTTGT-3'; R: 5'-AGTCCTGGTCTTCT-TCTCCTCC-3')、MMP2 (F: 5'-TTGACGGTAAG-GACGGACT-3'; R: 5'-TTGCCATTGAACAAGAAGG-3')、MMP9 (F: 5'-TCCAGTACCGAGAGAAAGCC-3', R: 5'-TTGGTCCACCTGGTTCAACT-3')、IL-6 (F: 5'-ATGTAGCCGCCCCACACAGA-3'; R: 5'-CATC-CATCTTTT-TCAGCCAT-3')。

1.5 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 法测定细胞增殖

CCK-8 法测定 si-circHIPK3 组及 si-nc 组细胞增殖情况,将 si-circHIPK3 组及 si-nc 组每孔按 2×10^3 个细胞/100 μ l 接种于 96 孔板中,经 0、24、48、72、96 h 培养后,将 10 μ l CCK-8 溶液加入每孔中,继续培养 2 h 后,在 450 nm 波长下,用酶标仪测定各孔吸光度(A)值,进行细胞增殖曲线的绘制,其横纵坐标分别为时间、相对增殖率。

1.6 划痕实验检测 5-8F 细胞迁移能力 将各组转染细胞板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,用白枪头垂直于细胞孔进行划痕,分别于划痕后 0、24 h 进行拍照观察,使用 Image J 进行分析。

1.7 Transwell 法检测 5-8F 细胞迁移侵袭能力

将转染 si-nc 和 si-circHIPK3 后的 5-8F 细胞消化后,1 500 r/min 离心 5 min 收集细胞,用无血清培养基吹散细胞并计数,调整细胞浓度达到 1×10^5 /ml 左右;取细胞悬液 200 μ l 加入 Transwell 小室(上室为无血清培养液,下室为含有血清的培养液,进行细胞侵袭实验时,上下室间聚碳酸酯薄膜被基质胶 Matrigel 覆盖)后置于培养箱内培养。于 48 h 后取出细胞培养板,取出小室,弃掉上层培养液,用湿润的棉签轻柔擦掉上层的细胞,4% 多聚甲醛固定 15 min,0.1% 结晶紫溶液染色 20 min,于倒置光学显微镜 100 倍放大倍率下计数每个视野内的细胞数目,并拍照留存。

1.8 Western blot 检测 E-Cadherin、N-Cadherin、MMP2、MMP9、pSTAT3 蛋白表达

收集培养 48 h 的各转染组 5-8F 细胞,RIPA 裂解液处理 30 min 后离心并收集上清液,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,SDS-PAGE 法分离各蛋白组分,冰浴条件下将 SDS-PAGE 胶上蛋白湿转印到 PVDF 膜上,脱脂牛奶封闭液室温下处理 2 h,孵育 anti-MMP2、anti-MMP9、anti-E-Cadherin、anti-N-Cadherin、anti-STAT3、anti-pSTAT3(按 1:1 000 稀释)和 anti-GAPDH(按 1:3 000 稀释)后 4 °C 冰箱静置过夜。第 2 天将膜在 TBST 中漂洗 3 次后孵育二抗(按 1:10 000 稀释)。

最后将 ECL 显色液加到 PVDF 膜上进行曝光拍照。选择 GAPDH 作为内参。

1.9 数据获取与整理 检索高通量基因表达数据库 GEO(GENE EXPRESSION OMNIBUS)数据库,下载并整理 circHIPK3 基因相关测序信息,包括 4 例鼻咽炎组织和 4 例 NPC 组织测序信息。

1.10 转录组测序分析 将 si-nc 和 si-circHIPK3 两组 5-8F 细胞样本进行测序,得到结果后进行比对。比较完毕后,分析基因结构优化以及基因表达量,发掘新基因。以在不同样品中基因的表达量为基准,来对差异表达基因进行明确,然后展开功能注释与通路富集等分析。

1.11 统计学处理和作图 使用 GraphPad Prism 8.0 作图和统计分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,若两组数据均符合正态分布,则采用 *t* 检验进行两组间差异比较;若不符合正态分布,则采用 Welch's 检验。 $P < 0.05$ 时组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circHIPK3 在 NPC 及非癌组织中的表达情况

为探讨 circHIPK3 在 NPC 组织中的表达情况,通过 GEO 分析了公共数据库中的信息。首先从 GEO 平台下载微阵列数据集 GSE143797,它包括 4 个鼻咽炎组织样本和 4 个 NPC 组织样本。提取 GSE143797 数据集中的 circHIPK3 表达量和临床信息,进行后续处理分析。结果显示,与鼻咽炎组织相比,NPC 组织中 circHIPK3 表达上调 ($F = 0.860, P < 0.05$),见图 1。

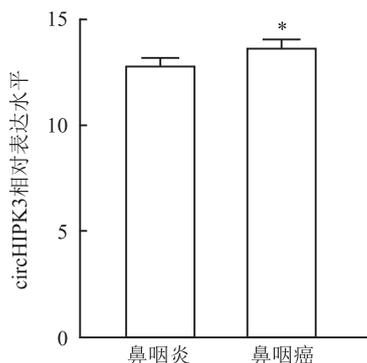


图 1 circHIPK3 在 NPC 及鼻咽炎组织中的表达
与鼻咽炎组织组比较: * $P < 0.05$

2.2 人不同 NPC 细胞系中 circHIPK3 表达情况

RT-qPCR 实验显示 circHIPK3 在 3 种细胞的表达水平并不相同,其中表达水平最高的是 5-8F 细胞(5-

8F vs CNE-1, $F = 1.477, P < 0.001$; 6-10B vs CNE-1, $F = 8.422, P < 0.01$)。综合各细胞系的细胞活性和 circHIPK3 表达,选取 5-8F 细胞系进行接下来的一系列实验,见图 2。

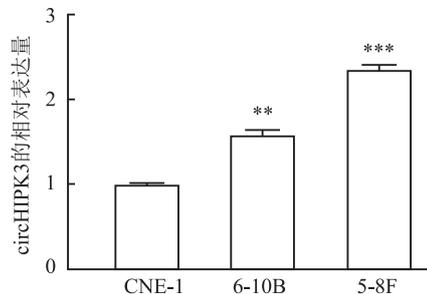


图 2 circHIPK3 在不同 NPC 细胞系中的表达
与 CNE-1 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.3 circHIPK3-siRNA 转染对 5-8F 细胞中 circHIPK3 表达的影响

与 mock 组和 si-nc 组相比, si-circHIPK3 组细胞的 circHIPK3 含量降低,组间差异有统计学意义 ($F = 6.965, P < 0.001$),见图 3。

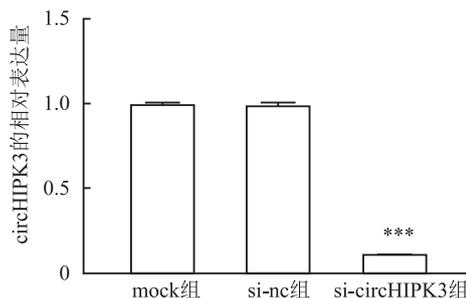


图 3 circHIPK3-siRNA 转染对 5-8F 细胞中 circHIPK3 表达的影响
与 si-nc 组比较: *** $P < 0.001$

2.4 下调 circHIPK3 对 5-8F 细胞的增殖、迁移和侵袭的影响

CCK-8 实验结果显示,24、48、72、96 h 时 si-nc 组和 si-circHIPK3 组的增殖率组间差异有统计学意义 ($F = 2.022, 1.267, 4.757, 3.699, P < 0.05$),见图 4。划痕实验结果显示,24 h 时 si-nc 组和 si-circHIPK3 组划痕愈合率分别是 66.2% 和 38.1%,组间差异有统计学意义 ($F = 5.125, 12.94, P < 0.01$),图 5A、B。Transwell 结果显示,48 h 时 si-nc 组和 si-circHIPK3 组细胞迁移数目组间差异有统计学意义 ($F = 34.830, P = 0.013$),见图 6A、B;48 h 时 si-nc 组和 si-circHIPK3 组细胞侵袭数目组间差异有统计学意义 ($F = 2.404, P = 0.004$),见图 6C、D。这些结果表明,下调 circHIPK3 能够抑制 5-8F 细胞的增殖、迁移和侵袭。

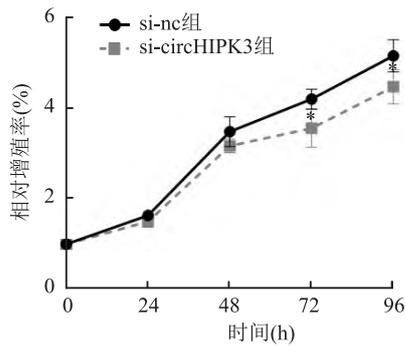


图4 CCK-8 实验检测下调 circHIPK3 对 5-8F 细胞的增殖能力的影响
与 si-nc 组比较: * $P < 0.05$

2.5 下调 circHIPK3 对 EMT 相关分子及 IL-6/STAT3 信号通路的影响 RT-qPCR 结果显示,与 si-nc 组相比, si-circHIPK3 组细胞的 *N-Cadherin/CDH2*、*IL-6*、*MMP2* 和 *MMP9* mRNA 表达水平降低,差异有统计学意义 ($F = 6.484, 19.17, 11.45, 176.3; P = 0.03, P < 0.001, P = 0.046, P = 0.045$),而 *E-Cadherin/CDH1* mRNA 表达水平升高,差异有统计学意义 ($F = 15.28, P < 0.001$),见图 7。Western blot 结果显示,与 si-nc 组相比, si-circHIPK3 组细胞的 *N-Cadherin*、*MMP2*、*MMP9* 和 *pSTAT3* 蛋白表达水平也降低 ($F = 1.646, 1.791, 1.862, 1.794; P = 0.006, P = 0.017, P = 0.012, P = 0.003$); *E-Cadherin*

蛋白表达水平升高 ($F = 6.36, P = 0.02$)。这些结果表明,下调 circHIPK3 促进 *E-Cadherin* 表达,而抑制 *N-Cadherin*、*MMP2*、*MMP9* 和 *pSTAT3* 表达。见图 8。

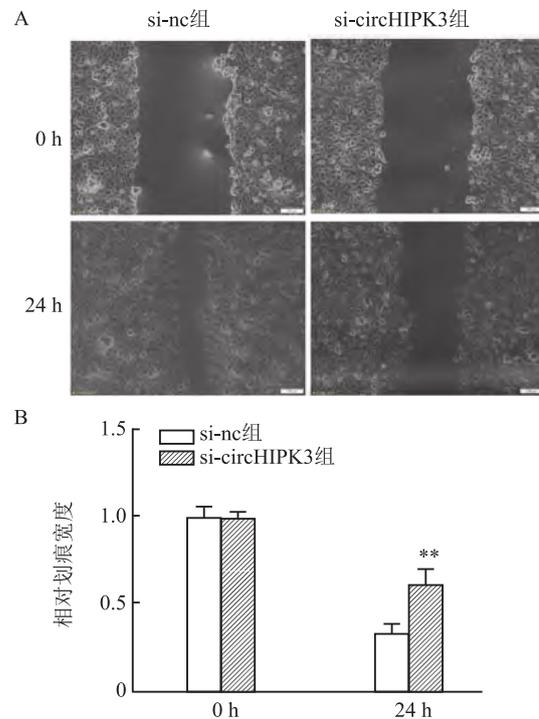


图5 下调 circHIPK3 对 5-8F 细胞的划痕愈合能力的影响

A: 划痕实验检测 5-8F 细胞的迁移能力; bar = 100 μm ; B: 干扰 circHIPK3 后 5-8F 细胞划痕愈合能力的统计图; 与 si-nc 组比较: ** $P < 0.01$

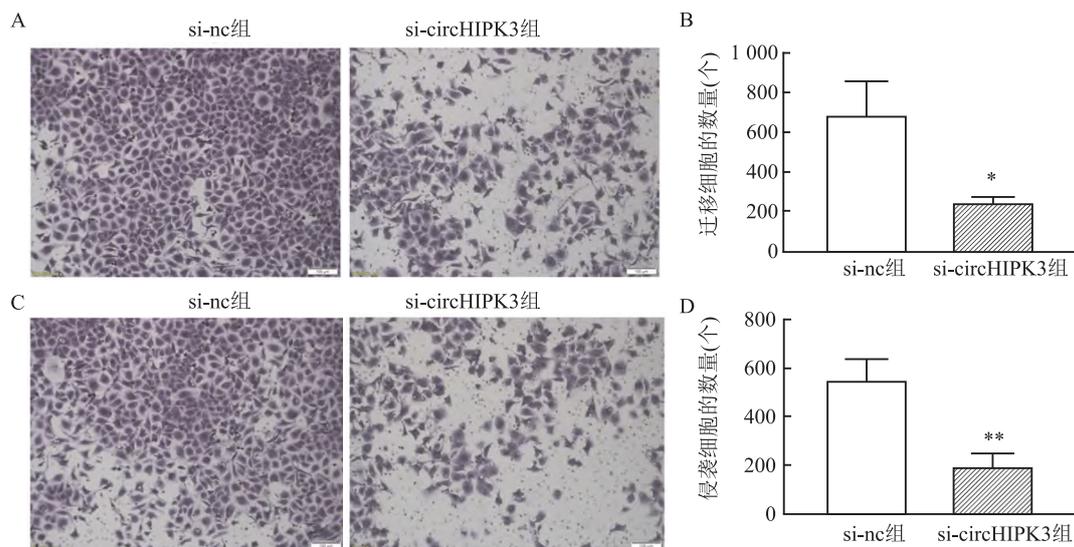


图6 下调 circHIPK3 对 5-8F 细胞的迁移和侵袭能力的影响

A: Transwell 法检测 5-8F 细胞的迁移能力; B: 干扰 circHIPK3 后迁移细胞数目统计图; C: Transwell 法检测 5-8F 细胞的侵袭能力; D: 干扰 circHIPK3 后侵袭细胞数目统计图; bar = 100 μm ; 与 si-nc 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

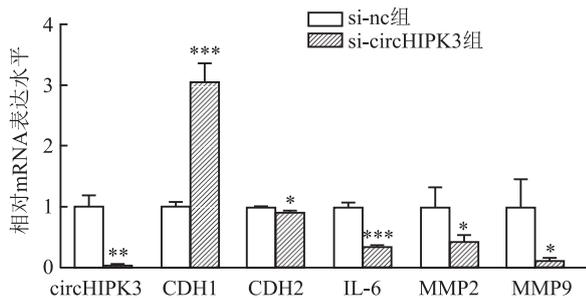


图7 RT-qPCR检测5-8F细胞中E-Cadherin、N-Cadherin、IL-6、MMP2和MMP9 mRNA的表达

与si-nc组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

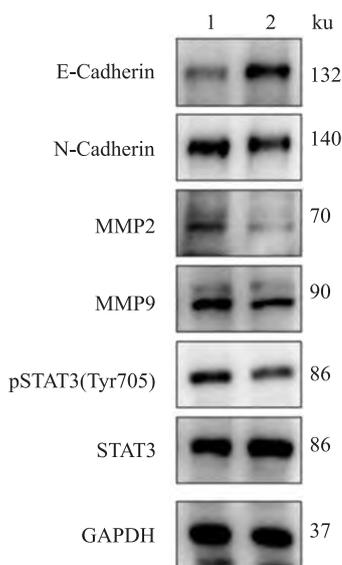


图8 Western blot法检测5-8F细胞中E-Cadherin、N-Cadherin、MMP2、MMP9、pSTAT3和STAT3蛋白的表达

1: si-nc组; 2: si-circHIPK3组

2.6 差异表达基因筛选及GO、KEGG功能分析

与si-nc组相比, si-circHIPK3组细胞有705个基因发

生显著差异性表达,其中有257个基因表达上调和448个基因表达下调。进一步分析显示,AL645922.1、SCO2、AL136295.1和ISY1-RAB43等表达上调($P < 0.05$), BIVM-ERCC5、FAM47E-STBD1、INO80B-WBP1、NAIP、C15orf38-AP3S2、BCL2L2-PABPN1和SMIM11B等表达下调($P < 0.05$),见图9。对所有差异表达基因进行GO功能注释,分三大类:生物过程(biological process)、细胞组分(cellular component)、分子功能(molecular function)。结果显示,差异基因富集于细胞、细胞组分、膜、细胞器、膜的部分区域,涉及的生物过程包括细胞过程、单一生物过程、生物调节和代谢过程,富集的分子功能包括催化作用和结合作用。根据差异基因检测结果,对其进行KEGG生物通路富集分析,结果表明,差异基因代谢通路主要包括维生素B₆代谢、叶酸合成和组氨酸代谢途径,见图10。

3 讨论

尽管临床上有关NPC的诊疗有所进步,但因其发病隐匿,多数患者诊断时临床分期晚,复发以及转移致死率高居不下。因此,针对NPC细胞转移的分子机制研究变得迫切。某些circRNAs的失控表达被发现在许多类型的癌症进展中发挥重要作用,这使得circRNAs很可能成为癌症治疗中潜在的预后生物标志物和治疗靶点,其中, circHIPK3被报道在许多类型的肿瘤中表达,包括NPC、肺癌及结直肠癌等^[2]。GEO数据分析数据显示, NPC组织中 circHIPK3的表达较非NPC组织显著增加,这与Ke et al^[4]研究结果一致。

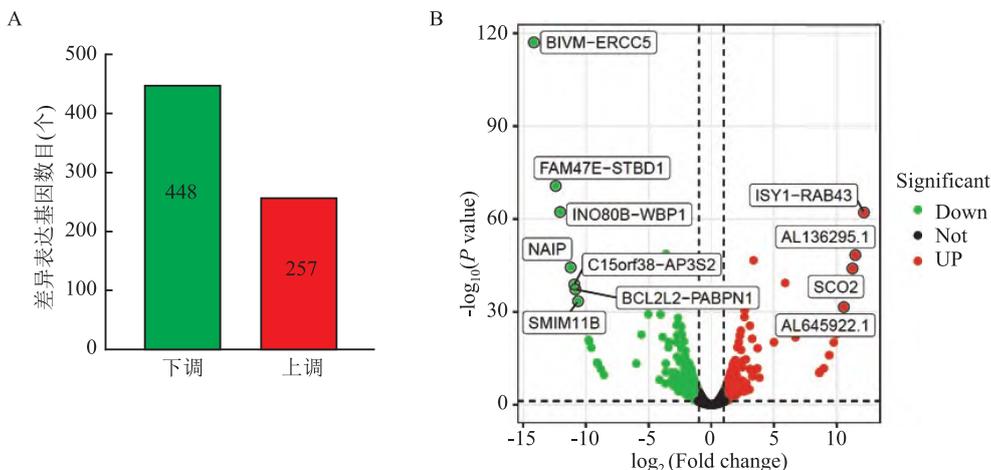


图9 差异表达基因数目统计及火山图

A: 差异表达基因数目柱状图; B: 差异表达基因火山图; 越远离X轴中心的点差异倍数越大; Y轴样本中表达差异越显著的点越靠近顶部

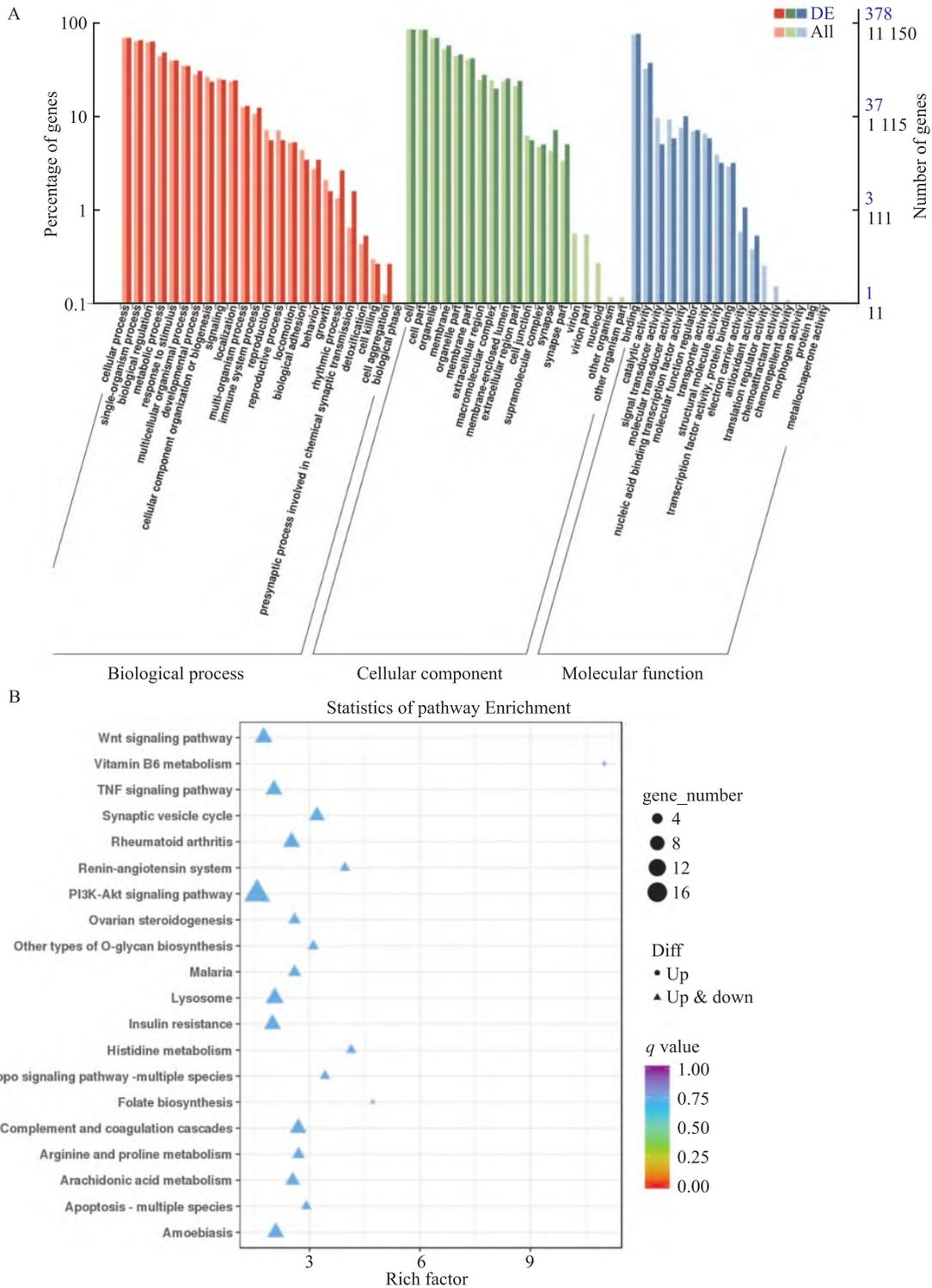


图 10 GO 注释二级分类统计图及 KEGG 富集分析图

A: GO 注释二级分类柱状统计图; X 轴为 GO 三大分类下的二级节点, 三大类用不同的颜色表示; Y 轴(左)表示注释到该节点的基因数目及占所有鉴定到的基因数目的百分比; Y 轴(右)表示该分类中的基因数量; B: KEGG 富集分析点状图; X 轴: Rich Factor, 表示筛选的基因集富集到该通路的基因数目与背景基因富集到该通路的基因数目的比值, 比值越大, 富集到该通路的基因数目越多, 各点越远离中心, 差异倍数越大; Y 轴: 富集出的通路名称(挑选前 20 富集通路)

该研究表明, circHIPK3 在 NPC 细胞系 5-8F 中高表达, 下调 circHIPK3 可以抑制 5-8F 细胞的增殖、迁移和侵袭。近年来有报道^[5-6], circHIPK3 过表达

后通过调节 miRNA-338-3p 加速前列腺癌细胞的增殖和侵袭。新近研究^[4]显示, circHIPK3/miR-4288/ELF3 通路参与 NPC 细胞的增殖和侵袭的调控。

EMT 是正常胚胎发育的重要过程。EMT 的异常再激活与癌症进展和转移过程中肿瘤细胞的恶性特性有关,是最常见的肿瘤侵袭性和转移的起始原因。然而,circHIPK3 在 NPC 细胞转移的过程中是否调控着 EMT 的发生,以及涉及的具体信号通路仍不明确。该研究结果显示,敲低 circHIPK3 后 NPC 细胞的迁移和侵袭能力显著减弱,并且伴有 *N-Cadherin*、*MMP2* 和 *MMP9* 和 *IL-6/STAT3* 表达水平的降低及 *E-Cadherin* 表达水平的显著升高。*N-Cadherin* 又称钙黏附蛋白-2,是一种由 *CDH2* 基因编码,在多种组织中表达并起到介导细胞间黏附功能的跨膜蛋白。*E-Cadherin* 也被称为钙黏附蛋白-1,由 *CDH1* 基因编码,对胚胎发育中的细胞识别、迁移和组织分化有重要作用。先前的研究^[7]显示,*E-Cadherin* 在前列腺癌和乳腺癌等组织中的表达减少与恶性程度及临床分期呈正相关,而 *N-Cadherin* 相反。同样的,陈曦等^[8]发现 *E-cadherin* 在慢性鼻咽炎性组织中阳性表达率高于 NPC 组织,而 *N-cadherin* 的表达则刚好相反。与这些研究结果相一致,本研究表明迁移和侵袭能力较强的 NPC 细胞低表达 *E-cadherin* 的同时高表达 *N-cadherin*,而迁移和侵袭能力较弱的 si-circHIPK3 组 NPC 细胞则相反。细胞外基质和基底共同构成阻碍肿瘤转移的第一道屏障,其降解是肿瘤侵袭转移的关键环节。*MMP2* 和 *MMP9* 属于基质金属蛋白酶基因家族,作为降解细胞外基质的重要酶,在介导肿瘤血管生成、转移和侵袭中均发挥重要作用。据报道,*MMP2* 参与 NPC 的侵袭性和转移性表型、上皮间质转化及不良预后^[9]。此外,丹参酚酸 A 通过 ERK 信号通路抑制人 NPC 组织 *MMP2* 表达,进而抑制癌细胞侵袭^[10]。有研究显示,通过激活 TGF- β /SMAD 通路,*MMP9* 在乳腺癌细胞系中过表达显著增加细胞的恶性程度^[11]。*MMP9* 是 NPC 的重要预后因素,此外 *MMP9* 的高表达与颈部淋巴结转移和较差的生存结局相关^[12]。本研究也发现 *MMP2* 和 *MMP9* 在迁移和侵袭能力较强的 NPC 细胞中表达较高,而在迁移和侵袭能力较弱的 si-circHIPK3 组 NPC 细胞表达量较低,这表明 *MMP2* 和 *MMP9* 表达量与 NPC 细胞迁移和侵袭能力具有显著的相关性。*MMP2* 和 *MMP9* 可以作为 NPC 转移的潜在生物标志物和治疗靶点。

尽管本研究揭示了 NPC 细胞中 circHIPK3 高表达引发 EMT 相关分子表达改变参与了 NPC 细胞转移,但 circHIPK3 发挥作用的分子生物学机制尚不清楚。circHIPK3 可以通过作为 microRNA 海绵竞

争 miRNA 结合位点、通过调控可变剪接或转录、与 RNA 结合蛋白相互作用,在基因调控中发挥多种功能^[13]。circHIPK3 通过吸附 miR-330-5p 和靶向 RASSF1,调节 *E-Cadherin* 和 *N-Cadherin* 表达,促进胰腺癌细胞对吉西他滨的耐药^[14]。CRIM1 能发挥内源竞争 RNA 作用,通过上调 FOXQ1,促进 NPC 转移和多西他赛化疗耐药性,而 circCRIM1 下调可显著增加 NPC 细胞 *E-cadherin* 的表达,而降低 *N-cadherin* 的表达^[5]。这些研究结果提示,circHIPK3 可能通过其它靶基因间接调控 *E-Cadherin*、*N-Cadherin*、*MMP2* 和 *MMP9* 表达水平,进而影响 NPC 细胞转移,circHIPK3 发挥调控作用的中间环节仍需进一步研究。与此同时,转录组测序结果提示 circHIPK3 下调引起的 NPC 细胞转移能力减弱是一系列基因表达共同作用的结果,它们发挥作用的分子生物学机制以及在 NPC 细胞转移中作用仍有待于进一步研究。

综上所述,该研究证实了 NPC 中高表达的 circHIPK3 可以诱导 EMT 的发生和激活 *IL6/STAT3* 信号活性,从而促进 NPC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。circHIPK3 有望成为诊断和治疗转移性 NPC 新的靶点。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] Wen J, Liao J, Liang J, et al. Circular RNA HIPK3: a key circular RNA in a variety of human cancers[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 773.
- [3] Yan Y, Su M, Qin B. CircHIPK3 promotes colorectal cancer cells proliferation and metastasis via modulating of miR-1207-5p/FMN2 signal[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(4): 839-46.
- [4] Ke Z, Xie F, Zheng C, et al. CircHIPK3 promotes proliferation and invasion in nasopharyngeal carcinoma by abrogating miR-4288-induced ELF3 inhibition[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1699-706.
- [5] Hong X, Liu N, Liang Y, et al. Circular RNA CRIM1 functions as a ceRNA to promote nasopharyngeal carcinoma metastasis and docetaxel chemoresistance through upregulating FOXQ1[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 33.
- [6] Cai C, Zhi Y, Wang K, et al. CircHIPK3 overexpression accelerates the proliferation and invasion of prostate cancer cells through regulating miRNA-338-3p[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 3363-72.
- [7] 杨亮,王斌,朱丽萍,等. 可溶性 E-钙黏连蛋白对良恶性

- 乳房肿块的鉴别诊断价值[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(3): 397-400.
- [8] 陈曦, 彭纲, 李跃华, 等. 鼻咽癌中 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2014, (1): 27-30.
- [9] Li S, Luo W. Matrix metalloproteinase 2 contributes to aggressive phenotype, epithelial-mesenchymal transition and poor outcome in nasopharyngeal carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 5701-11.
- [10] Chuang C Y, Ho Y C, Lin C W, et al. Salvianolic acid A suppresses MMP-2 expression and restrains cancer cell invasion through ERK signaling in human nasopharyngeal carcinoma[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 252: 112601.
- [11] Dong H, Diao H, Zhao Y, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cell lines remarkably increases the cell malignancy largely via activation of transforming growth factor beta/SMAD signalling[J]. Cell Prolif, 2019, 52(5): e12633.
- [12] Das A K, Baishya N, Sarma A, et al. Assessment and clinicopathological correlation of matrix metalloproteinase 9 expression in nasopharyngeal carcinoma[J]. J Carcinog, 2019, 18: 1.
- [13] Xie Y, Yuan X, Zhou W, et al. The circular RNA HIPK3 (circHIPK3) and its regulation in cancer progression: Review[J]. Life Sci, 2020, 254: 117252.
- [14] Liu Y, Xia L, Dong L, et al. CircHIPK3 promotes gemcitabine (GEM) resistance in pancreatic cancer cells by sponging miR-330-5p and targets RASSF1[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 921-9.

The mechanism underlying circHIPK3 promotes the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells 5-8F

Shao Wenting¹, Lv Lei², Gao Jin³

(¹Graduate School, Wannan Medical College, Wuhu 241002; ²Cancer Epigenetics Program,

³Dept of Radiation Oncology, West Region, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230031)

Abstract Objective To explore the role and molecular mechanism of circHIPK3 in the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** Firstly, we searched public databases and analyzed the expression level of circHIPK3 in nasopharyngeal carcinoma tissues and non-cancerous tissues in Gene Expression Database (GEO). Then, the circHIPK3 siRNA was synthesized and transfected into the NPC cell line 5-8F. After validate the efficiency of circHIPK3 knockdown, the proliferation, migration and invasion capacities of 5-8F cells were evaluated by CCK-8, wound healing and transwell assay. Meanwhile, the mRNA and protein expression of downstream genes, including *CDH1*, *CDH2*, *MMP2*, *MMP9* and *IL-6/STAT3* were determined by RT-qPCR and Western blot. Finally, transcriptome sequencing technology was used to analyze the significantly differentially expressed genes after the interference of circHIPK3-siRNA in 5-8F cells, in order to find out the key genes mediating the oncogenesis role of circHIPK3. **Results** circHIPK3 expression significantly increased in nasopharyngeal carcinoma tissues compared with non-cancerous tissues ($P < 0.05$). After siRNA-specific knockdown of circHIPK3 expression in 5-8F cells, the proliferation, scratch healing rate, and the number of migrated /invaded cells were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$ respectively). Meanwhile, the mRNA and protein levels of *CDH1* significantly increased ($P < 0.001$), but the *CDH2*, *MMP2*, *MMP9*, *IL-6/STAT3* mRNA and protein levels were significantly reduced ($P < 0.05$). Further analysis by RNA-seq showed that the expression of AL645922.1, SCO₂, AL136295.1 and ISY1-RAB43 was significantly up-regulated ($P < 0.05$), and the expression of BIVM-ERCC5, FAM47E-STBD1, INO80B-WBP1, NAIP, C15orf38-AP3S2, BCL2L2-PABPN1 and SMIM11B was significantly down-regulated ($P < 0.05$) in circHIPK3-siRNA transfected 5-8F cells. **Conclusion** circHIPK3 expression is significantly upregulated in nasopharyngeal carcinoma tissues. circHIPK3 promotes 5-8F cells proliferation, migration and invasion by regulating the expression of E-Cadherin, N-Cadherin, MMP2, MMP9 and IL-6/STAT3. Genes such as AL645922.1 and BIVM-ERCC5 may play a key role in promoting the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells mediated by circHIPK3.

Key words circHIPK3; 5-8F cells; nasopharyngeal carcinoma; migration and invasion; transcriptome sequencing