

文章编号 1006-8147(2020)02-0103-05

论著

TNF- α 诱导的 circMAN1A2 促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭和增殖

白丽丽, 汤华

(天津医科大学基础医学院病原生物学系, 天津市生命科学中心实验室, 天津市炎症生物学重点实验室, 天津 300070)

摘要 目的: 探讨肿瘤坏死因子 (TNF)- α 诱导的 circMAN1A2 对宫颈癌细胞恶性行为的影响。方法: RNA 高通量测序检测 TNF- α 处理后人宫颈癌 HeLa 细胞中 circRNA 的表达差异性。RT-qPCR 方法验证 TNF- α 对 circMAN1A2 的影响。RNase R 耐受性实验验证 circMAN1A2 是否耐受 RNase R 消化。核质 RNA 分离实验研究 circMAN1A2 在 HeLa 细胞的定位; Transwell 迁移侵袭实验、MTT 实验、集落形成实验研究 circMAN1A2 对宫颈癌细胞恶性行为的影响。结果: RNA 高通量测序检测到 98 种表达上调和 63 种表达下调的 circRNA。TNF- α 处理后 circMAN1A2 表达上调, 其能够耐受 RNase R 消化, 主要定位于 HeLa 细胞胞核中。细胞功能实验表明 circMAN1A2 能够促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭和增殖。结论: TNF- α 诱导的 circMAN1A2 促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭和增殖。

关键词 circMAN1A2; 宫颈癌; 迁移; 侵袭; 增殖

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

TNF- α -induced circMAN1A2 promotes migration, invasion and proliferation of cervical cancer cells

BAI Li-li, TANG Hua

(Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin Life Science Research Center, Tianjin Key Laboratory of Inflammation Biology, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To identify the effect of tumor necrosis factor (TNF)- α -induced circMAN1A2 on the malignant behavior of cervical cancer cells. **Methods:** RNA high-throughput sequencing was used to detect the difference of circRNA expression in human cervical cancer HeLa cells treated with TNF- α . RT-qPCR was used to verify the effect of TNF- α on circMAN1A2. The RNase R resistance assay verified whether circMAN1A2 was resistant to RNase R digestion. RNA isolation experiment was performed to investigate the localization of circMAN1A2 in HeLa cells. Transwell migration/invasion assay, MTT assay, and colony formation assay were used to study the effects of circMAN1A2 on the malignant behavior of cervical cancer cells. **Results:** RNA high-throughput sequencing found 98 up-regulated and 63 down-regulated circRNA. circMAN1A2 was up-regulated after TNF- α treatment, which was resistant to RNase R digestion and was mainly localized in the nuclear of HeLa cells. Cell function experiments showed that circMAN1A2 could promote the migration, invasion and proliferation of cervical cancer cells. **Conclusion:** TNF- α -induced circMAN1A2 promotes the migration, invasion and proliferation of cervical cancer cells.

Key words circMAN1A2; cervical cancer; migration; invasion; proliferation

宫颈癌(cervical cancer, CC)作为最常见的妇科癌症,具有很高的发病率和死亡率,在全世界由癌症导致的死亡病例中位于第四位^[1]。每年全球大约有 50 万名女性被确诊为宫颈癌,其中因为宫颈癌而死亡的人数更是远远超过了 30 万人^[2]。科学证据清楚地表明,宫颈癌是由人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)某些基因型的持续感染引起的^[3]。因此,近年来细胞学和/或 HPV 筛查计划成为预防宫颈癌的有效措施^[4],外科手术结合放疗和化

疗是治疗和增加宫颈癌患者生存时间的主要策略^[5]。然而,由于肿瘤的复发和转移,宫颈癌患者的预后常常不如预期所料^[6]。因此,深入研究宫颈癌发生的分子机制对开发新的癌症相关生物标志物以及寻找新的治疗方法都是至关重要的。

环状 RNA(circRNA)是一种非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA),也是近年来 RNA 领域的研究热点。CircRNA 不像线性 RNA 那样具有 5'端帽结构和 3'端多聚体(A)尾,而是形成了具有共价键的封闭环状结构^[7]。环状 RNA 不受 RNA 核酸外切酶的影响,所以它的表达更稳定^[8]。这些特性使得环状 RNA 在作为新的临床诊断标志物的开发和应用中

基金项目 国家自然科学基金重大研究计划集成项目(91629302)

作者简介 白丽丽(1988-),女,硕士在读,研究方向:病原生物学;通信作者:汤华, E-mail:htang2002@yahoo.com。

具有明显的优势。近来大量研究表明, circRNA 在许多生物过程中发挥重要作用^[9]。在由特定蛋白质复合物和互补 RNA 元件调节的反向剪接后, circRNA 可通过与 miRNA 或 RNA 结合蛋白相互作用参与肿瘤进展^[7,10-11]。越来越多的研究表明, circRNA 可以作为竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 而发挥作用。例如: circRNA cTFRC 可以通过充当 microRNA-107 的海绵, 调节 TFRC 的表达进而促进膀胱癌的进展^[12]。

研究表明 circMAN1A2 在鼻咽癌、口腔癌、甲状腺癌、卵巢癌和肺癌中表达上调, 可能作为这些疾病的血清学标志物, 但其作用机制目前仍不明了^[13]。在本研究中, 通过 RNA 高通量测序的方法发现 TNF- α 处理后 HeLa 细胞中 circMAN1A2 表达水平升高。过表达 circMAN1A2 可以促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭和增殖能力。表明其在宫颈癌的诊断和治疗中可能具有重要的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料 宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞(ATCC, 美国), RPMI 1640 液体培养基, DMEM 液体培养基 (GIBCO, 美国), 细胞培养箱 (Thermo Fisher, 美国), 胎牛血清 (FBS; GIBCO, 美国), TNF- α (碧云天生物技术有限公司, 中国), RNase R (广州吉赛生物科技有限公司, 中国), RNA 分离试剂盒 (Active motif, 美国), MTT (SIGMA-Aldrich, 美国), LipofectamineTM 2000 reagent (Invitrogen, 美国)

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌细胞系 HeLa 和 SiHa 细胞在含有 8% 或 10% 胎牛血清、100 μ g/mL 链霉素和 100 IU/mL 青霉素的 RPMI-1640 或 DMEM 培养基中培养, 将细胞孵育在 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 的培养箱中, 待细胞汇合度达到 80%~90% 时进行传代培养。

1.2.2 TNF- α 加药处理 将 HeLa 细胞接种至两个 100 mL 细胞培养瓶。40 h 后取出其中一瓶标记为“TNF- α 组”, 弃去原培养液, 加入 8 mL 含 60 ng/mL TNF- α 的培养液, 另一瓶标记为“无处理组”, 加入等体积的细胞培养液。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 使用 SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa, 中国) 进行 RT-qPCR 以检测 RNA 的表达水平。 β -actin 作为内源性对照。RT-qPCR 的所有引物如表 1 所示。

1.2.4 CircMAN1A2 过表达及敲降 质粒均由上海通用生物有限公司合成。

1.2.5 RNase R 耐受性 将 HeLa 细胞接种到 100 mL 细胞培养瓶内, 48 h 后提取宫颈癌细胞总 RNA。用

12 IU/ μ L RNaseR 处理后, 通过 RT-qPCR 检测 circMAN1A2 和 lineMAN1A2 的表达水平。

表 1 各基因引物序列

Tab 1 Sequence of each gene primer

引物(RT-qPCR)	序列(5'-3')
circMAN1A2-forward	ACCTTGTAGGAATACGTGGTG
circMAN1A2-reverse	TCTCTGTCTGAATTTCTGCTC
lineMAN1A2-forward	ACCTTGTAGGAATACGTGGTG
lineMAN1A2-reverse	AATCAAGGTTGTCTTCAATCC
β -actin-forward	CGTGACATTAAGGAGAAGCTG
β -actin-reverse	CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC

1.2.6 核质 RNA 分离 按照 Active motif 说明书步骤进行核质 RNA 分离。

1.2.7 Transwell 迁移/侵袭 转染 24 h 后, 1 \times PBS 洗涤细胞, 重悬于无血清培养基中并接种到不含/含 Matrigel 的 transwell 上层小室进行迁移 (6 \times 10⁴ 细胞)/侵袭 (8 \times 10⁴ 细胞) 实验。下室加入 600 μ L 含有 20% FBS 的细胞培养基。温育 48 h 或 72 h, 将迁移/侵袭的细胞用固定液 (75% 甲醇-25% 冰醋酸) 固定并用结晶紫染色。在 100 倍放大倍数下随机选取 5 个视野, 并在 Nikon TE2000 显微镜下对迁移/侵袭的细胞计数。

1.2.8 MTT 转染 24 h 后, 以 4 000/孔的密度将细胞接种到 96 孔板。分别在 24 h、48 h 和 72 h 加入 10 μ L MTT, 继续培养 4~6 h。避光弃去原含 MTT 的培养液, 加入 100 μ L DMSO, 避光摇晃 5 min, 使甲瓖充分溶解。测定 OD490 波长处的吸光度值。

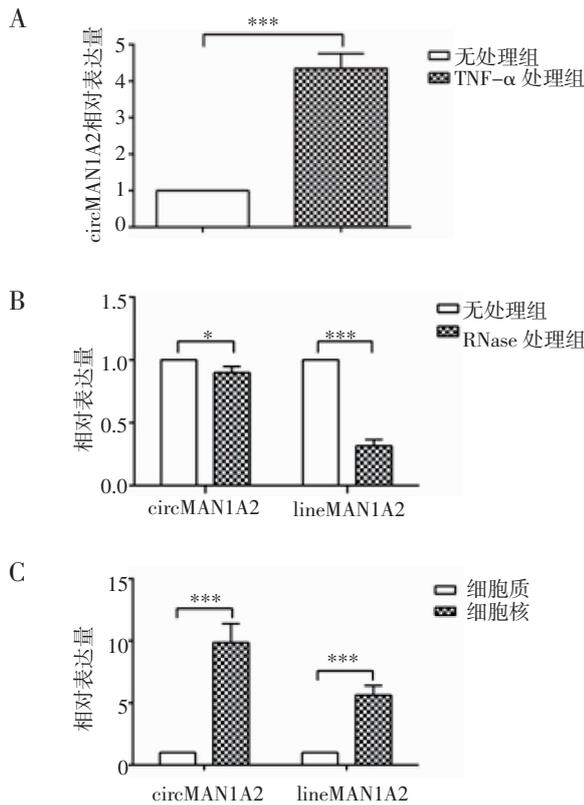
1.2.9 集落形成 转染 24 h 后, 以 500/孔的密度将细胞接种到 12 孔板。每 3 d 更换 1 次新鲜培养液, 持续两周。用结晶紫染色, 然后计算相对细胞集落形成率。

1.3 统计学处理 所有作图软件均为 GraphPad Prism 6.0。两组间均数比较采用 *t* 检验方法进行处理。所有数据结果均代表 3 次重复试验的平均值。以 $P < 0.05$ 作为有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 TNF- α 促进 HeLa 细胞中 circMAN1A2 表达 TNF- α 处理后的 RNA 高通量测序分析共检测到 98 种表达上调和 63 种表达下调的 circRNA。其中表达上调的 circMAN1A2 来源于 MAN1A2 母基因, 位于 1 号染色体第 117402186-117405645 碱基。经 RT-qPCR 验证得知 circMAN1A2 表达水平确实升高 ($P < 0.001$, 图 1A)。RNase R 耐受性实验结果表明相比于线性 MAN1A2 (lineMAN1A2), circMAN1A2 更能够耐受 RNase R 消化 ($P < 0.05$, $P < 0.001$, 图 1B)。

核质 RNA 分离实验表明 circMAN1A2 主要定位于细胞核中($P<0.001$,图 1C)。

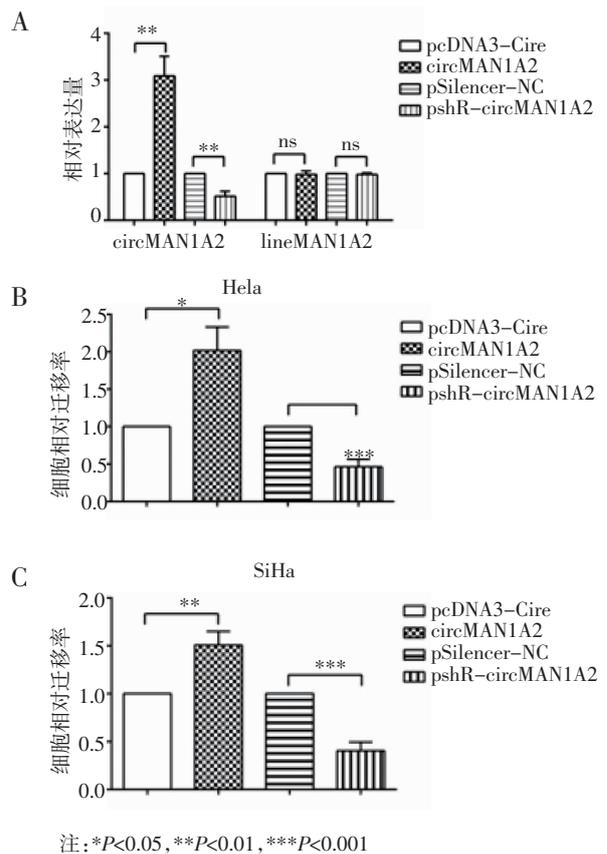


注: * $P<0.05$, *** $P<0.001$

图 1 TNF- α 促进 HeLa 细胞中 circMAN1A2 表达
Fig 1 TNF- α promotes the expression of circMAN1A2 in HeLa cells

2.2 CircMAN1A2 促进宫颈癌细胞迁移能力 为了研究 circMAN1A2 对宫颈癌细胞恶性行为的影响,构建 circMAN1A2 过表达及敲降质粒,并用 RT-qPCR 检测质粒有效性。结果表明转入 circMAN1A2 过表达质粒后 circMAN1A2 表达水平升高, lineMAN1A2 表达水平没有明显变化; 转入 circMAN1A2 敲降质粒后 circMAN1A2 表达水平降低, lineMAN1A2 表达水平没有明显变化, 表明构建的质粒只影响环状 RNA 表达水平而不影响线性 RNA 表达($P<0.01$,图 2A)。细胞迁移是指细胞在接收到迁移信号或感受到某种物质的梯度后而产生的移动。细胞迁移是正常细胞的功能之一,并且与癌症转移密切相关,因此利用 transwell 迁移实验来研究 circMAN1A2 对肿瘤细胞迁移能力的影响。结果发现:过表达 circMAN1A2 促进宫颈癌细胞迁移能力, 敲降 circMAN1A2 抑制宫颈癌细胞迁移能力($P<0.05$, $P<0.001$,图 2B; $P<0.01$, $P<0.001$,图 2C)。

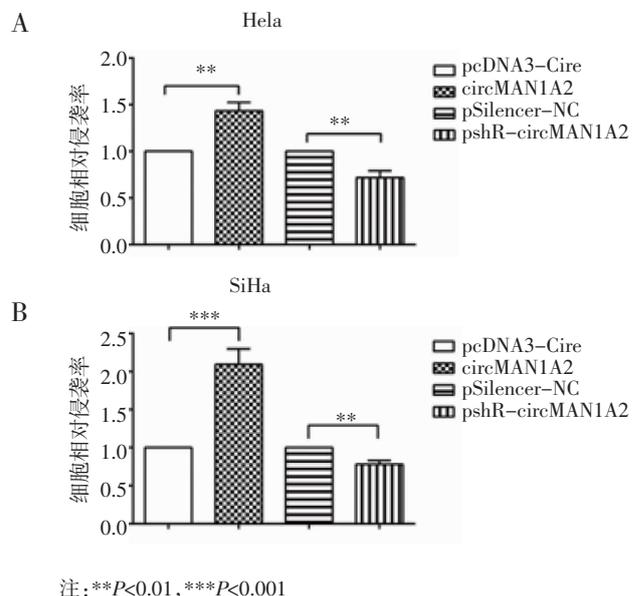
2.3 CircMAN1A2 促进宫颈癌细胞侵袭能力 癌细胞侵袭是指肿瘤细胞向局部侵犯或远处转移的能力。癌细胞的侵袭转移是恶性肿瘤最重要的特征



注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 2 CircMAN1A2 促进宫颈癌细胞迁移
Fig 2 CircMAN1A2 promotes the migration of cervical cancer cell

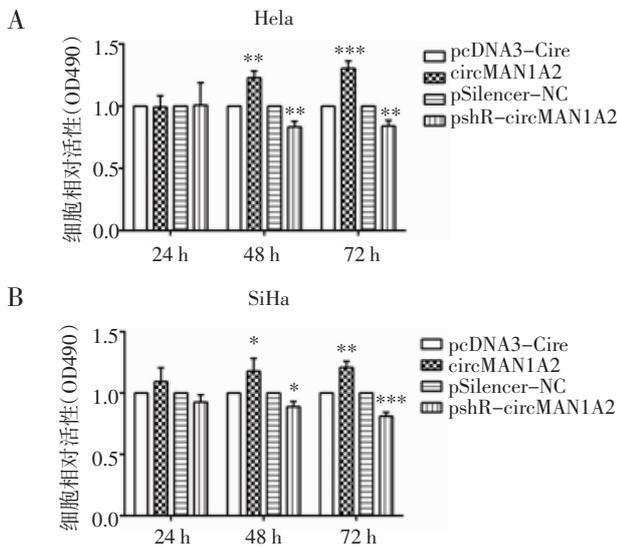
之一,也是影响患者预后的主要因素。因此利用 transwell 侵袭实验来研究 circMAN1A2 对肿瘤细胞侵袭能力的影响。结果发现:过表达 circMAN1A2 促进宫颈癌细胞侵袭能力, 敲降 circMAN1A2 抑制宫颈癌细胞侵袭能力($P<0.01$,图 3A; $P<0.01$, $P<0.001$,图 3B)。



注: ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 3 CircMAN1A2 促进宫颈癌细胞侵袭
Fig 3 CircMAN1A2 promotes the invasion of cervical cancer cell

2.4 CircMAN1A2 促进宫颈癌细胞活性 细胞活性是指细胞的生理状态和功能。活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为不溶性甲瓖并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。因此利用 MTT 实验来研究 circMAN1A2 对肿瘤细胞活性的影响。过表达 circMAN1A2 促进宫颈癌细胞活性, 敲降 circMAN1A2 抑制宫颈癌细胞活性($P<0.01$, $P<0.001$, 图 4A; $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, 图 4B)。

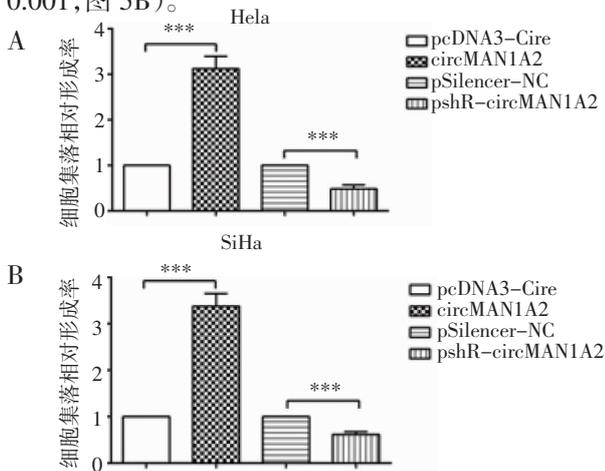


注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 4 CircMAN1A2 促进宫颈癌细胞活性

Fig 4 CircMAN1A2 promotes the viability of cervical cancer cell

2.5 CircMAN1A2 促进宫颈癌细胞体外增殖能力 单个细胞在体外持续增殖 6 代以上, 其后代形成一个细胞群体, 称为集落。因此集落形成实验是检测细胞增殖能力的有效方法之一。过表达 circMAN1A2 促进宫颈癌细胞体外增殖能力, 敲降 circMAN1A2 抑制宫颈癌细胞体外增殖能力($P<0.001$, 图 5A; $P<0.001$, 图 5B)。



注: *** $P<0.001$

图 5 CircMAN1A2 促进宫颈癌细胞体外增殖能力

Fig 5 CircMAN1A2 promotes the proliferation of cervical cancer cells in vitro

3 讨论

研究表明, 宫颈癌是由 HPV 某些基因型的持续感染引起的。而炎性细胞因子 TNF- α 诱导的核因子- κ B 活化是炎症导致癌症的常见机制。研究表明 TNF- α 诱导的慢性炎症能够增加细胞的易感性并导致恶性肿瘤的进展^[14-15]。在慢性炎症转化为癌症的发生、发展过程中发现了很多 miRNA, 如 miR-10a, miR-320a, miR-495 等与结肠癌或胃癌的进展有关^[16-18]。笔者实验室之前已经发现一些 miRNA 受核因子- κ B 转录调控, 其中 miR-23a 和 miR-429 分别通过靶向核因子- κ B 抑制蛋白激酶 (IKK) α 和 IKK β 形成了反馈调节环^[19-20]。但是, 与慢性炎症转化为癌症相关的 circRNA 的研究却几乎没有。因此, 对这类 circRNA 的研究将为宫颈癌的诊断和治疗提供新的临床依据。

近年来, 大量研究表明, circRNA 与多种人类疾病的发生、发展密切相关, 在几种人类癌症中充当必需的调节剂。已经发现许多 circRNA 在宫颈癌中异常表达。例如, 通过生物信息学分析发现, 与正常组织相比, hsa_circRNA_101996 在宫颈癌组织中高表达, 较高水平的 hsa_circRNA_101996 与宫颈癌患者的预后不良有关, 机制上, hsa_circRNA_101996 通过 miR-8075/TPX2 途径抑制了宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[21]。此外, hsa_circ_0000263 可通过影响 miR-150-5p 调节 MDM4 的表达促进肿瘤细胞增殖和迁移能力^[22]。过表达的 circ_0067934 可以通过 miR-545/EIF3C 轴促进宫颈癌进展^[23]。

本文研究结果表明, 炎性细胞因子 TNF- α 促进 circMAN1A2 的表达, 过表达 circMAN1A2 促进宫颈癌细胞的迁移、侵袭和增殖。提示 circMAN1A2 可能参与宫颈癌的发生、发展, 并且可能为宫颈癌的诊断治疗和预后提供新的思路。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394
- [2] Cohen P A, Jhingran A, Oaknin A, et al. Cervical cancer[J]. Lancet, 2019, 393(10167): 169
- [3] Bosch F X, Lorincz A, Muñoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4): 244
- [4] Crosbie E J, Einstein M H, Franceschi S, et al. Human papillomavirus and cervical cancer[J]. Lancet, 2013, 382(9895): 889
- [5] Petignat P, Roy M. Diagnosis and management of cervical cancer[J]. BMJ, 2007, 335(7623): 765
- [6] Shi J F, Canfell K, Lew J B, et al. The burden of cervical cancer in China: Synthesis of the evidence[J]. Int J Cancer, 2012, 130(3): 641

- [7] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs[J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 141
- [8] Chen L L, Yang L. Regulation of circRNA biogenesis[J]. *RNA Biol*, 2015, 12(4): 381
- [9] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495(7441):333
- [10] Ebbesen K K, Kjems J, Hansen T B. Circular RNAs: Identification, biogenesis and function[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2016, 1859(1): 163
- [11] He J H, Li Y G, Han Z P, et al. The circRNA-ACAP2/hsa-miR-21-5p/tiam1 regulatory feedback circuit affects the proliferation, migration, and invasion of colon cancer SW480 cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(4): 1539
- [12] Su H, Tao T, Yang Z, et al. Circular RNA cTFRC acts as the sponge of microRNA-107 to promote bladder carcinoma progression[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 27
- [13] Fan C M, Wang J P, Tang Y Y, et al. CircMAN1A2 could serve as a novel serum biomarker for malignant tumors[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(7):2180
- [14] Didonato J A, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer[J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 379
- [15] Shen Z, Zhou R, Liu C, et al. MicroRNA-105 is involved in TNF- α -related tumor microenvironment enhanced colorectal cancer progression[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(12): 3213
- [16] Liu Y, Zhang Y, Wu H, et al. miR-10a suppresses colorectal cancer metastasis by modulating the epithelial-to-mesenchymal transition and anoikis[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(4): e2739
- [17] Zhu Y, Zhang Y, Sui Z, et al. USP14 de-ubiquitinates vimentin and miR-320a modulates USP14 and vimentin to contribute to malignancy in gastric cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 8(30): 48725
- [18] Li Z, Zhang G, Li D, et al. Methylation-associated silencing of miR-495 inhibit the migration and invasion of human gastric cancer cells by directly targeting PRL-3[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(1): 344
- [19] Yang Z, Wang X L, Bai R, et al. miR-23a promotes IKK α expression but suppresses ST7L expression to contribute to the malignancy of epithelial ovarian cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(6): 731
- [20] Fan J Y, Fan Y J, Wang X L, et al. miR-429 is involved in regulation of NF- κ B activity by targeting IKK β and suppresses oncogenic activity in cervical cancer cells[J]. *FEBS Lett*, 2017, 591(1): 118
- [21] Song T, Xu A, Zhang Z, et al. CircRNA hsa_circRNA_101996 increases cervical cancer proliferation and invasion through activating TPX2 expression by restraining miR-8075[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8):14296
- [22] Cai H, Zhang P, Xu M, et al. Circular RNA hsa_circ_0000263 participates in cervical cancer development by regulating target gene of miR-150-5p[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11391
- [23] Hu C, Wang Y, Li A, et al. Overexpressed circ_0067934 acts as an oncogene to facilitate cervical cancer progression via the miR-545/EIF3C axis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9225

(2019-10-13 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB/T 3558.1-2009《统计学词汇及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选择合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达:应写明所用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如 $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P>0.05, P<0.05$ 和 $P<0.01$ 3 种表达方式,无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间。

本刊编辑部