



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.02.07

文章编号: 2095-1264(2023)02-0173-08

circ_0000064 靶向 miR-503 对甲状腺癌细胞生物学行为的影响

龚 烨, 刘思吟, 余喜梅

(新疆维吾尔自治区人民医院 乳腺甲状腺科, 新疆 乌鲁木齐, 830001)

摘要: **目的** 探讨环状 RNA 0000064(circ_0000064)靶向微小 RNA 503(miR-503)对甲状腺癌细胞生物学行为的影响。**方法** 实时定量 PCR(RT-qPCR)分析 21 例甲状腺癌组织和对应癌旁组织中 circ_0000064 和 miR-503 的表达水平。将 circ_0000064 小干扰 RNA(si-circ_0000064)、miR-503 模拟物、si-circ_0000064+miR-503 抑制物(anti-miR-503)分别转染甲状腺癌 SW579 细胞,采用平板克隆形成实验、细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测 SW579 细胞增殖,Transwell 实验检测 SW579 细胞迁移和侵袭,流式细胞术检测 SW579 细胞凋亡,蛋白质印迹法检测上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)和神经型钙黏蛋白(N-cadherin)表达量。双荧光素酶报告实验和 RT-qPCR 分析 circ_0000064 和 miR-503 的靶向调控关系。**结果** 甲状腺癌组织中 circ_0000064 表达量显著高于癌旁组织($P<0.05$),miR-503 表达量显著低于癌旁组织($P<0.05$)。沉默 circ_0000064 后 SW579 细胞活力、克隆形成数、迁移和侵袭数、N-cadherin 蛋白表达量均显著降低($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表达量显著增加($P<0.05$)。过表达 miR-503 后 SW579 细胞活力、克隆形成数、迁移和侵袭数、N-cadherin 蛋白表达量均显著降低($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表达量显著增加($P<0.05$)。miR-503 是 circ_0000064 的靶基因,沉默 circ_0000064 可显著上调 miR-503 表达($P<0.05$)。抑制 miR-503 表达可显著减弱沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞生物学行为的影响($P<0.05$)。**结论** 沉默 circ_0000064 可通过上调 miR-503 抑制甲状腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,诱导细胞凋亡,从而抑制甲状腺癌进展。

关键词: 甲状腺癌; circ_0000064; miR-503; 细胞增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

中图分类号: R736.1 **文献标识码:** A

Effects of circ_0000064 on the biological behavior of thyroid cancer cells by targeting miR-503

GONG Ye, LIU Siyin, YU Ximei

(Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi, 830001, Xinjiang, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of circular RNA 0000064 (circ_0000064) targeting miR-503 on the biological behavior of thyroid cancer cells. **Methods** The expression levels of circ_0000064 and miR-503 in the thyroid cancer tissues and the corresponding adjacent tissues of 21 cases were assessed using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Circ_0000064 small interfering RNA (si-circ_0000064), miR-503 mimic, si-circ_0000064 + miR-503 inhibitor (anti-miR-503) were transfected into thyroid cancer SW579 cells, respectively. The plate cloning formation test and cell counting kit (CCK-8) method were applied to calculate the proliferation of SW579 cells, and Transwell test was performed to detect the migration and invasion of SW579 cells. Flow cytometry was selected to detect the cell apoptosis, and Western blotting was employed to detect the expressions of epithelial cadherin (E-cadherin) and neural cadherin (N-cadherin) proteins. The targeted regulation relationship between circ_0000064 and miR-503 was confirmed by dual luciferase reporter assay and RT-qPCR. **Results** The expression of circ_0000064 was significantly higher in thyroid cancer tissues than in adjacent

tissues ($P<0.05$), while the expression of miR-503 was significantly lower in thyroid cancer tissues than in adjacent tissues ($P<0.05$). The cell viability, colony formation numbers, migration and invasion numbers, and N-cadherin protein expression of SW579 cells were significantly decreased ($P<0.05$), while E-cadherin protein expression was significantly increased ($P<0.05$) after silencing circ_0000064. The cell viability, colony formation numbers, migration and invasion numbers, N-cadherin protein expression of SW579 cells were significantly decreased ($P<0.05$), while E-cadherin protein expression was significantly increased ($P<0.05$) after overexpressing miR-503. miR-503 was the target gene of circ_0000064, and silencing circ_0000064 significantly increased the expression of miR-503 ($P<0.05$). miR-503 inhibition significantly weakened the effects of silencing circ_0000064 on the biological behavior of SW579 cells ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing circ_0000064 can inhibit the proliferation, migration and invasion, and induce the apoptosis of thyroid cancer cells by up-regulating the expression of miR-503, thereby inhibiting the progression of thyroid cancer.

Keywords: Thyroid cancer; circ_0000064; miR-503; Cell proliferation; Apoptosis; Migration; Invasion

前言

甲状腺癌是最常见的内分泌系统恶性肿瘤类型,更是目前发病率增长最快的恶性肿瘤之一^[1]。90%的甲状腺癌病例为分化型甲状腺癌,经甲状腺切除术、颈淋巴结清扫术、放射性碘、促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)抑制等特定方法治疗后,大多数患者预后良好,但仍存在肿瘤复发、转移风险^[2]。因此,研究甲状腺癌的潜在癌变机制对于制定有效的诊断和治疗策略必不可少。环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类分布广泛、种类繁多的内源性非编码RNA,可通过选择性剪切、转录调节、吸附微小RNA(miRNA, miRNA)等方式参与肿瘤发生中的多个细胞过程,在癌症进展中发挥启动子或抑制子功能^[3-4]。研究发现, circRNA 0000064(circ_0000064)在肺癌中表达上调,其异常表达与晚期分期、淋巴转移、TNM分期等临床特征相关,敲除 circ_0000064可抑制肺癌细胞增殖、阻断细胞周期进程,促进细胞凋亡,是肺癌潜在的生物标志物和治疗靶点^[5]。然而, circ_0000064在甲状腺癌中的表达和功能至今尚未研究。靶基因预测显示, miR-503是 circ_0000064的潜在靶点。已有研究证实,胃癌中 miR-503低表达与患者肿瘤大小、淋巴结转移以及较差的总生存期相关,抑制 miR-503表达可显著促进胃癌细胞恶性增殖和迁移^[6]。结肠癌中 miR-503也呈低表达,恢复其表达具有抗增殖和抗侵袭作用^[7]。基于上述背景,本研究分析了甲状腺癌组织中 circ_0000064和 miR-503的表达水平,研究 circ_0000064对甲状腺癌细胞生物学行为的影响,探讨其机制是否与调控 miR-503表达相关,旨在为甲状腺癌临床诊疗提供可用靶点。

1 材料与方法

1.1 组织来源 收集2017年2月至2019年2月于我院接受手术切除的51例甲状腺癌患者的癌组织和癌旁组织。其中女性46例,男性5例,年龄32~64岁,平均年龄53.15岁。所有组织样品均经病理证实;所有患者术前未接受任何治疗;所有组织样品切除后迅速保存于-80℃冰箱;本研究获得了我院医学伦理委员会的批准,所有患者或其家属均知情同意。

1.2 细胞和试剂 甲状腺癌SW579细胞购于中国典型培养物保藏中心。TRIzol试剂、细胞计数试剂盒(CCK-8)购于北京百奥莱博科技有限公司;PrimeScript逆转录试剂盒购于广州励德生物科技有限公司;miRNA逆转录试剂盒、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡检测试剂盒、通用型SYBR qPCR Master Mix购于南京诺唯赞生物股份有限公司;Lipofectamine 2000购于美国Invitrogen公司; circ_0000064的小干扰RNA(si-circ_0000064)、miR-503模拟物(mimics)、miR-503抑制物(anti-miR-503)、阴性对照(si-NC、miR-NC、anti-miR-NC)、重组荧光素酶报告基因载体购于上海生工生物公司;Transwell小室购于美国Millipore公司;小鼠抗上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、山羊抗鼠IgG二抗购于北京义翘神州科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 实时定量PCR检测 circ_0000064和 miR-503表达 TRIzol试剂提取组织样品的总RNA, Nano-

Drop 2000c 分光光度计测定 RNA 浓度和纯度合格后进行逆转录反应。为检测 circ_0000064 表达,采用 PrimeScript 逆转录试剂盒合成 cDNA。为检测 miR-503 表达,使用 miRNA 逆转录试剂盒合成 cDNA。再用通用型 SYBR qPCR Master Mix 进行 RT-qPCR。2^{-ΔΔCt}法分析 circ_0000064 和 miR-503 相对表达量。circ_0000064 上游引物 5'-GCGAG-GCATCCGCTGCTGACTC-3', 下游引物 5'-GC-TAGCCATGTGTAAGACGGA-3'; GAPDH 上游引物 5'-CGCTCTCTGCTCCTCTGTTC-3', 下游引物 5'-ATCCGTTGACTCCGACCTTCAC-3'; miR-503 上游引物 5'-CCTATTTCCATGATTCCTTCATA-3', 下游引物 5'-GTAATACGGTTATCCACGCG-3'; U6 上游引物 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3', 下游引物 5'-CGCTTCAGAATTTGCGTGTTCAT-3'。

1.3.2 细胞培养、转染和分组 将 SW579 细胞加入含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基,置于 37 °C、CO₂ 体积分数 5%、饱和湿度的培养箱培养,当细胞 80% 融合时,用 0.25% 胰蛋白酶消化吹打为单个细胞,按照 1:3 的比例传代。转染前 24 h 取 1×10⁵ 个第五代对数期细胞,接种在每孔含 500 μL 培养基的 24 孔板,转染时细胞融合度达到 40%。分别用 50 μL Opti-MEM 培养基稀释适量的转染物和 1 μL Lipofectamine 2000,轻轻吸吹 3 次混匀,室温静置 5 min。混合转染试剂和待转染物稀释液,轻轻吸吹 3 次混匀,室温静置 20 min。转染复合物至 24 孔板细胞中,前后摇动平板混合均匀。放入 37 °C、CO₂ 体积分数 5%、饱和湿度的培养箱培养,转染 6 h 后更换为新鲜培养基培养 48 h,收集细胞。根据待转染物的不同,将细胞分为 si-NC 组(转染 si-NC)、si-circ_0000064 组(转染 si-circ_0000064)、miR-NC 组(转染 miR-NC)、miR-503 组(转染 miR-503 mimics)、si-circ_0000064+anti-miR-NC 组(转染 si-circ_0000064 和 anti-miR-NC)、si-circ_0000064+anti-miR-503 组(转染 si-circ_0000064 和 anti-miR-503)。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活力 胰蛋白酶消化各组细胞,将其悬浮在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中。取 100 μL 细胞悬液(约 5×10³ 个细胞)加入 96 孔板,分别培养 24 h、48 h、72 h 后取出一板细胞,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液。将培养板置于培养箱孵育 3 h,用酶标仪测定 450 nm 处光密度(OD 值),以表示细胞活力。

1.3.4 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 把经胰蛋白酶消化的各组细胞悬浮在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中。将细胞悬液稀释,以每板 200 个细胞的密度接种到含 10 mL 37 °C 预温培养液的平板中,轻轻转动使细胞分散均匀,放入培养箱常规培养 2~3 周。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养,弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 2 次,加 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,然后去固定液,加 0.1% 结晶紫染色 10 min,用流水缓慢洗去染色液,空气干燥。在显微镜下计数 >50 个细胞的克隆数。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 将各组细胞消化后悬浮在 1×结合缓冲液中,调整细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL。取 100 μL 细胞悬液加入流式管,分别用 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 溶液在暗室内染色 30 min。用流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.3.6 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭 转染 48 h 后进行 Transwell 实验以评估细胞的迁移和侵袭能力。将各组细胞消化后悬浮在无血清 RPMI-1640 培养基中,取 200 μL 悬液(约 2×10⁵ 个)加入预先涂有(侵袭实验)或未涂有(迁移实验)基质胶的上室,取 600 μL 含 10% 胎牛血清的培养基加入下室作为引诱剂。37 °C 孵育 24 h,用 4% 多聚甲醛固定 Transwell 小室底部穿膜细胞,0.1% 结晶紫染色。在显微镜下随机选择 5 个视野计数,采用均值表示细胞侵袭或迁移数。

1.3.7 蛋白质印迹法检测 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达 总蛋白提取试剂盒分离各组细胞的总蛋白,按照 1:1 的比例将蛋白样品与 2×蛋白上样缓冲液混合,沸水浴加热 5 min 使蛋白变性。取 30 μg 冷却蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离,通过标准湿式转膜仪转移蛋白至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。用 5% 脱脂牛奶溶液 37 °C 封闭膜 2 h,然后用 1:1 000 稀释的一抗溶液 37 °C 孵育膜 2 h,最后用 1:1 000 稀释的二抗溶液 37 °C 孵育膜 1 h。滴加化学发光试剂显色,以 GAPDH 为内参,使用凝胶成像系统分析目的蛋白表达量。

1.3.8 双荧光素酶报告实验 利用 Circular RNA Interactome 软件预测 circ_0000064 与 miR-503 之间的结合位点,化学合成含有假定的 miR-503 结合位点的野生型(WT)或突变型(MUT) circ_0000064 片

段,并插入 psiCHECK2 荧光素酶报告基因载体,分别命名为 WT-circ_0000064、MUT-circ_0000064。使用 Lipofectamine 2000 将上述重组载体分别与 miR-503 mimic 或 miR-NC 共转染 SW579 细胞。转染 48 h 后通过双荧光素酶报告基因检测系统测定细胞裂解液中萤火虫和海肾荧光素酶的活性,以海肾荧光素酶为内参,计算相对荧光素酶活性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 进行统计学分析,实验独立重复

3 次,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用独立样本 *t* 检验分析两组间差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 circ_0000064 和 miR-503 表达检测

甲状腺癌组织中 circ_0000064 的表达量显著高于癌旁组织 ($P<0.05$),而 miR-503 的表达量显著低于癌旁组织 ($P<0.05$)(图 1)。

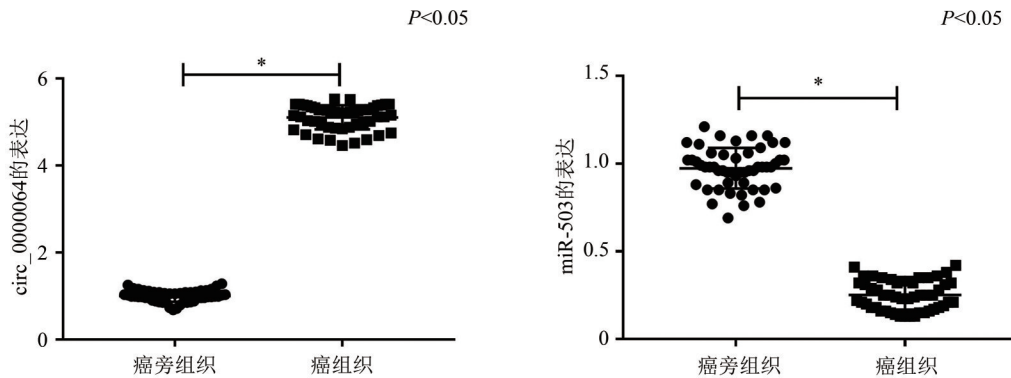


图 1 circ_0000064 和 miR-503 的表达 ($n=51$)

Fig. 1 Expressions of circ_0000064 and miR-503 ($n=51$)

2.2 沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞增殖和凋亡的影响

si-circ_0000064 组细胞中 circ_0000064 表达量、细胞活力(48 h、72 h)、集落形成数均显著低于 si-NC 组 ($P<0.05$),凋亡率、miR-503 表达量均显著高于 si-NC 组 ($P<0.05$)(图 2、表 1)。

2.3 沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞迁移和侵袭的影响

si-circ_0000064 组细胞迁移和侵袭数、N-cadherin 蛋白表达量均显著低于 si-NC 组 ($P<0.05$), E-cadherin 蛋白表达量显著高于 si-NC 组 ($P<0.05$)(图 3、表 2)。

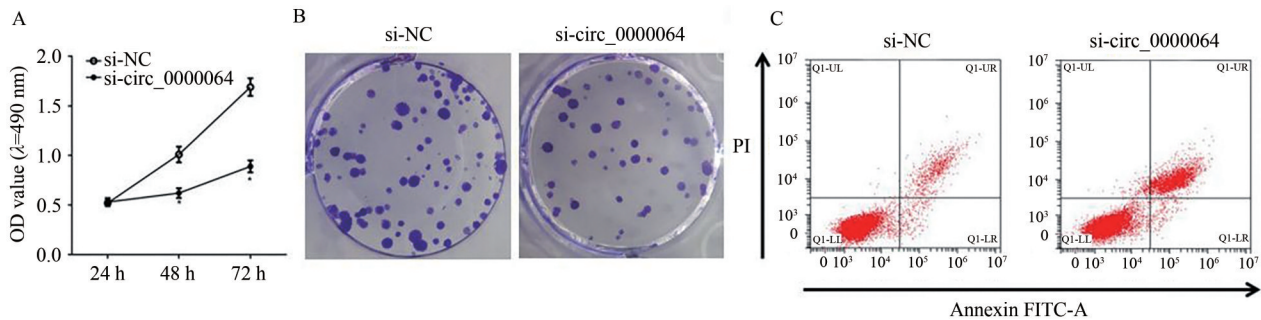


图 2 沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞增殖和凋亡的影响

Fig. 2 The effect of silencing circ_0000064 on the proliferation and apoptosis of SW579 cells

2.4 circ_0000064 和 miR-503 靶向关系验证

Circular RNA interactome 预测到 miR-503 与 circ_0000064 存在特异性互补序列(图 4)。同与 WT-circ_0000064 共转染,miR-503 组细胞相对荧光素酶活性显著低于 miR-NC 组 ($P<0.05$);同与

MUT-circ_0000064 共转染,miR-503 组细胞相对荧光素酶活性与 miR-NC 组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)(表 3)。

2.5 过表达 miR-503 对 SW579 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

miR-503 组 SW579 细胞 miR-503

表 1 沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞克隆形成和凋亡的影响 (n=3)

Tab. 1 The effects of silencing circ_0000064 on the clone formation and apoptosis of SW579 cells (n=3)

组别	circ_0000064	miR-503	集落形成数	凋亡率/%
si-NC	1.00±0.00	1.00±0.00	119.67±4.92	8.19±0.54
si-circ_0000064	0.20±0.02	4.25±0.08	56.00±1.63	23.92±0.88
<i>t</i>	69.282	70.365	21.277	26.388
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

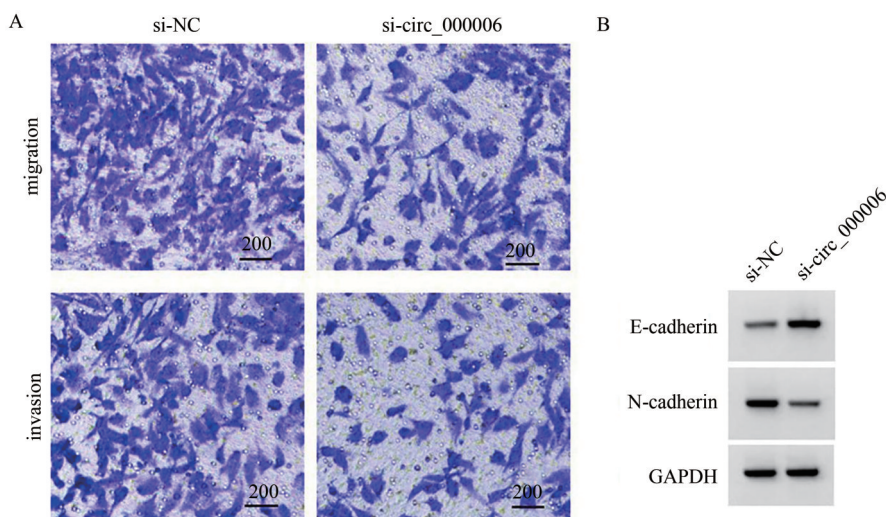


图 3 沉默 circ_0000064 抑制 SW579 细胞迁移和侵袭

Fig. 3 Silencing circ_0000064 inhibits the migration and invasion of SW579 cells

表 2 沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞迁移和侵袭的影响 (n=3)

Tab. 2 The effects of silencing circ_0000064 on the migration and invasion of SW579 cells (n=3)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数	E-cadherin	N-cadherin
si-NC	242.67±6.24	157.33±4.50	0.23±0.02	0.68±0.05
si-circ_0000064	122.00±2.45	71.67±2.05	0.76±0.05	0.26±0.02
<i>t</i>	31.178	30.004	17.047	13.509
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

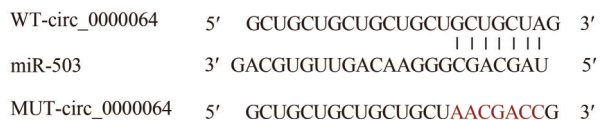


图 4 circ_0000064 和 miR-503 的互补序列

Fig. 4 Complementary sequence of circ_0000064 and miR-503

表 3 双荧光素酶报告实验结果 (n=3)

Tab. 3 Results of double luciferase report experiment (n=3)

组别	WT-circ_0000064	MUT-circ_0000064
miR-NC	0.98±0.07	0.97±0.07
miR-503	0.27±0.03	0.98±0.06
<i>t</i>	16.147	0.188
<i>P</i>	<0.05	0.860

表达量、凋亡率、E-cadherin 表达量均显著高于 miR-NC 组 ($P<0.05$), 集落形成数、细胞活力 (48 h、72 h)、迁移和侵袭数、N-cadherin 蛋白表达量均显著低于 miR-NC 组 ($P<0.05$) (图 5、表 4)。

2.6 抑制 miR-503 能逆转沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞增殖和凋亡的作用 与 si-circ_0000064+anti-miR-NC 组比较, si-circ_0000064+anti-miR-503 组 SW579 细胞 miR-503 表达量、凋亡率均显著降低 ($P<0.05$), 集落形成数、细胞活力 (48 h、72 h) 均显著升高 ($P<0.05$) (图 6、表 5)。

2.7 抑制 miR-503 能逆转沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞迁移和侵袭的作用 si-circ_0000064+anti-miR-503 组 SW579 细胞迁移和侵袭数、N-cad-

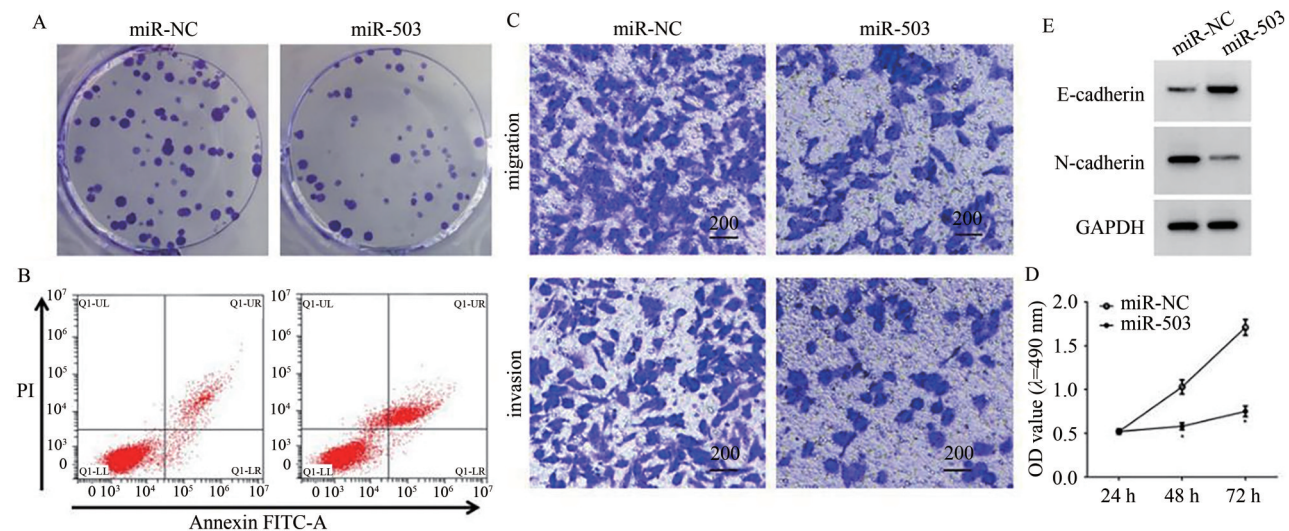


图 5 miR-503 抑制 SW579 细胞活性、克隆形成、迁移、侵袭并诱导凋亡

Fig. 5 miR-503 inhibits the activity, clone formation, migration and invasion of SW579 cells and induces cell apoptosis

表 4 miR-503 对 SW579 细胞克隆形成、凋亡、迁移和侵袭的影响 (n=3)

Tab. 4 The effects of miR-503 on the clone formation, apoptosis, migration and invasion of SW579 cells (n=3)

组别	miR-503	集落形成数	凋亡率/%	迁移细胞数	侵袭细胞数	E-cadherin	N-cadherin
miR-NC	1.00±0.00	121.33±5.31	8.26±0.54	244.33±7.59	158.67±5.73	0.24±0.02	0.69±0.06
miR-503	5.55±0.13	47.00±0.82	26.65±1.05	100.33±3.30	57.67±1.70	0.86±0.06	0.15±0.01
<i>t</i>	60.622	23.961	26.977	30.130	29.269	16.979	15.376
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

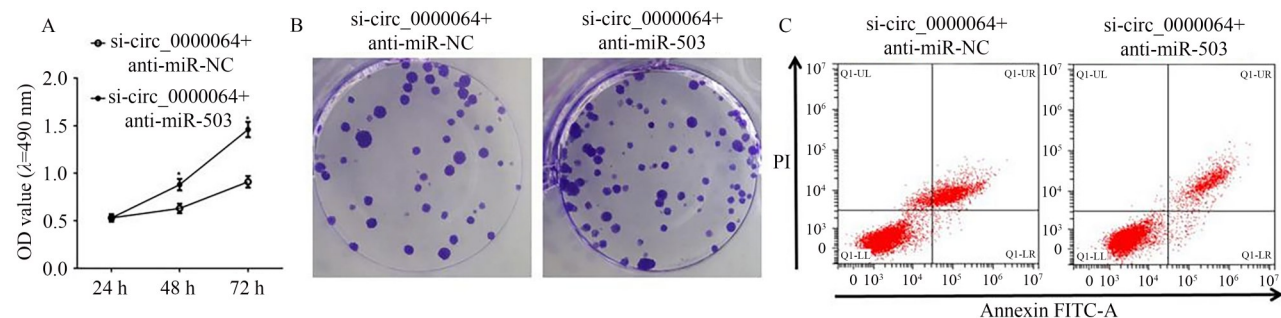


图 6 抑制 miR-503 可减弱沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞增殖和凋亡的作用

Fig. 6 Inhibition of miR-503 can attenuate the effects of silencing circ_0000064 on the proliferation and apoptosis of SW579

表 5 抑制 miR-503 可减弱沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞集落形成和凋亡的作用 (n=3)

Tab. 5 Inhibition of miR-503 can attenuate the effects of silencing circ_0000064 on the colony formation and apoptosis of SW579 cells (n=3)

组别	miR-503	集落形成数	凋亡率/%
si-circ_0000064+anti-miR-NC	4.27±0.06	56.00±2.45	24.19±0.98
si-circ_0000064+anti-miR-503	1.29±0.05	104.33±3.86	12.52±0.50
<i>t</i>	66.086	18.310	18.372
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

herin 蛋白表达量均显著高于 si-circ_0000064+anti-miR-NC 组, E-cadherin 蛋白表达量显著低于 si-circ_0000064+anti-miR-NC 组(图 7、表 6)。

3 讨论

circRNA 是各种生理和病理过程中的关键调控

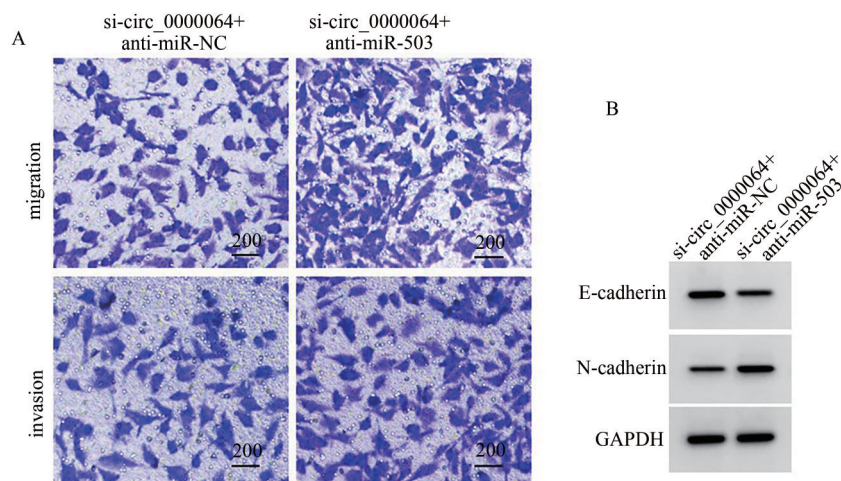


图7 抑制 miR-503 可减弱沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞迁移和侵袭的抑制作用

Fig. 7 Inhibition of miR-503 can attenuate the inhibitory effects of silencing circ_0000064 on the migration and invasion of SW579 cells

表6 抑制 miR-503 可减弱沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞迁移和侵袭的作用 (n=3)

Tab. 6 Inhibition of miR-503 can attenuate the inhibitory effects of silencing circ_0000064 on the migration and invasion of SW579 cells (n=3)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数	E-cadherin	N-cadherin
si-circ_0000064+anti-miR-NC	121.00±4.08	72.67±1.70	0.77±0.05	0.26±0.02
si-circ_0000064+anti-miR-503	213.00±5.89	137.00±3.74	0.35±0.02	0.54±0.05
<i>t</i>	22.240	27.122	13.509	9.006
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	0.001

因子,其表达水平与患者的临床特征密切相关,其异常表达往往导致恶性生物学行为^[8]。如 circ_0058124 与乳头状甲状腺癌患者的恶性特征和不良预后相关^[9]。circ_102002 在甲状腺癌组织和细胞中表达上调,并促进上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和细胞迁移^[10]。敲减 circNEK6 可显著降低甲状腺癌细胞的增殖和侵袭能力^[11]。因此,确定 circRNAs 与甲状腺癌进展的关系至关重要。有研究报道, circ_0000064 高表达的肝癌患者病理分期明显高于低表达患者,总生存率明显低于低表达患者,是预测肝癌患者预后的潜在标志物^[12]。本研究发现,甲状腺癌组织中 circ_0000064 表达显著上调,表明 circ_0000064 表达上调可能有助于甲状腺癌的进展。为证实 circ_0000064 的作用,本研究进行了功能缺失实验,结果显示,转染 si-circ_0000064 沉默 circ_0000064 可显著增加甲状腺癌 SW579 细胞的凋亡率,并降低细胞活力和克隆形成能力,这与沉默 circ_0000064 在肝癌、肺癌中的作用一致。EMT 是细胞失去上皮性特征、获得间质性特征的过程。在包括甲状腺癌在内的多种实体瘤中,EMT 与肿瘤的发生、侵袭、转

移和治疗抵抗有关^[13]。本研究证实,沉默 circ_0000064 可显著下调间质表型蛋白 N-cadherin 表达,上调上皮表型蛋白 E-cadherin 表达,降低 SW579 细胞的迁移和侵袭能力,表明 circ_0000064 可能通过抑制 EMT 对甲状腺癌细胞发挥迁移和侵袭抑制作用。

circ_0000064 的功能主要与调控 miRNA 表达相关。例如, circ_0000064 靶向 miR-143 可促进肝癌进展^[12]; circ_0000064 通过与 miR-143 相互作用加剧糖尿病肾病系膜细胞增殖和纤维化^[14]。通过双荧光素酶报告实验,本研究证实 miR-503 是 circ_0000064 的直接靶点。miR-503 为 miR-424 (322)/-503 簇成员,参与细胞周期进展、EMT、应激反应等基本细胞过程,参与调控组织分化、肿瘤的启动和进展^[15]。研究发现,结肠癌中 miR-503 呈低表达,miR-503 通过直接下调血管内皮生长因子-A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 抑制结肠癌的肿瘤发生、血管生成和淋巴管生成^[16]。上调 miR-503 可通过靶向调控 E2F 转录因子 3 (E2F3) 抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖、侵袭、迁移和 EMT^[17]。此外, miR-503 作为 circRNA 酪氨酸激酶受体 2

(circ-ERBB2)、circRNA 酸性神经肽(circ-BANP)等 circRNAs 的分子海绵,介导其在胃癌、肺癌中的致癌作用^[18-19]。本研究发现,甲状腺癌组织中 miR-503 表达下降。分析 miR-503 功能发现,转染 miR-503 mimics 可显著下调 N-cadherin 表达,上调 E-cadherin 表达,促进甲状腺癌 SW579 细胞凋亡,降低其活力以及克隆形成、迁移和侵袭能力,这与沉默 circ_0000064 对 SW579 细胞的抗癌效果类似,提示 miR-503 在甲状腺癌中具有抑癌功能,circ_0000064 可能通过靶向 miR-503 参与甲状腺癌的进展。恢复实验显示,抑制 miR-503 表达可显著逆转沉默 circ_0000064 对甲状腺癌 SW579 细胞生物学行为以及 EMT 相关蛋白表达的影响,恢复 SW579 细胞的异常凋亡和恶性增殖、迁移、侵袭能力,进一步证实了 circ_0000064 通过靶向 miR-503 参与甲状腺癌的进展。然而,本研究仍有不足之处,如 miR-503 的下游靶基因仍需阐明。此外,还需要补充体内实验进一步验证 circ_0000064/miR-503 途径在甲状腺癌进展中的作用。

总之,甲状腺癌中 circ_0000064 表达上调,miR-503 表达下调。沉默 circ_0000064 可通过上调 miR-503 诱导甲状腺癌细胞凋亡,抑制其增殖、迁移和侵袭。circ_0000064/miR-503 有望成为临床诊治甲状腺癌的靶点。

参考文献

- [1] 陈金东. 中国各类癌症的发病率和死亡率现状及发展趋势[J]. 遵义医学院学报, 2018, 41(6): 653-662. DOI: 10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2018.0134.
- [2] VALERIO L, PIERUZZI L, GIANI C, et al. Targeted therapy in thyroid cancer: state of the art [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2017, 29(5): 316-324. DOI: 10.1016/j.clon.2017.02.009.
- [3] LI R, JIANG J J, SHI H, et al. CircRNA: a rising star in gastric cancer [J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(9): 1661-1680. DOI: 10.1007/s00018-019-03345-5.
- [4] CHEN D S, MA W, KE Z Y, et al. CircRNA hsa_circ_100395 regulates miR-1228/TCF21 pathway to inhibit lung cancer progression [J]. Cell Cycle, 2018, 17(16): 2080-2090. DOI: 10.1080/15384101.2018.1515553.
- [5] LUO Y H, ZHU X Z, HUANG K W, et al. Emerging roles of circular RNA hsa_circ_0000064 in the proliferation and metastasis of lung cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 892-898. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.015.
- [6] LI W J, LI J, MU H, et al. MiR-503 suppresses cell proliferation and invasion of gastric cancer by targeting HMGA2 and inactivating WNT signaling pathway [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 164. DOI: 10.1186/s12935-019-0875-1.
- [7] LI L H, ZHANG X L, YI Z X, et al. MiR-503 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells by regulating

PDCD4 [J]. J BUON, 2018, 23(3): 579-586.

- [8] YIN Y T, LONG J L, HE Q L, et al. Emerging roles of circRNA in formation and progression of cancer [J]. J Cancer, 2019, 10(21): 5015-5021. DOI: 10.7150/jca.30828.
- [9] YAO Y, CHEN X Y, YANG H, et al. Hsa_circ_0058124 promotes papillary thyroid cancer tumorigenesis and invasiveness through the NOTCH3/GATAD2A axis [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 318. DOI: 10.1186/s13046-019-1321-x.
- [10] ZHANG W, LIU T, LI T S, et al. Hsa_circRNA_102002 facilitates metastasis of papillary thyroid cancer through regulating miR-488-3p/HAS2 axis [J]. Cancer Gene Ther, 2021, 28(3/4): 279-293. DOI: 10.1038/s41417-020-00218-z.
- [11] CHEN F K, FENG Z P, ZHU J L, et al. Emerging roles of circRNA_NEK6 targeting miR-370-3p in the proliferation and invasion of thyroid cancer via Wnt signaling pathway [J]. Cancer Biol Ther, 2018, 19(12): 1139-1152. DOI: 10.1080/15384047.2018.1480888.
- [12] WU L, XU X M, LI Y, et al. Circ_0000064 adsorption of microRNA-143 promotes malignant progression of hepatocellular carcinoma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(21): 9321-9330. DOI: 10.26355/eurrev_201911_19425.
- [13] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(3): 212-226. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.12.001.
- [14] GE X X, XI L Q, WANG Q Q, et al. Circular RNA Circ_0000064 promotes the proliferation and fibrosis of mesangial cells via miR-143 in diabetic nephropathy [J]. Gene, 2020, 758: 144952. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144952.
- [15] WANG F, LIANG R, TANDON N, et al. H19X-encoded miR-424(322)/-503 cluster: emerging roles in cell differentiation, proliferation, plasticity and metabolism [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(5): 903-920. DOI: 10.1007/s00018-018-2971-0.
- [16] WEI L L, SUN C N, ZHANG Y T, et al. MiR-503-5p inhibits colon cancer tumorigenesis, angiogenesis, and lymphangiogenesis by directly downregulating VEGF-A [J]. Gene Ther, 2022, 29(1/2): 28-40. DOI: 10.1038/s41434-020-0167-3.
- [17] 冉伟, 曾玉华, 马晓洁, 等. MiR-503-5p 通过靶向调控 E2F3 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、侵袭、迁移和上皮间质化的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2020, 51(2): 178-184. DOI: 10.12182/20200360501.
- [18] LI X S, HE M, GUO J J, et al. Upregulation of circular RNA circ-ERBB2 predicts unfavorable prognosis and facilitates the progression of gastric cancer via miR-503/CACUL1 and miR-637/MMP-19 signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 511(4): 926-930. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.03.010.
- [19] HAN J Q, ZHAO G B, MA X, et al. CircRNA circ-BANP-mediated miR-503/LARP1 signaling contributes to lung cancer progression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 2429-2435. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.172.

校稿: 李征 王娟

本文引用格式: 龚烨, 刘思吟, 余喜梅. circ_0000064 靶向 miR-503 对甲状腺癌细胞生物学行为的影响[J]. 肿瘤药学, 2023, 13(2): 173-180. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.02.07.

Cite this article as: GONG Ye, LIU Siyin, YU Ximei. Effects of circ_0000064 on the biological behavior of thyroid cancer cells by targeting miR-503 [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2023, 13(2): 173-180. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.02.07.